



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

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

Autor: Celia Magdaleno García

Tutor: Carmen Luisa Del Campo Pérez

Convocatoria: Junio

1. Resumen.

El glaucoma engloba un grupo de enfermedades que provocan un daño progresivo del nervio óptico. Como consecuencia de este daño, se produce una disminución del campo visual, que puede llegar incluso a la pérdida completa de la visión, siendo el glaucoma una de las principales causas de ceguera a nivel mundial.

A partir observación de fumadores de *Cannabis sativa L.* y la disminución en la presión intraocular (PIO) que presentaban se ha mostrado un interés creciente por parte de los científicos en el estudio del sistema endocannabinoide para conseguir la aplicación de cannabinoides exógenos, surgiendo nuevas líneas de tratamiento para el glaucoma.

2. Objetivos.

El objetivo principal se basa en la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento contra el glaucoma, con el fin de conseguir nuevos fármacos capaces de ser agonistas CB1, con elevada afinidad y selectividad generando una mejora de su biodisponibilidad. Mostraremos, además, ejemplos de diseño y síntesis adecuada de algunos derivados agonistas CB1.

3. Material y métodos.

La realización de este trabajo se ha llevado a cabo a través de una revisión bibliográfica mediante la utilización de diferentes bases de datos como son Pubmed, ScienceDirect y diversas revistas online, además de la búsqueda en diferentes direcciones web oficiales.

Las palabras clave empleadas han sido: Glaucoma, sistema endocannabinoide, agonistas cannabinoides, receptores cannabinoides.

4. Introducción y antecedentes.

El glaucoma es una enfermedad multifactorial cuyo principal factor de riesgo es un aumento de la presión intraocular (PIO) siendo además el único factor modificable en esta enfermedad, sin embargo, intervienen otros factores como pueden ser miopía mayor, uveítis, retinopatía diabética proliferativa y trombosis en la retina. Además, la edad, el sexo y la herencia genética tienen también importancia en dicha patología.

Según datos de la OMS el glaucoma es la segunda causa más común de ceguera afectando en la actualidad a 4.5 millones de personas en el mundo y con previsión de alcanzar los 11 millones en 2020 [1].

Se conocen varios tipos de glaucoma, el más frecuente es el glaucoma de ángulo abierto que es crónico, aunque también encontramos el glaucoma de ángulo cerrado, glaucoma congénito, glaucoma de presión normal, existiendo también glaucomas secundarios a otras patologías como el glaucoma pseudoexfoliativo, pigmentario o neovascular. Aunque la patogenia del glaucoma no se comprende completamente, el nivel de presión intraocular se relaciona con la destrucción de un tipo determinado de células en la retina llamadas células del ganglio. Así, es el equilibrio entre la secreción de humor acuoso por el cuerpo ciliar y su drenaje a través de dos vías independientes (la red trabecular y la vía de flujo de salida uveoescleral) lo que determina la presión intraocular. En pacientes con glaucoma de ángulo abierto, hay una mayor resistencia al flujo de salida acuoso a través de la red trabecular. Por el contrario, el acceso a las vías de drenaje está obstruido por lo general en pacientes con glaucoma de ángulo cerrado.

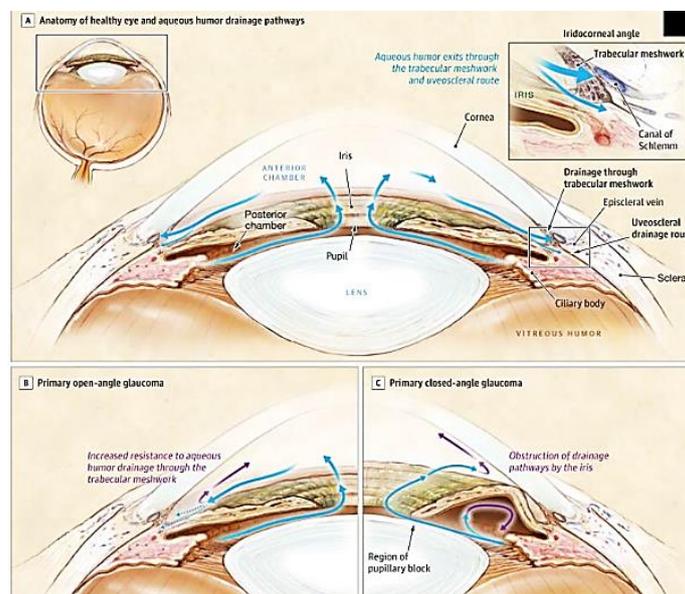


Ilustración 1. La figura A muestra la salida del humor acuoso por parte del ojo en ausencia de patología glaucomatosa. La figura B muestra la salida del humor acuoso en un ojo con glaucoma de ángulo abierto. La figura C muestra la salida del humor acuoso en un ojo con glaucoma de ángulo cerrado [2].

La elevada presión intraocular (por encima de 22 mmHg) presente en el glaucoma causa estrés mecánico y tensión en las estructuras posteriores del ojo, notablemente en la lámina cribosa y los tejidos adyacentes como se observa en la ilustración 2. En ausencia de glaucoma, la esclerótica está perforada en la lámina cribosa, donde las fibras del nervio óptico (es decir, los axones de células ganglionares de la retina) salen del ojo. La lámina es el punto más débil en la pared del ojo presurizado, por lo que el estrés y la tensión inducidos por la presión intraocular pueden provocar la compresión, deformación y remodelación de la lámina cribosa con el consecuente daños axonal mecánico y la interrupción del transporte axonal, que

impide el suministro retrógrado de factores tróficos esenciales a las células ganglionares de la retina.

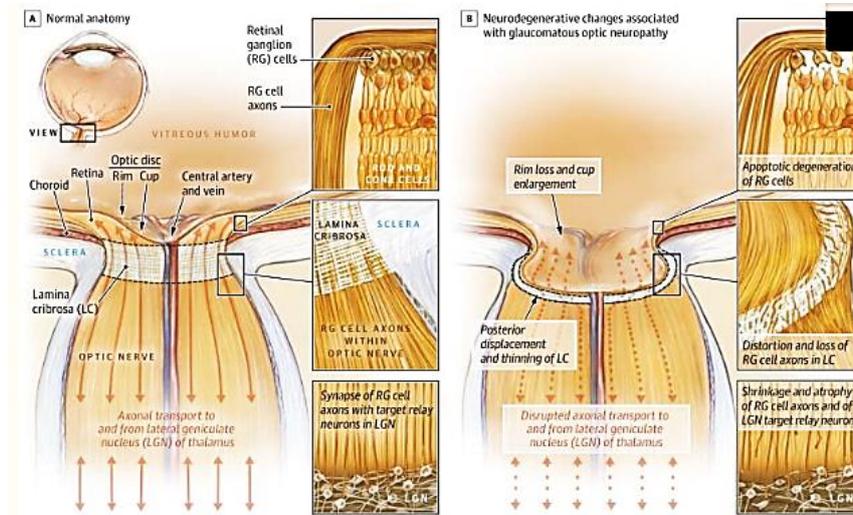


Ilustración 2. La figura A muestra la anatomía en un ojo no glaucomatoso del disco óptico y la convergencia de los axones de las células ganglionares en la retina que salen del ojo a través de la lámina cribrosa. En la figura B la neuropatía óptica glaucomatosa implica daño y remodelación de los tejidos del disco óptico y la lámina cribrosa [2].

