



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**CANNABINOIDES EN EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA.
DISEÑO Y RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD**

Autor: Carla Lozano Llano

Tutor: Carmen del Campo Pérez

Convocatoria: Junio 2017

RESUMEN

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera a nivel mundial. La observación de que los fumadores de *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC) desarrollaban una reducción de la presión intraocular (PIO), sugirió el aislamiento de cannabinoides como posibilidad terapéutica en el tratamiento del glaucoma.

El sistema cannabinoide endógeno (SEC), permitió conocer los ligandos endógenos (CB), y los receptores (CB₁ y CB₂) que activan para mediar sus acciones. Así, surgió la necesidad de obtener ligandos cannabinomiméticos sintéticos, en concreto con mayor afinidad CB₁, ya que hay mayor expresión de estos receptores a nivel de la retina.

El objetivo es conseguir dilucidar la estructura de agonistas CB₁, con elevada biodisponibilidad, gran afinidad y selectividad, así como crear una síntesis adecuada para su obtención.

ABSTRACT

Glaucoma is one of the leading causes of blindness worldwide. The observation that smokers of *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC) developed a reduction in intraocular pressure (IOP), suggested the isolation of cannabinoids as a therapeutic possibility in the treatment of glaucoma.

The endogenous cannabinoid system (SEC), allowed us to know the endogenous ligands (CB), and the receptors (CB₁ and CB₂) that activate to mediate their actions. Thus, the need arose to obtain synthetic cannabinomimetic ligands, in particular with greater CB₁ affinity, since there is a greater expression of these receptors at the level of the retina.

The objective is to obtain CB₁ agonists, with high bioavailability, high affinity and selectivity, create a useful pathway to get them synthesized.

INTRODUCCIÓN

El glaucoma constituye una de las principales causas de ceguera en el mundo, afectando al 3 % de la población según datos de la Sociedad Española del Glaucoma, y es, además, la enfermedad neurodegenerativa retiniana más prevalente ⁽¹⁾. La Organización Mundial de la Salud consideró que el 12,3% de las personas ciegas en el mundo (en el año 2002) tuvieron como causa el glaucoma. Por otro lado, se ha estimado que para el año 2020 podría haber 79,6 millones de personas afectadas por glaucoma (74% con glaucoma de ángulo abierto).

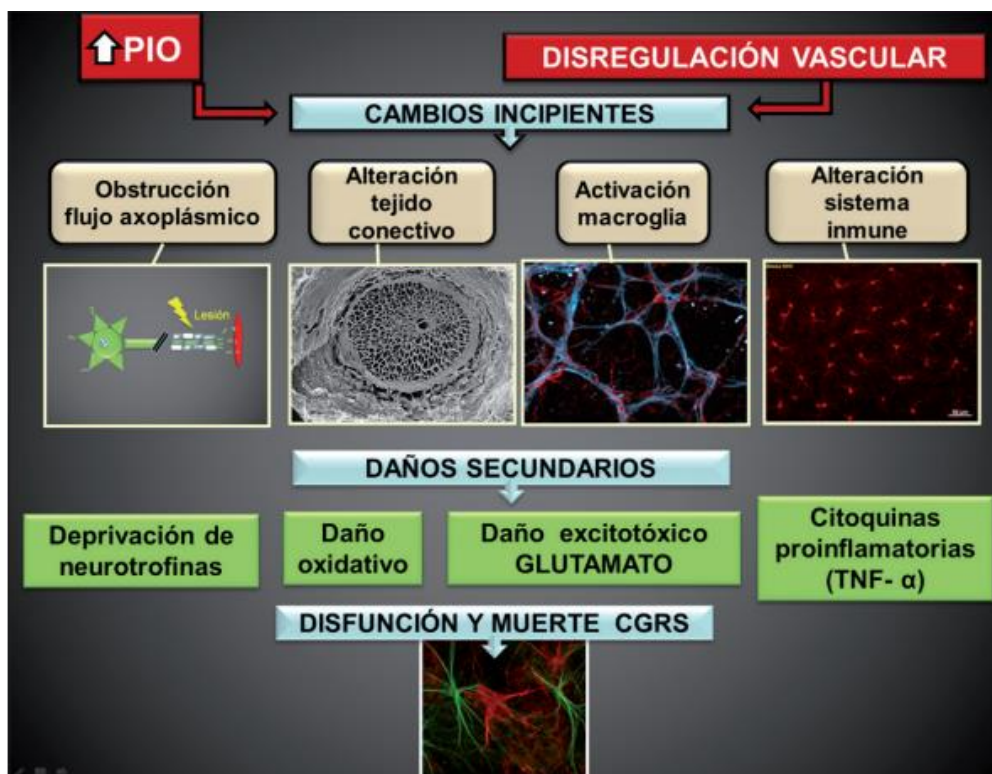
Se trata de una neuropatía óptica compuesta por un conjunto de afecciones oculares y su característica común es la destrucción del Nervio Óptico (NO) de forma lenta y progresiva ⁽¹⁾.

El glaucoma implica disminución de tejido neural, activación de las células gliales

(astrocitos), remodelación de tejidos (aumento de metaloproteinasas de matriz extracelular [MMPs] sobre todo de la MMP-9), variación en el número de linfocitos, desórdenes en el citoesqueleto y cambios en el riego sanguíneo. El glaucoma es una enfermedad multifactorial que implica daños celulares al combinarse el aumento de la Presión Intraocular (PIO) con otros factores de riesgo como son: la presión sanguínea elevada, otras patologías oculares, diabetes tipo II, la edad, el sexo y la herencia genética.

La primera fase de la enfermedad es una alteración en el correcto trofismo de las células ganglionares de la retina que se produce por la PIO y también induce la apoptosis de estas células. Ante el aumento de la PIO, el suministro sanguíneo que lleva a la retina se ve comprometido por el exceso de presión, viéndose afectado el tejido neuronal ya que, al aumentar la presión sobre el tejido conectivo de la cabeza del nervio óptico, se interrumpe el flujo axoplasmático, bloqueando la llegada de factores neutróficos.

En la segunda fase, se produce neurotoxicidad mediada por óxido nítrico y excitotoxicidad mediada por glutamato, donde el glutamato hiperestimula los receptores, aumentando las concentraciones de calcio intracelular y desencadenando la producción de radicales libres que son altamente citotóxicos (2). Estos tres factores amplifican los efectos iniciales de la lesión (1). Los cannabinoides, grupo farmacológico de interés en este trabajo, han demostrado eficacia a estos dos niveles.

