

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

Caracterización de nuevos ligandos cannabinoides con potencial neuroprotector|

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Gómez Cañas

Directores

M^a Ruth Pazos Rodríguez
Moisés García Arencibia
Javier Fernández Ruiz

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS
LIGANDOS CANNABINOIDES CON
POTENCIAL NEUROPROTECTOR**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Gómez Cañas

Bajo la dirección de

Dra. M^a Ruth Pazos Rodríguez

Dr. Moisés García Arencibia

Dr. Javier Fernández Ruiz

MADRID, 2016

M^a RUTH PAZOS RODRÍGUEZ, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular, Investigadora postdoctoral del CIBERNED adscrita al BBMIII, e Investigadora Principal del Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario Fundación de Alcorcón de Madrid,

MOISÉS GARCÍA ARENCIBIA, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, contratado postdoctoral PICATA del Campus de Excelencia Internacional UCM-UPM, e Investigador del Departamento de Ciencias Clínicas, de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

JAVIER FERNÁNDEZ RUIZ, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: “Caracterización de nuevos ligandos cannabinoides con potencial neuroprotector” presentada por María Gómez Cañas, Licenciada en Biología, para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado:

Dra. M^a Ruth Pazos Rodríguez

Dr. Moisés García Arencibia

Dr. Javier Fernández-Ruiz

En Madrid a 2 de Septiembre de 2016.

Índice

Lista de abreviaturas	11
Resumen	17
Summary	27
Introducción	37
1 Sistema Cannabinoide Endógeno	41
1.1 Receptores cannabinoides.....	41
1.1.1 Receptor CB ₁	42
1.1.2 Receptor CB ₂	43
1.1.3 Otros receptores cannabinoides	44
1.2 Endocannabinoides.....	46
1.2.1 Anandamida	46
1.2.2 2-Araquidonoil glicerol.....	46
1.2.3 Otros endocannabinoides	47
1.3 Biosíntesis y liberación de endocannabinoides	48
1.4 Inactivación de endocannabinoides	50
1.5 Metabolismo oxidativo de los endocannabinoides.....	52
1.6 Mecanismos de transducción de señales	53
1.6.1 Mecanismos de transducción de señales para los receptores CB ₁ y CB ₂	53
1.6.2 Mecanismos de transducción de señales para otros receptores con los que interactúan los cannabinoides	54
1.6.3 Oligomerización de los receptores cannabinoides.....	55
2 Farmacología del Sistema Cannabinoide	56
2.1 Agonistas de receptores CB ₁ y CB ₂	56
2.1.1 Cannabinoides clásicos.....	56
2.1.2 Cannabinoides no clásicos.....	57
2.1.3 Aminoalquilindoles.....	57
2.1.4 Eicosanoides	58
2.2 Agonistas selectivos del receptor CB ₁	58
2.3 Agonistas selectivos del receptor CB ₂	61
2.4 Antagonistas / agonistas inversos del receptor CB ₁	62
2.5 Antagonistas / agonistas inversos del receptor CB ₂	62
2.6 Antagonistas neutros de los receptores cannabinoides.....	63
2.7 Moduladores alostéricos	64
2.8 Agonistas indirectos de los receptores cannabinoides	66
2.9 Ligandos de los nuevos receptores cannabinoides.....	66
3 Papel fisiológico del Sistema Cannabinoide Endógeno	70
4 Cannabinoides y neuroprotección	72
5 Desarrollo de fármacos cannabinoides	77

Objetivos	79
Materiales y métodos	81
1 Estructura química y descripción de los compuestos	85
1.1 Cromenopirazoles y derivados.....	85
1.2 Pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos.....	87
1.3 Quinonas de fitocannabinoides.....	87
1.3.1 Quinonas de CBG.....	88
1.3.2 Quinonas de CBD.....	88
2 Caracterización farmacológica	90
2.1 Ensayos de unión ligando-receptor.....	90
2.1.1 Primer cribado para descartar compuestos sin afinidad.....	90
2.1.2 Segundo cribado para obtención del valor de K_i	92
2.2 Ensayos de unión de GTP γ S.....	93
2.3 Actividad biológica en un modelo <i>in vitro</i>	96
3 Predicción de parámetros farmacocinéticos	97
4 Determinación de las propiedades neuroprotectoras	98
4.1 Ensayo de neuroprotección en un modelo <i>in vitro</i> :.....	98
4.1.1 Curva de dosis.....	99
4.1.2 Implicación del receptor CB ₂ en el efecto neuroprotector del compuesto 1.56	99
4.2 Ensayo de neuroprotección en un modelo <i>in vivo</i> :.....	100
4.2.1 Animales.....	101
4.2.2 Lesiones con malonato.....	101
4.2.3 Tratamientos.....	101
4.2.4 Recogida de muestras.....	102
4.2.5 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear.....	102
4.2.6 Estudios histopatológicos.....	103
4.2.6.1 Tinción de Nissl.....	103
4.2.6.2 Análisis de la apoptosis.....	103
4.2.6.3 Análisis inmunohistoquímicos.....	104
5 Validación de la posible actividad del compuesto 1.56 sobre los receptores GPR55 y PPARγ	104
5.1 Actividad sobre GPR55.....	104
5.2 Actividad sobre PPAR γ	105
6 Análisis estadísticos	106
Resultados	107
1 Estudios de afinidad por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂	109
1.1 Cromenopirazoles y derivados.....	109
1.2 Pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos.....	110

1.3	Quinonas de fitocannabinoides	113
1.4	Selección de los compuestos para continuar con la caracterización farmacológica	114
2	Predicción de propiedades farmacocinéticas en un modelo <i>in silico</i>	115
3	Estudios de funcionalidad del receptor CB₂	117
3.1	Ensayos de unión de GTPγS	117
3.2	Actividad biológica en células de microglía en cultivo	118
4	Evaluación del papel neuroprotector del compuesto 1.56	122
4.1	Efecto neuroprotector del compuesto 1.56 en un modelo <i>in vitro</i>	122
4.1.1	Efecto protector del compuesto 1.56 dependiente de concentración	123
4.1.2	Implicación del receptor CB ₂ en el efecto neuroprotector del compuesto 1.56 ..	125
4.2	Efecto neuroprotector del compuesto 1.56 en un modelo <i>in vivo</i>	125
4.2.1	Determinación de la dosis efectiva.....	126
4.2.2	Implicación del receptor CB ₂ en el efecto neuroprotector del compuesto 1.56...	127
5	Estudio del efecto del compuesto 1.56 sobre los receptores GPR55 y PPARγ	130
5.1	Efecto sobre GPR55.....	130
5.2	Efecto sobre PPARγ.....	131
	Discusión	109
1	Evaluación de afinidad y selectividad por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ 138	
2	Predicción de propiedades farmacocinéticas	140
3	Estudios de funcionalidad del receptor CB₂	143
4	Evaluación del papel neuroprotector del compuesto 1.56	144
5	Estudio del efecto del compuesto 1.56 sobre los receptores GPR55 y PPARγ	146
6	Resumen de la discusión	146
	Conclusiones	137
	Bibliografía	151
	Anexos	193
1	Índice de figuras	195
1.1	Introducción	195
1.2	Materiales y métodos	195
1.3	Resultados.....	196
2	Índice de tablas	198
2.1	Introducción	198
2.2	Materiales y métodos	198
2.3	Resultados.....	198
2.4	Discusión	199
3	Publicaciones relacionadas con la Tesis	200
4	Otras publicaciones durante el periodo de la Tesis	201

Lista de abreviaturas

[³⁵S]GTPγS: Guanosina 5'-O-(γ-tio)trifosfato marcada con el isótopo ³⁵S
Δ⁸-THC: Δ⁸- tetrahidrocannabinol
Δ⁹-THC: Δ⁹- tetrahidrocannabinol
12-HAEA: 12-ácido hidroxil-*N*-araquidonoiletanolamina
12-HPETE: ácido 12-hidroxiperoxi-eicosatetraenoico
12-LOX: lipooxigenasa tipo 12
15-HAEA: 15-ácido hidroxil-*N*-araquidonoiletanolamina
15-HETE: ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico
15-HETE-G: 15- ácido hidroxi-eicosatetraenoico-gliceril
15-HPETE: ácido 15-hidroxiperoxi-eicosatetraenoico
15-LOX: lipooxigenasa tipo 15
2-AG: 2-araquidonoilglicerol
2-AGE: 2-araquidonilgliceril éter o noladin éter
2-LG: 2-linoleilglicerol
2-OG: 2-oleilglicerol
5-HETE: ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico
5HT-3: receptor de serotonina tipo 3
AA: ácido araquidónico
ABHD12: α/β hidrolasa de dominio tipo 12
ABHD4: α/β hidrolasa de dominio tipo 4
ABHD6: α/β hidrolasa de dominio tipo 6
Abn-CBD: del inglés: Abnormal-cannabidiol
AC: adenilil ciclasa
ACEA: araquidonoil-2'-cloroetilamida
ACPA: araquidonilciclopropilamida
ADME: Adsorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADMET: Adsorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad
AEA: *N*-araquidonoiletanolamina o anandamida
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
AMT: transportador de anandamida
ATP: adenosina trifosfato
azPC: del inglés: hexadecyl azelaoyl phosphatidylcholine
BHE: Barrera hematoencefálica
BSA: del inglés: bovine serum albumin
CB₁: receptor cannabinoide 1
CB₂: receptor cannabinoide 2
CB₃: receptor cannabinoide "de tipo 3"
CBC:cannabicromeno
CBD: cannabidiol
CBD-Q: quinona de cannabidiol

CBG: cannabigerol
CBG-Q: quinona de cannabigerol
CBN: cannabinol
COX-1: ciclooxigenasa tipo 1
COX-2: ciclooxigenasa tipo 2
COXs: ciclooxigenasas
CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DAG: diacilglicerol
DAGL: diacilglicerol lipasa
DHEA: *N*-docosahexaenoiletanolamina
DMSO: dimetilsulfóxido
dpm: desintegraciones por minuto
DSE: supresión de excitación inducida por despolarización
DSI: supresión de inhibición inducida por despolarización
EA: enfermedad de Alzheimer
ECBs: ligandos cannabinoides endógenos o endocannabinoides
EEM: error estándar de la media
EET: ácido epoxieicosatetraenoico
EH: enfermedad de Huntington
ELA: esclerosis lateral amiotrófica
EM: esclerosis múltiple
EMA: del inglés: European Medical Agency
Emax: eficacia o efecto máximo
EP: enfermedad de Parkinson
EPEA: *N*-eicosapentaenoiletanolamina
FAAH: amido hidrolasa de ácidos grasos
FBS: suero fetal bovino
FDA: del inglés: Food and Drug Administration
GDP β S: guanosina-5'-O-(2-thiodifosfato)
GIRK: del inglés G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels
GPCRs: del inglés: G protein-coupled receptors
GTP: guanosina trifosfato
GTP γ S: Guanosina 5'-O-(γ -tio)trifosfato
HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico
HL: hemisferio lesionado
HNL: hemisferio no lesionado
HRP: peroxidasa de rábano, del inglés: horseradish peroxidase
HSA: del inglés: human serum albumin
i.p.: intraperitoneal
IL-6: interleuquina de tipo 6

iNOS: del inglés: inducible nitric oxide synthase
IP3: inositol-1,4,5-trifosfato
IQM: Instituto de Química Médica
K_i: constante de inhibición
L: lesión
LEA: linoleoiletanolamida
liso-NAPE: *N*-araquidonoil-lisofosfatidiletanolamina
liso-PI: 2-araquidonoil-lisofosfatidilinositol
liso-PLC: fosfolipasa C, selectiva de lisofosfatidilinositol
liso-PLD: lisofosfolipasa D
LOXs: lipooxigenasas
LPI: lisofosfatidilinositol
LPS: lipopolisacárido
LTD: depresión a largo plazo
LTP: potenciación a largo plazo
MAGL: monoacilglicerol lipasa
MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MC: medio condicionado
Met-AEA: metanandamida
MTT: ensayos de de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
NAAA: *N*-aciletanolamina amidasa ácida
NADA: *N*-araquidonoil dopamina
NAEs: *N*-aciletanolamidas
NAGly: *N*-araquidonoilglicina
NAPE: *N*-araquidonoilfosfatidiletanolamina
NAPE-PLD: Fosfolipasa D específica de NAPE
NAT: *N*-aciltransferasa
NMDA: *N*-metil D-aspartato
NO: óxido nítrico
NOS: del inglés: nitric oxide synthase
NPAA: amidasa selectiva de PEA*
OEA: oleiletanolamida
OLDA: oleildopamina
PA: ácido fosfatídico
PALDA: palmitoildopamina
PBS: del inglés: Phosphate Buffered Saline
PC: Fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
PEA*: palmitoiletanolamida
PGE-2: prostaglandina E2

PI: Fosfatidilinositol
PI3K: fosfatidilinositol-3-kinasa
PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C
PLA1: fosfolipasa A1
PLC: fosfolipasa C
PMSF: del inglés: phenylmethylsulfonyl fluoride
PPARs: receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPAR γ : receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo γ
PTPN22: proteína tirosina fosfatasa 22
RMN: resonancia magnética nuclear
ROS: del inglés, reactive oxygen species
RXR: receptor X retinoide
SCE: Sistema Cannabinoide Endógeno o Endocannabinoide
SEA: estearoiletanolamida
SHIP1: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 5-fosfatasa1
SNC: Sistema Nervioso Central
sPLA2: fosfolipasa secretora A2
STERADA: esteroildopamina
TRPA: del inglés: transient receptor potential anquirin
TRPM: del inglés: transient receptor potential melastatin
TRPs: del inglés: transient receptor potential
TRPV: del inglés: transient receptor potential vanilloid
TUNEL: del inglés: TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling

Resumen

**Todas las abreviaturas empleadas en el resumen, son explicadas por primera vez en el texto que comienza con la Introducción y están incluidas en el apartado de Lista de abreviaturas.*

Desde que se descubrió el principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC) y sus efectos farmacológicos sobre el organismo, se investigó la posible existencia de los receptores sobre los que podría actuar esta molécula, así como la de sus ligandos endógenos cannabimiméticos y la maquinaria enzimática responsable de la síntesis y degradación de eCBs. Al conjunto de estos elementos se le denominó SCE.

En la actualidad se conocen dos receptores cannabinoides, ambos de la familia de GPCRs, denominados CB₁ y CB₂, cuya homología es del 44%, la cual asciende al 68% si se atiende a los segmentos transmembrana. El primero se localiza fundamentalmente en SNC, aunque también se ha observado su presencia en varios órganos periféricos; mientras que la distribución del segundo se ha considerado clásicamente periférica, principalmente en células del sistema inmune, aunque también se ha observado su presencia en distintos tipos de células del SNC, especialmente en células gliales activadas. Los efectos psicoactivos provocados por los cannabinoides, se deben a la activación del receptor CB₁, al estar ubicado en neuronas de determinadas áreas del cerebro relacionadas con procesos cognitivos y emocionales. Existen además, nuevas dianas para los cannabinoides como el receptor ionotrópico TRPV1, los receptores nucleares PPAR y otros receptores metabotrópicos, sobre los que aún existe controversia sobre su ligando endógeno, como los receptores GPR55 o GPR18.

En cuanto a las moléculas con capacidad para activar los receptores cannabinoides, se encuentran los fitocannabinoides (cannabinoides presentes en la planta), los eCBs (moléculas endógenas de origen animal) y cannabinoides de nueva síntesis, que se han desarrollado para mejorar las propiedades de los cannabinoides naturales y ser utilizados como terapia o como herramienta en el laboratorio. Los principales eCBs son la AEA y el 2-AG, ambos derivados del AA, los cuales se comportan como agonistas de los receptores CB₁ y CB₂. También se conocen más moléculas cannabimiméticas endógenas que tienen capacidad de activar los receptores, o bien de potenciar la señalización endocannabinoide, impidiendo la degradación de los principales eCBs. Se han estudiado los mecanismos de síntesis y degradación fundamentalmente de la AEA y el 2-AG, los cuales son sintetizados a demanda y degradados tras su acción. En cuanto a la AEA, su síntesis es fundamentalmente llevada a cabo por la acción consecutiva de dos enzimas dependientes de calcio: la NAT y la NAPE-PLD, aunque existen otras rutas alternativas, y su degradación tiene lugar principalmente por la acción de una serín-hidrolasa llamada FAAH. En cuanto al 2-AG, su síntesis es llevada a cabo a partir de DAG mediante la acción de una DAGL, aunque al igual que para la AEA, también hay otras rutas alternativas para su síntesis, y su degradación tiene lugar por la acción de la enzima MAGL, aunque existen otras con capacidad semejante. Aunque no se consideran mecanismos de degradación por la cantidad de metabolitos secundarios que se originan, los eCBs también pueden ser sometidos a rutas de metabolismo oxidativo, originando EETs y HETEs por la acción de LOXs y COXs, respectivamente.

Se han descrito numerosos mecanismos de señalización mediados por la activación de los receptores CB₁ y CB₂, entre los que destacan: (i) inhibición de la AC; (ii) activación de distintas MAPK como p44/42, JNK y p38, implicadas en procesos de diferenciación, crecimiento y muerte

celular, y de PI3K y Akt, asociadas con efectos pro-supervivencia; (iii) la modulación de la síntesis del esfingolípido proapoptótico ceramida, cuya acumulación permite la activación de la cascada de señalización de ERK, promoviendo la detención del ciclo celular y la apoptosis; (iv) activando la proteína PLC tras un aumento de calcio intracelular, desencadenando distintas rutas de señalización. Además el receptor CB₁, pero no el CB₂, presenta la capacidad de modular distintos canales iónicos y está involucrado en la activación de la enzima NOS. Se ha observado además la capacidad que presentan ambos receptores cannabinoides para formar dímeros entre ellos, así como otros heterómeros con otros receptores GPCR, lo que implica un aumento en la complejidad de su señalización y sus efectos biológicos y farmacológicos.

La amplia y ubicua distribución en el organismo y a la multitud de mecanismos de señalización celular en los que se ve implicado este sistema, confieren al SCE una importancia fisiológica y fisiopatológica muy relevantes. Por ello, las investigaciones continúan para caracterizar nuevos receptores cannabinoides, estudiar los mecanismos y cascadas de señalización derivadas de la activación de estos receptores e implicadas en las funciones celulares y tisulares del SCE, y además, diseñar y sintetizar nuevos ligandos más selectivos y estables, con mejor biodisponibilidad, así como con capacidad de unirse y activar o inhibir las nuevas dianas del SCE. Por ello, se han generado una gran cantidad de nuevas moléculas, como agonistas y antagonistas selectivos para los receptores CB₁ y CB₂ así como de los nuevos receptores cannabinoides, moduladores alostéricos y agonistas indirectos que tengan la capacidad de inhibir la recaptación de los eCBs o de inhibir su degradación. Desde hace varios años ya se han desarrollado fármacos basados en estas moléculas, que se han empleado para el tratamiento de distintos síntomas asociados con diversas patologías, como Marinol[®] (como antiemético y para el tratamiento del síndrome de anorexia/caquexia en pacientes con VIH o cáncer terminal), Cesamet[®] (como antiemético), Acomplia[®] (para el tratamiento de obesidad y síndrome metabólico) y Sativex[®] (para tratar la espasticidad en pacientes con EM).

El papel fisiológico del SCE es muy amplio y está implicado en numerosos procesos teniendo un efecto regulador sobre distintos sistemas, órganos y tejidos como: (i) sistema nervioso, (ii) sistema inmune; (iii) sistema cardiovascular, (iv) sistema endocrino, (v) órganos periféricos que controlan el metabolismo energético, y (vi) huesos. Además, el SCE tiene efectos reguladores de la supervivencia celular en diferentes tejidos. En cualquier caso, la función que primero se descubrió para este sistema, y la que parece más relevante, es la que tiene que ver con la modulación de procesos neurales y, en particular, una de las funciones mejor establecidas es la regulación de la función sináptica. En este contexto, el papel neuromodulador del SCE abarca numerosos procesos neurobiológicos entre los que se incluyen: control de la actividad motora, nocicepción, memoria y aprendizaje, procesos cognitivos, regulación neuroendocrina, emesis, termorregulación, control de la ingesta y el apetito, control del sueño, desarrollo cerebral, y regulación de la supervivencia e integridad neuronal. Atendiendo a esto último, se ha estudiado cómo este sistema está altamente implicado en procesos de neuroprotección, confiriéndole una gran importancia como diana farmacológica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o de daño neuronal agudo.

En general se ha observado el potencial de este sistema para modular diversos eventos que tienen lugar en este tipo de patologías, estando involucrado en la disminución de la excitotoxicidad (proceso mediado por la activación de receptores CB₁), neuroinflamación (fundamentalmente modulado por la activación de receptores CB₂ en células de glía activadas) y de liberación de ROS (proceso regulado posiblemente por la activación de Nrf-2/PPAR así como por la estructura química que presentan estas moléculas, confiriéndole potencial como lavadores de radicales libres), así como potenciando el proceso de neurogénesis. La modulación de este sistema resulta por tanto beneficiosa para diversas patologías que cursan con procesos de neurodegeneración como: EH, EA, EP, ELA, EM, y eventos hipóxico-isquémicos.

En este contexto, los elementos del SCE podrían servir como dianas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y en concreto, la activación del receptor CB₂, de forma selectiva o combinada con la activación de otras dianas como los receptores PPAR γ , ha suscitado interés en los últimos años y, en particular, en nuestro grupo de investigación. Las razones para ello serían: (i) la activación del receptor CB₂, a diferencia del receptor CB₁, no produce efectos psicoactivos, (ii) la función de receptor CB₂ en SNC es mucho más restringida que la del receptor CB₁, y está especialmente asociada con el proceso de daño neuronal, principalmente inflamatorio, (iii) se ha podido asociar con otras dianas antiinflamatorias como los receptores PPAR γ , produciendo efectos sinérgicos que tiene interés investigar con más detalle. Por todo ello, el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha consistido en la búsqueda de posibles ligandos agonistas específicos del receptor CB₂ con potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas.

Para ello, se ha llevado a cabo una caracterización farmacológica y biológica de un total de 88 moléculas, pertenecientes a 4 familias con distinto origen: 57 moléculas de una serie de cromenopirazoles y derivados, 17 de una serie de pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos, 10 derivados de quinonas de CBG y 4 de quinonas de CBD.

En primer lugar se procedió a evaluar la afinidad de las moléculas por los receptores CB₁ y CB₂ mediante ensayos unión a receptor. Fueron seleccionadas aquellas que cumplieron con dos criterios simultáneamente: presentar un valor de $K_i \leq 50$ nM por el receptor CB₂ (lo que indica una alta afinidad por este receptor), y un valor de la ratio K_i CB₁/ K_i CB₂ ≥ 20 , (lo que fue considerado un valor de selectividad por CB₂ con respecto a CB₁ aceptable). Mediante este análisis fueron seleccionadas 5 moléculas: 1.48, 1.56, 2.5, 2.9 y 2.10.

A continuación, dado que en múltiples ocasiones se descartan posibles fármacos con un atractivo perfil farmacodinámico por problemas asociados con deficiencias en sus propiedades ADME, se llevó a cabo una predicción *in silico* de las propiedades farmacocinéticas de solubilidad acuosa, capacidad de absorción oral, capacidad de unión a HSA, capacidad de atravesar la BHE y capacidad de bloquear los canales de potasio HERG, de los compuestos seleccionados y de los cannabinoides de referencia para el receptor CB₂, JWH-133, HU-308 y SR144528. Para cada propiedad hubo ciertos compuestos que presentaron una predicción favorable, pero tan sólo uno

de ellos, el compuesto 1.56 se mostró apto para todas ellas, y a nivel *in silico*, parece un compuesto con unas prometedoras propiedades ADMET.

A continuación se procedió a evaluar el efecto de los 5 compuestos seleccionados por su afinidad y selectividad por el receptor CB₂. Para ello se desarrollaron ensayos de unión de GTP. De las 5 moléculas se obtuvo un único agonista total del receptor CB₂, el compuesto 1.56. El compuesto 1.48 pareció comportarse como una agonista parcial débil, mientras que los compuestos 2.5, 2.9 y 2.10 presentaron un perfil de potentes, pero poco eficaces, agonistas inversos. Para verificar su efecto, se llevó a cabo un segundo ensayo consistente en un bioensayo *in vitro*, que además de evaluar el efecto de los compuestos a nivel de activación o no del receptor, permite evaluar el comportamiento de estos compuestos sobre células de microglía activada, relacionada con la activación glial presente en eventos de neuroinflamación. Estos ensayos consisten en la medida de liberación de PGE-2 por parte de las células de microglía BV-2, previamente estimuladas con LPS, en presencia o ausencia de los compuestos analizados, solos o co-incubados con SR144528 (para determinar su efecto agonista) o con WIN55,212-2 (para determinar su efecto antagonista). Los resultados mediante este ensayo, no pudieron confirmar los claros resultados obtenidos mediante los ensayos de unión de GTPγS, del efecto agonista del compuesto 1.56, posiblemente por haberse empleado una dosis insuficiente de compuesto. Con respecto al compuesto 1.48, parece tratarse de un compuesto antagonista, resultado más o menos en consonancia al obtenido en el ensayo de unión de GTP, ya que los agonistas débiles o parciales, al competir con un agonista suelen comportarse de este modo. Por último, los compuestos 2.5, 2.9 y 2.10, mostraron un efecto antagonista, de acuerdo con los resultados obtenidos para el ensayo de unión de GTP, aunque sólo en el caso del compuesto 2.5 fue estadísticamente significativo. Por lo tanto, en este proceso de caracterización funcional, sólo se obtuvo un único compuesto agonista selectivo por el receptor CB₂, el compuesto 1.56. Por ello fue el único seleccionado para evaluar su capacidad neuroprotectora.

Para evaluar el potencial neuroprotector del compuesto 1.56 se llevaron a cabo un modelo *in vitro* y uno *in vivo* de muerte neuronal. El modelo de neuroprotección *in vitro* consistió en evaluar la viabilidad de las células neuronales M213-2O al añadirles medios condicionados generados por las células de microglía BV-2, previamente estimuladas con LPS, en presencia o ausencia del compuesto 1.56, co-administrado o no con SR144528. En primer lugar se observó cómo la viabilidad neuronal reducía en presencia del medio condicionado que procedía de microglía estimulada con LPS, mientras que no lo hacía en ausencia de la toxina. Se demostró además que la adición de LPS directamente sobre las neuronas no condicionaba su viabilidad, indicando que la muerte neuronal era mediada por las sustancias proinflamatorias liberadas por las células microgliales. A continuación se estudió que el efecto neuroprotector del compuesto 1.56 era dependiente de dosis, y se concluyó que la concentración óptima del compuesto era de 10 µM. Por último se observó que el efecto neuroprotector del compuesto 1.56 era totalmente revertido cuando además se co-incubaba con el antagonista del receptor CB₂ SR144528 a la concentración de 10 µM, indicando un claro papel neuroprotector del compuesto 1.56 por activación de dicho receptor.

Se estudió además que el efecto era mediado por los receptores CB₂ microgliales, ya que al añadir el compuesto 1.56 directamente sobre las neuronas, su viabilidad no se veía recuperada. Por lo tanto, parece evidente el papel neuroprotector-antiinflamatorio del compuesto 1.56 en este modelo *in vitro*, por la activación de los receptores CB₂ microgliales.

Por todo ello, se procedió a evaluar el potencial neuroprotector del compuesto 1.56 en un modelo *in vivo* de daño mitocondrial e inflamación. Se seleccionó un modelo de lesión intraestriatal unilateral con la toxina malonato en ratas, por su idoneidad para el objetivo propuesto. Los animales, además de ser tratados con la toxina mitocondrial, se les administró el compuesto sólo o co-administrado con el antagonista del receptor CB₂ AM630 (1 mg/kg). Para evaluar el efecto neuroprotector del compuesto 1.56 se estudió: (i) el volumen de edema causado por la lesión con malonato en la zona de lesión mediante RMN, (ii) se llevó a cabo un análisis de las células teñidas con Nissl con el fin de evaluar la integridad tisular, (iii) se estudió el número de células apoptóticas mediante TUNEL en la zona lesionada, y (iv) se observó el marcaje de células de microglía por análisis inmunohistoquímicos del marcador Iba-1. Al igual que en el modelo *in vitro*, en primer lugar se determinó que la dosis efectiva del compuesto 1.56 era de 1 mg/kg (mediante estudios de RMN y estudios integridad tisular mediante tinción de Nissl) y posteriormente se estudió el papel del receptor CB₂ como mecanismo de acción del compuesto 1.56 en su papel neuroprotector, a la dosis seleccionada y al ser co-administrado con AM630. En los estudios de RMN se observó como en presencia del compuesto 1.56 el volumen de edema generado por la lesión con malonato se reducía significativamente y cómo ese efecto era revertido al co-administrar AM630. Los estudios de integridad tisular mostraron datos similares, ya que el número de células teñidas con Nissl aumentaba en los animales lesionados y tratados con el compuesto 1.56, y disminuía cuando además se co-administraba el antagonista CB₂. En los estudios de apoptosis, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales no tratados con 1.56 y los que sí lo estaban, aunque sí se observó la tendencia esperada en la que el número de células apoptóticas se redujo en los animales tratados con 1.56, con una reversión de esa reducción en aquellos en los que además se les co-administró AM630. Por último, en cuanto al marcaje de células de microglía, los animales lesionados no tratados, presentaron un mayor número de células de microglía marcadas que los animales control, mientras que los tratados con el compuesto 1.56 presentaron una reducción de este número de células de microglía marcadas, y en aquellos animales a los que además se les co-administró el antagonista CB₂, el efecto fue revertido. Por lo tanto, en este modelo *in vivo* se observó neuroprotección por la acción del compuesto 1.56, mediada por su capacidad para activar los receptores CB₂ de las células de microglía.

Por último se estudió si el compuesto 1.56 presentaba la capacidad de activar otras dianas cannabinoides con potencial antiinflamatorio como los receptores GPR55 y PPAR γ , para estudiar de forma más completa el potencial neuroprotector antiinflamatorio del compuesto 1.56. En ambos casos se concluyó que el compuesto 1.56 no presentaba la capacidad para activarlos, por lo que se puede decir que su efecto neuroprotector antiinflamatorio tiene lugar exclusivamente por la activación del receptor CB₂.

De forma general, los resultados obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral presentan a la molécula 1.56 como un nuevo ligando cannabinoide, selectivo para el receptor CB₂, con capacidad neuroprotectora en patologías que cursan con procesos neuroinflamatorios. Atendiendo a los objetivos fijados, de forma más concreta se puede concluir que:

- De un total de 88 moléculas, tan sólo 5 presentaron valores de afinidad y selectividad por el receptor CB₂ apropiados para ser consideradas ligandos selectivos de este receptor. En general los valores de selectividad fueron muy superiores a los definidos para ligandos ampliamente descritos en la literatura.
- De las 5 moléculas seleccionadas, tan sólo el compuesto 1.56 presentó propiedades farmacocinéticas adecuadas de solubilidad, absorción intestinal, interacción con proteínas plasmáticas, capacidad para atravesar la BHE y de inactivación de los canales de potasio HERG, características relevantes en el contexto de búsqueda de un fármaco con propiedades neuroprotectoras.
- De las 5 moléculas seleccionadas, tan sólo la 1.56 presentó la capacidad de activar al receptor CB₂, mostrando una mejor potencia y eficacia con respecto al agonista HU-308.
- El compuesto 1.56 demostró ejercer un efecto neuroprotector en un modelo *in vitro*, al disminuir la respuesta inflamatoria tras la activación de los receptores CB₂ de las células de microglía y aumentar la viabilidad neuronal.
- El efecto neuroprotector del compuesto 1.56 fue confirmado en un modelo *in vivo* de daño mitocondrial e inflamación, observándose una restauración de la integridad tisular del tejido estriatal mediada por la acción del compuesto. Se verificó que el mecanismo por el cual el compuesto 1.56 ejerce este efecto neuroprotector, es mediante la reducción de la respuesta inflamatoria por activación de los receptores CB₂, disminuyendo el número de células microgliales activadas.
- El compuesto 1.56 no activó los receptores GPR55 y PPAR γ , demostrando que su efecto neuroprotector antiinflamatorio tiene lugar exclusivamente por la activación del receptor CB₂.

Summary

** Most of abbreviations used in the summary, are explained for the first time in the text that begins with the Introduction and are included in the section of List of abbreviations.*

Since the major psychoactive component of *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC) and its pharmacological effects on the body was discovered, the possible existence of the receptors in which this molecule acts was investigated, as well as their endogenous ligands with cannabimimetic activity and enzymes responsible for the synthesis and degradation of eCBs. The whole of these elements was called Endocannabinoid System (ECS).

Currently two cannabinoid receptors are known, both belong to GPCR's family, which are called CB₁ and CB₂ receptors. The homology between them is 44%, but it increases at 68% considering only the transmembrane segments. CB₁ receptor is mainly located in CNS (Central Neuron System), but its presence has also been observed in several peripheral organs; while the distribution of the CB₂ receptor has been classically considered peripheral, mainly located in immune cells, although it has also been observed in various cells types present in CNS, particularly in activated glial cells. The psychoactive effects caused by cannabinoids are due to the activation of the CB₁ receptor, because they are located in neurons of certain areas of the brain associated with cognitive and emotional processes. There are also new targets for cannabinoids as the ionotropic receptor TRPV1, the PPAR nuclear receptors and other metabotropic receptors, on which there is still controversy over its endogenous ligand, such as GPR55 or GPR18 receptors.

Molecules known for their ability to activate cannabinoid receptors are phytocannabinoids (cannabinoids present in the plant), eCBs (endogenous animal molecules) and synthetic cannabinoids, which have been developed to improve the properties of natural cannabinoids and used as therapy or as laboratory tools. The most important eCBs are AEA and 2-AG, both derived from AA, which behave as agonists of CB₁ and CB₂ receptors. Other endogenous molecules with ability to activate cannabinoid receptors are also known and other that enhance endocannabinoid signaling, by preventing degradation of main eCBs. The mechanisms of synthesis and degradation of AEA and 2-AG have been studied, which are synthesized and degraded after demand action. Regarding to the AEA synthesis, it is essentially carried out by the consecutive action of two calcium-dependent enzymes: NAT and NAPE-PLD, although there are other alternative routes for its synthesis. The AEA degradation takes place mainly by the action of a serine-hydrolase called FAAH. Respecting to 2-AG synthesis, it is carried out by the action of a DAGL from a molecule of DAG, although as in the case of the AEA, there are other alternative routes for their synthesis. The 2-AG degradation takes place by the action of the MAGL enzyme, although there are others enzymes with similar capacity. Although oxidative metabolism is not considered as degradation mechanism because of the amount of secondary metabolites that are originated, eCBs are also subjected to these pathways resulting in HETEs and EETs by the action of LOXs and COXs, respectively.

Numerous cellular signaling mechanisms have been described to be mediated by activation of CB₁ and CB₂ receptors. The main signaling mechanisms are: (i) inhibition of AC; (ii) activation of different MAPK as p44 / 42, JNK and p38, involved in differentiation processes, cell growth and cell death, and PI3K and Akt, associated with pro-survival effects; (iii) modulation of ceramide synthesis, a proapoptotic sphingolipid, whose accumulation allows ERK signaling activation, which promoting

cell cycle arrest and apoptosis; (iv) activating the PLC protein by an increase of intracellular calcium, triggering different signaling pathways. Furthermore, the CB₁ receptor, but not CB₂, has the ability to modulate several ion channels and is involved in NOS enzyme activation. Homodimers have also been observed between both cannabinoid receptors, and heteromers formation between both cannabinoid receptors with other GPCRs, representing an increase in the complexity of endocannabinoid signaling and their pharmacological and biological effects.

The wide distribution of cannabinoid receptors in the body and the multitude of cellular signaling mechanisms in which this system is involved, give the ECS a very important physiological and pathophysiological significance. Therefore, research continues to characterize new cannabinoid receptors, to study the mechanisms and signaling resulting from the activation of these receptors which are involved in cellular and tissue functions of ECS, and also to design and synthesize new and more selective and stable ligands, with major bioavailability, as well as with ability to bind and activate or inhibit new targets of the ECS. Therefore, there have already been generated a lot of new molecules, as selective agonists and antagonists for the CB₁ and CB₂ receptors, as well as new allosteric modulators for the cannabinoid receptors, and indirect agonists with the ability to inhibit the eCBs reuptake or degradation. Cannabinoid-based drugs have been already developed since several years, which have been used to treat some symptoms associated with several diseases. These drugs are Marinol[®] (used as antiemetic and for the treatment of anorexia/cachexia syndrome in HIV or terminal cancer patients), Cesamet[®] (as antiemetic), Acomplia[®] (for the treatment of obesity and metabolic syndrome) and Sativex[®] (to treat spasticity in MS (Multiple Sclerosis) patients).

ECS physiology is very wide and is involved in numerous processes by regulating different systems, organs and tissues such as: (i) nervous system, (ii) immune system; (lii) cardiovascular system, (iv) endocrine system, (v) peripheral organs involved in control of energy metabolism, and (vi) bones. In addition, the ECS has regulatory effects of cell survival in different tissues. In any case, the first function discovered of this system, which seems to be the most relevant, is the modulation of neural processes and, in particular, one of the better established functions is the regulation of the synaptic function. In this context, numerous neurological processes are included in the neuromodulator role of ECS such as: motor activity, nociception, memory and learning, cognitive processes, neuroendocrine regulation, emesis, thermoregulation, intake and appetite, sleep, brain development, and regulation of neuronal survival and integrity. How this system is highly involved in neuroprotection processes has been studied, giving great importance as drug target in the treatment of neurodegenerative diseases or acute neuronal damage. Overall, the potential of this system to modulate several events which take place in this kind of pathologies have been observed. It is involved in excitotoxicity (mediated by CB₁ activation), neuroinflammation (mainly modulated by CB₂ receptor activation in activated glia cells), decrease of ROS release (possibly regulated by Nrf-2/PPAR and by the chemical structure of these molecules, which provide capability as scavengers of ROS), and ECS is involved in neurogenesis increase. Modulation of this system results beneficial for several neurodegenerative diseases such as: HD (Huntington

Disease), AD (Alzheimer Disease), PD (Parkinson Disease), ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis), MS and hypoxia-ischemia.

In this context, the elements of ECS could serve as targets for the treatment of neurodegenerative diseases. Specially, during the last few years, the CB₂ receptor activation, alone, or in combination with other cannabinoid targets activation, as PPAR γ receptor, has aroused much interest and particularly in our research group. Reasons are: (i) activation of the CB₁ receptor, but not the CB₂ receptor, produces psychoactive effects, (ii) the role of CB₂ receptor in CNS is much more restricted than CB₁ receptor, and is particularly associated with neuronal damage, especially inflammatory, (iii) it has been associated with other anti-inflammatory PPAR γ receptor targets as producing synergistic effects which are interesting to investigate more detail. Therefore, the main objective of this thesis has been to search new selective CB₂ receptor agonists with therapeutic potential in neurodegenerative diseases.

To this end, pharmacological and biological assays were developed to characterize a total of 88 molecules synthesized from four different scaffolds: 57 molecules from chromenopyrazol scaffold derivatives, 17 molecules from tricyclic pyrazole carboxamides derivatives, 10 molecules from CBG quinone derivatives and 4 molecules from CBD quinone derivatives.

We first proceeded to evaluate the affinity of the molecules for CB₁ and CB₂ receptors by developing binding assays. The selected compounds must perform two criteria simultaneously: to have a K_i value for the CB₂ receptor \leq 50 nM (indicating a high affinity for this receptor), and a K_i CB₁/K_i CB₂ value \geq 20, (considered an acceptable selectivity value for CB₂ over CB₁). This analysis allowed to select 5 molecules: 1.48, 1.56, 2.5, 2.9 and 2.10.

Then, as many times potential drugs with an attractive pharmacodynamic profile are discarded because they show failures associated to deficient ADME properties, an *in silico* study was carried out to predict some pharmacokinetic properties: aqueous solubility, oral absorption capability, ability to bind to HSA, ability to cross the BBB (blood brain barrier) and ability to block HERG potassium channels, of selected compounds and the reference CB₂ cannabinoid ligands, JWH-133, HU-308 and SR144528. There were certain compounds that had a favorable prediction for each property, but only the compound 1.56 was suitable for all properties, showing promising ADMET properties at *in silico* level.

Then we proceeded to evaluate the effect of the 5 selected compounds for their affinity and selectivity for the CB₂ receptor. GTP γ S binding assays were developed to this purpose. Only one of these 5 selected molecules performed as CB₂ receptor agonist, it was the compound 1.56. The compound 1.48 seemed to behave as a weak partial agonist, while compounds 2.5, 2.9 and 2.10 showed a powerful, but low effective, inverse agonist profile. To verify these effects, an *in vitro* bioassay was carried out. This assay allowed to evaluate the effect of compounds by studying activation or not of CB₂ receptor, and it also enable to assess the behavior of these compounds over activated microglia cells, a fact which take place in neuroinflammation events. This assay consists on measuring of PGE-2 release by BV-2 microglial cells previously stimulated with LPS, in

the presence or absence of compounds analyzed, alone or co-incubated with SR144528 (to determine their agonist effect) or WIN55,212-2 (to determine their antagonist effect). The agonistic effect of the compound 1.56 obtained by the GTP γ S binding assays, could not be confirmed by using this assay, possibly because an insufficient dose of compound has been used. Compound 1.48 seems to present an antagonist profile in data obtained in this bioassay, in agreement with data obtained in the GTP γ S binding assay, because when a weak or partial agonist competes with an agonist, it acts as antagonist. Finally, compounds 2.5, 2.9 and 2.10 showed an antagonistic effect, according to the results obtained in GTP γ S binding assay, although it was statistically significant only for compound 2.5. Thus, only compound 1.56 was obtained as CB₂ selective agonist. Hence, compound 1.56 was the only one selected to evaluate its neuroprotective properties.

To evaluate the neuroprotective profile of compound 1.56, an *in vitro* and an *in vivo* model of neuronal death were conducted. *In vitro* model consisted of determining the cell viability of a neuronal cell line (M213-2O) when conditioned media, generated by BV-2 microglial cells previously stimulated with LPS in the presence or absence of compound 1.56, co-administered or not with SR144528, was added to neuronal cells. First, neuronal viability decrease was observed in presence of conditioned media which came from microglia stimulated with LPS, while it does not occur in the absence of the toxin. We also demonstrated that direct LPS addition on neurons did not modify their viability, indicating that neuronal death was mediated by proinflammatory substances released by microglial cells. Then, we observed that neuroprotective effect of compound 1.56 was dose-dependent, and we concluded that optimum concentration was 10 μ M. Finally, we observed that the neuroprotective effect of compound 1.56 was totally reversed when the CB₂ antagonist SR144528 (10 μ M) was added, indicating a clear neuroprotective effect of compound 1.56 by activating CB₂ receptor. It was also studied that neuroprotective effect was mediated by CB₂ microglial receptors because when compound 1.56 was added directly on neurons, their viability was not recovered. Therefore, the neuroprotective antiinflammatory role of compound 1.56 seems to be clear in an *in vitro* model by activating CB₂ receptors of microglial cells.

Then, we proceeded to evaluate the neuroprotective profile of the compound 1.56 in an *in vivo* model based on mitochondrial damage and inflammation. An unilateral intrastratial of malonate insult in rats was selected for its suitability for the proposed purpose. Compound 1.56, alone or co-administered with CB₂ receptor antagonist AM630 (1 mg/kg) was administered to malonate-treated animals. In order to evaluate the neuroprotective effect of compound 1.56 we studied: (i) the edema volume caused by malonate insult in the injured area by NMR (Nuclear Magnetic Resonance), (ii) an analysis of Nissl-stained cells was carried out to analyze the tissue integrity, (iii) the number of apoptotic cells was assessed by TUNEL in the injured area, and (iv) Iba-1 immunostaining to detect microglial cells was also carried out. As in the *in vitro* model, we first determined the effective dose of compound 1.56 at 1 mg / kg (by NMR and by Nissl-staining studies) and the role of CB₂ receptor was later studied as a mechanism of action of the compound 1.56 in its neuroprotective role, at a selected dose and when it was co-administered with AM630. In NMR studies we observed that

edema volume caused by malonate was reduced by adding compound 1.56 and this effect was reversed when AM630 was co-administered. Similar results were observed in tissue integrity studies. The number of Nissl-stained cells was increased in malonate-treated sections, this number was reduced in animals treated with compound 1.56, and this effect was reversed when the CB₂ antagonist AM630 was co-administered. In the apoptosis studies, no differences were observed between malonate-treated animals and malonate-treated animals also treated with compound 1.56, although an expected trend was observed being that TUNEL-positive cells was reduced in animals treated with compound 1.56, and this effect was reversed when AM630 was co-administered. Finally, Iba-1 immunostaining showed that malonate-treated animals presented a greater number of Iba-1-positive cells compared with control animals, while those animals that were also treated with the compound 1.56 showed a reduction in the Iba-1-positive cells. Once again, this effect was reversed when AM630 was coadministered. Therefore, neuroprotection mediated by the action of the compound 1.56, for their ability to activate CB₂ receptors of microglial cells, was observed in this *in vivo* model.

Finally, we studied if compound 1.56 was able to activate other cannabinoids targets with anti-inflammatory potential as PPAR γ and GPR55 receptors, in order to study in depth the neuroprotective anti-inflammatory potential of 1.56. The compound had no ability to activate neither of the two receptors, so we conclude that their anti-inflammatory neuroprotective effect was exclusively by activation of CB₂ receptor.

In general, the results of the studies developed in this Doctoral Thesis show the molecule 1.56 as a novel and selective cannabinoid ligand for CB₂ receptor, with neuroprotective capacity in pathologies with neuroinflammatory events. Based on more specifically objectives, it can be concluded that:

- Of a total of 88 molecules, only 5 presented affinity and selectivity values considered appropriated for CB₂ selective ligands. Overall selectivity values were much higher than those defined for ligands widely described in literature.
- Only the compound 1.56 showed appropriate pharmacokinetic properties prediction of relevant features in the context of neuroprotective drug-discovery, as solubility, intestinal absorption, interaction with plasma proteins, ability to cross the BBB and inactivation of HERG potassium channels.
- Only the compound 1.56 presented the ability to activate CB₂ receptor, showing an improved potency and efficacy compared to the HU-308 agonist.
- The compound 1.56 showed a neuroprotective profile in an *in vitro* model by reducing the inflammatory response by activating CB₂ receptors of microglial cells and consequently increasing neuronal viability.

- The neuroprotective effect of compound 1.56 was confirmed in an *in vivo* model of mitochondrial damage and inflammation. Compound 1.56 allowed a restoration of tissue integrity of striatal tissue. It was verified that the mechanism by which this compound exerts neuroprotective effect is by reducing the inflammatory response by activating CB₂ receptor, and decreasing the number of activated microglia.
- The compound 1.56 did not activate the GPR55 and PPAR γ receptors, demonstrating that their neuroprotective antiinflammatory effect occurs exclusively by activation of CB₂ receptor.

Introducción

La planta *Cannabis sativa* ha sido ampliamente empleada por la humanidad a lo largo de la historia para uso textil y alimentario, así como con fines medicinales, religiosos y recreativos. El primer uso terapéutico registrado de cannabis se remonta a la antigua China hace casi cinco mil años, donde se utilizaba como tratamiento del reumatismo, gota y malaria. Desde China, el consumo se extendió a través de Asia y Oriente Medio, aunque no llegó a Europa hasta siglos después. El cannabis fue empleado en muchas culturas para tratar síntomas asociados a diversas patologías tales como dolor, convulsiones, inflamación, asma y la falta de apetito (Mechoulam, 2000; Ramos y Fernández-Ruiz, 2000). Fue a principios del siglo XX, cuando disminuyó el uso medicinal del cannabis, lo que limitó considerablemente el estudio de sus aplicaciones hasta la década de los 60.

El término cannabinoide se ha utilizado tradicionalmente para referirse a un grupo de moléculas presentes en la planta *Cannabis sativa*, tanto en sus hojas y brotes florecidos como en la resina que secretan. Los cannabinoides comparten una estructura común carbocíclica con 21 carbonos y están formadas generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. A raíz del estudio de estas moléculas, especialmente del principal componente psicoactivo en su forma neutra, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni y Mechoulam, 1964), se observó que los efectos que estos componentes botánicos ejercían sobre el organismo humano se debían a la capacidad que presentaban para unirse y activar a unos receptores presentes en las células con elevada expresión en el Sistema Nervioso Central (SNC), así como en otras regiones periféricas, denominados receptores cannabinoides CB₁ (Devane y cols., 1988; Matsuda y cols., 1990) y CB₂ (Munro y cols., 1993). Debido a la descripción de estos receptores, pareció lógico pensar en la existencia de ligandos endógenos o endocannabinoides (eCBs) con actividad sobre estos receptores y, por tanto, con capacidades cannabimiméticas, por lo que se llevaron a cabo estudios para su caracterización, siendo aislados en 1992 la N-araquidonoiletanolamina (AEA), más conocida como anandamida (Devane y cols., 1992), y en 1995 el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam y cols., 1995). Poco después se identificaban las enzimas responsables de la síntesis y degradación de estos endocannabinoides (revisado por Muccioli, 2010) así como otros endocannabinoides con nuevo interés (revisado por Pertwee, 2005b). Al conjunto formado por los receptores CB₁ y CB₂, sus ligandos endógenos y las enzimas encargadas de la síntesis y degradación de estos, se le llamó Sistema Cannabinoide Endógeno o Endocannabinoide (SCE).

Previamente, en paralelo y posteriormente a estos hallazgos, se han ido desarrollando moléculas sintéticas con actividad agonista o antagonista sobre los receptores cannabinoides y moléculas con capacidad de activar o inhibir las enzimas responsables del metabolismo de los endocannabinoides (Pertwee y cols., 2010). También se han generado animales genéticamente modificados, sobre todo carentes de estos receptores o de las enzimas, que han servido como importantes herramientas para el estudio de este sistema (Zimmer, 2015).

En la actualidad el término cannabinoide engloba tanto a los componentes naturales de la planta (fitocannabinoides), como a las moléculas endógenas de origen animal (eCBs) capaces de unirse a los receptores cannabinoides, así como a los cannabinoides sintéticos generados en el laboratorio, diseñados para mejorar las características farmacodinámicas y/o farmacocinéticas de los

cannabinoides conocidos, y ser empleados a nivel terapéutico o como herramientas para el estudio del SCE.

Dada la importancia fisiológica y fisiopatológica de este sistema, las investigaciones continúan para caracterizar nuevos receptores cannabinoides, estudiar los mecanismos y cascadas de señalización derivadas de la activación de estos receptores e implicadas en las funciones celulares y tisulares del SCE, y además, diseñar y sintetizar nuevos ligandos más selectivos y estables, con mejor biodisponibilidad, así como con capacidad de unirse y activar o inhibir las nuevas dianas del SCE.

1 Sistema Cannabinoide Endógeno

El SCE es un sistema de comunicación intercelular, capaz de modular diferentes efectos celulares en los tejidos y órganos donde está presente. Los elementos que forman parte de este sistema incluyen a los receptores involucrados en la acción de los compuestos cannabinoides, los ligandos endógenos o eCBs con afinidad por estos receptores cannabinoides y la maquinaria bioquímica responsable tanto de la síntesis como la inactivación de estos ligandos.

1.1 Receptores cannabinoides

En primer lugar se aislaron y clonaron dos tipos de receptores cannabinoides, conocidos como receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁) y tipo 2 (CB₂). Ambos receptores están acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) con siete dominios transmembrana, un extremo amino-terminal extracelular y un extremo carboxilo-terminal intracelular (Figura 1).

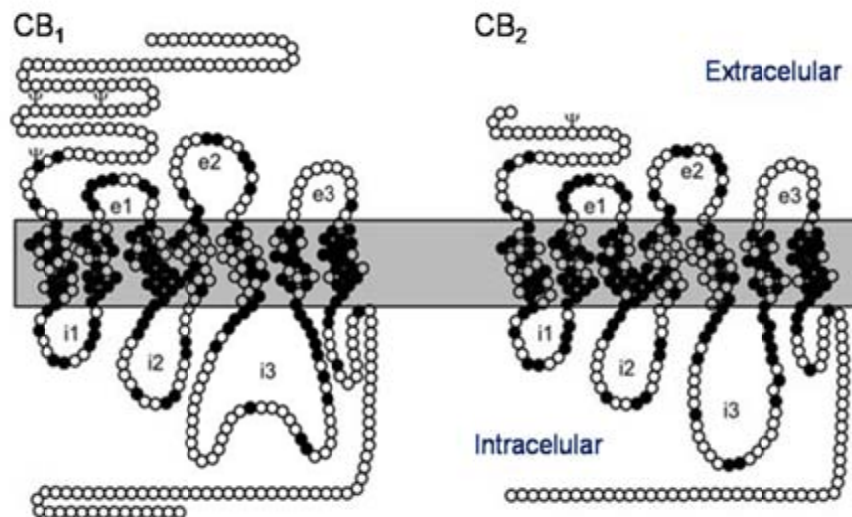


Figura 1. Estructura de los receptores CB₁ y CB₂.

Estudios de secuenciación génica han demostrado que existe homología entre ambos receptores de un 44%, que asciende hasta un 68% cuando se atiende solamente a la secuencia de aminoácidos de los segmentos transmembrana (Montero y cols., 2005). Además, estudios filogenéticos han demostrado que la secuencia del gen para el receptor CB₁ está altamente conservada entre distintas especies de vertebrados (Valenti y cols., 2005) y parece que, tanto el receptor CB₁ como el CB₂ están presentes no sólo en vertebrados, sino en todos los cordados (Elphick, 2012). Aunque los receptores cannabinoides parecen exclusivos de este filo, distintos componentes del SCE muestran ortólogos en diversas especies pertenecientes o no al filo de cordados (McPartland y cols., 2006a, 2006b).

1.1.1 Receptor CB₁

El primer receptor cannabinoide caracterizado fue el receptor CB₁, a finales de la década de los 80. Su caracterización se llevó a cabo primero mediante métodos radiométricos en membranas de células de neuroblastoma (Howlett y cols., 1986) y posteriormente en cerebro de rata (Devane y cols., 1988). Dos años después se identificó, también en rata, su estructura y distribución (Matsuda y cols., 1990) y más tarde se pudo clonar el receptor humano (Gérard y cols., 1991). Se trata de un péptido con 473 aminoácidos cuyo locus está ubicado en el cromosoma 6 humano, concretamente en la posición 6q14-6q15 (Caenazzo y cols., 1991; Hoehe y cols., 1991).

El receptor CB₁ está ampliamente distribuido en el SNC y es considerado el receptor metabotrópico más abundante en el cerebro de mamíferos (Herkenham y cols., 1991a). Su expresión es muy elevada en hipocampo, cerebelo, ganglios basales, y de forma más moderada aparece en corteza cerebral, áreas límbicas como el núcleo accumbens, el área tegmental ventral y la amígdala, así como en el asta dorsal de la médula espinal (Herkenham y cols., 1991a; Tsou y cols., 1998a; Glass y cols., 1997b; Mackie, 2005b). En cuanto a la distribución celular, además de en subpoblaciones neuronales con distintos fenotipos (Szabo y Schlicker, 2005), también se encuentra en astrocitos (Sánchez y cols., 1998b, 2001; Molina-Holgado y cols., 2002a), oligodendrocitos (Molina-Holgado y cols., 2002b), células de microglía (Cabral y cols., 2001) y en precursores neurales (Aguado y cols., 2005).

Además del SNC, el receptor CB₁ también está presente en tejidos periféricos, habiéndose descrito su presencia en bazo, pulmón, endotelio vascular, músculo liso, hígado, páncreas, tracto gastrointestinal, músculo esquelético y en el aparato reproductor, entre otros (Bermúdez-Silva y cols., 2008; Galiègue y cols., 1995; Ishac y cols., 1996; Pertwee, 2001; Park y cols., 2004) (Figura 2).

La activación de los receptores CB₁ del SNC está relacionada con los efectos psicoactivos producidos por los cannabinoideos (Ameri, 1999). Debido a la abundancia de este receptor y de sus ligandos endógenos en determinadas áreas cerebrales, la activación del receptor CB₁ conlleva efectos a nivel cognitivo sobre la memoria y afecta a procesos emocionales y motivacionales (Puighermanal y cols., 2012), pudiendo provocar efectos adversos en estos procesos (Moreira y Lutz, 2008; Zanettini y cols., 2011). Esto ha supuesto uno de los principales inconvenientes en el uso de agonistas y antagonistas CB₁ que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) como tratamiento para diversas patologías, a pesar de haberse demostrado su posible potencial terapéutico (Pacher y cols., 2006). Además, la activación del receptor CB₁ en otras áreas del SNC implica la aparición de efectos motores (ganglios basales y cerebelo), antieméticos (área postrema), analgésicos (sustancia gris periacueductal, núcleo talámico, médula espinal) y orexígenos (hipotálamo anterior).

1.1.2 Receptor CB₂

Se trata de una proteína de 360 aminoácidos, cuyo locus en el genoma humano está localizado en la posición 1p36 (Karsak y cols., 2005; Onaivi y cols., 2012). Fue descrito por primera vez en bazo (Munro y cols., 1993) y durante muchos años se creyó que estaba localizado exclusivamente en células y tejidos periféricos relacionados con el sistema inmune, como el propio bazo, las amígdalas, en los linfocitos B y T y en monocitos (Galiègue y cols., 1995). Sin embargo, posteriormente se ha descrito expresión del receptor CB₂ en células de otros tejidos y órganos periféricos como corazón, endotelio, hueso, hígado y páncreas (células secretoras de somatostatina) (Bouchard y cols., 2003; Joyeux y cols., 2002; Zoratti y cols., 2003) (Figura 2).

Durante tiempo, se excluyó la presencia del receptor CB₂ en el SNC, como consecuencia de estudios antiguos que no detectaron su presencia en células neurales (Griffin y cols., 1999b; Brown y cols., 2002; Lynn y Herkenham, 1994). Sin embargo, con el tiempo este hecho se volvió controvertido por algunos estudios que encontraron el receptor CB₂ en progenitores neurales, células gliales y células endoteliales de los vasos del SNC (revisado en Onaivi, 2011). De forma general, la expresión de CB₂ en el SNC se ha asociado principalmente con células gliales, sobre todo células de microglía que pasan a un estado activado en patologías que cursan con procesos inflamatorios (Benito y cols., 2003, 2008, Sheng y cols., 2005; Nuñez y cols., 2004; Cabral y Griffin-Thomas, 2009). La posibilidad de expresión del receptor CB₂ en células neuronales ha sido hasta la fecha un tema mucho más controvertido. De una posición inicial bastante restrictiva en la que el receptor CB₂ no está en neuronas, o si lo está, es en subpoblaciones muy concretas y en áreas filogenéticamente antiguas, como por ejemplo en el tallo cerebral (Van Sickle y cols., 2005) y el cerebelo (Skaper y cols., 1996), se pasó a la idea de una distribución amplia del receptor CB₂ en neuronas de corteza cerebral, hipocampo, globo pálido, en distintas áreas límbicas y mesencefálicas (Gong y cols., 2006; Lanciego y cols., 2010; Brusco y cols., 2008a; Suárez y cols., 2009, Kim y Lin, 2015; Sierra y cols., 2014; Zhang y cols., 2014, 2016, Stempel y cols., 2016). Posiblemente, este cambio de posición se debió a la falta de especificidad de los anticuerpos disponibles hasta la fecha (Atwood y Mackie, 2010) y a las dificultades de usar los animales *knock-out* para el receptor CB₂ con objeto de validar la especificidad de estos anticuerpos (Onaivi y cols., 2012).

Por tanto, descifrar cómo es la expresión del receptor CB₂ en células neuronales, se ha convertido en uno de los principales desafíos de la investigación en el SCE. En cualquier caso, no se ha observado que su activación genere efectos psicoactivos (Deng y cols., 2014), debido a su menor expresión en el SNC respecto al receptor CB₁. Este hecho, sumado a que se le ha atribuido un importante papel en inmunomodulación y neuroinflamación (Rom y Persidsky, 2013), en supervivencia celular (Fernández-Ruiz y cols., 2007), en proliferación y diferenciación de células neuronales (Palazuelos y cols., 2006) y en nocicepción (Jhaveri y cols., 2007a), propone al receptor CB₂ como una potencial diana terapéutica en numerosos eventos patológicos, como por ejemplo la neurodegeneración.

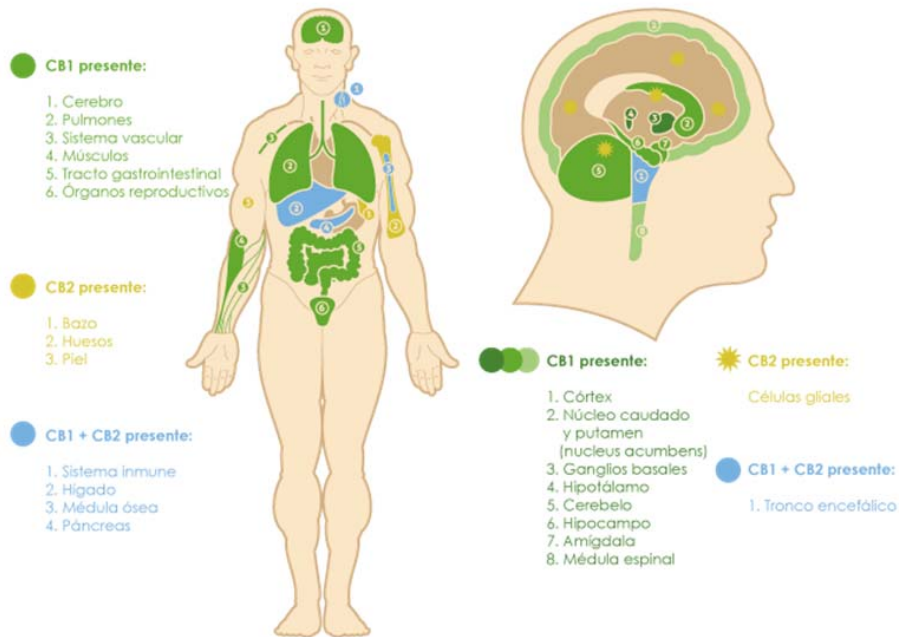


Figura 2. Distribución de los receptores CB₁ y CB₂ en humano. Fuente: Fundación Canna.

1.1.3 Otros receptores cannabinoides

Tanto en estudios realizados con ratones *knock-out* para los receptores CB₁ o CB₂, como en experimentos con antagonistas específicos para ambos receptores, se ha observado que se mantienen algunos de los efectos característicos de los cannabinoides, lo que, por lo tanto, indicaría que no están mediados por los receptores conocidos hasta el momento (Wiley y Martin, 2002; Qiao y cols., 2012). Algunos de estos efectos podrían ser derivados de las propiedades antioxidantes de ciertos cannabinoides, o bien de su capacidad de interactuar con *lipid rafts* a nivel de la membrana plasmática desencadenando respuestas independientes de la unión con los receptores cannabinoides (Wu y cols., 2012; Scuderi y cols., 2011; Yang y cols., 2010). También, existen evidencias de que pueden existir receptores adicionales, dianas intracelulares u otros mecanismos involucrados en la acción de los cannabinoides. Una posibilidad serían, los receptores huérfanos acoplados a proteínas G, como el GPR18, el GPR119 y el GPR55, que se expresan de forma abundante en el Sistema Nervioso y son activados por la acción de lípidos señaladores derivados de ácidos grasos, entre ellos ciertos endocannabinoides (Brown, 2007; Mc Hugh, 2012). Se ha publicado que los ligandos endógenos de estos receptores podrían ser la *N*-araquidonoilglicina (NAGly) para el GPR18 (Kohn y cols., 2006), la oleoiletanolamida (OEA) para el GPR119 (Brown, 2007), aunque parece que también la linoleoiletanolamida (LEA) y palmitoiletanolamida (PEA) se comportan como potentes agonistas para este receptor (Syed y cols., 2012), y por último, el lisofosfatidilinositol (LPI) para el receptor GPR55 (Oka y cols., 2007), aunque varios ligandos cannabinoides podrían activar también este receptor (Johns y cols., 2007;

Ryberg cols., 2007; Lauckner y cols., 2008). De los tres, se ha propuesto al receptor GPR55 como el más cercano a ser el receptor cannabinoide “de tipo 3” (CB₃), algo que ha generado cierta controversia, dado que el receptor GPR55 muestra una baja homología con las secuencias de los receptores CB₁ (13,5%) y CB₂ (14,4%) presentando importantes diferencias en la estructura, farmacología y señalización, cuando se compara con la de estos receptores (Moriconi y cols., 2010; Ryberg y cols., 2007). También en su momento se propuso al Abnormal-Cannabidiol (Abn-CBD) como posible CB₃.

Por otro lado, el hecho de que los efectos biológicos producidos por los cannabinoides persistan tras el tratamiento con toxina *pertussis* o con GDPβS (compuestos capaces de bloquear las funciones de los GPCRs), indica que los cannabinoides también pueden actuar a través de receptores no metabotrópicos. Se ha investigado si los cannabinoides pueden unirse a algunos de los receptores de potencial transitorio (TRP), una familia de canales iónicos con un papel fundamental en la transducción de los estímulos somatosensoriales (De Petrocellis y cols., 2011b). Algunos investigadores consideran que los canales TRP podrían ser los receptores ionotrópicos del SCE, mientras que los receptores CB₁ y CB₂ serían los de tipo metabotrópico (Di Marzo y de Petrocellis, 2012; Akopian y cols., 2009). Aunque existen 6 grupos de TRPs, sólo se ha observado actividad de ciertos cannabinoides en tres de ellos: activación sobre los receptores vanilloides TRPV (subtipos 1, 2, 3 y 4) y sobre los receptores de anquirina TRPA (subtipo 1), e inhibición sobre los receptores de melastatina TRPM (subtipo 8). Todos ellos están involucrados en la integración de estímulos térmicos y además, los TRPV y TRPA lo están en la integración de estímulos dolorosos, especialmente de tipo inflamatorio y neuropático (Caterina y Julius, 2001; Dhaka y cols., 2006; Jiang y cols., 2011; Macpherson y cols., 2007).

La última gran familia de receptores sobre los que se conoce que pueden actuar los cannabinoides son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) (Sun y Bennett, 2007), lo que significa que los cannabinoides también pueden tener efectos directos sobre la expresión de genes regulados por estos receptores nucleares (O’Sullivan, 2016). Los receptores PPARs son una familia de receptores nucleares que incluye tres subtipos: PPAR-α, PPARβ/δ y PPARγ. Los PPARs heterodimerizan con el receptor X retinoide (RXR), un receptor nuclear que es activado por ácido retinoico, y se unen a zonas específicas del ADN induciendo la transcripción de genes diana involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, diferenciación celular e inflamación (Ferré, 2004; Moraes y cols., 2006; Stienstra y cols., 2007c). Se ha descrito que varios ligandos cannabinoides pueden activar alguno o varios de los receptores PPAR como por ejemplo, el Δ⁹-THC (O’Sullivan y Kendall, 2010), WIN55212-2 (Mestre y cols., 2009), el ácido ajulémico (un análogo sintético del Δ⁹-THC que no presenta efectos psicotrópicos) (Liu y cols., 2003), o varios endocannabinoides (o lípidos relacionados) como la OEA (Fu y cols., 2003, 2005), la anandamida (Bouaboula y cols., 2005; Sun y cols., 2006), la PEA (Lo Verme y cols., 2005), el 2-AG y el 2-araquidonilgliceril éter, también conocido como noladin éter (2-AGE) (Rockwell y cols., 2006). Además se ha especulado con que la activación de los PPAR podría tener lugar por la acción de los productos generados en el metabolismo de estos endocannabinoides, como por ejemplo

derivados prostanoideos generados por actividad de las enzimas ciclooxigenasa de tipo 2 (COX-2) y lipooxigenasas (LOX) (Burstein y cols., 2000). También podrían derivar de los productos resultantes de la hidrólisis mediada por las enzimas amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), monoacilglicerol lipasa (MAGL) y la amidasa ácida selectiva de PEA (NPAA) (Vandevoorde y Lambert, 2005), algunos de los cuales, por ejemplo el ácido araquidónico (AA), podrían ser sustratos de COX-2 y LOX para generar directamente prostanoideos.