Sin embargo, la neuropatía óptica glaucomatosa puede ocurrir en individuos con presiones intraoculares dentro del rango normal (entre 12 y 22 mmHg). En este tipo de glaucoma puede haber una presión del líquido cefalorraquídeo anormalmente baja en el espacio subaracnoideo del nervio óptico que da como resultado un gran gradiente de presión a través de la lámina cribrosa. La microcirculación y la inmunidad alteradas, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo también pueden causar glaucoma.

El glaucoma progresa sin causar síntomas hasta que la enfermedad avanza con cantidades sustanciales de daño neuronal. Cuando se presentan los síntomas, la enfermedad ocasiona la pérdida de la visión con una reducción concomitante en la calidad de vida y la capacidad de realizar actividades diarias, como conducir. La intervención temprana es esencial para retrasar la progresión de la enfermedad. Con la muerte de las células ganglionares de la retina y la pérdida de fibra óptica en el glaucoma, ocurren cambios característicos en la apariencia de la cabeza del nervio óptico y la capa de fibras nerviosas retinianas. Estos cambios son el aspecto más importante del diagnóstico de glaucoma y pueden identificarse en la cabeza del nervio óptico durante el examen oftalmológico. Sin embargo, no existe un estándar de referencia perfecto para establecer el diagnóstico de glaucoma debido a la amplia variabilidad de su apariencia en la población sana, haciendo que el diagnóstico temprano sea un desafío.

La desaceleración de la progresión de la enfermedad y la preservación de la calidad de vida son los principales objetivos del tratamiento del glaucoma. La reducción de la presión intraocular es el único método probado para tratar el glaucoma, con resultados de varios ensayos clínicos multicéntricos que han demostrado el beneficio de disminuir la presión intraocular para prevenir el desarrollo y ralentizar la progresión de la enfermedad.

Las pautas de manejo actuales para el tratamiento del glaucoma recomiendan reducir la presión intraocular hacia un nivel objetivo, a partir del cual el clínico cree que la tasa de progresión de la enfermedad se reducirá. Los niveles de presión intraocular objetivo para un ojo en particular se establecen a partir de los niveles de presión pretratamiento asociados con el daño retiniano, la gravedad del daño, los factores de riesgo para la progresión, la esperanza de vida y el potencial de efectos adversos del tratamiento. En general, el objetivo inicial apunta a una reducción del 20% al 50% de la presión.

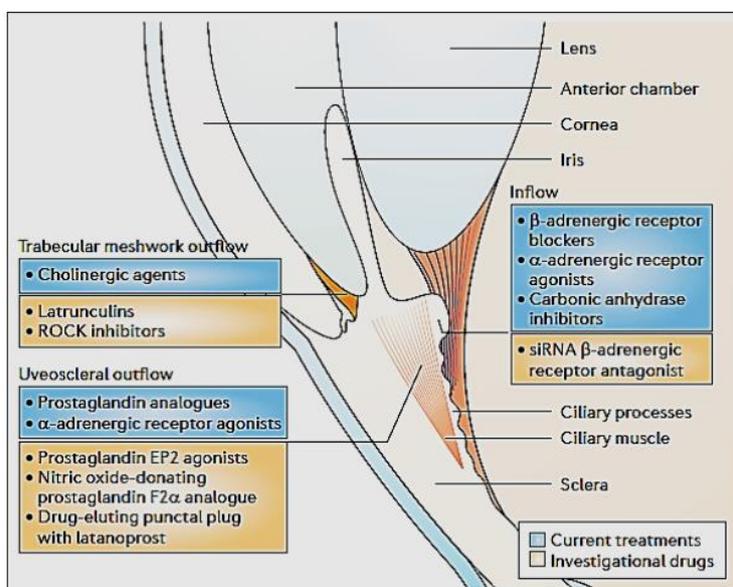


Ilustración 3. Tratamientos farmacológicos para disminuir la presión intraocular en el glaucoma.

La presión intraocular objetivo debe lograrse con la menor cantidad de medicamentos y los efectos adversos mínimos. En general, los análogos de prostaglandinas son la primera línea de terapia médica. Estos medicamentos reducen la presión intraocular al reducir la resistencia del flujo de salida, lo que resulta en un aumento del flujo del humor acuoso a través de la vía uveoescleral. Sin embargo, pueden causar efectos adversos locales tales como hiperemia conjuntival, elongación y oscurecimiento de las pestañas, pérdida de grasa orbitaria, oscurecimiento inducido del iris y pigmentación periocular de la piel. Otros fármacos utilizados como α -agonistas adrenérgicos y β -bloqueantes pueden generar reacciones adversas a nivel sistémico. Se han realizado además esfuerzos considerables para desarrollar

tratamientos de glaucoma neuroprotectores que prevengan el daño del nervio óptico, desafortunadamente, no existe buena evidencia de que estos agentes puedan prevenir la progresión de la enfermedad en pacientes con glaucoma. Finalmente, cuando el tratamiento médico no logra una reducción adecuada de la presión intraocular con efectos adversos aceptables, se indican las cirugías con láser o incisionales.

Como resultado de lo descrito anteriormente, hoy en día se desconoce un tratamiento verdaderamente efectivo para el glaucoma, es por ello que la aplicación de cannabinoides exógenos con el objetivo de disminuir la presión intraocular y la neuroprotección generada por los mismos sea una de las líneas de investigación actuales.

5. Resultados y discusión.

Los estudios relacionados con el uso de los cannabinoides para el tratamiento del glaucoma comenzaron en 1971 cuando Hepler y Frank observaron una reducción de la presión intraocular en personas que fumaban Marihuana (*Cannabis sativa* L.). Desde entonces, se han realizado multitud de experimentos humanos que incluyen la administración oral e intravenosa de Δ 9-tetrahidrocannabinol (Δ 9THC), el principal agente de la especie *Cannabis sativa* L. Como resultado, en los últimos 20 años se han investigado un elevado número de posibles compuestos relacionados con el sistema cannabinoide para el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, no se ha aprobado ningún tratamiento derivado de esta planta o análogo sintético para dicha indicación debido a que existe aún una corta duración del efecto y además presenta elevados efectos sistémicos no deseados.

Sistema endocannabinoide (ECS).

El cuerpo humano posee receptores específicos para los cannabinoides en la superficie de muchos tipos de células. Nuestro organismo produce varios endocannabinoides, derivados de ácidos grasos, que se acoplan a estos receptores (CB) activándolos. Juntos, receptores CB y endocannabinoides, constituyen el sistema endocannabinoide.

El sistema endocannabinoide ocular, por tanto, incluye las enzimas responsables de la producción y degradación de los endocannabinoides, así como varios receptores a los cuales se acoplan, incluyendo CB1 y CB2. Adicionalmente, los endocannabinoides se unen a receptores cannabinoides denominados “no clásicos”, incluyendo Receptor de proteína G 18

(GPR18), GPR55, receptores vallinoides 1 (TRPV1) y receptores de peroxisoma-proliferador-activado (PPARs) α , β/δ .