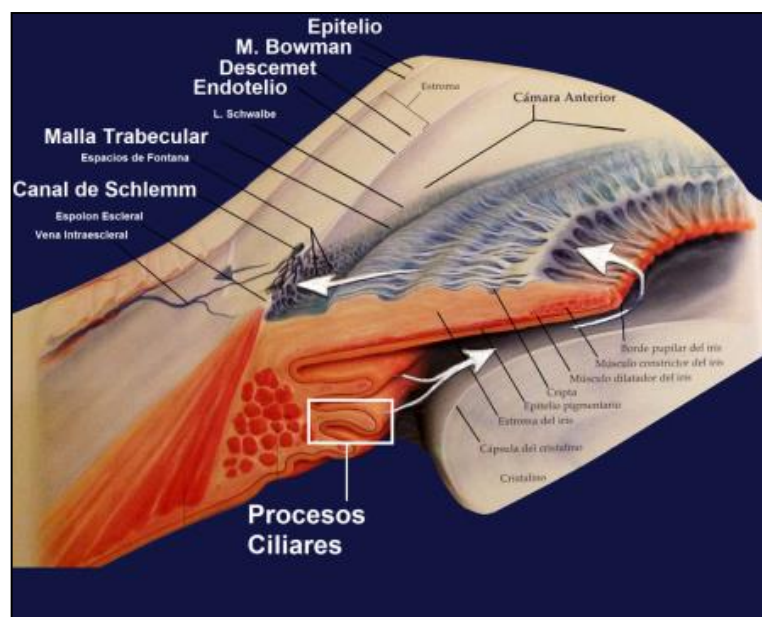


El incremento de la PIO puede producir un aumento de la resistencia al drenaje del humor acuoso, por tanto, es interesante saber las diferentes vías por las que drena el humor acuoso:

- La vía trabecular o convencional que se encarga aproximadamente del drenaje del 90% del humor acuoso. En esta vía el humor acuoso atraviesa la malla trabecular y el canal de Schlemm antes de drenar al sistema venoso.
- La vía uveoescleral o no convencional que se ocupa del drenaje del 10% del humor acuoso restante.
- Una pequeña cantidad también drena a través del iris (3).

Existen otros factores que también pueden llevar a la destrucción del NO: pacientes con miopía severa, uveítis, traumatismos graves, retinopatía diabética proliferativa y trombosis en la retina. Este daño genera una disminución del campo visual que se manifiesta con una visión en túnel que puede llegar incluso a la pérdida completa de visión (4).

La patogénesis del glaucoma es controvertida, pero hay dos conceptos que parecen ser fundamentales: **DAÑO EN LOS AXONES Y ACTIVACIÓN DE LOS ASTROCITOS**.



Flujo de humor acuoso a través de la vía trabecular

ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LOS CANNABINOIDES EN EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA

La primera vez que se observó que la marihuana (*Cannabis sativa*, L) disminuía la presión intraocular fue en el año 1970 por Hepler y Frank. Desde entonces se ha desarrollado un profundo trabajo de estudio sobre varios cannabinoides y su uso en terapéutica. También es

cierto que aún no ha sido aprobado ningún tratamiento derivado de esta planta o análogo sintético para su uso en terapéutica ocular, pero sí en el tratamiento de otras patologías y patologías. Ésto es debido a que se ha atribuido una corta duración de efecto, una potencial desensibilización del receptor, así como efectos sistémicos no deseados (5).

Tipos de receptores cannabinoides

Los cannabinoides ejercen sus efectos farmacológicos mediante la activación de receptores específicos de membrana. Se han identificado dos receptores para los cannabinoides CB₁ y CB₂. Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana.

Los receptores CB₁ se localizan fundamentalmente en el sistema nervioso central. Se sitúan en ganglios basales, capa molecular del cerebelo y ciertas partes del hipocampo y, a nivel periférico, en bazo y amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales nerviosas simpáticas. En el ojo se sitúan en capas intermedias de la retina así como en zonas implicadas en la regulación de la producción y excreción del humor acuoso: el cuerpo ciliar, vasos sanguíneos del cuerpo ciliar, el músculo ciliar y la malla trabecular.

Los receptores CB₂ se localizan fundamentalmente en bazo, amígdalas y en distintas células del sistema inmune, lo que explica las propiedades inmunosupresoras de la marihuana.

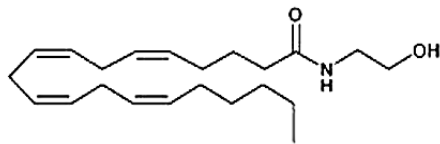
Asimismo, los cannabinoides tienen afinidad por receptores denominados “no clásicos” que incluyen receptores acoplados a proteínas G como GPR18 y GPR5, junto con el receptor de vainiloides TRPV1 y receptores de peroxisomas activadores de la proliferación PPARs: α , β/δ y γ (5).

Mediante la activación de estos receptores, los agonistas de cannabinoides han demostrado un claro efecto hipotensor ocular, un probado efecto neuroprotector sobre las células ganglionares de la retina y un efecto en la modulación de la inflamación (1) y (5).

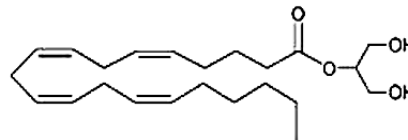
LIGANDOS ENDÓGENOS

Los endocannabinoides son amidas y ésteres de ácidos grasos de cadena larga. La anandamida (AEA) y el 2- acil-glicerol (2-AG) son los endocannabinoides más estudiados. El conjunto de los endocannabinoides, los receptores a los que se unen y las proteínas que sintetizan, transportan y degradan es lo que conocemos como: “sistema endocannabinoide endógeno”.

Se ha evidenciado la presencia, síntesis y degradación de AEA en distintas estructuras oculares de diferentes mamíferos en modelos porcinos (1).



N-araquidonil-etanolamida (AEA)



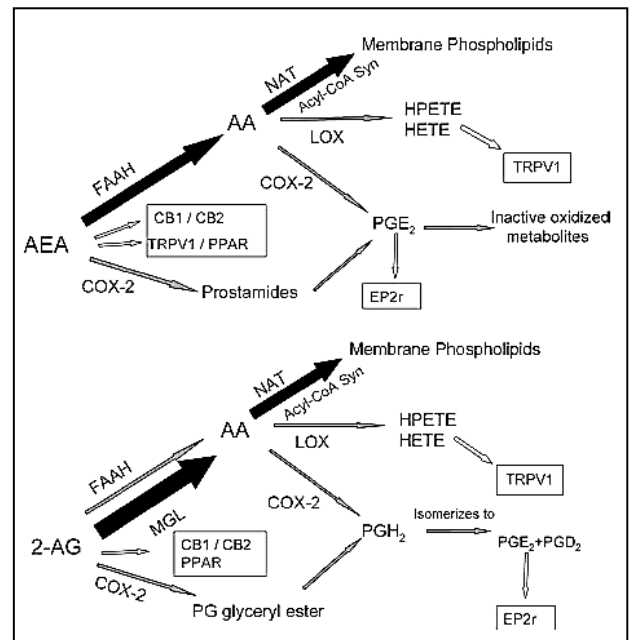
2-Araquidonil glicerol (2-AG)

Endocannabinoides más conocidos

Metabolismo del sistema cannabinoide endógeno

La anandamida se metaboliza por tres mecanismos principales, pero hay uno que resulta fundamental a nivel ocular y es la hidrólisis producida por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), que transforma la anandamida en ácido araquidónico (AA) y etanolamina y además cataliza el proceso inverso transformando el AA+etanolamina en anandamida. Esta enzima actúa también sobre análogos de anandamida como 2AG. El ácido araquidónico resultante de esta reacción, puede ser metabolizado por la COX para la producción de prostaglandinas (PGs).

