

TRABAJO DE FIN DE GRADO



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

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

Autora: Laura Risueño Ayerbe

Tutora: Carmen Luisa del Campo Pérez

Convocatoria: Junio 2019

I. RESUMEN

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera a nivel mundial, para la cual todavía no existe un tratamiento efectivo que permita su reversión. Este hecho ha favorecido que varias líneas de investigación actuales se centren en el uso de una serie de compuestos secretados por la planta *Cannabis sativa*, como una opción válida para su terapéutica.

Los cannabinoides son moléculas obtenidas de forma natural a través de esta planta, pero también producidas internamente por nuestro organismo, que son capaces de reducir la presión intraocular elevada (PIO), principal factor de riesgo causante de la patología, mediante la unión a sus receptores específicos. A nivel de la retina, predominan los receptores cannabinoide tipo 1, y es por eso que el desarrollo de análogos sintéticos en el laboratorio que actúen a este nivel se presenta como una necesidad. Este proceso se ha llevado a cabo con estudios de relación estructura-actividad tridimensional cuantitativa (3D-QSAR) y técnicas de modelaje molecular (CoMFA y CoMSIA) de diversos compuestos análogos de cannabinoides naturales, con el fin de dilucidar la estructura de posibles moléculas agonistas que tengan mayor selectividad y potencia de acción sobre el rCB1.

II. ABSTRACT

Glaucoma is one of the leading causes of blindness worldwide, which still does not have an effective treatment that allows it to be reversed. This fact has favored that several current lines of research focus on the use of a series of compounds produced by the plant *Cannabis sativa* as a valid option for its therapeutic.

Cannabinoids are molecules obtained naturally from the Cannabis plant but also produced internally by our body, being able to reduce elevated intraocular pressure (PIO), the main risk factor causing the pathology, by binding to their specific receptors. At retina level, type 1 cannabinoid receptors have a greater expression and this is why the development of synthetic analogues in the laboratory acting at this level has been arose as a real need. This process has been carried out with studies of structure-quantitative activity ratio (3D-QSAR) and molecular modelling techniques (CoMFA and CoMSIA) of various analogous compounds of natural cannabinoids, in order to elucidate the structure of potential agonist molecules with higher selectivity and power over rCB1.

III. INTRODUCCIÓN

LA ENFERMEDAD DEL GLAUCOMA

Esta enfermedad engloba un grupo de neuropatías ópticas que tienen en común una lenta y progresiva degeneración de las células ganglionares de la retina, así como de sus axones, lo que se traduce en un daño irreversible del nervio óptico y disminución del campo visual.

Su prevalencia se calcula de manera muy similar en todo el mundo, y estudios recientes muestran estar afectadas más de 60 millones de personas a nivel global, pudiendo llegar hasta 79,6 millones en 2020. [1]

Aunque las personas de avanzada edad poseen un mayor riesgo de sufrir la enfermedad, el glaucoma puede desarrollarse en adultos, jóvenes e incluso en edades

infantiles.

De esta forma, no solo nos enfrentamos a la principal causa de ceguera irreversible a nivel mundial, sino que además ésta conlleva un notable impacto socioeconómico y una reducción de la calidad de vida del paciente.

En los últimos años se han producido notables cambios en la comprensión, estudio, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

El nervio óptico es una estructura que parte de la retina y está formado por un millón de fibras nerviosas retinianas que recogen información de la luz e imágenes que vemos en la retina y la transmiten al cerebro, que la interpreta y nos proporciona la imagen visual.

En el glaucoma, estas fibras desaparecen y se forma un hueco en el interior del nervio óptico, que va aumentando y desarrollando un tono mucho más blanquecino debido a la ausencia de fibras, derivando en un campo visual muy afectado. [2]

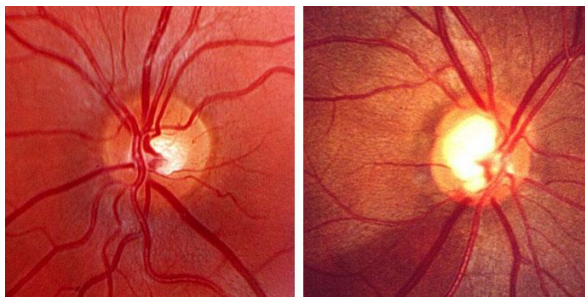


Imagen 1. A la izquierda, un ojo normal. A la derecha, un ojo glaucomatoso con gran excavación central y tono blanquecino, el cual tendrá un campo visual ya afectado. [2]

FACTORES DE RIESGO EN EL GLAUCOMA:

La presión intraocular (PIO) elevada es el principal y más conocido factor de riesgo para el desarrollo y progresión del glaucoma. Se establece una relación clara entre la presión intraocular y la prevalencia de glaucoma según importantes estudios como el de *Baltimore Eye Survey*, considerándose una PIO de 21 mm de Hg como punto de corte. [2.2] Sin embargo, no es condición necesaria para que exista la enfermedad.

Recientemente se han sumado otros factores de relevancia, como son:

El **historial familiar** de glaucoma, donde el **papel de carga genética** es fundamental en el desarrollo de la enfermedad. El gen GLC1A, ubicado en el cromosoma 1, codifica la proteína miocilina y su mutación está aproximadamente en el 3% de los casos de glaucoma de ángulo abierto (GPAA). Otros dos *loci* asociados al glaucoma se identificaron en los cromosomas 2 y 10 respectivamente (GLC1B y GLC1B); cuyas mutaciones se asocian a un glaucoma de tensión más baja. Otro gen implicado en esta enfermedad se ha encontrado en el cromosoma 23 (GLC1D). [2.3]

La edad supone otro factor de riesgo, al ser una enfermedad cuya prevalencia aumenta exponencialmente con los años, siendo los pacientes de edad más avanzada quienes poseen mayor probabilidad de sufrir esta patología. Por otro lado, **las personas de raza negra** también padecen un curso más severo de la enfermedad debido a que poseen una lamina cribosa menos resistente por motivos genéticos. Además, se trata de glaucomas más agresivos y difíciles de tratar, pues no responden a cirugía. [2]

La presión de **perfusión ocular** juega también un papel significativo en la susceptibilidad del nervio óptico. La irrigación sanguínea de la papila óptica llega desde

el corazón y es sabido que presiones diastólicas inferiores a 55 mmHg multiplican por 3 el riesgo relativo de padecer glaucoma. [2.4]

El problema de esta patología es que suele desarrollarse con el paso del tiempo y no produce síntomas detectables, de modo que en muchos casos se diagnostica cuando ya se ha producido la pérdida del campo visual.