El receptor CB se localiza principalmente en neuronas del cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico, pero también en órganos y tejidos periféricos; mientras que el CB2 se encuentra en tejidos periféricos, SNC y sistema inmune. El estudio de los receptores del ECS ocular se ha centrado en el CB1 debido a que tiene una amplia distribución en el interior del ojo humano y retina, encontrándolo en el epitelio ciliar, epitelio corneal, malla trabecular, Canal de Schlemm, músculo ciliar y en los vasos sanguíneos del cuerpo ciliar.

Ambos receptores de cannabinoides están acoplados a proteínas G (GPCRs). Se trata de una proteína G_i con siete dominios transmembrana. La activación de este receptor por parte de su ligando específico disminuye la liberación de AMPc e inhibe la óxido nítrico sintetasa, con disminución de óxido nítrico, lo cual contribuye con los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores. Además, producen una modulación en la liberación en los canales de calcio voltaje dependientes y de potasio, generando una reducción de la transmisión.

Los endocannabinoides son derivados de ácidos grasos poliinsaturados, lo que les diferencia de la estructura química de los fitocannabinoides. Los endocannabinoides más estudiados son el 2- acil-glicerol (2-AG) y la anandamina (AEA), ambos son encontrados en todos los tejidos oculares, y en todo el sistema nervioso central. Además, también podemos encontrar el N-palmitoiletanolamida (PEA), un análogo del AEA.

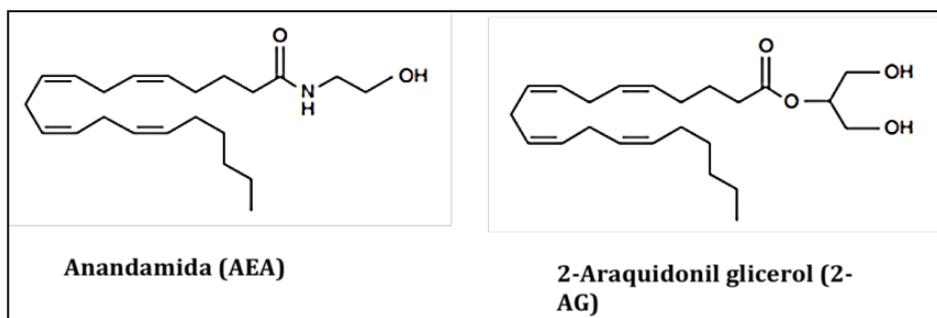


Ilustración 4. Estructuras clásicas de los endocannabinoides Anandamina y 2-AG.

A través del sistema nervioso los endocannabinoides son sintetizados y liberados “a demanda” por las neuronas, por lo cual, debe existir un equilibrio entre su síntesis y su degradación. Estos compuestos se liberan y son rápidamente desactivados mediante recaptación celular y metabolismo endógeno. El metabolismo endógeno de los endocannabinoides consiste en la rápida hidrólisis de los mismos a partir de varios sistemas

enzimáticos como son la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), mocoacilglicerol lipasa (MGL) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), estas enzimas regulan los niveles celulares de los endocannabinoides endógenos en la retina.

De tal forma que la FAAH degrada los endocannabinoides a ácido araquidónico, sobre el cual posteriormente actúa la COX-2 y la LOX-2, dos rutas oxidativas que tienen como resultado la formación de prostaglandinas y leucotrienos respectivamente. Todos ellos mediadores proinflamatorios, por lo cual la inhibición de dichas enzimas conlleva efectos antiinflamatorios, beneficiosos en el glaucoma, así como un incremento de la duración de los efectos de dichas moléculas.

Por otro lado, la COX-2 puede directamente metabolizar AEA y 2-AG para dar lugar prostaglandinas etanolamidas (prostamidas) y prostaglandina gliceril ésteres, respectivamente.

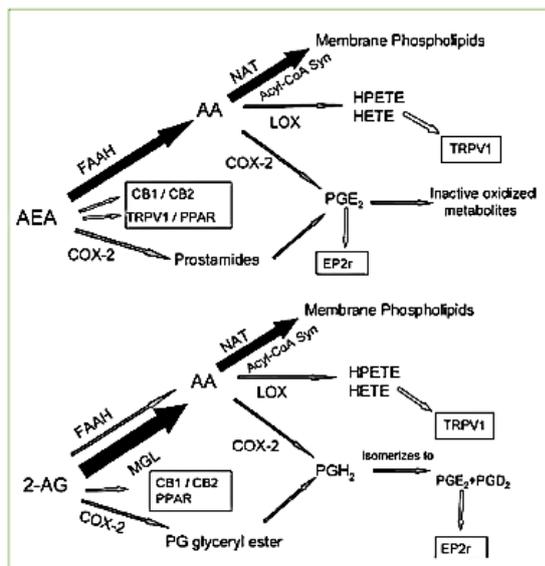


Ilustración 5. Metabolismo endógeno de los cannabinoides.

En ciertos estudios cuyos resultados se muestran esquemáticamente en la ilustración 6, se observó que la aplicación tópica de AEA y anandamida parecía influir sobre la IOP a través de la hidrólisis a ácido araquidónico, para dar lugar finalmente a los prostanoideos. Por otro lado, la aplicación de compuestos metabólicamente más estables α -sustituidos de anandamina y otro tipo de cannabinoides como CP-55,940 (Pate et al.,1998) y WIN-55,212-2 (Song& Slowey, 2000) parecen actuar sobre los receptores CB1. Sin embargo, ciertos estudios realizados en ratones normotensos pusieron de manifiesto que la administración tópica de anandamina y 2-AG causan un incremento inicial, seguido de una disminución de la IOP. Por lo tanto, la administración simultánea de inhibidores de FAAH previene la degradación de

AEA exógeno así como disminuye la aparición de la hipertensión generada por dicha vía, observándose un descenso de la presión intraocular.

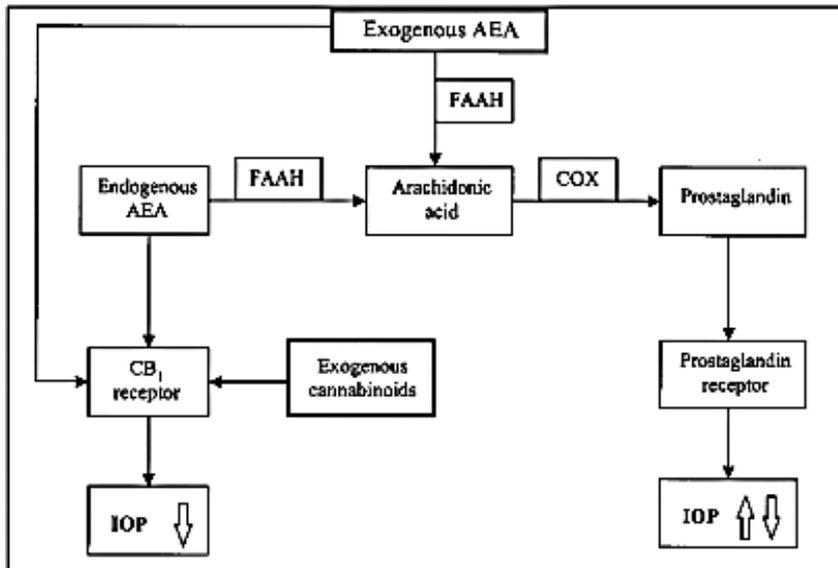


Ilustración 6. Se observa un esquema en el cual se representa la acción de los cannabinoides exógenos y endógenos sobre el receptor CB1 y su metabolismo [3].