1.2 Endocannabinoides

Los endocannabinoides se definen como compuestos endógenos capaces de unirse a los receptores de cannabinoides y provocar, generalmente, su activación y señalización. Son compuestos de naturaleza lipídica derivados de un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, que forma un enlace amida, éster o éter, con un grupo polar pequeño (Di Marzo y Fontana, 1995). El primer endocannabinoide descrito fue la AEA (Devane y cols., 1992), que junto con el 2-AG (Mechoulam y cols., 1995) constituyen los dos endocannabinoides de mayor relevancia fisiológica (Figura 3).

1.2.1 Anandamida

La palabra anandamida se compone del prefijo en sánscrito “*ānanda*”, que significa felicidad, seguida de la terminación amida, por su estructura química. La AEA es un derivado del ácido araquidónico y la etanolamina, que se une a ambos receptores cannabinoides, siendo algo mayor su afinidad por el receptor CB₁. Se comporta como agonista total o agonista parcial sobre el receptor CB₁ y como agonista parcial sobre el receptor CB₂ (Pertwee y cols., 2010). Además de unirse a los receptores CB₁ y CB₂, la anandamida tiene la capacidad de activar algunos canales iónicos dependientes de voltaje y canales iónicos dependientes de ligando, como los receptores de potencial transitorio TRPV (Oz, 2006), así como al receptor de serotonina 5HT-3 (Xiong y cols., 2008), al receptor GPR55 (Ryberg y cols., 2007) o a los receptores PPARs (Bouaboula y cols., 2005; Sun y cols., 2006).

La anandamida está presente en humanos en SNC y tejidos periféricos como bazo, corazón, testículos, útero (Felder y cols., 1996) y endotelio vascular (Randall, 2007). Las áreas del SNC que tienen mayor concentración de este endocannabinoide, como el hipocampo y el estriado (Bisogno y cols., 1999), coinciden con zonas en las que la expresión del receptor CB₁ es mayor (Felder y cols., 1996). Sin embargo, también se han encontrado altos niveles de AEA en regiones con baja densidad de receptores CB₁, como la médula espinal o el tronco cerebral (Felder y cols., 1996; Bisogno y cols., 1999), así como áreas con alta densidad de receptores CB₁ pero niveles bajos de AEA, como el cerebelo (Bisogno y cols., 1999).

1.2.2 2-Araquidonoil glicerol

El 2-AG es un éster entre AA y glicerol. Fue aislado por primera vez en intestino de perro y posteriormente se identificó en otros órganos como bazo, páncreas, corazón, hígado, riñón y

pulmón (Mechoulam y cols., 1995; Kondo y cols., 1998). También ha sido identificado en el SNC, presentando las máximas concentraciones en el tronco cerebral, estriado e hipocampo y las más bajas en corteza cerebral, diencéfalo y cerebelo (Bisogno y cols., 1999). El 2-AG presenta una afinidad por los receptores cannabinoides similar a la AEA, pero se comporta como agonista total tanto frente a CB₁ como a CB₂ (Pertwee y cols., 2010). Este hecho, sumado a que el 2-AG es el cannabinoide endógeno más abundante en el SNC y que sus niveles en las diferentes áreas sean unas 200 veces superiores a los de la AEA, ha llevado a algunos autores a proponer que este compuesto sea el verdadero agonista endógeno del SCE (Sugiura y cols., 2006). Además, el 2-AG se une a otros receptores celulares con actividad cannabimimética como el receptor GPR55 (Ryberg y cols., 2007) o el receptor TRPV1 (Zygmunt y cols., 2013).

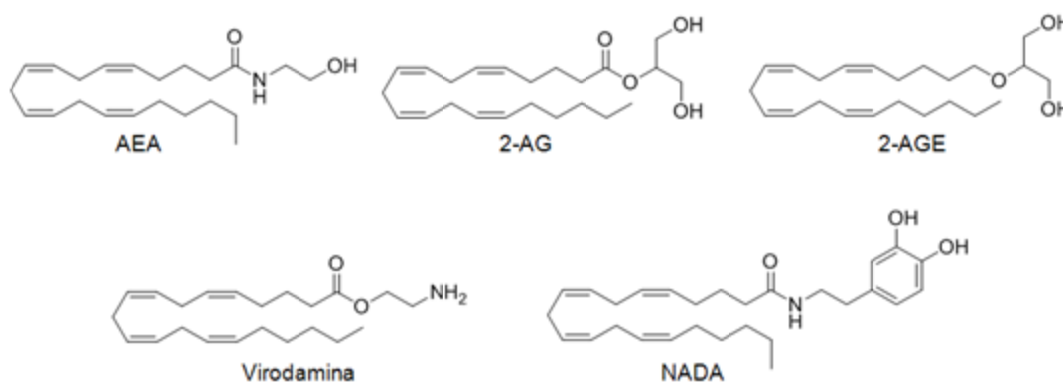


Figura 3. Estructura química de la AEA, 2-AG, 2-AGE, virodamina y NADA

1.2.3 Otros endocannabinoides

Además de la AEA y el 2-AG, se han identificado otros ligandos potencialmente endocannabinoides, como el agonista selectivo del receptor CB₁, el 2-AGE (Hanus y cols., 2001), o la O-araquidonil etanolamina (virodamina), la cual parece presentar un comportamiento agonista parcial o antagonista sobre el receptor CB₁ y agonista sobre el receptor CB₂ (Porter y cols., 2002; Steffens y cols., 2005). Las acilamidas dihomog- γ -linoleoiletanolamida y docosatetraenoiletanolamida, en las que el AA ha sido sustituido por otro tipo de ácido graso poliinsaturado, presentan afinidad por el receptor CB₁ (Hanus y cols., 1993), pero su presencia en tejidos y actividad biológica apenas han sido estudiadas. Otro caso interesante es el de la N-araquidonoil dopamina (NADA), que parece que podría activar el receptor CB₁, pero sobre todo tiene la capacidad de activar al receptor TRPV1 (Huang y cols., 2002) (Figura 3). Además, de forma reciente se han descrito dos ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga n-3 con capacidad de activar al receptor CB₁, llamados N-docosahexaenoiletanolamina (DHEA) y N-eicosapentaenoiletanolamina (EPEA) (Brown y cols., 2013).

Por otro lado, se han identificado otras moléculas endógenas derivadas de ácidos grasos que no se unen a los receptores cannabinoides, o no lo hacen en el rango fisiológico, pero que tienen

efectos cannabimiméticos. Se trata de ciertas *N*-aciletanolaminas (NAEs), de estructura similar a la AEA, tales como la PEA, la OEA, la estearoiletanolamida (SEA) y la LEA o de los acil-glicerol 2-linoleilglicerol (2-LG) y 2-oleilglicerol (2-OG). Se ha propuesto que estas moléculas ejercen un efecto “*entourage*” sobre los principales eCBs, incrementando la acción biológica de éstos, bien interfiriendo en su inactivación, o bien potenciando sus acciones sobre los receptores cannabinoides (Macarrone y cols., 2002; Di Marzo y cols., 2001b; Jonsson y cols., 2001; Capasso y cols., 2001). Parece ser que esto se produciría al compartir enzimas hidrolíticas como la FAAH en el caso de la AEA, PEA, OEA, SEA y LEA, o la MAGL en el caso del 2-AG, 2-LG y 2-OG, de forma que, al ocupar estas moléculas *entourage* cualquiera de estas enzimas para su propia hidrólisis, evitan la degradación de la AEA y el 2-AG y permiten que la acción de estos eCBs sea más duradera, de ahí su posible acción cannabimimética.

Por último, también existen otras moléculas como las acil-dopaminas, de estructura similar a la NADA, como la oleildopamina (OLDA), un potente agonista endógeno del receptor TRPV1 (Chu y cols., 2003; Gavva y cols., 2004). También la palmitoildopamina (PALDA) y estearoildopamina (STERADA), que muestran este efecto tanto sobre AEA como NADA (De Petrocellis y cols., 2004). Algunas *N*-acilaminas, como la oleamida, la linoleamida y la araquidonamida, o *N*-acil-aminoácidos como la NAGly, también podrían interactuar con enzimas implicadas en la degradación de la AEA para evitar su degradación, con posibilidad de efecto *entourage* (Maurelli y cols., 1995; Cravatt y cols., 1996; Bradshaw y Walker, 2005), aunque en varios casos el mecanismo de acción de muchas de estas moléculas se ha relacionado más con la activación de receptores PPARs y TRPVs (Bradshaw y Walker, 2005).

1.3 Biosíntesis y liberación de endocannabinoides

Los eCBs se sintetizan a demanda en respuesta a un incremento en la concentración de calcio intracelular, y lo hacen a partir de precursores lipídicos localizados en la membrana plasmática, siendo liberados al exterior celular inmediatamente después de su producción (Piomelli, 2003), de modo similar a lo que ocurre con otros moduladores como prostaglandinas y leucotrienos, y de forma diferente a lo que sucede con los neurotransmisores clásicos, que se almacenan en vesículas antes de ser liberados. Las rutas de síntesis de los endocannabinoides más estudiadas son las de la AEA y el 2-AG.

Con respecto a la AEA, se han observado distintas rutas para su síntesis *in vivo* (Figura 4). La primera de ellas viene mediada por la acción sucesiva de dos enzimas. En primer lugar, una *N*-aciltransferasa (NAT) dependiente de calcio transfiere AA, desde una molécula de fosfatidilcolina (PC), a la fosfatidiletanolamina (PE), presente en la membrana celular, dando lugar al precursor *N*-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE). A continuación se produce la hidrólisis de NAPE por acción de una fosfolipasa D específica y también dependiente de calcio (NAPE-PLD), produciendo ácido fosfatídico (PA) y AEA (Di Marzo y cols., 1994). Tras estudios con ratones *knock-out* para la enzima NAPE-PLD, en los que se observaron niveles relativamente similares de AEA en estos animales que en los ratones *wildtype*, pareció evidente que debían existir rutas alternativas para la

producción de AEA (Leung y cols., 2006; Okamoto y cols., 2007; Simon y Cravatt, 2010). Por este motivo se investigó una segunda ruta de síntesis de la AEA, en la que el precursor NAPE es hidrolizado por una fosfolipasa C (PLC), produciéndose fosfo-anandamida y diacilglicerol (DAG), la cual es desfosforilada posteriormente por algunas fosfatasa como la fosfatidilinositol 5'fosfatasa SHIP1 o la tirosina fosfatasa PTPN22 (Liu y cols., 2008).

Una tercera ruta de síntesis de este endocannabinoide puede ocurrir por una doble desacilación de NAPE mediante la α,β -hidrolasa 4 (ABHD4) (Simon y Cravatt, 2006) y posterior hidrólisis del glicerofosfo AEA produciéndose AEA y glicerol-fosfato (Liu y cols., 2008). Finalmente, otra ruta alternativa podría estar mediada por la acción de la fosfolipasa secretora A2 (sPLA2), que puede hidrolizar NAPE generando N-araquidonoil-lisofosfatidiletanolamina (liso-NAPE), el cual es posteriormente hidrolizado por una lisofosfolipasa D (liso-PLD), dando lugar a AEA.

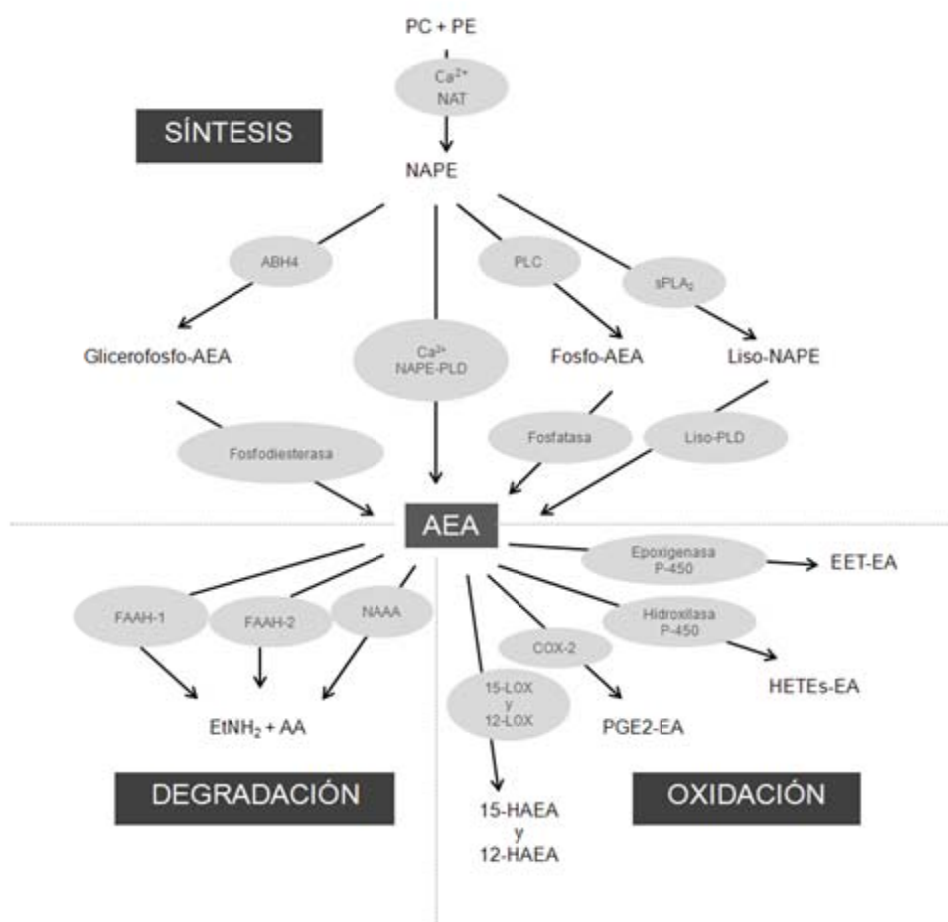


Figura 4. Posibles rutas metabólicas de la AEA. Adaptado de Maccarrone y cols., 2010; Guindon y Hohmann, 2008 y Fezza y cols., 2014.

Con respecto a la biosíntesis del 2-AG, tiene lugar cuando una molécula de DAG que presenta AA en la posición 2, es catalizada por una de las isoformas (α o β) de la diacilglicerol lipasa (DAGL)

dando lugar a 2-AG (Bisogno y cols., 2005) (Figura 5). El DAG es un mediador lipídico celular y se puede formar a partir de fosfolípidos precursores por acción bien de la PLC o de una fosfolipasa que actuaría específicamente sobre PA, para generar siempre DAG. Las DAGLs están localizadas en la membrana plasmática y son estimuladas por glutatión o calcio (Bisogno, 2008).

Se ha propuesto otra vía alternativa para generar 2-AG, aunque sólo actuaría en determinadas circunstancias (Ueda y cols., 1993). Se trata de la producción de 2-AG a partir de la desacilación del fosfatidilinositol (PI) a través de la enzima fosfolipasa A1 (PLA1) generando el intermediario 2-araquidonoil-lisofosfatidilinositol (liso-PI). A continuación tiene lugar la acción de una fosfolipasa C, selectiva de lisofosfatidilinositol (liso-PLC) sobre el intermediario liso-PI, produciéndose la molécula de 2-AG (Ueda y cols., 1993; Muccioli, 2010) (Figura 5).

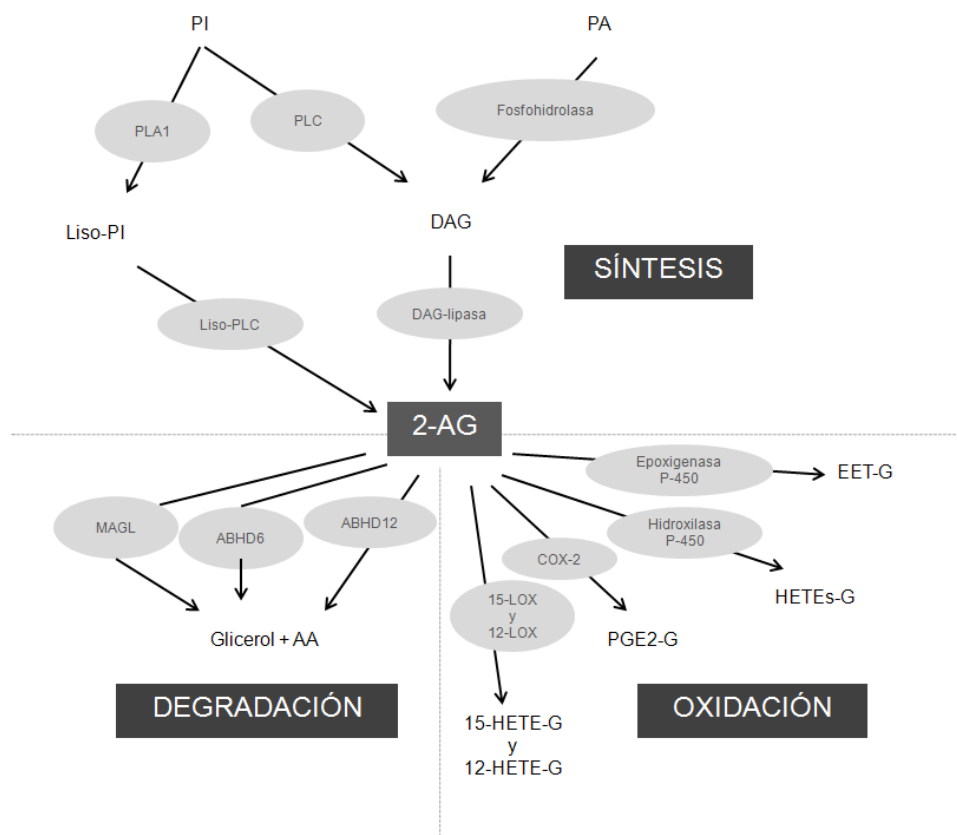


Figura 5. Posibles rutas metabólicas del 2-AG. Adaptado de Muccioli y cols., 2010; Guindon y Hohmann, 2008 y Fezza y cols., 2014. PA: ácido fosfatídico.

1.4 Inactivación de endocannabinoides

Una vez sintetizados, la AEA y el 2-AG son liberados al espacio sináptico y tras llevar a cabo sus acciones sobre los receptores CB₁ y CB₂, especialmente los situados en los terminales neuronales presinápticos, ven limitada su disponibilidad al ser transportados hacia el interior celular para ser

degradados. Se han propuesto distintos mecanismos por los que la AEA podría ser recaptada al interior celular, bien por difusión pasiva, o bien a través de un mecanismo de transporte facilitado mediante el transportador AMT (*anandamide membrane transporter*), así como a través de endocitosis dependiente de caveolina (Fowler, 2013). Debido a que se ha demostrado que se trata de un proceso saturable, competitivo, dependiente de la temperatura e independiente de iones sodio y de adenosina trifosfato (ATP) (Hillard y Jarrahian, 2000; Maccarrone y cols., 2002; Ronesi y cols., 2004), prácticamente se descarta la opción de que tenga lugar por difusión. Si además atendemos al hecho de que se han diseñado inhibidores específicos de este proceso (Pertwee, 2013), parece lógico pensar que tenga lugar a través de un transporte facilitado. Sin embargo, al no haberse podido clonar e identificar una proteína transportadora después de varios años de búsqueda de dicho transportador, se duda de esta posibilidad, lo que ha llevado a diferentes investigadores a proponer que la fuerza que genera que una simple difusión pasiva sea capaz de eliminar rápidamente la AEA del espacio extracelular y concentrarla en el interior de la célula, sería la rápida acción de la FAAH sobre la AEA internalizada (Deutch y cols., 2001). También se ha propuesto que el mecanismo de transporte podría ser bidireccional y podría funcionar tanto para introducir los eCBs liberados como para liberar estos compuestos tras su síntesis (Chicca y cols., 2012). En cualquier caso, este es otro de los retos más importantes en relación con el estudio del SCE, que está pendiente de nueva investigación.

Una vez dentro de la célula, los endocannabinoides son degradados a través de reacciones enzimáticas produciéndose su inactivación (Figuras 4 y 5). La anandamida es hidrolizada por la enzima FAAH dando lugar a AA y etanolamina (Cravat y cols., 1996). Se trata de una serin-hidrolasa anclada a membranas intracelulares, cuyo papel en la degradación de NAEs fue confirmado mediante la generación de ratones *knock-out* para esta enzima, en los cuales se veía reducida la actividad de FAAH del orden de 50-100 veces, en paralelo a un aumento de los niveles de AEA y otras NAEs en cerebro de un orden de magnitud (Cravatt y cols., 2001). En el encéfalo, la FAAH se localiza preferentemente en las neuronas postsinápticas siendo su distribución, en general, complementaria a la del receptor CB₁ (Egertová y cols., 1998; Ueda y cols., 2000), lo que hace pensar que esta enzima podría tener un papel en la regulación de la actividad del receptor CB₁ (Gulyas y cols., 2004). En 2006 se identificó otra amido hidrolasa que compartía un 20% de homología con FAAH, con un perfil similar en cuanto inhibición farmacológica y especificidad de sustrato, que fue llamada FAAH-2 (Wei y cols., 2006). Otros estudios han demostrado la presencia de una hidrolasa lisosomal llamada *N*-aciletanolamina amidasa ácida (NAAA), capaz de catalizar la misma reacción que FAAH a pH ácido (4,5 - 5) y que no presenta homología con FAAH y FAAH-2 (Ueda y cols., 2010).

Aunque el 2-AG también puede ser hidrolizado por la FAAH (Di Marzo y cols., 1998; Goparaju y cols., 1999), la degradación de este endocannabinoide se realiza fundamentalmente por la enzima MAGL (Dinh y cols., 2002). La MAGL es una serin-hidrolasa que preferentemente hidroliza monoacilglicerol produciendo el ácido graso correspondiente (AA en el caso del 2-AG) y glicerol. Se expresa de forma heterogénea en el cerebro, encontrándose los niveles más altos en las

regiones donde el receptor CB₁ está también presente, como el hipocampo, corteza cerebral y cerebelo (Dinh y cols., 2002). Además de la MAGL, existen otras enzimas con capacidad de hidrolizar 2-AG que se expresan en el cerebro, pudiendo ser responsables del 15% de la hidrólisis total de este endocannabinoide. Se han identificado dos hidrolasas con esta capacidad llamadas α/β hidrolasa dominio 6 (ABHD6) y α/β hidrolasa dominio 12 (ABHD12) (Savinainen y cols., 2012). La MAGL se localiza en los terminales presinápticos de las neuronas, ABHD6 en los postsinápticos y ABHD12, se expresa fundamentalmente en células de microglía (Savinainen y cols., 2012).

1.5 Metabolismo oxidativo de los endocannabinoides

Al igual que el ácido araquidónico, aquellos eCBs que contienen este ácido graso, pueden ser oxigenados mediante (LOXs), ciclooxigenasas (COXs) y actividades hidroxilasas y lipooxigenasas del complejo citocromo P450, dando lugar a leucotrienos, prostaglandinas y epóxidos (ácido epoxieicosatetraenoico, EET) e hidroxiácidos (ácidohidroxieicosatetraenoico, HETE) respectivamente (Guindon y Hohmann, 2008; Zelasko y cols., 2015) (Figuras 4 y 5). Estas reacciones enzimáticas no se consideran estrictamente reacciones de degradación ya que, aunque conducen a la inactivación de los endocannabinoides, generan una gran cantidad de nuevas moléculas con actividad sobre otras dianas moleculares (Guindon y Hohmann, 2008), que influyen sobre la homeostasis celular y tisular participando en diversas funciones fisiológicas como por ejemplo: respuesta a la inflamación, tono vascular, inmunidad o angiogénesis (Zelasko y cols., 2015).

Se ha estudiado especialmente este metabolismo oxidativo para los casos de la AEA y el 2-AG. En cuanto a las LOXs con capacidad metabólica sobre estas moléculas, se ha descrito que son la 12 y la 15-LOX. En concreto, la AEA puede ser metabolizada dando lugar a 12-HAEA y 15-HAEA, metabolitos a los que se les ha atribuido la capacidad de inhibir la FAAH y de activar los receptores TRPV1 (Van der Stelt y cols., 2002). El 2-AG también puede ser metabolizado por ambas LOXs generándose el metabolito 15-HETE-G que tiene la capacidad de activar receptores PPAR α (Kozak y cols., 2002).

En cuanto a las COXs, se ha observado que la isoforma COX-2, inducible en respuesta a estímulos inflamatorios en el SNC, es más efectiva que la COX-1 en el metabolismo de endocannabinoides (Kozak y cols., 2003). Tanto la AEA como el 2-AG pueden ser oxigenados *in vitro* por la COX-2 (Yu y cols., 1997; Kozak y Marnett, 2002), en el caso de la AEA, dando lugar a prostaglandina E2-etanolamida, también denominada prostamida E2, un metabolito que se une con diferente afinidad a los receptores para prostaglandinas E2 (PGE-2) (Ross y cols., 2002); y, en el caso del 2-AG, dando lugar a prostaglandina E2 éster de glicerol que produce hiperalgnesia *in vivo* (Hu y cols., 2008) y puede generar excitotoxicidad en el SNC (Sang y cols., 2007)

1.6 Mecanismos de transducción de señales

1.6.1 Mecanismos de transducción de señales para los receptores CB₁ y CB₂

La mayor parte de los efectos de los cannabinoides están mediados por la activación de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. Ambos son GPCRs, por tanto acoplados a proteína G con capacidad de hidrolizar el nucleótido guanosina trifosfato (GTP). La activación de la proteína G implica cambios conformacionales que conducen a la liberación de las subunidades de la proteína G (G α y G $\beta\gamma$) que inician la activación de cascadas de señalización intracelular. En general las vías de señalización por activación de ambos receptores cannabinoides son:

- La regulación de la enzima adenilato ciclasa (AC) implicada en la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), nucleótido imprescindible para la activación de la proteína quinasa A (PKA). Normalmente los receptores cannabinoides están acoplados a Gi/o y su activación supone una inhibición de la AC y por consiguiente de la PKA (Childers y cols., 1993). Sin embargo, en determinadas circunstancias, el receptor CB₁ puede estar acoplado a proteínas Gs, dando lugar a una acumulación de AMPc. Se ha observado que esto sucede cuando el receptor CB₁ presenta mutaciones en el tercer bucle intracelular (Ulfers y cols., 2002) o cuando las proteínas Gi/o son inactivadas por la *toxina pertussis* (Abadji y cols., 1999). A diferencia de lo que ocurre con los receptores CB₁, los receptores CB₂ no parecen acoplarse a Gs (Glass y Felder, 1997; Calandra y cols., 1999).
- La activación de los receptores cannabinoides también desencadena que el dímero $\beta\gamma$ active la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) p44/42 (Bouaboula y cols., 1995b; Sánchez y cols., 1998b; Guzmán y Sánchez, 1999; Davis y cols., 2003; Carrier y cols., 2004; Palazuelos y cols., 2006), JNK y p38 (Rueda y cols., 2000; Gertsch y cols., 2004; Herrera y cols., 2005), implicadas en diferenciación, crecimiento y muerte celular. También puede activarse la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la quinasa Akt, asociada con efectos pro-supervivencia (Gómez del Pulgar y cols., 2000; Molina-Holgado y cols., 2002b; Samson y cols., 2003; Palazuelos y cols., 2006, Sánchez y cols., 2003). Al actuar sobre la cascada de las quinasas, los cannabinoides, pueden modular factores de transcripción de las familias CREB/ATF, Fos/Jun (ambos relacionados con la proliferación y la muerte celular) y NF κ B (implicado en la regulación de varios genes de inflamación) (Herring y cols., 2001; Kaminski, 1998). También se ha observado que los cannabinoides pueden activar genes de expresión temprana como EGR-1 (Bouaboula y cols., 1995a), así como vías de señalización características de neurotrofinas y factores de crecimiento como NGF, BDNF o EGF (Butovsky y cols., 2005; Sánchez y cols., 2003).
- Modulación de la síntesis *de novo* del esfingolípido proapoptótico ceramida, aumentando su producción (Gómez del Pulgar y cols., 2002; Sánchez y cols., 1998b; Sánchez y cols., 2001; Carracedo y cols., 2006). La acumulación de ceramida permite la activación de la cascada de señalización de ERK, promoviendo el arresto del ciclo celular y la apoptosis

(Velasco y cols., 2012). A su vez, la acumulación de ceramida produce una respuesta de estrés en el retículo endoplásmico que desencadena la inducción sucesiva de la proteína de estrés p8, los factores de transcripción ATF-4 y CHOP y la pseudoquinasa TRB3, implicados en los procesos de muerte celular (Galve-Roperh y cols., 2008).

- Finalmente, se ha observado que los niveles de calcio intracelular aumentan (Sugiura y cols., 1996, 1997; Zoratti y cols., 2003), y a través de las proteínas G_q , se activa la proteína de membrana PLC. Una vez activada esta enzima, hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), dando lugar a los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y DAG, los cuales están involucrados en el aumento de la concentración intracelular de calcio por activación de los receptores IP del retículo endoplasmático y en la activación de la proteína quinasa C (PKC), respectivamente (De Petrocellis y cols., 2007; Zoratti y cols., 2003).

Además de las vías explicadas, existen otros mecanismos de señalización que son llevados a cabo por la activación del receptor CB_1 , pero no del receptor CB_2 . En concreto, la activación del receptor CB_1 puede modular canales iónicos vía G_i/o . Por un lado, se induce la activación de los canales de potasio tipo A (Childers y Deadwyler, 1996), así como de canales GIRK (del inglés: *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*) (Henry y Chavkin, 1995; Mackie y cols., 1995). Por otro lado, la activación del receptor CB_1 supone que la interacción del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G con determinados canales iónicos produzca su inhibición, habiéndose observado inactivación de canales de calcio de tipo N, P y Q, así como de canales de potasio D tras la activación del receptor CB_1 (Felder y cols., 1995).

El receptor CB_1 también está involucrado en la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva dependiente de calcio (Fimiani y cols., 1999, Stefano y cols., 2000), cuya acción produce pequeñas cantidades de óxido nítrico (NO) que es responsable de la relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, de la transmisión retrógrada y de la plasticidad sináptica. El NO producido de forma constitutiva actúa como un represor de la expresión de NF κ B, implicado en la regulación de genes involucrados en procesos inflamatorios, como la NOS inducible (iNOS) y la interleuquina de tipo 6 (IL-6) (Fimiani y cols., 1999). También se ha visto que los cannabinoides pueden atenuar la inducción de iNOS ejercida por estímulos proinflamatorios (Esposito y cols., 2006).

1.6.2 Mecanismos de transducción de señales para otros receptores con los que interaccionan los cannabinoides

Como se ha mencionado anteriormente algunos cannabinoides pueden unirse a otro tipo de receptores distintos de los receptores CB_1 y CB_2 , como el receptor metabotrópico GPR55. Cuando este receptor es activado, se puede acoplar a $G\alpha_{13}$ (Ryberg y cols., 2007; Henstridge y cols., 2009), a $G\alpha_{12}$ o a $G\alpha_q$ (Lauckner y cols., 2008), desencadenando cascadas de señalización que activan las vías de la PLC. Como consecuencia, se produce un aumento de calcio intracelular, activación de las proteínas G monoméricas Rac1, RhoA y Cdc42, de ROCK (una proteína quinasa

de la familia AGC asociada a Rho), y de las MAPKs ERK y p38, que pueden inducir la activación de los factores de transcripción NFAT, NFκB, CREB y ATF2 (Lauckner y cols., 2008; Henstridge y cols., 2009, 2010; Kapur y cols., 2009; Oka y cols., 2010b). También se ha observado que GPR55 interacciona con GASP-1 y que esta interacción determina la degradación de GPR55 (Kargl y cols., 2012a). Con respecto a otros GPCRs huérfanos como el GPR18 y el GPR119, se dispone de menos información, pero se ha observado que tras la activación de GPR18, se acopla a proteínas Gi/o y activa vías de señalización de MAPKs, como p44/42 y JNK (Kohn y cols., 2006; McHugh y cols., 2010); mientras que la activación de GPR119 da lugar a un aumento en la concentración de AMPc intracelular, al estar acoplado a proteínas Gs (Godlewski et al., 2009).

Otros receptores involucrados en la actividad cannabinoide son los ya mencionados TRP, cuya activación por cannabinoides produce un aumento en la concentración de calcio intracelular, desencadenando respuestas celulares involucradas en estimulación sensorial, dolor e inflamación (Roberts y cols., 2002; De Petrocellis y Di Marzo, 2010).

Por último, la activación de los receptores PPARs por cannabinoides regula la expresión de genes, como por ejemplo, el factor NFκB, lo que implica una disminución de la expresión de iNOS o COX-2, entre otros (Sun y cols., 2006, 2007).

1.6.3 Oligomerización de los receptores cannabinoides

Otra cuestión importante en relación con los receptores cannabinoides es que se ha descrito que pueden interaccionar entre ellos y/o con otros receptores acoplados a proteínas G formando dímeros o incluso trímeros (Ferré, 2015). Se ha observado la formación de homodímeros para el receptor CB₁ (Wager-Miller y cols., 2002; Mackie, 2005a); sin embargo, aún no se ha demostrado la formación de estas estructuras para el receptor CB₂. Lo que sí se ha observado es la formación de heterómeros entre ambos receptores cannabinoides (Callén y cols., 2012), así como del receptor CB₁ con otros receptores que utilizan sistemas efectores similares, como los receptores opioides (familias μ y δ) (Rozenfeld y cols., 2012; Hojo y cols., 2008; Rios y cols., 2006; Bushlin y cols., 2012), de dopamina (Akirav y cols., 2011), adenosina (Bonaventura y cols., 2014), angiotensina (Rozenfeld y cols., 2011), serotonina 5HT_{2A} (Viñals y cols., 2015), GPR55 (Martínez-Pinilla y cols., 2014; Kargl y cols., 2012b), y orexina (Ward y cols., 2011; Jäntti y cols., 2014). De igual modo se ha observado la formación de heterómeros del receptor CB₂ con otros receptores como GPR55 (Balenga y cols., 2014; Moreno y cols., 2014), con 5HT_{1A} (Pazos y cols., 2013) y con HER2 (Pérez-Gómez y cols., 2015). La formación de homodímeros y heterodímeros puede afectar a la respuesta tras la unión del ligando al receptor cannabinoide, aumentando o revirtiendo la señalización mediada por un único receptor, lo que influye en la farmacología de ese receptor en dependencia de que esté formando heterómeros o no (Ferré y cols., 2009). Por ello, parece necesario avanzar en la identificación de las funciones biológicas que supone la formación de estas estructuras y sus consecuencias a nivel farmacológico.

2 Farmacología del Sistema Cannabinoide

Desde que se descubrió la estructura del Δ^9 -THC, una parte importante de la investigación en cannabinoides, se ha dirigido hacia la obtención de compuestos análogos con mejores características farmacológicas que este compuesto natural. Estudios de relación estructura-actividad han permitido obtener compuestos cannabimiméticos con mayor afinidad y especificidad por los receptores cannabinoides (Tabla 1). Debido a la amplia farmacología que se ha generado en la de investigación con cannabinoides, se han desarrollado distintos criterios para clasificar las moléculas capaces de modular el SCE: bien por su naturaleza o procedencia, bien por su estructura química, o bien por su actividad farmacológica. En este trabajo se han clasificado atendiendo primero a la acción farmacológica que producen estos ligandos, es decir, si son agonistas, antagonistas/agonistas inversos, moduladores alostéricos o agonistas indirectos y, en un segundo orden de clasificación, se ha atendido a su estructura química.

2.1 Agonistas de receptores CB₁ y CB₂

Los compuestos que activan los dos receptores cannabinoides con una potencia relativamente similar (Figura 6) se pueden clasificar dentro de uno de los siguientes grupos: cannabinoides clásicos, cannabinoides no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

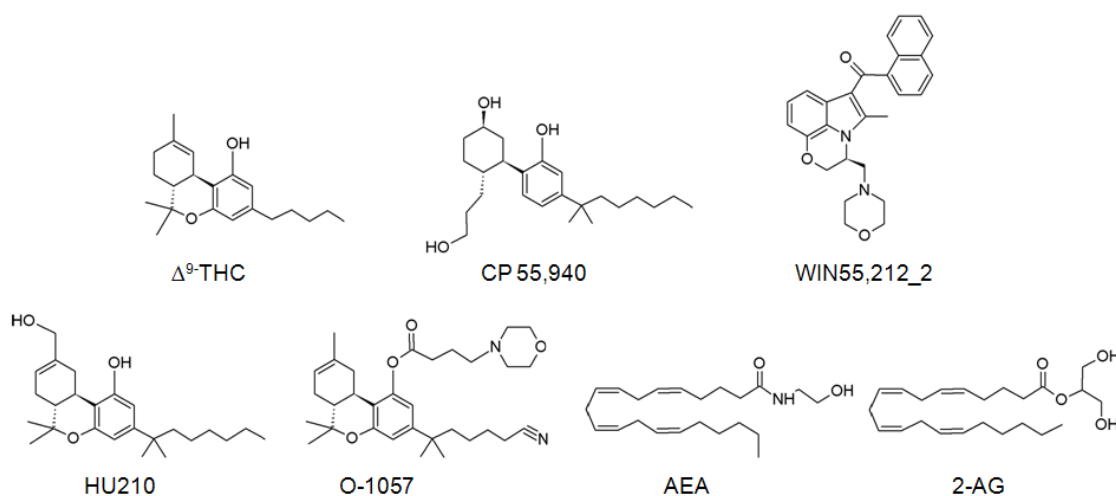


Figura 6. Estructura química de los cannabinoides agonistas de ambos receptores más representativos de las diferentes familias químicas.

2.1.1 Cannabinoides clásicos

Este grupo incluye los principales fitocannabinoides (Figura 7), compuestos con estructura de dibenzopirano y una cadena alifática, entre los que cabe destacar el Δ^9 -THC, que tiene elevada afinidad por ambos receptores (Tabla 1), aunque presenta una eficacia moderada, comportándose como un agonista parcial (Petitet y cols., 1998); y el Δ^8 -THC que presenta mayor afinidad por ambos receptores cannabinoides que el Δ^9 -THC (Tabla 1).

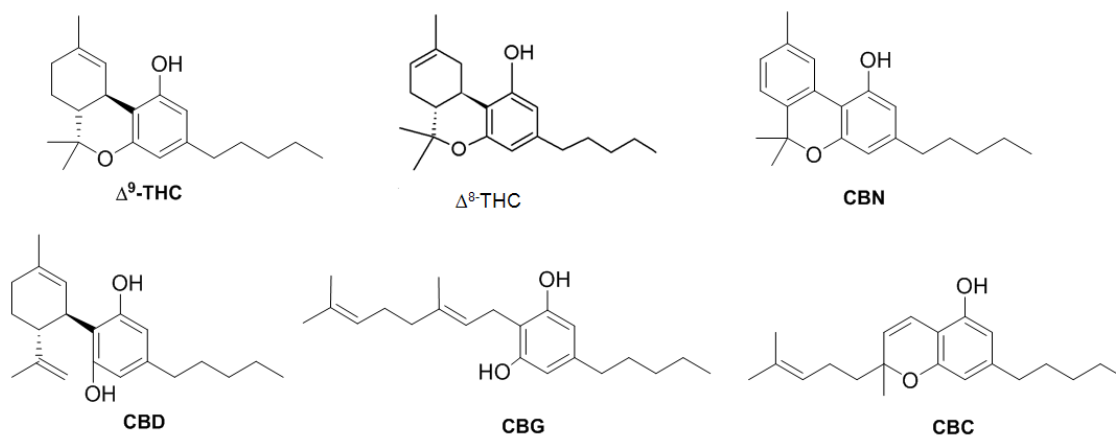


Figura 7. Estructura química de los principales fitocannabinoides.

En este grupo también se incluyen cannabinoides sintéticos como el HU-210 (análogo del Δ^8 -THC, ver Figura 6), que presenta mayor afinidad por ambos receptores cannabinoides (Tabla 1), y se trata de uno de los agonistas más potentes caracterizados (Ottani y Giuliani, 2001), efecto atribuido a la sustitución de la cadena alifática de 5 carbonos del Δ^9 -THC por un di-metil-heptilo. Otro ejemplo, es el O-1057 (ver figura 6), un derivado de Δ^8 -THC, con mayor solubilidad en medio acuoso, pudiendo interactuar con los receptores cannabinoides, cuando se usa como único vehículo agua o suero salino (Pertwee y cols., 2000).

2.1.2 Cannabinoides no clásicos

Los cannabinoides no clásicos son análogos sintéticos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC que carecen de anillo pirano. Entre ellos destaca el CP-55,940 (Figura 6) que posee una estructura bicíclica y tiene una eficacia relativamente alta, unas 5 veces más potente que el Δ^9 -THC, aunque al igual que éste, es activo sobre ambos tipos de receptores cannabinoides (Tabla 1).

2.1.3 Aminoalquilindoles

A principios de los años 90, los aminoalquilindoles fueron identificados como ligandos cannabinoides (D'Ambra y cols., 1992). Estos compuestos son derivados de la pravadolina e inicialmente fueron empleados como moléculas antiinflamatorias no esteroideas, siendo el WIN55,212-2 su principal representante como cannabimimético (Richter y Loscher, 1994). Su actividad farmacológica en ensayos *in vivo* es similar a la del Δ^9 -THC, aunque existen evidencias de que el WIN55,212-2 interactúa con los receptores cannabinoides de manera distinta a como lo hacen los análogos clásicos y no clásicos (Pertwee 1997, 2010). También parecen ser diferentes sus propiedades farmacocinéticas, el WIN55,212-2 es de acción más rápida y menos duradera que el Δ^9 -THC. Su afinidad es mayor por el receptor CB₂ que por el CB₁ (Tabla 1) y, al igual que el CP55,940, la eficacia es relativamente alta (Breivogel y Childers, 2000).

2.1.4 Eicosanoides

Dentro de este grupo se encuentran los derivados del AA o de otros ácidos grasos polinsaturados. Como ya se ha comentado con anterioridad, entre ellos los mejor caracterizados son los endocannabinoides AEA y 2-AG, que presentan afinidad por ambos receptores, ligeramente superior sobre el receptor CB₁ (Tabla 1), aunque la eficacia es bastante baja. El problema de estos compuestos es su estabilidad, ya que son fácilmente hidrolizables y eso determina su actividad biológica. Cuando se usan inhibidores de la hidrólisis enzimática en los ensayos de afinidad/eficacia, la AEA llega a unirse a los receptores cannabinoides en un rango parecido al del Δ⁹-THC. Un análogo de la AEA más resistente a la hidrólisis enzimática como la metanandamida (met-AEA) (Figura 8), eleva la afinidad por los receptores cannabinoides aunque principalmente a nivel del receptor CB₁, lo que la hace ser relativamente selectiva (ver más adelante).

2.2 Agonistas selectivos del receptor CB₁

Las primeras investigaciones dirigidas al desarrollo de cannabinoides selectivos para el receptor CB₁ (Figura 8), se basaron en modificaciones de la estructura de la AEA. Se desarrollaron distintas estrategias para aumentar su selectividad, como la modificación del grupo polar de la AEA, obteniéndose el araquidonoil-2'-cloroetilamida (ACEA) o araquidonilciclopropilamida (ACPA) (Hillard y cols., 1999), o bien mediante la metilación de la anandamida, que dio lugar a la met-AEA (Abadji y cols., 1994), o su análogo O-1812, que además de esta metilación presenta un grupo ciano (Di Marzo y cols., 2001a). Es importante destacar, que la metilación en el caso de la met-AEA como en O-1812 hace que, como se ha mencionado antes, presenten mayor resistencia a la acción hidrolítica de la enzima FAAH, lo que no sucedía en el caso de ACEA y ACPA, a pesar de ser, junto con el O-1812 (Di Marzo y cols., 2001a), los agonistas selectivos del receptor CB₁ con mayor afinidad por este receptor (Hillard y cols., 1999). Por ello, se procedió a metilar la ACEA, con la intención de mantener una elevada afinidad por el receptor y de disminuir la capacidad hidrolítica de FAAH sobre la molécula y, aunque sí se consiguió lo segundo, la afinidad por el receptor se vio disminuida del orden de 20 veces con respecto a la propia ACEA (Jarrahian y cols., 2000). Otro endocannabinoide que presenta una elevada y selectiva afinidad por el receptor CB₁ es el 2-AGE, que tiene una eficacia similar a la del CP55,940 aunque una potencia menor (Hannus y cols., 2001).

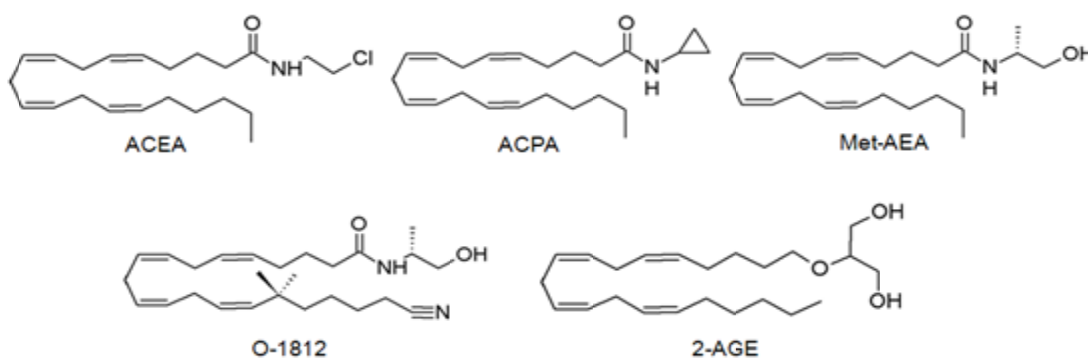


Figura 8. Estructura química de los principales agonistas selectivos del receptor CB₁.

Tabla 1. Principales ligandos cannabinoides y sus valores de K_i para ambos receptores cannabinoides, obtenidos en ensayos *in vitro* de desplazamiento de [3 H]-CP55,940 o [3 H]-HU243 en distintos soportes biológicos con sitios de unión específicos de los receptores CB₁ o CB₂.

Ligando	K_i rCB ₁ (nM)	K_i rCB ₂ (nM)	Selectividad rCB ₁	Selectividad rCB ₂	Referencia
Agonistas de ambos receptores cannabinoides					
Δ^9 -THC	5,1	3,1	0,6	1,6	Iwamura y cols., 2001
	35,3	3,9	0,1	9,1	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	39,5	40	1	1	Bayewitch y cols., 1996
	21	36,4	1,7	0,6	Showalter y cols., 1996
	53,3	75,3	1,4	0,7	Felder y cols., 1995
	80,3	32,2	0,4	2,5	Rhee y cols., 1997
	Δ^8 -THC	44	44	1	1
47,6		39,3	0,8	1,2	Busch-Petersen y cols., 1996
HU-210	0,1	0,5	8,6	0,1	Felder y cols., 1995
	0,1	0,2	1,7	0,6	Rhee y cols., 1997
	0,7	0,2	0,3	3,3	Showalter y cols., 1996
O-1057	4,4	11,2	2,6	0,4	Pertwee y cols., 2000
CP-55,940	5	1,8	0,4	2,8	Ross y cols., 1999a
	3,7	2,6	0,7	1,5	Felder y cols., 1995
	1,4	1,4	1	1	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	0,6	0,7	1,2	0,8	Showalter y cols., 1996
WIN55,212_2	0,5	2,8	5,6	0,2	Hillard y cols., 1999
	9,9	16,2	1,6	0,6	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	4,4	1,2	0,3	3,7	Hillard y cols., 1999
	1,9	0,3	0,1	6,8	Showalter y cols., 1996
	62,3	3,3	0,1	18,9	Felder y cols., 1995
AEA	123	4,1	0	30	Shire y cols., 1996a
	61	93	1,5	0,7	Lin y cols., 1998
	89	371	4,2	0,2	Showalter y cols., 1996
	543	940	1,7	0,6	Felder y cols., 1995
	71,7	279	3,9	0,3	Hillard y cols., 1999
	252	581	2,3	0,4	Mechoulam y cols., 1995
2-AG	472	1400	3	0,3	Mechoulam y cols., 1995
	58,3	145	2,5	0,4	Ben-Shabat y cols., 1998
Agonistas selectivos del receptor CB ₁					
ACEA	1,4	> 2000	> 1428,6	-	Hillard y cols., 1999
	5,3	195	36,9	-	Lin y cols., 1998
metanandamida	2,2	715	325	-	Hillard y cols., 1999
	17,9	868	48,5	-	Lin y cols., 1998
	20	815	40,8	-	Khanolkar y cols., 1996
O-1812	28,3	868	30,7	-	Goutopoulos y cols., 2001
	3,4	3870	1138,2	-	Di Marzo y cols., 2001a
noladin éter	21,2	> 3000	> 141,5	-	Hanus y cols., 2001

Ligando	K _i rCB ₁ (nM)	K _i rCB ₂ (nM)	Selectividad rCB ₁	Selectividad rCB ₂	Referencia
Agonistas selectivos del receptor CB ₂					
JWH-133	677	3,4	-	199,1	Huffman y cols., 1999
JWH-051	1,2	0	-	37,5	Huffman y cols., 1996
JWH-139	2290	14	-	163,6	Huffman y cols., 1998
L-759,633	1043	6,4	-	163	Ross y cols., 1999a
	15850	20	-	792,5	Gareau y cols., 1996
L-759,656	4888	11,8	-	414,2	Ross y cols., 1999a
	> 20000	19,4	-	>1030,9	Gareau y cols., 1996
HU-308	> 10000	22,7	-	> 440,5	Hanus y cols., 1999
HU-910	1400	6	-	233,3	Horváth y cols., 2012
O-3223	1115	14,7	-	75,9	Kinsey y cols., 2011
JWH-015	383	13,8	-	27,8	Showalter y cols., 1996
L-768,242	1917	12	-	159,8	Gallant y cols., 1996
AM-1241	280	3,4	-	82,4	Ibrahim y cols., 2003
Antagonistas / agonistas inversos del receptor CB ₁					
SR141716A	11,8	13200	1118,6	-	Felder y cols., 1998
	11,8	973	82,5	-	Felder y cols., 1995
	12,3	702	57,1	-	Showalter y cols., 1996
	5,6	> 1000	> 178,6	-	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	2	> 1000	> 505,1	-	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	1,8	514	285,6	-	Ruiu y cols., 2003
AM-251	7,5	2290	305,7	-	Lan y cols., 1999a
AM-281	12	4200	350	-	Lan y cols., 1999b
SR147778	3,5	400	114,3	-	Rinaldi-Carmona y cols., 2004
LY-320135	141	14900	105,7	-	Felder y cols., 1998
MK-0364	0,13	170	1307,7	-	Fong y cols., 2007
Antagonistas / agonistas inversos del receptor CB ₂					
SR144528	437	0,6	-	728,3	Rinaldi-Carmona y cols., 1998a
	>10000	5,6	-	> 1785,7	Ross y cols., 1999a
	70	0,3	-	250	Ruiu y cols., 2003
	50,3	2	-	25,3	Iwamura y cols., 2001
AM-630	5152	31,2	-	165,1	Ross y cols., 1999a
JTE-907	2370	35,9	-	66	Iwamura y cols., 2001
Antagonistas neutros CB ₁ o CB ₂					
NESS-0327	0,00035	21	60000	-	Ruiu y cols., 2003
AM-4113	0,89	92	103,4	-	Sink y cols., 2008
O-2050	2,5	0,2	0,1	12,5	Wiley y cols., 2011

2.3 Agonistas selectivos del receptor CB₂

También se han diseñado y sintetizado agonistas selectivos del receptor CB₂ siguiendo diferentes estrategias. Por un lado, se han hecho modificaciones a partir de la estructura de algunos fitocannabinoides. Este es el caso de los siguientes compuestos: JWH-133 (Huffman y cols., 1999), JWH-051 (Huffman y cols., 1996), JWH-139 (Huffman y cols., 1998), L-759,633 y L-759,656 (Ross y cols., 1999a), HU-308 (Hanus y cols., 1999) HU-910 (Horváth y cols., 2012) y O-3223 (Kinsey y cols., 2011) (Ver Figura 9), todos ellos con elevada potencia y selectividad por el receptor CB₂ (Tabla 1). Por otro lado, se ha utilizado la estructura de aminoquilindoles modificando distintos sustituyentes, en los compuestos: JWH-015 (Showalter y cols., 1996), L-768,242 (Gallant y cols., 1996) y AM-1241 (Ibrahim y cols., 2003) (Ver Figura 9 y Tabla1). Se ha observado que los compuestos AM-1241 y L-768,242 pueden comportarse como “*protean agonist*”, es decir, que en función del tejido/célula donde se evalúe su efecto biológico y el tono basal de activación del receptor cannabinoide, este ligando puede actuar como agonista o como antagonista (Mancini y cols., 2009). La mayoría de estos compuestos están desprovistos de los efectos psicoactivos derivados de los cannabinoides, dado que tienen muy poca o nula afinidad por el receptor CB₁, por lo que representan una buena alternativa para el tratamiento de algunos trastornos neurológicos, donde la activación/inhibición del receptor CB₁ puede representar un problema (Sagredo y cols., 2007).

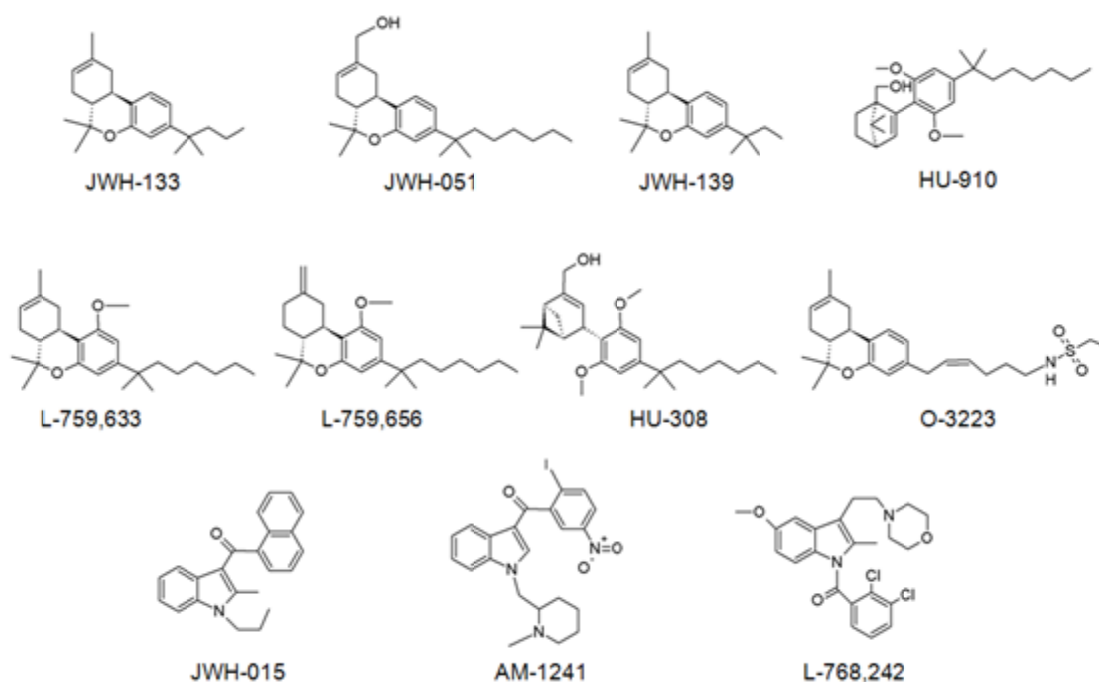


Figura 9. Estructura química de los principales agonistas selectivos del receptor CB₂.

2.4 Antagonistas / agonistas inversos del receptor CB₁

El primer antagonista del receptor CB₁, capaz de revertir los efectos producidos por la activación de este receptor, tanto *in vitro* como *in vivo*, fue el SR141716A, también conocido como rimonabant, un diarilpirazol sintetizado por primera vez en 1994 por investigadores de la compañía francesa Sanofi-Synthelabo (Rinaldi-Carmona y cols., 1994). Se han llevado a cabo muchos estudios acerca de esta familia de diarilpirazoles para el desarrollo de nuevas moléculas con capacidad de antagonizar el receptor CB₁ (Figura 10), como el AM-251 (Gatley y cols., 1996), el AM-281 (Gatley y cols., 1998) y el SR147778, también conocido como surinabant (Rinaldi-Carmona y cols., 2004). Por otro lado, se han desarrollado moléculas a partir de otras estructuras que también tienen capacidad antagonista selectiva del receptor CB₁ (Figura 10), como es el caso del LY-320135, una molécula con estructura de benzofurano (Felder y cols., 1998) o el MK-0364 (Fong y cols., 2007), también conocido como taranabant. De todos ellos, el LY-320135 es el que presenta menor afinidad por el receptor CB₁ (Tabla 1). Algunos tienen afinidad por receptores no-cannabinoides como el AM-251 y el AM-281, que presentan afinidad en rango submicromolar por los receptores muscarínicos y de serotonina 5HT₂ (Howlett y cols., 2002; Pertwee, 1999). Debido a su buena selectividad (Tabla 1) y a que fue el primero en ser desarrollado, el SR141716A es el antagonista selectivo del receptor CB₁ más empleado en investigación (Pertwee, 2010). Incluso se desarrolló su uso en clínica para el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico, formulado como Acomplia[®] (Topol y cols., 2010), pero problemas de depresión/suicidio en algunos pacientes tratados con rimonabant detectados en los estudios de seguimiento del fármaco llevaron a su retirada en 2008. Dichos efectos secundarios se deben a que estos antagonistas no sólo previenen o atenúan los efectos farmacológicos de los agonistas cannabinoides, sino que provocan por sí solos efectos contrarios a los evocados por los agonistas cannabinoides. Al principio, este efecto se atribuyó a un bloqueo del tono cannabinoide endógeno, aunque actualmente se asume que estos antagonistas tienen además la capacidad de comportarse como agonistas inversos (Pertwee, 2005a; Pertwee y cols., 2010).

2.5 Antagonistas / agonistas inversos del receptor CB₂

La primera molécula sintetizada con capacidad de revertir los efectos provocados por la activación del receptor CB₂ fue el diarilpirazol SR144528 (Figura 11), también desarrollada por Sanofi-Synthelabo (Rinaldi-Carmona y cols., 1998). Esta molécula presenta afinidad selectiva por el receptor CB₂ y una elevada potencia como antagonista. Al igual que el rimonabant y otros diarilpirazoles que son antagonistas/agonistas inversos selectivos del receptor CB₁, el SR144528 también se comporta como agonista inverso del receptor CB₂, pudiendo provocar por sí mismo efectos inversos a los compuestos agonistas de este receptor (Howlett y cols., 2002; Pertwee y cols., 2005; Pertwee, 1999). Otro antagonista del receptor CB₂ es el aminoalquilindol AM-630 (Ross y cols., 1999a) (Figura 11). Del mismo modo que ocurre con los agonistas AM-1241 y L-768,242, el AM-630 puede comportarse como “*protean agonist*” (Bolognini y cols., 2012). Por último, el JTE-907 (Iwamura y cols., 2001) es una molécula más desconocida y menos utilizada que las dos anteriores que actúa como agonista inverso para el receptor CB₂ (Figura 11).

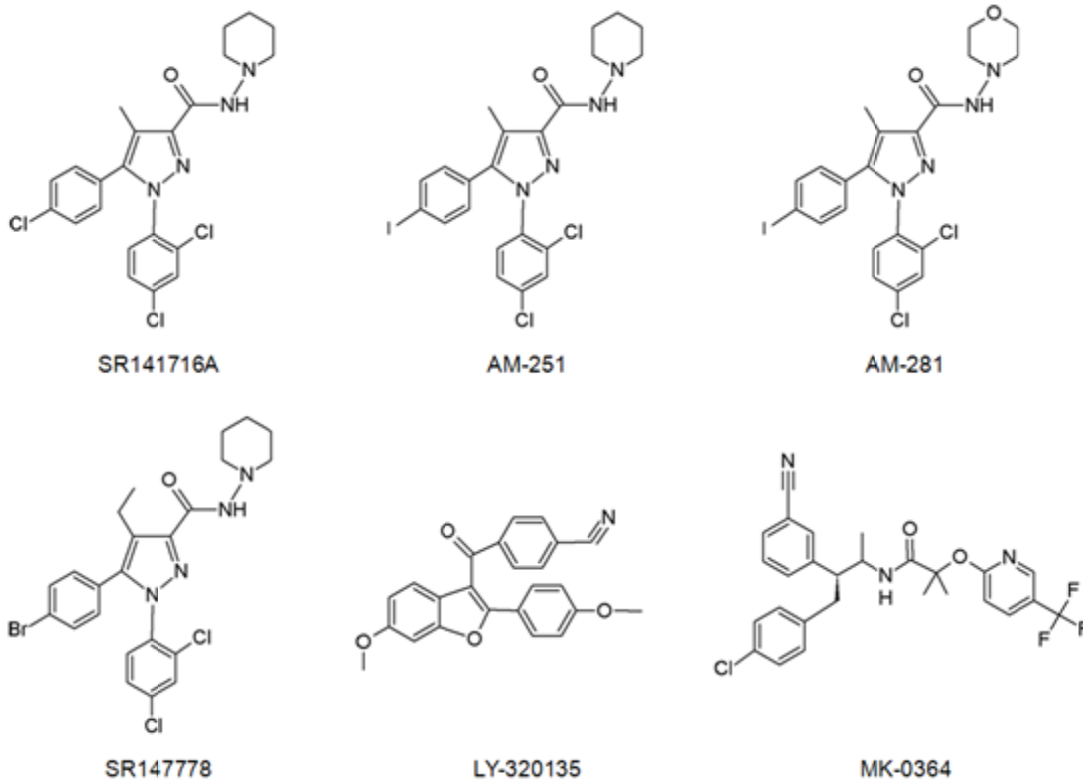


Figura 10. Estructura química de los principales antagonistas/ agonistas inversos selectivos del receptor CB₁.

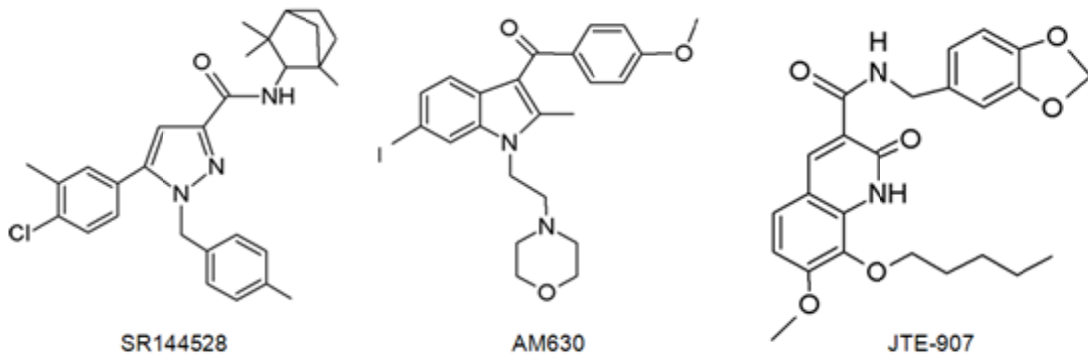


Figura 11. Estructura química de los principales antagonistas/ agonistas inversos selectivos del receptor CB₂.

2.6 Antagonistas neutros de los receptores cannabinoides

En la actualidad existe un considerable interés en la posibilidad de desarrollar potentes antagonistas neutros de los receptores CB₁ y CB₂, es decir, moléculas con elevada afinidad y selectividad por los receptores CB₁ o CB₂ que carezcan de actividad como agonistas inversos. Se trabaja en encontrar moléculas con este perfil para el receptor CB₂, basadas en carboxiamidas

bifenílicas (Bertini y cols., 2015), pero el avance ha sido escaso hasta la fecha. En cuanto al receptor CB₁ la investigación está un poco más desarrollada. Se han sintetizado moléculas como el NESS-0327, un análogo del SR141716A (Figura 12; Rui y cols., 2003), el AM-4113 (Bergman y cols., 2008) o el derivado del cannabidiol (CBD) O-2654 (Thomas y cols., 2004, 2007). En la búsqueda de este tipo de moléculas se observó que la sulfonamida O-2050 presentaba antagonismo neutro para ambos receptores cannabinoides (Figura 12; Wiley y cols., 2002). Hay que mencionar que el desarrollo de estos antagonistas neutros del receptor CB₁, se ha apoyado en la necesidad de solucionar los problemas de agonismo inverso del rimonabant que provocaba sus efectos secundarios en el tratamiento de los pacientes obesos. También se ha trabajado en el desarrollo de antagonistas del receptor CB₁ que no atraviesan la BHE y que sólo fueran activos sobre los procesos periféricos mediados por el receptor CB₁, cuyo bloqueo tiene efectos positivos en la regulación de la ingesta y en el balance energético (Sharma y cols., 2015). Los resultados hasta la fecha no han sido especialmente prometedores (Fulp y cols., 2012, 2013; Cumella y cols., 2012; Rovër y cols., 2013).

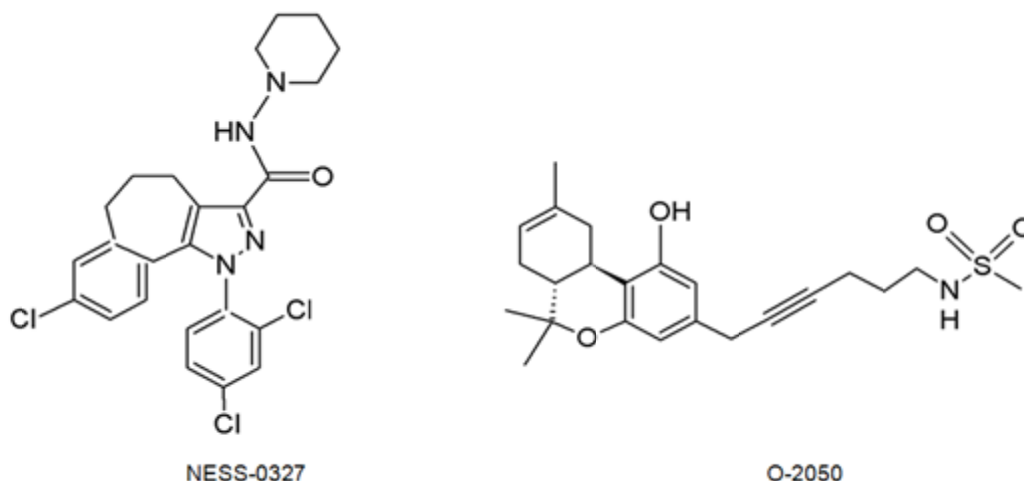


Figura 12. Estructura química de los principales antagonistas neutros de los receptores cannabinoides.

2.7 Moduladores alostéricos

En los apartados anteriores se han descrito los distintos tipos de ligandos cannabinoides y la afinidad que presentan por los receptores CB₁ y CB₂. Muchos de estos ligandos han sido diseñados, sintetizados y caracterizados como posibles compuestos con utilidad terapéutica por su capacidad de unirse al sitio ortostérico de los receptores cannabinoides y los efectos beneficiosos que ello podría implicar en determinadas patologías. Sin embargo, en los últimos años, el estudio y búsqueda de potenciales moduladores alostéricos de los receptores CB₁ y CB₂ han surgido como una propuesta farmacológica muy atractiva en el campo de los cannabinoides (Shore y cols., 2014; Picone y Kendall., 2015). Esto se debe a que los moduladores alostéricos interactúan con sitios que son topográficamente distintos al sitio ortostérico, modulando las respuestas farmacológicas

clásicas (May y cols., 2007). En muchos casos, estos moduladores alostéricos podrían aumentar eficacia y selectividad respecto a sus efectos biológicos, y, sobre todo, reducir algunos de los efectos secundarios detectados con compuestos activos sobre los sitios ortostéricos (Abood, 2016).

Un derivado indol-2-carboxiamida denominado ORG27569 (Figura 13) fue la primera molécula identificada como prototipo de modulador alostérico positivo del receptor CB₁ (Price y cols., 2005), capaz de aumentar la unión ortostérica de CP55,940 al receptor CB₁, aunque disminuye su eficacia agonista en las respuestas mediadas por G_α (Baillie y cols., 2013). Existen otras moléculas derivadas de ORG27569, como ORG27759 y ORG29647 que también presentan esta capacidad de modular alostéricamente el receptor CB₁, potenciando la unión del CP55,940 a este receptor (Price y cols., 2005), así como los derivados LDK1256 y LDK1258 (Cawston y cols., 2015; Mahmoud y cols., 2013; Khurana y cols., 2014). La modificación de otro tipo de estructuras químicas con esta capacidad de modular alostéricamente la activación del receptor CB₁ ha dado lugar a los compuestos PNCSBAM-1 (Horswill y cols., 2007) y RTI371 (Navarro y cols., 2009), (ver Figura 13). Por último, la molécula endógena lipoxina A4, también parece actuar como modulador alostérico positivo del receptor CB₁ (Pamplona y cols., 2012). En cuanto al receptor CB₂, actualmenteno hay descrito ningún modulador alostérico (Picone y Kendall, 2015), aunque es un campo de investigación que está despertando mucho interés (Cawston y cols., 2015).