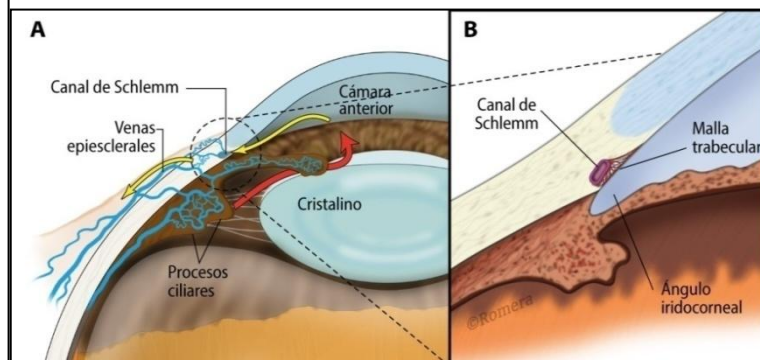
Actualmente la finalidad primordial del tratamiento del glaucoma es prevenir la pérdida adicional del campo visual, mantener la estructura y función del nervio óptico y preservar la calidad de vida del paciente. [2.2]

IV. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD:

El ojo produce constantemente humor acuoso, el cual se encarga de proveer nutrientes al iris, al cristalino y a la córnea. A medida que fluye nuevo humor acuoso en el ojo, debe drenarse la misma cantidad con el fin de mantener una presión intraocular estable.

El fluido se drena a través de un área llamada 'ángulo de drenaje' (situado entre el iris y la córnea, en la cámara anterior del ojo), siendo éste el principal sistema de eliminación llevando a cabo el drenaje total en un 83-96%, dentro de unas condiciones normales. En éste participan: la malla trabecular, el canal Schlemm, los canales intraesclerales y las venas conjuntivales. [2.6]

Imagen 2. Circulación del humor acuoso en el interior del ojo. **A:** el humor acuoso se produce en el cuerpo ciliar, luego pasa a través de la pupila hasta la cámara anterior, y se elimina a través de la malla trabecular y el canal de Schlemm hacia la circulación general. **B:** ampliación del ángulo iridocorneal.



Las vías secundarias o alternativas de drenaje del humor acuoso, también conocidas como sistema de drenaje uveoscleral, se encargan de la eliminación de éste en un 5-15%.

Vamos a distinguir distintos tipos de glaucoma; el glaucoma crónico es el más frecuente, se conoce como **glaucoma de ángulo abierto (GPA)** y se diagnostica en un 90% de los casos. Está causado por un bloqueo parcial de canal de drenaje que provoca un flujo de salida lento, aumentando de forma gradual la presión intraocular. El **glaucoma de ángulo cerrado (GAE)** presenta una súbita obstrucción física de la malla trabecular por el iris, suficiente para una reducción del drenaje normal del humor acuoso que aumenta la PIO rápidamente. En este caso, el ángulo formado entre iris y córnea es cerrado y estrecho.

Es un tipo de glaucoma que se desarrolla rápido y requiere atención médica inmediata, pues puede perderse la visión total al momento. Se corresponde con menos del 5% de los casos diagnosticados.

Encontramos por otro lado el glaucoma **de tensión normal (GTN)**, también denominado glaucoma de presión normal o de tensión baja. El nervio óptico se daña a pesar de que la presión ocular no es muy elevada. Son casos que se dan de forma excepcional.

El **glaucoma de desarrollo** (o congénito, en bebés cuando existe un desarrollo incorrecto o incompleto de los canales de drenaje del ojo durante el período prenatal) constituye el 1% de los casos de diagnóstico.

Por último, existen **glaucomas secundarios a otras patologías como son:** el pseudoexfoliativo (se forma una caspa en la estructura ocular que obstruye la salida de líquido), el pigmentario (donde el propio pigmento del iris obstruye la salida) y el neovascular (en diabetes mellitus y trombosis, se crean vasos anómalos rodeando el iris que impiden la salida del líquido y aumentan la tensión interna). [2]

DESARROLLO Y PROGRESIÓN ENFERMEDAD:

La patogénesis del glaucoma es controvertida, pero existen dos teorías en la actualidad que parecen fundamentales para explicar el daño del nervio óptico característico de la enfermedad; la de **índole isquémico** sugiere que la alteración del axón es consecuencia de una perfusión ocular inestable y por lo tanto, de una fluctuación en la presión sanguínea.

La autorregulación del flujo ocular se realiza fundamentalmente mediante la variación del diámetro de las arteriolas de los sistemas de irrigación ocular, desencadenándose una respuesta vasoconstrictora o vasodilatadora. Esto se lleva a cabo mediante mecanismos dispares, destacando los de naturaleza metabólica como el ejercido por el óxido nítrico, el cual actúa como vasodilatador, o la endotelina que produce el efecto contrario.

Se han observado niveles de endotelina-1 aumentados en el humor acuoso y el plasma de pacientes con diferentes tipos de glaucoma, lo que podría disminuir el aporte sanguíneo a la cabeza del nervio óptico y producir una isquemia mediada por el receptor ET-A.

Por otro lado, cuando el drenaje del humor acuoso no es el correcto, en la cámara anterior del ojo se produce un aumento de presión intraocular, que se puede transmitir a la cámara posterior produciendo una disminución del flujo sanguíneo retiniano. Esto provoca a su vez una mala irrigación arterial de la papila óptica, con la degeneración progresiva de las fibras del nervio óptico.

Esta teoría sostiene que la pérdida axonal en el glaucoma es predominantemente resultado de la isquemia. Además, el hecho de que la perfusión reducida puede conducir a la acumulación de excitotoxinas, como el glutamato, que causan toxicidad y muerte celular.[2.65]

Por otro lado, la teoría de índole mecánico señala que la presión intraocular elevada comprime y deforma los espacios entre las láminas cribosas por las que pasan los axones del nervio óptico, y hace que estos colapsen, pues interfiere con el transporte bidireccional axoplásmico cerebral. Esto es, se impide el suministro de distintas proteínas de apoyo o neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), esenciales para la supervivencia de las células ganglionares de la retina. Se activa la apoptosis celular.

Simultáneamente, el estrés mecánico producido por aumento de la PIO puede activar los astrocitos por estimulación de los factores de crecimiento (EGFR) y disparar la regulación en la síntesis de distintas moléculas. [2.65]

Los astrocitos son células que forman parte de la glía del sistema nervioso central y actúan complementando a las neuronas, siendo su soporte trófico vital. Sin embargo, cuando se produce un daño en el tejido nervioso, la glía reacciona cambiando su estado normal al de *glía reactiva* que tiene inicialmente como objeto reparar daños y normalizar niveles de nutrientes y neurotransmisores, pero termina generando lesiones secundarias que pueden llegar a cronificar la patología: '*degeneración secundaria*'.

Esto se produce porque los astrocitos expresan en su membrana gran número de receptores que al activarse, aumentan el calcio intracelular y gracias a ello, responden a neurotransmisores y liberan distintas sustancias químicas.

Estos astrocitos pueden ser igualmente activados por las endotelinas, aumentadas en pacientes glaucomatosos, y alterar sistemas enzimáticos como el óxido nítrico sintasa (NOS-2), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) o el factor necrótico tumoral(THF).