Recientemente se ha demostrado que la anandamida puede ser sustrato de la COX-2 que la transforma en prostaglandina E2-etanolamida y D2-etanolamida. Estos productos han sido denominados “prostamidas”. La prostamida E2 tiene un perfil de acción parecido a la PGE₂ ya que se une a los cuatro receptores EPs pero de manera menos potente.



Metabolismo endocannabinoide

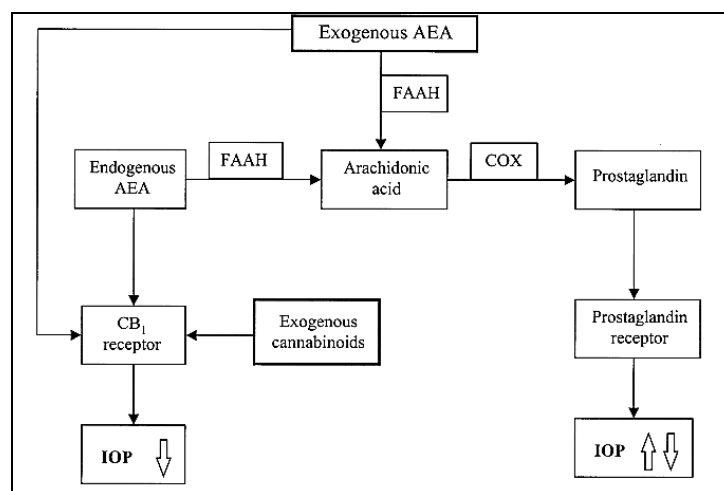
PRODUCTOS NATURALES E IMPORTANCIA EN EL SAR DE LOS AGONISTAS CB1 PARA EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA

El Cannabis sativa L. secreta una resina que contiene más de 400 compuestos químicos. De ellos, alrededor de 60 son componentes activos y el principal es el tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). A esta sustancia se le atribuye la mayor parte del efecto del cannabis pero parece que otros cannabinoides como el cannabinoil y el cannabidiol lo modulan.

No fue hasta la década de los 70 cuando se dispararon los estudios sobre los cannabinoides aplicados al glaucoma. A raíz de esto se observó un claro efecto hipotensor ocular con un

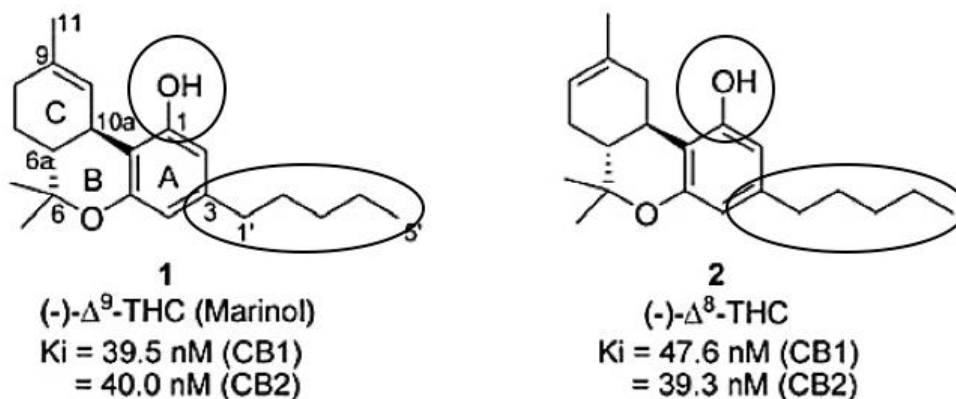
descenso de entre un 5% y un 45% de la tensión ocular y esto se observó en una muestra de voluntarios que ingería o fumaba marihuana. El efecto tenía una duración media de 3-4 horas y requería por tanto una frecuente dosificación para mantener tensiones con efectos similares sobre la tensión ocular. Así se confirmó que el principal ingrediente activo y con mayor efecto de la marihuana era el $\Delta 9$ -THC ya que, disminuía la tensión ocular cuando era administrado por vía intravenosa, oral o inhalado. Con respecto a este efecto hipotensor ocular dosis-dependiente, se ha clasificado como respondedores a cannabinoides a un 60-65% de la población, conclusiones sacadas de una muestra con voluntarios sanos y pacientes con glaucoma.

Los receptores CB_1 podrían actuar como neuroprotectores al inhibir los canales de calcio voltaje-dependientes. Sin embargo, no está del todo claro que el efecto neuroprotector aportado por los cannabinoides se encuentre exclusivamente a nivel de los receptores CB_1 , ya que el empleo de Cannabidiol (CBD) no activa los receptores CB_1 y éste demostró tener un efecto neuroprotector *in vivo* mediante el bloqueo en la formación de nitrotirosina. Además, el CBD no solo ejerce efectos neuroprotectores *per se*, sino que también inhibe la degradación del cannabinoide endógeno, araquidonil etanolamida o anandamida.



Acción sobre el receptor CB_1 y metabolismo de cannabinoides exógenos y endógenos

Ha sido evidenciado también que los cannabinoides poseen actividad antioxidante, independientemente de la activación de receptores CB_1/CB_2 , los cuales ejercen un efecto protector contra el estrés oxidativo en las células neuronales. Este mecanismo antioxidante requiere, como parámetro estructural, la presencia del fragmento fenólico como grupo farmacóforo, típico para cannabinoides naturales (cannabidiol) y sintéticos (CP-55940) (2).



Estructuras de cannabinoides clásicos.

RELACIÓN DEL RECEPTOR CB₁ Y PGE₂ (PROSTANOIDES), ASÍ COMO DE LOS β -ADRENÉRGICOS EN EL TRATAMIENTO ACTUAL DEL GLAUCOMA

El tratamiento farmacológico habitual del glaucoma se realiza vía tópica. Se dispone de diferentes fármacos para el tratamiento, que pueden administrarse de forma aislada o en combinación con otros fármacos. A veces no resultan suficientemente eficaces, por lo que es necesario buscar nuevas líneas de tratamiento.