Efectos beneficiosos de los cannabinoides en el ojo.

La presencia del sistema endocannabinoide en el ojo y la disminución de su concentración en ciertos tejidos glaucomatosos en el ojo humano encargados de la regulación de la presión intraocular, como el cuerpo ciliar, supone un papel importante en la fisiología del ojo y la patología del glaucoma.

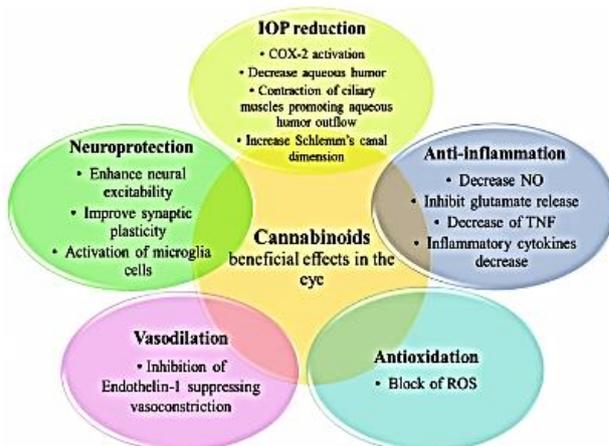


Ilustración 7. Efectos beneficiosos de los cannabinoides en el glaucoma explicados más adelante.

TNF: Factor de necrosis tumoral.
 ROS: Especies reactivas de oxígeno.
 NO: Óxido nítrico.
 COX-2: Ciclooxigenasa-2.

➤ Disminución de la PIO.

Los resultados de experimentos clínicos muestran la administración de marihuana o otros cannabinoides sintéticos en individuos con glaucoma y sus resultados a nivel de PIO.

Subjects	Administration route	Observations	Ref.
15 Male, 18–30 years old	smoking marijuana (12 mg Δ^9 -THC)	significant IOP decrease after 80 min, more frequent users showed lower or no IOP drop	[74]
10 healthy volunteers, 20–30 years old	0.022 or 0.044 mg/kg of Δ^9 -THC intravenously	IOP decrease in 9 patients with low dose and all subjects with high dose	[75]
256 glaucomatous patients	smoking marijuana (1–4% Δ^9 -THC) or 5–20 mg oral Δ^9 -THC	most patients showed IOP reduction, additive effect was seen with conventional glaucoma drugs	[76]
A 23-year-old male (suffers of HPPD), 4 young subjects (control), 23–28 years old	smoking marijuana	HPPD in patient, no change in the controls	[77]
9 patients with end-stage open angle glaucoma, 38–77 years old	smoking marijuana or oral Δ^9 -THC capsules	lower IOP, development of tolerance and significant systemic toxicity that limit the usefulness	[78]
6 patients with ocular hypertension or early primary open angle glaucoma	single sublingual preparation (5 mg Δ^9 -THC or 20 and 40 mg CBD)	significant IOP decrease by Δ^9 -THC, 40 mg CBD produced a transient IOP increase, no significant side effect	[79]
8 patients with glaucoma resistant to conventional treatments, 53–72 years old	topical application of WIN55212-2	IOP decreased directly through CB1	[80]
18 patients suffers of glaucoma	single oral dose of nabilone (0.5 mg)	IOP decreased by 27.9%, 2–6 h after administration, no visual side effect	[81]
32 patients suffers of glaucoma	BW29Y (5 or 10 mg) or BWI46Y (4, 8, or 12 mg)	BW29Y: ineffective, BWI46Y: IOP drop, lightheaded, dizzy, disorientation, blood pressure drop	[82]

HPPD: Hallucinogen persisting perception disorder; IOP: intraocular pressure; Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol; CBD: cannabidiol; WIN55212-2, Nabilone, BW29Y, BWI46Y: synthetic cannabinoids.

Tabla 1. Estudio no randomizado en el que se muestra a nueve pacientes que fueron tratados con marihuana inhalada o cápsulas de Δ^9 THC cada 4 horas. Todos ellos mostraron efectos beneficiosos en el tratamiento de la disminución de PIO, sin embargo siete pacientes perdían efectos beneficiosos debido a la aparición de tolerancia [4].

Uno de los principales mecanismos posibles mediante el cual los cannabinoides generan una disminución de la PIO es mediante la activación de los receptores CB1 en los vasos sanguíneos ciliares, causando vasodilatación y reduciendo la producción del humor acuoso. Además, la activación de los receptores CB1 en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar con 9THC y AEA genera un incremento en la expresión de la COX-2 en las células, lo que da lugar a un aumento de la prostaglandina E2, compuesto que participa en un incremento del flujo del humor acuoso y disminución de la PIO al unirse a sus receptores específicos. Así mismo, la activación de CB1 por parte de AEA, o la disminución de la degradación de la misma genera la contracción del músculo ciliar, mejorando la salida del humor acuoso. Finalmente, la administración sistémica o tópica de cannabigerol o 9THC incrementa la dimensión del Canal de Schlemm mejorando también la salida del humor acuoso.

➤ **Neuroprotección.**

El papel de los cannabinoides en la neuroprotección responde a diferentes mecanismos. La destrucción de las células ganglionares de la retina (CGRs) se genera a partir de una isquemia por el bloqueo del transporte axonal de factores tróficos, esto genera como consecuencia un incremento en la liberación de glutamato, lo que conlleva a un aumento del calcio intracelular y activación de la óxido nítrico sintetasa, que produce una liberación masiva de radicales libres de nitrógeno, dando lugar en última instancia a la apoptosis de las CGRs. Por tanto, la administración de cannabinoides activa los receptores CB1, inhibiendo en SNC la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato y genera inhibición de los canales de

calcio voltaje dependientes a la vez que activa los canales de potasio. Además, una administración sistémica de MK801, antagonista del receptor de glutamato NMDA dependiente previene la muerte celular de las CGRs y reduce la actividad de FAAH, incrementando los efectos de los cannabinoides administrados. Este es el mecanismo principal que relaciona el sistema endocannabinoide con la excitotoxicidad y la muerte las células ganglionares de la retina.

➤ **Vasodilatación.**

La hipoxia retiniana debido a la reducción de los suministros de sangre contribuye al daño retiniano causado por el glaucoma.

El efecto vasodilatador de los cannabinoides endógenos es parcialmente debido a la inhibición de la endotelina-1, un potente vasoconstrictor.

➤ **Antiinflamatorio.**

La liberación de factores tóxicos como el óxido nítrico, glutamato, y factor de necrosis tumoral (TNF) han sido observados mediante la activación de astrocitos, células Muller y microglía en modelos experimentales de glaucoma.

La activación de CB1 y CB2 en el sistema nervioso central y retina modula la activación y migración de las células de microglía e inhibe la producción de óxido nítrico y citoquinas inflamatorias.

➤ **Antioxidante.**

Ciertas evidencias científicas señalan el efecto neuroprotector de los cannabinoides a su actividad antioxidante independiente de la activación de los receptores CB, si no a una vía alternativa a través de la cual se produce un bloqueo de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Diseño y relación estructura-actividad de nuevos ligandos de receptores cannabinoides.