Las elevaciones de NO a nivel retiniano y su consecuente generación de radicales libres causantes de la apoptosis celular, se han demostrado usando distintos modelos isquemizantes como la elevación de la PIO, isquemias en el nervio óptico y enfermedades con isquemia ocular. La inhibición de la producción NO permite por tanto la protección histológica y funcional de la retina. [2.65]

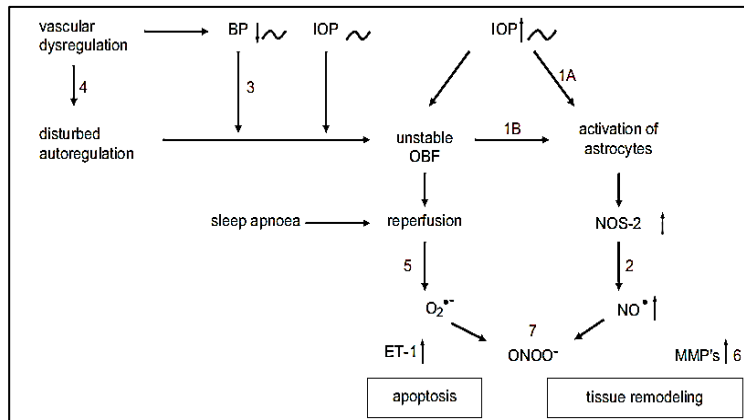


Imagen 3. Daño axonal y activación de astrocitos. [2.7]

Se puede describir este proceso cronológicamente en 3 pasos: daño axonal primario, influenciado principalmente por la elevada presión intraocular, muerte de la neurona dañada, y daño y posterior muerte de neuronas adyacentes o "*degeneración secundaria*" por la liberación de agentes citotóxicos. Esta degeneración secundaria ocurre en neuronas inicialmente no dañadas pero que acaban muriendo por exposición a agentes citotóxicos liberados por la muerte de las neuronas con daño axonal primario.

Por ejemplo, se ha demostrado que la cantidad de **glutamato** se eleva al doble en los casos de glaucoma, resultando tóxico para las células ganglionares por la sobre estimulación de los receptores NMDA, aumentando en éstas el influjo de calcio intracelular y activando la vía apoptótica mediada por caspasas.

Simultáneamente, se desencadena la producción de radicales libres ROS que son altamente citotóxicos y producen la muerte neuronal. [2.8]

NEUROPROTECCION:

El término **neuroprotección** se refiere a la protección de las neuronas sanas pero vulnerables que se encuentran en las proximidades de las células muertas y de las que se están muriendo, encontrándose en riesgo de ser lesionadas tras la lesión primaria.[2.8]

En el glaucoma, el objetivo de la neuroprotección es limitar o retrasar el daño o muerte, causado por el aumento de la presión intraocular o sus consecuencias en cuanto a liberación de agentes citotóxicos, en las células ganglionares de la retina.

OPCIONES TERAPEUTICAS:

Actualmente, los análogos de las prostaglandinas son el tratamiento de elección. [2.5] Favorecen la reducción de la resistencia al flujo de salida del humor acuoso a través de la vía uveoescleral, reduciendo la PIO. Sin embargo, se han notificado efectos secundarios locales tales como hiperemia conjuntival, elongación y oscurecimiento de las pestañas e iris y pigmentación periorcular de la piel, entre otros.

Otras alternativas terapéuticas utilizadas que todavía no han dado resultados convincentes son los α -agonistas adrenérgicos y β -bloqueantes.

Actualmente no existe un tratamiento verdaderamente efectivo para esta enfermedad. Como consecuencia, la aplicación de cannabinoides exógenos que actúen como hipotensores oculares y al mismo tiempo como neuroprotectores, constituye una de las líneas de investigación existentes en la actualidad.

V. CANNABIS SATIVA:

Conocida como cáñamo o marihuana, es una especie herbácea de la familia *Cannabaceae* originaria de las cordilleras del Himalaya (Asia). Ésta segrega una resina que contiene más de 400 compuestos químicos (terpenos, flavonoides...) de los que alrededor de un centenar contienen en su estructura únicamente carbono, hidrógeno y oxígeno. Se conocen como *cannabinoides* y son producidos con total exclusividad por esta especie.

La primera notificación de su uso data del 2700 a. C. a través de la medicina tradicional china con preparados que eran empleados para el tratamiento de la malaria, el beriberi y el estreñimiento, describiéndose también sus posibles efectos psicoactivos, denominados como “visiones diabólicas”.

Pero no fue hasta el **siglo XIX** que empezaron a utilizarse en la medicina occidental, cuando en Inglaterra y en Estados Unidos se utilizaban extractos de resina de cannabis disueltos en etanol (*tintura de cannabis*) para el tratamiento del tétanos, rabia, cólera, convulsiones infantiles, reumatismo o el *deliriums tremens* [2.9]

Sin embargo, en la primera mitad del **siglo XX** el empleo medicinal del *cannabis* desapareció, debido sobre todo a la impredecible respuesta individual que presentaba y a la aparición de alternativas más seguras, junto con la presión política y social en relación a su uso para la drogadicción.

CANNABINOIDES:

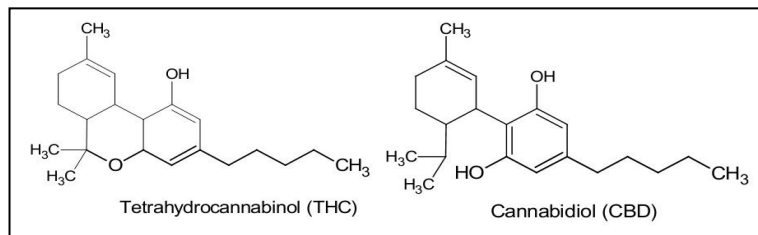
El término *cannabinoides* fue inicialmente usado para hacer referencia a un grupo de al menos un centenar de terpenofenoles activos biológicamente que se encuentran en la resina secretada por los brotes y las partes florecidas de la planta *Cannabis sativa*.

Los cannabinoides pueden ser clasificados en tres grupos: naturales o cannabinoides clásicos, endocannabinoides y cannabinoides sintéticos.

Los denominados **naturales** se encuentran en la planta del *Cannabis* y se producen en cantidad significativa, concentrándose en una savia viscosa que es segregada por unas estructuras conocidas como tricomas. El más representativo y de mayor potencia psicoactiva es el ***D9-tetrahidrocannabinol (delta9-THC)*** conocido desde hace más de 50 años. Su estructura contiene tres anillos químicos y una cola de pentilo, fórmula química que justifica su lipofilia (baja capacidad de disolución en disolventes acuosos y alta en disolventes orgánicos o grasos), de hecho, a temperatura ambiente es un aceite.

Pero éste no es el único componente activo de la planta, destaca el ***cannabidiol (CBD)*** un compuesto bicíclico, cuya fórmula es significativamente similar al delta 9-THC. Solamente difiere en su anillo tetrahidropirano, el cual se encuentra escindido, por lo que su estructura 3D cambia y también sus acciones sobre el organismo; ya que además de sus propiedades terapéuticas (antiinflamatorio y anticonvulsivante), es capaz de mejorar la tolerabilidad del THC al carecer de efectos psicoactivos y atenuar los de éste.