El mecanismo de salida del humor acuoso a través de la vía trabecular es el predominante en el ojo humano sano, y puede ser mejorado por la contracción del músculo ciliar o distendiendo la malla trabecular. Alternativamente, se ha demostrado que las sustancias relajantes del músculo liso disminuyen el tono de la malla trabecular que conduce a un aumento en los espacios inter-trabeculares a través de los cuales puede ocurrir el flujo de salida. El tono trabecular también puede ser regulado por la interacción de las sustancias producidas endógenamente, como la endotelina y las prostaglandinas (6).

Basándose en estos dos mecanismos el tratamiento farmacológico del glaucoma se ha compuesto de los siguientes fármacos: β -bloqueantes, simpaticomiméticos, α -agonistas, inhibidores de la anhidrasa carbónica y, más recientemente, los análogos de las prostaglandinas.

La introducción en terapéutica de los análogos de las prostaglandinas ha supuesto que pasen también a considerarse como fármacos de primera línea. Éstos actúan aumentando el flujo de salida de humor acuoso del ojo, sobre todo incrementando el drenaje uveoescleral, a través de la superficie del cuerpo ciliar y de la raíz del iris. Los análogos de las prostaglandinas parecen reducir la PIO en mayor medida que el timolol (β -adrenérgico típico) (7).

Como se ha mencionado, en el metabolismo de los endocannabinoides, la relación entre ellos y los análogos de prostaglandinas es directa ya que al catabolizarse AG-2 y AEA por las correspondientes rutas se produce PGE₂. Por lo que podríamos decir que los cannabinoides ejercen una doble acción hipotensora, primero como análogos del receptor CB₁ y posteriormente, al metabolizarse, siguen siendo activos al producirse prostaglandinas. Además, ambos ejercen su acción abriendo los canales BKCa y relajando la malla trabecular ocular (8).

La acción hipotensora de los análogos de las PGs se desarrolla por su interacción con los receptores FP presentes en el músculo ciliar, aumentando la vía de drenaje uveoescleral, como ya se ha mencionado, y se han propuesto dos posibles vías: abriendo canales BKCa produciendo la relajación de la malla trabecular y por la remodelación de la matriz extracelular del músculo ciliar, quizás a través de un aumento de producción de metaloproteinasas (9).

Por otro lado, en 2011 se produjo el primer estudio con ratones en el que se demostró la primera evidencia de que los agonistas cannabinoides, por si solos, no reducen la PIO en ratones RAβ (-/-). Por lo que es necesaria su presencia para que puedan ejercer su acción. Se ha estudiado, también, que las acciones simpaticolíticas indirectas en los receptores adrenérgicos β (RAβ) representan las acciones hipotensoras oculares de los agonistas de los receptores cannabinoides. Esto quiere decir que, los cannabinoides reducen la PIO actuando como simpaticolíticos indirectos e inhibiendo la liberación de norepinefrina (NE) dentro del ojo. Por tanto, los cannabinoides producen su efecto hipotensor ocular primario en el ojo al inhibir la liberación de (NE).

En varios estudios en los que los antagonistas RAβ han sido co-administrados con agonistas cannabinoides, no se observaron efectos aditivos sobre la PIO (Green et al., 1977 (10)). Esta falta de efecto aditivo sugiere que puede haber una superposición en los mecanismos de reducción de la PIO para estas dos clases de fármacos. Esto demuestra que los cannabinoides reducen la PIO principalmente actuando como agentes simpaticolíticos indirectos. Este mecanismo implica la presencia de receptores CB₁, catecolaminas y también de RAβs.

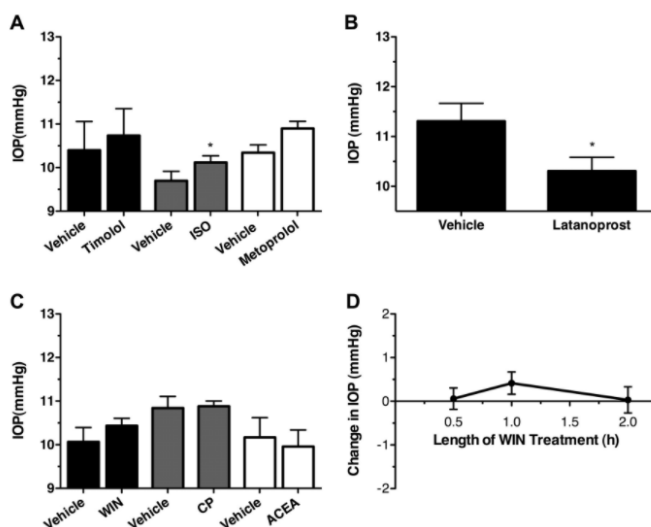
Debido a que tanto los receptores CB₁ como los RAβ se expresan en los tejidos implicados en cada uno de los procesos de producción y drenaje del humor acuoso, los efectos globales sobre la PIO de fármacos que actúan sobre estos receptores son, probablemente, el resultado de la combinación de sus efectos sobre cada uno de estos tejidos. Por ejemplo, tanto los antagonistas de RAβ como los agonistas pueden reducir la PIO. Los antagonistas de RAβ disminuyen la entrada de humor acuoso desde el cuerpo ciliar, mientras que los agonistas

RA β aumentan el flujo de salida del humor acuoso. Dado que los receptores CB₁ se expresan en los tejidos tanto de las vías de entrada como de salida, también es probable que estos compuestos, que actúan directa o indirectamente, tengan más de un sitio de acción que afecte a la PIO.

El mecanismo más plausible que explica esta observación es que los agonistas del receptor CB₁ disminuyen la PIO principalmente activando los receptores presinápticos CB₁ para inhibir la liberación de norepinefrina, como se ha demostrado en otros tejidos. Este efecto presináptico debe disminuir la secreción de humor acuoso del epitelio ciliar, lo que conduce a reducir la PIO. Sin embargo, cabe señalar que, aunque se encontró que el receptor CB₁ se colocalizaba con los receptores adrenérgicos en el ojo anterior, la mayor parte de la tinción con CB₁ no se solapaba con los mismos, lo que sugiere que CB₁ puede tener funciones postsinápticas adicionales (o no sinápticas).

Posteriormente han demostrado que los receptores CB₁ se heterodimerizan con receptores RA β ₂, y que ambos receptores se expresan dentro del epitelio del cuerpo ciliar (Straiker et al., 1999 (11)) La posibilidad de que la heterodimerización CB₁ / RA β ₂ dentro de las células epiteliales ciliares contribuya a las propiedades hipotensoras oculares de los cannabinoides no puede descartarse completamente.