Los cannabinoides pueden ser clasificados en tres principales categorías: endocannabinoides, cannabinoides naturales o clásicos y cannabinoides sintéticos. Los cannabinoides endógenos son producidos en el interior del cuerpo humano y de animales, como 2-AG y anandamida (*Ilustración 4*), capaces de unirse tanto a CB1 como a CB2. Los cannabinoides naturales son producidos en la planta *Cannabis sativa L.* y se caracterizan por presentar una estructura con anillos y átomos de oxígeno, se encuentran en esta categoría los fitocannabinoides Δ^9 -THC, cannabidiol, y cannabinol. Los cannabinoides sintéticos surgen a partir del descubrimiento de los receptores CB y sus ligandos, con el fin de encontrar nuevas terapias frente al glaucoma. En esta categoría encontramos HU-210, CP55,940 y nabilona. Finalmente, existe un grupo de

cannabinoides: los aminoalquilindoles. A este grupo pertenecen ciertos compuestos como WIN-55,212-2 capaz de unirse tanto a CB1 como a CB2 en administración tópica pudiendo reducir la presión intraocular.

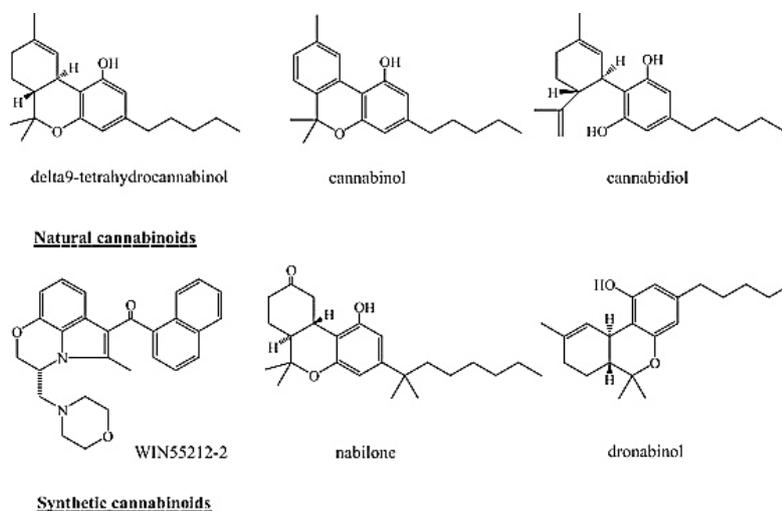


Ilustración 8. Estructuras de los cannabinoides naturales en la parte superior y cannabinoides sintéticos en la parte inferior, incluyendo WIN-55,212-2, un aminoalquilindol [4].

Los primeros estudios de relación estructura-actividad (SAR) dilucidaron que tanto los cannabinoides clásicos como no clásicos presentan cuatro grupos farmacóforos dentro de un cannabinoide prototipo: hidroxilo fenólico, zona lipofílica y dos alcoholes alifáticos situado uno en la zona norte de la molécula y otro al sur.

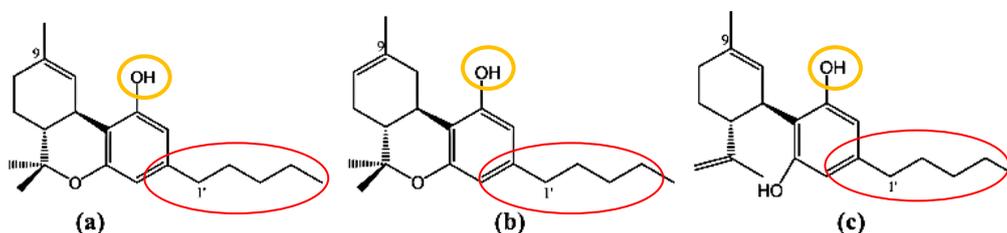


Ilustración 9. Estructura química de $\Delta 9$ -THC, $\Delta 8$ -THC y CBD (de izquierda a derecha respectivamente). La cadena lateral alquílica juega un papel crucial en la actividad cannbinomimética con el receptor en relación a su selectividad y potencia farmacológica. Esta cadena se introduce en un sitio hidrofóbico del receptor orientado perpendicular al anillo aromático. La distancia ideal de dicha cadena son 5 carbonos, al realizar cambios en la longitud de la misma se pueden obtener antagonistas, agonistas parciales o agonistas con mayor unión al receptor [5].

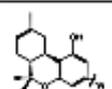
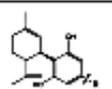
Diversos estudios en 3D-QSAR utilizan mapas en CoMFA y CoMSIA. A partir ellos se han obtenido numerosos resultados que pueden explicar los diferentes requerimientos para la unión de los cannabinoides a CB1 y CB2. Para poder realizar dichos mapas se han estudiado 30 compuestos diferentes (cuyos resultados se muestran en la Tabla 2), cuyas estructuras son derivadas de $\Delta 8$ -THC (compuesto químicamente más estable que $\Delta 9$ -THC) y CBD

El compuesto 12 que se muestra a continuación fue utilizado como modelo para la realización de los mapas en 3D-QSAR debido a que presenta una adecuada conformación estudiada a partir de RMN y estudios de modelado molecular.

Es el compuesto que presenta la mayor afinidad al receptor CB1 ($K_i = 0.32 \text{ nM}$) y la segunda mayor afinidad para el CB2 ($K_i = 0.52 \text{ nM}$). Este incremento de afinidad se debe a su estructura, ya que presenta un incremento de hidrofobicidad en la cadena que podría mejorar la interacción con el sitio hidrofóbico del receptor.

Tabla 2. Estructura molecular y valores de afinidad de unión (K_i) a receptores CB por parte de diferentes compuestos estudiados derivados de Δ^8 -THC y CBD para construir posteriormente modelos de CoMFA y CoMSIA [5].

Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la misma familia de receptores por lo cual presentan un 44% de homología, que se eleva hasta en un 68% en los dominios transmembrana, principal área implicada en el reconocimiento del ligando. Como resultado de esta homología entre ambos receptores se observa una correlación entre las afinidades de unión de un mismo ligando para ambos en los estudios 3D-QSAR relatados a continuación.