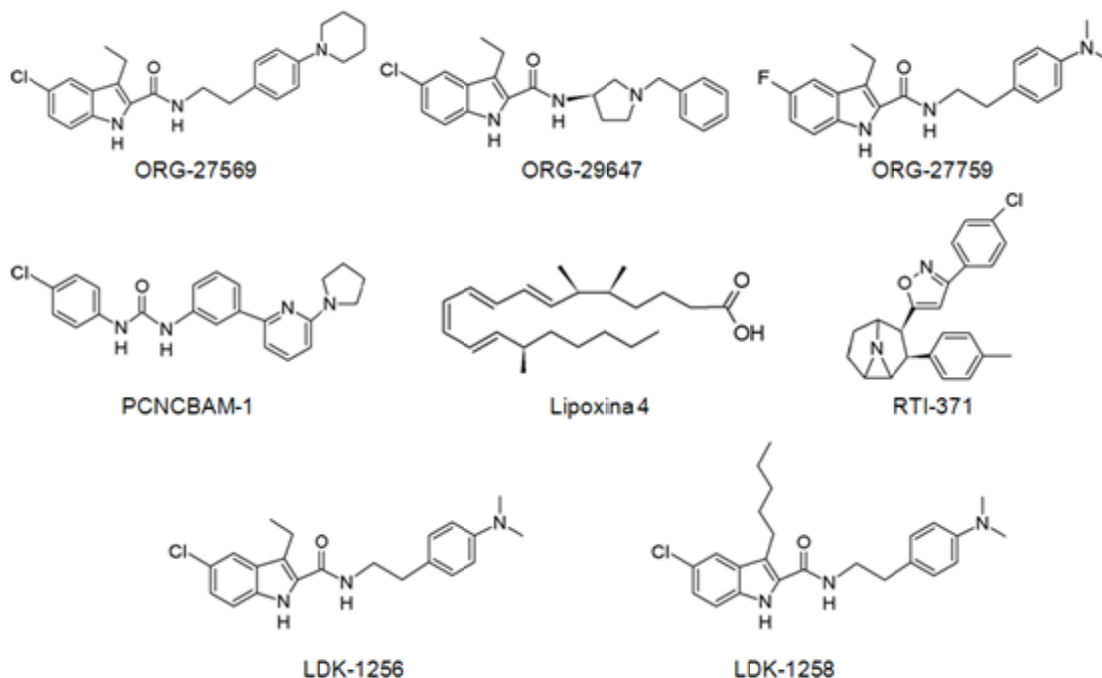


Figura 13. Estructura química de algunos moduladores alostéricos del receptor CB₁

2.8 Agonistas indirectos de los receptores cannabinoides

Frente a los clásicos ligandos de los sitios ortostéricos de los receptores CB₁ y CB₂ y la novedad que representan los nuevos moduladores alostéricos, también en el caso del SCE se han desarrollado inhibidores del proceso de inactivación de los eCBs, que se pueden clasificar como agonistas indirectos de los receptores cannabinoides. En primer lugar se han diseñado y sintetizado inhibidores del transportador de membrana, con el fin de impedir la recaptación de los eCBs (Goutopoulos y Makriyannis, 2002). Es cierto, que se trata de uno de los elementos del SCE que no ha podido ser identificado todavía y del que se tiene dudas de si existe o no (ver sección 1.4). Sin embargo, el hecho concreto es que se han podido desarrollar inhibidores del proceso de recaptación, como el AM404 (Jarrahian y cols., 2000), el VDM11 (De Petrocellis y cols., 2000) o el UCM707 (López-Rodríguez y cols., 2003), todos ellos con estructura eicosanoide. Estos compuestos son activos, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la elevación del tono endocannabinoide, lo que se ha considerado como una prueba a favor de la existencia de este mecanismo de transporte/recaptación de eCBs como primer elemento en el proceso de inactivación de estos ligandos endógenos. También se han sintetizado inhibidores de las enzimas responsables de la hidrólisis de los eCBs, en particular de la enzima FAAH y de las MAGLs (Pertwee, 2013). En relación a la enzima FAAH, el inhibidor más utilizado es el URB597 (Piomelli y cols., 2006) y, en el caso de MAGL, los más empleados serían JZL184 (Long y cols., 2009) y URB602 (Hohmann y cols., 2005). No obstante, ya que el desarrollo y evaluación de estos “agonistas indirectos” no ha sido objetivo de esta Tesis Doctoral, nos limitamos a una descripción resumida de este tipo de moléculas.

2.9 Ligandos de los nuevos receptores cannabinoides.

Aunque tampoco ha sido el objetivo de esta Tesis Doctoral, haremos una mención muy breve al hecho de que el descubrimiento de nuevos receptores, relacionados directa o indirectamente con el SCE, como los casos de los receptores huérfanos GPR55 y GPR18, los receptores ionotrópicos TRP y los receptores nucleares PPARs, ha animado a investigar la actividad de los ligandos clásicos CB₁/CB₂ sobre estos receptores, así como a desarrollar y sintetizar nuevos ligandos con actividad por alguno de ellos, pero sin actividad CB₁/CB₂. En la Tabla 2 se recogen algunos de los datos más representativos en esta línea.

Tabla 2. Principales nuevas dianas de cannabinoides y sus ligandos más representativos.

Ligando	Actividad sobre nuevas dianas cannabinoides	Actividad sobre CB ₁ /CB ₂	Referencias
Receptor GPR55			
LPI	Agonista GPR55	NO	Oka y cols., 2007; Kapur y cols., 2009; Whyte y cols., 2009; Hestridge y cols., 2009
AEA	Agonista GPR55	Agonista CB ₁ /CB ₂	Ryberg y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008; Waldeck-Weiermair y cols., 2008; Henstridge y cols., 2009
2-AG	Agonista GPR55	Agonista CB ₁ /CB ₂	Ryberg y cols., 2007; Henstridge y cols., 2009
Δ ⁹ -THC	Agonista GPR55	Agonista CB ₁ /CB ₂	Ryberg y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008; Yin y cols., 2009
CBD	Antagonista GPR55	NO	Ryberg y cols., 2007; Whyte y cols., 2009
O-1602	Agonista GPR55	NO	Ryberg y cols., 2007; Johns y cols., 2007; Whyte y cols., 2009; Waldeck-Weiermair y cols., 2008
CP55,940	Agonista GPR55	Agonista CB ₁ /CB ₂	Ryberg y cols., 2007
SR141716	Agonista/Antagonista GPR55	Agonista inverso CB ₁	Lauckner y cols., 2008; Waldeck-Weiermair y cols., 2008; Hestridge y cols., 2010; Kapur y cols., 2009; Yin y cols., 2009
AM251	Agonista GPR55	Agonista inverso CB ₁	Ryberg y cols., 2007; Hestridge y cols., 2009, 2010; Kapur y cols., 2009; Yin y cols., 2009
noladin éter	Agonista GPR55	Agonista CB ₁	Ryberg y cols., 2007
virodamina	Agonista GPR55	Agonista parcial/antagonista CB ₁ y Agonista CB ₂	Ryberg y cols., 2007
OEA	Agonista GPR55	<i>Entourage</i> CB ₁	Ryberg y cols., 2007
PEA	Agonista GPR55	<i>Entourage</i> CB ₁	Ryberg y cols., 2007
Receptor GPR18			
NaGly	Agonista GPR18	NO	Kohno y cols., 2006; Bradshaw y cols., 2009; McHugh y cols., 2010, 2012a, 2012b; Console-Bram y cols., 2014
Δ ⁹ -THC	Agonista GPR18	Agonista CB ₁ /CB ₂	McHugh y cols., 2012a; Rempel y cols., 2013; Console-Bram y cols., 2014
Abn-CBD	Agonista GPR18	NO	McHugh y cols., 2010; Cadwell y cols., 2013; Console-Bram y cols., 2014
O-1602	Agonista GPR18	NO	McHugh y cols., 2010; Console-Bram y cols., 2014
O-1918	Antagonista/Agonista GPR18	NO	McHugh y cols., 2010; Cadwell y cols., 2013; Console-Bram y cols., 2014

Ligando	Actividad sobre nuevas dianas cannabinoides	Actividad sobre CB ₁ /CB ₂	Referencias
Receptor TRPV1			
Capsaicina	Activador de TRPV-1	NO	Caterina y cols., 1997; Szallasi y cols., 1993; Hui y cols., 2003
pH ácido	Activador de TRPV-1	NO	Caterina y cols., 1997; Tominaga y cols., 1998
T ^a > 43 ^o C	Activador de TRPV-1	NO	Caterina y cols., 1997; Tominaga y cols., 1998
Voltaje	Activador de TRPV-1	NO	Gunthorpe y cols., 2000; Piper y cols., 1999
12- y 15-HPETEs	Activador de TRPV-1	NO	Hwang y cols., 2000
5- y 15-HETEs	Activador de TRPV-1	NO	Hwang y cols., 2000
PIP ₂	Inhibidor de TRPV-1	NO	Chuang y cols., 2001
AEA	Activador de TRPV-1	Agonista CB ₁ /CB ₂	Zygmunt y cols., 1999; Van der Stelt y Di Marzo, 2004; Bradshaw y Walker, 2005; Movahed y cols., 2005
NADA	Activador de TRPV-1	Agonista CB ₁	Huang y cols., 2002; Van der Stelt y Di Marzo, 2004; Bradshaw y Walker, 2005
CBD	Activador de TRPV-1	NO	Bisogno y cols., 2001; Ligresti y cols., 2006
OEA	Activador de TRPV-1	<i>Entourage</i> CB ₁	Ahern., 2003; Movahed y cols., 2005
LEA	Activador de TRPV-1	<i>Entourage</i> CB ₁	Movahed y cols., 2005
N-oleoildopamina	Activador de TRPV-1	NO	Movahed y cols., 2005
Receptores PPAR			
Fibratos como: fenofibrato y bezafibrato	Agonistas PPAR α	NO	Koufany y cols., 2014; Terasawa y cols., 2015
WY-14643	Agonista PPAR α	NO	Collino y cols., 2006; Karimian Azari y cols., 2013
GW7647	Agonista PPAR α	NO	Brown y cols., 2001
CP 775146	Agonista PPAR α	NO	Kane y cols., 2009
GW 6471	Antagonista PPAR α	NO	Xu y cols., 2002; Abu Aboud y cols., 2013, 2015
GW0742	Agonista PPAR β	NO	Graham y cols., 2005; Toral y cols., 2015, Niu y cols., 2015
GW501516	Agonista PPAR β	NO	Chen y cols., 2015; Serrano-Marco y cols., 2012; Wang y cols., 2015
L-165,041	Agonista PPAR β	NO	Lim y cols., 2009
GSK 0660	Antagonista PPAR β	NO	Hack y cols., 2012; Quintela y cols., 2012
GSK 3787	Antagonista PPAR β	NO	Palkar y cols., 2010; Hack y cols., 2012
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J ₂	Agonista PPAR γ	NO	Soares y cols., 2005; Collin y Thiemermann, 2003; Rohn y cols., 2001

Ligando	Actividad sobre nuevas dianas cannabinoides	Actividad sobre CB ₁ /CB ₂	Referencias
Receptores PPAR			
tiazolidinedionas como: pioglitazona, rosiglitazona, y troglitazona	Agonistas PPAR γ	NO	Koufany y cols., 2014; Lamounier y cols., 2013; Celinski y cols., 2013; Bolden y cols., 2012; Hasegawa-Moriyama y cols., 2013
S26948	Agonista PPAR γ	NO	Carmona y cols., 2007; Sohn y cols., 2009
GW9662	Antagonista PPAR γ	NO	Seargent y cols., 2004; Collin y cols., 2006
T0070907	Antagonista PPAR γ	NO	Zaytseva y cols., 2011; Collin y cols., 2006
azPC	Agonista PPAR γ	NO	Davies y cols, 2001
AEA	Agonista PPAR α y Agonista PPAR γ	Agonista CB ₁ /CB ₂	Bouaboula y cols., 2005; Sun y cols., 2006, Gasperi y cols., 2007, Rockwell y Kamisnki, 2004
2-AG	Agonista PPAR γ	Agonista CB ₁ /CB ₂	Rockwell y cols., 2006; Bouaboula y cols., 2005
noladín éter	Agonista PPAR γ	Agonista CB ₁	Rockwell y cols., 2006
WIN55,212-2	Agonista PPAR α y Agonista PPAR γ	Agonista CB ₁ /CB ₂	Downer y cols, 2012; Hong y cols., 2013; Giuliano y cols., 2009
Δ^9 -THC	Agonista PPAR γ	Agonista CB ₁ /CB ₂	O'Sullivan y cols., 2005, 2006
CBD	Agonista PPAR γ	NO	O'Sullivan y cols., 2009
Ácido ajulémico	Agonista PPAR γ	Agonista CB ₁ /CB ₂	Liu y cols., 2003
PEA	Agonista PPAR α	<i>Entourage</i> CB ₁	Lo Verme y cols., 2005; D'Agostino y cols., 2007, 2009
OEA	Agonista PPAR α	<i>Entourage</i> CB ₁	Fu y cols., 2003, 2005; Sun y cols., 2006; Guzmán y cols., 2004

3 Papel fisiológico del Sistema Cannabinoide Endógeno

La amplia distribución del SCE en numerosos tejidos, órganos y sistemas del organismo, explica el ubicuo papel modulador que tiene este sistema en numerosos procesos fisiológicos, principalmente en el sistema nervioso, aunque también tiene efecto regulador a nivel de: (i) sistema inmune (Cabral, 2001; Klein y Cabral, 2006); (ii) sistema cardiovascular, cuya activación produce vasorelajación y bradicardia (Kozłowska y cols., 2007; 2008); (iii) sistema endocrino, sobre el que ejerce una modulación de las respuestas neuroendocrinas (Brown y Dobbs, 2002); (iv) en órganos periféricos como el hígado, páncreas, tejido adiposo y músculo esquelético, que controlan el metabolismo energético, en los que el papel de los endocannabinoides consiste en promover la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos (Cota y cols., 2003; Osei-Hyiaman y cols., 2005; Nogueiras y cols., 2008; Pazos y cols., 2008); y (v) los huesos en los que participan en procesos de remodelado óseo (Bab y cols., 2008b, Whyte y cols., 2012). Además, el SCE tiene efectos reguladores de la supervivencia celular a nivel periférico y central a través de distintas vías (Caffarel y cols., 2006; Blázquez y cols., 2003; 2008; Ramer y cols., 2010a; Velasco y cols., 2012).

En cualquier caso, la función que primero se descubrió para este sistema, y la que parece más relevante, es la que tiene que ver con la modulación de procesos neurales y, en particular, una de las funciones mejor establecidas es la regulación de la función sináptica, a través de la activación de receptores CB₁, y es posible que en algunos casos, también CB₂.

Mediante la señalización retrógrada, los eCBs son capaces de participar en la regulación a corto plazo de la sinapsis. Si la sinapsis es de tipo excitatorio y el neurotransmisor implicado es glutamato, la acción del endocannabinoide será la de suprimir el exceso de excitación y en ese caso se habla de DSE (supresión de excitación inducida por despolarización), mientras que si la sinapsis es de tipo inhibitorio y el neurotransmisor implicado es GABA, el endocannabinoide lo que controla es el exceso de inhibición, produciendo una DSI (supresión de inhibición inducida por despolarización) (Wilson y Nicoll, 2002; Diana y Marty, 2004; Mackie, 2008a). Los endocannabinoides también pueden modular la plasticidad sináptica a largo plazo, mediante los fenómenos LTP (potenciación a largo plazo) y LTD (depresión a largo plazo) actuando sobre neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en distintas regiones encefálicas (Stella y cols., 1997; Gerdeman y cols., 2002; Robbe y cols., 2002; Chevaleyre y Castillo, 2003). Al tratarse de una función muy básica de la actividad neuronal, el SCE tiende a estar presente en numerosas estructuras del SNC donde conviven transmisión excitatoria e inhibitoria, abarcando por tanto, numerosos procesos neurobiológicos entre los que se incluyen: control de la actividad motora, nocicepción, memoria y aprendizaje, procesos cognitivos, regulación neuroendocrina, emesis, termorregulación, control de la ingesta y el apetito y control del sueño. En la Tabla 3 se muestran de forma resumida estos procesos fisiológicos, junto con las funciones asignadas al SCE, así como la localización de los componentes del SCE involucrados y las patologías que podrían beneficiarse de la acción terapéutica que podría tener la modulación del SCE. Además de estas funciones, el SCE está también involucrado en otros procesos como el desarrollo cerebral y la regulación de la supervivencia e integridad neuronal.

Tabla 3. Principales procesos fisiológicos en los que participa el SCE en el SNC.

Proceso	Funciones asignadas al SCE	Localización de elementos del SCE	Patologías para aplicación de CBs	Referencia
Actividad motora	Estimulación del movimiento a dosis bajas; inhibición a dosis altas	Ganglios basales y cerebelo	EH, Síndrome de Tourette, EM, EP y Disquinesias	Fernández-Ruiz, 2009; Fernández-Ruiz y cols., 2011; El Manira y Kyriakatos, 2010
Nocicepción	Analgesia espinal y supraespinal	Áreas cerebrales, supraespinales (PAG, núcleo talámico) y espinales implicadas en antinocicepción y terminales nerviosas sensoriales periféricas	Dolor neuropático e inflamatorio	Rahn y Hohmann, 2009; Guindon y Hohmann 2009; Hu y cols., 2014
Memoria y aprendizaje	Extinción de la memoria. Efectos sobre LTP y LTD	Hipocampo	Tratamiento de algunos trastornos de la memoria en diferentes patologías (síndrome de estrés postraumático y AD)	Marsicano y Lutz., 2006; Marsicano y Lafenêtre, 2009; Akirav, 2011; Puighermanal y cols., 2012
Procesos cognitivos	Motivación, emotividad, ansiedad y sistema de recompensa	Corteza cerebral y sistema límbico	Tratamiento estados adictivos y desórdenes psiquiátricos	Fernández-Ruiz y cols., 2004a; Laviolette y Grace, 2006a, 2006b
Regulación neuroendocrina	Liberación de hormonas adenohipofisarias	Hipotálamo mediobasal	Desconocida	Pagotto y cols., 2006a; Hilard, 2015a
Regulación de la émesis	Control de la náusea y el vómito	Área postrema	Reducción de las náuseas y vómitos en pacientes con cáncer	Smith y cols., 2015; Sharkey y cols., 2014; Van Sickle y cols., 2001
Temperatura corporal	Regulación de la temperatura corporal	Núcleos hipotalámicos	Desconocida	Rawls y Benamar., 2011, Álvarez y cols., 2008; Fernández-López y cols., 2007, 2013
Control de la ingesta y apetito	Regulación del apetito y el balance energético	Núcleos hipotalámicos, estructuras límbicas	Aumento del apetito en pacientes con SIDA, cáncer y anorexia. Reducción en pacientes con obesidad	Marsicano y Lutz., 2006; Verty y cols., 2011; Reuter y Martin., 2016
Desórdenes del sueño	Regulación del sueño y del ciclo sueño/vigilia	Hipotálamo anterior y lateral	Trastornos del sueño: insomnio y excesiva somnolencia	Murillo-Rodríguez, 2008a

4 Cannabinoides y neuroprotección

Además de los procesos descritos en el apartado anterior, una de las principales funciones del SCE a nivel del SNC, es regular la homeostasis, la integridad y la supervivencia de las neuronas, así como de otras células neurales, principalmente células de glía. No es un fenómeno exclusivo del SNC, ya que también ocurre en tejidos no neurales, pero en el SNC este hecho es, si cabe, aún más relevante, ya que las neuronas son células post-mitóticas y, a pesar de que se conoce desde hace tiempo la existencia de procesos de generación de nuevas neuronas a partir de los nichos neurogénicos localizados en áreas concretas del SNC (Gage, 1998), la reposición por la pérdida de neuronas en enfermedades neurodegenerativas es limitada e insuficiente, al menos en las actuales condiciones (Ziemka-Nałęcz y Zalewska, 2012).

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de patologías complejas, que tienen como características comunes el carácter progresivo de los procesos degenerativos y la muerte de poblaciones neuronales específicas en el SNC, lo que lleva a la aparición y deterioro progresivo de los síntomas clínicos de estas enfermedades. Dentro de este grupo de patologías, las enfermedades de Parkinson (EP), Alzheimer (EA) Huntington (EH), esclerosis múltiple (EM) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), son consideradas como las de mayor incidencia en la población. A pesar de que las causas de estas enfermedades son diferentes, tienen en común distintos mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad como la aparición de neuroinflamación, estrés oxidativo, excitotoxicidad, alteraciones de la proteostasis y disfunción mitocondrial (Giacoppo y cols., 2014).

Numerosas evidencias indican que los cannabinoides tienen propiedades neuroprotectoras en estas patologías neurodegenerativas (Fernández-Ruiz y cols., 2015); además, también se ha observado que en estas patologías los elementos que forman el SCE se ven alterados y podrían contribuir tanto en la patogénesis, como en la progresión de estas enfermedades, o tratarse de respuestas protectoras endógenas. En este sentido, de forma general, la expresión del receptor CB₂ se ve aumentada en los procesos neurodegenerativos, mientras que la expresión del receptor CB₁, los niveles de endocannabinoides así como las enzimas de síntesis y degradación de éstos, pueden verse incrementados o disminuidos en función de la enfermedad y de la fase en la que ésta se encuentre (Revisado por Bisogno y di Marzo, 2010; Fagan y Campbell, 2014; Benito y cols., 2008). Por este motivo, el tratamiento orientado a la modulación del SCE, bien para potenciar respuestas endógenas protectoras o bien para corregir disfunciones, puede resultar una alternativa útil en el tratamiento de estas patologías (Tabla 3).

Desde hace aproximadamente quince años, se han llevado a cabo estudios en condiciones de neurodegeneración, que confirman que tratamientos basados en la estimulación de la señalización endocannabinoide, evitan la muerte celular, e incluso pueden reparar el daño ya producido (Van der Stelt y Di Marzo, 2005a; Fernández-Ruiz y cols., 2015). Los mecanismos moleculares que subyacen a estos efectos neuroprotectores son diversos (Figura 14) y suelen interactuar entre

ellos, lo que representa el principal valor añadido de este tipo de moléculas frente a otros tipos de agentes neuroprotectores.

En relación al receptor CB₂, se ha observado que el tratamiento con agonistas aumenta la supervivencia neuronal, ya que tras la activación de estos receptores, tiene lugar una reducción de los estímulos citotóxicos que las células de microglía activada ejercen sobre las neuronas (Bisogno y Di Marzo, 2010, Fernández-Ruiz y cols., 2007, 2008), un aumento del soporte trófico que ejercen los astrocitos (Fernández-Ruiz y cols., 2007, 2008), así como un aumento de los procesos neurogénicos (Fernández-Ruiz y cols., 2007; Palazuelos y cols., 2006).

Los astrocitos son el tipo celular más abundante en el cerebro, que además de tener un papel relevante en el soporte trófico neuronal, son clave en cuanto al mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica, modulando la actividad sináptica, así como en su papel regulador en procesos inflamatorios, estando involucrados en la liberación de ciertas citoquinas (Feuerstein y cols., 1998; Dong y Beneviste, 2001). La microglía está compuesta por las células del sistema inmune residentes en el SNC, siendo esenciales en la modulación de liberación de citoquinas como IL-1 e IL-12, así como de TNF α (Cabral y cols., 2008a; Aloisi y cols., 2000b). Cuando tiene lugar un proceso de daño cerebral, ambos tipos celulares responden frente a estas condiciones patológicas, aumentando la liberación de citoquinas proinflamatorias, contribuyendo a aumentar el daño.

Los cannabinoides pueden modular la liberación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, actuando sobre receptores localizados en células gliales, especialmente sobre CB₂, comportándose como moléculas antiinflamatorias inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y aumentando la producción de citoquinas antiinflamatorias (Ortega-Gutiérrez y cols, 2005b; Croxford y Miller, 2003; Fernández-Ruiz y cols, 2010).

Estos beneficios de la activación del receptor CB₂ se han podido confirmar en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, llevados a cabo en modelos experimentales de distintas enfermedades neurodegenerativas crónicas como la EH (Sagredo y cols., 2009, Palazuelos y cols., 2009), la EA (Ramírez y cols., 2005, Aso y cols., 2013), la ELA (Kim y col., 2006), la EP (García y cols., 2011; Gómez-Gálvez y cols., 2016), la EM (Arévalo-Martín y cols., 2003) o en procesos de neurodegeneración aguda como la isquemia (Fernández-López y cols., 2006; Zhang y cols., 2007).

La activación del receptor CB₁ está relacionada con la protección neuronal frente a distintos efectos citotóxicos, como la excitotoxicidad (Fernández Ruiz y cols., 2015), uno de los principales eventos que tienen lugar en patologías neurodegenerativas. El aumento de los niveles de glutamato en el espacio sináptico y la consecuente hiperactivación de los receptores ionotrópicos para este aminoácido, como los receptores NMDA (N-metil D-aspartato), desencadena una entrada desproporcionada de calcio en el interior de la célula, ocasionando una sobreactivación de mecanismos celulares dependientes de calcio que resultan ser neurotóxicos (Dong y cols., 2009). El aumento de la concentración de calcio intracelular activa diversas enzimas que comprometen la supervivencia celular como calpainas, caspasas, quinasas, lipasas, endonucleasas; enzimas que

generan factores neurotóxicos, como la NOS; así como especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenando la muerte neuronal por apoptosis (Doble, 1999). Los cannabinoides tienen la capacidad de activar los receptores CB₁ presinápticos produciendo una disminución de la liberación de glutamato y por lo tanto disminuyendo la muerte celular (Hampson y Grimaldi, 2001; Skaper y cols., 1996). También se ha observado la capacidad de disminuir la excitotoxicidad por HU-211, un enantiómero del potente agonista HU-210, que no presenta afinidad por los receptores cannabinoides; y por AEA, mediante el bloqueo directo de los receptores NMDA (Bar-Joseph y cols., 1994; Zeltser y cols., 1991; Hampson y cols., 1998). Además se ha observado que los agonistas cannabinoides, a través de la activación de receptores CB₁ postsinápticos, tienen la capacidad de cerrar los canales de calcio dependientes de voltaje, evitando estas cascadas de señalización (Shen y Thayer, 1998; De Petrocellis y Di Marzo, 2009b).

En lo que al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se refiere, los beneficios obtenidos por la activación de este receptor no son tan unánimes como los obtenidos tras la activación del receptor CB₂ (Fowler y cols., 2010), ya que los efectos favorables dependen de la enfermedad y de la fase en la que se encuentre (Bisogno y Di Marzo, 2010). Es posible que esto tenga que ver con el hecho de que el receptor CB₁ es preferentemente neuronal y puede perderse de forma progresiva por la pérdida de neuronas en cada una de estas enfermedades. Por otro lado, también se ha observado, que la inhibición de la degradación de endocannabinoides, que aumenta el tono cannabinoide endógeno, es también beneficiosa en el tratamiento de distintas enfermedades neurodegenerativas (Nomura y cols., 2011; Chen y cols., 2012; Van der Stelt y cols., 2006), aunque en ocasiones, el aumento de los niveles de eCBs genera, a través del metabolismo por la COX-2, descrito en la sección 1.5 (ver antes), prostamidas y prostaglandinas-gliceril ésteres, que pueden agravar la excitotoxicidad (Valdeolivas y cols., 2013).

Al margen de la acción neuroprotectora mediada por los receptores CB₁ y CB₂, se ha observado que los cannabinoides presentan propiedades antioxidantes que serían independientes de la unión a estos receptores. En primer lugar, algunos ligandos cannabinoides podrían actuar como lavadores de radicales libres debido al anillo fenólico presente en su estructura química (Marsicano y cols., 2002). En segundo lugar, algunos cannabinoides podrían reducir el estrés oxidativo a través de la activación de la señalización por el factor de transcripción Nrf-2, efecto en el que podrían estar implicados los PPARs (Pazos y cols., 2008; Fernández-Ruiz y cols., 2010; Fernández-Ruiz y cols., 2013).

Finalmente, frente a la pérdida neuronal que tiene lugar en enfermedades neurodegenerativas, la generación de nuevas neuronas que reemplacen a las que se pierden podría resultar beneficiosa. La neurogénesis es un proceso que tiene lugar desde la división de las células precursoras, hasta la generación de una nueva neurona funcional, lo que implica procesos de proliferación, supervivencia, migración y diferenciación (Fogaça y cols., 2013), en los cuales están relacionados mecanismos de señalización cannabinoide (Harkany y cols., 2007). Se ha observado expresión de los receptores CB₁ y CB₂ y de FAHH en progenitores celulares neurales de cerebros en desarrollo, así como la producción de 2-AG y AEA (Aguado y cols., 2005; Palazuelos y cols., 2006). También

se ha observado que elementos del SCE permanecen expresados en progenitores celulares en estructuras específicas del cerebro adulto, induciendo proliferación celular tras la activación de los receptores cannabinoides, demostrando su implicación en la regulación de la neurogénesis en individuos adultos (Galve-Roperh y cols., 2007). Existen evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* que corroboran el papel modulador del SCE en la neurogénesis (Fogaça y cols, 2013).

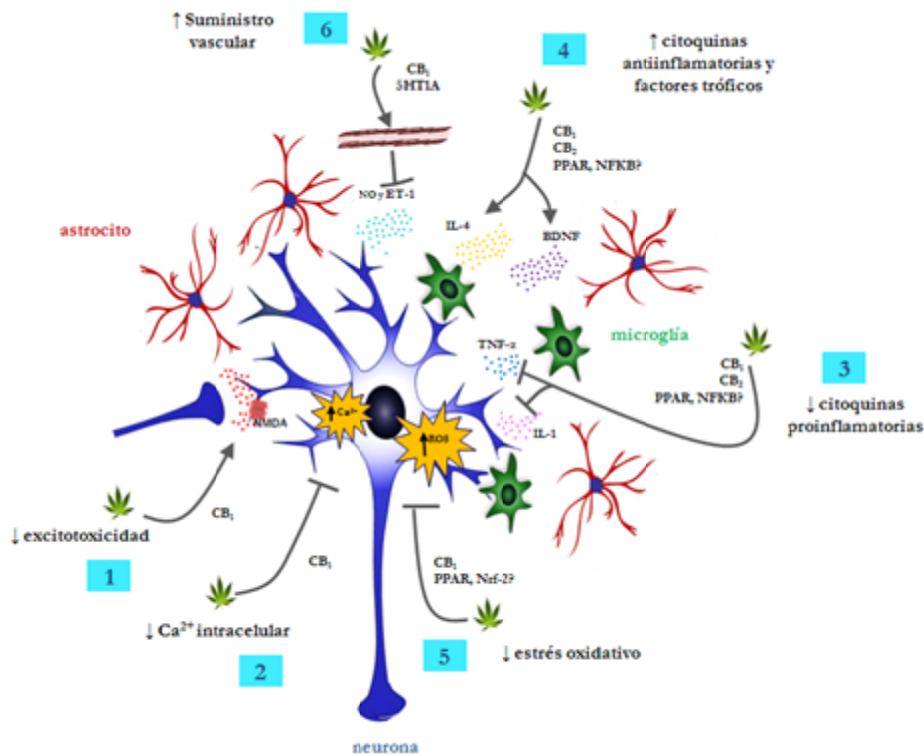


Figura 14. Principales mecanismos de neuroprotección de los cannabinoides ante una situación neurodegenerativa.

Basándose en los mecanismos neuroprotectores en los que están involucrados los cannabinoides, se han llevado a cabo estudios de neuroprotección en las principales enfermedades neurodegenerativas observándose que tras el tratamiento con estas moléculas, se activan vías que tienen como consecuencia efectos neuroprotectores. En la Tabla 4 se muestran de manera resumida dichos efectos.

Tabla 4. Efectos neuroprotectores mediados por agonistas cannabinoides en procesos de neurodegeneración crónica y aguda. Tabla adaptada de Giacoppo y cols., 2014.

Enfermedad	Efectos neuroprotectores de los cannabinoides
Parkinson	Actividad antioxidante por modulación de Nrf-2 Disminución de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-1 β) Disminución de ROS Disminución de actividad de NFkB Aumento de factores tróficos y la citoquina antiinflamatoria IL-10
Huntington	Reducción de la microglía reactiva y los procesos de astrogliosis Disminución del estrés oxidativo y el volumen de edema Control de la sobreexpresión de marcadores proinflamatorios Reducción de la agregación de Htt mutada Atenuación de la toxicidad asociada a agregados de Htt
Alzheimer	Inhibición de AchE previniendo la formación de agregados de A β Reducción de ROS y peroxidación lipídica Modulación de expresión de NOSi Disminución de la activación de p38 Disminución de actividad de NFkB Disminución de actividad de caspasa-3 Modulación de las células de microglía y la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-1 β) Reducción de la apoptosis
Esclerosis múltiple	Prevención de excitotoxicidad por liberación de glutamato Promoción de la supervivencia de oligodendrocitos, por disminución de desmielinización y apoptosis Reducción de inflamación, probablemente por disminución de liberación de TNF α e IL-1 β Reducción de la activación de la microglía y la activación de células T
Esclerosis lateral amiotrófica	Reducción de excitotoxicidad por liberación de glutamato Reducción de daño oxidativo (citoquinas, NO y ROS)
Hipoxia-Isquemia	Modulación de excitotoxicidad Modulación de liberación de citoquinas Modulación de liberación de NOSi Modulación de COX-2

5 Desarrollo de fármacos cannabinoides

Dado el potencial terapéutico que presenta el SCE en estudios preclínicos, resulta prometedor el desarrollo de nuevos fármacos basados en la modulación de este sistema de aplicabilidad en clínica. Ya se han desarrollado varios fármacos, disponibles para el tratamiento de distintos síntomas derivados de varias patologías. Algunos de ellos están basados en fitocannabinoides, mientras que el principio activo de otros consiste en un cannabinoide sintético. Los principales fármacos derivados de cannabinoides hasta la fecha son:

- Marinol[®]: Está compuesto por Δ^9 -THC, también llamado dronabinol. Se trata de un antiemético (May y Glode, 2016), el cual también resulta útil para paliar síntomas del síndrome de anorexia/caquexia en pacientes con VIH tratados con antirretrovirales o con cáncer terminal (Badowski y Perez, 2016). Fue aprobado definitivamente por la FDA (del inglés: *Food and Drug Administration*) en 1985 para tratar las náuseas y los vómitos en pacientes con cáncer. Su uso en el tratamiento de la pérdida de peso y pérdida de apetito en pacientes con VIH/SIDA fue aprobado para en enero de 1991.
- Cesamet[®]: Está compuesto por nabilona, un derivado del Δ^9 -THC. Al igual que Marinol, también está prescrito como antiemético (Ware y cols., 2008). La FDA aprobó este cannabinoide sintético para el tratamiento de las náuseas y los vómitos causados por la quimioterapia en 1985.
- Acomplia[®]: Está compuesto por rimonabant o SR141716A, un agonista inverso del receptor CB₁, y fue utilizado para reducir el apetito y el perímetro abdominal (Topol y cols., 2010). Nunca consiguió la aprobación de la FDA, pero sí de la EMA (del inglés: *European Medical Agency*) y fue comercializado en varios países, principalmente europeos, para tratar la obesidad y el síndrome metabólico, siendo aprobado por primera vez en Reino Unido en el año 2006. Como se mencionó en la sección 2.4, este fármaco fue retirado en el año 2008, al presentar algunos pacientes problemas de depresión, dándose incluso casos de suicidios.
- Sativex[®]: Se trata de un fármaco compuesto por extractos botánicos de Δ^9 -THC y CBD que se encuentran en una concentración equimolar, aunque también puede contener trazas de otros fitocannabinoides. Aunque aún no ha sido aprobado por la FDA, sí se ha logrado la comercialización de este medicamento en diversos países, ocurriendo por primera vez en Canadá en el año 2005. En la actualidad está aprobado para el tratamiento de la espasticidad en pacientes de esclerosis múltiple (Patti y cols., 2016), pero también se investiga a nivel clínico su potencial farmacológico para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer (Johnson y cols., 2013) y para el dolor neuropático (Russo y cols., 2016).

- Epidiolex[®]: Se trata de una formulación como jarabe del fitocannabinoide CBD, que ha recibido la designación de medicamento huérfano por la FDA en 2013 y por la EMA en 2014, para el tratamiento de pacientes con epilepsia infantil (Leo y cols., 2016), como el Síndrome de Dravet (Porter y Jacobson, 2013) y el Síndrome de Lennox-Gastaut (Hussain y cols., 2015). La designación como medicamento huérfano permite el desarrollo de estudios clínicos y en paralelo su prescripción a los pacientes afectados por esas enfermedades.

Actualmente se sigue trabajando en el desarrollo de nuevos fármacos cannabinoides, por el potencial terapéutico que se ha demostrado para este tipo de moléculas en estudios preclínicos. Los principales retos que se tratan de abordar en cuanto al desarrollo de estos nuevos fármacos son:

- Mejorar la selectividad por uno de los dos receptores cannabinoides (CB₁/CB₂).
- Mejorar la solubilidad acuosa para facilitar el desarrollo de medicamentos de administración por vía oral.
- Desarrollar reguladores alostéricos que modulen la interacción de los ligandos endocannabinoides con los receptores cannabinoides.
- Desarrollar inhibidores de las enzimas responsables de la finalización de la señalización endocannabinoide (FAAH y MAGL), para potenciar esta señalización.
- Desarrollar antagonistas neutros para eliminar los efectos secundarios que pueden provocar los agonistas inversos.
- Desarrollar antagonistas que actúen sólo a nivel periférico, impidiendo que tengan lugar efectos secundarios producidos por la activación de receptores a nivel de SNC, en patologías en las que sólo sea necesaria la modulación en receptores cannabinoides periféricos.
- Desarrollar ligandos de nuevas dianas cannabinoides como GPR55 y PPARs, así como moléculas multidiana con capacidad de activar varias dianas involucradas en efectos beneficiosos para una determinada patología.

Objetivos

Como se ha descrito en la Introducción, los cannabinoides son sustancias con una notable actividad pleiotrópica, activos sobre numerosos procesos fisiológicos, tanto en el SNC como en tejidos, órganos y sistemas periféricos, lo que parece que les confiere un interesante potencial terapéutico en el tratamiento de diversas patologías, en la mayoría de los casos, todavía pendiente de investigar y establecer. En los últimos 10 – 15 años, una de estas capacidades terapéuticas que ha despertado mayor interés, han sido sus propiedades neuroprotectoras que se ejercen a través los receptores cannabinoides clásicos, pero también a través de otra serie de mecanismos independientes de estos receptores. Estas propiedades neuroprotectoras los convierten en fármacos prometedores para el tratamiento de patologías neurodegenerativas.

Dentro de los mecanismos implicados en los efectos neuroprotectores de los cannabinoides, la activación del receptor CB₂, de forma selectiva o combinada con la activación de otras dianas como los receptores PPAR γ , ha suscitado interés en los últimos años y, en particular, en nuestro grupo de investigación. Las razones para ello serían las siguientes:

- (i) La activación del receptor CB₂, a diferencia del receptor CB₁, no produce efectos psicoactivos.
- (ii) La función de receptor CB₂ en el SNC es mucho más restringida que la del receptor CB₁, y está especialmente asociada con el proceso de daño neuronal, principalmente de origen inflamatorio y asociado con reactividad glial.
- (iii) Se ha podido asociar con otras dianas antiinflamatorias como los receptores PPAR γ , produciendo efectos sinérgicos que tiene interés investigar con más detalle.

Es en este contexto en el que se ha enmarcado el objetivo general de esta Tesis Doctoral que ha sido la búsqueda de posibles ligandos agonistas específicos del receptor CB₂ con potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas. Gracias a una colaboración de nuestro grupo con los grupos de Instituto de Química Médica (IQM) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Pilar Goya y Nadine Jagerovic; de Gabriele Murineddu en el Departamento de Química y Farmacia de la Universidad de Sassari en Italia; y también a nuestra relación con la empresa Vivacell Biotechnology Spain así como con su grupo fundador liderado por Eduardo Muñoz, se ha podido disponer de nuevos cannabinoides derivados de diferentes tipos de estructuras químicas de partida, sobre los que se ha buscado una optimización de su perfil farmacológico, orientado al desarrollo de sus propiedades neuroprotectoras. Usando los compuestos diseñados y generados por nuestros colaboradores, hemos desglosado el objetivo general de esta Tesis Doctoral en los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación farmacológica de los diferentes compuestos, llevada a cabo mediante la determinación de la afinidad y la actividad sobre los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, así como mediante el estudio *in silico* de ciertas propiedades farmacocinéticas de los compuestos selectivos para el receptor CB₂. También ha sido objetivo de este trabajo, la

- determinación de su actividad sobre otros receptores (por ejemplo PPAR γ y GPR55), de aquellos compuestos con mejor perfil farmacológico.
2. Análisis *in vitro* de las propiedades antiinflamatorias en un bioensayo con células de microglía de algunos de los compuestos con actividad sobre el receptor CB₂.
 3. Evaluación *in vitro* en un bioensayo con células de microglía, de las propiedades neuroprotectoras del compuesto agonista CB₂ con el perfil más prometedor en cuanto a selectividad, potencia y farmacocinética.
 4. Valoración de las propiedades neuroprotectoras del compuesto del objetivo anterior en un modelo *in vivo* de daño mitocondrial y reactividad glial.

Materiales y métodos

1 Estructura química y descripción de los compuestos

Se utilizaron diferentes familias de compuestos para la búsqueda y cribado de posibles ligandos para el receptor CB₂. Como se ha indicado anteriormente, dichos compuestos fueron sintetizados por diferentes grupos con los que nuestro grupo colabora y cuya actividad investigadora se basa en el diseño, síntesis y caracterización de nuevos ligandos cannabinoides. Concretamente, las moléculas investigadas en este trabajo pertenecen a tres grandes series de compuestos:

- Cromenopirazoles (Pilar Goya y Nadine Jagerovic, del Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC))
- Pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos (Gabriele Murineddu, del Departamento de Química y Farmacia de la Universidad de Sassari)
- Quinonas de los fitocannabinoides cannabigerol (CBG) y CBD (Eduardo Muñoz, de la Universidad de Córdoba y de Vivacell Biotechnology España S.L.).

A continuación se detallan las principales características químicas y de estructura de los compuestos obtenidos de nuestros colaboradores, pero no se incluyen detalles del proceso de síntesis de estos compuestos, ya que no ha sido una actividad de esta Tesis Doctoral, desarrollándose bajo la responsabilidad de los investigadores de estos grupos colaboradores. Los detalles de estos procesos de síntesis se pueden encontrar en las publicaciones y/o patentes que se citan para cada grupo de compuestos.

1.1 Cromenopirazoles y derivados

Los cromenopirazoles constituyen un grupo de moléculas con estructura tricíclica, diseñada a partir de la estructura del cannabinoide clásico cannabinol (CBN). El esqueleto estructural de los cromenopirazoles (Figura 15) mantiene el núcleo benzopiránico de la estructura del CBN, pero se ha sustituido el grupo fenilo por un anillo de pirazol (Cumella y cols., 2012; Morales y cols., 2016).

Tras la modificación de las cadenas laterales hidrofóbicas en la posición R1, así como diversos sustituyentes en las posiciones R2 y R3, se obtuvieron 52 cromenopirazoles candidatos para los ensayos de unión al receptor CB₂ (1.1 - 1.52, en la Tabla 5). Además se obtuvieron 2 piranocromenopirazoles, tras la inserción de un anillo pirano (1.53 y 1.54, en la Tabla 5) y tres cromenoisoxazoles, al reemplazar el anillo pirazol por un isoxazol (1.55 – 1.57, en la Tabla 5).

Tabla 5. Sustituyentes en las posiciones R1, R2 y R3 de los cromenopirazoles (1.1 – 1.52) y sus derivados piranocromenopirazoles (1.53 y 1.54) y cromenoisoxazoles (1.55 – 1.57). Ver figura 15 para observar las posiciones de los sustituyentes R1, R2 y R3 en el esqueleto estructural de los cromenopirazoles y derivados.

Las moléculas 1.53 y 1.54 son piranocromenopirazoles, es decir, cromenopirazoles con núcleo tetracíclico por la introducción de un anillo de pirano en su estructura.* Las moléculas 1.55, 1.56 y 1.57, además de las modificaciones en los radicales (R1, R2 y R3), presentan una variación en el esqueleto de su molécula, en que el anillo de pirazol se encuentra reemplazado por un anillo isoxazol, tratándose de nuevas moléculas denominadas cromenoisoxazoles.

Compuesto	R1	R2	R3
1.1	OH	N2-Me	-
1.2	OH	N1-Me	-
1.3	OH	N2-Et	-
1.4	OH	N1-Et	-
1.5	OH	N1-3,4-diCIPh	-
1.6	OH	N1-H	-
1.7	pentilo	N2-Et	-
1.8	pentilo	N1-Et	-
1.9	pentilo	N1-3,4-diCIPh	-
1.10	pentilo	N1-Me	-
1.11	pentilo	N2-Me	-
1.12	1-ciclopentilo-1'-pentilo	N1-2,4-diCIPh	-
1.13	1-ciclopentilo-1'-pentilo	N2-Et	-
1.14	1-ciclopentilo-1'-pentilo	N1-Et	-
1.15	1-ciclopentilo-1'-pentilo	N1-3,4-diCIPh	-
1.16	1,1-dimetilheptilo	H	H
1.17	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	H
1.18	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	H
1.19	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	H
1.20	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	H
1.21	1,1-dimetilheptilo	N1-2,4-diCIPh	H
1.22	1,1-dimetilheptilo	N1-(CH ₂) ₂ OH	H
1.23	1,1-dimetilheptilo	N2-(CH ₂) ₂ OH	H
1.24	1,1-dimetilheptilo	N2-CH ₂ OH	H
1.25	1,1-dimetilheptilo	N1-3,5-diFPh	H
1.26	1,1-dimetilheptilo	N1-3-OMePh	H
1.27	1,1-dimetilheptilo	N1-Cy	H
1.28	1,1-dimetilheptilo	H	Me
1.29	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	Me
1.30	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	Me
1.31	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	Me
1.32	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	Me
1.33	1,1-dimetilheptilo	N1-2,4-diCIPh	Me
1.34	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	Et
1.35	1,1-dimetilheptilo	H	Bn
1.36	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	Bn
1.37	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	Bn
1.38	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	Bn

Compuesto	R1	R2	R3
1.39	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	Bn
1.40	1,1-dimetilheptilo	N1-2,4-diCIPh	Bn
1.41	1,1-dimetilheptilo	H	(CH ₂) ₃ OH
1.42	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	(CH ₂) ₃ OH
1.43	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	(CH ₂) ₃ OH
1.44	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	(CH ₂) ₃ OH
1.45	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	(CH ₂) ₃ OH
1.46	1,1-dimetilheptilo	N1-2,4-diCIPh	(CH ₂) ₃ OH
1.47	1,1-dimetilheptilo	H	(CH ₂) ₂ OH
1.48	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	(CH ₂) ₂ OH
1.49	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	(CH ₂) ₂ OH
1.50	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	(CH ₂) ₃ Br
1.51	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	(CH ₂) ₃ Br
1.52	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	(CH ₂) ₂ Br
1.53 [#]	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	-
1.54 [#]	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	-
1.55 [*]	1,1-dimetilheptilo	-	H
1.56 [*]	1,1-dimetilheptilo	-	Me
1.57 [*]	1,1-dimetilheptilo	-	(CH ₂) ₃ OH

1.2 Pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos

Esta serie de compuestos también presenta un esqueleto estructural tricíclico (Figura 15), diseñado a partir de moléculas análogas al agonista inverso selectivo del receptor CB₁, SR141716A, que se han descrito en estudios previos (Mussinu y cols., 2003; Murineddu y cols., 2005, 2006, 2012). El objetivo de nuestros colaboradores de la Universidad de Sassari fue investigar qué modificaciones eran relevantes para mejorar su interacción con el receptor CB₂, para el que el compuesto de partida no tiene afinidad. La modificación de la posición R con ciclos de distintos tamaños, la posición X con pequeñas cadenas alifáticas, así como la posición Q con distintas amidas del esqueleto estructural que se muestra en la Figura 15, permitieron la obtención de 17 nuevos compuestos (Deiana y cols., 2016), que se observan en la Tabla 6.

1.3 Quinonas de fitocannabinoides

La compañía Vivacell Biotechnology y nuestros colaboradores en la Universidad de Córdoba trabajan en el desarrollo de derivados de fitocannabinoides que puedan optimizar sus propiedades terapéuticas a través de mejorar su actividad por determinadas dianas farmacológicas. Su actividad se ha centrado principalmente en los dos principales fitocannabinoides no psicoactivos, es decir, el CBG y el CBD, para los que se obtuvieron sus correspondientes quinonas. Las quinonas formadas consisten en la oxigenación de los fitocannabinoides dando lugar a dicetonas cíclicas en el anillo fenol de dichos compuestos, obteniéndose *para*-quinonas (*p*-quinonas). Sobre estas quinonas se introdujeron una serie de modificaciones químicas dirigidas a atenuar la tradicional citotoxicidad de

de las quinonas de fitocannabinoides (Kogan y cols., 2004), y mejorar su perfil farmacológico, obteniéndose las dos series de compuestos que se describen a continuación (Appendino y cols., 2015a, 2015b).

1.3.1 Quinonas de CBG

Estos compuestos son derivados de la estructura quinona de CBG (CBG-Q) mostrada en la Figura 15, donde R representa a distintas aminas sustituyentes, excepto en el caso de la molécula 3.10, una molécula divalente de la CBG-Q en la cual, R es otra hidroxiquinona de CBG. Las diferencias en los compuestos que forman la serie se muestran en la Tabla 7.

1.3.2 Quinonas de CBD

Esta serie agrupa a moléculas derivadas de la estructura quinona de CBD (CBD-Q; Figura 15), donde R representa a distintas aminas sustituyentes que generan los diferentes compuestos de la Tabla 8.

Tabla 6. Sustituyentes en las posiciones R, X y Q de las moléculas de la serie de pirazoles-3-carboxamida tricíclicos (2.1 – 2.17). Ver figura 15 para observar las posiciones de los sustituyentes R, X y Q en el esqueleto estructural de los pirazoles-3-carboxamida tricíclicos.

Compuesto	R	X	Q
2.1	ciclopropilo	CH ₂	1-aminopiperidina
2.2	ciclopropilo	CH ₂ -CH ₂	1-aminopiperidina
2.3	ciclopropilo	CH=CH	1-aminopiperidina
2.4	ciclohexilo	CH ₂	1-aminopiperidina
2.5	ciclopropilo	CH ₂	fenilamina
2.6	ciclopropilo	CH ₂ -CH ₂	fenilamina
2.7	ciclopropilo	CH=CH	fenilamina
2.8	ciclohexilo	CH ₂	fenilamina
2.9	ciclopropilo	CH ₂	bornilamina
2.10	ciclopropilo	CH ₂	1-adamantilamina
2.11	ciclopropilo	CH ₂	1-aminopirrolidina
2.12	ciclopropilo	CH ₂	morfolin-4-amina
2.13	ciclopropilo	CH ₂	piperidina
2.14	ciclopropilo	CH ₂ -CH ₂	mirtanilamina
2.15	ciclopropilo	CH=CH	1-aminopirrolidina
2.16	ciclopropilo	CH=CH	piperidina
2.17	ciclohexilo	CH ₂	1-aminopirrolidina

Tabla 7. Sustituyentes en la posición R, de las moléculas de la serie de quinonas de CBG (3.1 – 3.10). Ver figura 15 para observar las posiciones de los sustituyentes R en el esqueleto estructural de las quinonas de CBG.

Compuesto	R
3.1	-
3.2	Etilamina
3.3	Pentanamina
3.4	3-metil-butanamina
3.5	Butanamina
3.6	Isopropilamina
3.7	Fenilmetanamina
3.8	2,2-dimetil-propilamina
3.9	3-metil-butilamina
3.10	Cannabigerolhidroxiquinona

Tabla 8. Sustituyentes en la posición R, de las moléculas de la serie de quinonas de CBD (4.1 – 4.4). Ver figura 15 para observar las posiciones de los sustituyentes R en el esqueleto estructural de las quinonas de CBD.

Compuesto	R
4.1	Pentanamina
4.2	Butanamina
4.3	Fenilmetanamina
4.4	3-metil-butanamina

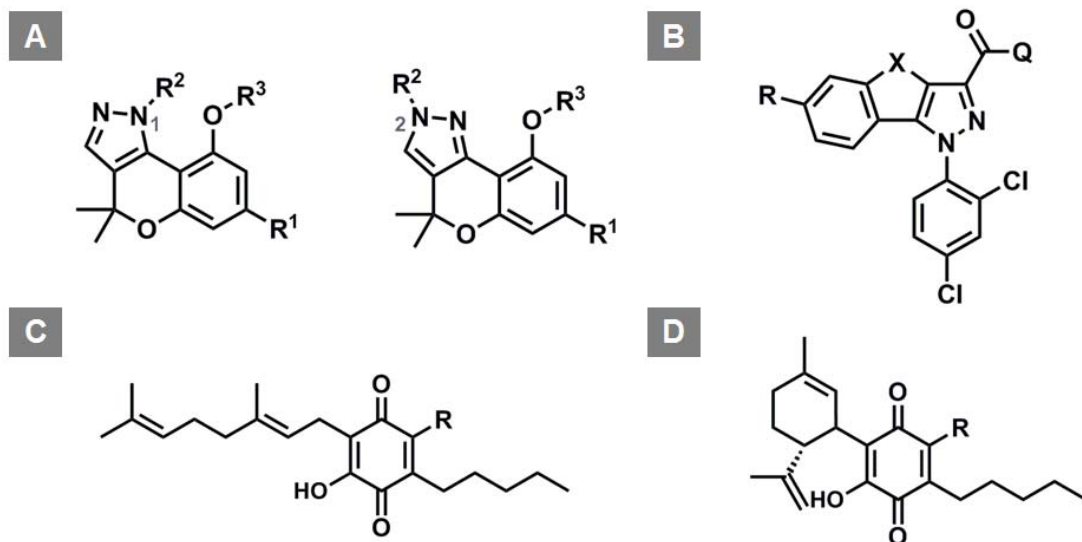


Figura 15. Esqueleto estructural de las cuatro series de compuestos estudiadas: cromenopirazoles y derivados (A), pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos (B), CBG-Q (C) y CBD-Q (D).

2 Caracterización farmacológica

En primer lugar se procedió a caracterizar farmacológicamente los compuestos descritos en el apartado anterior, atendiendo a su afinidad y al efecto que ejercen sobre los receptores CB₁ y CB₂. Recuérdese que la idea que se persigue es generar compuestos selectivos CB₂, por lo que el análisis de su afinidad por CB₁ persigue demostrar que los compuestos no son activos sobre este tipo de receptor. Para determinar la afinidad y la selectividad de los compuestos por ambos receptores, se llevaron a cabo ensayos de unión ligando-receptor. Aquellos compuestos con afinidad y selectividad relevante por el receptor CB₂, se investigaron además para determinar su capacidad para activar o bloquear al receptor CB₂, mediante ensayos de unión de GTPγS así como mediante ensayos *in vitro* para evaluar una actividad biológica dependiente del receptor CB₂ que implica la inhibición de la liberación de PGE-2 por células de microglía.

2.1 Ensayos de unión ligando-receptor

Debido al elevado número de moléculas a evaluar, se llevó a cabo un primer cribado para descartar aquellas moléculas que, a una elevada concentración, no presentasen afinidad por los receptores cannabinoides, de modo que aquellas moléculas que demostrasen ser capaces de desplazar la unión de al menos el 50% de los receptores marcados con el radioligando a una concentración elevada, serían analizadas mediante un segundo cribado más completo para poder determinar de manera concreta su afinidad (cálculo de la constante de inhibición (K_i)) y selectividad (cálculo de la relación K_i CB₁/K_i CB₂) por el receptor CB₂.

2.1.1 Primer cribado para descartar compuestos sin afinidad

Para evaluar la afinidad de los compuestos por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, se llevaron a cabo ensayos de competición entre el compuesto objeto de estudio y un cannabinoide agonista para ambos receptores, el CP55,940, marcado radiactivamente con tritio ([³H]-CP55,940; Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU) en membranas celulares comerciales que sobreexpresan el receptor en cuestión (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU). La afinidad de los compuestos vino determinada por la capacidad que presentaron para desplazar al radioligando (Deupree y Bylund, 2002).

Este primer cribado consistió en utilizar una única concentración saturante del compuesto a 40 o a 10 μM, en función de la solubilidad del compuesto. Para facilitar su solubilización, los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Madrid, España). La concentración final de DMSO nunca superó el 0.1% v/v con el fin de evitar interferencias en el ensayo. Además, todo el material de plástico utilizado (placas de 96 pocillos y tubos) fue previamente siliconizado con Sigmacote (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para prevenir la posible adhesión de los compuestos al material por su naturaleza hidrofóbica.

Las condiciones para los ensayos fueron ligeramente diferentes para el receptor CB₁ y para el receptor CB₂. Dichas condiciones se detallan a continuación:

- **Condiciones de ensayo para el receptor CB₁:**

El compuesto a investigar (40 μ M o 10 μ M) y el radioligando [³H]-CP55,940 se añadieron a un volumen total de 200 μ l de tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2.5 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0.5 mg/ml, pH 7.4). La concentración de [³H]-CP55,940 utilizada es variable y dependiente de la K_d de las membranas comerciales, utilizándose la fórmula: [[³H]-CP55,940]= 0.8*K_d (Deupree y Bylund, 2002; Bylund y Toews, 1993). El comienzo de la reacción vino determinado por la incorporación de las membranas (8 μ g de membrana por pocillo; Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU) para inmediatamente incubar las placas a 30° C durante 90 minutos.

- **Condiciones de ensayo para el receptor CB₂:**

Para analizar la unión al receptor CB₂ de cada compuesto (a 40 o 10 μ M) se utilizó un tampón de ensayo ligeramente diferente (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 2.5 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7.5), la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 600 μ l y además se utilizaron 4 μ g de membrana por pocillo (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU). La concentración de ³H-CP55,940 empleada, al igual que en los ensayos para el receptor CB₁, también es variable y dependiente de la K_d, por lo que se aplicó la misma fórmula. Una vez preparadas las placas, se incubaron a 30° C durante 90 minutos.

En ambos casos, para determinar la unión inespecífica del ensayo se utilizó el agonista CB₁/CB₂, WIN 55,212-2 (Sigma-Aldrich, Madrid, España), a una concentración de 10 μ M. La unión máxima del radioligando al receptor se determinó en las mismas condiciones de ensayo y en ausencia del compuesto objeto de estudio. Tras la incubación, se procedió a separar el radioligando libre del unido a la fracción de membranas, mediante filtración en filtros GF/C, previamente equilibrados con una solución de polietilenoimina al 0.05% (v/v) y posteriores lavados con tampón de ensayo, utilizando para ello el equipo Filtermate Harvester (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU). La medida de la radioactividad se realizó con un contador Microbeta Trilux 1450 LSC & Luminiscence Counter (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU).

Los datos obtenidos se expresaron en porcentaje de desplazamiento del radioligando calculado respecto a la unión máxima y restando la unión inespecífica (Figura 16). El estudio de cada compuesto se realizó por triplicado y cada experimento fue repetido tres veces, presentándose los resultados como porcentaje de desplazamiento \pm el error estándar de la media (EEM). Aquellos compuestos que presentaron un porcentaje de desplazamiento del radioligando [³H]-CP55,940 inferior al 50% fueron descartados (Deupree y Bylund, 2002) y no pasaron al siguiente ensayo de cribado (llevado a cabo a diferentes concentraciones del compuesto), asumiendo que su valor de K_i siempre sería superior al valor de concentración del compuesto utilizado en el cribado primario (>40 ó > 10 μ M).

$$\text{Desplazamiento (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{dpm compuesto} - \text{dpm unión inespecífica}}{\text{dpm unión máxima} - \text{dpm unión inespecífica}} \right) \times 100$$

Figura 16. Fórmula empleada para determinar el porcentaje de desplazamiento del radioligando ³H-CP55,940, normalizado con respecto a la unión máxima y considerando la unión inespecífica, a partir de los valores de desintegraciones por minuto (dpm).

2.1.2 Segundo cribado para obtención del valor de K_i

La determinación de la K_i por los receptores cannabinoides de los compuestos que superaron la fase de primer cribado, se llevó a cabo aplicando una variante del protocolo anterior. En particular, el cambio principal fue utilizar concentraciones del compuesto de estudio en un rango de 10⁻⁴ a 10⁻¹² M, en lugar de emplear una única concentración elevada. La unión del radioligando al receptor disminuye en paralelo al aumento de la concentración de compuesto, adoptando esta relación la forma de una curva sigmoidea en la cual la concentración que produce el 50% de desplazamiento define la IC50, valor directamente relacionado con la K_i, que determina la afinidad del compuesto por el receptor, más baja cuanto mayor afinidad tenga el compuesto y viveversa.

El material utilizado, incluyendo el material siliconizado, los tampones de ensayo, las membranas biológicas y el radioligando, así como el procedimiento general de condiciones de incubación, filtración y conteo de radiactividad, fueron idénticos a los descritos para efectuar el primer cribado. Una vez obtenidos los valores de radiactividad, se calculó la unión del radioligando al receptor para cada una de las concentraciones de compuesto, restando la unión inespecífica del radioligando y normalizando respecto a su unión máxima (Figura 17A). Los datos de cada compuesto fueron analizados mediante el software GraphPad Prism, versión 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU). La aplicación de una regresión no lineal minimizando la suma de los residuos al cuadrado (algoritmo Levenberg-Marquand) permite ajustar estos datos a una ecuación de tipo dosis-respuesta con pendiente de Hill -1.0 (Figura 17 B). La representación gráfica semilogarítmica del porcentaje de radioligando unido frente a la concentración de compuesto generó una curva sigmoidea a partir de la cual se estimó el parámetro logIC50. Mediante la aplicación de la ecuación de Cheng-Prusoff, (Cheng y Prusoff, 1973) se determinó la K_i característica de cada compuesto. Al igual que en los ensayos del primer cribado, el ensayo de cada concentración cada compuesto se realizó por triplicado y los experimentos fueron repetidos 3 veces presentándose los resultados como valor de K_i ± EEM.

A

$$\text{Radioligando unido (\%)} = \left(\frac{\text{dpm compuesto} - \text{dpm unión inespecífica}}{\text{dpm unión máxima} - \text{dpm unión inespecífica}} \right) \times 100$$

B

$$\text{Radioligando unido (\%)} = \text{Unión inespecífica} + \frac{(\text{Unión máxima} - \text{Unión inespecífica})}{1 + 10^{\log[\text{compuesto}] - \log \text{IC}_{50}}}$$

Figura 17. Fórmula empleada para determinar el porcentaje del radioligando unido a las membranas, normalizado con respecto a la unión máxima y considerando la unión inespecífica, a partir de los valores de dpm (A). Fórmula empleada para relacionar el porcentaje de radioligando unido con el valor de IC₅₀ (B).

Los compuestos seleccionados para continuar la caracterización fueron aquellos que presentaban simultáneamente una afinidad ($K_i \leq 50$ nM) y selectividad (K_i para CB₁ al menos 20 veces mayor que K_i para CB₂) relevantes por el receptor CB₂. Se utilizaron ensayos de unión de GTPγS para determinar su actividad (agonista, antagonista o agonista inverso) por ese receptor.

2.2 Ensayos de unión de GTPγS

Para determinar la actividad funcional por el receptor CB₂ de los compuestos seleccionados, se llevaron a cabo ensayos de unión de GTPγS, que permiten conocer si un compuesto determinado activa (agonista), inhibe (agonista inverso) o simplemente bloquea a ese receptor (antagonista). Brevemente, esta técnica permite la cuantificación de la radiactividad emitida por el análogo no hidrolizable del nucleótido guanosina trifosfato ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$), que queda asociado a la subunidad α de la proteína G del receptor CB₂ presente en las membranas biológicas, cuando se incubaba en presencia de un ligando de ese receptor. El efecto del compuesto puede estimarse por comparación con su actividad basal o constitutiva.

Al igual que los ensayos de unión al receptor, todo el material plástico utilizado fue previamente siliconizado con Sigmacote (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El DMSO utilizado para disolver los compuestos nunca superó el 0.1% v/v para evitar interferencias en el ensayo.

Se emplearon diferentes concentraciones (10^{-4} - 10^{-12} M) del compuesto de estudio, junto con $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 0,3 nM (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU) en un volumen total de 100 μl en tampón HEPES (HEPES 20 mM, MgCl₂ 10mM, NaCl 10mM, GDP 10 μM, pH 7.4), (Ragusa y cols., 2015; Deiana y cols., 2016). El comienzo de la reacción vino determinado por la incorporación de las membranas (5 μg por pocillo; Eurofins Discovery Services St. Charles, MO, EEUU), previamente tratadas con saponina en una proporción 1:1 (v/v). Una vez añadidas las membranas, se incubó la placa a 30° C durante 30 minutos. Para las uniones inespecíficas se utilizó el análogo no hidrolizable del nucleótido guanosina trifosfato no marcado radiactivamente (GTPγS) a una

concentración de 10 μM y el grado de actividad basal o constitutiva fue determinado en las mismas condiciones de ensayo y en ausencia del compuesto objeto de estudio. La reacción se detuvo mediante filtración en filtros GF/C y posteriores lavados con tampón fosfato sódico 10 mM pH=7.4, utilizando para ello el equipo Filtermate Harvester (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU). La medida de la radioactividad se realizó mediante un contador Microbeta Trilux 1450 LSC & Luminiscence Counter (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU).

El efecto del compuesto en la activación del receptor se determinó mediante la forma indicada en la Figura 18, en la que se resta la unión inespecífica de [^{35}S]GTP γS y se normaliza el valor resultante respecto a la activación basal. Los valores se expresan como porcentaje de activación del receptor CB_2 .

$$\text{Activación del receptor (\%)} = \left(\frac{\text{dpm compuesto} - \text{dpm unión inespecífica}}{\text{dpm activación basal} - \text{dpm unión inespecífica}} \right) \times 100$$

Figura 18. Fórmula aplicada para transformar el valor de dpm obtenido normalizado con respecto a la actividad basal y considerando la unión inespecífica.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism, versión 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU) y ajustados a una ecuación de tipo dosis-respuesta mediante regresión no lineal, minimizando la suma de los residuos al cuadrado (algoritmo Levenberg-Marquardt). En el caso de los compuestos considerados agonistas, los datos fueron ajustados a una ecuación de tipo dosis-respuesta con pendiente de Hill 1.0 (Figura 19); mientras que en el caso de los compuestos que fueron considerados agonistas inversos, los datos fueron ajustados a una ecuación de tipo dosis-respuesta con pendiente de Hill -1.0 (Figura 20).

$$\text{Activación del receptor (\%)} = \text{Activación basal} + \frac{(\text{Efecto máximo} - \text{Activación basal})}{1 + 10^{\log \text{EC50} - \log [\text{compuesto}]}}$$

Figura 19. Fórmula aplicada sobre los compuestos agonistas para obtener la curva de dosis-respuesta a partir de los valores de respuesta en porcentaje, normalizados sobre la actividad basal.

$$\text{Activación del receptor(\%)} = \text{Efecto máximo} + \frac{(\text{Activación basal} - \text{Efecto máximo})}{1 + 10^{\log [\text{compuesto}] - \log \text{IC50}}}$$

Figura 20. Fórmula aplicada sobre los compuestos agonistas inversos para obtener la curva de dosis-respuesta a partir de los valores de respuesta en porcentaje, normalizados sobre la actividad basal.