Es por ello que a nivel terapéutico se suele recomendar su combinación en preparados.[5]



El ***cannabinol (CBN)*** es otro compuesto natural que posee propiedades psicoactivas, aunque una décima parte de las atribuidas al *delta9-THC*. Presenta mayor afinidad por el receptor CB2 que por CB1, actuando a nivel de la inmunomodulación que se les atribuye a los cannabinoides.

Alrededor de 100 cannabinoides naturales han sido aislados de la planta, entre los que destacan, junto a los anteriores; el ***cannabigerol (CBG)*** que además posee acción antibiótica incluyendo estafilococos resistentes a metilicina (MRSA).

Luego el ***cannabinocromeno (CBC)***, ***canabigerol (CBG)***, ***alfa 8-tetrahidrocannabinol (alfa8THC)***, ***ácido cannabinólico (CBDA)*** entre otros.

Alrededor de 1992 fue cuando se produjo el descubrimiento de los receptores cannabinoides (rCB), moléculas en la superficie de ciertas células en nuestro organismo que reconocen específicamente estos compuestos, se activan y responden ante ellos. La identificación, caracterización, farmacológica y localización en nuestro organismo de receptores CB que ligaban específicamente un principio activo producido por una especie de las aproximadamente 300.000 que componen el reino vegetal, pareció un capricho evolutivo. Esto fue lo que propulsó la búsqueda de ligandos endógenos que

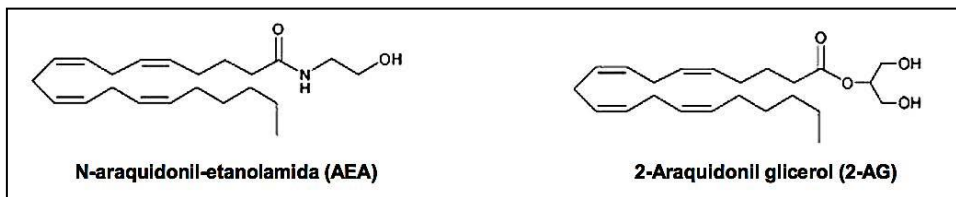
se pudieran unir a ellos, ya que debíamos poseer estos receptores para unir moléculas que se produjeran de forma natural en nuestro organismo.

Así fueron descubiertos los **endocannabinoides** (EC) o cannabinoides endógenos que son amidas y ésteres de ácidos grasos de cadena larga.

Fue a partir de un extracto lipídico obtenido del cerebro de cerdo de donde se aisló en 1992 la **andandamida (AEA)**, que resultó ser una amida del ácido araquidónico(ARA).

Posteriormente, a partir del intestino de perro y cerebro de rata, se aisló en 1995 otro ligando endógeno, **el 2-araquidonil glicerol (2-AG)**.

Hoy en día estos siguen siendo los más representativos. Son similares al THC y comparten las mismas dianas primarias, al tiempo que llevan a cabo acciones similares.



Los endocannabinoides cumplen las condiciones necesarias de todo neurotransmisor en nuestro organismo, ya que son sintetizados y liberados a partir de las neuronas, se unen y activan receptores de membrana, siendo finalmente inactivados por receptación y degradación en el interior celular. Únicamente, y a diferencia de lo que ocurre en el caso de otros neurotransmisores, dada su lipofilia no son almacenados dentro de vesículas sinápticas.

La síntesis de estos compuestos se produce mediante hidrólisis catalizada(AEA) o acetilación(2-AG) a partir de precursores fosfolipídicos de membrana, que sirven como depósito de almacenaje hasta su síntesis y liberación, cuando existe una demanda del organismo por necesidad de los mismos.

El conjunto de estos compuestos, los receptores a los que se unen y las proteínas que los sintetizan, los transportan y los hidrolizan, es lo que conocemos como **el “Sistema Cannabinoide Endógeno” (SEC)**.

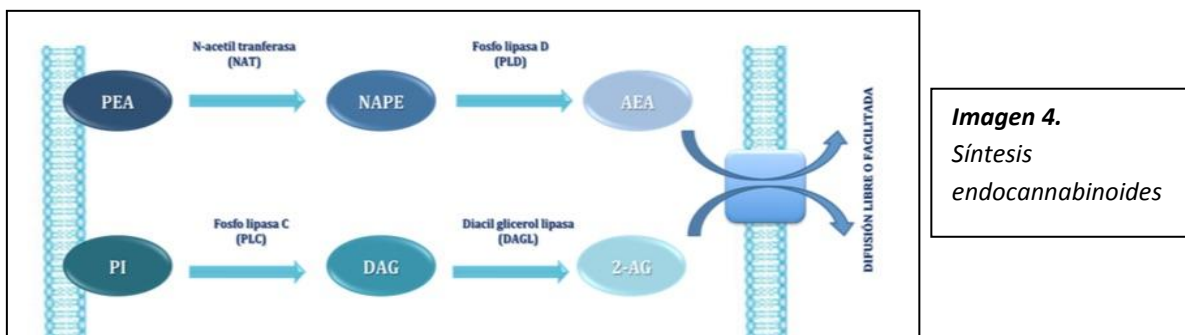


Imagen 4.
Síntesis
endocannabinoides

El metabolismo 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)** y **la monoacilglicerolipasa (MAGL)** que degradan los endocannabinoides a ácido araquidónico, sobre el cual posteriormente actúan la **ciclooxigenasa (COX)** o la **lipooxigenasa (LOX)**, dos rutas oxidativas que tienen como resultado la formación de prostaglandinas, y por otro lado, la de leucotrienos y eicosanoides (HETE; HPETE), respectivamente.

Todos ellos son mediadores de la inflamación, por lo que la **inhibición de dichas enzimas conlleva efectos antiinflamatorios, beneficiosos en el glaucoma, y además evita el metabolismo de los endocannabinoides, prolongando su efecto.**

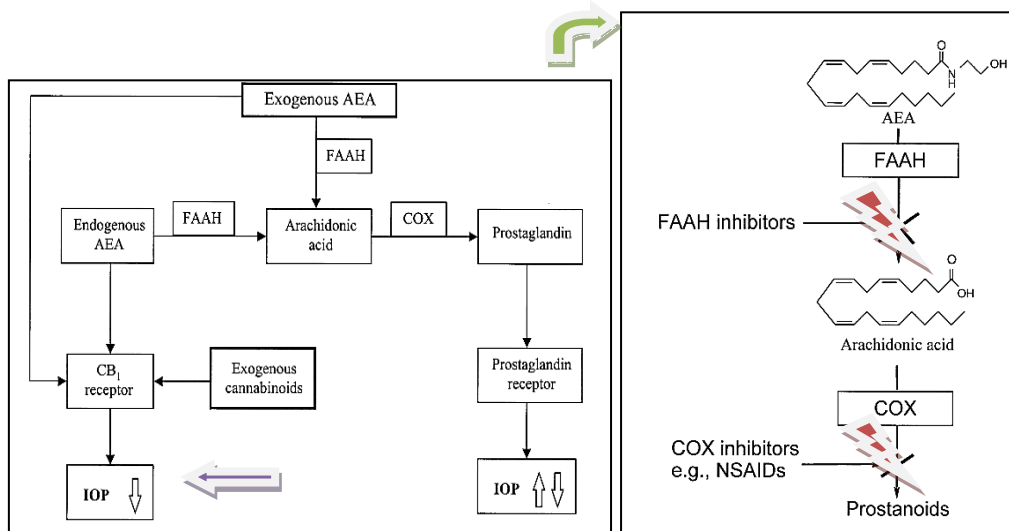


Imagen 5. Esquema que muestra la acción de EC sobre el rCB1 y ruta de degradación de cannabinoides endógenos y exógenos. [4]

La relevancia clínica de los cannabinoides en el glaucoma ya fue demostrada en unos estudios iniciales que se basaron en las diferencias de concentración de endocannabinoides en los diferentes tejidos oculares. El estudio analítico sobre 2-AG, AEA y palmitoiletanolamina (PEA) en tejidos oculares humanos normales y tejidos glaucomatosos, confirmó el relevante papel del SEC en la fisiología ocular y muestra una disminución de éstos en ciertos tejidos del ojo glaucomatoso humano.