						
Compound No.	R	K_i for CB1 (nM)	K_i for CB2 (nM)	Compound No.	K_i for CB1 (nM)	K_i for CB2 (nM)
1		95.49	71.81	2	638.1	374.4
3		119.6	51.70			
4		92.33	107.88			
5		11.73	9.39	6	753.5	221.6
7		27.96	25.20	8	259.0	169.0
8		1.26	3.86	10	319.0	116.7
11		168.0	103.0			
12		0.52	0.52	13	136.0	56.40
14		0.52	0.22			
15		96.99	229.0			
16		1.80	3.68			
17		32.38	19.70			
18		0.45	1.92			
19		47.60	19.30	20	1265.0	239.0
21		22.80	-			
22		0.85	0.49			
23		0.44	0.86	24	51.68	99.23
25		1.27	0.29	26	666.4	32.87
27		0.71	1.03	28	189.0	63.30
29		21.39	83.70			
30		2.17	3.38			

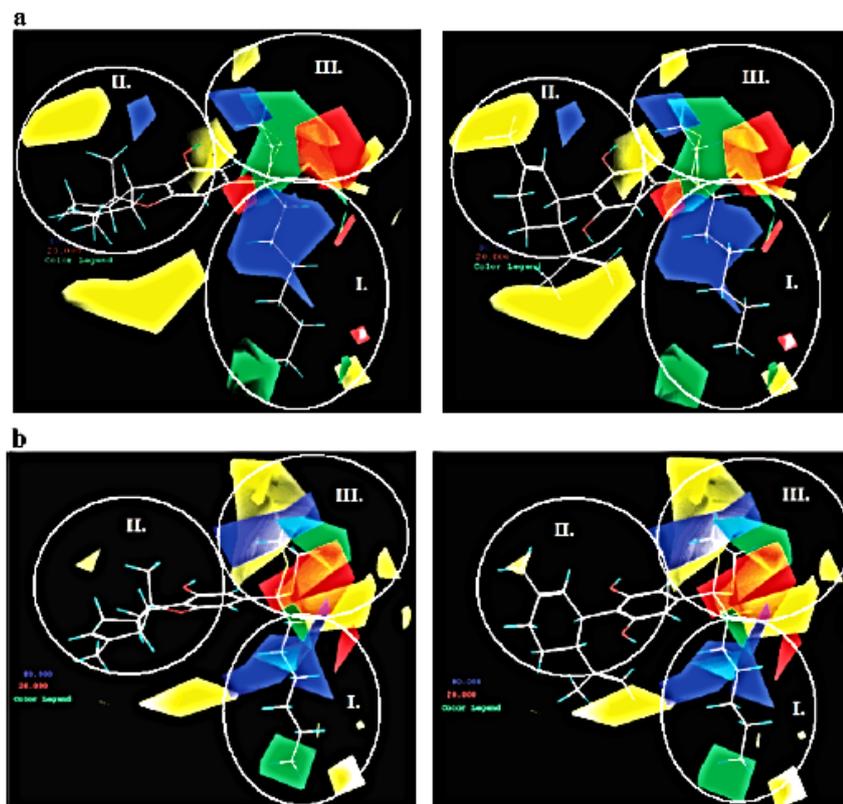


Figura 1. Se observa un mapa coMFA con el compuesto modelo 12 (izquierda) y su respectivo análogo CBD (derecha) tanto en unión al receptor CB1 en la parte superior como al CB2 en la parte inferior. Las zonas estéricamente favorecidas se observan en verde (presentan una contribución del 80%), las zonas estéricamente desfavorecidas se observan en amarillo (presentan una contribución del 20%). Las zonas electrostáticamente favorecidas se observan en azul (presentan una contribución del 80%), las zonas electrostáticamente desfavorecidas se observan en rojo (presentan una contribución del 20%).

Las regiones rodeadas I, II y III representan la cadena alquílica, la zona triclídica y la cara alfa de C1' del ligando respectivamente [5].

De los mapas en 3D de CoMFA y CoMSIA se han investigado tres regiones diferentes de los ligandos cannabinoides:

- I. **Cadena alquílica.** Como se puede observar en la figura 1, las zonas verdes representan zonas favorecidas estéricamente, es por tanto que se puede concluir que grupos voluminosos incrementan la afinidad de unión a CB1 y CB2 en dichos modelos. Así, por ejemplo, la presencia de grupos isopropilo o ciclopentilo mejoran la unión al receptor. Sin embargo, como se observa en las zonas amarillas (estéricamente desfavorecidas) la orientación de dichos grupos es importante. En cuanto a la selectividad, ciertos compuestos como 12, 14, 16, 18 y 22 presentan una elevada afinidad, pero una baja selectividad para CB1 y CB2 debido a su ajuste en el sitio hidrofóbico en ambos receptores. La interacción óptima en el CB1 se observa cuando el grupo lipofílico se encuentra en la posición C1', sin embargo en el CB2 se incrementa la afinidad con un sustituyente pequeño tipo anillo de dioxolano.
- II. **Sistema de anillos ABC.** Las interacciones existentes en la zona situada entre los segmentos I y II afecta de diferente manera a la interacción entre derivados de 8THC y CBD a los receptores CB1 y CB2. Esto se observa en los mapas 3D ya que el receptor

CB1 es más sensible que el CB2 en cuanto a la orientación estructural que presenta la molécula, esto es debido a que en el CB1 presenta una zona más alargada en amarillo. Por lo tanto, como los derivados de $\Delta 8$ -THC y CBD presentan diferencias en la zona anular van a tener distintas interacciones, así, una adecuada orientación en el anillo es importante a la hora de la unión al receptor.

III. **Cara alfa del C1' del ligando.** La zona estéricamente desfavorable se encuentra en las proximidades del anillo A. Por lo tanto, la existencia de grupos voluminosos en este segmento molecular genera una disminución de la afinidad de unión tal y como se observa en la siguiente figura con los compuestos 15 y 16.

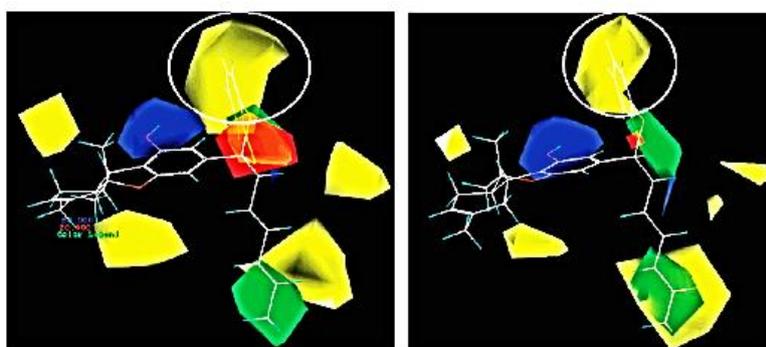


Figura 2. Se observan mapas de CoMSIA estérico-electrostático del compuesto 15 para receptores CB1 y CB2 a izquierda y derecha, respectivamente [5].

Los mapas de contorno muestran que la mayor afinidad de unión y la potencia farmacológica se asocia con grupos voluminosos (de color verde) y grupos cargados negativamente (color rojo) en la cara alfa de C1'. Por tanto, en los resultados se observa que en la cara alfa de C1' y en el medio de la cadena lateral de alquilo, los ligandos cannabinoides pueden interactuar con zonas electropositivas y electronegativas correspondiente de los receptores CB1 y CB2 respectivamente. Los resultados de los modelos de CoMFA y CoMSIA de los receptores CB1 y Cb2 obtenidos han sido similares y los modelos sirven como base para el diseño de nuevos prototipos de cannabinoides que pueden llegar a mejorar la actividad en los receptores.

Diseño, síntesis y relación estructura actividad de compuestos análogos a indol-3-carboxamida.

El estudio para el diseño y síntesis de nuevos ligandos de receptores cannabinoides en el tratamiento contra el glaucoma se basa en la necesidad de crear moléculas nuevas capaces de disminuir la presión intraocular. La administración intravenosa de varios cannabinoides, incluyendo $\Delta 9$ -THC, $\Delta 8$ -THC, nabilona y cannabinoles producen dicho efecto sin embargo, generan elevados efectos secundarios como psicoactividad, hipereremia conjuntival e hipotensión postural. Es por ello que los estudios más recientes buscan una administración

oftálmica, que ayude a disminuir los efectos no deseados e incrementar la dosis en el lugar de acción.