Se procedió a la identificación cualitativa funcional del compuesto analizando la trayectoria de la curva dosis-respuesta (Figura 21), para determinar su perfil agonista (aumento de la actividad basal), antagonista (no afecta a la actividad basal) o agonista inverso (disminución de la actividad basal). La representación gráfica semilogarítmica del porcentaje de activación del receptor frente a la concentración de compuesto generó una curva sigmoidea a partir de la cual se estimaron los parámetros log EC50 y log IC50, y a partir de la que se extrajeron los datos de efecto máximo.

Al igual que en los ensayos de unión al receptor, todos los puntos se realizaron por triplicado y cada ensayo fue repetido 3 veces, presentándose los resultados como valor de EC50 o IC50 ± el EEM, así como la eficacia o efecto máximo (Emax) ± el EEM.

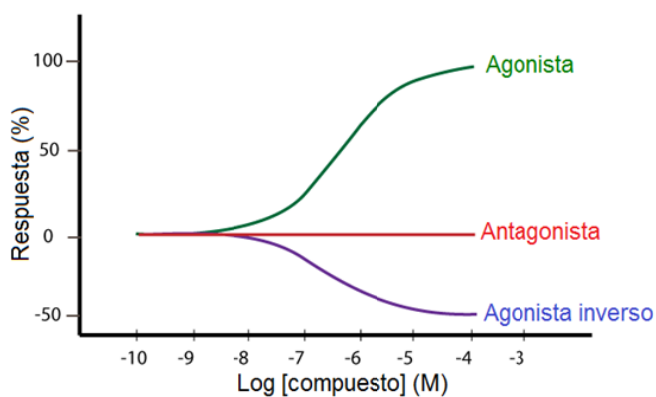


Figura 21. Curvas de dosis-respuesta correspondientes a la respuesta biológica generada por un agonista, un antagonista o un agonista inverso.

2.3 Actividad biológica en un modelo *in vitro*

Para verificar el efecto sobre el receptor CB₂ de algunos de los compuestos seleccionados, se estudió su actividad biológica en un modelo *in vitro*. Consiste en estudiar la capacidad de estas moléculas para interactuar directamente con el receptor CB₂ y así modular la liberación de PGE-2 por células de microglía tras su estimulación con lipopolisacárido (LPS) (Ragusa y cols., 2015; Deiana y cols., 2016). Se trata de un modelo que reproduce *in vitro* las propiedades antiinflamatorias de los agonistas CB₂ y proinflamatorias de los agonistas inversos.

Se empleó la línea celular de microglía de ratón, BV-2, (generosamente donada por la Dra. Carmen Guaza, Instituto Cajal del CSIC, Madrid, España). Las células se mantuvieron en DMEM (Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado con suero fetal bovino (FBS, del inglés: *Fetal Bovine Serum*) al 10% (Sigma Aldrich, Madrid, España), ultraglutamina 2 mM (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de una mezcla de antibióticos (ampicilina, anfotericina y estreptomycin; Lonza, Verviers, Bélgica) en un incubador a 37°C y al 5% de CO₂.

Las placas utilizadas para los ensayos se trataron previamente con 15 mg/ml de poliornitina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y las células BV-2 se sembraron a una densidad celular de 500.000 células por pocillo, parcialmente deprivadas de suero (FBS al 1%). A continuación, las células de microglía fueron estimuladas con 1 µg/ml de LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich, Madrid, España), y se añadió el compuesto de estudio para evaluar la producción de PGE-2.

Para determinar el efecto agonista de las moléculas seleccionadas, se trató a las células sembradas con SR144528 (10 µM) y transcurrida una hora se añadió el compuesto objeto de estudio a una concentración 10 veces el valor de su K_i. Una hora más tarde se añadió LPS (Oh y cols., 2010), como se muestra en la Figura 22A. Para determinar el efecto antagonista/agonista inverso de las moléculas seleccionadas se procedió al revés: se trató a las células con el compuesto objeto de estudio a la dosis de 10 veces el valor de su K_i y transcurrida una hora se añadió el agonista WIN55212-2 (10 µM). Una hora más tarde se añadió LPS (Figura 22 B). En ambos casos, transcurridas 16 horas de la adición del LPS, se recogió el medio de cultivo que se utilizó para cuantificar los niveles de PGE-2 liberados por las células de microglía, mediante el kit de ELISA DetectX® Prostaglandin E2 (Arbor Assays, Michigan, EEUU).

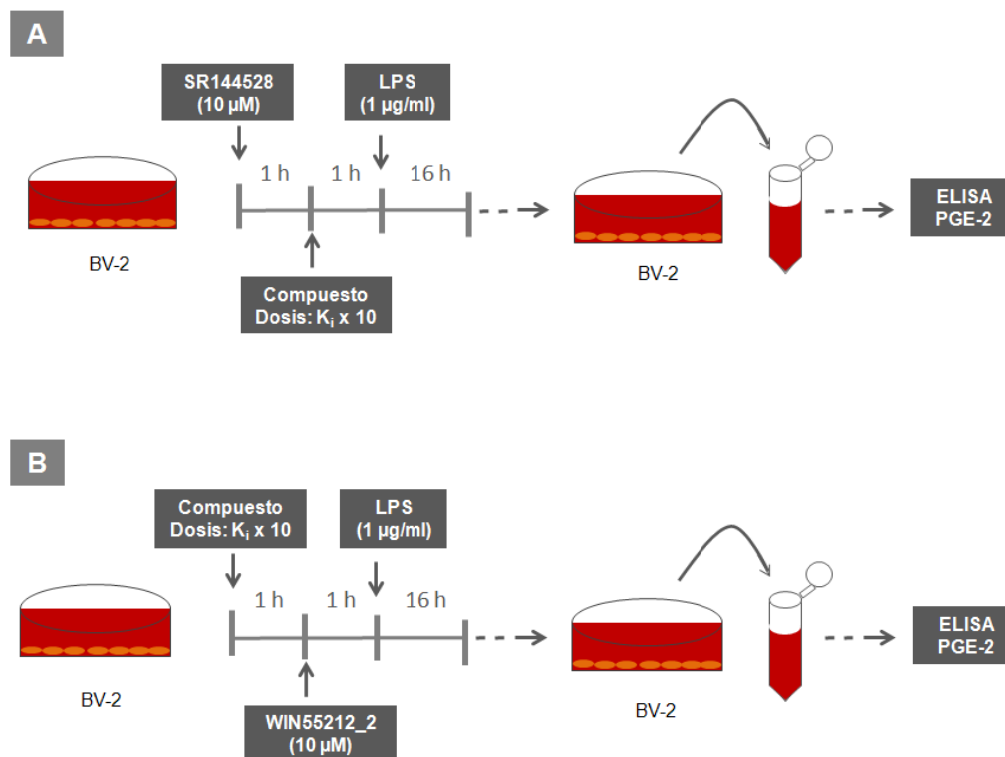


Figura 22. Esquema representativo del procedimiento llevado a cabo para el estudio de la actividad biológica mediada por el receptor CB_2 de los compuestos en un modelo *in vitro*. (A). Esquema del desarrollo de la técnica para explicar el comportamiento agonista de los compuestos. (B). Esquema del desarrollo de la técnica para determinar el efecto antagonista/agonista inverso de las moléculas.

3 Predicción de parámetros farmacocinéticos

Con el objetivo de determinar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos seleccionados por su afinidad y selectividad por el receptor CB_2 , se llevó a cabo un estudio *in silico*. La predicción de esta serie de parámetros farmacocinéticos es importante en la medida que la ausencia de capacidad de atravesar la BHE, una débil biodisponibilidad, la posibilidad de tener toxicidad, o de metabolizarse muy rápidamente, pueden condicionar significativamente el perfil farmacológico y terapéutico de compuestos que en los estudios *in vitro* hayan podido resultar muy atractivos por su elevada afinidad y/o selectividad por el receptor CB_2 .

Para realizar esta predicción se trabajó con un conjunto de 34 descriptores físico-químicos utilizando el software QikProp versión 3.5 integrado en Maestro (Schrödinger, LLC, New York, USA). De esos 34 descriptores se prestó especial atención a aquellos relacionados con la permeabilidad de la BHE, la absorción oral e intestinal humana, la inhibición de canales de potasio HERG, la capacidad de asociación a la albúmina de suero humano (HSA) y la solubilidad acuosa. Las conformaciones 3D empleadas en el cálculo de los descriptores fueron generadas utilizando el software Spartan '08 (Wave function, Inc., EEUU). Utilizando la librería de fragmentos moleculares

disponible en el programa, se construyó la estructura de cada molécula y se aplicó una minimización de la energía a nivel Hartree-Fock 6-31G* de esta estructura. A continuación, se realizó una búsqueda de conformaciones mediante mecánica molecular (método de Monte Carlo), seguido de una minimización de la energía de cada conformación a nivel Hartree-Fock 6-31G *. La conformación global de menor energía obtenida para cada compuesto se empleó en los estudios farmacocinéticos de ADMET (Adsorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) con QikProp. Esta parte del estudio de los compuestos se realizó en el IQM del CSIC, gracias a la colaboración mantenida con el grupo de Pilar Goya y Nadine Jagerovic.

4 Determinación de las propiedades neuroprotectoras

Como se ha indicado en el apartado de objetivos, los estudios anteriores (perfil de unión a los receptores, actividad funcional, actividad biológica y farmacocinética) estaban orientados a seleccionar los mejores candidatos de entre las diferentes familias de compuestos investigadas por su farmacodinámica (alta afinidad y selectividad por el receptor CB₂) y farmacocinética (buena predicción respecto a sus propiedades ADME), para investigar dichos compuestos en ensayos biológicos de neuroprotección. Tras la caracterización farmacológica de los compuestos de partida, se seleccionó sólo uno, el cromenoisoxazol 1.56 (7-(1,1-dimetilheptil)-4,4-dimetil-9-metoxicromeno[3,4-d]isoxazol, también llamado PM226), derivado de la serie de cromenopirazoles. Este compuesto fue investigado por sus potenciales propiedades neuroprotectoras dependientes de la activación del receptor CB₂ en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para tal fin, se utilizó, en primer lugar, un modelo *in vitro* basado en el estudio de los efectos sobre la supervivencia neuronal de este compuesto, generados a través de reducir la toxicidad de medios condicionados, derivados de cultivos de células de microglía. A continuación, se utilizó un modelo *in vivo* de daño mitocondrial e inflamación, que ha sido utilizado previamente como modelo de la EH (Sagredo y cols., 2009), en el que se pudieron valorar las propiedades neuroprotectoras del compuesto 1.56.

4.1 Ensayo de neuroprotección en un modelo *in vitro*:

Se utilizó un modelo celular basado en la reversión del daño que provocan sobre la integridad y supervivencia neuronal, distintas moléculas proinflamatorias liberadas por las células de microglía BV-2 cuando son estimuladas con LPS. Se ha visto que la activación de receptores CB₂ localizados en las células de microglía, reduce la liberación de moléculas proinflamatorias por parte de estas células en respuesta al LPS (Oh y cols., 2010) y, por tanto, disminuye el efecto tóxico sobre las neuronas. Se trata, por tanto, de un sistema *in vitro* de fácil uso para evaluar propiedades neuroprotectoras mediadas por la activación del receptor CB₂.

Para estos estudios *in vitro* se emplearon las células BV-2, mencionadas anteriormente y que expresan el receptor CB₂ (Atwood y cols., 2011) y las células M213-2O, una línea celular neuronal derivada de estriado de rata (generosamente donada por el Dr. WJ Freed, del Instituto Nacional de Drogas de Abuso, Bethesda, MD, USA), que no expresan los receptores cannabinoides (Pazos, 2010). Al igual que las BV-2, las neuronas se mantuvieron en DMEM (Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado con FBS al 10% (Sigma Aldrich, Madrid, España), ultraglutamina 2 mM (Lonza,

Verviers, Bélgica) y 1% de una mezcla de antibióticos (ampicilina, anfotericina y estreptomina; Lonza, Verviers, Bélgica) en un incubador a 37°C y al 5% de CO₂. Una vez ambos cultivos estaban estables, se utilizaron para diferentes tipos de experimentos que se describen a continuación. En todos los casos, la estrategia fue obtener medios condicionados de los cultivos de BV-2 tras la estimulación con LPS y añadirlos a las neuronas para determinar su efecto sobre la viabilidad celular. El procedimiento estándar consistió en la adición de LPS sobre las células BV-2 a la concentración de 0.1 µg/ml, con el fin de obtener el medio condicionado. Tras 24 horas de incubación con LPS, se añadió el medio condicionado generado a las células M213-2O y tras 40 horas de exposición, se estudió la viabilidad neuronal mediante ensayos de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain). Como control, se añadió el LPS directamente sobre las células M213-2O, para la determinación del papel de la activación microglial como mecanismo neurotóxico.

4.1.1 Curva de dosis

Para determinar si la activación del receptor CB₂ microglial con el compuesto 1.56 reducía la muerte neuronal y cuál era la dosis efectiva, se sembraron las células M213-2O a una densidad celular de 50.000 células por pocillo, en placas de 24 pocillos, y se mantuvieron en el medio de cultivo a 37°C y 5% de CO₂ toda la noche hasta el momento de añadirles los medios condicionados. Al mismo tiempo se sembraron las células BV-2 en placas de 6 pocillos, a una densidad celular de 200.000 células por pocillo, parcialmente deprivadas de suero. Dos horas después, se añadió el compuesto 1.56 a las dosis de 0.1, 1 y 10 µM al medio de cultivo de las células BV-2. Los pocillos control se trataron con DMSO, como vehículo en el que se disolvió el compuesto, (0.1% v/v, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Tras una hora de incubación en presencia del compuesto, se añadió 0.1 µg/ml de LPS (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 24 horas después, se recogió el medio de incubación de las células BV-2 (medio condicionado), que fue añadido a las células M213-2O, para inducir la muerte celular, siguiendo el procedimiento descrito por Lin y cols. (2007). Las células M213-2O se incubaron durante 40 horas con los medios condicionados y transcurrido ese tiempo se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain). Los datos de todos los experimentos llevados a cabo se normalizaron frente a un grupo control de células M213-2O expuestas a medio fresco con 1% FBS (Figura 23A).

4.1.2 Implicación del receptor CB₂ en el efecto neuroprotector del compuesto 1.56

Tras determinarse que la concentración de 1.56 que mostraba mayor efecto neuroprotector era la de 10 µM, el siguiente objetivo fue confirmar que ese efecto era mediado por la activación del receptor CB₂. Para ello se co-incubó el compuesto 1.56 con el antagonista selectivo del receptor CB₂ SR144528. Las condiciones del ensayo, en cuanto al número de células y medios de cultivo fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior. El procedimiento fue el siguiente: Una vez sembradas las células BV-2, se trataron con 10 µM de 1.56 en ausencia o presencia de 10 µM SR144528 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) (Figura 23B). En primer lugar se añadió SR144528, una hora después se añadió el compuesto 1.56 y tras una hora de incubación se

añadió 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. Los pocillos control se trataron con el vehículo (DMSO, 0.2 % v/v, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Del mismo modo que en la curva de dosis, 24 horas después de añadir el LPS se recogieron los medios condicionados y se añadieron a las células M213-2O. Tras 40 horas de incubación con los medios condicionados, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) y los datos se normalizaron frente a un grupo control de células M213-2O expuestas a medio fresco con 1% FBS.

En este experimento se utilizó además un control adicional para comprobar que la acción neuroprotectora del compuesto 1.56 se basa en la disminución de la liberación de sustancias proinflamatorias por las células microgliales activadas, las cuales son letales para las células neuronales. Este control consistió en la adición del compuesto 1.56 directamente sobre las células M213-2O, con objeto de comprobar si también es activo a ese nivel, frente a la toxicidad microglial.

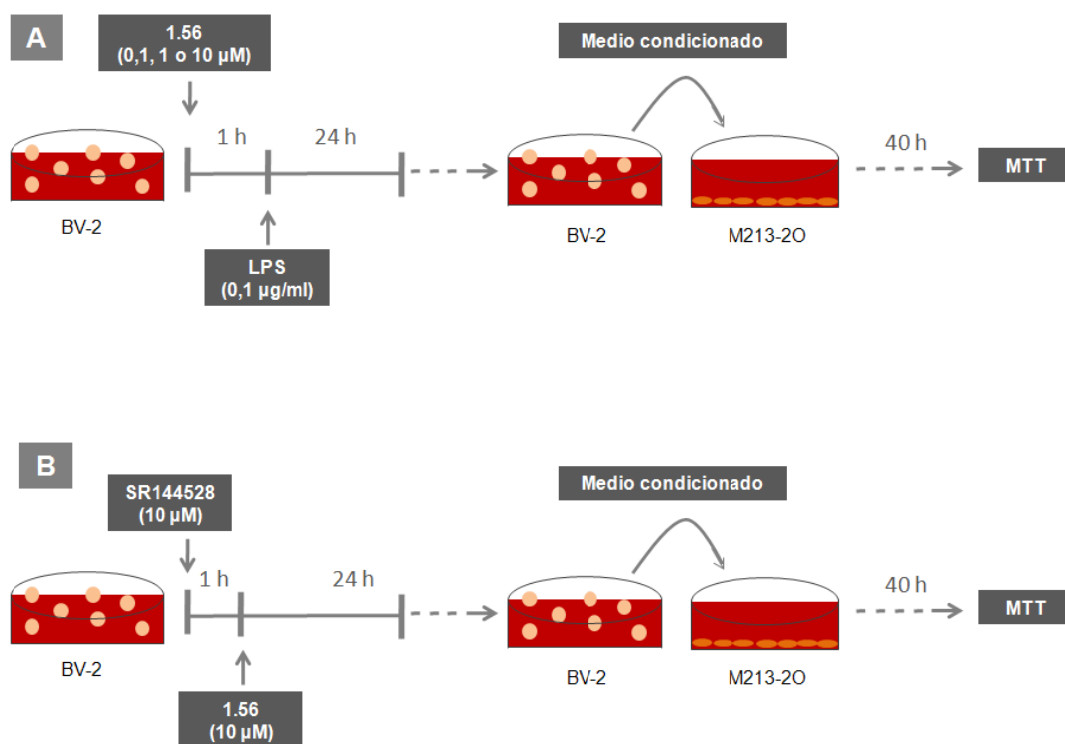


Figura 23. Esquema-resumen del procedimiento utilizado para determinar el potencial neuroprotector del compuesto 1.56 *in vitro*. (A). Esquema del ensayo de curva de dosis de 1.56 (0.1, 1 y 10 μM). (B). Esquema del ensayo para verificar el efecto de 1.56 por activación del receptor CB₂.

4.2 Ensayo de neuroprotección en un modelo *in vivo*:

Con el objetivo de evaluar el efecto neuroprotector del compuesto 1.56 *in vivo*, se utilizó un modelo de daño mitocondrial y reactividad glial, que al realizarse de forma local en el cuerpo estriado, se ha venido utilizando como modelo de la EH (Sagredo y cols., 2009). Se basa en la administración intraestriatal de la toxina mitocondrial malonato (inhibidor del complejo II de la cadena de

transporte de electrones) que provoca la muerte de las neuronas GABAérgicas del estriado, principalmente las neuronas de proyección al globo pálido y a la sustancia nigra. Se ha elegido este modelo porque en estudios previos ya se ha descrito que los agonistas del receptor CB₂ tienen efectos neuroprotectores. (Sagredo y cols., 2009; Valdeolivas y cols., 2012).

4.2.1 Animales

Se utilizaron ratas adultas macho de 12 semanas de edad, de la cepa Wistar (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Los animales se mantuvieron siempre bajo condiciones constantes de fotoperiodo (luz de 08:00 a 20:00 horas), temperatura (22 ±1°C) y humedad. En todo momento tuvieron libre acceso a comida estándar (Panlab) y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la normativa europea (Directiva 2010/63/EU) y fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (código CEA-UCM 56/2012).

4.2.2 Lesiones con malonato

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (60mg/kg) y xilacina (40mg/kg) y posicionadas en un aparato estereotáxico David Kopf (DK 900, Tujunba, CA) para llevar a cabo la lesión unilateral del estriado izquierdo mediante una microinyección de malonato 2 M (Sigma-Aldrich, Madrid, España), disuelto en PBS (del inglés: *Phosphate Buffered Saline*) 0.1 M, pH=7.4, en un volumen final de 1µl, en las siguientes coordenadas: + 0.8 mm en sentido antero-posterior desde el Bregma, +2.9 mm en sentido lateral izquierdo desde el Bregma y -4.5 mm en sentido dorso-ventral desde el Bregma. Los animales controles fueron anestesiados, tratados con el vehículo, colocados en el estereotáxico, y sometidos al proceso quirúrgico general, con la salvedad de que en lugar de malonato, se les administró el mismo volumen de suero salino. Tanto los animales control (sham) como los lesionados, tenían intacto el estriado contralateral (derecho) que se utilizó como referencia para los diferentes análisis y para detectar si el compuesto objeto de estudio pudiera ser tóxico o no en ausencia de lesión. Tras la cirugía, los animales se mantuvieron bajo observación para facilitar una recuperación y reducir la mortalidad postquirúrgica

4.2.3 Tratamientos

Al igual que en el modelo de neuroprotección *in vitro*, se realizó un primer ensayo para determinar la dosis del compuesto 1.56 (0.1, 1 y 10 mg/kg) con mejor efecto neuroprotector. A continuación, se realizó un ensayo para revertir el efecto del compuesto a la dosis elegida con el antagonista del receptor CB₂ AM630 (Tocris, Biogen Científica, Madrid, España) y confirmar que el efecto neuroprotector era mediado por la activación del receptor CB₂.

Ambos compuestos se prepararon en una solución de Tween-80:salino (1:16 v/v), con un porcentaje de DMSO de 0.3% para el compuesto 1.56, y del 2% para el AM630. Los animales control (sham) y los animales lesionados que fueron tratados con vehículo, recibieron la misma proporción de DMSO en Tween-80:salino.

La administración del compuesto 1.56 se realizó vía intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes y 2 horas después de la inyección intraestriatal con malonato (Figura 24A). En el grupo experimental tratado con el AM630, dicho compuesto se administró i.p. 10 minutos antes de cada inyección del compuesto 1.56 (Figura 24B).

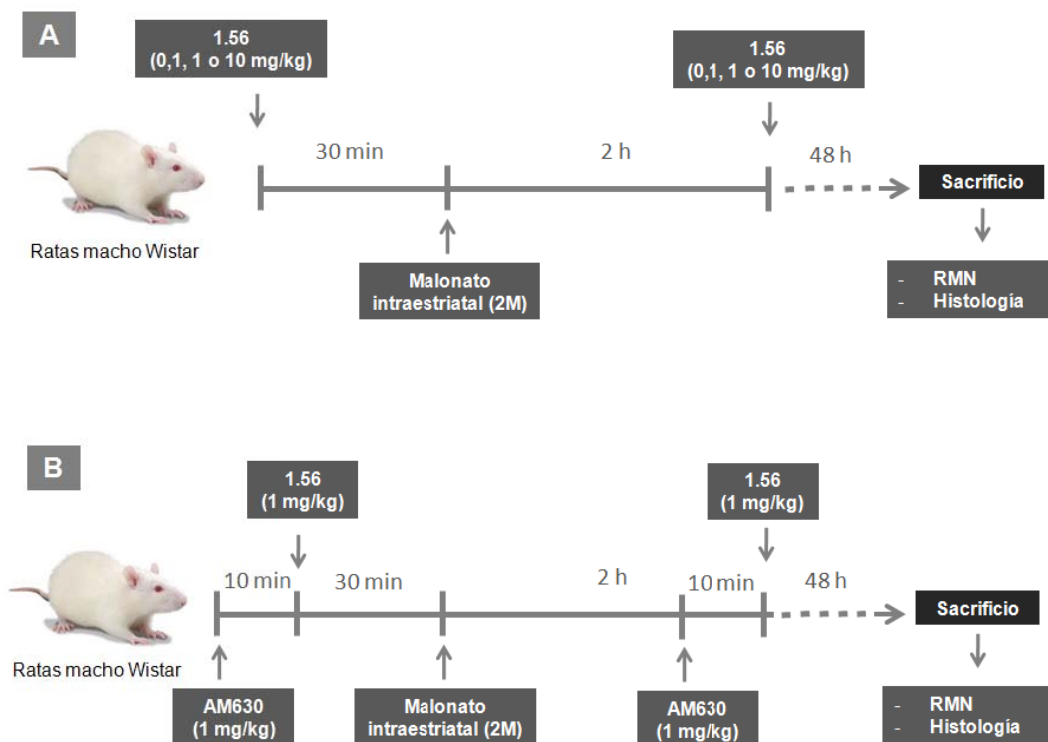


Figura 24. Esquema representativo del ensayo de neuroprotección *in vivo*. (A). Esquema del ensayo, en el que se lleva a cabo una curva de dosis (0.1, 1 y 10 mg/kg) para determinar la concentración óptima del compuesto. (B). Esquema del ensayo en el que se antagoniza la acción de 1.56 con la administración de AM630 para verificar su efecto además de la activación del receptor CB₂.

4.2.4 Recogida de muestras

Los animales fueron sacrificados a las 48 horas de la lesión con malonato, mediante la administración de una dosis subletal de ketamina:xilacina y posterior perfusión con suero salino al 0.9 % seguida de paraformaldehído al 4%. A continuación se extrajeron rápidamente los cerebros, y se fijaron toda la noche en paraformaldehído al 4% a 4°C.

4.2.5 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear

Los cerebros extraídos y fijados fueron utilizados para medir el volumen de edema estriatal mediante imágenes de Resonancia Magnética nuclear (RMN). Dichas imágenes fueron adquiridas en el Centro de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Autónoma de Madrid. La toma de imágenes se realizó en un sistema Bruker Pharmascan (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania). Todos los datos fueron adquiridos por el software Paravision 5,1 (Bruker Medical

Gmbh). En cada corte se delineó manualmente el área total del hemisferio lesionado (HL), el área de edema estriatal provocada por la lesión (L) y el área del hemisferio no lesionado (HNL). El volumen total de lesión fue calculado y expresado como porcentaje del volumen total teórico (Pazos y cols., 2012).

4.2.6 Estudios histopatológicos

Una vez finalizados los análisis de RMN, los cerebros fueron criopreservados por inmersión en sacarosa al 30% y congelados a -80°C. Se obtuvieron secciones coronales consecutivas de 20 µm de grosor mediante corte en un criostato (Leica, Wetzlar, Alemania). Las secciones obtenidas se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados. Para los estudios histológicos se seleccionaron las secciones pertenecientes a la zona intermedia del estriado, ubicadas a unos 0,8 mm en sentido posterior del bregma, localizadas mediante el uso del atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986).

4.2.6.1 Tinción de Nissl

Para evaluar la integridad del tejido, se realizó un análisis neuropatológico utilizando la tinción de Nissl. Para ello, las secciones se sumergieron en azul de toluidina (0.5%, Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 30 segundos, seguido de sucesivas inmersiones en etanol para su deshidratación y procesado con medio de montaje Depex (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

De cada animal se obtuvieron cuatro microfotografías (dos del estriado ipsilateral y dos del estriado contralateral) con el microscopio DMRB y cámara DFC300FX (Leica, Wetzlar, Alemania) con el objetivo de aumento 20X. Para el análisis de las imágenes se procedió al contaje de píxeles mediante el programa ImageJ 1.43u (Bethesda, MD, EEUU). La integridad tisular del estriado ipsilateral (lesionado) fue definida comparando porcentualmente el lado lesionado respecto al no-lesionado.

4.2.6.2 Análisis de la apoptosis

Para la detección de células en proceso de muerte celular por apoptosis se utilizó la técnica del TUNEL (del inglés: *TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*). El ensayo se llevó a cabo mediante el kit de TUNEL *Dead End fluorometric TUNEL system* (Promega, Biotech Ibérica, Madrid, España) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. De cada animal se obtuvieron dos microfotografías del estriado ipsilateral con el microscopio Leica TCS SP5 con el objetivo de aumento 20X. Para el análisis de las imágenes se procedió al contaje de células en apoptosis mediante el programa ImageJ 1.43u (Bethesda, MD, EEUU). En este caso, dada la ausencia de señal en el estriado no-lesionado, la muerte celular por apoptosis del estriado ipsilateral fue definida exclusivamente por el número total de células en apoptosis del lado lesionado.

4.2.6.3 Análisis inmunohistoquímicos

Para la detección y análisis de las células de microglía, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica analizando el marcador específico de estas células, Iba-1. Para ello, se descongelaron las secciones y se fijaron con paraformaldehído frío al 4% disuelto en PBS 0.1 M, pH = 7.4. Tras sucesivos lavados en PBS, las secciones se incubaron durante 10 minutos en NHCl_4 (10 mM), con objeto de disminuir la autofluorescencia. Después de repetidos lavados en PBS se procedió a la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-IBA-1 (1:800; Wako, Neuss, Alemania) (PBS 0.1 M, pH = 7.4; Triton X-100 al 0.4% y BSA al 1%) durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incubaron durante dos horas a 37°C con el anticuerpo secundario anti-conejo, conjugado con Alexa Fluor-488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) preparado a una dilución 1:200. Finalmente, las secciones fueron contrateñidas con el marcador de núcleos TO-PRO®-3 (Life Technologies; Madrid, España). De cada animal se obtuvieron dos microfotografías del estriado ipsilateral con el microscopio Leica TCS SP5 con el objetivo de aumento 20X. Para el análisis de las imágenes se procedió al conteo de células de microglía mediante el programa ImageJ 1.43u (Bethesda, MD, EEUU).

5 Validación de la posible actividad del compuesto 1.56 sobre los receptores GPR55 y PPAR γ

La última parte experimental de esta Tesis Doctoral ha consistido en investigar si el compuesto 1.56 podría tener actividad, además de por el receptor CB_2 , por alguna otra de las nuevas dianas que se han relacionado con el SCE. Esta parte se describe aquí porque sólo se ha estudiado para el compuesto 1.56, aunque conceptualmente debería ubicarse en la sección de caracterización farmacológica (sección 2). Entre las posibles dianas a investigar se han incluido dos, para las que estudios previos han descrito una interacción con determinados ligandos cannabinoides. Se trata del receptor metabotrópico GPR55 (Johns y cols., 2007; Ryberg y cols., 2007; Henstridge y cols. 2009, 2010), así como de los receptores nucleares PPAR (Sun y Bennett, 2007). Hay que indicar que ambos receptores se han relacionado con efectos antiinflamatorios/antiexcitotóxicos mediados por las células gliales, tanto en el caso de GPR55 (Kallendrusch y cols., 2013), como PPAR γ (Madeira y cols., 2015; Song y cols., 2016), lo que en caso de que el compuesto 1.56 tuviese alguna actividad sobre estos receptores, sumaría a su papel antiinflamatorio mediado por activación de los receptores CB_2 .

5.1 Actividad sobre GPR55

Para estudiar la posible actividad del compuesto 1.56 sobre el receptor GPR55 se utilizó un ensayo funcional basado en la detección de la fosforilación de ERK1/2, cuantificada por Western blot, en células HEK293T transfectadas transitoriamente con el receptor GPR55. Como control positivo de la activación de GPR55 se empleó AM251 (Henstridge y cols., 2010) y como control negativo, se emplearon células HEK293T no transfectadas con GPR55. Estos análisis de actividad se llevaron a cabo en el laboratorio de nuestros colaboradores de Vivacell Biotechnology y de la Universidad de Córdoba.

Ambos tipos celulares se mantuvieron en medio de cultivo (DMEM suplementado con FBS al 10%, y antibióticos al 1%) a 37° C y en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos en medio de cultivo a una densidad celular de 250000 células por pocillo y permanecieron en el incubador toda la noche. Al día siguiente, se llevó a cabo la transfección transitoria con Roti®-Fect (Calrl Roth, Karlsruhe, Alemania). Transcurridas 48 horas tras la transfección, se procedió a la incubación con el compuesto 1.56 a las dosis de 0.1, 1 y 10 µM, el control AM251 a 1 µM y DMSO al 0.1% v/v (usado como vehículo). Transcurridos 25 minutos de incubación con los compuestos, las células fueron lavadas con PBS y lisadas para la extracción de proteínas mediante la adición de un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10% y NP-40 1%), suplementado con NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml y fenilmetilsulfonil (PMSF) saturado 1 µl/ml. La concentración de proteína fue determinada mediante ensayo de Bradford (Bio-rad, CA, EEUU). 30 µg de proteínas fueron resuspendidas en tampón Laemmli y desnaturalizadas por inmersión en un baño a 95° C, para después ser cargadas en un gel SDS/PAGE al 10% y ser sometidas a electroforesis. Una vez separadas, las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (20V durante 30 minutos) y bloqueadas en una solución TBS con 0.1% Tween-20 y 5% de leche desnatada, durante una hora a temperatura ambiente.

La inmunodetección de las proteínas ERK1/2 y ERK1/2 fosforilado se llevó a cabo por la incubación con los anticuerpos primarios ERK1/2 (1:2000, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y pERK (1:200, Santa Cruz, Heidelberg, Alemania), respectivamente, durante toda la noche a 4° C. Tras la incubación, se lavaron las membranas sucesivamente con PBS-Tween-20 y se añadieron los anticuerpos secundarios anti-conejo (1:10000, Jackson ImmunoResearch laboratorios, West Grove, PA, EEUU), y anti-ratón (1:10000, Jackson ImmunoResearch laboratorios, West Grove, PA, EEUU), para la detección de ERK1/2 y pERK, respectivamente, ambos conjugados con peroxidasa (HRP). La detección se llevó a cabo por un sistema de quimioluminiscencia (GE Healthcare Europe GmbH, Alemania) y la señal fue cuantificada mediante análisis de densitometría, usando el programa Image J (NIH; Bethesda, MD, EEUU).

5.2 Actividad sobre PPAR γ

Del mismo modo que para el receptor GPR55, también se procedió a evaluar la capacidad del compuesto 1.56 para activar el receptor PPAR γ . Estos análisis de actividad también se llevaron a cabo en el laboratorio de nuestros colaboradores de Vivacell Biotechnology y de la Universidad de Córdoba. Para ello, se empleó la línea celular HEK293T transfectada transitoriamente con PPAR γ . Las células HEK293T fueron mantenidas en medio de cultivo (DMEM suplementado con FBS al 10%, y antibióticos al 1%) a 37° C y en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Para la transfección, se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 90000 células/pocillo, manteniéndose en el incubador toda la noche. Al día siguiente, se procedió con la co-transfección transitoria del vector de expresión GAL-4-PPAR γ y el vector reportero de luciferasa GAL-4-luc, mediante el uso del kit Roti®-Fect (Calrl Roth, Karlsruhe, Alemania). Tras 24 horas, las células fueron tratadas durante 6 horas con 10 y 20 µM del compuesto 1.56 y con 1 µM de rosiglitazona

como control positivo (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU), y el vehículo empleado (DMSO al 0.1% v/v). Transcurrido el tiempo de incubación con los compuestos, las células fueron lisadas por la adición de tampón de lisis (25 mM Tris-fosfato pH 7.8, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, y 7% glicerol). En el lisado obtenido se procedió a medir la actividad de la luciferasa mediante luminómetro Autolumat LB 953 (EG&G Berthold, EEUU). Los experimentos fueron repetidos tres veces y los datos fueron expresados como porcentaje de inducción con respecto al control \pm EEM.

6 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU). En cuanto a los ensayos para la caracterización farmacológica de unión a receptor y los de unión de GTP γ S, los análisis específicos han sido detallados y comentados en los respectivos apartados. Los datos obtenidos en los ensayos de funcionalidad *in vitro*, de neuroprotección, tanto de modelos *in vitro* como *in vivo*, así como los de funcionalidad para los receptores PPAR γ , fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Student-Neuman Keuls, para definir la significación entre grupos.

Resultados

Debido al potencial neuroprotector que presentan los agonistas selectivos del receptor CB₂ y la ventaja que poseen por no desencadenar efectos psicoactivos mediados por la activación del receptor CB₁ (D'Souza y cols., 2004), el objetivo de esta Tesis doctoral ha sido la caracterización farmacológica de posibles nuevos ligandos cannabinoides selectivos para el receptor CB₂, así como la determinación de su potencial neuroprotector, tanto *in vitro* como *in vivo*, dirigido a que puedan convertirse en futuros fármacos para el tratamiento de patologías con neurodegeneración.

1 Estudios de afinidad por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂

En ese proceso de caracterización farmacológica, lo primero que se hizo fue determinar la afinidad de los diferentes compuestos sintetizados por los receptores CB₂, y a la vez determinar si además, tenían afinidad o no por los receptores CB₁ con objeto de desarrollar compuestos selectivos.

Se analizaron un total de 88 compuestos, pertenecientes a cuatro familias de distinto origen químico (57 moléculas de la familia de cromenopirazoles y sus derivados, 17 pirazoles tricíclicos carboxiamidas, 10 derivados de CBG-Q y 4 derivados de CBD-Q). De los 88 compuestos, 60 mostraron un porcentaje de desplazamiento superior al 50% en el primer cribado para el receptor CB₂, mientras que para CB₁ lo hicieron 45. A los compuestos que no alcanzaron ese 50% de desplazamiento, se les predijo una K_i "superior al valor de la concentración" de compuesto utilizada para ese primer cribado (40 o 10 µM), mientras que los que sí alcanzaron el 50% de desplazamiento, pasaron a un segundo cribado que permitió conocer un valor exacto de K_i.

1.1 Cromenopirazoles y derivados

Con respecto a los compuestos de la serie 1 (Tabla 9), parece que la sustitución de la posición R1 con un hidroxilo o con distintas cadenas insaturadas no resulta favorable en lo que a la afinidad de los receptores cannabinoides se refiere (compuestos 1.1 - 1.11). Sin embargo, el sustituyente 1-ciclopentilo-1'-pentilo parece mejorar la afinidad por ambos receptores (compuestos 1.12 - 1.15). Por otro lado, el sustituyente 1,1-dimetilheptilo en esa posición parece no estar directamente relacionado con la selectividad por uno de los receptores cannabinoides, ya que en general estas moléculas presentan afinidad por alguno de estos receptores, pudiendo variar la selectividad en función de los sustituyentes que se encuentren las posiciones R2 y R3. Por este motivo se diseñaron y sintetizaron varias moléculas con el sustituyente 1,1-dimetilheptilo en posición R1, estudiando los cambios de afinidad por los receptores CB₁ y CB₂ que supone la variación de los grupos funcionales en las posiciones R2 y R3 (compuestos 1.16 - 1.52).

Por otro lado, se estudió la variación de la afinidad por los cambios en los sustituyentes en posición R2, manteniendo un hidrógeno en posición R3, es decir, compuestos que presentan un anillo fenólico simple en el núcleo tricíclico. Se observa que en aquellos compuestos que presentan pequeños alquilo en posición R2, la afinidad es claramente selectiva para CB₁ (1.16 - 1.21), mientras que en aquellos en los que R2 está representado por un grupo hidroxialquilo, la afinidad es similar para ambos receptores (1.22 - 1.24). Cuando la sustitución del anillo pirazol viene marcada por la introducción de anillos aromáticos, la afinidad cannabinoide disminuye (1.25 -

1.26), y la introducción de un grupo ciclohexilo marca un aumento de la afinidad y selectividad por el receptor CB₂ (compuesto 1.27).

El estudio del papel de R3 como modulador de la afinidad por los receptores cannabinoides indica que, en general, la pérdida del grupo fenólico libre del esqueleto tricíclico por pérdida del hidrógeno en posición R3, con la consecuente O-alkilación de los compuestos, mantiene la afinidad por el receptor CB₂, mientras que la afinidad por el receptor CB₁ disminuye o incluso se anula. Los grupos funcionales que más aumentan la afinidad y selectividad por el receptor CB₂ en la posición R3 son los grupos alquílicos, mientras que los compuestos que presentan un benceno en posición R3 ven disminuida dicha selectividad (1.28 – 1.52). En estos compuestos O-alkilados, las sustituciones en R2 también son relevantes. Se ha observado que cuando es sustituido por un hidrógeno, se mantiene una buena afinidad por ambos receptores cannabinoides (1.28, 1.35, 1.41 y 1.47); cuando el sustituyente es un N-aril, la afinidad por el receptor CB₂ disminuye de forma evidente (1.32, 1.33, 1.39, 1.40, 1.45 y 1.46); y cuando es un metilo o un etilo, la afinidad por el receptor CB₂ aumenta (1.29, 1.30, 1.31, 1.36, 1.37, 1.38, 1.42, 1.43, 1.44, 1.48 y 1.49).

Con respecto a la inserción de un anillo de pirano en la estructura cromenopirazol, obteniéndose como resultado un núcleo tetracíclico dando lugar a los piranocromenopirazoles (compuestos 1.53 y 1.54), se puede observar cómo ambas moléculas muestran cierta selectividad por el receptor CB₂, pareciendo más favorable la N-alkilación en el N1.

Por último, en la generación de cromenoisoxazoles, dada por la sustitución del anillo de pirazol por un indazol, el sustituyente que se encuentre en la posición R3 parece determinante para definir la afinidad y la selectividad por los receptores cannabinoides. Se obtuvo un compuesto altamente afín y selectivo por el receptor CB₂ al introducirse un O-metil en posición R3 (1.56), en este nuevo grupo de moléculas denominadas cromenoisoxazoles.

1.2 Pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos

Con respecto a los compuestos de la serie 2 (Tabla 10), la presencia de un grupo ciclopropilo en la posición R, parece favorecer la afinidad de este tipo de moléculas por el receptor CB₂, frente a la introducción de un ciclo de mayor tamaño (ciclohexilo). En la posición X parece beneficiosa, para aumentar la afinidad y la selectividad por el receptor CB₂, la presencia del grupo funcional CH₂, manteniendo un anillo de cinco carbonos en el núcleo tricíclico, frente a otros grupos que aumentan este tamaño, como el grupo funcional *etilo* (CH₂-CH₂) o el grupo *etileno* (CH=CH) formando un anillo de seis carbonos, insaturado en el segundo caso. Manteniendo el ciclopropilo en la posición R y el metilo en la posición X, los sustituyentes más adecuados para la posición Q resultan los grupos 1-adamantina, fenilamina y bornilamina (compuestos 2.5, 2.10 y 2.9). Se trata de moléculas con elevada afinidad (K_i = 4.5, 5.8 y 37.7 nM, respectivamente) y selectividad (> 2232, > 6944 y > 1061, respectivamente) por el receptor CB₂, seguidos de otros sustituyentes como 1-aminopiperidina, 1-aminopirrolidona, morfolin-4-amina y piperidina (compuestos 2.1, 2.11, 2.12 y 2.13, respectivamente), que presentan una afinidad más moderada y una selectividad muy reducida.

Resultados

Tabla 9. Afinidad de los compuestos de la familia de cromenopirazoles y derivados por los receptores CB₁ y CB₂, expresada como valores de K_i ± EEM. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. El valor de selectividad por el receptor CB₂ se corresponde con la ratio K_iCB₁ / K_iCB₂.

Compuesto	R1	R2	R3	K _i CB1 (nM)	K _i CB2 (nM)	Selectividad CB2
1.1	OH	N2-Me	H	>40000	>40000	-
1.2	OH	N1-Me	H	>40000	>40000	-
1.3	OH	N2-Et	H	>40000	>40000	-
1.4	OH	N1-Et	H	1420	>40000	-
1.5	OH	N1-3,4- diCIPh	H	>40000	>40000	-
1.6	OH	N1-H	H	>40000	7656 ± 901,6	> 5,2
1.7	pentilo	N2-Et	H	>40000	4450	> 9,0
1.8	pentilo	N1-Et	H	9610	>40000	-
1.9	pentilo	N1-3,4- diCIPh	H	607 ± 87	>40000	-
1.10	pentilo	N1-Me	H	4696 ± 700,9	3462 ± 597,1	-
1.11	pentilo	N2-Me	H	22100 ± 1000	>40000	-
1.12	1-ciclopentilo- 1'-pentilo	N1-2,4- diCIPh	H	345,9 ± 44,2	111 ± 10,9	3,1
1.13	1-ciclopentilo- 1'-pentilo	N2-Et	H	157,1 ± 32,6	29,1 ± 5,4	5,4
1.14	1-ciclopentilo- 1'-pentilo	N1-Et	H	32,9 ± 16,6	4,0 ± 0,5	8,2
1.15	1-ciclopentilo- 1'-pentilo	N1-3,4- diCIPh	H	>40000	744,9 ± 226,5	53,7
1.16	1,1- dimetilheptilo	H	H	28.5 ± 23.7	>40000	-
1.17	1,1- dimetilheptilo	N2-Me	H	14.2 ± 2.9	>40000	-
1.18	1,1- dimetilheptilo	N1-Et	H	4.5 ± 0.6	>40000	-
1.19	1,1- dimetilheptilo	N2-Et	H	18.6 ± 2.9	>40000	-
1.20	1,1- dimetilheptilo	N1-3,4- diCIPh	H	514 ± 205	270	1.9
1.21	1,1- dimetilheptilo	N1-2,4- diCIPh	H	5.2 ± 4.3	>40000	-
1.22	1,1- dimetilheptilo	N1- (CH ₂) ₂ OH	H	19.1 ± 8.9	366 ± 169	-
1.23	1,1- dimetilheptilo	N2- (CH ₂) ₂ OH	H	54.4 ± 8.1	39.6 ± 7.1	1.4
1.24	1,1- dimetilheptilo	N2-CH ₂ OH	H	218.1 ± 40.5	59.4 ± 31.2	3.7
1.25	1,1- dimetilheptilo	N1-3,5- diFPh	H	>40000	>40000	-
1.26	1,1- dimetilheptilo	N1-3- OMePh	H	6440 ± 655	562.0 ± 13.2	11.5
1.27	1,1- dimetilheptilo	N1-Cy	H	1140 ± 190	53.7 ± 11.8	21.5
1.28	1,1- dimetilheptilo	H	Me	272 ± 75	87.1 ± 10.6	3.1
1.29	1,1- dimetilheptilo	N2-Me	Me	4159 ± 542	66.4 ± 13.29	62.6

Resultados

Compuesto	R1	R2	R3	Ki CB1 (nM)	Ki CB2 (nM)	Selectividad CB2
1.30	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	Me	5040 ± 670	159.5 ± 31.2	31.6
1.31	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	Me	2930 ± 470	92.6 ± 17.1	31.8
1.32	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	Me	2324 ± 327	2256 ± 499	-
1.33	1,1-dimetilheptilo	N1-2,4-diCIPh	Me	1693 ± 239	1493 ± 272	1.1
1.34	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	Et	>40000	3545 ± 89	>11.3
1.35	1,1-dimetilheptilo	H	Bn	22.4 ± 4.1	93.3 ± 29.5	-
1.36	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	Bn	702.4 ± 98.6	208.8 ± 39.5	3.3
1.37	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	Bn	613.7 ± 206.9	295.9 ± 53.6	2.0
1.38	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	Bn	671.3 ± 166.1	212.2 ± 49.4	3.1
1.39	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	Bn	>40000	3740 ± 297	>10.7
1.40	1,1-dimetilheptilo	N1-2,4-diCIPh	Bn	>40000	>40000	-
1.41	1,1-dimetilheptilo	H	(CH ₂) ₃ OH	450.4 ± 9.9	26.0 ± 7.1	17.3
1.42	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	(CH ₂) ₃ OH	>40000	364.0 ± 68.9	>109.9
1.43	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	(CH ₂) ₃ OH	1613 ± 284	440 ± 145	3.6
1.44	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	(CH ₂) ₃ OH	>40000	97.4 ± 9.9	>410.7
1.45	1,1-dimetilheptilo	N1-3,4-diCIPh	(CH ₂) ₃ OH	>40000	>40000	-
1.46	1,1-dimetilheptilo	N1-2,4-diCIPh	(CH ₂) ₃ OH	>40000	>40000	-
1.47	1,1-dimetilheptilo	H	(CH ₂) ₂ OH	64.8 ± 18.0	3.6 ± 0.7	18
1.48	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	(CH ₂) ₂ OH	1086 ± 198	39.8 ± 24.9	27.2
1.49	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	(CH ₂) ₂ OH	6512 ± 714	210.6 ± 93.2	31.0
1.50	1,1-dimetilheptilo	N2-Me	(CH ₂) ₃ Br	1482 ± 221	77.3 ± 0.87	19.1
1.51	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	(CH ₂) ₃ Br	657 ± 159	87.1 ± 14.2	7.5
1.52	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	(CH ₂) ₂ Br	1331 ± 320	78.7 ± 11.3	16.9
1.53 [#]	1,1-dimetilheptilo	N1-Et	-	>10000	563.8 ± 13.1	>17.7
1.54 [#]	1,1-dimetilheptilo	N2-Et	-	>40000	121.6 ± 43.5	>330.5
1.55 [*]	1,1-dimetilheptilo	-	H	15.4 ± 12.2	5.3 ± 0.8	2.9
1.56 [*]	1,1-dimetilheptilo	-	Me	>40000	12.8 ± 2.4	>3125
1.57 [*]	1,1-dimetilheptilo	-	(CH ₂) ₃ OH	332.6 ± 143.9	65.5 ± 21.8	5.1

Tabla 10. Afinidad de los compuestos de la familia de pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos por los receptores CB₁ y CB₂, expresada como valores de K_i ± EEM. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. El valor de selectividad por el receptor CB₂ se corresponde con la ratio K_iCB₁ / K_iCB₂.

Compuesto	R	X	Q	K _i CB1 (nM)	K _i CB2 (nM)	Selectividad CB2
2.1	ciclopropilo	CH ₂	1-aminopiperidina	1852±474.3	69.4 ± 2.8	26.7
2.2	ciclopropilo	CH ₂ -CH ₂	1-aminopiperidina	> 40000	143.1 ± 34.2	>279.6
2.3	ciclopropilo	CH=CH	1-aminopiperidina	> 40000	825.3 ± 451.3	>48.5
2.4	ciclohexilo	CH ₂	1-aminopiperidina	> 10000	509.1 ± 89.2	>19.6
2.5	ciclopropilo	CH ₂	fenilamina	> 40000	5.8 ± 1.5	>6944
2.6	ciclopropilo	CH ₂ -CH ₂	fenilamina	> 40000	5517 ± 216.8	>7.25
2.7	ciclopropilo	CH=CH	fenilamina	> 40000	> 40000	-
2.8	ciclohexilo	CH ₂	fenilamina	> 10000	> 10000	-
2.9	ciclopropilo	CH ₂	bornilamina	> 40000	37.7 ± 9.6	>1061
2.10	ciclopropilo	CH ₂	1-adamantilamina	> 10000	4.5 ± 0.7	>2232
2.11	ciclopropilo	CH ₂	1-aminopirrolidina	4211±645.5	152.1 ± 27.2	27.7
2.12	ciclopropilo	CH ₂	morfolin-4-amina	4033±2978	197.9 ± 37.3	20.4
2.13	ciclopropilo	CH ₂	piperidina	> 10000	413.7 ± 66.7	>24.2
2.14	ciclopropilo	CH ₂ -CH ₂	mirtanilamina	> 10000	>10000	-
2.15	ciclopropilo	CH=CH	1-aminopirrolidina	> 40000	> 40000	-
2.16	ciclopropilo	CH=CH	piperidina	> 40000	> 40000	-
2.17	ciclohexilo	CH ₂	1-aminopirrolidina	> 10000	515.1 ± 44.8	>19.4

1.3 Quinonas de fitocannabinoides

Con respecto a los derivados de quinonas de fitocannabinoides, ninguno de los compuestos de la serie 3 (quinonas de CBG, ver Tabla 11), presenta afinidad ni selectividad por el receptor CB₂. La afinidad por el receptor CB₁ de los compuestos 3.5 - 3.9 no fue evaluada, dado que dichos compuestos no mostraron afinidad por el receptor CB₂, que era el objetivo de este estudio. Los compuestos de la serie 4 (quinonas de CBD, ver Tabla 12) sí presentaron cierta afinidad y selectividad por el receptor CB₂ con respecto a CB₁, especialmente notable en los compuestos 4.3 y 4.4. Parece claro el papel de la bencilamina para aumentar la selectividad por el receptor CB₂, aunque en general, en este grupo de compuestos, la afinidad por el receptor CB₁ es muy baja o prácticamente nula.

Tabla 11. Afinidad de los compuestos de la familia de CBG-Q por los receptores CB₁ y CB₂, expresada como valores de K_i ± EEM. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. El valor de selectividad por el receptor CB₂ se corresponde con la ratio K_iCB₁ / K_iCB₂.

Compuesto	R	K _i CB1 (nM)	K _i CB2 (nM)	Selectividad CB2
3.1	-	> 40000	1759 ± 649	22,7
3.2	Etilamina	>40000	>40000	-
3.3	Pentanamina	>40000	22490 ± 7841	1,8
3.4	3-metil-butanamina	>40000	7435 ± 1123	5,4
3.5	Butanamina	-	>4000	-
3.6	Isopropilamina	-	>4000	-
3.7	Fenilmetanamina	-	>4000	-
3.8	2,2-dimetil-propilamina	-	>4000	-
3.9	3-metil-butilamina	-	>4000	-
3.10	Cannabigerol hidroxiquinona	>40000	36600 ± 15000	-

Tabla 12. Afinidad de los compuestos de la familia de CBD-Q por los receptores CB₁ y CB₂, expresada como valores de K_i ± EEM. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. El valor de selectividad por el receptor CB₂ se corresponde con la ratio K_iCB₁ / K_iCB₂.

Compuesto	R	K _i CB1 (nM)	K _i CB2 (nM)	Selectividad CB2
4.1	Pentanamina	2750 ± 811,2	213,8 ± 55,3	12,7
4.2	Butanamina	1686 ± 487,1	421,7 ± 232,9	4
4.3	Bencilamina	>40000	169,7 ± 46,4	235,7
4.4	3-metil-butanamina	5281 ± 718,2	129,3 ± 7,6	40,8

1.4 Selección de los compuestos para continuar con la caracterización farmacológica

Dado que uno de los principales objetivos de este trabajo se basa en la obtención de nuevos ligandos cannabinoides selectivos para el receptor CB₂, se seleccionaron aquellas moléculas que presentaban un valor de K_i inferior a 50 nM (rango de afinidad para cannabinoides de referencia, ver Tabla 13) y al menos 20 veces menor para el receptor CB₂ que para el receptor CB₁.

Atendiendo a estos criterios, los compuestos seleccionados fueron: 1.48, 1.56, 2.5, 2.9 y 2.10, con valores de K_i (39.8, 12.8, 5.8, 37.7 y 4.5) y selectividad (27.2, > 3125, > 6944, > 1061, > 2232) para el receptor CB₂, respectivamente (Ver Tablas 9 y 10).

Tabla 13. Afinidad de los ligandos cannabinoides de referencia HU-308 y WIN55,212-2 por los receptores CB₁ y CB₂, expresada como valores de K_i ± EEM. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. El valor de selectividad por el receptor CB₂ se corresponde con la ratio K_i CB₁ / K_i CB₂. ND: valor de K_i para el receptor CB₁ del compuesto HU-308 no determinado por su conocida selectividad por el receptor CB₂, descrita por Hanus y cols. (1999).

Compuesto	K _i CB ₁ (nM)	K _i CB ₂ (nM)	Selectividad CB ₂
HU-308	ND	11.23 ± 0.78	-
WIN55,212-2	28.8 ± 4.1	3.7 ± 0.12	7.8

2 Predicción de propiedades farmacocinéticas en un modelo *in silico*

La evaluación farmacológica de un nuevo compuesto no sólo se basa en demostrar su alta afinidad y/o efecto sobre un determinado receptor, ya que en ocasiones, la ausencia de propiedades adecuadas de ADMET complica un prometedor perfil farmacodinámico obtenido generalmente en estudios realizados *in vitro*. Es por ello que la predicción de las propiedades ADMET mediante modelos *in silico* de estas propiedades resulta de gran interés en el desarrollo de posibles nuevos fármacos. Por esta razón, tras el estudio de la afinidad por los receptores CB₁ y CB₂, se llevó a cabo un análisis de ciertas propiedades farmacocinéticas de los compuestos seleccionados, así como de los ligandos cannabinoides de referencia JWH-133, HU-308, y SR144528, mediante el uso del programa QikProp integrado en el software Maestro. Este programa calcula 34 descriptores fisicoquímicos basados en el confórmero de mínima energía de cada molécula, de los cuales fueron seleccionados siete parámetros considerados relevantes en el estudio de fármacos cannabinoides relacionados con la solubilidad, la capacidad para atravesar la BHE, la probabilidad de ser absorbidos por vía oral, la capacidad de interaccionar con la albúmina para predecir su distribución en el organismo, así como la capacidad de bloquear canales de potasio HERG, para predecir posible toxicidad, tal y como se muestra en la Tabla 14.

En esa tabla se muestran en primer lugar dos parámetros directamente relacionados con la solubilidad de los compuestos, como QPLogP_{o/w} y QPLogS. Atendiendo al parámetro QPLogP_{o/w} se puede observar que tan sólo los dos derivados de la serie 1 y el HU-308 se encuentran dentro del rango del 95% de los fármacos, mientras que el resto de las moléculas analizadas no lo están. Con respecto a la predicción de QPLogS, tan sólo las moléculas 1.48 y 1.56, de la familia de cromenopirazoles y derivados, se encuentran en dicho rango. Los compuestos 2.5, 2.9 y 2.10 (de la familia de pirazoles tricíclicos), así como los controles selectivos para el receptor CB₂ (JWH-133, HU308 y SR144528) muestran una solubilidad mucho menor y fuera del rango.

Los descriptoresQPlogBB y QPPMDCK están relacionados con la capacidad de atravesar la BHE; el QPlogBB representa el coeficiente de partición cerebro/sangre y el QPPMDCK la permeabilidad de los compuestos en la línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby (MDCK), cuyas propiedades morfológicas son similares a las de las células endoteliales vasculares que constituyen la BHE, convirtiéndolas en el modelo *in vitro* más representativo de la BHE (Navarro y cols., 2011). La permeabilidad de los cannabinoides analizados, expresada como el logaritmo del coeficiente de partición cerebro/sangre (QPlogBB), es moderadamente baja, especialmente para los pirazoles tricíclicos, así como para el control SR144528, aunque al encontrarse dentro del rango del 95% de los fármacos de la librería es predecible que tengan la capacidad para atravesar la barrera. Atendiendo al segundo descriptor que estudia esta capacidad (QPPMDCK), todos los compuestos muestran un valor que predice una excelente capacidad para atravesar la BHE. Por lo tanto, se podría considerar que, *a priori*, todos los compuestos analizados presentan la capacidad de atravesar la BHE y alcanzar el parénquima cerebral donde serían necesarios con el objetivo de preservar las neuronas afectadas en procesos neurodegenerativos.

Tabla 14. Descriptores fisicoquímicos calculados mediante QikProp 3.5 integrado en Maestro (Schrödinger, LLC, Nueva York, USA) de los compuestos 1.48, 1.56, 2.5, 2.9, 2.10, así como de los agonistas selectivos del receptor CB₂ JWH-133 y HU308 y del agonista inverso selectivo para dicho receptor, SR144528, usados como compuestos de referencia. La tabla indica del valor definido para cada molécula en cada propiedad estudiada.

Comp.	QLogP _{o/w} ^a	QLogS ^b	QLogBB ^c	QPPMDCK ^d	QPPCaco ^e	Absorción oral humana (%) ^f	QLogK _{HSA} ^g	QLogHERG ^h
1.48	5.86	-6.13	-0.19	4123	7112	100	0.99	-5.08
1.56	4.91	-5.31	-0.15	2517	4505	100	0.81	-4.77
2.5	7.23	-9.24	0.11	2835	5029	100	1.89	-6.32
2.9	7.19	-9.2	0.02	2317	4172	100	1.9	-6.27
2.10	7.20	-9.21	0.02	2564	4562	100	1.89	-6.3
JWH-133	7.00	-9.04	-0.93	5899	3738	100	1.6	-4.60
HU-308	5.56	-8.06	-0.52	2058	9906	100	1.62	-5.17
SR144528	7.61	-9.07	0.11	5587	4606	100	1.91	-5.77

a= predicción del coeficiente de partición octano/agua [-2.0 / 6.5]

b= predicción de solubilidad acuosa [-6.5 / 0.5]

c= predicción del logaritmo del coeficiente de partición cerebro/sangre [-3.0 / 1.2]

d= permeabilidad estimada para la línea celular MDCK [<25 baja, >500 excelente]

e= permeabilidad estimada para la línea celular Caco-2 [<25 baja, >500 excelente]

f= absorción intestinal en humanos (%) tras la administración oral del compuesto [<25% baja, >80% alta]

g= logaritmo de la constante de asociación a albúmina de suero humano [-1,5/1,5]

h= predicción del valor de logIC₅₀ relacionado con el bloqueo de canales de potasio HERG [> -5]

El rango de cada parámetro se corresponde con el del 95% de los fármacos que conforman la librería utilizada.

Los descriptores QPPCaco y absorción oral humana (%) estudian la capacidad que presentan las moléculas analizadas para ser absorbidas en el tracto gastrointestinal tras ser administrados por vía oral. El descriptor QPPCaco muestra la permeabilidad estimada que presentan los compuestos sobre la línea celular Caco-2, que ha sido utilizada tradicionalmente como modelo *in vitro* de absorción intestinal, debido a que su comportamiento en monocapa confluyente es similar al de los enterocitos del intestino delgado (Meunier y cols., 1995), y el descriptor de absorción oral humana predice la capacidad de absorción intestinal en humanos, basándose en propiedades fisicoquímicas de la molécula. Atendiendo a los resultados obtenidos con ambos parámetros (Tabla 14) se puede predecir una absorción intestinal excelente de todos los compuestos analizados.

El descriptor QLogK_{HSA} indica la capacidad que presentan los compuestos de asociación a HSA. La distribución de los compuestos en el organismo y su vida media están estrechamente relacionadas con su capacidad de unión a proteínas plasmáticas. La albúmina es la proteína más abundante en sangre y su función principal consiste en el transporte de moléculas estableciendo interacciones reversibles de naturaleza hidrofóbica y de tipo electrostático con moléculas lipofílicas, como los ácidos grasos (Hamilton y cols., 1991). Atendiendo a este parámetro, tan sólo los compuestos 1.48 y 1.56 se encuentran dentro del rango del 95% de los fármacos de la librería, siendo algo menor el valor del compuesto 1.56. Los demás compuestos (2.5, 2.9, 2.10 y los compuestos controles) sobrepasan dicho rango mostrando un valor muy elevado (Tabla 14), lo que significaría que tan sólo los compuestos 1.48 y 1.56 mostrarían una predicción de interacción con esta proteína plasmática adecuada, permitiendo su transporte por el organismo, pero a su vez no

estableciendo una unión excesivamente elevada que pudiera impedir su disociación al llegar a su diana.

Finalmente, el último descriptor de la Tabla 14 (QPlogHERG), muestra el valor predictivo de IC₅₀ para el bloqueo de canales de potasio HERG. Estos canales están involucrados en la repolarización cardíaca y su bloqueo está relacionado con el síndrome “Q-T largo” (Raschi y cols., 2009). Atendiendo a los valores obtenidos para este parámetro, tan sólo los compuestos 1.56 y JHW-133 presentaron valores dentro del rango del 95% de los fármacos de la librería, pareciendo aptos para el uso clínico. Los demás compuestos muestran valores demasiado bajos, pudiendo resultar tóxicos al presentar mayor capacidad de bloquear los receptores HERG (Tabla 14).

A la vista de estos resultados, la molécula 1.56 presenta una predicción de propiedades farmacocinéticas relevantes en el contexto del estudio de este trabajo. Es el más favorable de todos los compuestos analizados, más incluso que los cannabinoides de referencia, incluidos como controles.

3 Estudios de funcionalidad del receptor CB₂

Para evaluar el efecto que ejercen sobre el receptor CB₂ las moléculas seleccionadas por los resultados de los estudios de afinidad (1.48, 1.56, 2.5, 2.9, 2.10) se llevaron a cabo dos tipos de análisis: por un lado, ensayos de unión de GTPγS, que permiten determinar la actividad funcional de los compuestos sobre el receptor de estudio (en nuestro caso, el receptor CB₂), así como calcular los valores de EC₅₀/IC₅₀ y E_{max}; y, en segundo lugar, ensayos biológicos *in vitro* con cultivos de una línea celular de microglía, que permiten observar el efecto que ejercen estos compuestos sobre una determinada respuesta biológica mediada por el receptor CB₂, en nuestro caso, la liberación de PGE-2, que puede ser relevante para su acción neuroprotectora.

3.1 Ensayos de unión de GTPγS

Mediante estos ensayos se estudió el efecto agonista/antagonista/agonista inverso de las moléculas seleccionadas, en relación al receptor CB₂. Se puede observar tanto en los perfiles representativos mostrados en la Figura 25 como en los valores obtenidos de EC₅₀/IC₅₀ en la Figura 26, que el compuesto 1.48 se comporta como un agonista parcial sobre el receptor CB₂, con un valor de EC₅₀ de 50.04 μM; los compuestos 2.5, 2.9 y 2.10 actúan como agonistas inversos de dicho receptor, con valores de IC₅₀ de 80.4, 18.3 y 50.7 nM, respectivamente; mientras que el compuesto 1.56, es un claro y potente agonista del receptor CB₂, con un valor de EC₅₀ de 38.7 nM. Atendiendo al E_{max} de los compuestos analizados, se puede observar que 2.5, 2.9 y 2.10, presentan un E_{max} en torno a 4 veces inferior al del agonista inverso de referencia SR144528 (Figura 26B), mientras que los compuestos 1.48 y 1.56, muestran un E_{max} del orden de 1.2 y 1.5 veces superior al agonista de referencia evaluado HU-308, respectivamente (Figura 26A).

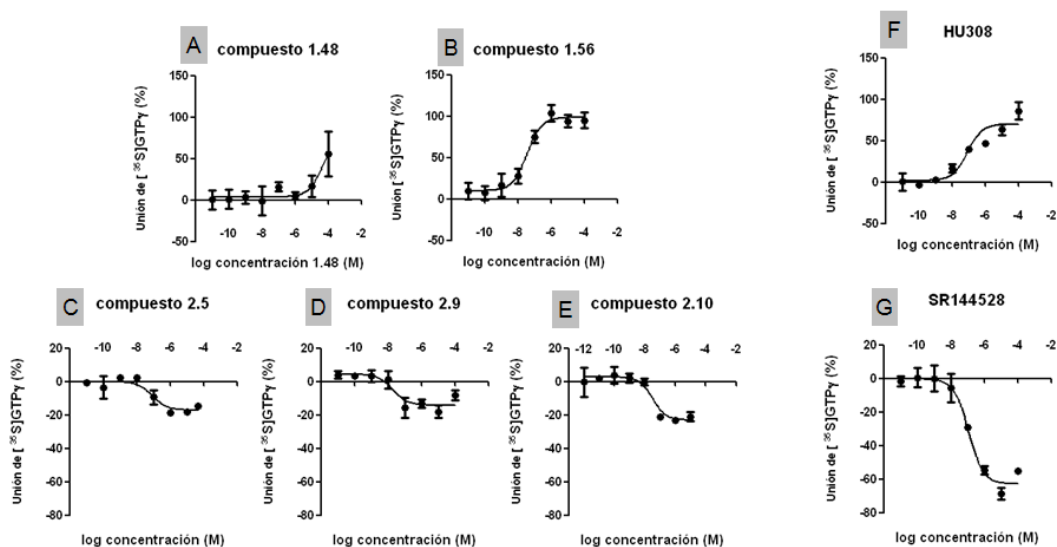


Figura 25. Curvas representativas de los compuestos 1.48, 1.56, 2.5, 2.9, 2.10 y de los controles HU308 y SR144528 generadas mediante en el ensayo de unión de GTP γ S.

A			B		
Compuesto	EC50 (nM)	E _{max} (%)	Compuesto	IC50 (nM)	E _{max} (%)
1.48	50035 ± 12186	84,6 ± 35,3	2.5	80,4 ± 17,0	-15,8 ± 2,2
1.56	38,7 ± 6,7	98,3 ± 8,5	2.9	18,3 ± 8,8	-15,2 ± 3,3
HU308	69,4 ± 14,2	69,4 ± 11,5	2.10	50,7 ± 19,2	-18,5 ± 1,6
			SR144528	96,2 ± 1,4	-63,2 ± 3,1

Figura 26. Valores de EC50 (A) o IC50 (B) ± EEM (nM) y E_{max} ± EEM (%) (A y B) de al menos 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado sobre el receptor CB₂ de los compuestos con perfil agonista 1.48, 1.56 y HU-308 (A) y con perfil de agonista inverso 2.5, 2.9, 2.10 y SR144528 (B).