Además, trabajos previos sugieren que los cannabinoides pueden aumentar el flujo trabecular (Stumpff et al., 2005 (8)) y la heterodimerización CB₁ / RA β ₂ que modula la función de RA β ₂s dentro de las células trabeculares (Hudson et al., 2010 (12)). Por lo tanto, este heterodímero, al menos teóricamente, podría ser un mecanismo que explique el hecho de que los agonistas cannabinoides y RA β no redujeron la PIO en ratones CB₁ (- / -) y RA β (- / -), en el mismo trabajo del 2011 (9).



Acción de los antagonistas de los RA β , los agonistas de RA β y los agonistas cannabinoides sobre la PIO de ratones RA β (-/-) frente a la acción de Latanoprost, un análogo de PGs. Demostración de los diferentes mecanismos de acción.

RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE POSIBLES FÁRMACOS ANTIGLAUCOMA: PIRAZOLES

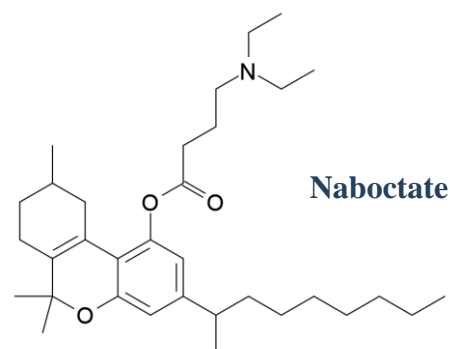
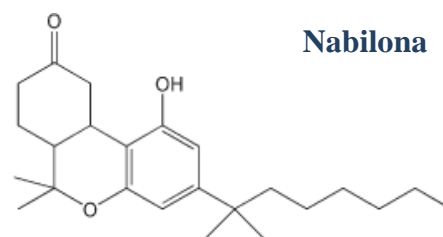
Los cannabinoides naturales son sustancias que suelen tener una estructura carbocíclica con 21 carbonos y están formados generalmente por tres anillos: ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno.

El conocimiento de las relaciones existentes entre la estructura y la actividad de los cannabinoides ha permitido el diseño de compuestos análogos. En algunos casos, se ha modificado el marcado carácter hidrofóbico de los cannabinoides para aumentar su solubilidad en agua. Otras veces, se ha aumentado la afinidad por su receptor.

Además, las sucesivas modificaciones de su estructura han permitido la preparación de derivados relacionados con alguna de las acciones atribuidas a estos compuestos, evitando las relativas a sus efectos psicotrópicos. Así se han creado cannabinoides sintéticos con propiedades terapéuticas como la Nabilona y el Naboctate.

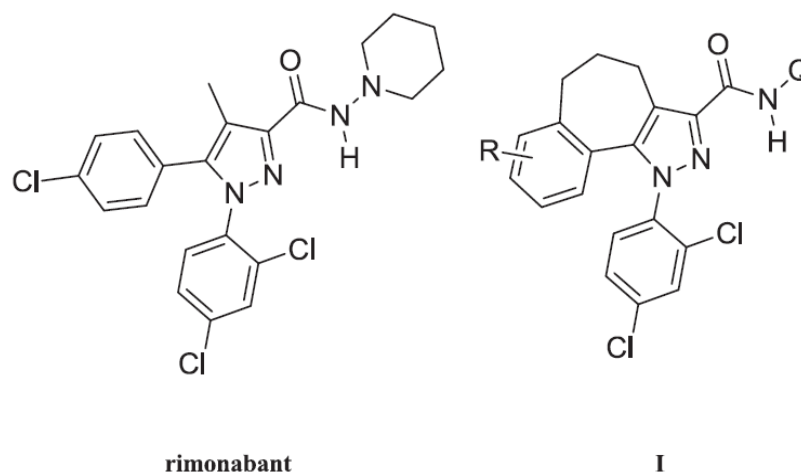
El primero posee, en el carbono nueve, un grupo cetónico en lugar de un metilo, lo que le confiere un apreciable efecto antiemético. La presencia en el segundo de un grupo dietil-etilamino esterificado en el hidroxilo fenólico implica la reducción de la presión intraocular (Razdan, 1986 (13)). El 11-hidroxi- Δ^8 -THC-DMH (HU-210) es el cannabinoide sintético más potente de los actualmente conocidos. Esta propiedad está relacionada con la presencia de un grupo hidroxilo en C11 y de 1,1, dimetilheptilo en su cadena lateral. Su elevada potencia fue clave para la caracterización de la anandamida, que ha sido el primer cannabinoide endógeno aislado en tejido cerebral.

Por otro lado, los aminoalquilindoles no están relacionados estructuralmente con los cannabinoides, pero muestran un perfil farmacológico cannabimimético. Uno de ellos, el WIN-55212-2 se une al receptor de cannabinoides, inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa, por lo que se ha utilizado en la caracterización de este receptor (Bell y cols., 1991 (14)). La anandamida y el 2-araquidonilglicerol, que son los dos cannabinoides endógenos, mejor caracterizados, tienen una estructura química muy diferente a la del Δ^9 -THC y carecen de sus propiedades psicotrópicas (15).



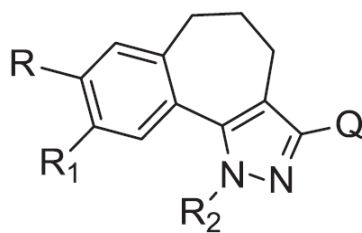
Productos pirazólicos y triazólicos, demuestran mayor actividad sobre receptores CB₁ frente a otros compuestos. Recientemente se han estudiado análogos para el tratamiento de la obesidad, deshabituación tabáquica y otra serie de patologías mediadas por el receptor CB₁, como es el caso del glaucoma (16). Un estudio publicado en 2016, presenta una serie de resultados interesantes respecto al SAR de compuestos pirazólicos. En este estudio tomaron como compuesto de referencia el 8 - Cloro - 1- (2', 4' - diclorofenil) - N - piperidin - 1 - il - 1,4,5,6 - tetrahidrobenzo [6,7] ciclohepta [1,2 - c] pirazol - carboxamida, denominado compuesto 1. Este compuesto se trataba de un análogo rígido del Rimonabant.

Revisaron la síntesis del compuesto 1, ya que sus resultados de K_i para el receptor CB₁ y CB₂, eran dispares entre varios equipos de investigación. De estas síntesis se produjeron resultados de afinidad concluyentes.



COMPUESTO	K _i CB ₁ (nM)	K _i CB ₂ (nM)
1 síntesis A	4.20 (0.3-56)	55.7 (18-176)
1 síntesis B	8.18 (0.9-60)	85.2 (35-208)
CP-55,940	0.62 (0.2-1.9)	9.73 (1.1-18.0)
Rimonabant	2.82 (0.9-9.8)	1400 (750-2350)

Como los valores de K_i de los compuestos 1, sintetizados por diferentes vías propuestas, no eran tan buenos como los de otros análogos ya estudiados, se produjeron cambios en los diferentes radicales obteniendo distintos compuestos. De estos compuestos se obtuvieron algunas conclusiones.