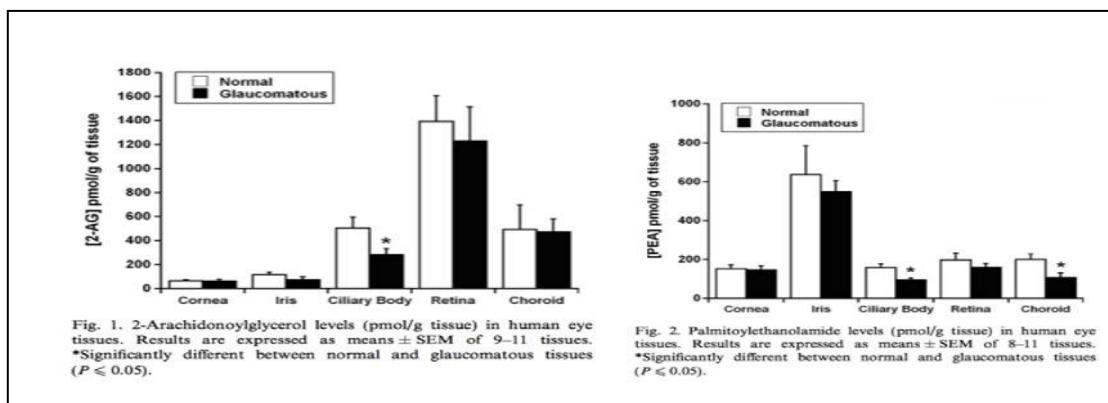


Imagen 6. Diferencias existentes en la concentración de endocannabinoides (PEA, 2AG) en un ojo sano y un ojo glaucomatoso [5]

Por último, el conocimiento de las relaciones existentes entre la estructura y la actividad de los cannabinoides ha permitido el diseño de compuestos análogos que han sido de gran utilidad en el estudio farmacológico y fisiológico de estas sustancias. Este tercer y último grupo lo forman los **cannabinoides sintéticos**. Las sucesivas modificaciones de su estructura han permitido la preparación de derivados que

potencian alguna de sus propiedades atribuidas, moderando en parte sus efectos psicotrópicos.

Se han sintetizado derivados como por ejemplo los del Δ^9 -THC, *dronabinol* y *nabilona*, usados por sus características antieméticas. Han sido también desarrollados compuestos más selectivos, como *HU210*, que muestra una alta afinidad por el receptor CB1 o WIN55212, que es más selectivo por el receptor CB2.

DIANAS O RECEPTORES:

La observación de la *marihuana* como reductor de la PIO por Hepler y Frank fue en 1970, resultando ser la razón que hizo que se dispararan los estudios sobre *cannabinoides* aplicados al glaucoma, a raíz de observar un claro efecto hipotensor ocular de los mismos (descenso de un 5 a un 45% de la tensión ocular) en una muestra de voluntarios que ingería o fumaba *marihuana*(*delta9-THC*)[4].

Se observaron, sin embargo, otros efectos oculares no deseados como: hiperemia conjuntival, reducción de la producción de lágrimas, cambio en el tamaño de la pupila y efectos secundarios sistémicos como reducción de la presión arterial y taquicardia, alteraciones cognitivas y de la memoria, distorsión del sentido del tiempo, reducción de la coordinación y somnolencia.

El carácter lipofílico de los cannabinoides naturales dificultó durante muchos años la identificación de los receptores específicos para este tipo de sustancias hasta el punto que algunos autores atribuían los efectos del *delta9-THC* a su interacción con componentes lipídicos de la membrana celular. Pero el desarrollo de análogos sintéticos de mayor potencia y menor lipoficidad permitió establecer con contundencia que la mayoría de las acciones evocadas por estos compuestos se deben, al menos, a dos tipos de receptores cannabinoides.

El receptor cannabinoide tipo 1 (rCB1) fue el primero en ser localizado por métodos radiométricos(*Devane y cols, 1988*) y su estructura molecular fue identificada poco después en el ser humano(*Gerard y cols, 1991*). Estas proteínas formadas por 473 aminoácidos están en la membrana plasmática, y son capaces de unir tanto el THC como los endocannabinoides.

Se localizan fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central, encontrándose la mayor densidad en los ganglios basales y en menor número, en las capas I y IV de la corteza cerebral, luego en el hipotálamo, medula espinal y tallo cerebral. Además, están en regiones periféricas como próstata, amígdalas, ovarios, útero y a nivel presináptico en terminaciones nerviosas. [5.5]

El receptor de cannabinoides de tipo 2 (rCB2) fue aislado en 1993(*Munro y cols.*) y se trata de otra proteína transmembrana de 360 aminoácidos. En este caso, su localización es fundamentalmente periférica en distintos tipos de células inmunes (macrófagos, linfocitos.) y órganos (bazo, timo...), y los efectos inmunomoduladores de los endocannabinoides se atribuyen a la interacción con estas proteínas.[6]

De esta forma, la actividad farmacológica de los *cannabinoides* está mediada por estos dos receptores CB, pertenecientes a la clase A receptores de membrana acoplados a proteína Gi/O y que cuentan con 7 dominios transmembrana.

En el sistema nervioso se comportan principalmente como neuromoduladores inhibidores de la propagación del impulso nervioso, la transmisión sináptica y la liberación de neurotransmisores.

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores de cannabinoides **CB1** incluyen la inhibición de la adenilil ciclasa (AC), con lo que los niveles de AMPc intracelular se van a ver reducidos, siendo esto una señal de activación de distintos efectos biológicos.

Los receptores CB1 también pueden modular la actividad de los canales iónicos induciendo una inhibición de los canales de calcio(Ca²⁺) dependientes de voltaje y un aumento de la conductancia del potasio(K⁺). El efecto combinado sobre ambos canales parece ser la base de la inhibición que ejercen frente a la liberación de neurotransmisores y neuroprotección de las células ganglionares de la retina.

Finalmente, los cannabinoides también activan la ruta de las MAP quinasas, vía involucrada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación celular.