3.2 Actividad biológica en células de microglía en cultivo

Junto con los ensayos de unión de GTP γ S, también se llevaron a cabo otros estudios de funcionalidad basados en el análisis de la capacidad de los compuestos seleccionados (1.48, 1.56, 2.5, 2.9, 2.10) a la dosis de 10 veces el valor de su K_i (398, 126, 58, 377 y 45 nM, respectivamente) de reducir la respuesta inflamatoria inducida por la estimulación de cultivos de células de microglía (usando la línea celular BV-2) con LPS. Para ello, se cuantificó el efecto de los compuestos sobre la liberación de PGE-2 por estas células. Se seleccionó esta línea celular para este ensayo biológico porque se usa frecuentemente para el estudio de la función microglial (Blasi y cols., 1990) y también por su conocida expresión de receptores CB₂ (Atwood y cols., 2011), los cuales cuando son activados inducen una clara disminución de la respuesta proinflamatoria, incluyendo la reducción de PGE-2 (Oh y cols., 2010).

Para verificar la validez del ensayo, se analizó el comportamiento del ligando agonista no selectivo WIN55,212-2 y del antagonista del receptor CB₂ SR144528. Como puede observarse en la Figura 27, tras añadir LPS a las células BV-2, los niveles de liberación de PGE-2 aumentan con respecto

al grupo control ($p < 0.01$), la adición del agonista frente a este estímulo disminuye la liberación de PGE-2 ($p < 0.05$), mientras que el agonista inverso SR144528 revierte el efecto provocado por WIN55,212-2, aumentando los niveles de la liberación de la prostaglandina ($p < 0.005$), incluso por encima del valor basal generado por la adición de LPS, posiblemente debido a su naturaleza como agonista inverso. Que el efecto de WIN55,212-2 sea revertido por SR144528 confirma la hipótesis de que esta respuesta es mediada por la activación del receptor CB₂.

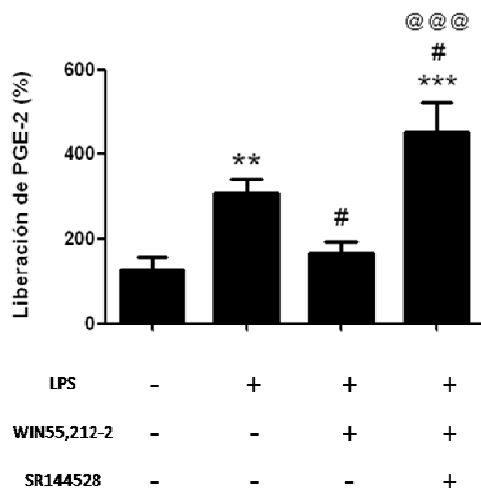


Fig. 27. Efecto de los ligandos WIN55,212-2 y SR144528 en el ensayo biológico de liberación de PGE-2 por las células de microglía BV-2 estimuladas con LPS. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. (**= $p < 0.01$ vs. control, ***= $p < 0.005$ vs. control, #= $p < 0.05$ vs. LPS, @@@= $p < 0.001$ vs. LPS + WIN55,212-2).

A continuación se procedió a analizar la respuesta de los compuestos seleccionados. Para ello se estudió su efecto sobre los niveles de PGE-2 en el medio de cultivo tras ser añadidos a las células BV-2 estimuladas con LPS. Además se añadieron grupos en los que los compuestos se co-incubaron con WIN55,212-2 o con SR144528 para poder determinar su perfil farmacológico. En el caso de las moléculas seleccionadas de la serie de cromenopirazoles y derivados, el compuesto 1.48, a la dosis de 398 nM, no disminuye la liberación de PGE-2 con respecto a las células estimuladas con LPS (Figura 28B) pero revierte de manera significativa ($p < 0.05$) el efecto producido por WIN55,212-2 (Figura 28A), lo que sugiere un comportamiento antagonista para esta molécula, un resultado semejante al obtenido en el ensayo de unión de GTPγS, ya que los agonistas parciales, cuando son combinados con agonistas, pueden comportarse como antagonistas, al competir ambos por la misma diana, aunque se comentará más adelante en la discusión. A la dosis de 126 nM, el compuesto 1.56 tampoco parece reducir la liberación de PGE-2 (Figura 28D), pero no revierte el efecto agonista del WIN55,212-2 (Figura 28C), por lo que, para este compuesto, este ensayo no permitió confirmar el perfil agonista observado en el ensayo de unión de GTPγS, posiblemente debido a una concentración de compuesto insuficiente, como se comentará en el apartado de discusión.

Con respecto a los compuestos de la serie 2, el compuesto 2.5 a la dosis de 58 nM no revierte la liberación de PGE-2 (Figura 29B), pero sí el efecto del WIN55,212-2 ($p < 0.05$) (Figura 29A), lo que determina un efecto antagonista para este compuesto, coincidiendo con los datos del ensayo de unión de GTP γ S. En el caso de los compuestos 2.9 y 2.10, ninguno de ellos revierte el efecto del LPS (Figura 29D y 29F), aunque tampoco el efecto del agonista WIN55,212-2 (Figura 29C y 29E), al menos no de manera estadísticamente significativa. Es cierto que parece haber una tendencia a esa reversión, lo que coincide con los datos obtenidos mediante el ensayo de unión de GTP γ S, pero no hay significación estadística que lo confirme definitivamente.

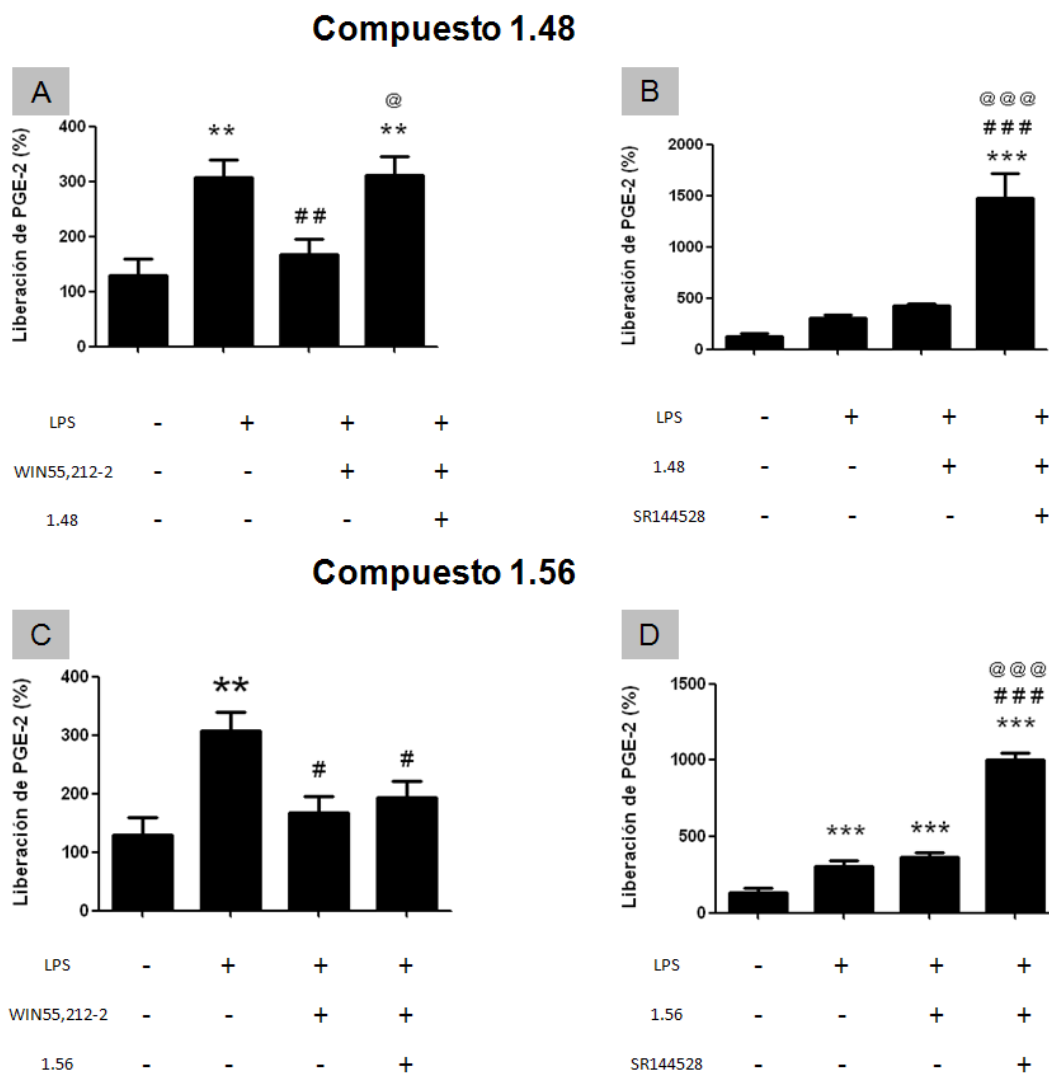


Figura 28. Efectos de los compuestos 1.48 y 1.56, combinados con o sin WIN55,212-2 o SR144528 en el ensayo biológico de liberación de PGE-2 por las células de microglía BV-2 estimuladas con LPS. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. (A) Compuesto 1.48 + WIN55,212-2 (**= $p < 0.01$ vs. control, ###= $p < 0.01$ vs. LPS, @= $p < 0.05$ vs. LPS + WIN55,212-2). (B) Compuesto 1.48 y compuesto 1.48 + SR144528 (**= $p < 0.005$ vs. control, ###= $p < 0.005$ vs. LPS, @@@= $p < 0.001$ vs. LPS + 1.48). (C) Compuesto 1.56 + WIN55,212-2 (**= $p < 0.01$ vs. control, #= $p < 0.05$ vs. LPS). (D) Compuesto 1.56 y compuesto 1.56 + SR144528 (**= $p < 0.005$ vs. control, ###= $p < 0.005$ vs. LPS, @@@= $p < 0.001$ vs. LPS + 1.56).

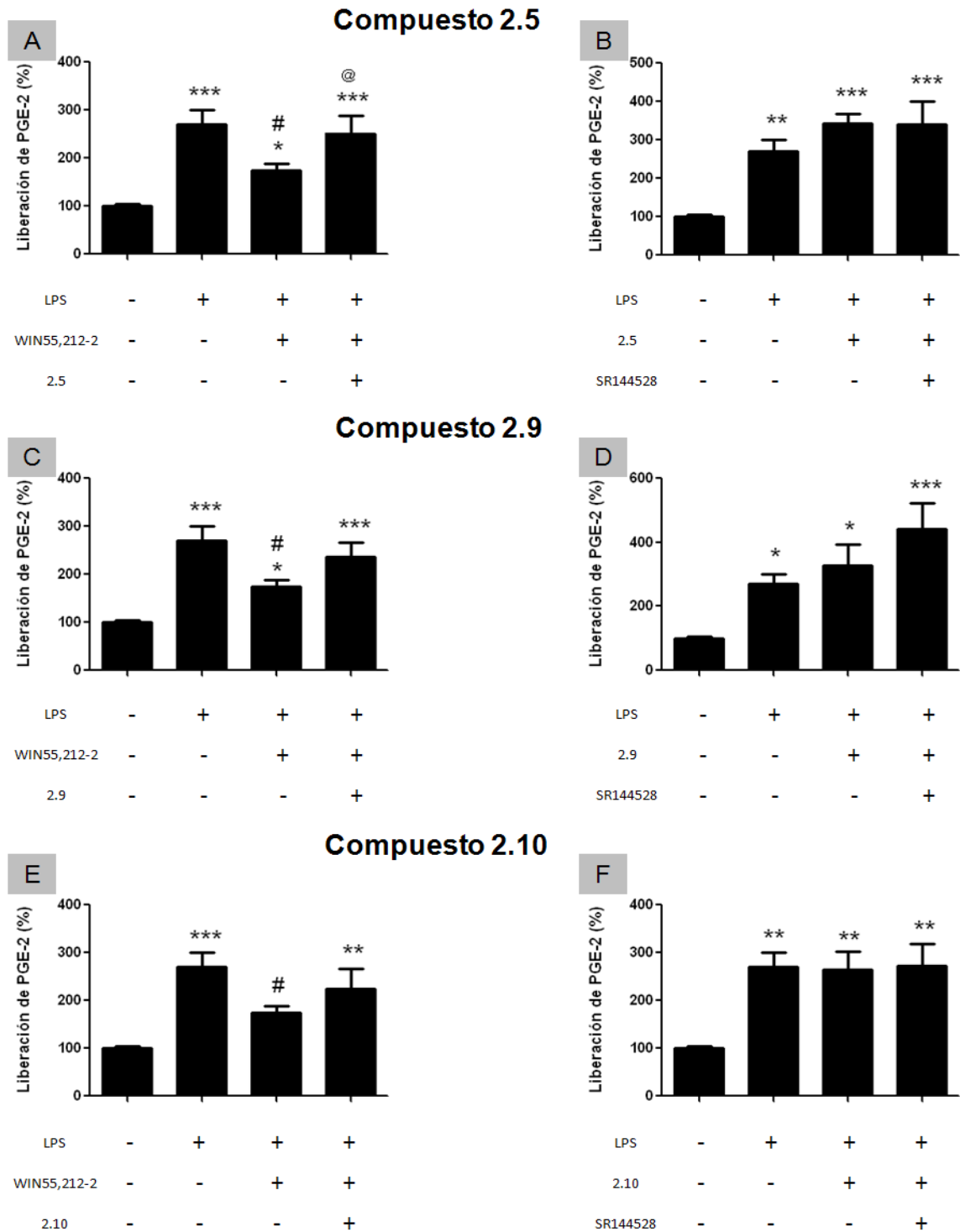


Figura 29. Liberación de PGE-2 por las células BV-2 estimuladas con LPS en presencia de los compuestos 2.5, 2.9 y 2.10, combinados o no con WIN55,212-2 o SR144528. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

(A) Compuesto 2.5 + WIN55,212-2 (*= $p < 0.05$ vs. control, ***= $p < 0.005$ vs. control, #= $p < 0.05$ vs. LPS, @= $p < 0.05$ vs. LPS + WIN55,212-2).

(B) Compuesto 2.5 y compuesto 2.5 + SR144528 (**= $p < 0.01$ vs. control, ***= $p < 0.005$ vs. control).

(C) Compuesto 2.9 + WIN55,212-2 (*= $p < 0.05$ vs. control, ***= $p < 0.005$ vs. control, #= $p < 0.05$ vs. LPS).

(D) Compuesto 2.9 y compuesto 2.9 + SR144528 (*= $p < 0.05$ vs. control, ***= $p < 0.005$ vs. control).

(E) Compuesto 2.10 + WIN55,212-2 (**= $p < 0.01$ vs. control, ***= $p < 0.005$ vs. control, #= $p < 0.05$ vs. LPS).

(F) Compuesto 2.9 y compuesto 2.9 + SR144528 (**= $p < 0.01$ vs. control).

Atendiendo a los efectos estudiados para determinar la funcionalidad de los compuestos 1.48, 1.56, 2.5, 2.9 y 2.10, se seleccionó el compuesto 1.56 para las siguientes fases del estudio, que tienen como objetivo investigar propiedades neuroprotectoras en los compuestos seleccionados, por ser el único en presentar un claro efecto de agonista para el receptor CB₂, determinado mediante el ensayo de unión de GTPγS.

4 Evaluación del papel neuroprotector del compuesto 1.56

A partir de los datos que demostraban que el compuesto 1.56 se comporta como un agonista selectivo y potente del receptor CB₂ y presenta una predicción de propiedades farmacocinéticas bastante favorable, se eligieron dos modelos para la evaluación del potencial neuroprotector de este compuesto, mediada por la activación del receptor CB₂ y la modulación de procesos inflamatorios.

4.1 Efecto neuroprotector del compuesto 1.56 en un modelo *in vitro*

En el modelo *in vitro*, el procedimiento fue estimular las células BV-2 con LPS para generar medios condicionados que, al ser transferidos a los cultivos de células M213-2O reducían significativamente su viabilidad, y determinar cómo el compuesto 1.56 era capaz de inhibir ese proceso activando el receptor CB₂, localizado en las células de microglía. Para ello, en primer lugar, se procedió a demostrar que el medio de crecimiento de las BV-2 sólo afectaba a la viabilidad de las células M213-2O cuando las células BV-2 eran estimuladas por LPS (reducción de la viabilidad neuronal en torno al 40%, $p < 0.05$), pero esto no sucedía en ausencia de LPS. (Figura 30).

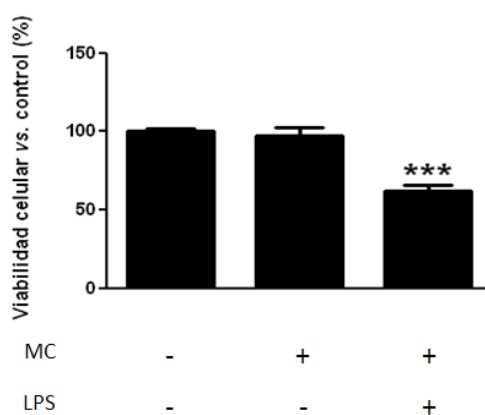


Figura 30. Determinación de la viabilidad en las células M213-2O expuestas a medio condicionado (MC) generado por las células BV-2, estimuladas o no por LPS. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. (***) = $p < 0.005$ vs. control).

A continuación, se llevó a cabo un estudio comparativo del efecto del LPS sobre la viabilidad de las células M213-2O en función del cultivo celular al que se añade esta toxina inflamatoria. Como se observa en la Figura 31, la viabilidad no se veía afectada por la adición directa del LPS sobre las células M213-2O, respecto al grupo control, mientras que sí se veía disminuida cuando el LPS se añadía al cultivo de células de microglía y los medios generados por estas células eran transferidos al cultivo neuronal ($p < 0.005$, Figura 31).

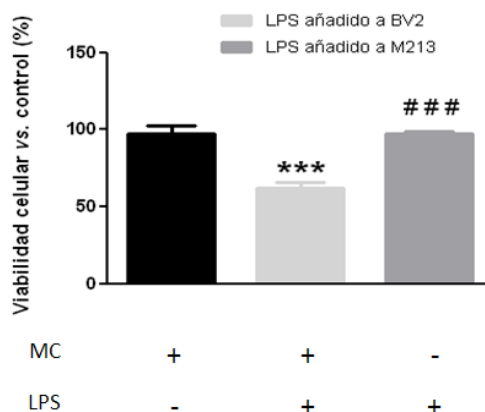


Figura 31. Efecto del LPS sobre la viabilidad de las células M213-2O tras ser añadido directamente sobre las neuronas, o a través de los medios condicionados generados por las células BV-2. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. (***= $p < 0.005$ vs. MC – LPS, ###= $p < 0.005$ vs MC + LPS).

4.1.1 Efecto protector del compuesto 1.56 dependiente de concentración

Una vez comprobado que la toxicidad del LPS sobre las neuronas se alcanza a través de la estimulación de las células microgliales con esa toxina y no a través de su acción directa sobre las propias neuronas, se pasó a investigar la capacidad protectora del compuesto 1.56 en este modelo. Para ello se añadió el compuesto a tres concentraciones distintas (0.1, 1 y 10 μM) sobre las células BV-2 estimuladas con LPS, y se observó una recuperación de la viabilidad neuronal dependiente de la concentración. Como se puede observar en la Figura 32, la recuperación de la viabilidad de las neuronas fue total ($p < 0.005$) a la concentración más alta de 1.56 (10 μM).

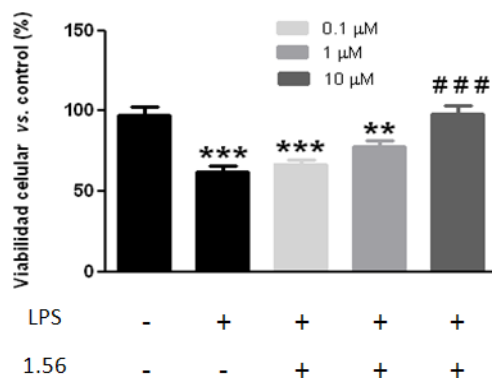


Figura 32. Viabilidad de las células M213-2O expuestas a medios condicionados generados por células BV-2 estimuladas con LPS, en presencia o ausencia de distintas concentraciones del compuesto 1.56. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. (**= $p < 0.01$ vs. MC – LPS, ***= $p < 0.005$ vs. MC – LPS, ###= $p < 0.005$ vs MC + LPS).

En este experimento también se realizaron algunos controles necesarios como añadir el compuesto 1.56 directamente sobre las células M213-2O tratadas con medio condicionado, en lugar de hacerlo como en los datos de la Figura 32, sobre las células BV-2. En el caso de la adición directa sobre las neuronas, no se observó recuperación de la viabilidad ($p < 0.005$), confirmando que el efecto neuroprotector del 1.56 tendría que ver con la activación de los receptores CB₂ microgliales. (Figura 33), receptores que no están descritos en las neuronas M213-2O (Pazos, 2010).

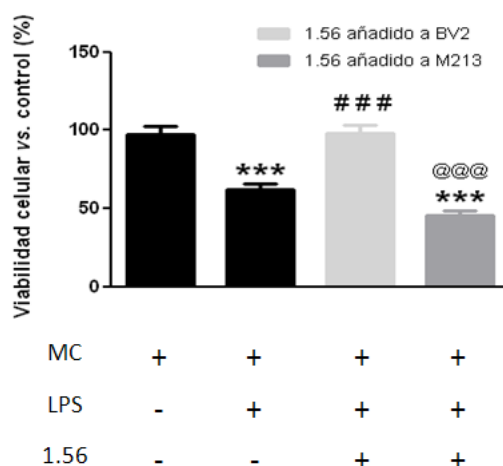


Figura 33. Efecto del compuesto 1.56 sobre la viabilidad de las células M213-2O tras ser añadido directamente sobre las neuronas, o sobre las células BV-2 para generar medios condicionados. Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. (***)= $p < 0.005$ vs. MC – LPS, ###= $p < 0.005$ vs MC + LPS, @@@= $p < 0.005$ vs MC + LPS + 1.56)

4.1.2 Implicación del receptor CB₂ en el efecto neuroprotector del compuesto 1.56

Para demostrar que el efecto del compuesto 1.56 tiene lugar a través de la activación de los receptores CB₂ se llevó a cabo un nuevo experimento utilizando un antagonista específico de este receptor, el SR144528. Como se observa en la Figura 34, el efecto de recuperación de la viabilidad de las células M213-2O llevado a cabo por el compuesto 1.56 ($p < 0.005$) fue revertido cuando se añadió SR144528 ($p < 0.005$). Como control en este experimento se estudió el comportamiento del SR144528 en ausencia de 1.56, y como se puede ver en la figura 34, este antagonista no tuvo efectos sobre la viabilidad neuronal *per se*.

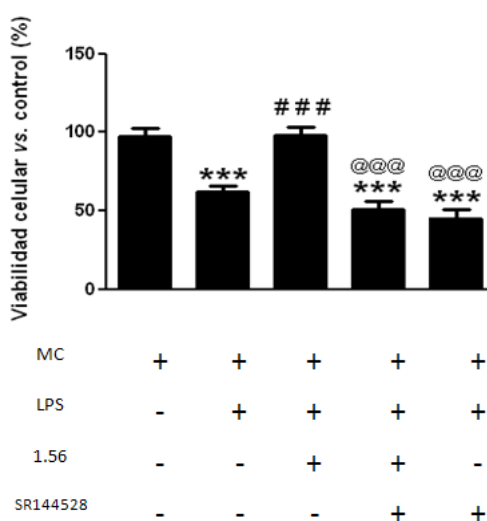


Figura 34. Efectos sobre la viabilidad de las células M213-2O expuestas a medio condicionado generado por células BV-2 estimuladas con LPS, en presencia o ausencia del compuesto 1.56 (10 μ M), sólo o combinado con SR144528 (10 μ M). Los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. (***) = $p < 0.005$ vs. MC – LPS, (###) = $p < 0.005$ vs MC + LPS, (@@@) = $p < 0.005$ vs MC + LPS + 1.56).

4.2 Efecto neuroprotector del compuesto 1.56 en un modelo *in vivo*

Como ya se ha comentado anteriormente, los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* han puesto el énfasis en el perfil antiinflamatorio del compuesto 1.56, ejercido a través de la activación del receptor CB₂, del que derivarían sus propiedades neuroprotectoras. Por ese motivo, a la hora de seleccionar un modelo *in vivo* de daño neuronal, se buscó enfatizar de nuevo en modelos en los que el daño tenga una relación directa con procesos inflamatorios y dependientes de activación glial. Se eligió un modelo de daño del estriado por la inyección local de la toxina mitocondrial malonato. Se sabe que este modelo conduce a la apoptosis de las neuronas estriatales asociada a una intensa gliosis reactiva e inflamación (Toulmond y cols., 2004; Sagredo y cols., 2009). Además, en este modelo ya se había descrito que los agonistas del receptor CB₂ tenían efectos neuroprotectores reduciendo tanto la respuesta apoptótica como la inflamatoria (Sagredo y cols.,

2009; Valdeolivas y cols., 2012). Por lo tanto, el modelo de lesión estriatal con malonato parecía idóneo para la evaluación *in vivo* del potencial neuroprotector del compuesto 1.56.

4.2.1 Determinación de la dosis efectiva

En primer lugar, se procedió a determinar qué dosis del compuesto podría ser más efectiva en este modelo de estudio. En base a la información disponible sobre las dosis habituales de cannabinoides empleadas en modelos de neuroprotección *in vivo*, se procedió a evaluar el efecto de tres dosis: 0.1, 1 y 10 mg/kg. Como primera aproximación, se cuantificó el volumen de lesión mediante análisis por RMN y se observó una reducción dependiente de dosis del edema causado por la lesión, siendo estadísticamente significativa a las dosis de 1 ($p < 0.01$) y 10 mg/kg ($p < 0.05$) (Figura 35).

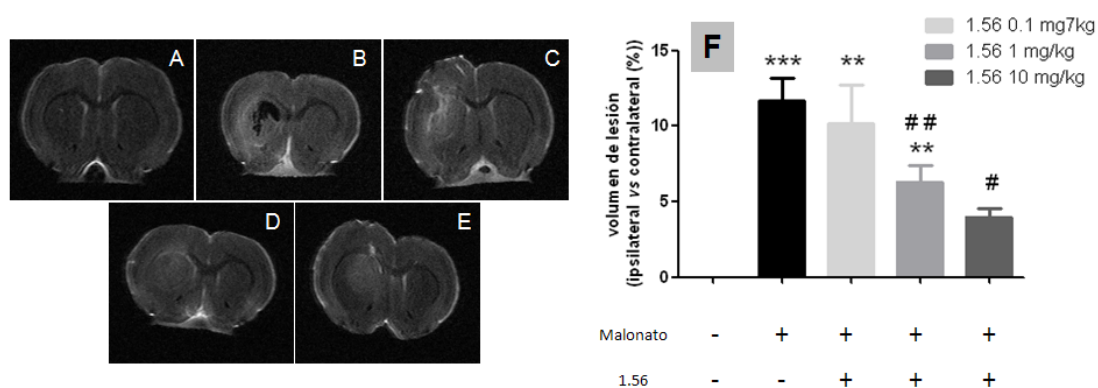


Figura 35. Determinación del volumen de edema causado por la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (0.1, 1 y 10 mg/kg). Las figuras A-E son imágenes representativas de la lesión estriatal analizadas por RMN: (A): sham, (B): malonato, (C): malonato + 1.56 (0.1 mg/kg), (D): malonato + 1.56 (1 mg/kg), (E): malonato + 1.56 (10 mg/kg). La figura F representa los valores de lesión expresados como porcentaje de lesión del lado lesionado vs. lado no lesionado y se corresponden con los valores medios \pm EEM de cuatro sujetos por grupo. (***= $p < 0.005$ vs. sham, **= $p < 0.01$ vs. sham, ###= $p < 0.01$ vs. malonato, #= $p < 0.05$ vs. malonato).

A continuación se realizó un análisis histopatológico del estriado lesionado respecto al no-lesionado mediante la tinción de Nissl. En primer lugar, se observó una drástica disminución en la intensidad de la tinción en el cuerpo estriado del grupo tratado con malonato + vehículo frente al grupo control (sham + vehículo) que indica el grado de lesión causado por el malonato (Figura 36A-B). La administración del compuesto 1.56 a los animales con malonato produjo un aumento del número de células teñidas con Nissl, que resultó ser estadísticamente significativo a las dosis de 0.1 ($p < 0.05$) y 1 mg/kg ($p < 0.01$) (Figura 36). En base a estos resultados, se decidió trabajar con la dosis de 1 mg/kg, en los siguientes experimentos dirigidos a confirmar el papel del receptor CB₂ en los efectos neuroprotectores del compuesto 1.56.

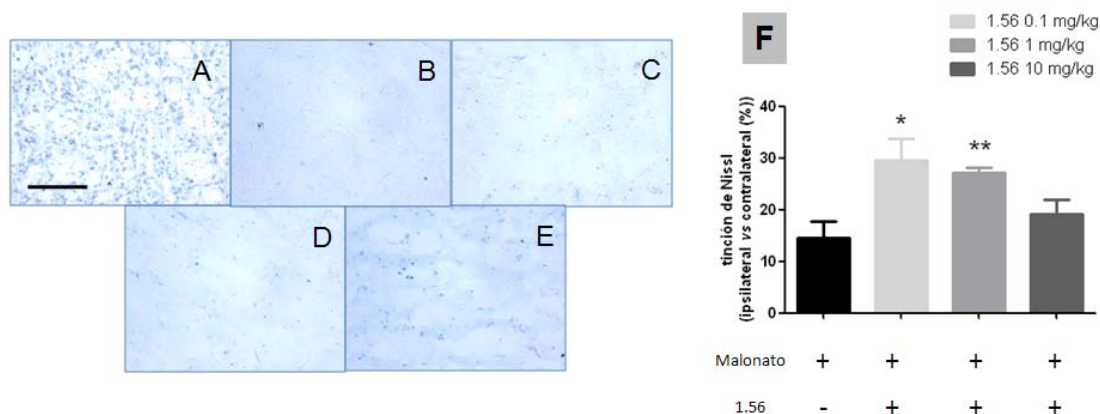


Figura 36. Análisis de la Integridad tisular mediante tinción de Nissl, tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (0.1, 1 y 10 mg/kg). Las figuras A-E son imágenes representativas del parénquima estriatal a nivel del área lesionada: (A): sham, (B): malonato, (C): malonato + 1.56 (0.1 mg/kg), (D): malonato + 1.56 (1 mg/kg), (E): malonato + 1.56 (10 mg/kg). La figura F representa los datos de la cuantificación de la tinción de Nissl expresados como porcentaje de integridad tisular del lado lesionado vs. lado no lesionado y se corresponden con los valores medios \pm EEM de cuatro sujetos por grupo. (**= $p < 0.01$ vs. malonato, * = $p < 0.05$ vs. malonato).

4.2.2 Implicación del receptor CB_2 en el efecto neuroprotector del compuesto 1.56

Para confirmar el papel del receptor CB_2 en el efecto neuroprotector del compuesto 1.56, se realizó un nuevo experimento utilizando dicho compuesto (1 mg/kg) en presencia o ausencia del antagonista selectivo del receptor CB_2 , AM630, también a una dosis de 1 mg/kg (Valdeolivas y cols, 2012).

El análisis de las imágenes de RMN reveló que el volumen de edema causado por la lesión producida por la administración de malonato en los animales (Figura 37) se veía disminuido de manera estadísticamente significativa ($p < 0.01$) al administrar el compuesto 1.56, y este efecto desapareció ($p < 0.01$) al co-administrar AM630.

A continuación se llevó a cabo el análisis histológico de los tejidos utilizados para el análisis de RMN y, como se puede observar en la Figura 38, la tinción de Nissl en el estriado de los animales lesionados con malonato se vio de nuevo reducida con respecto a la de los animales sham ($p < 0.005$). La administración del compuesto 1.56 aumentó de nuevo ese marcaje ($p < 0.01$) y este incremento fue revertido cuando además se administró AM630 ($p < 0.01$), lo que refleja que la preservación de la integridad del tejido estriatal por el tratamiento con el compuesto 1.56 se produce a través de la activación de los receptores CB_2 .

Dado que se sabe que la muerte neuronal causada por el malonato es fundamentalmente del tipo apoptótico (Toulmond y cols., 2004), se procedió a analizar el número de células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL, en los diferentes grupos de este experimento. Como se puede observar en la Figura 39, los animales sham no muestran células TUNEL-positivas, mientras que los animales lesionados con malonato presentan un elevado número de células apoptóticas. En aquellos animales que fueron lesionados con malonato y tratados con el compuesto 1.56 no se observó reducción significativa de la apoptosis, y por tanto, el grupo que además llevaba AM630

tampoco mostró ningún efecto, aunque en los tres grupos se pudo apreciar la tendencia esperada: se observó mayor apoptosis tras la lesión con malonato, cierta reducción con el tratamiento del compuesto 1.56 y pérdida de esta tendencia al co-administrarlo con AM630 (Figura 39).

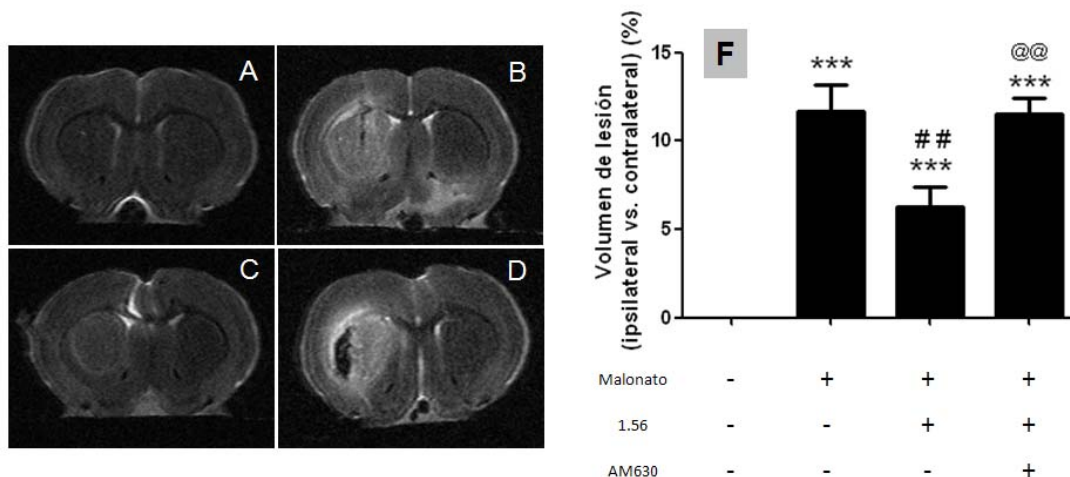


Figura 37. Determinación del volumen de edema causado por la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg), en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg). Las figuras A-D son imágenes representativas de la lesión estriatal analizadas por RMN: (A): sham, (B): malonato, (C): malonato + 1.56 (1 mg/kg), (D): malonato + 1.56 (1 mg/kg) + AM630 (1 mg/kg). La figura E representa los valores de lesión expresados como porcentaje de lesión del lado lesionado vs. lado no lesionado y se corresponden con los valores medios \pm EEM de 5-6 sujetos por grupo. (***)= $p < 0.005$ vs. sham, (##)= $p < 0.01$ vs. malonato, (@@)= $p < 0.01$ vs. malonato + 1.56 (1 mg/kg)).

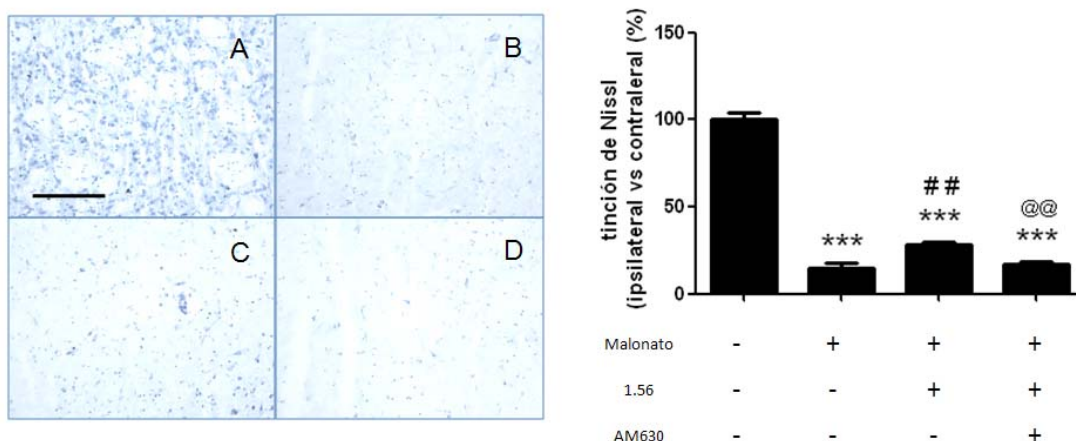


Figura 38. Análisis de la integridad tisular mediante tinción de Nissl tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg) en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg). Las figuras A-D son imágenes representativas de la región estriatal lesionada marcada por tinción de Nissl: (A): sham, (B): malonato, (C): malonato + 1.56 (1 mg/kg), (D): malonato + 1.56 (1 mg/kg) + AM630 (1 mg/kg). La figura E representa los valores de marcaje por tinción de Nissl expresados como porcentaje de integridad tisular del lado lesionado vs. lado no lesionado y se corresponden con los valores medios \pm EEM de 5-6 sujetos por grupo. (***)= $p < 0.005$ vs. sham, (##)= $p < 0.01$ vs. malonato, (@@)= $p < 0.01$ vs. malonato + 1.56 (1 mg/kg)).

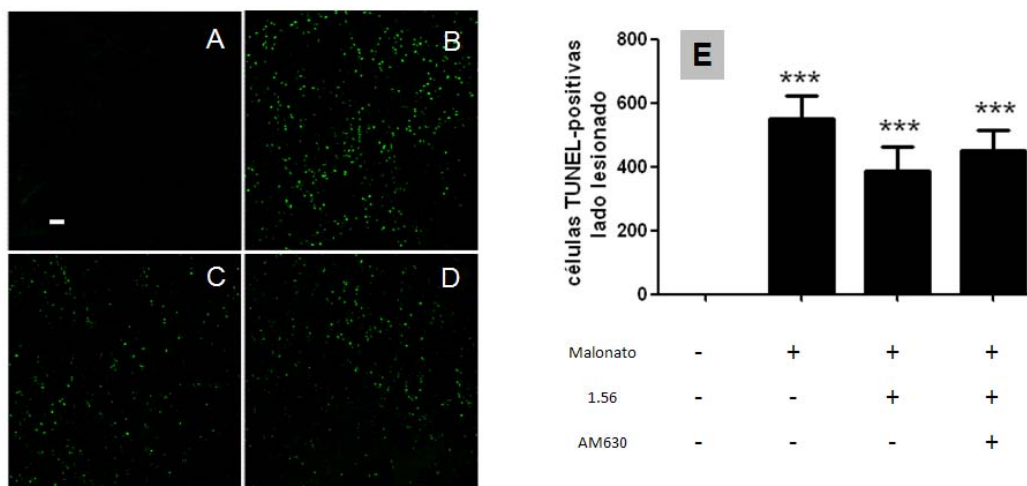


Figura 39. Análisis de apoptosis mediante TUNEL tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg) en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg). Las figuras A-D son imágenes representativas de la región estriatal lesionada marcada por TUNEL: (A): sham, (B): malonato, (C): malonato + 1.56 (1 mg/kg), (D): malonato + 1.56 (1 mg/kg) + AM630 (1 mg/kg). La figura E representa los valores apoptosis expresados como porcentaje de marcaje del lado lesionado vs. lado lesionado del sham y se corresponden con los valores medios \pm EEM de 5-6 sujetos por grupo. (***) = $p < 0.005$ vs. sham).

Uno de los principales determinantes de la muerte por apoptosis de las neuronas estriatales tras la administración con malonato es la intensa reactividad glial e inflamación que ocurre tras la administración de la toxina (Sagredo y cols., 2009). Como ya se mencionó anteriormente, estudios previos habían destacado el papel del receptor CB_2 en la modulación de esta respuesta (Sagredo y cols., 2009). Por ese motivo, en este experimento también se estudió la activación de células de microglía mediante estudios inmunohistoquímicos con el marcador Iba-1 en los animales tratados con malonato y/o la combinación de los compuestos 1.56 y AM630.

Como se puede observar en la Figura 40, tras la lesión con malonato, el número de células marcadas con Iba-1 aumenta de manera significativa con respecto al control ($p < 0.005$). Como era de esperar, en los animales lesionados con malonato y tratados con el compuesto 1.56 la inmunoreactividad por Iba-1 disminuye ($p < 0.005$), igualándose el número de células Iba-1 positivas a las del grupo control. Por último, en los animales lesionados con malonato y tratados con el compuesto 1.56 y el antagonista AM630, el efecto del compuesto 1.56 desapareció parcialmente ($p < 0.05$). Estos resultados indican que el compuesto 1.56 reduce la reactividad microglial causada por la lesión intraestriatal con malonato, y este efecto beneficioso, fue claramente mediado por la activación de los receptores CB_2 .

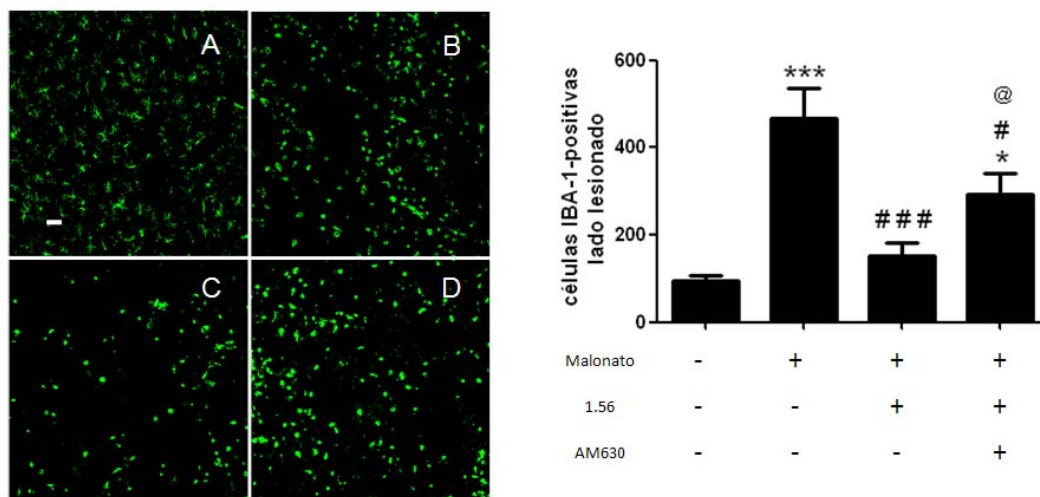


Figura 40. Análisis inmunohistoquímico de las células de microglía con el marcador Iba-1 tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg) en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg). Las figuras A-D son imágenes representativas de la región estriatal lesionada marcada por Iba-1: (A): sham, (B): malonato, (C): malonato + 1.56 (1 mg/kg), (D): malonato + 1.56 (1 mg/kg) + AM630 (1 mg/kg). La figura E representa el número de células Iba-1 positivas expresado como porcentaje del lado lesionado vs. lado lesionado del control y se corresponden con los valores medios \pm EEM de 5-6 sujetos por grupo. (***) = $p < 0.005$ vs. sham).

5 Estudio del efecto del compuesto 1.56 sobre los receptores GPR55 y PPAR γ

Como se ha comentado en la Introducción, los ligandos cannabinoides pueden unirse a otros receptores, además de a los receptores CB₁ y CB₂. Por ejemplo, se ha observado una interacción entre ciertos ligandos cannabinoides y el receptor metabotrópico GPR55 (Johns y cols., 2007; Ryberg y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008; Hestridge y cols., 2009, 2010), así como con los receptores nucleares de la familia PPAR (O'Sullivan y cols., 2005; Mestre y cols., 2009; Liu y cols., 2003; Bouaboula y cols., 2005; Sun y cols., 2006; Rockwell y cols., 2006). Debido al claro efecto antiinflamatorio del compuesto 1.56 mediado por la activación de los receptores CB₂, observado tanto en el modelo *in vitro* como en el *in vivo*, y dado que GPR55 y sobre todo PPAR γ han sido relacionados también con respuestas antiinflamatorias asociadas a gliosis reactiva (Kallendrusch y cols., 2013; Madeira y cols., 2015; Song y cols., 2016), entendimos que era interesante estudiar si el efecto antiinflamatorio y neuroprotector de 1.56 podría involucrar en alguna medida a GPR55 y/o PPAR γ . En otras palabras, lo que quisimos comprobar es si el compuesto 1.56 tiene algún tipo de actividad sobre estos receptores que se pueda añadir a su efecto antiinflamatorio/neuroprotector mediado por la activación de los receptores CB₂.

5.1 Efecto sobre GPR55

Para estudiar el efecto del compuesto 1.56 sobre el receptor GPR55 se llevó a cabo un ensayo funcional basado en la detección de la activación de ERK1/2 promovida por ligandos GPR55 (Henstridge y cols., 2010). Se estudió la capacidad de fosforilación de ERK1/2 por activación de

GPR55 causada tanto por el compuesto AM251, descrito como agonista de este receptor (Henstridge y cols., 2010) y utilizado como control de la técnica, como por el compuesto 1.56. Estos ensayos se llevaron a cabo en células HEK293 transfectadas con *hGPR55* así como en células HEK293 sin transfectar. Como se puede observar en la Figura 41, en las células transfectadas con *hGPR55*, tan sólo tras la adición de AM251 a la dosis de 1 μM tiene lugar la fosforilación de ERK1/2, mientras que al añadir el compuesto 1.56 a las dosis de 0.1, 1 y 10 μM no se observan cambios con respecto al ensayo en el que sólo se añade el vehículo. En las células no transfectadas no se observaron cambios en ninguno de los casos. Estos datos sugieren que el compuesto 1.56 no activa al receptor GPR55, por lo que se puede descartar que GPR55 contribuya al efecto antiinflamatorio y neuroprotector de 1.56.

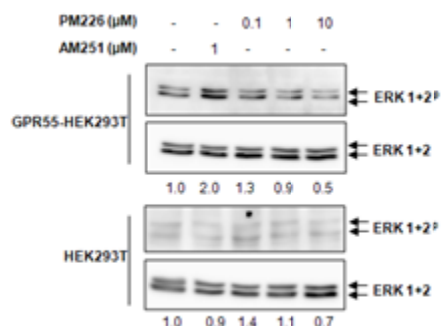


Figura 41. Imagen representativa de la activación de ERK1/2. Como control positivo se empleó el agonista del receptor GPR55 AM251. También se muestra la ausencia de fosforilación de ERK1/2 en las células control HEK293 no transfectadas, así como los blots de ERK1/2 no fosforilado en ambas líneas celulares, en presencia o ausencia de los compuestos empleados.

5.2 Efecto sobre PPAR γ

El mismo planteamiento se realizó para el receptor PPAR γ y su posible activación por el compuesto 1.56. Para ello, se trabajó en un modelo *in vitro*, empleando células HEK293 transfectadas con el vector de expresión GAL4-PPAR γ y con el gen GAL-4-luc, tratadas con el compuesto 1.56 a las dosis de 10 y 20 μM y con el agonista de PPAR γ rosiglitazona (Edvarsson y cols., 1999) a la dosis de 1 μM . Como se puede observar en la Figura 42, la inducción de actividad luciferasa que refleja activación de PPAR γ , sólo se ve aumentada de manera significativa en las células transfectadas al añadir la rosiglitazona (1 μM , $p < 0.005$), mientras que al añadir el compuesto 1.56 a las dosis de 10 y 20 μM los datos de inducción de actividad luciferasa son similares al control, indicando que 1.56 no presenta ninguna capacidad de activar PPAR γ .

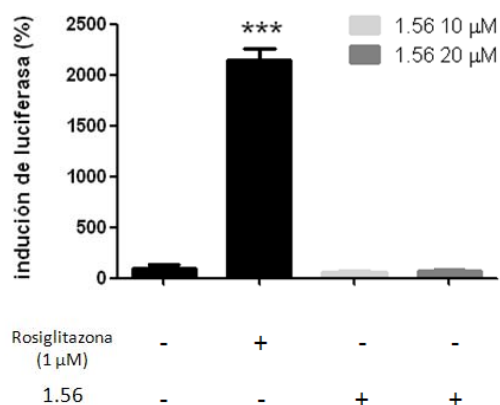


Figura 42. Análisis de inducción de la luciferasa por el compuesto 1.56 y por el agonista selectivo de PPAR γ , rosiglitazona, usando células HEK293 transfectadas con los vectores GAL4-PPAR γ y GAL-4-luc, para determinar su efecto sobre los receptores PPAR γ . Los datos fueron expresados como la media \pm EEM de la inducción obtenida para cada grupo de tres experimentos independientes. (***)= $p < 0.005$ vs. control).

También fue analizado el papel del compuesto 1.56 como posible antagonista de los receptores PPAR γ , mediante el mismo diseño *in vitro*, coincubando la rosiglitazona (1 μ M) y el compuesto 1.56 (a las concentraciones de 10 y 20 μ M) sobre las células HEK-293 transfectadas. Como se puede ver en la Figura 43, el compuesto 1.56 presenta cierta capacidad de revertir el efecto de la rosiglitazona, lo que podría sugerir un comportamiento antagonista/inhibidor sobre este receptor. Parece contradictorio entonces el papel antiinflamatorio de 1.56, ya que está implicado en dos vías relacionadas con la modulación de procesos inflamatorios, inhibiéndolos por un lado por su capacidad para activar CB $_2$, pero pudiendo incrementarlos por otro, al mostrar potencial para inhibir PPAR γ . Sin embargo, esta respuesta para ser total, necesitaría de concentraciones superiores a 20 μ M., mientras que a una concentración de 10 μ M, el compuesto presenta la capacidad de activar el receptor CB $_2$ de manera total. Por lo tanto, parece más relevante el efecto neuroprotector llevado a cabo vía CB $_2$, que implica una disminución de la respuesta inflamatoria, demostrada en dos modelos de neuroprotección.

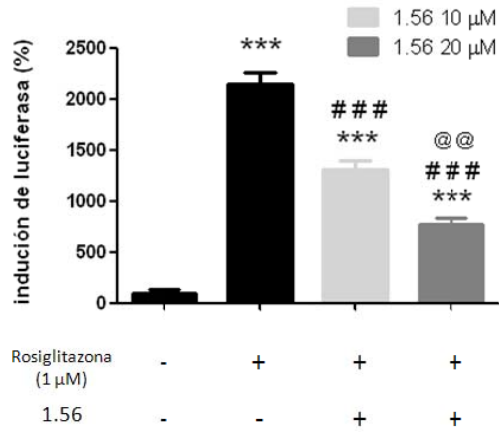


Figura 43.. Análisis de inducción de la luciferasa por el compuesto 1.56 y por el agonista selectivo de PPAR γ , rosiglitazona, usando células HEK293 transfectadas con los vectores GAL4-PPAR γ y GAL-4-luc, para determinar su efecto sobre los receptores PPAR γ . Los datos fueron expresados como la media \pm EEM de la inducción obtenida para cada grupo de tres experimentos independientes. (***= $p < 0.005$ vs. control, ###= $p < 0.005$ vs. rosiglitazona (1 μ M), @ @ = $p < 0.01$ vs. 1.56 (10 μ M)).

Discusión

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de patologías complejas, que tienen como características comunes el carácter progresivo de los síntomas y la degeneración de subpoblaciones neuronales específicas, lo que desemboca en incapacidad física y psíquica, dando lugar a la muerte del individuo. Aunque para algunas de estas patologías se han desarrollado tratamientos, estos sólo se han centrado en paliar los síntomas pero no en controlar la progresión de la enfermedad, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas terapias dirigidas a la recuperación y cura de los pacientes, o que al menos retrasen o frenen la progresión de la enfermedad.

Desde que se descubrieron las estructuras de los fitocannabinoides, endocannabinoides y los componentes del SCE en general, se han estudiado las posibilidades terapéuticas que este tipo de compuestos y sus análogos sintéticos podrían tener para diversas enfermedades (Pertwee, 2009). La elevada expresión de los receptores cannabinoides, sobre todo CB₁, en el SNC y el estudio de la alteración de distintos elementos del SCE en varias patologías neurodegenerativas (Fernández-Ruiz y cols., 2014), han llevado a pensar que tanto los receptores, como las enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides pueden ser dianas terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades. Se han estudiado las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides, demostrándose su influencia sobre numerosos mecanismos involucrados en la neurodegeneración, capaces de reducir la excitotoxicidad, el daño oxidativo, inflamación y de mejorar la supervivencia neuronal (Sagredo y cols., 2007; Fernández-Ruiz y cols., 2010, 2011, 2015), entre otros.

Aunque la activación de ambos receptores cannabinoides en el SNC resulta interesante por las evidentes propiedades neuroprotectoras que presentan los agonistas cannabinoides, se ha observado que, debido a la ubicación mayoritaria del receptor CB₁ en células neuronales, (Herkenham y cols., 1991a; Tsou y cols., 1998a), la administración de agonistas CB₁ puede producir los efectos terapéuticos buscados, pero en ocasiones se asocia con el desarrollo de efectos psicoactivos (Ameri, 1999) o con una pérdida progresiva de eficacia terapéutica derivada de la muerte de las neuronas que contienen el propio receptor CB₁. El receptor CB₂, por el contrario, tiene una distribución mucho más restringida, ubicándose fundamentalmente en células de glía activadas (Benito y cols., 2003, 2008, Sheng y cols., 2005; Nuñez y cols., 2004; Ibrahim y cols., 2003, Cabral y Griffin-Thomas, 2009), y facilitando que su activación selectiva no se asocie con dichos efectos psicoactivos y/o no se afecte por la pérdida neuronal. Además, dado que la inflamación crónica o exacerbada puede provocar efectos dañinos, comunes en las enfermedades neurodegenerativas y que la activación del receptor CB₂ de las células microgliales está relacionada con una disminución de los procesos inflamatorios, el empleo de agonistas CB₂ en estas patologías parece claramente un tratamiento prometedor. Actualmente se están desarrollando a nivel preclínico terapias basadas en la activación del receptor CB₂ en enfermedades neurodegenerativas como la EA (Benito y cols., 2003; Aso y cols., 2013), EH (Sagredo y cols., 2009; Palazuelos y cols., 2009), EP (Price y cols., 2009; García y cols., 2011; Gómez-Gálvez y cols., 2016), ELA (Yiangou y cols., 2006, Espejo-Porrás y cols., 2015) y otras (revisado en Fernández-Ruiz y cols., 2007, 2008, 2015). Por ese motivo, se están diseñando y

sintetizando nuevas moléculas agonistas selectivas para el receptor CB₂, que mejoren las propiedades farmacológicas (mayor selectividad, mejor solubilidad y biodisponibilidad, más potencia...) respecto a los compuestos ya existentes (Sekiguchi y cols., 2015; Nanda y cols., 2014; Van der Stelt y cols., 2011).

En este contexto, el objetivo de este trabajo ha consistido en la búsqueda de nuevos agonistas cannabinoides, selectivos para el receptor CB₂, que presentasen propiedades farmacocinéticas favorables y con potencial neuroprotector, derivado de su capacidad de reducir la respuesta inflamatoria. Para ello se procedió a la evaluación farmacológica y biológica mediante un sistema de cribado de un conjunto de 88 moléculas, de distinto origen.

1 Evaluación de afinidad y selectividad por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂.

Para determinar la afinidad y selectividad de las moléculas propuestas por el receptor CB₂ y por otras potenciales dianas, sobre todo CB₁, se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento radiométricos sobre ambos receptores cannabinoides. En la familia de cromenopirazoles y derivados varios compuestos mostraron una elevada afinidad por el receptor de estudio: 1.13, 1.14, 1.23, 1.41, 1.47, 1.48, 1.55, 1.56, mientras que algunos de ellos u otros de la serie, presentaron elevada afinidad por el receptor CB₁: 1.14, 1.16, 1.17, 1.18, 1.19, 1.21, 1.22, 1.35 y 1.55. Además se obtuvieron varias moléculas selectivas por el receptor CB₂ con respecto al receptor CB₁ como: 1.15, 1.27, 1.29, 1.30, 1.31, 1.42, 1.44, 1.48, 1.49, 1.54 y 1.56. En líneas generales, esta selectividad se vio aumentada con la alquilación del anillo fenólico acompañada de una sustitución en R2 (ver Figura 15 y Tabla 9) por un pequeño grupo alquilo. La molécula más selectiva de esta primera serie fue el cromenoisoxazol 1.56 (con selectividad > 3125) obtenida al reemplazar el anillo pirazol por uno isoxazol que también requirió la alquilación del grupo fenólico, para mantener la selectividad por CB₂, confirmando lo observado de forma general en esta familia de cromenopirazoles y derivados. Sin embargo, atendiendo a los criterios de selección fijados, tan sólo las moléculas 1.48 y 1.56 cumplieron ambos requisitos de selectividad y elevada afinidad por el receptor para ser seleccionados para continuar con su estudio. Con respecto a la serie de pirazoles tricíclicos 3-carboxiamida, los compuestos analizados mostraron afinidad nula por el receptor CB₁, mientras que la afinidad por CB₂ pareció claramente dependiente de la presencia de un grupo ciclopropilo en la posición R, combinado con la presencia del grupo CH₂ en la posición X(ver Figura 15 y Tabla 10). Los compuestos de esta serie que mayor afinidad mostraron por el receptor CB₂ fueron 2.5, 2.9 y 2.10. Con respecto a las series de quinonas de fitocannabinoides, ninguna mostró valores de K_i para CB₂ dentro del criterio fijado, aunque en líneas generales, las quinonas de CBD presentaron mayor afinidad por dicho receptor que las de CBG. Los valores de afinidad por CB₁ en los compuestos en los que fue analizada, fueron muy elevados o prácticamente nulos, haciendo que algunas quinonas mostrasen valores de selectividad por CB₂ dentro del rango marcado, como en el caso de los compuestos 3.1, 4.3 y 4.4. Sin embargo, al no cumplirse los dos criterios de elevada afinidad y selectividad por CB₂ simultáneamente, ninguna molécula de estas familias fue seleccionada para continuar con su caracterización dentro de este trabajo doctoral, aunque sí lo han sido por sus propiedades neuroprotectoras/neurorregeneradoras

o por otros efectos terapéuticos de su acción combinada sobre diferentes dianas en otros estudios (Granja y cols., 2012; Díaz-Alonso y cols., 2016; Del río y cols., 2016). Del mismo modo, otras moléculas descartadas en el proceso de cribado en la búsqueda de agonistas selectivos del receptor CB₂ de este trabajo, podrían llegar a ser prometedores fármacos, pero no en el contexto de los objetivos propuestos para esta Tesis Doctoral, por eso no se ha continuado con su estudio.

En conclusión, después del análisis de 88 moléculas, atendiendo a los criterios de selectividad y afinidad por el receptor CB₂, tan sólo las moléculas 1.48, 1.56, 2.5, 2.9 y 2.10 fueron seleccionadas para continuar con su estudio como ligandos cannabinoides con potencial neuroprotector. En general, los compuestos muestran unos valores de selectividad idóneos, y salvo por el compuesto 1.48, se podría decir que excelentes (27.2, > 3125, > 6944, > 1061 y > 2232, respectivamente), considerando los valores de cannabinoides de referencia selectivos para este receptor (Tabla 15), como de los agonistas HU308, JWH-133 y L-759,656, así como del antagonista AM630, o del agonista inverso SR144528, que tienen valores de selectividad por CB₂ desde 25.3 a > 1785.7 (en función del ensayo sobre el que se haya determinado dicho valor) (Tabla 15). Al comparar estos datos, se puede observar que previamente no se habían registrado valores de selectividad por el receptor CB₂ mayores a 2000 en los cannabinoides de referencia, por lo que, salvo por el compuesto 1.48, nos encontramos con nuevas moléculas considerablemente mejores en cuanto a la selectividad por el receptor CB₂ se refiere. Con respecto a los valores de K_i para las moléculas seleccionadas (valores entre 4.5 y 39.8 nM), se encuentran dentro del rango registrado para cannabinoides ampliamente estudiados en la literatura (Tabla 15). Haciendo referencia a los cannabinoides comentados anteriormente, los valores de K_i observados para estos compuestos se encuentran entre 0.3 y 31.2 nM. (Tabla 15). Por lo tanto, ya que se trata de moléculas que presentan valores de K_i para el receptor CB₂ dentro del rango de los compuestos de referencia y que, en general, son moléculas con mayor selectividad por dicho receptor, podemos hablar de nuevos compuestos mejorados con respecto a lo descrito en la literatura.

Tabla 15. Valores de K_i y selectividad por el receptor CB₂ de los cannabinoides de referencia HU-308, JW-133, L-759,656, AM630 y SR144528.

Ligando	K _i rCB ₁ (nM)	K _i rCB ₂ (nM)	Selectividad rCB ₂	Referencia
HU-308	> 10000	22,7	> 440,5	Hanus y cols., 1999
JWH-133	677	3,4	199,1	Huffman y cols., 1999
L-759,656	4888	11,8	414,2	Ross y cols., 1999a
	> 20000	19,4	>1030,9	Gareau y cols., 1996
AM-630	5152	31,2	165,1	Ross y cols., 1999a
SR144528	437	0,6	728,3	Rinaldi-Carmona y cols., 1998a
	>10000	5,6	> 1785,7	Ross y cols., 1999a
	70	0,3	250	Ruiu y cols., 2003
	50,3	2	25,3	Iwamura y cols., 2001

2 Predicción de propiedades farmacocinéticas

En numerosas ocasiones, tras el diseño, la síntesis y la evaluación farmacológica de un nuevo compuesto que presenta un perfil interesante para el tratamiento de ciertas patologías, se desestima su uso en ensayos clínicos por no mostrar propiedades apropiadas de ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción), por lo que la caracterización temprana de estas propiedades resulta de gran interés en el análisis de posibles fármacos. Algunas compañías farmacéuticas, de hecho, realizan esos estudios de ADME incluso antes de la caracterización biológica. Los modelos *in silico* permiten una predicción de estos parámetros disminuyendo los costes y el intervalo de tiempo necesario para poder evaluarlos en ensayos biológicos (Butina y cols., 2002; Gombar y cols., 2003). La estimación *in silico* de los parámetros ADME se fundamenta en el análisis de descriptores moleculares representativos relacionados con las propiedades físico-químicas y estructurales de la molécula. Las propiedades estudiadas en este trabajo de solubilidad, absorción, capacidad de ser transportado en el torrente sanguíneo, capacidad para atravesar la BHE, así como baja toxicidad, atienden a las demandas requeridas en los objetivos de este trabajo basado en la búsqueda de ligandos CB₂ con potencial neuroprotector, como se detalla a continuación:

La solubilidad es una propiedad molecular que afecta a la actividad biológica de las moléculas, influye en su vía de administración, distribución y transporte y en ocasiones en la biodisponibilidad del fármaco en su sitio de acción (Tetko y cols., 2000). En general, los cannabinoides son moléculas altamente lipófilas (Garrett y Hunt, 1974; Sharma y cols., 2012), lo que ha llevado al desarrollo de numerosos estudios con el objetivo de disminuir la hidrofobicidad de compuestos ya conocidos, o bien sintetizar nuevos ligandos solubles en medio acuoso (Murgia y cols., 2013; Martin y cols., 2006). Una elevada hidrofobicidad podría suponer una baja absorción si se administra por vía oral, una elevada interacción con proteínas plasmáticas, impidiendo la correcta llegada a su diana o incluso una posible limitación para atravesar la BHE. Atendiendo a los valores obtenidos en la predicción de esta propiedad en las moléculas seleccionadas (1.48, 1.56, 2.5, 2.9 y 2.10), así como en los cannabinoides de referencia HU308, JWH-133 y SR144528, también analizados, se puede observar que, de acuerdo con lo esperado por su estructura, en general, la predicción de solubilidad de estos compuestos es muy baja, por debajo del rango del 95% de los fármacos incluidos en la librería del programa, excepto en las moléculas 1.48 y 1.56, que sí se encuentra dentro de dicho rango; por lo tanto, se obtuvieron dos moléculas cannabinoides con una predicción de solubilidad aceptable, dentro del marco farmacológico y mejor con respecto a los cannabinoides de referencia analizados. Sin embargo, atendiendo al logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua (QPLogP_{o/w}), otro parámetro directamente relacionado con la solubilidad, y cuyo valor no debe ser mayor de 5.0 para encontrarse dentro del rango de un fármaco (Egan y Lauri, 2002), tan sólo el compuesto 1.56 se encuentra dentro del rango aceptable. Esto hace pensar en esta molécula como la más indicada farmacocinéticamente de todas las propuestas.

Se ha observado que aquellos compuestos que presentan un elevado QPLogP_{o/w} mostrarían una excesiva tendencia a permanecer en el entorno hidrofóbico de la membrana, por lo que no

alcanzarían la fase acuosa y la absorción sería menor (Egan y Lauri, 2002). Por lo tanto, una solubilidad acuosa razonable implicaría una predecible absorción oral, requisito aconsejable que deben presentar aquellos compuestos que se puedan llegar a emplear como fármacos. Esto es debido a que, a nivel clínico, la administración por vía oral (y por lo tanto, la absorción intestinal), es preferible frente a otras opciones, al tratarse de una vía de administración no invasiva y que no requiere la intervención de personal sanitario, implicando mayor comodidad e independencia para el paciente al que se le administra el fármaco, así como una reducción de costes económicos. Para estudiar la absorción intestinal, tradicionalmente se ha empleado la línea celular Caco-2, como modelo *in vitro*, debido a que su comportamiento en monocapa confluyente es similar al de los enterocitos del intestino delgado (Meunier y cols., 1995). Gracias al amplio conocimiento derivado del uso de este modelo *in vitro*, se han podido desarrollar modelos teóricos con el fin de predecir la absorción intestinal de fármacos *in silico*, administrados por vía oral. Este parámetro junto con la predicción de absorción oral (%) empleados en este trabajo predicen la difusión pasiva de los compuestos a través del epitelio intestinal, sin considerar procesos de transporte activo ni posibles transformaciones metabólicas. A pesar de tratarse de parámetros estudiados en un modelo *in silico*, todos los compuestos analizados presentaron una excelente predicción para su absorción. Además de estos parámetros, se prestó atención a las reglas de Lipinski (Lipinski y cols., 2001), para predecir la capacidad de absorción. Estas reglas advierten que, para que un principio activo presente la capacidad de ser absorbido por vía oral, no debe violar más de una de estas consideraciones, preferiblemente ninguna. Estas reglas son:

- No debe contener más de 5 donadores de enlaces por puentes de hidrógeno
- No debe contener más de 10 aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno
- Su peso molecular debe ser inferior a 500 g/mol
- El $\text{LogP}_{o/w}$ debe ser inferior a 5

Tan sólo el compuesto 1.56 no incumple ninguna de estas reglas, mientras que todos los demás violan la cuarta regla, superando el valor de $\text{LogP}_{o/w}$, como se ha comentado anteriormente. No obstante, dado que el criterio permite quebrantar como máximo una de las reglas, cabe esperar que todos los compuestos presenten la capacidad de ser absorbidos. Sin embargo el compuesto que presenta mejor perfil farmacocinético atendiendo a las reglas de Lipinski es el 1.56.

Una vez absorbidos, los compuestos deben viajar por el organismo hasta llegar a su diana. La distribución de los compuestos en el organismo y su vida media están estrechamente relacionadas con su capacidad de unión a proteínas plasmáticas. La albúmina es la proteína más abundante en sangre y su función principal consiste en el transporte de moléculas estableciendo interacciones reversibles de naturaleza hidrofóbica y de tipo electrostático con moléculas lipófilas, como los ácidos grasos (Hamilton y cols., 1991). Dichas interacciones han de ser lo suficientemente estables para mantener la unión, pero no excesivamente elevadas, para permitir la disociación cuando la molécula llegue a su destino (Vallianatou y cols., 2013). Posiblemente la hidrofobicidad de la mayoría de los compuestos analizados, hacen que las interacciones con la HSA sean demasiado

fuertes, haciendo que tanto los cannabinoides de referencia como los compuestos de la serie 2 se encuentren fuera del rango del 95% de los fármacos de la librería empleada. Tan sólo los compuestos 1.48 y 1.56 mostraron una predicción de asociación a la HSA apropiada para su distribución en el organismo.