Compd	R	R ₁	R ₂	Q	Compd	R	R ₁	R ₂	Q
1	Cl	H			8	Cl	H		
2	Cl	H			9	H	Cl		
3	Cl	H			10	Cl	H		
4	Cl	H			11	H	Cl		
5	Cl	H			12	Cl	H		
6	Cl	H			13	Cl	H		
7	Cl	H							

1. La introducción de un espaciador de metileno entre el anillo de ciclohexilo y el grupo carboxamida en la posición 3 del anillo de pirazol (de **4 a 5**) produjo una duplicación de K_iCB_1 , aunque esta modificación mantuvo una buena afinidad CB_1R (**5**: $K_iCB_1 = 19,4$ nM).
2. No se registró ningún efecto significativo debido a la sustitución del anillo de ciclohexilo en **5** para dar los derivados **6 y 7**. Sin embargo, el compuesto que portaba el sustituyente voluminoso de myrtanil (**8**) mostró la mejor afinidad CB_1R , con un $K_iCB_1 = 3,6$ nM, que fue equivalente al determinado para el cabeza de grupo **1**.
3. El desplazamiento de la posición del átomo de cloruro 8 a 9 de los derivados tricíclicos basados en myrtanil indujo una disminución de la afinidad RCB_1 .
4. La sustitución del 2,4-dicloro-fenilo por el sustituyente 4-metil-bencilo en 1 posición del anillo de pirazol de **8 y 9** determinó los compuestos **10 y 11**, respectivamente. En ambos casos, la modificación adoptada provocó una reducción significativa de la afinidad RCB_1 , con 2-3 órdenes de magnitud de aumento de K_iCB_1 valores.

5. Introducción de un grupo cetona en la posición 3 del anillo de pirazol, no generó una mejor unión, de hecho, el compuesto **12** mostró un valor más favorable de $KiCB_1$ que demostró una disponibilidad de los electrones de oxígeno cetónico para formar enlaces de hidrógeno con el RCB_1 en lugar de los del resto hidroxilo. Entre los compuestos sintetizados, el compuesto **12** muestra la mejor selectividad RCB_1 , con $KiCB_2 / KiCB_1 = 38,24$
6. La selectividad aceptable de RCB_1 se registró sólo para **1 y 2** ($KiCB_2 / KiCB_1$ de 13,26 y 10,58, respectivamente).

Todo esto produjo que se escogieran tres análogos (**4, 12 y 13**) por sus características estructurales y de afinidad. Se compararon con otras estructuras no rígidas y se volvió a demostrar la necesidad de la estructura plana para la mayor afinidad hacia el receptor CB_1 (16).

Estudio conformacional

A continuación, se seleccionaron tres de los nuevos análogos (**4, 12 y 13**) para cálculos conformacionales y electrostáticos para definir algunas características estructurales en relación con el sustituyente C3-pirazol.

El análisis determinó la conformación de mínima energía para **1** y es aquella en el que el anillo de piperidina está en conformación de silla, con el par de electrones de nitrógeno solitario y el grupo de oxígeno de la carboxamida apuntando en la dirección opuesta. También se consideró el conformador que muestra el par de electrones del nitrógeno de piperidina y el oxígeno de carboxamida en la misma dirección propuesta por (Hurst et al, 2002 (17)). Las diferencias de energía entre ambos conformadores fueron $\Delta E = 0,84$ kcal / mol para **1** y 0,91 kcal / mol para rimonabant.

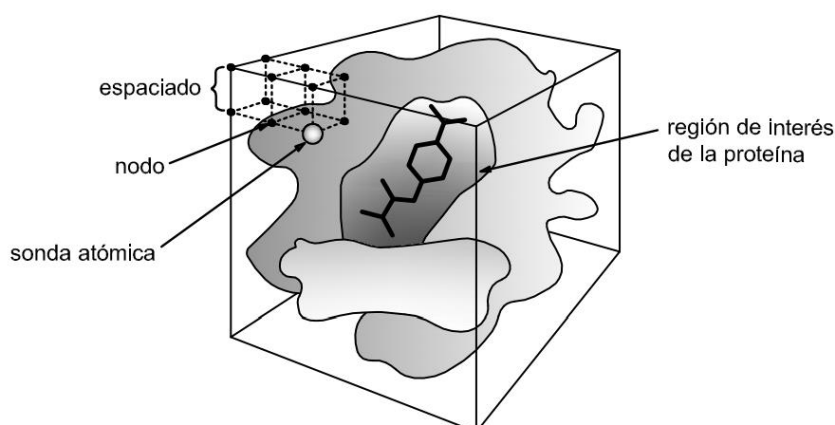
Las modificaciones estructurales realizadas en el sustituyente C3 de **1** preservan la geometría de los anillos de fenilo y el núcleo de pirazol. Sin embargo, había una diferencia crucial en el mapa de potencial electrostático de **13** en comparación con **1, 4 y 12**. Esta diferencia se refiere a la orientación de la región más electronegativa de la molécula. Un enlace de hidrógeno intramolecular, entre el grupo hidroxilo y el nitrógeno pirazol, puede estabilizar el conformero mínimo de energía. Esta conformación dificulta la disponibilidad del par aislado de oxígeno para interactuar con RCB_1 explicando la disminución de la afinidad (16).

ESTUDIO DOCKING

El estudio Docking es un método que predice la conformación preferida de una molécula, al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable. Permite predecir la fuerza de la asociación o la afinidad de enlace entre dos moléculas.

El acoplamiento molecular se usa para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña, que serán candidatos a fármacos, con la proteína que será donde ejercerán su acción (receptor CB₁ o CB₂), con lo que se podrá predecir la afinidad y la actividad de la molécula de estudio (DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS).

El estudio Docking permite localizar el sitio activo, realizar una búsqueda conformacional del ligando en el sitio activo, aplicar filtros que determinan rápidamente las conformaciones que son eliminables por forma y generar un Grid, de las conformaciones que han pasado el filtro, que es la aplicación de rejillas tridimensionales rectangulares con las que se discretiza el espacio alrededor del receptor o de su centro activo, evaluándose la energía de interacción entre la molécula y un átomo (sonda química), localizado en cada uno de los nodos situados en puntos igualmente espaciados, de la rejilla tridimensional.