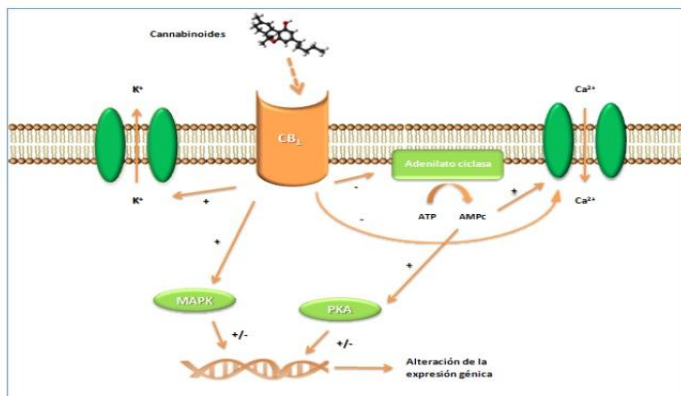


Imagen 8. Mecanismo de transducción de señales en nuestro organismo tras la unión del ligando cannabinoide. [3]

En relación al receptor **CB2**, su activación inhibe igualmente la adenilato ciclasa y activa la vía de las MAP quinasas, pero no es capaz de modificar las corrientes de los canales K⁺ y Ca²⁺, por lo que no ejerce efecto sobre la liberación de neurotransmisores.

ACCIONES FISIOLÓGICAS AFECTADAS POR EL THC REGULADAS POR LOS ENDOCANNABINOIDES:

En general, el efecto que el organismo sufre por la acción cannabinoide es principalmente de tipo negativo o inhibitorio, y algunas de las acciones fisiológicas sobre las que actúa son:

A **nivel cognitivo** afectan a la coordinación motora, y producen alteraciones en la percepción cognitiva y auditiva debido a la presencia de receptores en el cerebelo y ganglios basales, con la consecuente alteración de sus funciones.

Participa en la inhibición de **nauseas y vómitos** inducidos por quimioterapias emetógenas (usado en cáncer muy frecuentemente) mediante la interacción específica con rCB ubicados en centros del vómito.

Mientras que, en el **metabolismo energético**, cabe destacar el papel orexigénico en la regulación del apetito debido a la acción sobre receptores ubicados en el hipotálamo, aumentando el apetito. [3]

Otros receptores

Hoy en día sabemos que existen otros receptores relacionados con el sistema endocannabinoide como son por ejemplo el receptor metabotrópico GPR55 y los receptores vanilloides de potencial transitorio (TRPV). **El receptor GPR55 huérfano** está localizado en el sistema nervioso central y tejidos periféricos, y recientemente le ha sido atribuida una posible implicación en el control de la sensibilidad al dolor. Los ligandos con los que podemos actuar sobre este receptor son el CBD (antagonista) y el THC (efecto bifásico, agonista a dosis bajas y antagonista a dosis altas).

Otro va a ser el **receptor de potencial transitorio TRPV1**, de amplia distribución central y periférica. Pertenece a una familia de canales iónicos que modulan el flujo de iones a través de la membrana celular, influyendo en la modulación e integración de estímulos nocivos.

Un efecto cannabinoide directo sobre este receptor se puso de manifiesto porque la anandamida activa canales TRPV1 que se expresan en células renales HEK 293, y dicho efecto es bloqueado por capsazepina (un bloqueante selectivo de TRPV1) pero no por SR141716A (bloqueante CB1).

Los datos indican que los cannabinoides endógenos pueden modular la transmisión nociceptiva o fenómenos de depresión neuronal por vías diferentes a los receptores CB. [6]

VI. PROTOTIPOS. LIGANDOS ENDOCANNABINOIDES:

Aunque se ha descrito la expresión de ambos receptores CB1 y CB2 en tejidos oculares, los que predominan a este nivel son los CB1. De este modo, para una fisiopatología como es el glaucoma, interesará conocer sus efectos tras la activación/inhibición de los mismos, gracias a la acción ejercida por sus ligandos agonistas y antagonistas.

Agonistas no selectivos: Existe una amplia variedad de ellos, que se dividen a su vez en cuatro grupos con estructura química bien diferenciada. Los cannabinoides clásicos se corresponden con estructuras tipo dibenzopirano y son los presentes en *Cannabis sativa*; delta9-THC, CBN, CBD y análogos sintéticos del THC como el HU210 y la nabilona.

Los cannabinoides no clásicos son análogos bicíclicos y tricíclicos del delta9-THC sin anillo pirano y entre los que destacan CP55940, CP50556 (levonantradol).

El tercer grupo de compuestos canabimiméticos no selectivos son los aminoalquilindoles, cuyo principal representante es WIN55,212-2. Aunque éste interacciona de forma distinta con los rCB, se ha demostrado que estos 3 grupos de compuestos pueden desplazarse entre ellos en su unión a los rCB.

El último grupo de los eicosanoides surgió con el descubrimiento de ligandos endógenos e incluye compuestos derivados de ácido araquidónico, destacando la anandamida (AEA), 2-araquidonilglicerol(2-AG) y el recientemente descubierto; noladin eter.

Agonistas CB1 selectivos: la araquidnil-2-cloroetilamida (ACEA) y la araquidonil-1-ciclopropilamida (ACPA) son agonistas CB1 altamente selectivos, e incluyen igualmente derivados estructurales de la anandamida como la metanandamida. [3]

Antagonistas CB1. En los últimos años se han desarrollado varias moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos canabimiméticos mediados por rCB, y han supuesto una herramienta fundamental para la caracterización final de estos receptores. Una de las moléculas más conocidas y potente es el Rimonabant

(SR141716A), de marcada selectividad por CB1 e identificado en 1994. Está aprobado como tratamiento para la obesidad, y pese a sus posibles efectos secundarios a nivel mental, sigue siendo la terapia más prometedora para esta patología. [6.5]

En los últimos años, algunos Estados han revisado la eficacia del *Cannabis sativa L.* de modo que actualmente el uso de la planta está aprobado por Agencias Reguladoras (FDA, *Food and Drug Administration* y la EMA, *European Medicines Agency*)[5] y se encuentra legalmente disponible para su uso terapéutico en forma de medicamentos como:

-**Marinol®**: cápsulas de *dronabinol* (THC sintético), están indicadas como estimulante del apetito en pacientes con SIDA y para combatir vómitos y náuseas en pacientes con quimio.

-**Sativex®**: spray de administración oral consistente en una combinación que mejora la tolerabilidad de THC junto con CBD en proporción 1:1 y se usa en la esclerosis múltiple.

-**Cesamet®**: cápsulas duras de *nabilona* (análogo sintético THC, 10x más potente) que se usa como antiemético en el cáncer.

-**Epidiolex®**: CBD puro extraído de la planta, presentado en forma de jarabe.

VII. EFECTO OFTALMOLÓGICO CANNABINOIDE:

✚ Reducción de la PIO:

Varios compuestos cannabinoides han demostrado disminuir la presión ocular a través de distintas vías de administración, como ha sido descrito por ejemplo para el *delta9-THC* inhalado, por vía oral, de forma intravenosa, sublingual y tras su administración tópica a nivel ocular.