Teniendo en cuenta que el principal objetivo del trabajo consiste en la búsqueda de moléculas neuroprotectoras, y que existen cannabinoides que sólo actúan a nivel periférico (Cumella y cols., 2012, Fulp y cols., 2013), también se analizó la capacidad para atravesar la BHE de los compuestos. Dado el papel protector de esta estructura biológica (Abbott y cols., 2010), el principal mecanismo de transporte a través de la BHE es la difusión pasiva por vía transcelular, por lo que los estudios farmacocinéticos desarrollados *in silico* se fundamentan en este mecanismo, sin considerar transportadores activos ni sistemas enzimáticos que pudieran afectar a la permeabilidad. En general, la hidrofobicidad de la molécula determinada por el $Q\text{PLogP}_{ow}$ es el parámetro más destacado para describir esta capacidad, aunque también son relevantes otros descriptores para la predicción de la capacidad para atravesar la BHE como la superficie polar accesible, el número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno (Mensch y cols., 2009; Vilar y cols., 2010). En el modelo *in silico* empleado en este trabajo, se determinó la capacidad de las moléculas estudiadas para atravesar la BHE mediante el coeficiente de partición cerebro/sangre ($Q\text{PLogBB}$). Como estudio complementario también se estudió el parámetro $Q\text{PPMDCK}$ que representa la permeabilidad de los compuestos en la línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby (MDCK), cuyas propiedades morfológicas son similares a las de las células endoteliales vasculares que constituyen la BHE, convirtiéndolas en el modelo *in vitro* más representativo de la BHE (Navarro y cols., 2011). Según el parámetro $Q\text{PLogBB}$ todos los compuestos se encuentran dentro del rango del 95% de los fármacos de la librería, resultando algo mayor en los derivados de la serie 2 y en el SR144528, y claramente inferior en los controles HU-308 y JWH-133, mientras que los derivados de la serie de cromenopirazoles 1.48 y 1.56, se ubican en una posición intermedia. Con respecto al descriptor de permeabilidad de las células MDCK, todos los compuestos presentaron una predicción excelente. Por lo tanto, la predicción de atravesar la BHE fue positiva para todos los compuestos evaluados con los dos parámetros utilizados, por lo que se puede predecir que todos ellos deben atravesar la BHE.

Finalmente, aunque un compuesto cumpla con estos requisitos, su administración podría resultar tóxica para el organismo, por lo que es fundamental que la predicción también considere la información proveniente de ensayos de toxicidad. Existen diversas razones por las que una molécula podría resultar dañina, al estar relacionada con procesos mutagénicos, carcinógenos, cardiotoxicos, nefrotóxicos y hepatotóxicos, entre otros. Por ello se han desarrollado distintas plataformas *in silico* que determinan su posible toxicidad (Muster y cols., 2008). Para estudiar una posible cardiotoxicidad de los compuestos, se obtuvo el parámetro $Q\text{PLogHERG}$, que se corresponde con el valor de IC_{50} de los canales de potasio HERG. Estos canales son una diana molecular responsable de una toxicidad cardíaca causada por un elevado número de fármacos (Vandenberg y cols., 2001), ya que están involucrados en la repolarización cardíaca y su bloqueo

está relacionado con el síndrome “Q-T largo” (Raschi y cols., 2009). Atendiendo a los valores obtenidos de este parámetro para los compuestos estudiados, tan sólo resultaron seguros para el uso clínico los compuestos 1.56 y JWH-133.

En conclusión, por los datos obtenidos mediante el modelo *in silico*, el único compuesto de los analizados que resultó adecuado, farmacocinéticamente hablando, fue el 1.56. Es importante mencionar que esta predicción de propiedades ADMET se ha obtenido sólo a nivel *in silico* y que debe ser refrendada por nuevos estudios *in vitro* e *in vivo*, que permitan validar estas propiedades, algo que será necesario llevar adelante para progresar en el desarrollo del compuesto hacia su uso clínico.

3 Estudios de funcionalidad del receptor CB₂

Con respecto a los estudios de funcionalidad, el modelo de ensayos de unión de GTPγS, reveló con claridad una única molécula agonista para el receptor CB₂, el compuesto 1.56. Además los valores de EC₅₀ y de E_{max}, mostraron una potencia y un efecto máximo superior para este compuesto que para el agonista selectivo de referencia HU-308, también estudiado mediante esta técnica, por lo que se obtuvo un compuesto que presentaba mejoras significativas en base a los objetivos de este trabajo. Sin embargo, los estudios de funcionalidad *in vitro* basados en la medida de liberación de PGE-2 por células BV-2 activadas con LPS (descrito por Ragusa y cols., 2015), mostraron cierta controversia con los obtenidos en los ensayos de unión de GTPγS. En realidad, parece que el compuesto no muestra ningún efecto, ya que ni revierte el efecto provocado por la adición de LPS, ni antagoniza el efecto generado por el agonista WIN55,212-2. Podría explicarse por una dosis insuficiente de compuesto, ya que al tratarse de dos modelos distintos, en los que tanto la actividad constitutiva (Kenakin, 2005; Howlett y cols., 2011) como la medida del efecto es diferente, la observación de una respuesta tras la activación del receptor puede no atender a las mismas concentraciones de compuesto. De hecho, en el ensayo de neuroprotección *in vitro*, se puede observar en los resultados de los experimentos de la curva de dosis para 1.56, que el compuesto ejerce un efecto sobre la toxicidad de las células de microglía estimuladas con LPS, recuperando de manera total la viabilidad neuronal, tan sólo a la dosis de 10 μM, mientras que a 0.1 (prácticamente el valor empleado en el ensayo de funcionalidad) y 1 μM, no hay recuperación de la viabilidad celular. Teniendo en cuenta que los modelos de funcionalidad y neuroprotección *in vitro* son semejantes en cuanto al principio experimental y a las condiciones de ensayo, se puede suponer que la falta de efecto en el modelo de funcionalidad sea debido a una dosis insuficiente. Además, atendiendo a la metodología empleada, el tiempo de incubación con el compuesto 1.56 en el bioensayo (17-18 horas, dependiendo de si se coíncuba con SR144528 o WIN55,212-2, respectivamente) es mucho mayor que en el ensayo de unión de GTPγS (30 minutos). Una activación del receptor prolongada en el tiempo, puede dar lugar una desensibilización del receptor (Breivogel y cols., 1999), y por lo tanto su internalización, es decir, que aunque se añada mayor concentración del compuesto, si el receptor no está disponible, no se observará más efecto, pudiendo haber sido ésta una de las razones de por qué no se ha percibido diferencias en la liberación de PGE-2 en el bioensayo llevado a cabo para el compuesto 1.56. Por lo tanto, asumir

un comportamiento agonista del compuesto 1.56 observado en el ensayo de unión de GTPγS parece razonable.

Con respecto al resto de compuestos, ninguno se mostró como agonista total en el ensayo de unión de GTPγS, tan sólo el 1.48 presentó un comportamiento de agonista parcial, ya que tanto el perfil como los valores de EC50 y Emax resultaron propios de este tipo de compuestos; mientras que todos los compuestos de la serie 2 presentaron un perfil de agonista inverso, con valores de IC50 inferiores al del SR144528, aunque con un Emax mucho menor al de este cannabinoide de referencia. Aunque para estos compuestos los resultados de ambos ensayos de funcionalidad no se corresponden completamente, si se aproximan más que para el compuesto 1.56. Con respecto al compuesto 1.48, en el modelo de funcionalidad *in vitro*, se obtuvieron datos que indicaron un claro papel antagonista para el receptor CB₂, al no revertir el efecto causado por la adición de LPS, y sí revertir el efecto del agonista WIN55,212-2. Al compararlo con los datos obtenidos del ensayo de unión de GTPγS, no parece algo extraño, ya que como se ha observado en ocasiones anteriores, ciertos cannabinoideos pueden mostrar distintos efectos dependiendo de la concentración utilizada (Little y Martin, 1991, Tzavara y cols., 2003) o cómo un agonista parcial, dependiendo del contexto, pueda actuar como antagonista en presencia de un agonista (Calvey y Williams., 2008). Los resultados del modelo de funcionalidad *in vitro* de los compuestos de la serie 2 parecen reflejar un resultado similar al obtenido mediante los ensayos de unión de GTPγS. Ninguno muestra un comportamiento de agonista inverso, posiblemente porque la eficacia sea muy modesta (observado en los ensayos de unión de GTPγS) o por la diferencia de actividad constitutiva que puede existir entre los dos modelos (Kenakin, 2005; Howlett y cols., 2011), pero todos muestran un perfil antagonista. En concreto, el compuesto 2.5 revierte el efecto agonista de WIN55,212-2, recuperando los niveles de liberación de PGE-2 en presencia de LPS. El efecto de los compuestos 2.9 y 2.10, sin embargo no alcanzó la significación estadística, aunque sí mostraron una tendencia en este efecto. Posiblemente la no obtención de dicha significación, sea debida de nuevo, a una dosis insuficiente de compuestos o a una desensibilización de los receptores, tal y como se ha comentado anteriormente para el compuesto 1.56.

4 Evaluación del papel neuroprotector del compuesto 1.56

Basándonos en el objetivo principal de esta Tesis Doctoral, se escogió la molécula 1.56 para evaluar su capacidad neuroprotectora por activación selectiva del receptor CB₂. Por tanto, esta molécula parece presentar potencial terapéutico para el tratamiento de un grupo de patologías que comparten procesos asociados a la activación glial y su influencia en la funcionalidad y la integridad neuronal. Se trata de patologías que cursan con eventos neuroinflamatorios y sobre las cuales, la activación del receptor CB₂, involucrado en la modulación de la respuesta inflamatoria, podría resultar beneficiosa (Fernández-Ruiz y cols., 2007, 2015). Por ello, se escogieron dos modelos que reproducen las condiciones de neuroinflamación: uno *in vitro* y uno *in vivo*, y que mediante este proceso afectan la viabilidad neuronal.

En primer lugar se descartó la posible toxicidad que el compuesto podría presentar por sí mismo en ambos modelos. En el modelo *in vitro* fue descartada al añadir 1.56 directamente sobre las neuronas y no observarse ninguna alteración en la viabilidad celular, con respecto al control; y en el modelo *in vivo*, al no observarse ningún indicio de muerte neuronal, edema o anomalías en el parénquima estriatal del lado contralateral.

Los resultados obtenidos en ambos modelos respaldaron firmemente el potencial neuroprotector del compuesto 1.56 ejercido a través de la activación de los receptores CB₂. En el modelo *in vitro* se observó cómo el compuesto 1.56, actuando a través de los receptores CB₂ localizados en las células de microglía (esto no ocurría al añadirlo directamente a las neuronas), revertía el efecto producido al añadir a las neuronas el medio condicionado de las células BV-2 estimuladas con LPS, recuperando la viabilidad neuronal, tratándose de un efecto dependiente de dosis. En el modelo *in vivo*, también se observó una recuperación de la integridad del tejido, y una reducción del volumen de edema, como ocurrió en estudios previos con el tratamiento con otros agonistas CB₂ (Sagredo y cols., 2009; Valdeolivas y cols., 2012). Este efecto, al igual que en el modelo *in vitro*, es dependiente de dosis. Con la dosis seleccionada se estudió si el efecto del compuesto modificaba el número de células en apoptosis en el estriado ipsilateral a la lesión mediante TUNEL, no observándose diferencias significativas, probablemente por la severidad del modelo, aunque sí cierta tendencia. Sin embargo, los análisis histológicos revelaron un efecto importante del compuesto 1.56 sobre la morfología de la población microglial y, por lo tanto, sobre su activación. La lesión induce un cambio de morfología ramificada a ameboide, característica de la microglía proinflamatoria. La administración del compuesto, reduce el número de células con morfología ameboide indicando que las células de la microglía son la principal diana del 1.56, activando el receptor CB₂ microglial, modulando la liberación de citoquinas proinflamatorias y permitiendo la recuperación de la morfología quiescente.

En ambos modelos, parece clave el papel de la microglía tanto para explicar la toxicidad inflamatoria, como por su potencial como sustrato celular de la diana terapéutica para revertir este evento patológico. Esto no excluye una contribución por parte de la activación de los receptores CB₂ astroglicales en el modelo *in vivo*, ya que se ha observado expresión de estos receptores en astrocitos activados en el cuerpo del estriado en estudios previos utilizando el mismo modelo de lesiones con malonato (Sagredo y cols., 2009), pero en este estudio hemos fijado nuestra atención en la respuesta microglial, en concordancia con los estudios llevados a cabo en el modelo *in vitro*. Se puede deducir por los datos del modelo *in vitro*, que la viabilidad neuronal sólo se ve disminuida en presencia de la microglía activada. Cuando esta activación no tiene lugar, la viabilidad de las neuronas permanece intacta. Quedó demostrado por el modelo de funcionalidad *in vitro* que cuando las células BV-2 son tratadas con LPS aumentan los niveles de PGE-2, también observado en el estudio de Ragusa y cols. (2015). Así mismo, en otros estudios previos se observó que en estas circunstancias tiene lugar la inducción de enzimas proinflamatorias como iNOS, COX-2 y una sobreproducción de prostaglandinas, citoquinas y otros mediadores proinflamatorios (Oh y cols., 2010). Bajo estas premisas, parece evidente que el daño neuronal está claramente relacionado

con la activación microglial y que la activación de los receptores CB₂ de las células de microglía desencadena cascadas de señalización para disminuir la liberación de esas sustancias proinflamatorias (Oh y cols., 2010), dando lugar a un efecto neuroprotector. Además, en estudios anteriores del modelo *in vivo* de malonato se observó activación de células microgliales, relacionándose con un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , mecanismo modulado por la activación de los receptores CB₂ en células de microglía activadas. (Sagredo y cols., 2009). Es esperable que esté ocurriendo lo mismo en nuestro estudio dado el elevado aumento del número de células de microglía que hemos encontrado, efecto que es revertido por el tratamiento con el compuesto 1.56. Además todo ello está en consonancia con los resultados obtenidos en el modelo *in vitro*, quedando patente la importante implicación de la activación de los receptores CB₂ microgliales en los efectos beneficiosos sobre la viabilidad neuronal.

La neuroprotección mediada por la activación del receptor CB₂ por el compuesto 1.56 fue corroborada en ambos modelos mediante el uso de antagonistas selectivos para este receptor, observándose una reversión de los efectos del compuesto 1.56. Esto también se observó en el estudio previo de Sagredo y cols. (2009), utilizando el antagonista CB₂ y también al emplearse ratones deficientes para este receptor.

5 Estudio del efecto del compuesto 1.56 sobre los receptores GPR55 y PPAR γ

Demostrado el efecto neuroprotector del compuesto 1.56 por la activación de los receptores CB₂ de las células microgliales, y su incapacidad para activar el receptor CB₁, como demostraron los ensayos de unión a receptor, se nos planteó la posibilidad de estudiar si 1.56 podría además estar actuando a través de otros receptores como GPR55 y PPAR γ , ampliamente descritos por su capacidad de interaccionar con moléculas con actividad cannabinoide y relacionados de forma reciente con la regulación de los procesos inflamatorios (Kallendrusch y cols., 2013; Madeira y cols., 2015; Song y cols., 2016). Se observó que el compuesto 1.56 no presentaba ninguna capacidad de activar a estos receptores, por lo que se confirmó que el mecanismo fundamental por el que tiene lugar efecto neuroprotector de este compuesto viene dado por la activación de los receptores CB₂ de las células de microglía, y la consecuente disminución de la respuesta inflamatoria que aparece en patologías neurodegenerativas/neuroinflamatorias.

6 Resumen de la discusión

En resumen, de un total de 88 moléculas evaluadas, se seleccionó el compuesto 1.56, de la serie de los cromenopirazoles y derivados. Esta molécula presenta una afinidad por el receptor CB₂ comparable a otros cannabinoideos descritos en la literatura y con una selectividad por este receptor claramente superior a la de ningún otro cannabinoide de referencia previamente descrito. Funcionalmente se comporta como agonista CB₂, mostrando mayor potencia y eficacia respecto al HU-308. Este compuesto además presenta una excelente predicción de propiedades farmacocinéticas claves en su papel neuroprotector, y mejores con respecto a dos cannabinoideos de referencia. También muestra un efecto neuroprotector analizado tanto *in vitro* como *in vivo*,

basado en la activación de los receptores CB₂ microgliales con la consecuente disminución de la respuesta inflamatoria. Todo ello, confiere al compuesto 1.56 unas características que lo convierten en una prometedora opción terapéutica a nivel clínico para diferentes enfermedades neurológicas en las que tenga lugar una exacerbada respuesta neuroinflamatoria, que contribuya a la muerte neuronal.

Conclusiones

De forma general, los resultados obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral presentan a la molécula 1.56 como un nuevo ligando cannabinoide, selectivo para el receptor CB₂, con capacidad neuroprotectora en patologías que cursan con procesos neuroinflamatorios. Atendiendo a los objetivos fijados, de forma más concreta se puede concluir que:

- De un total de 88 moléculas, tan sólo 5 presentaron valores de afinidad y selectividad por el receptor CB₂ apropiados para ser consideradas ligandos selectivos de este receptor. En general los valores de selectividad fueron muy superiores a los definidos para ligandos ampliamente descritos en la literatura.
- De las 5 moléculas seleccionadas, tan sólo el compuesto 1.56 presentó propiedades farmacocinéticas adecuadas de solubilidad, absorción intestinal, interacción con proteínas plasmáticas, capacidad para atravesar la BHE y de inactivación de los canales de potasio HERG, características relevantes en el contexto de búsqueda de un fármaco con propiedades neuroprotectoras.
- De las 5 moléculas seleccionadas, tan sólo la 1.56 presentó la capacidad de activar al receptor CB₂, mostrando una mejor potencia y eficacia con respecto al agonista HU-308.
- El compuesto 1.56 demostró ejercer un efecto neuroprotector en un modelo *in vitro*, al disminuir la respuesta inflamatoria tras la activación de los receptores CB₂ de las células de microglía y aumentar la viabilidad neuronal.
- El efecto neuroprotector del compuesto 1.56 fue confirmado en un modelo *in vivo* de daño mitocondrial e inflamación, observándose una restauración de la integridad tisular del tejido estriatal mediada por la acción del compuesto. Se verificó que el mecanismo por el cual el compuesto 1.56 ejerce este efecto neuroprotector, es mediante la reducción de la respuesta inflamatoria por activación de los receptores CB₂, disminuyendo el número de células microgliales activadas.
- El compuesto 1.56 no activó los receptores GPR55 y PPAR γ , demostrando que su efecto neuroprotector antiinflamatorio tiene lugar exclusivamente por la activación del receptor CB₂.

Bibliografía

A

Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG, Makriyannis A. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem.* 1994, 37(12):1889-93.

Abadji V, Lucas-Lenard JM, Chin C, Kendall DA. Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. *J Neurochem.* 1999, 72(5):2032-8.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010, 37(1):13-25.

Aboud ME. Allosteric Modulators: A Side Door. *J Med Chem.* 2016, 59(1):42-3.

Abu Aboud O, Wettersten HI, Weiss RH. Inhibition of PPAR α induces cell cycle arrest and apoptosis, and synergizes with glycolysis inhibition in kidney cancer cells. *PLoS One.* 2013, 8(8):e71115.

Abu Aboud O, Donohoe D, Bultman S, Fitch M, Riiff T, Hellerstein M, Weiss RH. PPAR α inhibition modulates multiple reprogrammed metabolic pathways in kidney cancer and attenuates tumor growth. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015, 308(11):C890-8.

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 2005, 19(12):1704-6.

Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem.* 2003, 278(33):30429-34.

Akirav I, Fattore L. Cannabinoid CB1 and Dopamine D1 Receptors Partnership in the Modulation of Emotional Neural Processing. *Front Behav Neurosci.* 2011, 5:67.

Akirav I. The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Front Behav Neurosci.* 2011, 5:34.

Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves KM. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci.* 2009, 30(2):79-84.

Aloisi F, Serafini B, Adorini L. Glia-T cell dialogue. *J Neuroimmunol.* 2000, 107(2):111-7.

Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M, Pertwee RG, Castillo AI, Romero J, Martínez-Orgado J. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res.* 2008, 64(6):653-8.

Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol.* 1999, 58(4):315-48.

Appendino G, Bellido ML, Muñoz R. Novel cannabigerol derivatives. WO2015/128200. 2015

Appendino G, Bellido ML, Muñoz R. Novel cannabidiol quinone derivatives. WO2015/158381. 2015

Arévalo-Martín A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2003, 23(7):2511-6.

Aso E, Juvés S, Maldonado R, Ferrer I. CB2 cannabinoid receptor agonist ameliorates Alzheimer-like phenotype in A β PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis.* 2013, 35(4):847-58.

Atwood BK, Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol.* 2010, 160(3):467-79.

Atwood BK, Lopez J, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics.* 2011, 12:14.

B

Bab I, Ofek O, Tam J, Rehnelt J, Zimmer A. Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism. *J Neuroendocrinol.* 2008, 20 Suppl 1:69-74.

Badowski ME, Perez SE. Clinical utility of dronabinol in the treatment of weight loss associated with HIV and AIDS. *HIV AIDS (Auckl).* 2016, 8:37-45.

Baillie GL, Horswill JG, Anavi-Goffer S, Reggio PH, Bolognini D, Abood ME, McAllister S, Strange PG, Stephens GJ, Pertwee RG, Ross RA. CB(1) receptor allosteric modulators display both agonist and signaling pathway specificity. *Mol Pharmacol.* 2013, 83(2):322-38.

Balenga NA, Martínez-Pinilla E, Kargl J, Schröder R, Peinhaupt M, Platzer W, Bálint Z, Zamarbide M, Dopeso-Reyes IG, Ricobaraza A, Pérez-Ortiz JM, Kostenis E, Waldhoer M, Heinemann A, Franco R. Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling. *Br J Pharmacol.* 2014, 171(23):5387-406.

Bar-Joseph A, Berkovitch Y, Adamchik J, Biegon A. Neuroprotective activity of HU-211, a novel NMDA antagonist, in global ischemia in gerbils. *Mol Chem Neuropathol.* 1994, 23(2-3):125-35.

Bayewitch M, Rhee MH, Avidor-Reiss T, Breuer A, Mechoulam R, Vogel Z. (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1996, 271(17):9902-5.

Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci.* 2003, 23(35):11136-41.

Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol.* 2008, 153(2):277-85.

Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol.* 1998, 353(1):23-31.

Bergman J, Delatte MS, Paronis CA, Vemuri K, Thakur GA, Makriyannis A. Some effects of CB1 antagonists with inverse agonist and neutral biochemical properties. *Physiol Behav.* 2008, 93(4-5):666-70.

Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Muñoz AL, Fuentes E, Juan-Pico P, Castro MJ, Milman G, Mechoulam R, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia.* 2008, 51(3):476-87.

Bertini S, Parkkari T, Savinainen JR, Arena C, Saccomanni G, Saguto S, Ligresti A, Allarà M, Bruno A, Marinelli L, Di Marzo V, Novellino E, Manera C, Macchia M. Synthesis, biological activity and molecular modeling of new biphenylic carboxamides as potent and selective CB2 receptor ligands. *Eur J Med Chem.* 2015, 90:526-36.

- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, 256(2):377-80.
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*. 2001, 134(4):845-52.
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005, 81(2):224-38.
- Bisogno T. Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2008, 20 Suppl 1:1-9.
- Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010, 9(5):564-73.
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*. 1990, 27(2-3):229-37.
- Blázquez C, Casanova ML, Planas A, Gómez Del Pulgar T, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Aragonés J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J*. 2003, 17(3):529-31.
- Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res*. 2008, 68(6):1945-52.
- Bolden A, Bernard L, Jones D, Akinyeke T, Stewart LV. The PPAR Gamma Agonist Troglitazone Regulates Erk 1/2 Phosphorylation via a PPARγ-Independent, MEK-Dependent Pathway in Human Prostate Cancer Cells. *PPAR Res*. 2012, 2012:929052.
- Bolognini D, Cascio MG, Parolaro D, Pertwee RG. AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. *Br J Pharmacol*. 2012, 165(8):2561-74.
- Bonaventura J, Rico AJ, Moreno E, Sierra S, Sánchez M, Luquin N, Farré D, Müller CE, Martínez-Pinilla E, Cortés A, Mallol J, Armentero MT, Pinna A, Canela EI, Lluís C, McCormick PJ, Lanciego JL, Casadó V, Franco R. L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A(2A) adenosine-CB(1) cannabinoid-D(2) dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology*. 2014, 79:90-100.
- Bouaboula M, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem*. 1995 Jun 9;270(23):13973-80.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*. 1995, 312 (Pt 2):637-41.
- Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARγ transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2005, 517(3):174-81.

- Bouchard JF, Lépiciér P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci.* 2003, 72(16):1859-70.
- Bradshaw HB, Walker JM. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *Br J Pharmacol.* 2005, 144(4):459-65.
- Bradshaw HB, Lee SH, McHugh D. Orphan endogenous lipids and orphan GPCRs: a good match. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009, 89(3-4):131-4.
- Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ. Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *J Neurochem.* 1999, 73(6):2447-59.
- Breivogel CS, Childers SR. Cannabinoid agonist signal transduction in rat brain: comparison of cannabinoid agonists in receptor binding, G-protein activation, and adenylyl cyclase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000, 295(1):328-36.
- Brown PJ, Stuart LW, Hurley KP, Lewis MC, Winegar DA, Wilson JG, Wilkison WO, Ittoop OR, Willson TM. Identification of a subtype selective human PPARalpha agonist through parallel-array synthesis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001, 11(9):1225-7.
- Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K. Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1576(3):255-64.
- Brown I, Cascio MG, Rotondo D, Pertwee RG, Heys SD, Wahle KW. Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Prog Lipid Res.* 2013, 52(1):80-109.
- Brown TT, Dobs AS. Endocrine effects of marijuana. *J Clin Pharmacol.* 2002, 42(11 Suppl):90S-96S.
- Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2007, 152(5):567-75.
- Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi ES. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse.* 2008, 62(12):944-9.
- Burstein SH, Rossetti RG, Yagen B, Zurier RB. Oxidative metabolism of anandamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000, 61(1-2):29-41.
- Busch-Petersen J, Hill WA, Fan P, Khanolkar A, Xie XQ, Tius MA, Makriyannis A. Unsaturated side chain beta-11-hydroxyhexahydrocannabinol analogs. *J Med Chem.* 1996, 39(19):3790-6.
- Bushlin I, Gupta A, Stockton SD Jr, Miller LK, Devi LA. Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS One.* 2012, 7(12):e49789.
- Butina D, Segall MD, Frankcombe K. Predicting ADME properties in silico: methods and models. *Drug Discov Today.* 2002, 7(11):S83-8.
- Butovsky E, Juknat A, Goncharov I, Elbaz J, Eilam R, Zangen A, Vogel Z. In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol. *J Neurochem.* 2005, 93(4):802-11.
- Bylund DB, Toews ML. Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am J Physiol.* 1993, 265(5 Pt 1):L421-9.

C

Cabral A. Marijuana and cannabinoids: Effects of infections, immunity and AIDS. *Journal of Cannabis Therapeutics* Russo E (ed). 2001, 1(3/4): 61-85

Cabral GA, Harmon KN, Carlisle SJ. Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation. *Adv Exp Med Biol*. 2001, 493:207-14.

Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol*. 2008, 153(2):240-51.

Cabral GA, Griffin-Thomas L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med*. 2009, 11:e3.

Caldwell MD, Hu SS, Viswanathan S, Bradshaw H, Kelly ME, Straiker A. A GPR18-based signalling system regulates IOP in murine eye. *Br J Pharmacol*. 2013, 169(4):834-43.

Caenazzo L, Hoehe MR, Hsieh WT, Berrettini WH, Bonner TI, Gershon ES. HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR). *Nucleic Acids Res*. 1991, 19(17):4798.

Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res*. 2006, 66(13):6615-21.

Calandra B, Portier M, Kernéis A, Delpech M, Carillon C, Le Fur G, Ferrara P, Shire D. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol*. 1999, 374(3):445-55.

Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortés A, Mallol J, Casadó V, Lanciego JL, Franco R, Lluís C, Canela EI, McCormick PJ. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem*. 2012, 287(25):20851-65.

Calvey TN, Williams NE. *Drug Action. Principles and Practice of Pharmacology for Anaesthetists*, Fifth Edition. 2008. Chapter 3:43-67

Capasso R, Izzo AA, Fezza F, Pinto A, Capasso F, Mascolo N, Di Marzo V. Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br J Pharmacol*. 2001, 134(5):945-50.

Carmona MC, Louche K, Lefebvre B, Pilon A, Hennuyer N, Audinot-Bouchez V, Fievet C, Torpier G, Formstecher P, Renard P, Lefebvre P, Dacquet C, Staels B, Casteilla L, Pénicaud L; Consortium of the French Ministry of Research and Technology. S 26948: a new specific peroxisome proliferator activated receptor gamma modulator with potent antidiabetes and antiatherogenic effects. *Diabetes*. 2007, 56(11):2797-808.

Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G, Iovanna JL. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res*. 2006, 66(13):6748-55.

Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*. 2004, 65(4):999-1007.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997, 389(6653):816-24.

Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*. 2001, 24:487-517.

Cawston EE, Connor M, Di Marzo V, Silvestri R, Glass M. Distinct Temporal Fingerprint for Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Signaling of Indole-2-carboxamides as Allosteric Modulators of the Cannabinoid Receptors. *J Med Chem*. 2015, 58(15):5979-88.

Celinski K, Dworzanski T, Fornal R, Korolczuk A, Madro A, Brzozowski T, Slomka M. Comparison of anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in prophylactic treatment of experimental colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2013, 64(5):587-95.

Chen R, Zhang J, Wu Y, Wang D, Feng G, Tang YP, Teng Z, Chen C. Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep*. 2012, 2(5):1329-39.

Chen W, Gao R, Xie X, Zheng Z, Li H, Li S, Dong F, Wang L. A metabolomic study of the PPAR δ agonist GW501516 for enhancing running endurance in Kunming mice. *Sci Rep*. 2015, 5:9884.

Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*. 1973, 22(23):3099-108.

Chevalleyre V, Castillo PE. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*. 2003, 38(3):461-72.

Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J. Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem*. 2012, 287(41):34660-82.

Childers SR, Pacheco MA, Bennett BA, Edwards TA, Hampson RE, Mu J, Deadwyler SA. Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochem Soc Symp*. 1993, 59:27-50.

Childers SR, Deadwyler SA. Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1996, 52(6):819-27.

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem*. 2003, 278(16):13633-9.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature*. 2001 Jun, 411(6840):957-62.

Collin M, Thiernemann C. The PPAR-gamma ligand 15-deoxy(δ 12,14) prostaglandin J₂ reduces the liver injury in endotoxic shock. *Eur J Pharmacol*. 2003, 476(3):257-8.

Collin M, Murch O, Thiernemann C. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonists GW9662 and T0070907 reduce the protective effects of lipopolysaccharide preconditioning against organ failure caused by endotoxemia. *Crit Care Med*. 2006, 34(4):1131-8.

Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Benetti E, Gallicchio M, Dianzani C, Danni O, Thiernemann C, Fantozzi R. Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral

ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643. *Free Radic Biol Med.* 2006, 41(4):579-89.

Console-Bram L, Brailoiu E, Brailoiu GC, Sharir H, Abood ME. Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: a tale of biased agonism. *Br J Pharmacol.* 2014, 171(16):3908-17.

Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest.* 2003, 112(3):423-31.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 1996, 384(6604):83-7.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98(16):9371-6.

Croxford JL, Miller SD. Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212. *J Clin Invest.* 2003, 111(8):1231-40.

Cumella J, Hernández-Folgado L, Girón R, Sánchez E, Morales P, Hurst DP, Gómez-Cañas M, Gómez-Ruiz M, Pinto DC, Goya P, Reggio PH, Martín MI, Fernández-Ruiz J, Silva AM, Jagerovic N. Chromenopyrazoles: non-psychoactive and selective CB₁ cannabinoid agonists with peripheral antinociceptive properties. *ChemMedChem.* 2012, 7(3):452-63.

D

D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, Raso GM, Cuzzocrea S, Lo Verme J, Piomelli D, Meli R, Calignano A. Acute intracerebroventricular administration of palmitoylethanolamide, an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist, modulates carrageenan-induced paw edema in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007, 322(3):1137-43.

D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, Mattace Raso G, Cuzzocrea S, Loverme J, Piomelli D, Meli R, Calignano A. Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-kappaB nuclear signalling in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol.* 2009, 613(1-3):54-9.

D'Ambra TE, Estep KG, Bell MR, Eissenstat MA, Josef KA, Ward SJ, Haycock DA, Baizman ER, Casiano FM, Beglin NC, et al. Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 1992, 35(1):124-35.

D'Souza DC, Perry E, MacDougall L, Ammerman Y, Cooper T, Wu YT, Braley G, Gueorguieva R, Krystal JH. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 2004, 29(8):1558-72.

Davies SS, Pontsler AV, Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Hinshaw JC, Prestwich GD, Hilaire AS, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem.* 2001, 276(19):16015-23.

Davis MI, Ronesi J, Lovinger DM. A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2003, 278(49):48973-80.

- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett.* 2000, 483(1):52-6.
- De Petrocellis L, Chu CJ, Moriello AS, Kellner JC, Walker JM, Di Marzo V. Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *Br J Pharmacol.* 2004, 143(2):251-6.
- De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, Nigam S, Di Marzo V. Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res.* 2007, 313(14):2993-3004.
- De Petrocellis L, Di Marzo V. Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium.* 2009, 45(6):611-24.
- De Petrocellis L, Di Marzo V. Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010, 5(1):103-21.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol.* 2011, 163(7):1479-94.
- Deiana V, Gómez-Cañas M, Pazos MR, Fernández-Ruiz J, Asproni B, Cichero E, Fossa P, Muñoz E, Deligia F, Murineddu G, García-Arencibia M, Pinna GA. Tricyclic pyrazoles. Part 8. Synthesis, biological evaluation and modelling of tricyclic pyrazole carboxamides as potential CB2 receptor ligands with antagonist/inverse agonist properties. *Eur J Med Chem.* 2016, 112:66-80.
- Del Río C, Navarrete C, Collado JA, Bellido ML, Gómez-Cañas M, Pazos MR, Fernández-Ruiz J, Pollastro F, Appendino G, Calzado MA, Cantarero I, Muñoz E. The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CB2 pathways. *Sci Rep.* 2016, 6:21703.
- Deng L, Guindon J, Cornett BL, Makriyannis A, Mackie K, Hohmann AG. Chronic cannabinoid receptor 2 activation reverses paclitaxel neuropathy without tolerance or cannabinoid receptor 1-dependent withdrawal. *Biol Psychiatry.* 2015, 77(5):475-87.
- Deupree JD, Bylund DB. Basic principles and techniques for receptor binding. Tocris Cookson, Manley S, Barcker N (ed). *Tocris Review.* 2002, 18: 1-7
- Deutsch DG, Glaser ST, Howell JM, Kunz JS, Puffenbarger RA, Hillard CJ, Abumrad N. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J Biol Chem.* 2001, 276(10):6967-73.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988, 34(5):605-13.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992, 258(5090):1946-9.
- Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci.* 2006, 29:135-61.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994, 372(6507):686-91.

Di Marzo V, Fontana A. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995, 53(1):1-11.

Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J*. 1998, 331 (Pt 1):15-9.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Brandi I, Jefferson RG, Winckler RL, Davis JB, Dasse O, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR. Highly selective CB(1) cannabinoid receptor ligands and novel CB(1)/VR(1) vanilloid receptor "hybrid" ligands. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 281(2):444-51.

Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J*. 2001, 358(Pt 1):249-55.

Di Marzo V, De Petrocellis L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012, 367(1607):3216-28.

Diana MA, Marty A. Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *Br J Pharmacol*. 2004, 142(1):9-19.

Díaz-Alonso J, Paraíso-Luna J, Navarrete C, Del Río C, Cantarero I, Palomares B, Aguarales J, Fernández-Ruiz J, Bellido ML, Pollastro F, Appendino G, Calzado MA, Galve-Roperh I, Muñoz E. VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington's disease. *Sci Rep*. 2016, 6:29789.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(16):10819-24.

Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*. 1999, 81(3):163-221.

Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001, 36(2):180-90.

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009, 30(4):379-87.

Downer EJ, Clifford E, Amu S, Fallon PG, Moynagh PN. The synthetic cannabinoid R(+)-WIN55,212-2 augments interferon- β expression via peroxisome proliferator-activated receptor- α . *J Biol Chem*. 2012, 287(30):25440-53.

E

Edvardsson U, Bergström M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B, Dahllöf B. Rosiglitazone (BRL49653), a PPAR γ -selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J Lipid Res*. 1999, 40(7):1177-84.

Egan WJ, Lauri G. Prediction of intestinal permeability. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002, 54(3):273-89.

Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci.* 1998, 265(1410):2081-5.

El Manira A, Kyriakatos A. The role of endocannabinoid signaling in motor control. *Physiology (Bethesda).* 2010, 25(4):230-8.

Elphick MR. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012, 367(1607):3201-15.

Espejo-Porras F, Piscitelli F, Verde R, Ramos JA, Di Marzo V, de Lago E, Fernández-Ruiz J. Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015, 10(2):233-44.

Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, Iuvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett.* 2006, 399(1-2):91-5.

F

Fagan SG, Campbell VA. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *Br J Pharmacol.* 2014, 171(6):1347-60.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 1995, 48(3):443-50.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 1996, 393(2-3):231-5.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, Koppel GA, Brownstein M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 284(1):291-7.

Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Nuñez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res.* 2006, 60(2):169-73.

Fernández-López D, Pazos MR, Tolón RM, Moro MA, Romero J, Lizasoain I, Martínez-Orgado J. The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatr Res.* 2007, 62(3):255-60.

Fernández-López D, Lizasoain I, Moro MA, Martínez-Orgado J. Cannabinoids: well-suited candidates for the treatment of perinatal brain injury. *Brain Sci.* 2013, 3(3):1043-59.

Fernández-Ruiz JJ, González S, Sagredo O, De Miguel R, Ramos JA. Endocannabinoids and alcohol addiction. *Recent Advances in Pharmacology and Physiology of Cannabinoids.* 2004: 237-246

- Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?. *Trends Pharmacol Sci.* 2007, 28(1):39-45.
- Fernández-Ruiz J, Pazos MR, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos JA. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol.* 2008, 286(1-2 Suppl 1):S91-6.
- Fernández-Ruiz J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2009, 156(7):1029-40.
- Fernández-Ruiz J, García C, Sagredo O, Gómez-Ruiz M, de Lago E. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin Ther Targets.* 2010, 14(4):387-404.
- Fernández-Ruiz J, Moreno-Martet M, Rodríguez-Cueto C, Palomo-Garo C, Gómez-Cañas M, Valdeolivas S, Guaza C, Romero J, Guzmán M, Mechoulam R, Ramos JA. Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol.* 2011, 163(7):1365-78.
- Fernández-Ruiz J, Sagredo O, Pazos MR, García C, Pertwee R, Mechoulam R, Martínez-Orgado J. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid?. *Br J Clin Pharmacol.* 2013, 75(2):323-33.
- Fernández-Ruiz J, de Lago E, Gómez-Ruiz M, García C, Sagredo O, García-Arencibia M. Neurodegenerative Disorders Other Than Multiple Sclerosis. *Handbook of Cannabis*, Pertwee RG (ed). Oxford University Press. 2014, (pp) 505-525.
- Fernández-Ruiz J, Romero J, Ramos JA. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Pertwee RG (ed.). Endocannabinoids. 2015, (pp) 235-253.
- Ferré P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 2004, 53 Suppl 1:S43-50.
- Ferré S. The GPCR heterotetramer: challenging classical pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2015, 36(3):145-52.
- Feuerstein G, Wang X, Barone FC. Cytokines in brain ischemia-the role of TNF alpha. *Cell Mol Neurobiol.* 1998, 18(6):695-701.
- Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, Fuxe K, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Mackie K, Milligan G, Pflieger KD, Pin JP, Volkow ND, Waldhoer M, Woods AS, Franco R. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* 2009, 5(3):131-4.
- Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules.* 2014, 19(11):17078-106.
- Fimiani C, Liberty T, Aquirre AJ, Amin I, Ali N, Stefano GB. Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1999, 57(1):23-34.
- Fogaça MV, Galve-Roperh I, Guimarães FS, Campos AC. Cannabinoids, Neurogenesis and Antidepressant Drugs: Is there a Link?. *Curr Neuropharmacol.* 2013, 11(3):263-75.
- Fong TM, Guan XM, Marsh DJ, Shen CP, Stribling DS, Rosko KM, Lao J, Yu H, Feng Y, Xiao JC, Van der Ploeg LH, Goulet MT, Hagmann WK, Lin LS, Lanza TJ Jr, Jewell JP, Liu P, Shah SK, Qi H, Tong X, Wang J, Xu SS, Francis B, Strack AM, MacIntyre DE, Shearman LP. Antiobesity efficacy of a novel cannabinoid-1 receptor inverse agonist, N-[(1S,2S)-3-(4-chlorophenyl)-2-(3-cyanophenyl)-1-

methylpropyl]-2-methyl-2-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]propanamide (MK-0364), in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007, 321(3):1013-22.

Fowler CJ, Rojo ML, Rodríguez-Gaztelumendi A. Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity?. *Exp Neurol.* 2010, 224(1):37-47.

Fowler CJ. Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. *FEBS J.* 2013, 280(9):1895-904.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* 2003, 425(6953):90-3.

Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology.* 2005, 48(8):1147-53.

Fulp A, Bortoff K, Seltzman H, Zhang Y, Mathews J, Snyder R, Fennell T, Maitra R. Design and synthesis of cannabinoid receptor 1 antagonists for peripheral selectivity. *J Med Chem.* 2012, 55(6):2820-34.

Fulp A, Bortoff K, Zhang Y, Snyder R, Fennell T, Marusich JA, Wiley JL, Seltzman H, Maitra R. Peripherally selective diphenyl purine antagonist of the CB1 receptor. *J Med Chem.* 2013, 56(20):8066-72.

G

Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol.* 1998, 36(2):249-66.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995, 232(1):54-61.

Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Guay D, Leblanc Y, Prasit P, Rochette C, Sawyer N, Slipetz DM, Tremblay N, et al. New class of potent ligands for the human peripheral cannabinoid receptor. *Bioorg Med Chem* 1996, 6:2263–2268.

Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist.* 2007, 13(2):109-14.

Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des.* 2008, 14(23):2279-88.

Gaoni Y, Mechouylam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86 (8): 1646–1647.

García C, Palomo-Garo C, García-Arencia M, Ramos J, Pertwee R, Fernández-Ruiz J. Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* 2011, 163(7):1495-506.

Gareau Y, Dufresne C, Gallant M, Rochette C, Sawyer N, Slipetz DM, Tremblay N, Weech PK, Metters KM, Labelle M. Structure activity relationships of tetrahydrocannabinol analogues on human cannabinoid receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 1996, 6(2):189–194.

- Garrett ER, Hunt CA. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci.* 1974, 63(7):1056-64.
- Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agrò AF, Maccarrone M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci.* 2007, 64(2):219-29.
- Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol.* 1996, 307(3):331-8.
- Gatley SJ, Lan R, Volkow ND, Pappas N, King P, Wong CT, Gifford AN, Pyatt B, Dewey SL, Makriyannis A. Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo. *J Neurochem.* 1998, 70(1):417-23.
- Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, Treanor JJ. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem.* 2004, 279(19):20283-95.
- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 1991, 279 (Pt 1):129-34.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci.* 2002, 5(5):446-51.
- Gertsch J1, Schoop R, Kuenzle U, Suter A. Echinacea alkylamides modulate TNF-alpha gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* 2004, 577(3):563-9.
- Giacoppo S, Mandolino G, Galuppo M, Bramanti P, Mazzon E. Cannabinoids: new promising agents in the treatment of neurological diseases. *Molecules.* 2014, 19(11):18781-816.
- Giuliano M, Pellerito O, Portanova P, Calvaruso G, Santulli A, De Blasio A, Vento R, Tesoriere G. Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor PPARgamma. *Biochimie.* 2009, 91(4):457-65.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience.* 1997, 77(2):299-318.
- Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci.* 1997, 17(14):5327-33.
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009, 89(3-4):105-11.
- Gombar VK, Silver IS, Zhao Z. Role of ADME characteristics in drug discovery and their in silico evaluation: in silico screening of chemicals for their metabolic stability. *Curr Top Med Chem.* 2003, 3(11):1205-25.
- Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J.* 2000, 347(Pt 2):369-73.
- Gómez del Pulgar T, Velasco G, Sánchez C, Haro A, Guzmán M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J.* 2002, 363(Pt 1):183-8.

Gómez-Gálvez Y, Palomo-Garo C, Fernández-Ruiz J, García C. Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016, 64:200-8.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 2006, 1071(1):10-23.

Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1999, 57(4):417-23.

Goutopoulos A, Fan P, Khanolkar AD, Xie XQ, Lin S, Makriyannis A. Stereochemical selectivity of methanandamides for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and their metabolic stability. *Bioorg Med Chem*. 2001, 9(7):1673-84.

Goutopoulos A, Makriyannis A. From cannabis to cannabinergics: new therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2002, 95(2):103-17.

Graham TL, Mookherjee C, Suckling KE, Palmer CN, Patel L. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis*. 2005, 181(1):29-37.

Granja AG, Carrillo-Salinas F, Pagani A, Gómez-Cañas M, Negri R, Navarrete C, Mecha M, Mestre L, Fiebich BL, Cantarero I, Calzado MA, Bellido ML, Fernández-Ruiz J, Appendino G, Guaza C, Muñoz E. A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012, 7(4):1002-16.

Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, Abood ME. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol*. 1999, 377(1):117-25.

Guindon J, Hohmann AG. A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br J Pharmacol*. 2008, 153(7):1341-3.

Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009, 8(6):403-21.

Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*. 2004, 20(2):441-58.

Gunthorpe MJ, Harries MH, Prinjha RK, Davis JB, Randall A. Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol*. 2000, 525 Pt 3:747-59.

Guzmán M, Sánchez C. Effects of cannabinoids on energy metabolism. *Life Sci*. 1999, 65(6-7):657-64.

Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem*. 2004, 279(27):27849-54.

H

Hack K, Reilly L, Palmer C, Read KD, Norval S, Kime R, Booth K, Foerster J. Skin-targeted inhibition of PPAR β/δ by selective antagonists to treat PPAR β/δ -mediated psoriasis-like skin disease in vivo. *PLoS One*. 2012, 7(5):e37097.

- Hamilton JA, Era S, Bhamidipati SP, Reed RG. Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88(6):2051-4.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem*. 1998, 70(2):671-6.
- Hampson AJ, Grimaldi M. Cannabinoid receptor activation and elevated cyclic AMP reduce glutamate neurotoxicity. *Eur J Neurosci*. 2001, 13(8):1529-36.
- Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem*. 1993, 36(20):3032-4.
- Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(25):14228-33.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(7):3662-5
- Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci*. 2007, 28(2):83-92.
- Hasegawa-Moriyama M, Kurimoto T, Nakama M, Godai K, Kojima M, Kuwaki T, Kanmura Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates inflammatory pain through the induction of heme oxygenase-1 in macrophages. *Pain*. 2013, 154(8):1402-12.
- Henry DJ, Chavkin C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett*. 1995, 186(2-3):91-4.
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J*. 2009, 23(1):183-93.
- Henstridge CM, Balenga NA, Schröder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, Arthur S, Penman J, Whistler JL, Kostenis E, Waldhoer M, Irving AJ. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol*. 2010, 160(3):604-14.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991, 11(2):563-83.
- Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, Guzmán M, Velasco G. p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Lett*. 2005, 579(22):5084-8.
- Herring AC, Faubert Kaplan BL, Kaminski NE. Modulation of CREB and NF-kappaB signal transduction by cannabitol in activated thymocytes. *Cell Signal*. 2001, 13(4):241-50.
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther*. 1999, 289(3):1427-33.
- Hillard CJ, Jarrahan A. The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem Phys Lipids*. 2000, 108(1-2):123-34.

Hillard CJ. Endocannabinoids and the Endocrine System in Health and Disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2015, 231:317-39.

Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, Bonner TI. Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol*. 1991, 3(9):880-5.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*. 2005, 435(7045):1108-12.

Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y. μ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci*. 2008, 108(3):308-19.

Hong Y, Zhou Y, Wang Y, Xiao S, Liao DJ, Zhao Q. PPAR γ mediates the effects of WIN55,212-2, an synthetic cannabinoid, on the proliferation and apoptosis of the BEL-7402 hepatocarcinoma cells. *Mol Biol Rep*. 2013, 40(11):6287-93.

Horswill JG, Bali U, Shaaban S, Keily JF, Jeevaratnam P, Babbs AJ, Reynet C, Wong Kai In P. PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist at cannabinoid CB1 receptors with hypophagic effects in rats. *Br J Pharmacol*. 2007, 152(5):805-14.

Horváth B, Magid L, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Rajesh M, Park O, Tanchian G, Gao RY, Goodfellow CE, Glass M, Mechoulam R, Pacher P. A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Br J Pharmacol*. 2012, 165(8):2462-78.

Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*. 1986, 29(3):307-13.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002, 54(2):161-202.

Howlett AC, Reggio PH, Childers SR, Hampson RE, Ulloa NM, Deutsch DG. Endocannabinoid tone versus constitutive activity of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 2011, 163(7):1329-43.

Hu SS, Bradshaw HB, Chen JS, Tan B, Walker JM. Prostaglandin E2 glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NF κ B activity. *Br J Pharmacol*. 2008, 153(7):1538-49.

Hu SS, Ho YC, Chiou LC. No more pain upon Gq-protein-coupled receptor activation: role of endocannabinoids. *Eur J Neurosci*. 2014, 39(3):467-84.

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(12):8400-5.

Huffman JW, Yu S, Showalter V, Abood ME, Wiley JL, Compton DR, Martin BR, Bramblett RD, Reggio PH. Synthesis and pharmacology of a very potent cannabinoid lacking a phenolic hydroxyl with high affinity for the CB2 receptor. *J Med Chem*. 1996, 39(20):3875-7.

Huffman JW, Yu S, Liddle J, Wiley JL, Abood M, Martin BR, Aung MM. 1-Deoxy-1,1-dimethylalkyl-8-THC derivatives: selective ligands for the CB2 receptor. Symposium on the Cannabinoids; 1999, pp 10, International Cannabinoid Research Society, Burlington, Vermont.

Huffman JW1, Liddle J, Yu S, Aung MM, Abood ME, Wiley JL, Martin BR. 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorg Med Chem*. 1999, 7(12):2905-14.

Hui K, Liu B, Qin F. Capsaicin activation of the pain receptor, VR1: multiple open states from both partial and full binding. *Biophys J*. 2003, 84(5):2957-68.

Hussain SA, Zhou R, Jacobson C, Weng J, Cheng E, Lay J, Hung P, Lerner JT, Sankar R. Perceived efficacy of cannabidiol-enriched cannabis extracts for treatment of pediatric epilepsy: A potential role for infantile spasms and Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsy Behav*. 2015, 47:138-41.

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97(11):6155-60.

I

Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP Jr. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100(18):10529-33.

Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol*. 1996, 118(8):2023-8.

Iwamura H, Suzuki H, Ueda Y, Kaya T, Inaba T. In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, 296(2):420-5.

J

Jääntti MH, Mandrika I, Kukkonen JP. Human orexin/hypocretin receptors form constitutive homo- and heteromeric complexes with each other and with human CB1 cannabinoid receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, 445(2):486-90.

Jarrahian A, Manna S, Edgemond WS, Campbell WB, Hillard CJ. Structure-activity relationships among N-arachidonyl ethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J Neurochem*. 2000, 74(6):2597-606.

Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V. Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol*. 2007, 36(1):26-35.

Jiang LH, Gamper N, Beech DJ. Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. *Curr Drug Targets*. 2011, 12(5):724-36.

Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, Dowell S, Staton PC, Green P, Shabon U, Bao W, Aiyar N, Yue TL, Brown AJ, Morrison AD, Douglas SA. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol*. 2007, 152(5):825-31.

Johnson JR, Lossignol D, Burnell-Nugent M, Fallon MT. An open-label extension study to investigate the long-term safety and tolerability of THC/CBD oromucosal spray and oromucosal THC spray in patients with terminal cancer-related pain refractory to strong opioid analgesics. *J Pain Symptom Manage.* 2013, 46(2):207-18.

Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001, 133(8):1263-75.

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.* 2002, 55(3):619-25.

K

Kallendrusch S, Kremzow S, Nowicki M, Grabiec U, Winkelmann R, Benz A, Kraft R, Bechmann I, Dehghani F, Koch M. The G protein-coupled receptor 55 ligand l- α -lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. *Glia.* 2013, 61(11):1822-31.

Kaminski NE. Inhibition of the cAMP signaling cascade via cannabinoid receptors: a putative mechanism of immune modulation by cannabinoid compounds. *Toxicol Lett.* 1998, 102-103:59-63.

Kane CD, Stevens KA, Fischer JE, Haghpassand M, Royer LJ, Aldinger C, Landschulz KT, Zagouras P, Bagley SW, Hada W, Dullea R, Hayward CM, Francone OL. Molecular characterization of novel and selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists with robust hypolipidemic activity in vivo. *Mol Pharmacol.* 2009, 75(2):296-306.

Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem.* 2009, 284(43):29817-27

Kargl J, Balenga NA, Platzer W, Martini L, Whistler JL, Waldhoer M. The GPCR-associated sorting protein 1 regulates ligand-induced down-regulation of GPR55. *Br J Pharmacol.* 2012, 165(8):2611-9.

Kargl J, Balenga N, Parzmair GP, Brown AJ, Heinemann A, Waldhoer M. The cannabinoid receptor CB1 modulates the signaling properties of the lysophosphatidylinositol receptor GPR55. *J Biol Chem.* 2012, 287(53):44234-48.

Karimian Azari E, Leitner C, Jaggi T, Langhans W, Mansouri A. Possible role of intestinal fatty acid oxidation in the eating-inhibitory effect of the PPAR- α agonist Wy-14643 in high-fat diet fed rats. *PLoS One.* 2013, 8(9):e74869.

Karsak M, Cohen-Solal M, Freudenberg J, Ostertag A, Morieux C, Kornak U, Essig J, Erxlebe E, Bab I, Kubisch C, de Vernejoul MC, Zimmer A. Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis. *Hum Mol Genet.* 2005, 14(22):3389-96.

Kenakin T. The physiological significance of constitutive receptor activity. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 2005, (26)12:603-630

Khanolkar AD, Abadji V, Lin S, Hill WA, Taha G, Abouzid K, Meng Z, Fan P, Makriyannis A. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J Med Chem.* 1996, 39(22):4515-9.

Khurana L, Ali HI, Olszewska T, Ahn KH, Damaraju A, Kendall DA, Lu D. Optimization of chemical functionalities of indole-2-carboxamides to improve allosteric parameters for the cannabinoid receptor 1 (CB1). *J Med Chem.* 2014, 57(7):3040-52.

Kim K, Moore DH, Makriyannis A, Abood ME. AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2006, 542(1-3):100-5.

Kim J, Li Y. Chronic activation of CB2 cannabinoid receptors in the hippocampus increases excitatory synaptic transmission. *J Physiol.* 2015, 593(4):871-86.

Kinsey SG, Mahadevan A, Zhao B, Sun H, Naidu PS, Razdan RK, Selley DE, Imad Damaj M, Lichtman AH. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacology.* 2011, 60(2-3):244-51.

Klein TW, Cabral GA. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006, 1(1):50-64.

Kogan NM, Rabinowitz R, Levi P, Gibson D, Sandor P, Schlesinger M, Mechoulam R. Synthesis and antitumor activity of quinonoid derivatives of cannabinoids. *J Med Chem.* 2004, 47(15):3800-6.

Kohno M, Hasegawa H, Inoue A, Muraoka M, Miyazaki T, Oka K, Yasukawa M. Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 347(3):827-32.

Kondo S, Kondo H, Nakane S, Kodaka T, Tokumura A, Waku K, Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* 1998, 429(2):152-6.

Koufany M, Jouzeau JY, Moulin D. Fenofibrate vs pioglitazone: Comparative study of the anti-arthritic potencies of PPAR-alpha and PPAR-gamma agonists in rat adjuvant-induced arthritis. *Biomed Mater Eng.* 2014, 24(1 Suppl):81-8.

Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem.* 2002, 277(26):23278-86.

Kozak KR, Marnett LJ. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002, 66(2-3):211-20.

Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Prudhomme DR, Marnett LJ. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry.* 2003, 42(30):9041-9.

Kozłowska H, Baranowska M, Schlicker E, Kozłowski M, Laudański J, Malinowska B. Identification of the vasodilatory endothelial cannabinoid receptor in the human pulmonary artery. *J Hypertens.* 2007, 25(11):2240-8.

Kozłowska H, Baranowska M, Schlicker E, Kozłowski M, Laudański J, Malinowska B. Virodhamine relaxes the human pulmonary artery through the endothelial cannabinoid receptor and indirectly through a COX product. *Br J Pharmacol.* 2008, 155(7):1034-42.

L

Lamounier RN, Coimbra CN, White P, Costal FL, Oliveira LS, Giannella-Neto D, Kaestner KH, Corrêa-Giannella ML. Apoptosis rate and transcriptional response of pancreatic islets exposed to the PPAR gamma agonist Pioglitazone. *Diabetol Metab Syndr.* 2013, 5(1):1.

- Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem.* 1999, 42(4):769-76.
- Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, Makriyannis A. Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci.* 1999, 1(2):E4.
- Lanciego JL, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Conte-Perales L, Callén L, Roda E, Gómez-Bautista V, López IP, Lluis C, Labandeira-García JL, Franco R. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J Psychopharmacol.* 2011, 25(1):97-104.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 105(7):2699-704.
- Laviolette SR, Grace AA. Cannabinoids Potentiate Emotional Learning Plasticity in Neurons of the Medial Prefrontal Cortex through Basolateral Amygdala Inputs. *J Neurosci.* 2006, 26(24):6458-68.
- Laviolette SR, Grace AA. The roles of cannabinoid and dopamine receptor systems in neural emotional learning circuits: implications for schizophrenia and addiction. *Cell Mol Life Sci.* 2006, 63(14):1597-613.
- Leo A, Russo E, Elia M. Cannabidiol and epilepsy: Rationale and therapeutic potential. *Pharmacol Res.* 2016, 107:85-92.
- Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF. Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry.* 2006, 45(15):4720-6.
- Ligresti A, Cascio MG, Pryce G, Kulasegram S, Beletskaya I, De Petrocellis L, Saha B, Mahadevan A, Visintin C, Wiley JL, Baker D, Martin BR, Razdan RK, Di Marzo V. New potent and selective inhibitors of anandamide reuptake with antispastic activity in a mouse model of multiple sclerosis. *Br J Pharmacol.* 2006, 147(1):83-91.
- Lim HJ, Lee S, Park JH, Lee KS, Choi HE, Chung KS, Lee HH, Park HY. PPAR delta agonist L-165041 inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle. *Atherosclerosis.* 2009, 202(2):446-54.
- Lin S, Khanolkar AD, Fan P, Goutopoulos A, Qin C, Papahadjis D, Makriyannis A. Novel analogues of arachidonylethanolamide (anandamide): affinities for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and metabolic stability. *J Med Chem.* 1998, 41(27):5353-61.
- Lin YC, Uang HW, Lin RJ, Chen IJ, Lo YC. Neuroprotective effects of glyceryl nonivamide against microglia-like cells and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007, 323(3):877-87.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001, 46(1-3):3-26.
- Little PJ, Martin BR. The effects of delta 9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on cAMP accumulation in synaptosomes. *Life Sci.* 1991, 48(12):1133-41.

Liu J, Li H, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD. Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol Pharmacol*. 2003, 63(5):983-92.

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, Razdan RK, Kunos G. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*. 2008, 54(1):1-7.

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol*. 2005, 67(1):15-9.

Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavón FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*. 2009, 5(1):37-44.

López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Fowler CJ, Tiger G, de Lago E, Fernández-Ruiz J, Ramos JA. Design, synthesis, and biological evaluation of new inhibitors of the endocannabinoid uptake: comparison with effects on fatty acid amidohydrolase. *J Med Chem*. 2003, 46(8):1512-22.

Lynn AB, Herkenham M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994, 268(3):1612-23.

M

Maccarrone M, Cartoni A, Parolaro D, Margonelli A, Massi P, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 2002, 21(1):126-40.

Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci*. 2010, 35(11):601-8.

Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*. 1995, 15(10):6552-61.

Mackie K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci*. 2005, 77(14):1667-73.

Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 2005, (168):299-325.

Mackie K. Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2008, 286(1-2 Suppl 1):S60-5.

Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 2007, 445(7127):541-5.

Madeira JM, Schindler SM, Klegeris A. A new look at auranofin, dextromethorphan and rosiglitazone for reduction of glia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2015, 10(3):391-3.

Mahmoud MM, Ali HI, Ahn KH, Damaraju A, Samala S, Pulipati VK, Kolluru S, Kendall DA, Lu D. Structure-activity relationship study of indole-2-carboxamides identifies a potent allosteric modulator for the cannabinoid receptor 1 (CB1). *J Med Chem*. 2013, 56(20):7965-75.

- Mancini I, Brusa R, Quadrato G, Foglia C, Scandroglio P, Silverman LS, Tulshian D, Reggiani A, Beltramo M. Constitutive activity of cannabinoid-2 (CB2) receptors plays an essential role in the protean agonism of (+)AM1241 and L768242. *Br J Pharmacol*. 2009, 158(1):382-91.
- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem*. 2002, 80(3):448-56.
- Marsicano G, Lutz B. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest*. 2006, 29(3 Suppl):27-46.
- Marsicano G, Lafenêtre P. Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. *Curr Top Behav Neurosci*. 2009, 1:201-30.
- Martin BR, Wiley JL, Beletskaya I, Sim-Selley LJ, Smith FL, Dewey WL, Cottney J, Adams J, Baker J, Hill D, Saha B, Zerkowski J, Mahadevan A, Razdan RK. Pharmacological characterization of novel water-soluble cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006, 318(3):1230-9.
- Martínez-Pinilla E, Reyes-Resina I, Oñatibia-Astibia A, Zamarbide M, Ricobaraza A, Navarro G, Moreno E, Dopeso-Reyes IG, Sierra S, Rico AJ, Roda E, Lanciego JL, Franco R. CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp Neurol*. 2014, 261:44-52.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990, 346(6284):561-4.
- Maurelli S, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Luccia A, Marino G, Di Marzo V. Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. *FEBS Lett*. 1995, 377(1):82-6.
- May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007, 47:1-51.
- May MB, Glode AE. Dronabinol for chemotherapy-induced nausea and vomiting unresponsive to antiemetics. *Cancer Manag Res*. 2016, 8:49-55.
- McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, Bradshaw HB. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci*. 2010, 11:44.
- McHugh D, Page J, Dunn E, Bradshaw HB. $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonoyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br J Pharmacol*. 2012, 165(8):2414-24.
- McHugh D, Wager-Miller J, Page J, Bradshaw HB. siRNA knockdown of GPR18 receptors in BV-2 microglia attenuates N-arachidonoyl glycine-induced cell migration. *J Mol Signal*. 2012, 7(1):10.
- McHugh D. GPR18 in microglia: implications for the CNS and endocannabinoid system signalling. *Br J Pharmacol*. 2012, 167(8):1575-82.
- McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene*. 2006, 370:64-74.
- McPartland JM, Agraval J, Gleeson D, Heasman K, Glass M. Cannabinoid receptors in invertebrates. *J Evol Biol*. 2006, 19(2):366-73.

- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995,50(1):83-90.
- Mechoulam R. Looking back at Cannabis research. *Curr Pharm Des.* 2000, 6(13):1313-22.
- Mensch J, Oyarzabal J, Mackie C, Augustijns P. In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *J Pharm Sci.* 2009, 98(12):4429-68.
- Mestre L, Docagne F, Correa F, Loría F, Hernangómez M, Borrell J, Guaza C. A cannabinoid agonist interferes with the progression of a chronic model of multiple sclerosis by downregulating adhesion molecules. *Mol Cell Neurosci.* 2009, 40(2):258-66.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol.* 1995, 11(3-4):187-94.
- Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ. Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res.* 2002, 67(6):829-36.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci.* 2002, 22(22):9742-53.
- Montero C, Campillo NE, Goya P, Páez JA. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur J Med Chem.* 2005, 40(1):75-83.
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006, 110(3):371-85.
- Morales P, Gómez-Cañas M, Navarro G, Hurst DP, Carrillo-Salinas FJ, Lagartera L, Pazos R, Goya P, Reggio PH, Guaza C, Franco R, Fernández-Ruiz J, Jagerovic N. Chromenopyrazole, a Versatile Cannabinoid Scaffold with in Vivo Activity in a Model of Multiple Sclerosis. *J Med Chem.* 2016.
- Moreira FA, Lutz B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol.* 2008, 13(2):196-212.
- Moreno E, Andradas C, Medrano M, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, Blasco-Benito S, Gómez-Cañas M, Pazos MR, Irving AJ, Lluís C, Canela EI, Fernández-Ruiz J, Guzmán M, McCormick PJ, Sánchez C. Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *J Biol Chem.* 2014, 289(32):21960-72.
- Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A. GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. *Curr Med Chem.* 2010, 17(14):1411-29.
- Movahed P, Jönsson BA, Birnir B, Wingstrand JA, Jørgensen TD, Ermund A, Sterner O, Zygmunt PM, Högestätt ED. Endogenous unsaturated C18 N-acylethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. *J Biol Chem.* 2005, 280(46):38496-504.
- Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today.* 2010, 15(11-12):474-83.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993, 365(6441):61-5.

Murgia S, Fadda P, Colafermina G, Angelico R, Corrado L, Lazzari P, Monduzzi M, Palazzo G. Characterization of the SolutoI® HS15/water phase diagram and the impact of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol solubilization. *J Colloid Interface Sci.* 2013, 390(1):129-36.

Murillo-Rodríguez E. [The modulatory role of endocannabinoids in sleep]. *Rev Neurol.* 2008, 46(3):160-6.

Muster W, Breidenbach A, Fischer H, Kirchner S, Müller L, Pähler A. Computational toxicology in drug development. *Drug Discov Today.* 2008, 13(7-8):303-10.

N

Nanda KK, Henze DA, Della Penna K, Desai R, Leidl M, Lemaire W, White RB, Yeh S, Brouillette JN, Hartman GD, Bilodeau MT, Trotter BW. Benzimidazole CB2 agonists: design, synthesis and SAR. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014, 24(4):1218-21.

Navarro HA, Howard JL, Pollard GT, Carroll FI. Positive allosteric modulation of the human cannabinoid (CB) receptor by RTI-371, a selective inhibitor of the dopamine transporter. *Br J Pharmacol.* 2009, 156(7):1178-84.

Navarro C, González-Álvarez I, González-Álvarez M, Manku M, Merino V, Casabó VG, Bermejo M. Influence of polyunsaturated fatty acids on Cortisol transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier in vitro model. *Eur J Pharm Sci.* 2011, 42(3):290-9.

Niu HS, Ku PM, Niu CS, Cheng JT, Lee KS. Development of PPAR-agonist GW0742 as antidiabetic drug: study in animals. *Drug Des Devel Ther.* 2015, 9:5625-32.

Nogueiras R, Rohner-Jeanrenaud F, Woods SC, Tschöp MH. The endocannabinoid system and the control of glucose homeostasis. *J Neuroendocrinol.* 2008, 20 Suppl 1:147-51.

Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MC, Ward AM, Hahn YK, Lichtman AH, Conti B, Cravatt BF. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science.* 2011, 334(6057):809-13.

Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse.* 2004, 53(4):208-13.

O

O'Sullivan SE, Tarling EJ, Bennett AJ, Kendall DA, Randall MD. Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 337(3):824-31.

O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Further characterization of the time-dependent vascular effects of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006, 317(1):428-38.

O'Sullivan SE, Sun Y, Bennett AJ, Randall MD, Kendall DA. Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 2009, 612(1-3):61-8.

O'Sullivan SE, Kendall DA. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology.* 2010, 15(8):611-6.

O'Sullivan SE. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2016, 173(12):1899-910.