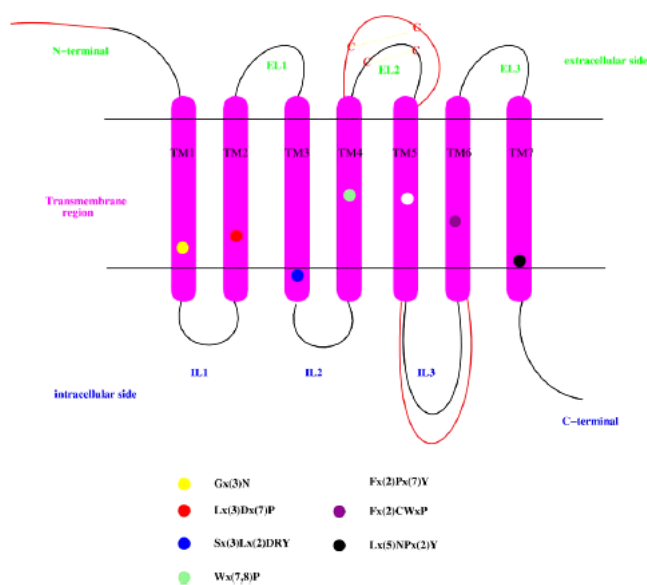
En un estudio realizado en 2005, produjeron los modelos 3D de los receptores CB₁ y CB₂ humanos (dónde el receptor cannabinoide CB₂ muestra un 44% de identidad con el receptor cannabinoide CB₁), mediante modelado de homología usando como modelo la estructura de rayos X de la rodopsina bovina (código pdb: 1F88) que es un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Un recurso que permite la alineación de secuencias y la posterior construcción del modelo.

Los efectos estructurales de la unión del ligando se estudiaron y analizaron sobre la base de las interacciones de enlace de hidrógeno, y los cálculos de energía de unión. Los sitios de interacción potencial del receptor se determinaron a partir del análisis del estudio de la superficie de acceso accesible (DASA) de la proteína con y sin ligando.

Los estudios de mutación específicos de sitio en la subfamilia de receptores de rodopsina sugieren que el sitio de unión del ligando está localizado dentro de la región de núcleo TM en la hendidura formada por TM3 TM5 TM6 y TM7.

La mayoría de los residuos que son clave para GPCRs se conservan en CB₁ y CB₂. Las principales diferencias de secuencia entre 1F88 y los receptores cannabinoides se encuentran en la región transmembrana TM5. La familia de los GPCRs tiene prolina altamente conservada en TM5 (215, 1F88), mientras que no está presente en el receptor cannabinoide y, adicionalmente, dos residuos tirosina (207 y 208, numeración CB₂) están presentes en CB₁ mientras que es una región que normalmente contiene una única tirosina en CB₂. Además, esta región muestra en CB₁ y CB₂ un entorno aromático fuerte, más notable en CB₂.

C. Montero et al. / European Journal of Medicinal Chemistry 40 (2005) 75–83



Key residues cons

TM	Pattern	Rhodopsin	CB1	CB2
TM1	Gx ^a (3)N	+	Gx(2)Tx(3)N	Gx(2)Sx(3)N
TM2	Lx(3)Dx(7)P	Lx(3)D	Lx(3)D	Lx(3)D
TM3	Sx(3)Lx(2)Ix(2)DRY	+	Sx(3)Tx(2)Ix(2)DRY	Sx(3)Tx(2)Ix(2)DRY
TM4	Wx(7,8)P	+	+	+
TM5	Fx(2)Px(7)Y	+	-	-
TM6	Fx(2)CWxP	+	Lx(2)CWxP	Lx(2)CWxP
TM7	Lx(5)NPx(2)Y	Kx(5)YNPx(2)Y	+	+

Montero C, Campillo NE, Goya P, Páez JA. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. 2005 Jan; 40(1):75-83.

Otra diferencia importante es la ausencia en CB₁ y CB₂ de las cisteínas implicadas en un puente disulfuro presente en todos los miembros de la familia de los GPCR. Sin embargo, hay dos otras cisteínas conservadas en ambos receptores cannabinoides que podrían estar involucrados en un puente disulfuro.

Por otro lado, las diferencias más importantes entre CB₁ y CB₂ se localizan en el extremo N-terminal, el bucle extracelular II (EL2), C-terminal de la hélice transmembrana VII (TM7) y el C-terminal. Sólo CB₁ de todos los miembros de la clase I de la familia GPCR tiene una larga N-terminal, aproximadamente de los 70 residuos y los estudios no muestran ningún golpe significativo en esta región. CB₁ tiene una serina (en la posición 317) situada en el bucle intracelular III (IL3) que es un sitio fosforilado de la proteína kinasa C (PKC) mientras que en CB₂ esta serina no está presente. CB₁ muestra una región (RxAFRS) que está bien conservada en receptores de canales catiónicos tales como el receptor vanilloide VR1 lo que podría demostrar la acción de los análogos de cannabinoides sobre estos receptores.

Con el fin de investigar la predictividad, así como las características del sitio de unión de nuestros modelos y para facilitar el diseño racional de nuevos ligandos selectivos del receptor cannabinoide se realizó un acoplamiento de los ligandos cannabinoides, es decir, un estudio Docking.

Como regla general, la interacción del ligando con el receptor cannabinoide está mediada por enlace de hidrógeno específico y por interacciones aromáticas entre la cadena principal del ligando y el sitio activo del receptor. Teniendo en cuenta estos hechos, utilizaron las interacciones aromáticas y las de enlace de hidrógeno como el principal criterio de análisis. Se calculó la energía de la unión para cada complejo receptor-ligando.

LIGANDO	PUENTE DE HIDROGENO	CONTACTO AR-AR	ENERGIA DE AFINIDAD	Ki
SR 141716A (CB ₁)	O(CO)-Lys 122 N- Trp 209	Phe130,Phe198, Trp209,Trp286	-64,00	2.2 5.9
AM-630 (CB ₂)	O-Thr114	Phe197	-39,72	31.2
SR144528 (CB ₂)	N(1)-Ser165 N(2)-Ser 165 O(CO)-Ser161 N(NH)-Val164	Trp172, Tyr190 Trp194, Phe197	-67,23	1.99 5.6

La identificación del sitio de emplazamiento y las conformaciones de unión de los ligandos cannabinoides dentro de los receptores CB es de gran interés para la comprensión de principios que explican las interacciones entre el ligando y los residuos de aminoácidos y para el diseño de nuevos ligandos.

El diseño de ligandos representa un enfoque integral útil para proporcionar información estructural no disponible a partir de los métodos experimentales. Se han utilizado estudios de acoplamiento para estudiar orientaciones de unión y predicción de afinidades de unión (18).

CONCLUSIÓN

La revisión bibliográfica de las diferentes fuentes ha permitido concluir que los cannabinoides, los ligandos endógenos, así como los compuestos análogos, presentan una conexión con los tratamientos habituales para el glaucoma, además de poseer su propia acción sobre la disminución de la PIO, demostrando su gran potencial como futuro tratamiento.