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%, 2–6h 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.

Imagen 9. 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. [7]

Desconociendo todavía el mecanismo de acción exacto por el que llevan a cabo su función, se ha identificado un marcaje intenso de rCB1 en regiones implicadas en la

producción y excreción del humor acuoso como son: el cuerpo ciliar, los vasos sanguíneos del cuerpo ciliar, el músculo ciliar y la malla trabecular.

Tabla 1 – Marcaje con inmunohistoquímica de receptores CB1 a nivel ocular.

Estructura	Marcaje
Segmento anterior	
Epitelio corneal	++++
Estroma corneal	–
Endotelio corneal	++++
Malla trabecular	++++
Epitelio trabecular	++++
Canal de Schlemm	+++
Tracto uveal	
Borde anterior del iris	–
Estroma	–
Epitelio pigmentario	–
Base del iris	–
Músculo ciliar	++++
Epitelio ciliar no pigmentado	++++
Epitelio ciliar pigmentado	–
Vasos sanguíneos en cuerpo ciliar	+++
Retina	
Corioides	–
Epitelio pigmentado de la retina	–
Segmentos externos de fotorreceptores	++++
Segmentos internos de los fotorreceptores	++++
Capa plexiforme externa	+++
Capa nuclear externa	++
Capa plexiforme interna	+++
Capa nuclear interna	+++
Capa de las células ganglionares de la retina	+++
Capa de fibras nerviosas	+++

Marcaje con inmunohistoquímica de receptores CB1 a nivel ocular.
 –: ausencia de marcaje; +: marcaje leve; ++: leve-moderado; +++: moderado; ++++: moderado-intenso; +++++: intenso.
 Tabla basada en los datos del artículo de Straiker et al, 1999.

Imagen 10. Expresión de receptores CB en diferentes tejidos oculares. [8]

Este marcaje para receptores CB1 a nivel de los **vasos ciliares** ejerce un efecto básico para el aumento de filtración de humor acuoso a través de la vía uveoescleral y trabecular.

Además, para demostrar esta reducción de la PIO a través de los agonistas CB1, en ensayos con animales, se pudo revertir el efecto de CP55940 (un agonista CB1 sintético) usando SR141716A, un antagonista CB1.

Sumado a esto, la activación de los receptores CB1 ubicados en el **epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar** con compuestos como *delta9-THC* y *AEA* genera un incremento en la expresión de la COX-2 en las células, que produce un aumento de la prostaglandina E2, la cual participa en un incremento del flujo de salida del humor acuoso y disminución de la PIO al unirse a sus receptores específicos.

Un aumento en las dimensiones **del canal de Schlemm**, gracias a la aplicación tópica o administración sistémica de compuestos como *delta-9THC* o *cannabigerol*, también ha sido considerado por diversos estudios como un mecanismo hipotensor al facilitar la excreción de humor acuoso.

Neuroprotección:

El papel de los cannabinoides en la neuroprotección del glaucoma está adquiriendo cada vez más importancia. La isquemia causada por el suministro impedido de distintos factores vitales para su supervivencia, conlleva la muerte de las células ganglionares de la retina (CGRs). Esta situación favorece la liberación de glutamato, agente que en altas concentraciones aumenta el calcio intracelular, lo que a su vez activa el óxido nítrico sintasa. Los niveles de ésta pueden encontrarse excesivamente aumentados en el glaucoma, favoreciendo la liberación de radicales libres de nitrógeno que destruyen las células ganglionares de la retina.

Se ha demostrado el efecto beneficioso de los cannabinoides que actúan sobre CB1 al **disminuir la degeneración asociada al glaucoma mediada por la excitotoxicidad del glutamato**. Hay evidencia de que el *D9-THC* puede inhibir la liberación de ácido glutámico al aumentar K⁺ y disminuir la concentración de Ca²⁺ intracelular. Por otro lado, el cannabinoide sintético *HU-211* puede bloquear la unión del glutamato a sus receptores NMDA y evitar su neurotoxicidad.

Este mecanismo antioxidante requiere, como parámetro estructural, la presencia del fragmento fenólico como grupo farmacóforo, típico para cannabinoides naturales (cannabidiol) y sintéticos (CP-55940) [2.8]

✚ Efecto vasorelajante:

Se ha observado que muchos pacientes con glaucoma de ángulo abierto presentan menor flujo sanguíneo a nivel de la cabeza del nervio óptico, siendo otro mecanismo importante en la patogenia de la enfermedad.

Los agonistas de cannabinoides producen un **efecto relajante vascular** a través de la activación de canales de K⁺, por la vía GMPc y del óxido nítrico. La *AEA* y *WIN 55212-2* producen un efecto vasodilatador dosis-dependiente a través de factores relajantes derivados del endotelio como el óxido nítrico, por estimulación de receptores CB1 y de vanilloides (TRPV1).

✚ Antioxidante:

Ha sido reportado igualmente que los cannabinoides poseen **actividad antioxidante, independientemente de la activación de receptores CB1/CB2**, ejerciendo un efecto protector contra el estrés oxidativo en células neuronales. Se previene la muerte neuronal mediante el barrido de radicales libres producidos por la sobreestimulación de receptores NMDA, activados por glutamato. El cannabinoide sintético *HU-211* es capaz de llevar a cabo la eliminación de radicales peróxido causantes del daño oxidativo, al mismo tiempo que inhibe la liberación de el factor TNF-alfa promotor de la inflamación. [8.5]

Este mecanismo antioxidante requiere, como parámetro estructural, la presencia del fragmento fenólico como grupo farmacóforo, típico para cannabinoides naturales y sintéticos.

VII. ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE NUEVOS LIGANDOS CANNABINOIDES:

El cannabinoide natural *delta9-THC* fue descartado como tratamiento terapéutico debido a sus numerables efectos indeseados, mientras que los endocannabinoides como la *anandamida* no son considerados en la actualidad como una opción terapéutica válida debido a su rápida metabolización en el organismo. Esto hace necesario que surjan nuevas alternativas las cuales posibiliten la aplicación de la terapia cannabinoide.

Han sido sintetizados diversos cannabinoides sintéticos hasta el momento. Estos fueron compuestos que en un principio se unieron con más o menos afinidad a ambos receptores, y más tarde lo hicieron selectivamente a alguno de ellos. Los primeros estudios de relación estructura-actividad(SAR) pusieron de manifiesto la existencia de 4 grupos farmacóforos que se presentan dentro del prototipo cannabinoide; estos son un **hidroxilo fenólico, una cadena lipofílica y dos alcoholes alifáticos situado uno en la zona norte de la molécula y otro al sur.**

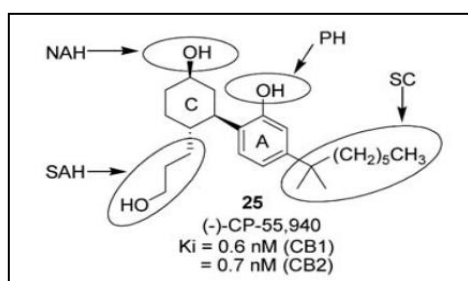


Imagen 11. Representación de los cuatro grupos farmacóforos del prototipo cannabinoide.