Oh YT, Lee JY, Lee J, Lee JH, Kim JE, Ha J, Kang I. Oleamide suppresses lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 through inhibition of NF-kappaB activation in BV2 murine microglial cells. *Neurosci Lett*. 2010, 474(3):148-53.

Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007, 362(4):928-34.

Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem*. 2010, 147(5):671-8.

Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*. 2007, 4(8):1842-57.

Onaivi ES. Commentary: Functional Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in the CNS. *Curr Neuropharmacol*. 2011 Mar;9(1):205-8.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gu S, Liu QR. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol*. 2012, 26(1):92-103.

Ortega-Gutiérrez S, Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Correa F, Viso A, López-Rodríguez ML, Di Marzo V, Guaza C. Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. *FASEB J*. 2005, 19(10):1338-40.

Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005, 115(5):1298-305.

Ottani A, Giuliani D. Hu 210: a potent tool for investigations of the cannabinoid system. *CNS Drug Rev*. 2001, 7(2):131-45.

Oz M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. *Curr Pharm Des*. 2006, 12(2):227-39.

P

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006, 58(3):389-462.

Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*. 2006, 27(1):73-100.

Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J*. 2006, 20(13):2405-7.

Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, Sagredo O, Benito C, Romero J, Azcoitia I, Fernández-Ruiz J, Guzmán M, Galve-Roperh I. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*. 2009, 132(Pt 11):3152-64.

Palkar PS, Borland MG, Naruhn S, Ferry CH, Lee C, Sk UH, Sharma AK, Amin S, Murray IA, Anderson CR, Perdew GH, Gonzalez FJ, Müller R, Peters JM. Cellular and pharmacological selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta antagonist GSK3787. *Mol Pharmacol*. 2010, 78(3):419-30.

Pamplona FA, Ferreira J, Menezes de Lima O Jr, Duarte FS, Bento AF, Forner S, Villarinho JG, Bellocchio L, Wotjak CT, Lerner R, Monory K, Lutz B, Canetti C, Matias I, Calixto JB, Marsicano G,

Guimarães MZ, Takahashi RN. Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012, 109(51):21134-9.

Park B, McPartland JM, Glass M. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004, 70(2):189-97.

Patti F, Messina S, Solaro C, Amato MP, Bergamaschi R, Bonavita S, Bruno Bossio R, Brescia Morra V, Costantino GF, Cavalla P, Centonze D, Comi G, Cottone S, Danni M, Francia A, Gajofatto A, Gasperini C, Ghezzi A, Iudice A, Lus G, Maniscalco GT, Marrosu MG, Matta M, Mirabella M, Montanari E, Pozzilli C, Rovaris M, Sessa E, Spitaleri D, Trojano M, Valentino P, Zappia M; SA.FE. study group. Efficacy and safety of cannabinoid oromucosal spray for multiple sclerosis spasticity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016, pii: jnnp-2015-312591.

Pazos MR. Papel del sistema cannabinoide en el desarrollo y el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Tesis Doctoral. 2010.

Pazos MR, Tolón RM, Benito C, Rodríguez CF, Gorgojo JJ, Nevado M, Alvarez M, Arias F, Almodóvar F, Fernández MT, Lledó JL, González S, Fernández-Ruiz JJ, Romero J. Cannabinoid CB1 receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa. *J Histochem Cytochem*. 2008, 56(5):511-6.

Pazos MR, Sagredo O, Fernández-Ruiz J. The endocannabinoid system in Huntington's disease. *Curr Pharm Des*. 2008, 14(23):2317-25.

Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, Santos M, Martínez-Pinilla E, Moreno E, Valdizan E, Romero J, Pazos A, Franco R, Hillard CJ, Alvarez FJ, Martínez-Orgado J. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology*. 2013, 71:282-91.

Pérez-Gómez E, Andradas C, Blasco-Benito S, Caffarel MM, García-Taboada E, Villa-Morales M, Moreno E1, Hamann S, Martín-Villar E, Flores JM, Wenners A, Alkatout I, Klapper W, Röcken C, Bronsert P, Stickeler E, Staebler A, Bauer M, Arnold N, Soriano J, Pérez-Martínez M, Megías D, Moreno-Bueno G, Ortega-Gutiérrez S, Artola M, Vázquez-Villa H, Quintanilla M, Fernández-Piqueras J, Canela EI, McCormick PJ, Guzmán M, Sánchez C. Role of cannabinoid receptor CB2 in HER2 pro-oncogenic signaling in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015, 107(6):djv077.

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*. 1997, 74(2):129-80.

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem*. 1999, 6(8):635-64.

Pertwee RG, Gibson TM, Stevenson LA, Ross RA, Banner WK, Saha B, Razdan RK, Martin BR. O-1057, a potent water-soluble cannabinoid receptor agonist with antinociceptive properties. *Br J Pharmacol*. 2000, 129(8):1577-84.

Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut*. 2001, 48(6):859-67.

Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci*. 2005, 76(12):1307-24.

Pertwee RG. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J*. 2005, 7(3):E625-54.

Pertwee RG. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol*. 2009, 156(3):397-411.

Pertwee RG. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem*. 2010, 17(14):1360-81.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev*. 2010, 62(4):588-631.

Pertwee RG. Elevating endocannabinoid levels: pharmacological strategies and potential therapeutic applications. *Proc Nutr Soc*. 2014, 73(1):96-105.

Petitot F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeuq MC. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci*. 1998, 63(1):PL1-6.

Picone RP, Kendall DA. Minireview: From the bench, toward the clinic: therapeutic opportunities for cannabinoid receptor modulation. *Mol Endocrinol*. 2015, 29(6):801-13.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003, 4(11):873-84.

Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Mor M, Compton TR, Dasse O, Monaghan EP, Parrott JA, Putman D. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev*. 2006, 12(1):21-38.

Piper AS, Yeats JC, Bevan S, Docherty RJ. A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J Physiol*. 1999, 518 (Pt 3):721-33.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002, 301(3):1020-4.

Porter BE, Jacobson C. Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2013, 29(3):574-7.

Price MR, Baillie GL, Thomas A, Stevenson LA, Easson M, Goodwin R, McLean A, McIntosh L, Goodwin G, Walker G, Westwood P, Marrs J, Thomson F, Cowley P, Christopoulos A, Pertwee RG, Ross RA. Allosteric modulation of the cannabinoid CB₁ receptor. *Mol Pharmacol*. 2005, 68(5):1484-95.

Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernandez E, Strong R, Lutz B, Marsicano G, Roberts JL, Giuffrida A. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2009, 29(11):2177-86.

Puighermanal E, Busquets-Garcia A, Maldonado R, Ozaita A. Cellular and intracellular mechanisms involved in the cognitive impairment of cannabinoids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012, 367(1607):3254-63.

Q

Qiao Z, Kumar A, Kumar P, Song ZH. Involvement of a non-CB₁/CB₂ cannabinoid receptor in the aqueous humor outflow-enhancing effects of abnormal-cannabidiol. *Exp Eye Res*. 2012, 100:59-64.

Quintela AM, Jiménez R, Gómez-Guzmán M, Zarzuelo MJ, Galindo P, Sánchez M, Vargas F, Cogolludo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) prevents endothelial dysfunction in type 1 diabetic rats. *Free Radic Biol Med.* 2012, 53(4):730-41.

R

Ragusa G, Gómez-Cañas M, Morales P, Hurst DP, Deligia F, Pazos R, Pinna GA, Fernández-Ruiz J, Goya P, Reggio PH, Jagerovic N, García-Arencibia M, Murineddu G. Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of pyrrole structure-based CB2 receptor antagonists. *Eur J Med Chem.* 2015, 101:651-67.

Rahn EJ, Hohmann AG. Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside. *Neurotherapeutics.* 2009, 6(4):713-37.

Ramer R, Merkord J, Rohde H, Hinz B. Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem Pharmacol.* 2010, 79(7):955-66.

Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci.* 2005, 25(8):1904-13.

Ramos JA, Fernández-Ruiz J. Uso de los cannabinoides a través de la historia. Monografía Cannabis, Bobes J, Calafat A (ed). 2000. 12 (2): 19-30.

Randall MD. Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol.* 2007, 152(5):671-5.

Raschi E, Ceccarini L, De Ponti F, Recanatini M. hERG-related drug toxicity and models for predicting hERG liability and QT prolongation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5(9):1005-21.

Rawls SM, Benamar K. Effects of opioids, cannabinoids, and vanilloids on body temperature. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011, 3:822-45.

Reddy DS, Golub VM. The Pharmacological Basis of Cannabis Therapy for Epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 Apr;357(1):45-55.

Rempel V, Volz N, Gläser F, Nieger M, Bräse S, Müller CE. Antagonists for the orphan G-protein-coupled receptor GPR55 based on a coumarin scaffold. *J Med Chem.* 2013, 56(11):4798-810.

Reuter SE, Martin JH. Pharmacokinetics of Cannabis in Cancer Cachexia-Anorexia Syndrome. *Clin Pharmacokinet.* 2016, 55(7):807-12.

Rhee MH, Vogel Z, Barg J, Bayewitch M, Levy R, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R. Cannabinol derivatives: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylyl cyclase. *J Med Chem.* 1997, 40(20):3228-33.

Richter A, Löscher W. (+)-WIN 55,212-2, a novel cannabinoid receptor agonist, exerts antidystonic effects in mutant dystonic hamsters. *Eur J Pharmacol.* 1994, 264(3):371-7.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 1994, 350(2-3):240-4.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Brelière JC, Le Fur GL. SR 144528, the first potent

and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 284(2):644-50.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Congy C, Martinez S, Oustric D, Péro A, Poncelet M, Maruani J, Arnone M, Finance O, Soubrié P, Le Fur G. SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidiny)-1H-pyrazole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004, 310(3):905-14.

Rios C, Gomes I, Devi LA. μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuriteogenesis. *Br J Pharmacol.* 2006, 148(4):387-95.

Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(12):8384-8.

Roberts LA, Christie MJ, Connor M. Anandamide is a partial agonist at native vanilloid receptors in acutely isolated mouse trigeminal sensory neurons. *Br J Pharmacol.* 2002, 137(4):421-8.

Rockwell CE, Kaminski NE. A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004, 311(2):683-90.

Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol.* 2006, 70(1):101-11.

Rohn TT, Wong SM, Cotman CW, Cribbs DH. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, a specific ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces neuronal apoptosis. *Neuroreport.* 2001, 12(4):839-43.

Rom S, Persidsky Y. Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013, 8(3):608-20.

Ronesi J, Gerdeman GL, Lovinger DM. Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci.* 2004, 24(7):1673-9.

Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A, Pertwee RG. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol.* 1999, 126(3):665-72.

Ross RA, Craib SJ, Stevenson LA, Pertwee RG, Henderson A, Toole J, Ellington HC. Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002, 301(3):900-7.

Röver S, Andjelkovic M, Bénardeau A, Chaput E, Guba W, Hebeisen P, Mohr S, Nettekoven M, Obst U, Richter WF, Ullmer C, Waldmeier P, Wright MB. 6-Alkoxy-5-aryl-3-pyridinecarboxamides, a new series of bioavailable cannabinoid receptor type 1 (CB1) antagonists including peripherally selective compounds. *J Med Chem.* 2013, 56(24):9874-96.

Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, Nieto N, Devi LA. AT1R-CB₁R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.* 2011, 30(12):2350-63.

Rozenfeld R, Bushlin I, Gomes I, Tzavaras N, Gupta A, Neves S, Battini L, Gusella GL, Lachmann A, Ma'ayan A, Blitzer RD, Devi LA. Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS One*. 2012, 7(1):e29239.

Rubio M, Valdeolivas S, Piscitelli F, Verde R, Satta V, Barroso E, Montolio M, Aras LM, Di Marzo V, Sagredo O, Fernández-Ruiz J. Analysis of endocannabinoid signaling elements and related proteins in lymphocytes of patients with Dravet syndrome. *Pharmacol Res Perspect*. 2016, 4(2):e00220.

Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzmán M. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol*. 2000, 58(4):814-20.

Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, Casti P, Vargiu R, Pani L. Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003, 306(1):363-70.

Russo M, Naro A, Leo A, Sessa E, D'Aleo G, Bramanti P, Calabrò RS. Evaluating Sativex® in Neuropathic Pain Management: A Clinical and Neurophysiological Assessment in Multiple Sclerosis. *Pain Med*. 2016, 17(6):1145-54.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007, 152(7):1092-101.

S

Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol*. 2007, 36(1):82-91.

Sagredo O, González S, Aroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, Romero JP, Tolón RM, Mechoulam R, Brouillet E, Romero J, Fernández-Ruiz J. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia*. 2009, 57(11):1154-67.

Samson MT, Small-Howard A, Shimoda LM, Koblan-Huberson M, Stokes AJ, Turner H. Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. *J Immunol*. 2003, 170(10):4953-62.

Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol*. 1998, 54(5):834-43.

Sánchez C, Rueda D, Ségui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzmán M. The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol*. 2001, 59(5):955-9.

Sánchez MG, Ruiz-Llorente L, Sánchez AM, Díaz-Laviada I. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal*. 2003, 15(9):851-9.

Sang N, Zhang J, Chen C. COX-2 oxidative metabolite of endocannabinoid 2-AG enhances excitatory glutamatergic synaptic transmission and induces neurotoxicity. *J Neurochem*. 2007, 102(6):1966-77.

Savinainen JR, Saario SM, Laitinen JT. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012, 204(2):267-76.

- Scuderi MR, Cantarella G, Scollo M, Lempereur L, Palumbo M, Saccani-Jotti G, Bernardini R. The antimitogenic effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on human melanoma cells is mediated by the membrane lipid raft. *Cancer Lett.* 2011, 310(2):240-9.
- Seargent JM, Yates EA, Gill JH. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol.* 2004, 143(8):933-7.
- Sekiguchi K, Fukumura K, Hasegawa H, Kanazu T. The metabolism and pharmacokinetics of [14C]-S-777469, a new cannabinoid receptor 2 selective agonist, in healthy human subjects. *Xenobiotica.* 2015, 45(2):150-7.
- Serrano-Marco L, Barroso E, El Kochairi I, Palomer X, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ agonist GW501516 inhibits IL-6-induced signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and insulin resistance in human liver cells. *Diabetologia.* 2012, 55(3):743-51.
- Sharkey KA, Darmani NA, Parker LA. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids and the endocannabinoid system. *Eur J Pharmacol.* 2014, 722:134-46.
- Sharma P, Murthy P, Bharath MM. Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran J Psychiatry.* 2012, 7(4):149-56.
- Sharma MK, Murumkar PR, Giridhar R, Yadav MR. Exploring structural requirements for peripherally acting 1,5-diaryl pyrazole-containing cannabinoid 1 receptor antagonists for the treatment of obesity. *Mol Divers.* 2015, 19(4):871-93.
- Shen M, Thayer SA. The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1998, 783(1):77-84.
- Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia.* 2005, 49(2):211-9.
- Shire D, Calandra B, Delpech M, Dumont X, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. Structural features of the central cannabinoid CB1 receptor involved in the binding of the specific CB1 antagonist SR 141716A. *J Biol Chem.* 1996, 271(12):6941-6.
- Shore DM, Baillie GL, Hurst DH, Navas F 3rd, Seltzman HH, Marcu JP, Abood ME, Ross RA, Reggio PH. Allosteric modulation of a cannabinoid G protein-coupled receptor: binding site elucidation and relationship to G protein signaling. *J Biol Chem.* 2014, 289(9):5828-45.
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996, 278(3):989-99.
- Sierra S, Luquin N, Rico AJ, Gómez-Bautista V, Roda E, Dopeso-Reyes IG, Vázquez A, Martínez-Pinilla E, Labandeira-García JL, Franco R, Lanciego JL. Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques: changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct Funct.* 2015, 220(5):2721-38.
- Simon GM, Cravatt BF. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem.* 2006, 281(36):26465-72.

Simon GM, Cravatt BF. Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol Biosyst.* 2010, 6(8):1411-8.

Sink KS, McLaughlin PJ, Wood JA, Brown C, Fan P, Vemuri VK, Peng Y, Olszewska T, Thakur GA, Makriyannis A, Parker LA, Salamone JD. The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2008, 33(4):946-55.

Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A. The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93(9):3984-9.

Smith LA, Azariah F, Lavender VT, Stoner NS, Bettiol S. Cannabinoids for nausea and vomiting in adults with cancer receiving chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015, (11):CD009464.

Soares AF, Nosjean O, Cozzone D, D'Orazio D, Becchi M, Guichardant M, Ferry G, Boutin JA, Lagarde M, Géloën A. Covalent binding of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 to PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 337(2):521-5.

Sohn KA, Cruciani-Guglielmacci C, Kassis N, Clément L, Ouali F, Caüzac M, Lebègue N, Berthelot P, Caignard DH, Pégorier JP, Renard P, Dacquet C, Ktorza A, Magnan C; Consortium of the French Ministry of Research and Technology. S26948, a new specific peroxisome proliferator activated receptor gamma modulator improved in vivo hepatic insulin sensitivity in 48 h lipid infused rats. *Eur J Pharmacol.* 2009, 608(1-3):104-11.

Song GJ, Nam Y, Jo M, Jung M, Koo JY, Cho W, Koh M, Park SB, Suk K. A novel small-molecule agonist of PPAR- γ potentiates an anti-inflammatory M2 glial phenotype. *Neuropharmacology.* 2016, 109:159-169.

Stefano GB, Bilfinger TV, Rialas CM, Deutsch DG. 2-arachidonoyl-glycerol stimulates nitric oxide release from human immune and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1. *Pharmacol Res.* 2000, 42(4):317-22.

Steffens M, Zentner J, Honegger J, Feuerstein TJ. Binding affinity and agonist activity of putative endogenous cannabinoids at the human neocortical CB1 receptor. *Biochem Pharmacol.* 2005, 69(1):169-78.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* 1997, 388(6644):773-8.

Stempel AV, Stumpf A, Zhang HY, Özdoğan T, Pannasch U, Theis AK, Otte DM, Wojtalla A, Rácz I, Ponomarenko A, Xi ZX, Zimmer A, Schmitz D. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. *Neuron.* 2016, 90(4):795-809.

Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* 2007, 2007:95974.

Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus.* 2009, 19(7):623-32.

Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 229(1):58-64.

Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Nakane S, Kondo H, Waku K, Ishima Y, Watanabe K, Yamamoto I. Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor?. Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells. *J Biochem.* 1997, 122(4):890-5.

Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res.* 2006, 45(5):405-46.

Sun Y, Alexander SP, Kendall DA, Bennett AJ. Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans.* 2006, 34(Pt 6):1095-7.

Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol.* 2007, 152(5):734-43.

Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res.* 2007, 2007:23513.

Syed SK, Bui HH, Beavers LS, Farb TB, Ficorilli J, Chesterfield AK, Kuo MS, Bokvist K, Barrett DG, Efanov AM. Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012, 303(12):E1469-78.

Szabo B, Schlicker E. Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol.* 2005,(168):327-65.

Szallasi A, Goso C, Blumberg PM, Manzini S. Competitive inhibition by capsazepine of [³H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993, 267(2):728-33.

T

Terasawa T, Aso Y, Omori K, Fukushima M, Momobayashi A, Inukai T. Bezafibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor α agonist, decreases circulating CD14(+) CD16(+) monocytes in patients with type 2 diabetes. *Transl Res.* 2015, 165(2):336-45.

Tetko IV, Tanchuk VY, Kasheva TN, Villa AE. Estimation of aqueous solubility of chemical compounds using E-state indices. *J Chem Inf Comput Sci.* 2001, 41(6):1488-93.

Thomas A, Ross RA, Saha B, Mahadevan A, Razdan RK, Pertwee RG. 6"-Azidohept-2"-yne-cannabidiol: a potential neutral, competitive cannabinoid CB1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 2004, 487(1-3):213-21.

Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007, 150(5):613-23.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 1998, 21(3):531-43.

Topol EJ, Bousser MG, Fox KA, Creager MA, Despres JP, Easton JD, Hamm CW, Montalescot G, Steg PG, Pearson TA, Cohen E, Gaudin C, Job B, Murphy JH, Bhatt DL; CRESCENDO Investigators. Rimonabant for prevention of cardiovascular events (CRESCENDO): a randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010, 376(9740):517-23.

Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Utrilla MP, Hermenegildo C, Cogolludo Á, Pérez-Vizcaíno F, Gálvez J, Duarte J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 prevents hypertension, vascular inflammatory and oxidative status, and endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *J Hypertens*. 2015, 33(9):1831-44.

Toulmond S, Tang K, Bureau Y, Ashdown H, Degen S, O'Donnell R, Tam J, Han Y, Colucci J, Giroux A, Zhu Y, Boucher M, Pikounis B, Xanthoudakis S, Roy S, Rigby M, Zamboni R, Robertson GS, Ng GY, Nicholson DW, Flückiger JP. Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. *Br J Pharmacol*. 2004, 141(4):689-97.

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1998, 83(2):393-411.

Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG. Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci*. 2003, 23(28):9374-84.

U

Ueda H, Kobayashi T, Kishimoto M, Tsutsumi T, Okuyama H. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *J Neurochem*. 1993 Nov;61(5):1874-81.

Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem Phys Lipids*. 2000, 108(1-2):107-21.

Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. N-acylethanolamine metabolism with special reference to N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Prog Lipid Res*. 2010, 49(4):299-315.

Ulfers AL, McMurry JL, Kendall DA, Mierke DF. Structure of the Third Intracellular Loop of the Human Cannabinoid 1 Receptor. *Biochemistry*. 2002, 41(38):11344-50.

V

Valdeolivas S, Satta V, Pertwee RG, Fernández-Ruiz J, Sagredo O. Sativex-like combination of phytocannabinoids is neuroprotective in malonate-lesioned rats, an inflammatory model of Huntington's disease: role of CB1 and CB2 receptors. *ACS Chem Neurosci*. 2012, 3(5):400-6.

Valdeolivas S, Pazos MR, Bisogno T, Piscitelli F, Iannotti FA, Allarà M, Sagredo O, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J. The inhibition of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) biosynthesis, rather than enhancing striatal damage, protects striatal neurons from malonate-induced death: a potential role of cyclooxygenase-2-dependent metabolism of 2-AG. *Cell Death Dis*. 2013, 4:e862.

Valenti M, Cottone E, Martinez R, De Pedro N, Rubio M, Viveros MP, Franzoni MF, Delgado MJ, Di Marzo V. The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *J Neurochem*. 2005, 95(3):662-72.

Vallianatou T, Lambrinidis G, Tsantili-Kakoulidou A. In silico prediction of human serum albumin binding for drug leads. *Expert Opin Drug Discov*. 2013, 8(5):583-95.

Van der Stelt M, van Kuik JA, Bari M, van Zadelhoff G, Leeflang BR, Veldink GA, Finazzi-Agrò A, Vliegthart JF, Maccarrone M. Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. *J Med Chem*. 2002, 45(17):3709-20.

Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem*. 2004, 271(10):1827-34.

Van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*. 2005, 7(1-2):37-50.

Van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, Micale V, Steardo L, Drago F, Iuvone T, Di Marzo V. Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci*. 2006, 63(12):1410-24.

Van der Stelt M, Cals J, Broeders-Josten S, Cottney J, van der Doelen AA, Hermkens M, de Kimpe V, King A, Klomp J, Oosterom J, Pols-de Rooij I, de Roos J, van Tilborg M, Boyce S, Baker J. Discovery and optimization of 1-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)imidazolidine-2,4-dione derivatives as a novel class of selective cannabinoid CB2 receptor agonists. *J Med Chem*. 2011, 54(20):7350-62.

Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology*. 2001, 121(4):767-74.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 2005, 310(5746):329-32.

Vandenberg JI, Walker BD, Campbell TJ. HERG K⁺ channels: friend and foe. *Trends Pharmacol Sci*. 2001, 22(5):240-6.

Vandevoorde S, Lambert DM. Focus on the three key enzymes hydrolysing endocannabinoids as new drug targets. *Curr Pharm Des*. 2005, 11(20):2647-68.

Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer*. 2012, 12(6):436-44.

Verrotti A, Castagnino M, Maccarrone M, Fezza F. Plant-Derived and Endogenous Cannabinoids in Epilepsy. *Clin Drug Investig*. 2016, 36(5):331-40.

Verty AN, Evetts MJ, Crouch GJ, McGregor IS, Stefanidis A, Oldfield BJ. The cannabinoid receptor agonist THC attenuates weight loss in a rodent model of activity-based anorexia. *Neuropsychopharmacology*. 2011, 36(7):1349-58.

Vilar S, Chakrabarti M, Costanzi S. Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *J Mol Graph Model*. 2010, 28(8):899-903.

Viñals X, Moreno E, Lanfumey L, Cordoní A, Pastor A, de La Torre R, Gasperini P, Navarro G, Howell LA, Pardo L, Lluís C, Canela EI, McCormick PJ, Maldonado R, Robledo P. Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT_{2A} Receptors. *PLoS Biol*. 2015, 13(7):e1002194.

W

Wager-Miller J, Westenbroek R, Mackie K. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids*. 2002, 121(1-2):83-9.

Waldeck-Weiermair M, Zoratti C, Osibow K, Balenga N, Goessnitzer E, Waldhoer M, Malli R, Graier WF. Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci*. 2008, 121(Pt 10):1704-17.

Wang X, Sng MK, Foo S, Chong HC, Lee WL, Tang MB, Ng KW, Luo B, Choong C, Wong MT, Tong BM, Chiba S, Loo SC, Zhu P, Tan NS. Early controlled release of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW501516 improves diabetic wound healing through redox modulation of wound microenvironment. *J Control Release*. 2015, 197:138-47.

Ward RJ, Pediani JD, Milligan G. Heteromultimerization of cannabinoid CB(1) receptor and orexin OX(1) receptor generates a unique complex in which both protomers are regulated by orexin A. *J Biol Chem*. 2011, 286(43):37414-28.

Ware MA, Daeninck P, Maida V. A review of nabilone in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ther Clin Risk Manag*. 2008, 4(1):99-107.

Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem*. 2006, 281(48):36569-78.

Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA, Rogers MJ. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106(38):16511-6.

Whyte LS, Ford L, Ridge SA, Cameron GA, Rogers MJ, Ross RA. Cannabinoids and bone: endocannabinoids modulate human osteoclast function in vitro. *Br J Pharmacol*. 2012, 165(8):2584-97.

Wiley JL, Martin BR. Cannabinoid pharmacology: implications for additional cannabinoid receptor subtypes. *Chem Phys Lipids*. 2002, 121(1-2):57-63.

Wiley JL, Breivogel CS, Mahadevan A, Pertwee RG, Cascio MG, Bolognini D, Huffman JW, Walentiny DM, Vann RE, Razdan RK, Martin BR. Structural and pharmacological analysis of O-2050, a putative neutral cannabinoid CB(1) receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 2011, 651(1-3):96-105.

Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 2002, 296(5568):678-82.

Wu HY, Goble K, Mecha M, Wang CC, Huang CH, Guaza C, Jan TR. Cannabidiol-induced apoptosis in murine microglial cells through lipid raft. *Glia*. 2012, 60(7):1182-90.

X

Xiong W, Hosoi M, Koo BN, Zhang L. Anandamide inhibition of 5-HT_{3A} receptors varies with receptor density and desensitization. *Mol Pharmacol*. 2008, 73(2):314-22.

Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM, Stimmel JB. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature*. 2002, 415(6873):813-7.

Y

Yang Q, Liu HY, Zhang YW, Wu WJ, Tang WX. Anandamide induces cell death through lipid rafts in hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010, 25(5):991-1001.

Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol*. 2006, 6:12.

Yin H, Chu A, Li W, Wang B, Shelton F, Otero F, Nguyen DG, Caldwell JS, Chen YA. Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay. *J Biol Chem*. 2009, 284(18):12328-38.

Yu M, Ives D, Ramesha CS. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 1997, 272(34):21181-6.

Z

Zanettini C, Panlilio LV, Alicki M, Goldberg SR, Haller J, Yasar S. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci*. 2011, 5:57.

Zaytseva YY, Wallis NK, Southard RC, Kilgore MW. The PPARgamma antagonist T0070907 suppresses breast cancer cell proliferation and motility via both PPARgamma-dependent and -independent mechanisms. *Anticancer Res*. 2011, 31(3):813-23.

Zelasko S, Arnold WR, Das A. Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015, 116-117:112-23

Zeltser R, Seltzer Z, Eisen A, Feigenbaum JJ, Mechoulam R. Suppression of neuropathic pain behavior in rats by a non-psychotropic synthetic cannabinoid with NMDA receptor-blocking properties. *Pain*. 1991, 47(1):95-103.

Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Jallo JI, Tuma RF. Cannabinoid CB(2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007, 27(7):1387-96.

Zhang HY, Gao M, Liu QR, Bi GH, Li X, Yang HJ, Gardner EL, Wu J, Xi ZX. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, 111(46):E5007-15.

Zhang HY, Gao M, Shen H, Bi GH, Yang HJ, Liu QR, Wu J, Gardner EL, Bonci A, Xi ZX. Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addict Biol*. 2016.

Ziemka-Nałęcz M, Zalewska T. Endogenous neurogenesis induced by ischemic brain injury or neurodegenerative diseases in adults. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2012, 72(4):309-24.

Zimmer A. Genetic Manipulation of the Endocannabinoid System. *Handb Exp Pharmacol*. 2015, 231:129-83.

Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates Ca(2+) signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2003, 140(8):1351-62.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sjørgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999, 400(6743):452-7.

Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BA, Blomgren A, Birnir B, Bevan S, Eschalier A, Mallet C, Gomis A, Högestätt ED. Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One*. 2013, 8(12):e81618.

Anexos

1 Índice de figuras

1.1 Introducción

Figura 1. Estructura de los receptores CB ₁ y CB ₂	41
Figura 2. Distribución de los receptores CB ₁ y CB ₂ en humano.	44
Figura 3. Estructura química de la AEA, 2-AG, 2-AGE, virodamina y NADA	47
Figura 4. Posibles rutas metabólicas de la AEA	49
Figura 5. Posibles rutas metabólicas del 2-AG	50
Figura 6. Estructura química de los cannabinoides agonistas de ambos receptores más representativos de las diferentes familias químicas.....	56
Figura 7. Estructura química de los principales fitocannabinoides	57
Figura 8. Estructura química de los principales agonistas selectivos del receptor CB ₁	58
Figura 9. Estructura química de los principales agonistas selectivos del receptor CB ₂	61
Figura 10. Estructura química de los principales antagonistas/ agonistas inversos selectivos del receptor CB ₁	63
Figura 11. Estructura química de los principales antagonistas/ agonistas inversos selectivos del receptor CB ₂	63
Figura 12. Estructura química de los principales antagonistas neutros de los receptores cannabinoides	64
Figura 13. Estructura química de algunos moduladores alostéricos del receptor CB ₁	65
Figura 14. Principales mecanismos de neuroprotección de los cannabinoides ante una situación neurodegenerativa	75

1.2 Materiales y métodos

Figura 15. Esqueleto estructural de las cuatro series de compuestos estudiadas: cromenopirazoles y derivados (A), pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos (B), CBG-Q (C) y CBD-Q (D).....	89
Figura 16. Fórmula empleada para determinar el porcentaje de desplazamiento del radioligando ³ H-CP55,940, normalizado con respecto a la unión máxima y considerando la unión inespecífica, a partir de los valores de dpm	92
Figura 17. Fórmula empleada para determinar el porcentaje del radioligando unido a las membranas, normalizado con respecto a la unión máxima y considerando la unión inespecífica, a partir de los valores de dpm (A). Fórmula empleada para relacionar el porcentaje de radioligando unido con el valor de IC50 (B).....	93
Figura 18. Fórmula aplicada para transformar el valor de dpm obtenido normalizado con respecto a la actividad basal y considerando la unión inespecífica	94

Figura 19. Fórmula aplicada sobre los compuestos agonistas para obtener la curva de dosis-respuesta a partir de los valores de respuesta en porcentaje, normalizados sobre la actividad basal	94
Figura 20. Fórmula aplicada sobre los compuestos agonistas inversos para obtener la curva de dosis-respuesta a partir de los valores de respuesta en porcentaje, normalizados sobre la actividad basal	95
Figura 21. Curvas de dosis-respuesta correspondientes a la respuesta biológica generada por un agonista, un antagonista o un agonista inverso.....	95
Figura 22. Esquema representativo del procedimiento llevado a cabo para el estudio de la actividad biológica mediada por el receptor CB ₂ de los compuestos en un modelo <i>in vitro</i>	97
Figura 23. Esquema-resumen del procedimiento utilizado para determinar el potencial neuroprotector del compuesto 1.56 <i>in vitro</i>	100
Figura 24. Esquema representativo del ensayo de neuroprotección <i>in vivo</i>	102
1.3 Resultados	
Figura 25. Curvas representativas de los compuestos 1.48, 1.56, 2.5, 2.9, 2.10 y de los controles HU308 y SR144528 generadas mediante en el ensayo de unión de GTPγS	118
Figura 26. Valores de EC ₅₀ (A) o IC ₅₀ (B) ± EEM (nM) y E _{max} ± EEM (%) (A y B sobre el receptor CB ₂ de los compuestos con perfil agonista 1.48, 1.56 y HU-308 (A) y con perfil de agonista inverso 2.5, 2.9, 2.10 y SR144528 (B).....	118
Figura 27. Efecto de los ligandos WIN55,212-2 y SR144528 en el ensayo biológico de liberación de PGE-2 por las células de microglía BV-2 estimuladas con LPS.....	119
Figura 28. Efectos de los compuestos 1.48 y 1.56, combinados con o sin WIN55,212-2 o SR144528 en el ensayo biológico de liberación de PGE-2 por las células de microglía BV-2 estimuladas con LPS.....	120
Figura 29. Liberación de PGE-2 por las células BV-2 estimuladas con LPS en presencia de los compuestos 2.5, 2.9 y 2.10, combinados o no con WIN55,212-2 o SR144528	121
Figura 30. Determinación de la viabilidad en las células M213-2O expuestas a MC generado por las células BV-2, estimuladas o no por LPS	122
Figura 31. Efecto del LPS sobre la viabilidad de las células M213-2O tras ser añadido directamente sobre las neuronas, o a través de los medios condicionados generados por las células BV-2	123
Figura 32. Viabilidad de las células M213-2O expuestas a medios condicionados generados por células BV-2 estimuladas con LPS, en presencia o ausencia de distintas concentraciones del compuesto 1.56.....	124
Figura 33. Efecto del compuesto 1.56 sobre la viabilidad de las células M213-2O tras ser añadido directamente sobre las neuronas, o sobre las células BV-2 para generar medios condicionados	124
Figura 34. Efectos sobre la viabilidad de las células M213-2O expuestas a MC generado por células BV-2 estimuladas con LPS, en presencia o ausencia del compuesto 1.56 (10 μM), sólo o combinado con SR144528 (10 μM)	125

Figura 35. Determinación del volumen de edema causado por la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (0.1, 1 y 10 mg/kg).....	126
Figura 36. Análisis de la Integridad tisular mediante tinción de Nissl, tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (0.1, 1 y 10 mg/kg)	127
Figura 37. Determinación del volumen de edema causado por la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg), en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg).....	128
Figura 38. Análisis de la integridad tisular mediante tinción de Nissl tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg) en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg).....	128
Figura 39. Análisis de apoptosis mediante TUNEL tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg) en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg).....	129
Figura 40. Análisis inmunohistoquímico de las células de microglía con el marcador Iba-1 tras la lesión con malonato y el tratamiento con el compuesto 1.56 (1 mg/kg) en ausencia o presencia de AM630 (1 mg/kg).....	130
Figura 41. Imagen representativa de la activación de ERK1/2	131
Figura 42. Análisis de inducción de la luciferasa por el compuesto 1.56 y por el agonista selectivo de PPAR γ , rosiglitazona, usando células HEK293 transfectadas con los vectores GAL4-PPAR γ y GAL-4-luc, para determinar su efecto sobre los receptores PPAR γ	132
Figura 43. Análisis de inducción de la luciferasa por el compuesto 1.56 y por el agonista selectivo de PPAR γ , rosiglitazona, usando células HEK293 transfectadas con los vectores GAL4-PPAR γ y GAL-4-luc, para determinar su efecto sobre los receptores PPAR γ	133

2 Índice de tablas

2.1 Introducción

Tabla 1. Principales ligandos cannabinoides y sus valores de K_i para ambos receptores cannabinoides 59

Tabla 2. Principales nuevas dianas de cannabinoides y sus ligandos más representativos 67

Tabla 3. Principales procesos fisiológicos en los que participa el SCE en el SNC 71

Tabla 4. Efectos neuroprotectores mediados por agonistas cannabinoides en procesos de neurodegeneración crónica y aguda 76

2.2 Materiales y métodos

Tabla 5. Sustituyentes en las posiciones R1, R2 y R3 de los cromenopirazoles (1.1 – 1.52) y sus derivados piranocromenopirazoles (1.53 y 1.54) y cromenoisoxazoles (1.55 – 1.57) 86

Tabla 6. Sustituyentes en las posiciones R, X y Q de las moléculas de la serie de pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos (2.1 – 2.17) 88

Tabla 7. Sustituyentes en la posición R, de las moléculas de la serie de quinonas de CBG (3.1 – 3.10) 89

Tabla 8. Sustituyentes en la posición R, de las moléculas de la serie de quinonas de CBD (4.1 – 4.4) 89

2.3 Resultados

Tabla 9. Afinidad de los compuestos de la familia de cromenopirazoles y derivados por los receptores CB_1 y CB_2 , expresada como valores de $K_i \pm EEM$ 111

Tabla 10. Afinidad de los compuestos de la familia de pirazoles-3-carboxiamida tricíclicos por los receptores CB_1 y CB_2 , expresada como valores de $K_i \pm EEM$ 113

Tabla 11. Afinidad de los compuestos de la familia de CBG-Q por los receptores CB_1 y CB_2 , expresada como valores de $K_i \pm EEM$ 114

Tabla 12. Afinidad de los compuestos de la familia de CBD-Q por los receptores CB_1 y CB_2 , expresada como valores de $K_i \pm EEM$ 114

Tabla 13. Afinidad de los ligandos cannabinoides de referencia HU-308 y WIN55,212-2 por los receptores CB_1 y CB_2 , expresada como valores de $K_i \pm EEM$ 114

Tabla 14. Descriptores fisicoquímicos calculados mediante QikProp 3.5 integrado en Maestro (Schrödinger, LLC, Nueva York, USA) de los compuestos 1.48, 1.56, 2.5, 2.9, 2.10, así como de los agonistas selectivos del receptor CB_2 JWH-133 y HU308 y del agonista inverso selectivo para dicho receptor, SR144528, usados como compuestos de referencia. La tabla indica del valor definido para cada molécula en cada propiedad estudiada 116

2.4 Discusión

Tabla 15. Valores de K_i y selectividad por el receptor CB_2 de los cannabinoides de referencia HU-308, JW-133, L-759,656, AM630 y SR144528 139

3 Publicaciones relacionadas con la Tesis

Cumella J, Hernández-Folgado L, Girón R, Sánchez E, Morales P, Hurst DP, **Gómez-Cañas M**, Gómez-Ruiz M, Pinto DC, Goya P, Reggio PH, Martin MI, Fernández-Ruiz J, Silva AM, Jagerovic N. Chromenopyrazoles: non-psychoactive and selective CB₁ cannabinoid agonists with peripheral antinociceptive properties. *ChemMedChem*. 2012, 7(3):452-63.

Granja AG, Carrillo-Salinas F, Pagani A, **Gómez-Cañas M**, Negri R, Navarrete C, Mecha M, Mestre L, Fiebich BL, Cantarero I, Calzado MA, Bellido ML, Fernández-Ruiz J, Appendino G, Guaza C, Muñoz E. A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012, 7(4):1002-16.

Del Río C, Navarrete C, Collado JA, Bellido ML, **Gómez-Cañas M**, Pazos MR, Fernández-Ruiz J, Pollastro F, Appendino G, Calzado MA, Cantarero I, Muñoz E. The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CB₂ pathways. *Sci Rep*. 2016, 6:21703.

Deiana V, **Gómez-Cañas M**, Pazos MR, Fernández-Ruiz J, Asproni B, Cichero E, Fossa P, Muñoz E, Deligia F, Murineddu G, García-Arencibia M, Pinna GA. Tricyclic pyrazoles. Part 8. Synthesis, biological evaluation and modelling of tricyclic pyrazole carboxamides as potential CB₂ receptor ligands with antagonist/inverse agonist properties. *Eur J Med Chem*. 2016, 112:66-80.

Gómez-Cañas M, Morales P, García-Toscano L, Navarrete C, Muñoz E, Jagerovic N, Fernández-Ruiz J, García-Arencibia M, Pazos MR. Biological characterization of PM226, a chromenoisoxazole, as a selective CB₂ receptor agonist with neuroprotective profile. *Pharmacol Res*. 2016, 110:205-15.

Morales P, **Gómez-Cañas M**, Navarro G, Hurst DP, Carrillo-Salinas FJ, Lagartera L, Pazos R, Goya P, Reggio PH, Guaza C, Franco R, Fernández-Ruiz J, Jagerovic N. Chromenopyrazole, a Versatile Cannabinoid Scaffold with in Vivo Activity in a Model of Multiple Sclerosis. *J Med Chem*. 2016.

4 Otras publicaciones durante el periodo de la Tesis

Fernández-Ruiz J, Moreno-Martet M, Rodríguez-Cueto C, Palomo-Garo C, **Gómez-Cañas M**, Valdeolivas S, Guaza C, Romero J, Guzmán M, Mechoulam R, Ramos JA. Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol*. 2011, 163(7):1365-78.

Szafranski P, Dyduch K, Kosciolk T, P. Wrobel T, **Gómez-Cañas M**, Gómez-Ruiz M, Fernández-Ruiz J, Mlynarski, J. Design and synthesis of novel cannabinoid ligands based on a 1,2,3-triazole scaffold. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2013, 10(2): 169-172.

Fernández-Fernández C, Decara J, Bermúdez-Silva FJ, Sánchez E, Morales P, **Gómez-Cañas M**, Gómez-Ruiz M, Callado LF, Goya P, Rodríguez de Fonseca F, Martín MI, Fernández-Ruiz J, Meana JJ, Jagerovic N. Description of a bivalent cannabinoid ligand with hypophagic properties. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2013, 346(3):171-9.

Alvarado M, Decara J, Luque MJ, Hernandez-Folgado L, **Gómez-Cañas M**, Gómez-Ruiz M, Fernández-Ruiz J, Elguero J, Jagerovic N, Serrano A, Goya P, de Fonseca FR. Novel antiobesity agents: synthesis and pharmacological evaluation of analogues of Rimonabant and of LH21. *Bioorg Med Chem*. 2013, 21(7):1708-16.

Morales P, Vara D, **Gómez-Cañas M**, Zúñiga MC, Olea-Azar C, Goya P, Fernández-Ruiz J, Díaz-Laviada I, Jagerovic N. Synthetic cannabinoid quinones: preparation, in vitro antiproliferative effects and in vivo prostate antitumor activity. *Eur J Med Chem*. 2013, 70:111-9.

González-Naranjo P, Pérez-Macias N, Campillo NE, Pérez C, Arán VJ, Girón R, Sánchez-Robles E, Martín MI, **Gómez-Cañas M**, García-Arencibia M, Fernández-Ruiz J, Páez JA. Cannabinoid agonists showing BuChE inhibition as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2014, 73:56-72.

Moreno E, Andradas C, Medrano M, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, Blasco-Benito S, **Gómez-Cañas M**, Pazos MR, Irving AJ, Lluís C, Canela EI, Fernández-Ruiz J, Guzmán M, McCormick PJ, Sánchez C. Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *J Biol Chem*. 2014, 289(32):21960-72.

Morales P, Blasco-Benito S, Andradas C, **Gómez-Cañas M**, Flores JM, Goya P, Fernández-Ruiz J, Sánchez C, Jagerovic N. Selective, nontoxic CB(2) cannabinoid o-quinone with in vivo activity against triple-negative breast cancer. *J Med Chem*. 2015, 58(5):2256-64.

Ragusa G*, **Gómez-Cañas M***, Morales P*, Hurst DP, Deligia F, Pazos R, Pinna GA, Fernández-Ruiz J, Goya P, Reggio PH, Jagerovic N, García-Arencibia M, Murineddu G. Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of pyrrole structure-based CB2 receptor antagonists. *Eur J Med Chem*. 2015, 101:651-67.

de Salas-Quiroga A, Díaz-Alonso J, García-Rincón D, Remmers F, Vega D, **Gómez-Cañas M**, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I. Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015, 112(44):13693-8.

Morales P, Whyte LS, Chicharro R, **Gómez-Cañas M**, Pazos MR, Goya P, Irving AJ, Fernández-Ruiz J, Ross RA, Jagerovic N. Identification of Novel GPR55 Modulators Using Cell-Impedance-Based Label-Free Technology. *J Med Chem*. 2016, 59(5):1840-53.

Chromenopyrazoles: Non-psychoactive and Selective CB₁ Cannabinoid Agonists with Peripheral Antinociceptive Properties

Jose Cumella,^[a] Laura Hernández-Folgado,^[a] Rocio Girón,^[b] Eva Sánchez,^[b] Paula Morales,^[a] Dow P. Hurst,^[c] María Gómez-Cañas,^[d] María Gómez-Ruiz,^[d] Diana C. G. A. Pinto,^[e] Pilar Goya,^[a] Patricia H. Reggio,^[c] María Isabel Martín,^[b] Javier Fernández-Ruiz,^[d] Artur M. S. Silva,^[e] and Nadine Jagerovic*^[a]

The unwanted psychoactive effects of cannabinoid receptor agonists have limited their development as medicines. These CB₁-mediated side effects are due to the fact that CB₁ receptors are largely expressed in the central nervous system (CNS). As it is known that CB₁ receptors are also located peripherally, there is growing interest in targeting cannabinoid receptors located outside the brain. A library of chromenopyrazoles designed analogously to the classical cannabinoid cannabimol were synthesized, characterized, and tested for cannabinoid activity. Radioligand binding assays were used to determine their affinities at CB₁ and CB₂ receptors. Structural features required for CB₁/CB₂ affinity and selectivity were explored by molecular modeling. Some compounds in the chromenopyrazole series were observed to be selective CB₁ ligands. These modeling studies suggest that full CB₁ selectivity over CB₂ can be ex-

plained by the presence of a pyrazole ring in the structure. The functional activities of selected chromenopyrazoles were evaluated in isolated tissues. In vivo behavioral tests were then carried out on the most effective CB₁ cannabinoid agonist, **13a**. Chromenopyrazole **13a** did not induce modifications in any of the tested parameters on the mouse cannabinoid tetrad, thus discounting CNS-mediated effects. This lack of agonistic activity in the CNS suggests that this compound does not readily cross the blood–brain barrier. Moreover, **13a** can induce antinociception in a rat peripheral model of orofacial pain. Taking into account the negative results obtained with the hot-plate test, the antinociception induced by **13a** in the orofacial test could be mediated through peripheral mechanisms.

Introduction

The three major components of marijuana are Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD), and cannabimol (CBN).^[1] Unlike Δ^9 -THC,^[2] CBD and CBN are non-psychoactive phytocannabinoids.^[3] Δ^9 -THC interacts with two well-characterized G-protein-coupled receptors: CB₁ and CB₂.^[4,5] The CB₁ receptors are localized with high density in the brain and are also found in peripheral tissues. In contrast, the CB₂ receptors are expressed mainly in immune cells, although they can also be found in the CNS, particularly under pathological circumstances. The activity of the cannabinoid receptors is elicited not only by phytocannabinoids, but also by synthetic ligands and endocannabinoids.^[6–9] The only cannabinoid receptor ligands prescribed so far are CB₁/CB₂ receptor agonists. Cesamet (nabilone) and Marinol (Δ^9 -THC) are used for the treatment of nausea and vomiting associated with cancer chemotherapy or as anti-emetic agents. Sativex (Δ^9 -THC and CBD) is prescribed to relieve spasticity and pain in patients of multiple sclerosis. However, preclinical data indicate that CB₁ and/or CB₂ receptor agonists are useful for diverse therapeutic applications, including pain relief, treatment of intestinal disorders, glaucoma, cancer proliferation, and neurodegenerative diseases.^[10–12]

Δ^9 -THC and CBN are classical cannabinoids characterized by tricyclic terpenoids bearing a benzopyran moiety (Figure 1).^[13]

Structure–activity relationship (SAR) studies of Δ^9 -THC and Δ^8 -THC analogues for CB₁/CB₂ receptors have been widely report-

[a] Dr. J. Cumella, Dr. L. Hernández-Folgado, P. Morales, Prof. Dr. P. Goya, Dr. N. Jagerovic
Instituto de Química Médica, CSIC
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid (Spain)
E-mail: nadine@iqm.csic.es

[b] Dr. R. Girón, Dr. E. Sánchez, Prof. Dr. M. I. Martín
Departamento de Farmacología y Nutrición
Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos
Avda. Atenas S/N, 28922 Alcorcón, Madrid (Spain)

[c] Dr. D. P. Hurst, Prof. Dr. P. H. Reggio
Department of Chemistry and Biochemistry
University of North Carolina Greensboro
Greensboro, NC 27402 (USA)

[d] M. Gómez-Cañas, Dr. M. Gómez-Ruiz, Prof. Dr. J. Fernández-Ruiz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina
Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid (Spain)

[e] Dr. D. C. G. A. Pinto, Prof. Dr. A. M. S. Silva
Department of Chemistry & QOPNA
University of Aveiro, 38210-193 Aveiro (Portugal)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201100568>.

A Cannabigerol Quinone Alleviates Neuroinflammation in a Chronic Model of Multiple Sclerosis

Aitor G. Granja · Francisco Carrillo-Salinas · Alberto Pagani · María Gómez-Cañas · Roberto Negri · Carmen Navarrete · Miriam Mecha · Leyre Mestre · Bend L. Fiebich · Irene Cantarero · Marco A. Calzado · Maria L. Bellido · Javier Fernandez-Ruiz · Giovanni Appendino · Carmen Guaza · Eduardo Muñoz

Received: 24 July 2012 / Accepted: 2 September 2012 / Published online: 14 September 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Phytocannabinoids like Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) show a beneficial effect on neuroinflammatory and neurodegenerative processes through cell membrane cannabinoid receptor (CB₁)-dependent and -independent mechanisms. Natural and synthetic cannabinoids also target the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ), an attractive molecular target for the treatment of neuroinflammation. As part of a study on the SAR of phytocannabinoids, we have investigated the effect of the oxidation

modification in the resorcinol moiety of cannabigerol (CBG) on CB₁, CB₂ and PPAR γ binding affinities, identifying cannabigerol quinone (VCE-003) as a potent anti-inflammatory agent. VCE-003 protected neuronal cells from excitotoxicity, activated PPAR γ transcriptional activity and inhibited the release of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated microglial cells. Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) model of multiple sclerosis (MS) was used to investigate the anti-inflammatory activity of this compound in vivo. Motor function performance was

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11481-012-9399-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. G. Granja · C. Navarrete · M. L. Bellido
Vivacell Biotechnology España S.L. Parque Científico
Tecnológico Rabanales 21,
c/Cecilia Payne, Parcela ID 8.1,
14014 Córdoba, Spain

F. Carrillo-Salinas · M. Mecha · L. Mestre · C. Guaza
Instituto Cajal, CSIC,
Avda. Doctor Arce, 37,
28002 Madrid, Spain

A. Pagani · R. Negri · G. Appendino
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche,
Università del Piemonte Orientale,
Via Bovio 6,
28100 Novara, Italy


M. Gómez-Cañas · J. Fernandez-Ruiz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto
Universitario de Investigación en Neuroquímica, Centro de
Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades
Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto Ramón y Cajal de
Investigación Sanitaria (IRYCIS), Facultad de Medicina,
Universidad Complutense,
28040 Madrid, Spain

B. L. Fiebich
Neurochemistry Research Group, Department of Psychiatry,
University of Freiburg Medical School,
Hauptstrasse 5,
79104 Freiburg, Germany

B. L. Fiebich
VivaCell Biotechnology GmbH,
Ferdinand-Porsche-Str. 5,
79211 Denzlingen, Germany

I. Cantarero · M. A. Calzado · E. Muñoz (✉)
Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba
(IMIBIC), Departamento de Biología Celular, Fisiología e
Inmunología, Universidad de Córdoba,
c/María, Virgen y Madre s/n,
14004 Córdoba, Spain
e-mail: fi1muble@uco.es

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CB₂ pathways

Carmen del Río¹, Carmen Navarrete², Juan A. Collado², M. Luz Bellido², María Gómez-Cañás^{3,4,5}, M. Ruth Pazos^{3,4,5}, Javier Fernández-Ruiz^{3,4,5}, Federica Pollastro⁶, Giovanni Appendino⁶, Marco A. Calzado¹, Irene Cantarero¹ & Eduardo Muñoz¹

Scleroderma is a group of rare diseases associated with early and transient inflammation and vascular injury, followed by fibrosis affecting the skin and multiple internal organs. Fibroblast activation is the hallmark of scleroderma, and disrupting the intracellular TGF β signaling may provide a novel approach to controlling fibrosis. Because of its potential role in modulating inflammatory and fibrotic responses, both PPAR γ and CB₂ receptors represent attractive targets for the development of cannabinoid-based therapies. We have developed a non-thiophilic and chemically stable derivative of the CBD quinol (VCE-004.8) that behaves as a dual agonist of PPAR γ and CB₂ receptors, VCE-004.8 inhibited TGF β -induced Col1A2 gene transcription and collagen synthesis. Moreover, VCE-004.8 inhibited TGF β -mediated myofibroblast differentiation and impaired wound-healing activity. The anti-fibrotic efficacy *in vivo* was investigated in a murine model of dermal fibrosis induced by bleomycin. VCE-004.8 reduced dermal thickness, blood vessels collagen accumulation and prevented mast cell degranulation and macrophage infiltration in the skin. These effects were impaired by the PPAR γ antagonist T0070907 and the CB₂ antagonist AM630. In addition, VCE-004.8 downregulated the expression of several key genes associated with fibrosis, qualifying this semi-synthetic cannabinoid as a novel compound for the management of scleroderma and, potentially, other fibrotic diseases.

Systemic sclerosis (SSc; scleroderma) is a rare and heterogeneous disease that involves three main hallmarks: fibroblast dysfunction leading to increased deposition of extracellular matrix proteins, small vessel vasculopathy resulting in tissue hypoxia and an immune response with autoantibody production¹. SSc is characterized by progressive thickening and fibrosis of skin secondary to excessive collagen accumulation, that can be limited to the skin (limited cutaneous SSc) or extended to internal organs (diffuse cutaneous SSc)².

SSc is initiated by microvascular injury and inflammation followed by fibroblast activation, a key event in fibrosis development. Activated fibroblasts are more resistant to apoptosis and differentiate to myofibroblasts,

¹Maimonides Biomedical Research Institute of Córdoba, Reina Sofía University Hospital, Dept of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Avda Menéndez Pidal s/n, 14004. Córdoba, Spain. ²VivaCell Biotechnology España, Parque Científico Tecnológico Rabanales 21, 14014, Córdoba, Spain. ³Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. ⁵Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain. ⁶Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche, Via Bovio 6, 28100, Novara, Italy. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.C. (email: b12cakai@uco.es) or E.M. (email: e.munoz@uco.es)

which are responsible for the excessive collagen synthesis and Transforming Growth Factor beta (TGF β) production³. Following TGF β binding to its receptors, SMAD2 and SMAD3 are phosphorylated and associated with SMAD4. The resulting heteromultimer translocates to the nucleus, where it regulates the expression of TGF β target genes like collagen type I⁴. Excessive TGF β signaling is the hallmark of SSc and different strategies aimed to disrupt the TGF β /SMAD signaling pathway have been proposed for the treatment of SSc and related fibrotic diseases⁵. Different studies prove that peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) as well as cannabinoid receptor type-2 (CB₂) are potential therapeutic targets for the disease because of their involvement in the inhibition of inflammation and fibrosis progression.

PPAR γ is a nuclear receptor originally implicated in the regulation of cell growth, lipid metabolism and glucose homeostasis and it is a target for some antidiabetic drugs⁶. However, PPAR γ is broadly expressed and has been recognized to play a key role in inflammatory processes and connective tissue homeostasis⁷. In this sense, loss of PPAR γ function in fibroblasts resulted in increased susceptibility to skin fibrosis in mice. Conversely, PPAR γ agonists such as rosiglitazone (RGZ) have shown to prevent inflammation, dermal fibrosis and lipodystrophy in a mouse model of cutaneous sclerosis⁸. Moreover, it is known that PPAR γ expression and function are impaired in scleroderma by different factors (TGF β , CTGF, IFN γ , Wnt proteins, IL-13, hypoxia) while fibrosis development is associated to a mutual inhibitory interaction between TGF β and PPAR γ that contributes to disease progression^{9,10}. It has also been shown that PPAR γ agonists inhibit the profibrotic response through inhibition of the TGF β /SMADs signaling pathway at the nuclear level^{10,11}.

In addition to antidiabetic drugs, PPAR γ is also activated by some endocannabinoids and related signaling lipids, as well as by certain natural and synthetic cannabinoids^{12–14}. Cannabinoids are a complex group of molecules that comprise phytocannabinoids, endocannabinoids and synthetic cannabinoids. Cannabinoids were initially identified by their ability to bind and activate the classical cannabinoid receptors CB₁ and CB₂, but these compounds are pleiotropic in nature and also activate other type of receptors including PPAR γ ¹². Thus, the multitarget activity of cannabinoids may account for their ability to modulate several key processes including neuroprotection, inflammation, immunomodulation and vascular responses^{15,16}.

Recent evidence indicates that genetic and pharmacological manipulation of the endocannabinoid system modulates the fibrotic response. Thus, CB₁ and CB₂ receptors have shown different patterns in experimental models of dermal fibrosis. CB₁ inactivation prevents fibroblast activation and exerts potent antifibrotic effect¹⁷. The role of CB₁ as a pro-fibrotic receptor has also been confirmed in fatty acid amide hydrolase knock-out mice, in which elevated levels of endocannabinoids may induce fibrosis in a CB₁-dependent manner¹⁸. In contrast, CB₂ activation protected mice from experimental dermal fibrosis and tissue leukocyte infiltration¹⁹. Accordingly, replace by WIN-55,212-2 in all the manuscript (highlighted), a synthetic dual CB₁/CB₂ agonist, prevented bleomycin-induced dermal fibrosis²⁰, and ajulemic acid, a dual PPAR γ /CB₂ agonist, was also antifibrotic in the same mouse model of SSc¹⁴. Finally, JWH-133, a selective CB₂ agonist, was found to alleviate diffuse SSc induced by hypochlorite injections and CB₂ receptors deficient mice were more susceptible to fibrosis development in this model²¹.

Considering that dual PPAR γ /CB₂ agonists have a strong potential as disease-modifying agents in SSc, we have investigated the novel non-psychotropic cannabidiol (CBD) quinol derivative VCE-004.8 for its activity at both targets and its capacity to prevent fibrosis in experimental models of SSc. VCE-004.8 is a chemically stable and non-thiophilic analogue of HU-331, the major product of atmospheric oxidation of CBD in basic medium.

Material and Methods

Cell lines and reagents. NIH-3T3, HEK-293T-CB₂, normal human dermal fibroblasts (NHDFs) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 1% (v/v) penicillin/streptomycin and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Rosiglitazone, AM630, T0070907 and WIN-55,212-2 were obtained from Cayman Chem (MI, USA), TGF β 1 was purchased from Immunotools GmbH (Friesoythe, Germany), CBD was purchased to THC Pharm (Frankfurt, Germany) and HU-331 was from Santa Cruz (CA, USA). All other reagents were from Sigma Co (St Louis, MO, USA). The synthesis and structure of VCE-004.8 is described in supplementary information.

PPAR γ , CB₁ and CB₂ binding assays. To determine PPAR γ binding activity the PolarScreen™ PPAR γ Competitor Assay kit (Life Technologies, CA, USA) was used following manufacturer's instructions. The IC₅₀ value was determined as the 50% inhibition of percentage of polarization. CB₁ and CB₂ receptor binding affinities were determined by competition studies using [³H]CP55940 as radioligand and commercial membrane preparations of HEK293 EBNA cells stably expressing the respective receptor type (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA), following a procedure previously described²². Initially, compounds were screened at 40 μ M and, in those cases in which the inhibition of radioligand binding was at least about 70%, competition curves using a broad range of compound concentrations were performed to calculate Ki values. Competition binding data were analyzed by using GraphPad Prism® version 5.01 (GraphPad Software Inc., CA, USA).

Transient transfections and luciferase reporter assays. The cells were seeded in 24-well plates and after 24 hours they were transiently transfected with the indicated constructs using Roti®-Fect (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) following manufacturer's specifications. After stimulation, the luciferase activities were quantified using Dual-Luciferase Assay (Promega, Madison, WI, USA). To correct for transfection efficacy, 100 ng *Renilla* luciferase (pRL-CMV) was cotransfected.

Cytotoxicity assays. Briefly, NIH-3T3 cells were seeded at a density of 1×10^3 cells/well in 96-well plates and treated with increasing concentrations of VCE-004.8 or HU-331 for 24 hours. After that, 50 μ l of 3-MTT (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (5 mg/ml) from a mixture solution of MTT: DMEM (1:2) per well was added and cells were incubated for 4 hours at 37 °C in darkness. Then, supernatant was

removed and 100 μ l DMSO was added to each well for 10 min, in gentle shaking. Absorbance was measured at 550 nm using a TriStar LB 941 (Berthold Technologies, GmbH & Co. KG). The mean concentration in each set of three wells was measured. The absorbance of untreated controls was considered as 100% survival.

Determination of collagen in NHDFs. To determine collagen deposition, NHDFs cells were seeded in 24-well plates (5×10^4 /well), preincubated with VCE-004.8 for 1 hour and stimulated with TGF β 1 (5 ng/ml) during 48 hours. Cell pellets were extracted with 0.5 M acetic acid and dyed for 30 min (0,1% Sirius Red and 0,1% Fast Green dissolved in saturated picric acid). Collagen deposition was measured at 540 nm and 605 nm in Genesis 10 UV spectrofluorometer (Thermo Fisher Scientific). To study the secretion of collagen, NHDFs cells were seeded in 24-well plates (5×10^4 /well) and cultivated in serum-free medium for 24 h. After that, the cells were preincubated with VCE-004.8 for 1 hour and stimulated with TGF β 1 (10 ng/ml) for 48 h in serum-free medium and the supernatants collected and tested using the Procollagen Type I C-Peptide (PIP) EIA Kit (Takara, Japan) following manufacturer's recommendations.

Miofibroblast differentiation. To induce myofibroblast differentiation MEFs were plated on glass coverslips with the appropriate medium. After serum starvation for 24 h, the cells were preincubated with RGZ or VCE-004.8 for 1 h and stimulated with TGF β 1 (10 ng/ml) for another 24 h. Coverslips were collected, washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. After antigen retrieval non-specific binding was reduced by blocking with IHC select blocking reagent (Merck Millipore, MA, USA) at room temperature for 30 min. Coverslips were placed in a humidified chamber and incubated overnight at 4 °C with a primary antibody α -SMA (1:50, sc-32251, Santa Cruz). Then, coverslips were washed three times with 0.1% PBS-Tween 20 and incubated with the secondary antibody goat anti-rat Alexa 488 (Merck Millipore). Finally, coverslips were mounted in VectaShield Mounting Medium with DAPI and analyzed using a Leica DM2500 microscope and a Leica DFC420c camera.

Western blots. Cells were washed with PBS and proteins extracted in 50 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol and 1% NP-40) supplemented with 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml leupeptine, 1 μ g/ml pepstatin and aprotinin, and 1 μ l/ml PMSF saturated. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad, CA, USA) and 30 μ g of proteins were boiled at 95 °C in Laemmli buffer and electrophoresed in 10% SDS/PAGE gels. Separated proteins were transferred to PVDF membranes (20V for 30 min) and blocked in TBS solution containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk for 1 hour at room temperature. Immunodetection of specific proteins was carried out by incubation with primary antibody against α -SMA (1:500; sc-32251, Santa Cruz), pSMAD2 (1:500; AB3849, Merck Millipore) or SMAD2 (1:1000; 5339, Cell Signaling, MA, USA) overnight at 4 °C. After washing membranes, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was added and detected by chemiluminescence system (GE Healthcare Europe GmbH). The blots were re-probed with an antibody against α -tubulin or β -actin (1:10.000; DM-1A and AC-74, Sigma). Densitometric analysis of immunoblots was performed using Image J software (NIH; Bethesda, MD, USA).

In vitro cell migration assays. The modulation of cell migration was analyzed by wound-healing assays. Briefly, NHDFs were seeded in a 96-well Essen ImageLock plate (Essen BioScience) and were grown to confluence. After 24 h, the scratches were made using the 96-pin WoundMaker (Essen BioScience), followed by incubation of the cultures in media with 10 ng/ml of mitomycin C to block cell proliferation. VCE-004.8 and TGF β 1 or rhIL-4 (10 ng/ml) were added and wound images were taken every 60 min for 36 h, and the data analyzed by the integrated metric Relative Wound Density part of the live content cell imaging system IncuCyte HD (Essen BioScience).

Animals and Experimental protocols. Six- to eight-week-old female BALB/c mice were purchased from Harlan laboratories (Barcelona, Spain) and housed in our animal facilities (University of Córdoba, Córdoba, Spain) under controlled conditions (12 h light/dark cycle; temperature 20 °C (± 2 °C) and 40–50% relative humidity) with free access to standard food and water. All experiments were performed in accordance with European Union guideline and approved by the Animal Research Ethic Committee of the Córdoba University (2014PI/016). Dermal fibrosis was induced by daily subcutaneous injections of filter-sterilized bleomycin (20 μ g/mouse diluted in PBS) (Mylan, Spain) into the shaved backs well-defined areas (1 cm²) of mice for 6 weeks. During the last 3 weeks of bleomycin injections, mice were treated in parallel by daily intraperitoneal injection of RGZ (5 mg/kg) or VCE004.8 (10 and 20 mg/kg). In some experiments, mice received a combination of VCE-004.8 (20 mg/kg) and the CB2 antagonist AM630 (2.5 mg/kg), or the PPAR γ antagonist T0070907 (5 mg/kg), injected 15 minutes before VCE-004.8. Control group and VCE-004.8 group received subcutaneous injections of 100 μ l PBS and intraperitoneal injections of vehicle or VCE-004.8 (20 mg/kg), respectively. At the end of the experiment, mice were sacrificed and dissected for tissue processing. Affected skin was frozen in RNA-later cooled in dry ice and stored at -80 °C for biochemical analyses (PCR array system) or fixed in fresh 4% paraformaldehyde (PBS) for histochemical analysis. Eight to ten animals were analyzed per experimental group.

Histochemical analysis. Five-micrometer-thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded skin biopsy samples were stained for hematoxylin and eosin, Masson's trichrome or toluidine blue. Only nuclear cells were counted. For immunohistochemical analysis, antigen retrieval was performed in 37 °C trypsin (pH 7.8) for 1 h. Sections were incubated with F4/80 antibody (1:50; MCA497, Bio-Rad) for 2 hours at room temperature or with p-SMAD2 antibody (1:500) overnight at 4 °C. Then, sections were washed in 0.1 M PBS and incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate biotin-conjugated secondary antibody (Merck Millipore). Reaction was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Merck Millipore). A Leica DM2500 microscope and a Leica DFC420c camera were used for slide observation and photography.

PCR array. RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to isolate total mRNA from the skin. One microgram of RNA was transcribed to single chain cDNA using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) and analyzed using the RT² Profiler™ PCR Array Mouse Fibrosis (Qiagen). This array contains 84 key genes involved in fibrosis development. Data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and normalized with five housekeeping genes.

Statistical analysis. *In vitro* data are expressed as mean \pm S.D. and *in vivo* results are represented as mean \pm SEM. Data were subjected to Kolmogorov-Smirnov normality test and then, differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. When data were not normally distributed, significant differences were studied using the Kruskal-Wallis followed by Dunns post-hoc test. $P < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® version 5.01. Images were analyzed and quantified using the Image J.