Por un lado, los cannabinoides median su acción por los mismos canales BKCa que los análogos de prostaglandinas, permitiendo el incremento del drenaje uvoescleral. A su vez interaccionan con los receptores RA β , disminuyendo la entrada de humor acuoso desde el cuerpo ciliar y aumentando el flujo de salida. Por otra parte, no se descartan otras posibles vías de acción de estos compuestos, como su participación en vías donde se produce una heterodimerización CB₁ / RA β ₂.

El estudio de su relación estructura actividad no sólo ha permitido el desarrollo racional de fármacos, sino que también ha permitido conocer en profundidad estructuras del receptor no conocidas hasta el momento.

Respecto a los pirazoles, se han conseguido diferentes resultados interesantes que abren un campo más amplio de estudio para el tratamiento de esta patología:

- Entre los compuestos sintetizados, el compuesto **12** muestra la mejor selectividad para el RCB₁, con KiCB₂ / KiCB₁ = 38,24.
- El compuesto **8**, que portaba el sustituyente voluminoso de myrtanil, mostró la mejor afinidad para RCB₁, con un KiCB₁ = 3,6 nM, que fue equivalente al determinado para el cabeza de grupo **1**.
- Sólo se consiguió una selectividad aceptable para RCB₁ en los compuestos **1** y **2** (KiCB₂ / KiCB₁ de 13,26 y 10,58, respectivamente).

Por otro lado, el estudio conformacional permitió determinar la orientación más favorable y es aquella en la que el compuesto **1** tiene el que el anillo de piperidina en conformación de silla, con el par de electrones de nitrógeno solitario y el grupo de oxígeno de la carboxamida apuntando en la dirección opuesta.

Por último, el estudio Docking ha permitido conocer las interacciones principales necesarias para la unión del ligando con su receptor: el enlace de hidrógeno específico y las diferentes interacciones aromáticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. Pinar-Suerio, R. Rodriguez-Puertas y E. Vecino (2010). Aplicaciones de los cannabinoides en glaucoma. *Archivo Sociedad Española Oftalmología*. 2011;86(1):16-23.
2. Fernando Berrendero. Guía Básica sobre los Cannabinoides. Sociedad Española de investigación sobre cannabinoides. Capítulo 2: Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno. ISBN: 84-699-8658-9. Depósito Legal: M-29044-2002
3. Depósito Legal: GR-356-1984. ISSN 0212-9450. Año XX, n.º 151 Septiembre- Octubre 2005, Franqueo Concertado 18/30. Tratamiento farmacológico tópico del glaucoma de ángulo abierto. Año 2005, Volumen 21 nº 5
4. Conferencia de las Doctoras del IMO especialistas en glaucoma. Ponentes: Dra. Arrondo, Dra. Freixes y Dra. Pallás: <https://www.youtube.com/watch?v=yX8NVYFAn-o>
5. Elisabeth A. Cairns, J. Thomas Toguri, Richard F. Porter, Anna- Maria Szczesniak and Melanie E. M. Kelly. Seeing over the horizon – targeting the endocannabinoid system for the treatment of ocular disease. *J basic Clin Physiol Pharmacol* 2016; 27(3): 253-256
6. M.ª Paz Villegas Pérez, Ana M.ª Gómez Ramírez, José Javier García Medina, Antonio Martínez García, Juan José Gómez Fernández, Jaime Miralles de Imperial y Mora-Figueroa. Mecanismos de actuación de los fármacos hipotensores, fisiopatología de la terapéutica médica.
7. Joel E. Schlosburg, Steven G. Kinsey, and Aron H. Lichtman. Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) to Treat Pain and Inflammation
8. Stumpff F, Boxberger M, Krauss A, Rosenthal R, Meissner S, Choritz L, Wiederholt M, Thieme H. Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. 2005 May;80(5):697-708. Epub 2005 Jan 4.
9. Brian D. Hudson, Meggie Beazley, Anna-Maria Szczesniak, Alex Straiker and Melanie E. M. Kelly. Indirect Sympatholytic Actions at β -Adrenoceptors Account for the Ocular Hypotensive Actions of Cannabinoid Receptor Agonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* December 2011, 339 (3) 757-767; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.111.185769>.

10. Green K, Bigger JF, Kim K, and Bowman K (1977) Cannabinoid action on the eye as mediated through the central nervous system and local adrenergic activity. *Exp Eye Res* 24:189-196.
11. Straiker AJ, Maguire G, Mackie K and Lindsey J (1999) Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2442-2448
12. Hudson BD, Hébert TE, and Kelly ME (2010) Physical and functional interaction between CB1 cannabinoid receptor and β 2-adrenoreceptors. *Br J Pharmacol* 160:627-642.
13. Razdan RK (1986) Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol. Rev.* 38:75-149
14. Bell MR, D'Ambra TE, Kumar V, Eissenstat MA y Herrman JL (1991) Antinociceptive (aminoalkyl)-indoles. *J. Med. Chem.* 34:1099-1110
15. Gallego B. I., Ramírez A. I.1, 2, Salazar J. J.1, 2, de Hoz R.1, 2, Rojas B.1, 3, García-Martín E.S.1, Triviño A.1, 3, Ramírez J. M.1, 3. Fisiopatología y progresión de la neurodegeneración glaucomatosa. *Revista Española de Glaucoma e Hipertensión Ocular* 2013;3(2):197-211.
16. Lazzari P, Distinto R, Manca I, Baillie G, Murineddu G, Pira M, Falzoi M, Sani M, Morales P, Ross R, Zanda M, Jagerovic N, Pinna GA. A critical review of both the synthesis approach and the receptor profile of the 8-chloro-1-(2',4'-dichlorophenyl)-N-piperidin-1-yl-1,4,5,6-tetrahydrobenzo [6,7] cyclohepta[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide and analogue derivatives. 2016 Oct4; 121:194-208.
17. D.P. Hurst, D.L. Lynch, J. Barnett-Norris, S.M Hyatt, H.H, Seltzman, M. Zhong, Z.H.Song, J. Nie, D. Lewis, P.H. Reggio, N-(Piperidin-1-y)-5-(a-chlorophenyl)-1-(2,dichlorophenil)-4 methyl-1H-pyrazole-3carboxamide (SR141716A) interaction with LYS 3.28(192) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB1 receptor. *Mol. Pharmacol.*62 (2002) 1274-1278.
18. Montero C, Campillo NE, Goya P, Páez JA. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. 2005 Jan; 40(1):75-83.
19. Hong Shu, Sari Izenwasser, Dean Wade, Edwin D. Stevens, Mark L. Trudell. Synthesis and Cb1 Cannabinoid receptor affinity of 4-alkoxycarbonyl- 1,5- diaryl – 1,2,3- triazoles.