Uno de los problemas en el diseño de estos fármacos de administración oftálmica es que los cannabinoides presentan un elevado carácter hidrofóbico y por lo tanto con baja solubilidad. Por ello, se estudian posibles vehículos tales como el aceite de sésamo o aceites minerales, sin embargo, pueden presentar irritación en el lugar de acción. El incremento de la solubilidad acuosa con la formación de emulsiones mediante el uso de Tween 80 o la formación de ciclodextrinas para la aplicación tópica a nivel ocular ha generado éxito en varias líneas de investigación.

Otra de las estrategias para incrementar la hidrosolubilidad de los cannabinoides es el diseño de análogos a indol-3-carboxamida, compuestos ya descritos en la literatura como agonistas del receptor CB1 más solubles en agua que podrían ser adecuados para la administración intravenosa como analgésicos perioperatorios.

Se presentan a continuación una serie de compuestos derivados de indol restringido, en el cual el grupo ciclohexilo se encuentra restringido por la formación de un anillo de 6 miembros entre la posición 1 y 7 del indol. Así, este bloqueo impide que se genere una mezcla racémica en solución, disminuyendo el número de conformaciones.

La síntesis estereoselectiva expuesta más adelante reveló las necesidades estructurales para una actividad agonista de CB1 más potente. También se muestran estudios de relación estructura-actividad para encontrar el sustituyente de la amida que presente una mayor afinidad de unión al receptor y mejora de la solubilidad.

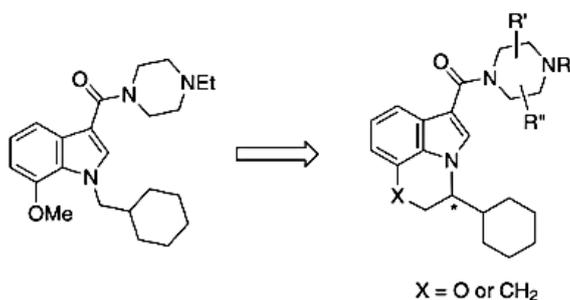


Figure 1. The structure of the original lead compound and newly designed scaffold.

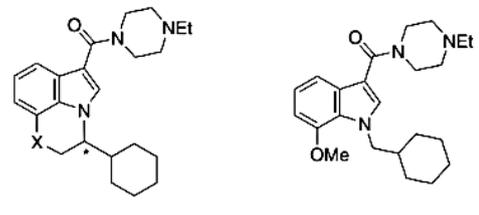
Ilustración 10. Muestra la estructura original de indol-3-carboxamida y el nuevo diseño basado en limitar la conformación por medio del anillo en posición 1 y 7 del indol, además de la introducción de diferentes sustituyentes [6].

Los compuestos preparados fueron probados como agonistas de los receptores CB1 usando células CHO transfectadas con receptores CB1 humanos y gen de luciferasa.

Los resultados obtenidos a partir de dicho estudio se muestran en la Tabla 3. Establecieron que los compuestos restringidos con el anillo (compuestos derivados del de la derecha en la

Ilustración 10) eran más potentes que aquellos que tenían libertad conformacional (compuesto de la izquierda en la *Ilustración 10*) con una afinidad de unión $pEC_{50}=7.5$, 7.6 y $pEC_{50}=6.8$, respectivamente.

CBI agonist activities for conformationally constrained compounds 1–4 and non-constrained compound 5



Compound	X	Absolute configuration	pEC_{50}^a
1	O	Racemic mixture	7.5
2	CH ₂	Racemic mixture	7.6
3	O	R	7.5
4	O	S	<5
5	—	—	6.8

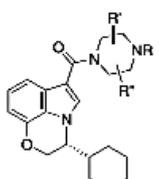
^a Values are means of three experiments.

Tabla 3. Resultados de estudios relación estructura-actividad para los diferentes compuestos que se muestran. Cabe resaltar que el isómero R (3) presenta una actividad similar al compuesto racémico 1, sin embargo el isómero S (4) presenta una elevada disminución de la actividad.

Estos resultados indican que una correcta orientación del grupo ciclohexilo es esencial en la unión al receptor CBI y por tanto interviene en la potencia del agonista cannabinoide [6].

Por otro lado, estudios de SAR han dilucidado una serie de afinidades de unión al receptor CB1 para (R) – tricíclico indol derivados. Los datos son recogidos en la siguiente tabla.

Table 2
CBI agonist activities for (R)-tricyclic indole derivatives



Compound	Piperazine moieties	pEC_{50}^a	Compound	Piperazine moieties	pEC_{50}^a
3		7.5	11		7.8
6		7.0	12		6.3
7		5.4	13		7.2
8		8.4	14		6.1
9		8.2	15		8.2
10		6.9	16		8.3

^a Values are means of three experiments.

Tabla 4. Resultados de las afinidades unión al receptor CB1 para (R) – tricíclico indol derivados [6].

A partir de los resultados observados podemos afirmar que el sustituyente en la posición 4 del anillo de piperacilina presenta una importante influencia en la actividad de los agonistas. Así,

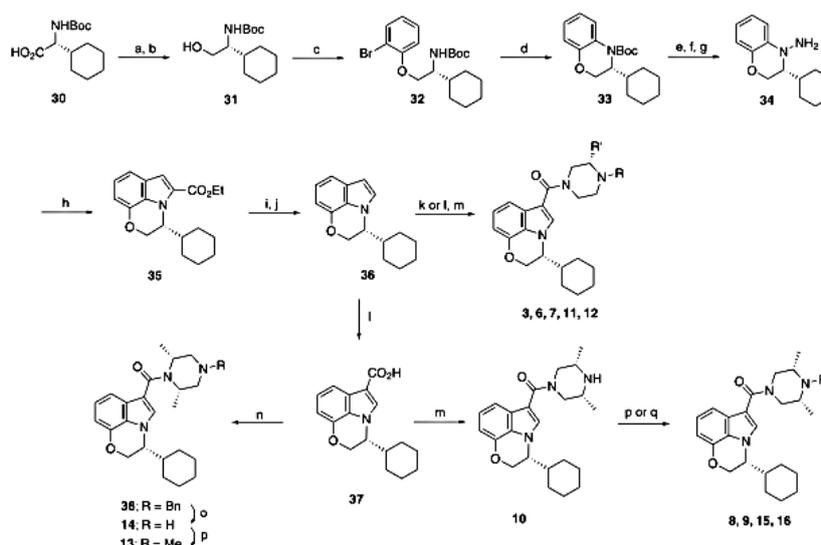
el compuesto 8 (cis-4-etil-3,5-dimetil-tricíclico indol) es el que presenta una mayor afinidad de unión al CB1 ($pEC_{50} = 8.4$) al reemplazar el R=etilo, y presentar dos metilos en cis.