Results

VCE-004.8 is a stable and non-thiophilic cannabinoid quinol. We have previously reported that the oxidation of CBG (Cannabigerol) and CBD to their corresponding quinols (VCE-003 and HU-331, respectively) increases the PPAR γ binding activity of these natural cannabinoids¹³. HU-331 is a reactive quinone that shows potent antitumor activity by targeting DNA topoisomerase II²³ and shows thiol trapping activity that induces oxidative stress and apoptosis in splenocytes²⁴. Furthermore, HU-331 is rather unstable toward dimerization, that complete abolishes activity (unpublished data). In order to dissect the thiol-trapping activity of HU-311 from the PPAR γ activity and stabilize the product toward oxidative dimerization, we capitalized on the electrophilicity of HU-331 to introduce a nitrogen function via a formal C-H functionalization. The resulting and fully substituted quinol (VCE-004.8, Fig. 1a) could not dimerize any more, and did not show any thiol trapping properties, as evidenced by a comparative cysteamine-recovery assay with HU-331. This cysteamine recovery assay was inspired by the cysteamine trapping assay²⁵, a NMR method based on the treatment of a thiophylic compound with cysteamine in DMSO. This assay cannot be carry out on quinones due to the reversible formation of iminoquinones with the free amino group of the thiol probe that complicated the analysis of the spectra. A recovery assay was therefore developed, evaluating the recovery of the quinol from a solution of cysteamine in DMSO. While VCE-004.8 could be recovered unscathed in an essential quantitative way by extraction with hexane. In contrast HU-331 was undetectable in the hexane extract, suggesting that it had irreversibly reacted with cysteamine to form polar and not extractable adducts (see supplementary information for details).

Next, we first wanted to investigate whether VCE-004.8 was able to bind to PPAR γ , and compare its binding capacity to RGZ. Using a PPAR γ competitor-binding assay, we found that VCE-004.8 binds to the nuclear receptor with an IC₅₀ of 1.7 μ M (Fig. 1b), significantly lower than the affinity comparatively evaluated for HU-331 (5 μ M)¹³. To further study the ability of HU-331 and VCE-004.8 to activate PPAR γ transcriptional activity, NIH-3T3 cells were transfected with a GAL4-PPAR γ expression plasmid plus a GAL4-luc reporter plasmid. Our results showed that HU-331 induced PPAR γ transactivation in a biphasic manner and this activity was lost with the higher concentrations tested. On the contrary, VCE-004.8 induced PPAR γ transactivation in a concentration-dependent manner (Fig. 1c). The results obtained with HU-331 may reflect its cytotoxic activity and, therefore, NIH-3T3 cells were treated with increasing concentrations of both HU-331 and VCE-004.8 for 24 h. As depicted in Fig. 1d, HU-331 but not VCE-004.8 showed a clear cytotoxic activity with concentrations as low as 5 μ M. In addition, we found that HU-311 induced reactive oxygen species (ROS), disrupted the mitochondrial transmembrane potential and activated the Nrf2 pathway, whereas none of these bioactivities were induced by VCE-004.8 (see Supplementary Fig. S1). Altogether our results indicate that the specific modification introduced in the structure of VCE-004.8 did not affect its PPAR γ binding activity but abolished its thiophilic and cytotoxic activity.

It is known that CBD does not bind directly to either CB₁ or CB₂ receptors but it can modulate CB₁ activity²⁶. Therefore, we were interested in investigating whether VCE-004.8 could interfere with these cannabinoid receptors. We studied the binding affinity of VCE-004.8 to CB₁ and CB₂ receptors and we found that VCE-004.8 could displace [³H]CP55,940 from specific binding sites in HEK-293T-hCB₂ cell membranes with a *K_i* value of 170 \pm 50 nM (Fig. 1e), with a negligible binding to CB₁-containing membranes (*K_i* > 40 μ M). Furthermore, we observed that VCE-004.8 repressed FSK-induced CRE-Luc activity in HEK-293T-CB₂ cells, indicating that it is a functional CB₂ agonist functional activity (Fig. 1f).

VCE-004.8 inhibits collagen gene transcription and synthesis in fibroblasts. Since PPAR γ agonists repress TGF β -induced collagen gene transcription¹¹, we evaluated if VCE-004.8 was also able to interfere with this pathway. We found that TGF β -induced collagen deposition (46.4% induction vs control) and collagen synthesis (43.5% induction vs control) were significantly inhibited by pretreatment with VCE-004.8 (Fig. 2a,b, respectively). Type I collagen is a predominant ECM component of the fibrotic lesion, and is a product of two coordinately regulated genes, α 1(I) (COL1A1) and α 2(I) (COL1A2). COL1A2 promoter has been extensively used as an experimental model system to delineate the transcriptional regulation of the collagen gene expression. Thus, to further demonstrate that VCE-004.8 inhibits collagen synthesis at the transcriptional level, NIH-3T3 cells were transiently transfected with the Col1A2-luc plasmid, containing the sequence from -376 to +58 of the human COL1A2 gene, and stimulated with TGF β 1 in the absence or presence of VCE-004.8 or RGZ. Fig. 2c shows that VCE-004.8 inhibited TGF β -induced Col1A2 gene transcription in a concentration-dependent manner. As expected, RGZ also inhibited TGF β -induced collagen gene transcription.

It has been shown that SMAD2/SMAD3 overexpression stimulates COL1A2 promoter activity²⁷, and we therefore tested the capacity of VCE-004.8 to interfere with upstream or downstream TGF β signaling pathways. We found that both compounds were able to inhibit the transcriptional activity driven by SMAD proteins in

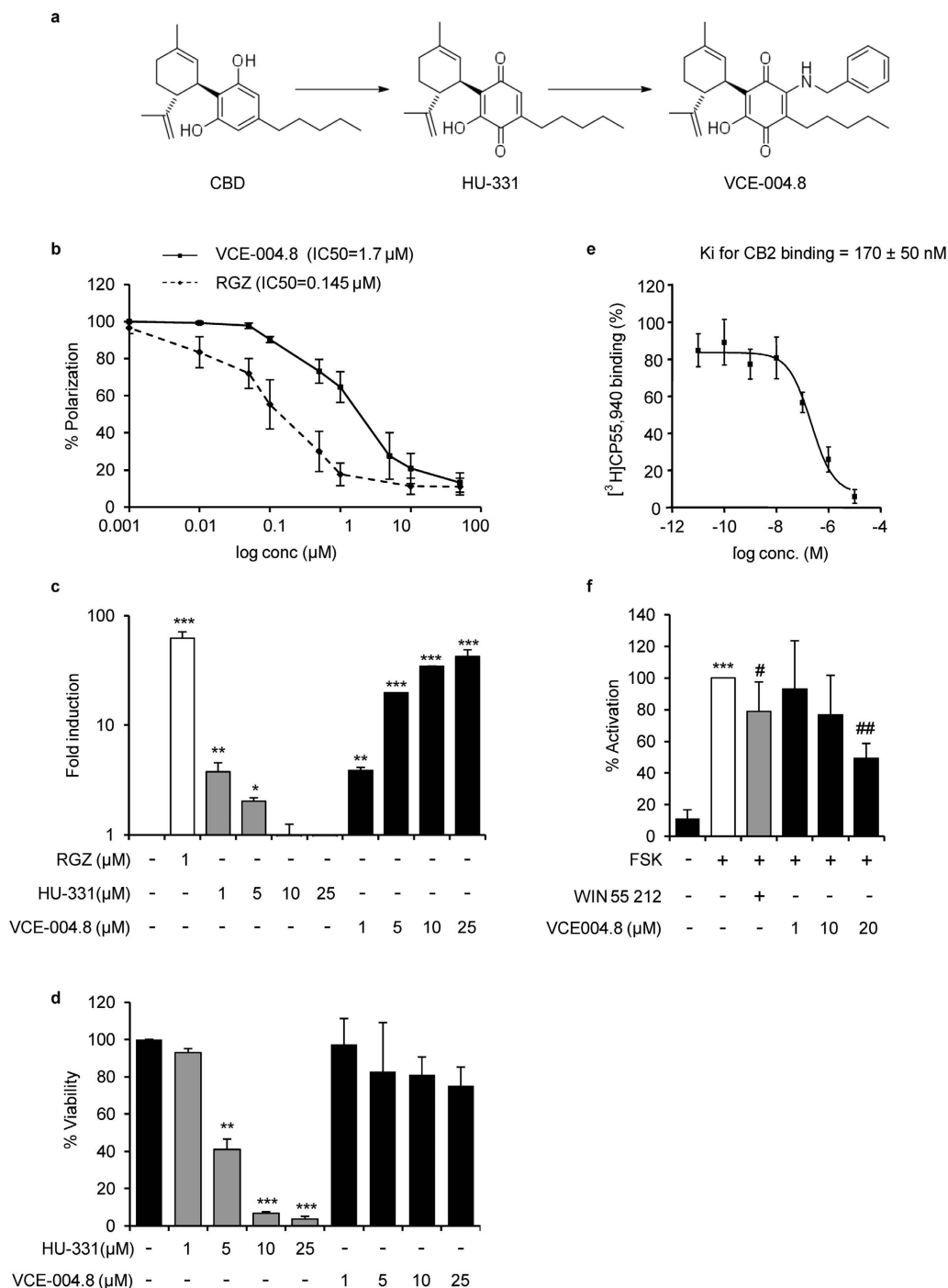


Figure 1. VCE-004.8 characterization. (a) Schematic representation of VCE-004.8 synthesis. (b) VCE-004.8 and RGZ PPAR γ binding affinities. The indicated concentrations were tested and results were plotted to obtain the polynomial trend on a logarithmic range. IC₅₀ values are indicated within the graph (n = 3). (c) Effect of VCE-004.8 and HU-331 on PPAR γ transcriptional activity. NIH-3T3 cells were co-transfected with GAL4-PPAR γ and GAL4-luc. After 24 h, cells were incubated with the compounds at the indicated concentrations for 6 hours and lysed for luciferase activity. Results are expressed on a logarithmic scale as the fold induction \pm S.D. relative to untreated control (n = 4). (d) Study of cytotoxic activity of VCE-004.8 and HU-331. NIH-3T3 cells were treated with the compounds at the indicated doses for 24 hours and cell viability was analyzed by the MTT method. Results are shown as mean \pm S.D. and expressed as percentage of cell viability against untreated cells. (n = 3). (e) Binding affinity of VCE-004.8 to CB₂ receptor. *K_i* values obtained from competition studies using [³H] CP55,940 as radioligand for hCB₂ receptors and expressed as the mean \pm SEM (n = 3). (f) VCE-004.8 is a CB₂ receptor agonist. HEK-293T-CB₂ cells were transfected with the plasmid pCRE-Luc containing three cAMP response elements and treated with WIN55212 or VCE-004.8 for 30 min and stimulated with FSK for 6 hours. Then, cells were lysed for luciferase activity. Data are shown as mean activation percentage \pm S.D. considering FSK as 100% activation. (n = 6). *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 versus control; #p < 0.05 ##p < 0.01 versus FSK.

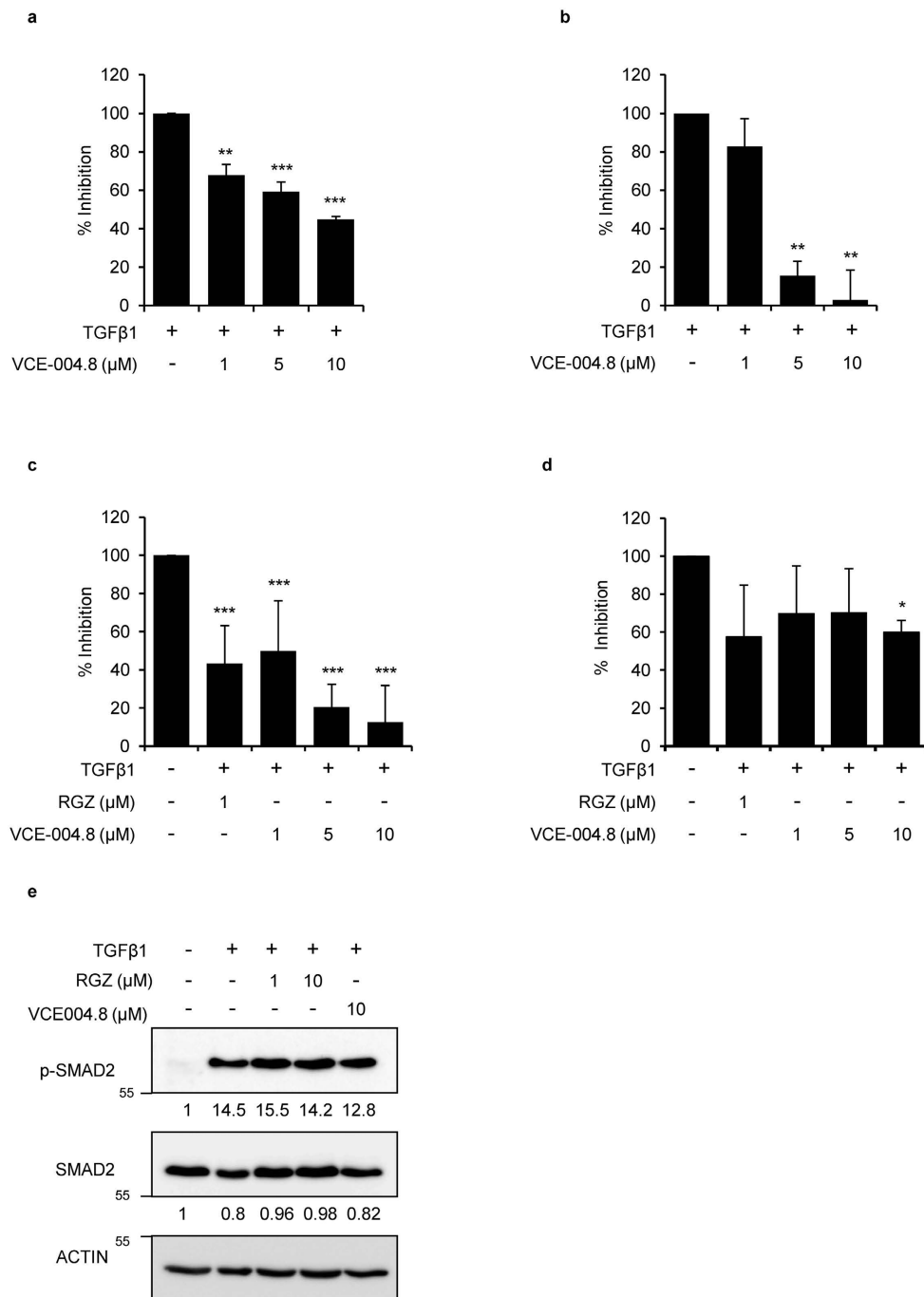


Figure 2. VCE-004.8 inhibits collagen deposition and gene transcriptional activation induced by TGFβ. NHDFs were preincubated with VCE-004.8 for 1 hour at the indicated concentrations and stimulated with TGFβ1 during 48 hours. **(a)** Cells were collected and tested for collagen content using Sirius Red-Fast Green method. (n = 5). **(b)** Supernatants were collected for procollagen type I measurement. Results are expressed as mean percentage of inhibition ±S.D. considering TGFβ1 as 100% (n = 3). **(c)** Effect of VCE-004.8 on Col1a2 transcriptional activity. NIH-3T3 cells were transfected with Col1a2-luc. Cells were preincubated with the compound at the indicated concentrations for 1 hour and stimulated with TGFβ1 (10 ng/ml) for 24 hours. Cells were lysed for luciferase activity. Results are expressed as mean percentage of inhibition ±S.D. considering TGFβ1 as 100% (n = 4). **(d)** Effect of VCE-004.8 on SMAD-dependent transcriptional activity. NIH-3T3 cells were transfected with the CAGA-Luc plasmid, preincubated with the indicated concentrations of VCE-004.8 for 1 hour and stimulated with TGFβ1 (10 ng/ml) for 6 hours. Then, cells were lysed for luciferase activity. Results are expressed as mean percentage of inhibition ±S.D. taking TGFβ1 as 100% (n = 4). **(e)** VCE-004.8 effect on SMAD2 phosphorylation. NIH-3T3 cells were incubated in low serum conditions (1% FBS) for 24 hours. Then, cells were pretreated with VCE-004.8 or RGZ for 1 hour and stimulated with TGFβ1 (10 ng/ml) for 2 hours. Protein expression was determined by Western Blot. Values under the gel indicate protein signal intensities after normalization to β-actin signal intensities. *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 versus TGFβ1 treated cells.

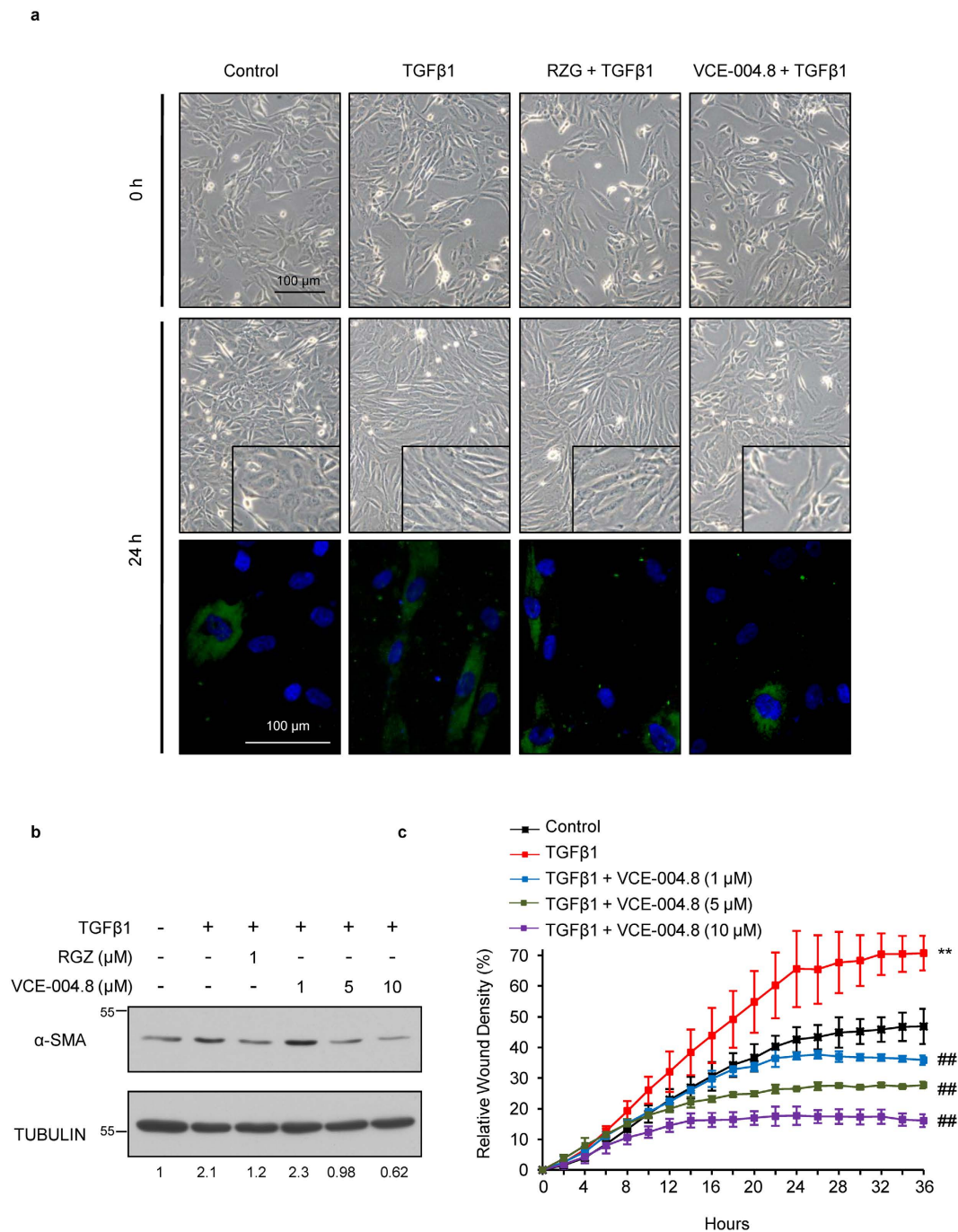


Figure 3. VCE-004.8 prevents differentiation into myfibroblast and impairs wound healing induced by TGFβ. (a) Representative images of MEFs differentiation into myfibroblasts. Cells were incubated in low serum conditions (1% FBS) for 24 hours. Then, cells were pretreated with VCE-004.8 for 1 hour and stimulated with TGFβ1 (10 ng/ml) for 24 hours. MEFs were stained for α-SMA (green) and DAPI (blue). Treatment with VCE-004.8 prevented TGFβ1 induction of α-SMA expression (n = 3). (b) VCE-004.8 reduces α-SMA protein expression induced by TGFβ. NIH-3T3 cells were incubated in low serum conditions (1% FBS) for 24 hours. Then, cells were pretreated with VCE-004.8 for 1 hour, stimulated with TGFβ1 (10 ng/ml) for 48 hours and the expression of α-SMA protein was determined by Western Blot. Values under the gel indicate α-SMA protein signal intensities after normalization to tubulin signal intensities and the results are representative of three independent experiments. (c) Scratch assay on NHDFs cells treated with either TGFβ in the absence or the presence of increasing concentrations of VCE-004.8. Results were plotted using the Incucyte^{FLR} software in terms of percentage of relative wound density ± S.D. as a function of time (n = 3). *p < 0.05 **p < 0.01 versus control; ##p < 0.01 versus TGFβ1 treated cells.

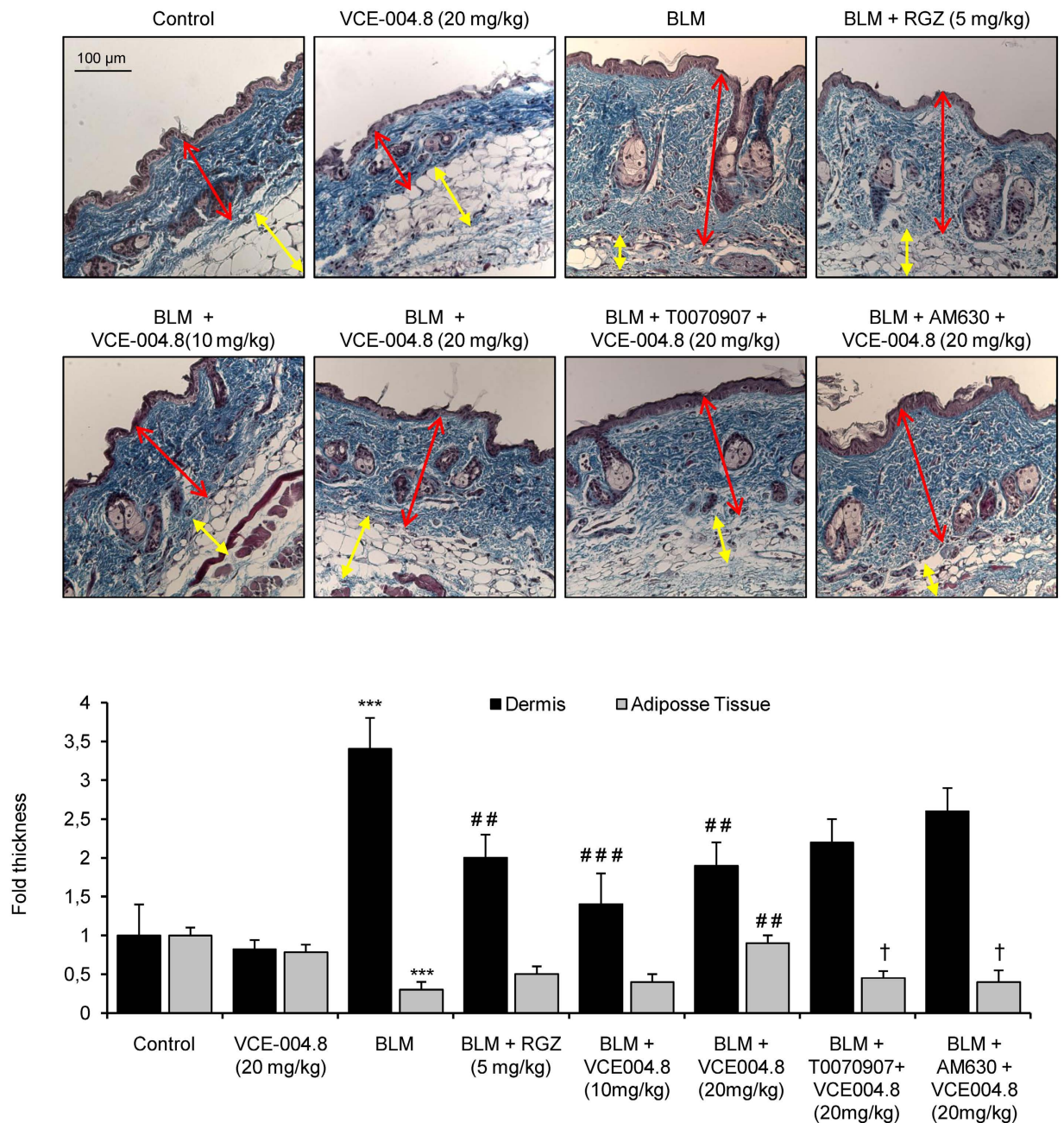


Figure 4. VCE-004.8 prevents dermal thickening induced by BLM administration. Images show Masson's trichrome staining (**upper panel**) and their respective quantification (**bottom panel**) of skin from BLM-treated mice. Values are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$ animals per group). *** $p < 0.001$ versus control group; ** $p < 0.01$ ### $p < 0.001$ versus BLM group; and † $p < 0.05$ versus BLM + VCE-004.8 (20 mg/kg).

CAGA-Luc transfected NIH-3T3 cells (Fig. 2d). However, neither VCE-004.8 nor RGZ inhibited TGF β -induced SMAD2 phosphorylation (Fig. 2e). These results are consistent with the view that PPAR γ agonists inhibit the expression of several TGF β -activated genes by acting at the transcriptional level.

VCE-004.8 inhibits myfibroblasts differentiation and fibroblast migration. As previously described in the literature, SSc fibroblasts differentiate to myfibroblasts with prominent stress fibers and contractile properties that can be triggered by autocrine TGF β activation (reviewed in²⁸). Therefore, to study myfibroblastic differentiation *in vitro*, cells were labeled with antibody against α -SMA as specific marker for myfibroblasts. As shown in Fig. 3a, TGF β 1 induces α -SMA protein expression in cultured MEFs, which is associated with morphological changes of cellular hypertrophy, cell shape variations from stellate to bipolar and well-formed actin stress fibers, the hallmark of myfibroblast differentiation. Pretreatment with both RGZ and VCE-004.8 prevented cell morphology changes and decreased α -SMA expression as well as TGF β 1-induced cell

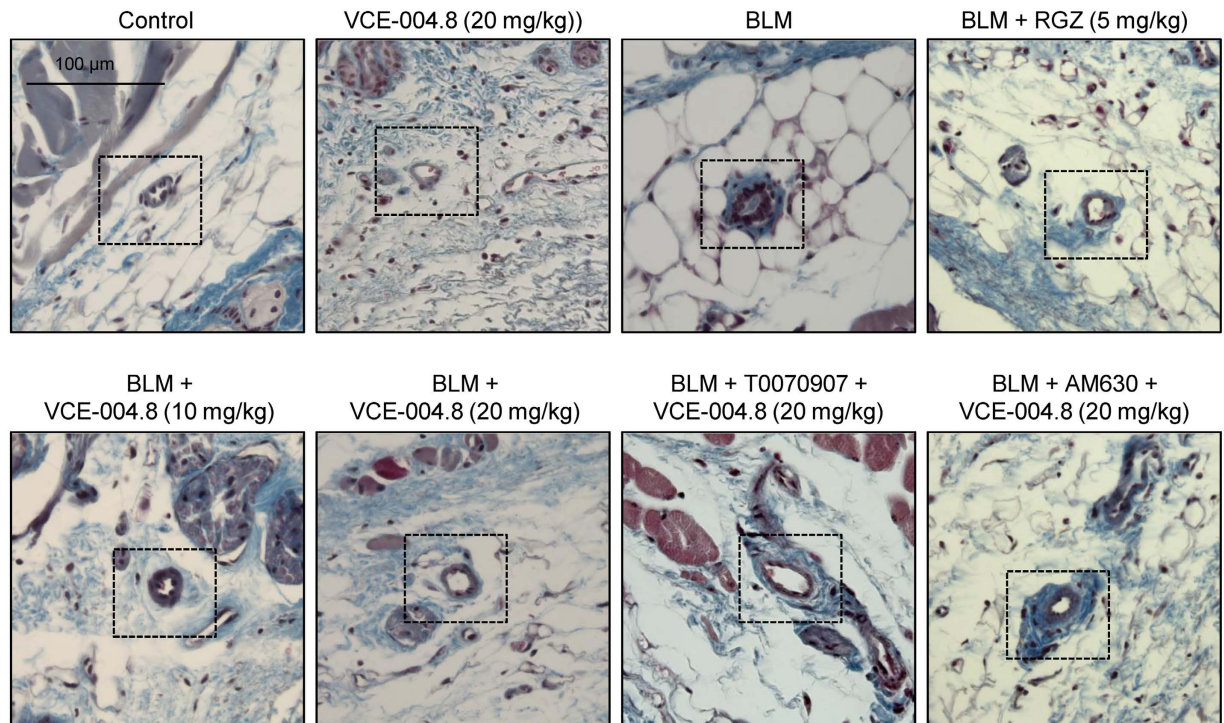


Figure 5. VCE-004.8 prevents BLM- induced collagen accumulation around blood vessels. Representative images of Masson's trichrome stained skin sections showing collagen associated to blood vessels (indicated with frames). (n = 8 animals *per* group).

proliferation detected by DAPI staining. We also found that RGZ and VCE-004.8 inhibited the steady state levels of α -SMA induced by TGF β 1 in NIH-3T3 cells (Fig. 3b).

Migration of skin fibroblast plays a crucial role not only in normal wound healing but also in SSc²⁹. To further analyze this point, we tested if the anti-fibrotic effect of VCE-004.8 could be associated with reduced fibroblast migration. To investigate this possibility, monolayers of NHDFs cells were scratched and the effect of VCE-004.8 on TGF β 1-induced and rhIL-4-induced wound healing was analyzed during 36 h in the presence of mitomycin C. As is shown, VCE-004.8 significantly attenuated wound closure induced by either TGF β 1 or rhIL-4 in a concentration-dependent manner (Fig. 3c and supplementary Fig. 2 respectively).

Effects of VCE-004.8 on fibrotic skin. To study the anti-fibrotic effect of VCE-004.8 *in vivo*, we evaluated its effectiveness in a murine model of SSc. The induction was done by a 6 weeks regime of subcutaneous injections of bleomycin, followed by treatment with the different therapeutic regimen during the last 3 weeks. No signs of toxicity were observed during the experimental procedure. After 6 weeks, mice treated with bleomycin showed a significant increment in dermal thickness and collagen content that paralleled with a reduction of subcutaneous adipose layer, which was replaced by connective tissue. VCE-004.8 (10 and 20 mg/kg) alleviated skin fibrosis and reduced skin thickness to levels similar to those of RGZ. In addition, VCE-004.8 at the highest dose was also capable of recovering lipoatrophy. Pretreatment with either the CB₂ antagonist AM630 or the PPAR γ antagonist T007907 partially abrogated the effect of VCE-004.8, indicating that the anti-fibrotic response was dependent on dual PPAR γ and CB₂ activation (Fig. 4). Repeated local injections of bleomycin have been described to also lead to a significant thickness of vascular wall that mimicked some of histologic features found in human SSc³⁰. As depicted in Fig. 5, bleomycin induced a significant collagen deposition around blood vessels that was prevented by both RGZ and VCE-004.8. Moreover, the effects of VCE-004.8 were abolished by pretreatment with the PPAR γ and CB₂ antagonists.

As previously demonstrated³¹, bleomycin-induced fibrosis is associated with changes in the number and function of mast cells and macrophage infiltration. Degranulating mast cells release profibrotic cytokines that induce collagen production³². Thus, skin mast cells were assessed for intact phenotype versus degranulating phenotype that was identified by the presence of extracellular granules. By staining with toluidine blue we found that bleomycin induced a significant increase of degranulated dermal mast cells that was significantly lessened in mice treated with RGZ or VCE-004.8 (10 and 20 mg/kg) (Fig. 6). Again, the effect of VCE-004.8 was partially blocked by pretreatment with PPAR γ or CB₂ antagonists. Next, we evaluated the effect of VCE-004.8 treatment on the recruitment of inflammatory cells by measuring the infiltration of F4/80(+) macrophages in the skin. When compared with control mice, bleomycin-treated skin samples showed a significant increase in the number of F4/80(+). Interestingly, VCE-004.8 (20 mg/kg), as well as RGZ, prevented macrophage infiltration in the skin. Although not statistically significant, mice pretreated with PPAR γ or CB₂ antagonist showed a higher number of F4/80 positive cells compared to VCE-004.8 (20 mg/kg) group (Fig. 7).

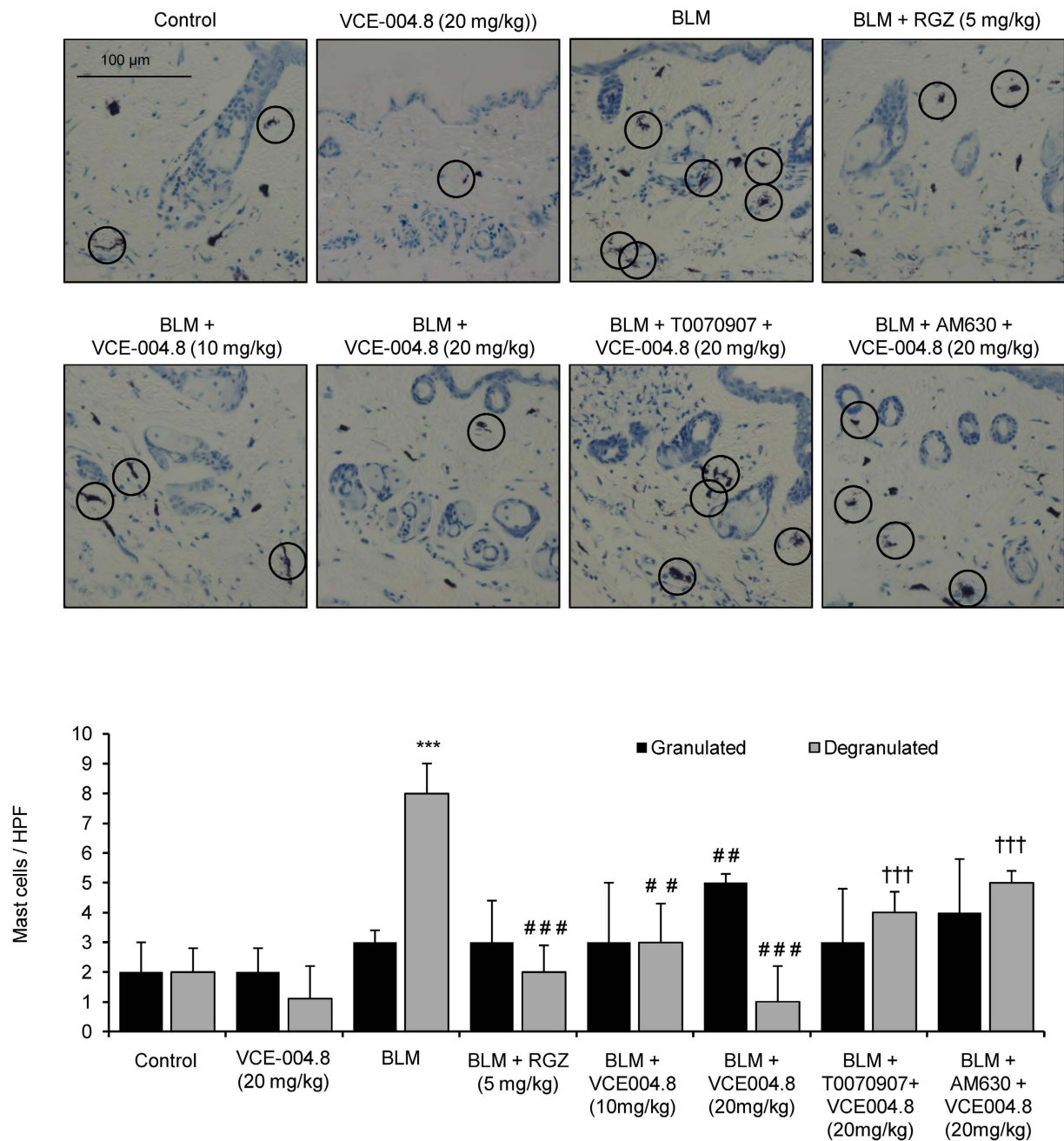


Figure 6. VCE-004.8 reduces BLM- induced mast cell degranulation in mice skin. (Upper panel) Toluidine blue staining of skin sections showing degranulated mast cells infiltration (indicated with circles). **(Bottom panel)** Quantification of toluidine labeled granulated/degranulated mast cells. Values are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$ animals *per* group). *** $p < 0.001$ versus control group; ** $p < 0.01$ ### $p < 0.001$ versus BLM group; and ††† $p < 0.001$ versus BLM + VCE-004.8 (20 mg/kg).

VCE-004.8 and the expression of fibrotic-related genes in the skin of bleomycin-treated mice.

In order to understand the molecular mechanisms underlying the beneficial effects of VCE-004.8 in bleomycin-induced skin fibrosis, mRNA was isolated from the skin of sick animals untreated and treated with VCE-004.8 (20 mg/kg), and the expression of 84 genes involved in fibrotic physiopathology was analyzed by qRT-PCR. The most striking results were obtained for the expression of *Col3A1*, *Col1A2*, *IL-1 β* and *IL-13* genes, which were induced by bleomycin and clearly inhibited by VCE-004.8 treatment (Fig. 8). In contrast, VCE-004.8 was not able to counteract the expression of *TGF β 1* and the induction of SMAD2 phosphorylation that were upregulated in the fibrotic tissue (supplemental Fig. 3). These results suggest that the activity of VCE-004.8 is related to the interaction with TGF β 1 signaling pathways downstream SMAD2 phosphorylation (i.e. *Col1A2* and *Col1A3* transcriptional inhibition) and by anti-inflammatory mechanisms (i.e. *IL-1 β* and *IL-13* inhibition).

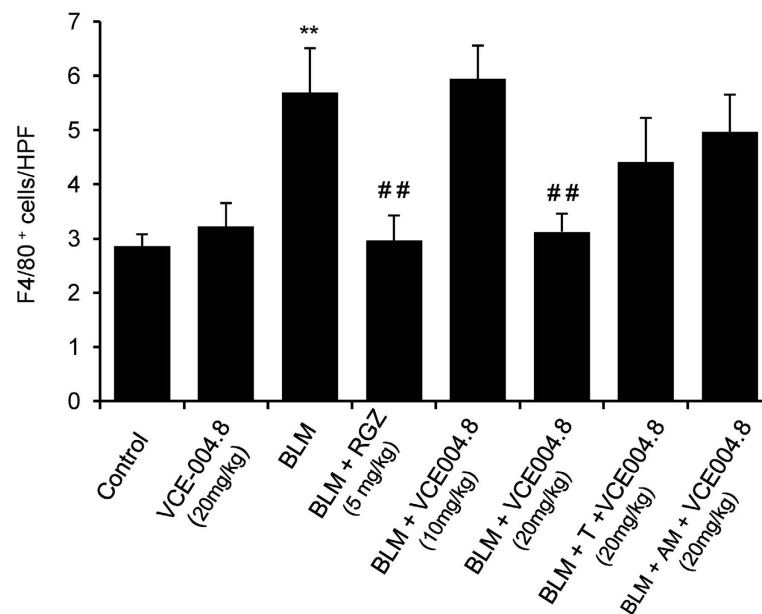
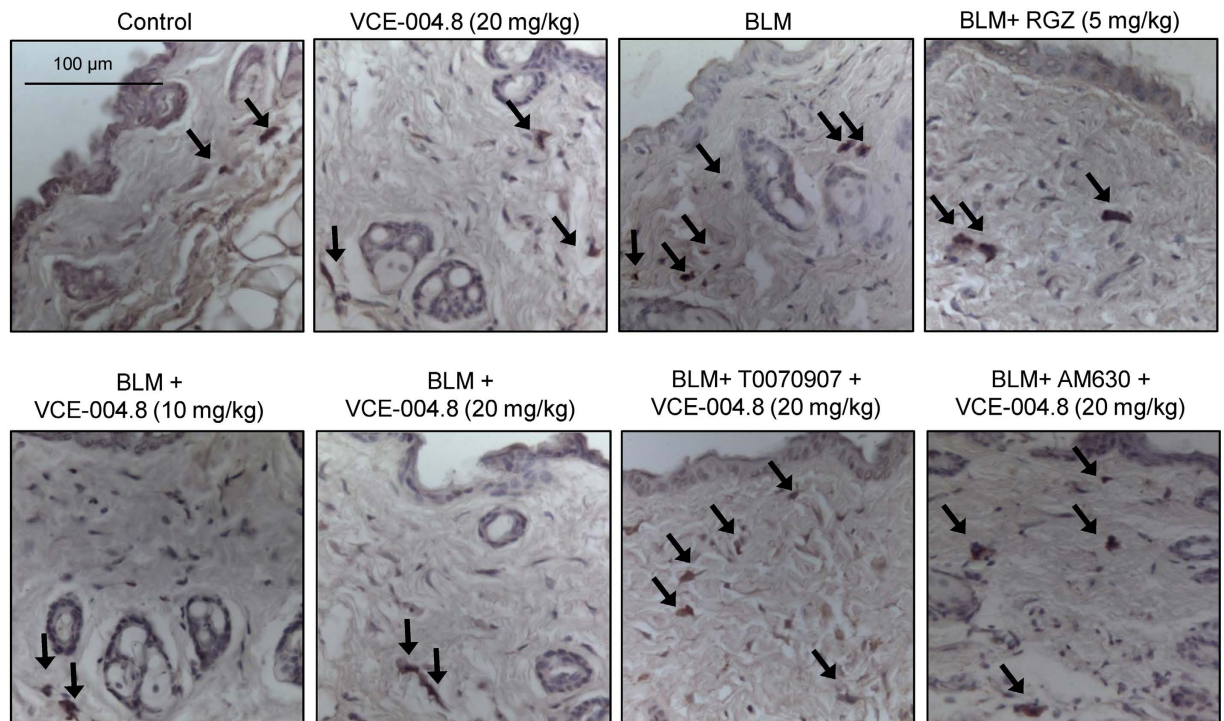


Figure 7. Treatment with VCE-004.8 reduces macrophage infiltration in the skin. (Upper panel) Images show immunostaining of skin sections for the macrophage specific marker F4/80 (indicated with arrows). **(Bottom panel)** Quantification of F4/80(+) cells in skin. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 8 animals per group). **p < 0.01 versus control group; ##p < 0.01 versus BLM group.

Discussion

We have shown for the first time that VCE-004.8 is a dual PPAR γ /CB $_2$ agonist, devoid of affinity for the CB $_1$ receptor and lacking thiophilicity, capable to inhibit collagen synthesis in fibroblasts and miofibroblast differentiation. In addition, this cannabinoid could efficiently prevent bleomycin-induced dermal fibrosis in mice.

Quinone based drugs exerting antibiotic and antineoplastic effects are commonly used in clinical practice, but their use for chronic treatments is not feasible because of its reactivity and toxicity. Thus, the development of cannabinoid quinonoid compounds displaying antiinflammatory activity that are more specific in their actions and

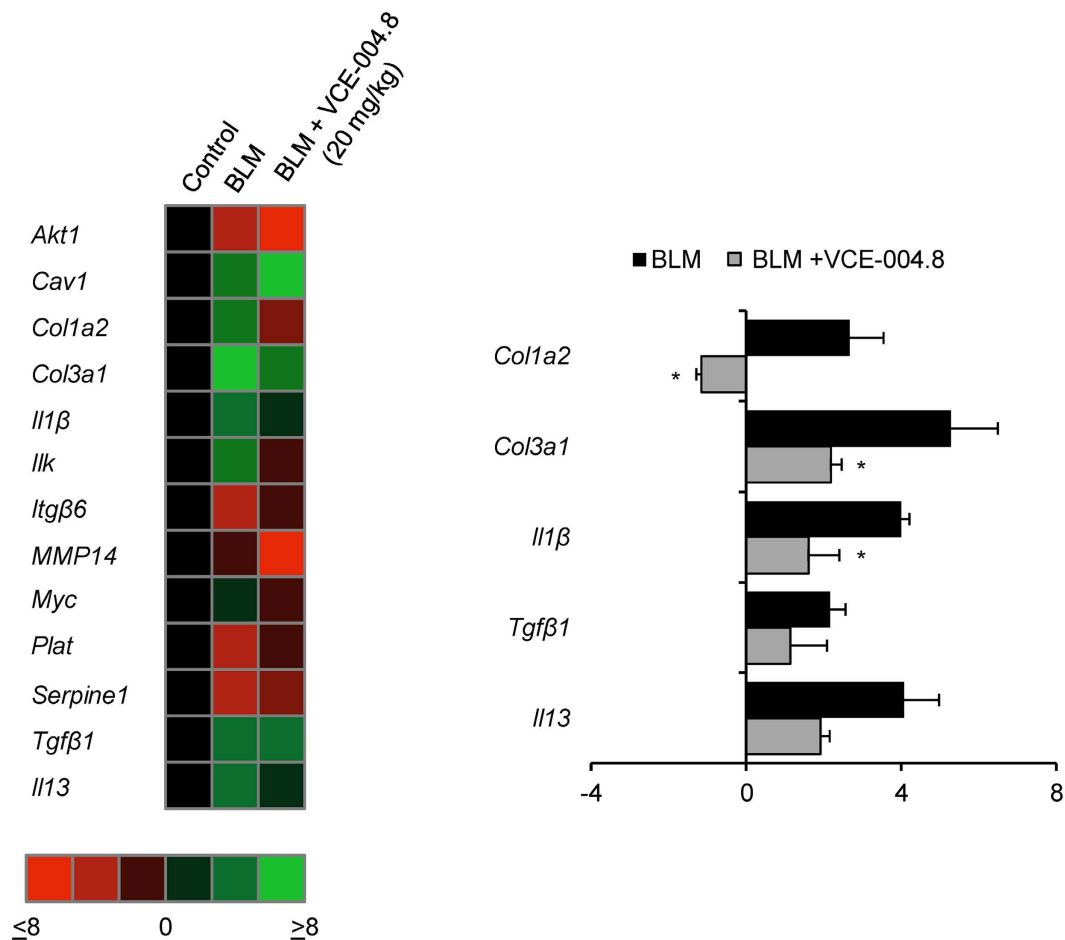


Figure 8. VCE-004.8 modulates gene expression in the skin of bleomycin-induced fibrosis in mice. Animals were treated as indicated and total RNA was isolated. 1 μg of RNA was retrotranscribed and the resulting cDNA was analyzed in a mouse fibrosis PCR array. (Left panel) Heat maps represents genes with significant upregulation (green) or downregulation (red) in the skin of BLM + vehicle or BLM + VCE004.8 (20 mg/kg) treated mice compared with control group. (Right panel) Those genes showing a relevant change in the expression pattern are shown and gene expression levels are expressed as fold up- or down-regulation during sickness (BLM + vehicle) and treatment (BLM + VCE-004.8 (20 mg/kg)). Five housekeeping genes contained on the experimental system were used to standardize the mRNA expression levels in every sample (n = 3). *p < 0.05 versus BLM group.

are less toxic, is a major therapeutic goal. HU-311 shows increased PPAR γ binding activity compared to its parent compound CBD¹³. However, HU-331 is also a thiol-trapping agent that induces ROS, disrupts the mitochondria transmembrane potential and induces cytotoxicity in primary and transformed cells *in vitro*. Here we report that VCE-004.8 is not a Michael-reactive compound as the electron-donating substituent eliminates thiophilicity by a combination of electronic (+M properties of nitrogen) and steric effects.

Thioglitazones such as RGZ and pioglitazone are potent PPAR γ full agonists (PPAR γ -fa) that have been largely used so far in the clinical practice. They provide similar effects on glycemic control, as well as a range of similar adverse effects, such as fluid retention, weight gain and increased risk of heart failure³³. Indeed, RGZ was recently withdrawn in Europe and its use has been restricted in the USA as a consequence of increased risk of cardiovascular events in T2D patients. Beside the side effects of thioglitazones, PPAR γ is still a major and relevant target to develop novel agonists that reduce or eliminate adverse effects for the management of different diseases including SSc. Therefore, an intense research activity has developed for the discovery of selective PPAR γ modulators (PPAR γ -m) as safer alternatives to PPAR γ -fa. In fact, RGZ is at least 20 fold more potent than VCE-004.8 to activate PPAR γ . PPAR γ -m only activate a subset of the functions induced by the cognate ligand or that act in a cell-type-selective manner³⁴. In this sense VCE-004.8 can be considered a PPAR γ -m based on the phytocannabinoid structural motif.

Blocking TGF β signaling represents a therapeutic approach in fibrosis. PPAR γ interferes with the SMADs transcriptional signaling without blocking its phosphorylation or nuclear accumulation⁹. Since PPAR γ competes for the interaction of p300 to SMAD proteins inhibiting SMAD/p300 complex formation, which are required for TGF β -induced collagen gene transcription¹¹, it is conceivable that VCE-004.8 exerted most of their anti-fibrotic effects through PPAR γ . However, CB₂ activation may also be involved in the anti-inflammatory activity

of VCE-004.8 probably acting on macrophages inhibiting the expression of proinflammatory cytokines such as IL-1 β . CB₂ activation is thought to be beneficial in fibrotic diseases. For instance JWH-133, a CB₂ selective agonist, has been shown to decrease the inflammatory infiltrate and fibrosis in cirrhotic rats³⁵. It has also been described that CB₂ activation inhibits dermal fibrosis by preventing leukocyte infiltration and the release of profibrotic mediators¹⁹. Thus, further research is warranted to investigate which antiinflammatory activities of VCE-004.8 are mediated by CB₂ activation.

Experimental fibrosis induced by bleomycin administration is a widely used model to study SSc. Subcutaneous injections of bleomycin induce early inflammatory reaction followed by fibroblast activation and progressive fibrosis that resembling human disease³⁶. We have used a modified model of bleomycin-induced fibrosis in which the treatment is initiated three weeks after the beginning of bleomycin injections in order to study the effect of VCE-004.8 on established fibrosis. This experimental model is less dependent of inflammation^{14,37}. Consistent with previous studies, histological examination of the skin after bleomycin administration resulted in a significant dermal thickness and loss of subcutaneous adipose layer³⁰. Treatment with VCE-004.8 during the last three weeks of bleomycin injections demonstrated a high inhibitory effect on the progression of dermal thickness and perivascular collagen deposition. In addition, VCE-004.8 was also effective when studied in a more inflammatory model of SSc that is induced by bleomycin administration during 3 weeks and treated in parallel with VCE-004.8 (data not shown). The infiltration of macrophages and degranulating mast cells, which represents an important source of TGF β during fibrosis development^{32,38}, was also reduced in mice receiving VCE-004.8. Although the levels of mRNA for TGF β were not inhibited by VCE-004.8 in the tissues, it is possible that the inhibition of IL-1 β and IL-13 mRNA expression observed in VCE-004.8-treated animals is reflecting a reduced macrophage infiltration and mast cell degranulation. Although mast cells are not necessary for inducing dermal fibrosis, they can produce IL-13, which together with other inflammatory cytokines such as IL-1 β , may accelerate fibrosis development^{39,40}. Overall, our results are in agreement with previous studies showing that PPAR γ or CB₂ agonists attenuated the infiltration of inflammatory cells in bleomycin-induced skin fibrosis^{8,19}.

In conclusion, VCE-004.8 can be considered a PPAR γ -m with CB₂ agonistic activity that may qualify it as a candidate for the treatment of SSc and perhaps other fibrotic diseases whose management is currently elusive. The combination of dual agonists of PPAR γ and CB₂ receptors may represent an important advance in the development of novel therapies. In particular, it could be used for disorders with marked inflammatory profile, since both end-points are critical and complementary for the control of inflammatory pathways.

References

- Wollheim, F. A. Classification of systemic sclerosis. Visions and reality. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 1212–1216 (2005).
- Pattanaik, D., Brown, M., Postlethwaite, B. C. & Postlethwaite, A. E. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol* **6**, 272 (2015).
- Jelaska, A. & Korn, J. H. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **43**, 2230–2239 (2000).
- Varga, J. & Abraham, D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* **117**, 557–567 (2007).
- Varga, J. & Pasche, B. Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 200–206 (2009).
- Spiegelman, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* **47**, 507–514 (1998).
- Wei, J., Bhattacharyya, S. & Varga, J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: innate protection from excessive fibrogenesis and potential therapeutic target in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **22**, 671–676 (2010).
- Wu, M. *et al.* Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Am J Pathol* **174**, 519–533 (2009).
- Wei, J. *et al.* PPARgamma downregulation by TGFs in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis. *PLoS One* **5**, e13778 (2010).
- Dantas, A. T. *et al.* The Role of PPAR Gamma in Systemic Sclerosis. *PPAR Res* **2015**, 124624 (2015).
- Ghosh, A. K. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB J* **23**, 2968–2977 (2009).
- O'Sullivan, S. E. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* **152**, 576–58 (2007).
- Granja, A. G. *et al.* A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* **7**, 1002–1016 (2012).
- Gonzalez, E. G. *et al.* Synthetic cannabinoid ajulemic acid exerts potent antifibrotic effects in experimental models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1545–1551 (2012).
- Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J. & Stephens, G. J. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol Ther* **133**, 79–97 (2012).
- Stanley, C. & O'Sullivan, S. E. Vascular targets for cannabinoids: animal and human studies. *Br J Pharmacol* **171**, 1361–1378 (2014).
- Marquart, S. *et al.* Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis. *Arthritis Rheum* **62**, 3467–3476 (2010).
- Palumbo-Zerr, K. *et al.* Inactivation of fatty acid amide hydrolase exacerbates experimental fibrosis by enhanced endocannabinoid-mediated activation of CB1. *Ann Rheum Dis* **71**, 2051–2054 (2012).
- Akhmetshina, A. *et al.* The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* **60**, 1129–1136 (2009).
- Balistreri, E. *et al.* The cannabinoid WIN55, 212-2 abrogates dermal fibrosis in scleroderma bleomycin model. *Ann Rheum Dis* **70**, 695–699 (2011).
- Servettaz, A. *et al.* Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. *Am J Pathol* **177**, 187–196 (2010).
- Ragusa, G. *et al.* Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of pyrrole structure-based CB receptor antagonists. *Eur J Med Chem* **101**, 651–667 (2015).
- Kogan, N. M. *et al.* HU-331, a novel cannabinoid-based anticancer topoisomerase II inhibitor. *Mol Cancer Ther* **6**, 173–183 (2007).
- Wu, H. Y. & Jan, T. R. Cannabidiol hydroxyquinone-induced apoptosis of splenocytes is mediated predominantly by thiol depletion. *Toxicol Lett* **195**, 68–74 (2010).
- Avonto, C. *et al.* An NMR spectroscopic method to identify and classify thiol-trapping agents: revival of Michael acceptors for drug discovery? *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 467–471 (2011).

26. Thomas, A. *et al.* Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists *in vitro*. *Br J Pharmacol* **150**, 613–623 (2007).
27. Poncelet, A. C., de Caestecker, M. P. & Schnaper, H. W. The transforming growth factor-beta/SMAD signaling pathway is present and functional in human mesangial cells. *Kidney Int* **56**, 1354–1365 (1999).
28. Bhattacharyya, S., Wei, J. & Varga, J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 42–54 (2012).
29. Gilbane, A. J., Denton, C. P. & Holmes, A. M. Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Res Ther* **15**, 215 (2013).
30. Yamamoto, T. & Katayama, I. Vascular changes in bleomycin-induced scleroderma. *Int J Rheumatol* **2011**, 270938, doi: 10.1155/2011/270938 (2011).
31. Yamamoto, T. *et al.* Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* **112**, 456–462 (1999).
32. Gruber, B. L. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* **5**, 147–153 (2003).
33. Ciudin, A., Hernandez, C. & Simo, R. Non-invasive methods of glucose measurement: current status and future perspectives. *Curr Diabetes Rev* **8**, 48–54 (2012).
34. Doshi, L. S., Brahma, M. K., Bahirat, U. A., Dixit, A. V. & Nemmani, K. V. Discovery and development of selective PPAR gamma modulators as safe and effective antidiabetic agents. *Expert Opin Investig Drugs* **19**, 489–512 (2010).
35. Munoz-Luque, J. *et al.* Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 475–483 (2008).
36. Yamamoto, T. & Nishioka, K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol* **14**, 81–95 (2005).
37. Beyer, C., Schett, G., Distler, O. & Distler, J. H. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum* **62**, 2831–2844 (2010).
38. Wynn, T. A. & Barron, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* **30**, 245–257 (2010).
39. Obara, W. *et al.* T cells and mast cells as a major source of interleukin-13 in atopic dermatitis. *Dermatology* **205**, 11–17 (2002).
40. Yamamoto, T., Takahashi, Y., Takagawa, S., Katayama, I. & Nishioka, K. Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol* **26**, 2628–2634 (1999).

Acknowledgements

This work was supported by the MINECO grants RTC-2014-1877-1 and SAF2014-53763-P. We acknowledge Carmen Cabrero-Doncel for her assistance with the article. HEK-293T-CB₂ cells were kindly provided by Prof. Akos Heinemann (Institute of Experimental and Clinical Pharmacology, Graz, Austria).

Author Contributions

Guarantor of integrity of the entire study: C.D.R., I.C., G.A., J.F.R. and E.M. M.A.C., I.C., M.L.B. and E.M. managed and designed the overall study; C.D.R., I.C. and E.M. contributed to the literature research; C.D.R., C.N., J.A.C., M.G.C., M.R.P., F.P. and I.C. performed *in vivo* and *in vitro* experiments. C.D.R., I.C., G.A., J.F.R. and E.M. collected and analyzed the data. C.D.R. and I.C. performed statistical analysis and C.D.R., M.A.C. and E.M. wrote the manuscript. All the authors approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: del Rio, C. *et al.* The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CB₂ pathways. *Sci. Rep.* **6**, 21703; doi: 10.1038/srep21703 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Tricyclic pyrazoles. Part 8. Synthesis, biological evaluation and modelling of tricyclic pyrazole carboxamides as potential CB₂ receptor ligands with antagonist/inverse agonist properties

Valeria Deiana^a, María Gómez-Cañas^{b, c, d, e}, M. Ruth Pazos^{b, c, d, e},
 Javier Fernández-Ruiz^{b, c, d, e}, Battistina Asproni^a, Elena Cichero^f, Paola Fossa^f,
 Eduardo Muñoz^g, Francesco Deligia^a, Gabriele Murineddu^{a, *},
 Moisés García-Arencibia^{b, c, d, e, 1}, Gerard A. Pinna^a

^a Dipartimento di Chimica e Farmacia, Università degli Studi di Sassari, via F. Muroli 23/A, 07100 Sassari, Italy^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain^c Campus de Excelencia Internacional (CEI-Moncloa), Madrid, Spain^d Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain^e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^f Dipartimento di Farmacia, Sezione Chimica del Farmaco e del Prodotto Cosmetico, Università degli Studi di Genova, Viale Benedetto XV, 3, 16132 Genova, Italy^g Maimonides Biomedical Research Institute of Córdoba, Reina Sofía University Hospital, Dept of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Avda Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 October 2015

Received in revised form

2 February 2016

Accepted 3 February 2016

Available online 6 February 2016

Keywords:

Tricyclic pyrazoles

Synthesis

Cannabinoid receptors

CB₂ antagonism

Molecular modelling

ABSTRACT

Previous studies have investigated the relevance and structure-activity relationships (SARs) of pyrazole derivatives in relation with cannabinoid receptors, and the series of tricyclic 1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazoles emerged as potent CB₂ receptor ligands. In the present study, novel 1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole and 1*H*-benzo[*g*]indazole carboxamides containing a cyclopropyl or a cyclohexyl substituent were designed and synthesized to evaluate the influence of these structural modifications towards CB₁ and CB₂ receptor affinities. Among these derivatives, compound **15** (6-cyclopropyl-1-(2,4-dichlorophenyl)-*N*-(adamantan-1-yl)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide) showed the highest CB₂ receptor affinity ($K_i = 4$ nM) and remarkable selectivity ($K_i\text{CB}_1/K_i\text{CB}_2 = 2232$), whereas a similar affinity, within the nM range, was seen for the fenchyl derivative (compound **10**: $K_i = 6$ nM), for the bornyl analogue (compound **14**: $K_i = 38$ nM) and, to a lesser extent, for the aminopiperidine derivative (compound **6**: $K_i = 69$ nM). Compounds **10** and **14** were also highly selective for the CB₂ receptor ($K_i\text{CB}_1/K_i\text{CB}_2 > 1000$), whereas compound **6** was relatively selective ($K_i\text{CB}_1/K_i\text{CB}_2 = 27$). The four compounds were also subjected to GTPγS binding analysis showing antagonist/inverse agonist properties (IC_{50} for compound **14** = 27 nM, for **15** = 51 nM, for **10** = 80 nM and for **6** = 294 nM), and this activity was confirmed for the three more active compounds in a CB₂ receptor-specific in vitro bioassay consisting in the quantification of prostaglandin E₂ release by LPS-stimulated BV2 cells, in the presence and absence of WIN55,212-2 and/or the investigated compounds. Modelling studies were also conducted

Abbreviations: Δ⁹-THC, Δ⁹-Tetrahydrocannabinol; 2-AG, 2-Arachidonoylglycerol; CB₁, cannabinoid receptor type 1; CB₂, cannabinoid receptor type 2; CNS, Central nervous system; TRPV1, transient receptor potential vanilloid-1 channel; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; GTPγS, guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate; LPS, lipopolysaccharide; DDQ, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone; hCB₂, human CB₂ receptor; FC, flash chromatography.

* Corresponding author.

E-mail address: muri@uniss.it (G. Murineddu).¹ Present address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ULPGC, Las Palmas, Spain.<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.005>

0223-5234/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.



Biological characterization of PM226, a chromenoisoxazole, as a selective CB₂ receptor agonist with neuroprotective profile



M. Gómez-Cañas^{a,b,c}, P. Morales^d, L. García-Toscano^{a,b,c}, C. Navarrete^e, E. Muñoz^f, N. Jagerovic^d, J. Fernández-Ruiz^{a,b,c,*}, M. García-Arencibia^{a,b,c,*}, M.R. Pazos^{a,b,c,*}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

^c Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

^d Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

^e Vivacell Biotechnology Spain, Córdoba, Spain

^f Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2016

Received in revised form 16 March 2016

Accepted 17 March 2016

Available online 22 March 2016

Keywords:

Cannabinoids

PM226

Chromenoisoxazole

Neuronal death

Neuroprotection

Anti-inflammatory effects

Glial-mediated effects

ABSTRACT

Cannabinoids have emerged as promising neuroprotective agents due to their capability to activate specific targets, which are involved in the control of neuronal homeostasis and survival. Specifically, those ligands that selectively target and activate the CB₂ receptor may be useful for their anti-inflammatory and neuroprotective properties in various neurological disorders, with the advantage of being devoid of psychotropic effects associated with the activation of CB₁ receptors. The aim of this work has been to investigate the neuroprotective properties of 7-(1,1-dimethylheptyl)-4,4-dimethyl-9-methoxychromeno[3,4-d]isoxazole (PM226), a compound derived from a series of chromeno-isoxazoles and -pyrazoles, which seems to have a promising profile related to the CB₂ receptor. The compound binds selectively to this receptor with an affinity in the nanomolar range ($K_i = 12.8 \pm 2.4$ nM). It has negligible affinity for the CB₁ receptor ($K_i > 40000$ nM) and no activity at the GPR55. PM226 was also evaluated in GTP γ S binding assays specific to the CB₂ receptor showing agonist activity ($EC_{50} = 38.67 \pm 6.70$ nM). *In silico* analysis of PM226 indicated that it has a good pharmacokinetic profile and a predicted ability to cross the blood-brain barrier. Next, PM226 was investigated in an *in vitro* model to explore its anti-inflammatory/neuroprotective properties. Conditioned media were collected from LPS-stimulated cultures of BV2 microglial cell line in the absence or presence of different doses of PM226, and then media were added to cultured M213-20 neuronal cells to record their influence on cell viability evaluated using MTT assays. As expected, cell viability was significantly reduced by the exposure to these conditioned media, while the addition of PM226 attenuated this reduction in a dose-dependent manner. This effect was reversed by co-incubating with the CB₂ antagonist SR144528, thus confirming the involvement of CB₂ receptors, whereas the addition of PM226 to neuronal cultures instead cultured BV2 cells was not effective. PM226 has also been studied in an *in vivo* model of mitochondrial damage generated by intrastriatal application of malonate in rats. MRI analysis showed that PM226 administration decreased the volume of the striatal lesion caused by malonate, effect that was confirmed after the histopathological evaluation (Nissl staining, Iba-1 immunostaining and TUNEL assay) of striatal sections derived from malonate-lesioned rats in the absence or presence of PM226. Again, the beneficial effects of PM226 were dependent on the activation of CB₂ receptors as they were reversed by blocking these receptors with AM630. Overall, PM226 has shown to have a promising neuroprotective profile derived from its ability to selectively activate CB₂ receptor, so that it could be a useful disease-modifying agent in those neurodegenerative pathologies in which the activation of these receptors may have therapeutic value.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding authors at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.

E-mail addresses: jjfr@med.ucm.es (J. Fernández-Ruiz), moisesgar@med.ucm.es (M. García-Arencibia), ruthpazos@med.ucm.es (M.R. Pazos).

¹ Present address: Instituto de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain.

Chromenopyrazole, a Versatile Cannabinoid Scaffold with in Vivo Activity in a Model of Multiple Sclerosis

Paula Morales,[†] María Gómez-Cañas,^{‡,§,∇} Gemma Navarro,^{||,∇} Dow P. Hurst,[⊥] Francisco J. Carrillo-Salinas,[#] Laura Lagartera,[†] Ruth Pazos,^{‡,§} Pilar Goya,[†] Patricia H. Reggio,[⊥] Carmen Guaza,[#] Rafael Franco,^{||} Javier Fernández-Ruiz,^{‡,§} and Nadine Jagerovic^{*,†}[†]Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid, Spain[‡]Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain[§]Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), E-28040 Madrid, Spain^{||}Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain[⊥]Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, North Carolina 27402, United States[#]Grupo de Neuroinmunología Neurobiología Funcional y de Sistemas, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, E-28002 Madrid, Spain

S Supporting Information



ABSTRACT: A combination of molecular modeling and structure–activity relationship studies has been used to fine-tune CB₂ selectivity in the chromenopyrazole ring, a versatile CB₁/CB₂ cannabinoid scaffold. Thus, a series of 36 new derivatives covering a wide range of structural diversity has been synthesized, and docking studies have been performed for some of them. Biological evaluation of the new compounds includes, among others, cannabinoid binding assays, functional studies, and surface plasmon resonance measurements. The most promising compound [43 (PM226)], a selective and potent CB₂ agonist isoxazole derivative, was tested in the acute phase of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (TMEV-IDD), a well-established animal model of primary progressive multiple sclerosis. Compound 43 dampened neuroinflammation by reducing microglial activation in the TMEV.

■ INTRODUCTION

The endocannabinoid system (ECS) composed of at least two cannabinoid G-protein coupled receptors (CB₁ and CB₂ receptors),^{1,2} endogenous ligands such as anandamide and 2-arachidonoylglycerol, and the enzymes for their biosynthesis and degradation, is involved in numerous physiological and pathological conditions.^{3–6} Therefore, for several years the ECS has been considered a potential therapeutic target for the clinical management of various disorders including inflammatory and neuropathic pain, neurological pathologies, and cancer among others.⁷ A few diseases can be treated nowadays with cannabinoid-based medicines, mainly, plant derived com-

pounds. A mixture of synthetic tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) [Figure 1] and nabilone, a Δ^9 -THC synthetic analogue, can be prescribed in several countries as antiemetic drugs for chemotherapy-induced nausea and vomiting^{8,9} and for anorexia¹⁰ treatment in patients with AIDS. A combination of Δ^9 -THC and cannabidiol is used for the symptomatic relief of spasticity in adults suffering multiple sclerosis and as an adjunctive analgesic treatment in adult patients with neuropathic pain or cancer.¹¹ Rimonabant, a CB₁ receptor

Received: March 16, 2016