Además, cabe resaltar los compuestos 15 y 16, ya que presentan una elevada afinidad de unión ($pEC_{50} = 8.2$ y $pEC_{50} = 8.3$, respectivamente) y, por otro lado, se ha introducido un radical con un grupo hidroxilo o metoxi, que podría incrementar la solubilidad en agua, mejorando ciertas propiedades de la molécula. Los resultados in vitro de los agonistas de receptores CB en su unión con el receptor, recogidos en la Tabla 5, reflejaron resultados similares a los obtenidos anteriormente, por lo tanto, se puede afirmar que los compuestos restringidos 3-(piperazin-1-il-carbonil) indol derivados sintetizados estereoselectivamente presentan una mayor potencia en su unión a los receptores frente a aquellos con libertad conformacional.

Profile of CB1 agonists in in vitro hCB1 and hCB2 binding assays		
Compound	CB1 pK_i	CB2 pK_i
3	7.9	8.4
11	8.7	9.4

Tabla 5. Resultados in vitro de agonistas de receptores CB en su unión al receptor [6].

Como ejemplo de estos análogos proponemos una síntesis para 3-(piperazin-1-il-carbonil) indol derivados sintetizados estereoselectivamente, pudiéndose sintetizar gracias a la misma los compuestos 8, 9, 15 y 16, mencionados anteriormente como los más potentes en relación a la afinidad que presenta con el receptor.



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) MeI, NaHCO₃, DMF, 90%; (b) NaBH₄, CaCl₂, THF, MeOH, 85%; (c) 2-bromophenol, DIAD, PPh₃, toluene, 0 °C to rt, 46%; (d) Pd(PPh₃)₄, t-BuONa, toluene, microwave 120 °C, 67%; (e) HCl, EtOH, 70 °C, quant.; (f) NaNO₂, DMF, water, 0 °C, 85%; (g) LAH, THF, 0 °C, 70%; (h) ethyl pyruvate, H₂SO₄, EtOH, reflux, 85%; (i) NaOH, EtOH, 70 °C, 92%; (j) Cu, quinoline, 210 °C, 86%; (k) i-oxalyl chloride, 1,1,2,2-tetrachloroethane, 120 °C; (l) i-amine, Et₃N, two steps 44-52%; (l) i-(CF₃CO)₂O, DMF, 0 °C to rt, 75%; (m) NaOH, 1,4-dioxane, water, reflux, quant.; (m) amine, EDCl, HOBT, DMF, 48%; (n) i-oxalyl chloride, DCM; (n) i-1-benzyl-cis-3,5-dimethylpiperazine, DIEA, DCM, two steps 39%; (o) H₂, Pd-C, EtOH, 60%; (p) aldehyde, NaBH(OAc)₂, EtOH; (q) alkylbromide, CH₂Cl₂, microwave, 150 °C.

Los análogos homocirales del compuesto 1 (observado en la Tabla 3) podría obtenerse partir de (S) o (R) N-Boc-ciclohexil-glicina (compuesto 30) como se ilustra en el Esquema 1.

Reacción de Mitsunobu de 2-bromofenol con el alcohol **31**, que se obtuvo de la reducción de **30**, generó el ariléter **32**. Posteriormente, una aminación intramolecular catalizada por paladio proporcionó 3,4-dihidro- derivado de 2H-1,4-benzoxazina **33**. Después se elimina el Boc del compuesto **33** para desproteger la amina para formar el núcleo tricíclico. La posterior introducción del resto piperazinilcarbonilo se realizó por amidación directa usando cloruro de oxalilo o por reacción a través del intermedio **37** para proporcionar una variedad de sustituyentes derivados de piperazina.

6. Conclusión.

La revisión bibliográfica realizada a partir de las diferentes fuentes que se han consultado permite concluir que los cannabinoides son un potencial tratamiento alternativo en la enfermedad del glaucoma, ya que son capaces de disminuir la presión intraocular, único factor modificable de dicha enfermedad a través de diferentes mecanismos.

Además, los cannabinoides presentan numerosos efectos beneficiosos para el ojo tales como vasodilatación, efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Por otro lado, generan neuroprotección, efecto ampliamente buscado por los científicos en el tratamiento del glaucoma ya que con las alternativas terapéuticas hasta ahora utilizadas no era posible.

El estudio de la relación estructura-actividad de los cannabinoides ha permitido conocer con mayor profundidad los receptores del sistema endocannabinoide, además de proporcionar la síntesis de nuevos fármacos a partir del diseño racional de los mismos.

Respecto a los modelos de 3D-QSAR obtenidos a partir de derivados de Δ^8 -THC y CBD, se han obtenido los siguientes resultados:

- La cadena alquílica puede presentar sustituyentes en la posición C1', para los cuales grupos voluminosos incrementan la afinidad de unión al receptor CB1, sin embargo disminuirían la misma para el CB2.
- La orientación de los diferentes anillos que poseen tanto derivados de Δ^8 -THC y CBD es importante en la unión al receptor.
- Los receptores presentan grupos cargados electropositivamente y electronegativamente capaces de interactuar con los ligandos cannabinoides en la cara alfa de C1' y en medio de la cadena lateral de alquilo.

Por otro lado, en el diseño de análogos a indol-3 carboxamida se puede afirmar, que los compuestos restringidos 3-(piperazin-1-ilcarbonil)indol derivados sintetizados estereoselectivamente, presentan una mayor potencia en su unión a los receptores frente a aquellos con libertad conformacional. Además, se encuentran una serie de moléculas que presentan diferentes sustituyentes capaces de incrementar la afinidad de unión al receptor y la adición de grupos hidrofílicos lo que disminuye la liposolubilidad que los cannabinoides presentan en sí mismos.

7. Bibliografía.

- [1] [En línea]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/es/>. [Último acceso: 18 04 2018].
- [2] Weinreb, R. N., T. Aung y a. F. A. Medeiros, «“The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review.”», *JAMA May*. 311.18, pp. 1901-1911, 2014..
- [3] J. T, P. DW y L. K, «Cannabinoids in the treatment of glaucoma.,» *Pharmacol Ther.* 95, pp. 203-220, 2002.
- [4] P. Y, M. A, N. M y V. M, «The arguments for and against cannabinoids application in glaucomatous retinopathy,» *Biomed Pharmacother.*, pp. 620-627, 2017.
- [5] D. S, K. A, K. T, A. T, N. SP, N. VR y Papahatjis, «The Application of 3D-QSAR Studies for Novel Cannabinoid Ligands Substituted at the C1' position of the alkyl side chain on the structural requirements for binding to cannabinoid receptors CB1 and CB2.,» *J. Med. Chem.*, pp. 50, 2875-2885, 2007.
- [6] K. T, Y. M, F. S, E. D, W. G, H. AK y C. JE, «Design, synthesis, and structure–activity relationship study of conformationally constrained analogs of indole-3-carboxamides as novel CB1cannabinoid receptor agonists.,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20., pp. 4918-4921, 2010.
- [7] Dra.Arrondo, D. Freixes y Dra.Pallás., «Conferencia de las Doctoras del IMO especialistas en glaucoma,» [En línea]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=yX8NVYFAn-o>.
- [8] C. EA, T. JT, P. RF, S. AM y K. ME., «Seeing over the horizon - targeting the endocannabinoid system for the treatment of ocular disease,» *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*, pp. 253-265, 2016.
- [9] F. Grotenhermen, «Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide,» *Cannabinoids*, pp. 10-14, 2006.
- [10] T. I, P. RG y A.-B. A., «Cannabinoids and glaucoma,» *Br J Ophthalmol*, pp. 708-713, 2004 May.