Va a ser la **cadena lateral lipofílica** la que juega un papel imprescindible en la determinación de la actividad cannabinomimética; en cuanto a su selectividad respecto a los dos tipos de rCB y su potencia de acción. La cadena se introduce y se fija en un bolsillo hidrofóbico, orientándose de forma perpendicular al anillo aromático.

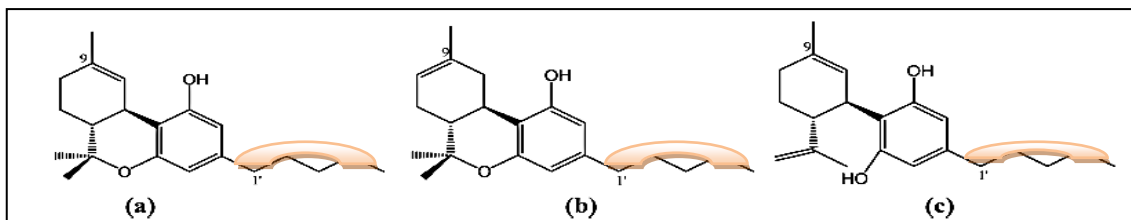


Imagen 12. Estructura química de $\Delta 9$ -THC, $\Delta 8$ -THC y CBD (de izquierda a derecha respectivamente). La cadena lateral alquílica juega un papel crucial en la actividad cannabinomimética con el receptor. [9]

Diversas pruebas han puesto de manifiesto que una cadena con menos de 5 carbonos se une menos afínmente al rCB1, mientras que, si a una cadena de 5 carbonos se le añaden uno o dos más, esta afinidad se ve incrementada. **Los cambios en esta cadena alifática (C-1) dan lugar a ligandos de alta afinidad ya sea con efecto agonista puro, parcial o antagonista.**

Han sido recientemente realizados estudios de relación estructura-actividad tridimensional cuantitativa (3D-QSAR) de nuevos análogos de cannabinoides, **usando técnicas de análisis de campo molecular comparativo (CoMFA) y análisis comparativo de índices de similitud molecular (CoMSIA), junto con resonancia magnética nuclear (RMN).** A partir de esto, se han obtenido numerosos resultados que pueden explicar los diferentes requerimientos para la unión de los cannabinoides a rCB1 y rCB2.

Por un lado, **CoMFA** calcula las propiedades estéricas y electrostáticas en el espacio que rodea a las moléculas alineadas y lo correlaciona con la actividad biológica, mientras que **CoMSIA** calcula los índices de similitud alrededor de las moléculas de estudio y las expone en términos fisicoquímicos tales como ocupación estérica, enlaces de hidrógeno...etc.

Gracias a la combinación de estas técnicas, se pudo obtener la conformación bioactiva de los ligandos CB con mayor potencia dentro un grupo de 30 compuestos derivados de $\Delta 8$ -THC (compuesto químicamente más estable que $\Delta 9$ -THC) y CBD.

De entre los análogos sintetizados, fue el **nº12** el elegido como modelo, ya que gracias a la información proporcionada por la combinación aplicada de técnicas RNM y estudios de modelaje molecular (CoMFA, CoMSIA), se determinó que éste **posee la mayor afinidad por el rCB1, con un valor de Km de 0.32nM, y la segunda mayor afinidad sobre rCB2 con Ki 0.52nM.**

Ha contribuido a este hecho, como una de las razones principales, su incrementada hidrofobicidad de la cadena lateral debido a la sustitución benzólica, que puede favorecer la interacción con el correspondiente sitio hidrofóbico del receptor.

Compound No.	R	K _i for CB1 (nM)		K _i for CB2 (nM)		
		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		119.0	51.70			
4		57.77	107.80			
5		11.73	9.29	6	753.5	221.6
7		27.96	25.20	8	259.0	169.0
9		8.26	3.86	10	319.0	110.7
11		168.0	100.0			
12		0.52	0.52	13	136.0	56.40
14		0.52	0.22			
15		56.90	257.0			
16		1.80	3.68			
17		52.38	19.70			
18		0.45	1.92			
19		47.80	19.30	20	1265.0	239.0
21		22.80	-			
22		0.85	0.49			
23		0.44	0.86	24	58.06	99.23
25		1.27	0.29	26	868.4	32.87
27		0.71	1.03	28	189.0	63.30
29		21.70	83.70			
30		2.17	3.38			

Imagen 13. 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. [9]

Tras este hallazgo se pretendió profundizar en el conocimiento de los límites estereoquímicos de este sitio de unión, para lo cual se elaboraron '**Countor maps**' o **mapas de volumen esencial de receptores** y fue el ya citado análogo 12 (análogo ditiolano) el elegido para usarse como modelo en la elucidación de la estructura del ligando afín al rCB1 de interés.

Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la misma familia de receptores y muestran alrededor de **44% de secuencia homóloga, que aumenta hasta 68% en los dominios transmembrana**, encargados del reconocimiento de ligandos. [6]

Los resultados obtenidos muestran la importancia de los componentes hidrofóbicos en los cannabinoides clásicos y otros CBs con actividad canabinomimética, observándose como los resultados de ambos análisis coinciden en que existen requerimientos estructurales similares para el óptimo ligando de los receptores CB1 y CB2.

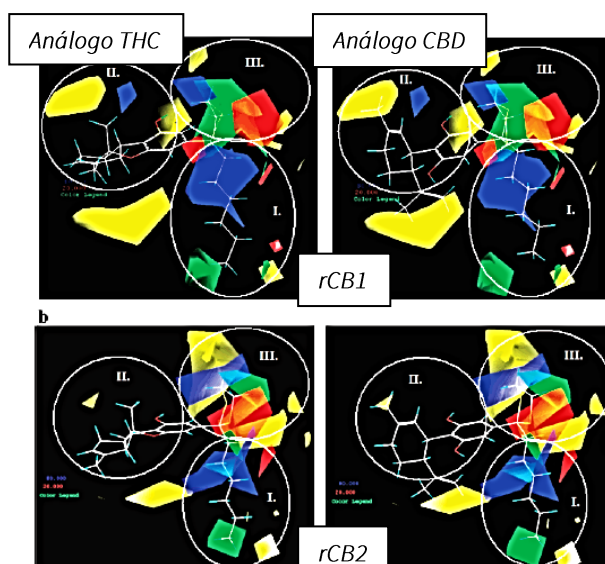


Imagen 14. Mapa CoMFA del modelo 12 (izquierda) y su respectivo análogo CBD (derecha). Las zonas estéricas y electrostáticas favorables en color **verde** (contribución del 80%) y las no favorables en **amarillo** (contribuyen un 20%). Por otro las áreas **azules** serían las potencialmente positivas (contribuyen en un 80%) y las desfavorables potencialmente en **rojo** (20%). Las zonas I; II; III muestran la cadena alquil lateral, la parte tricíclica y parte c-1 del ligando [9].

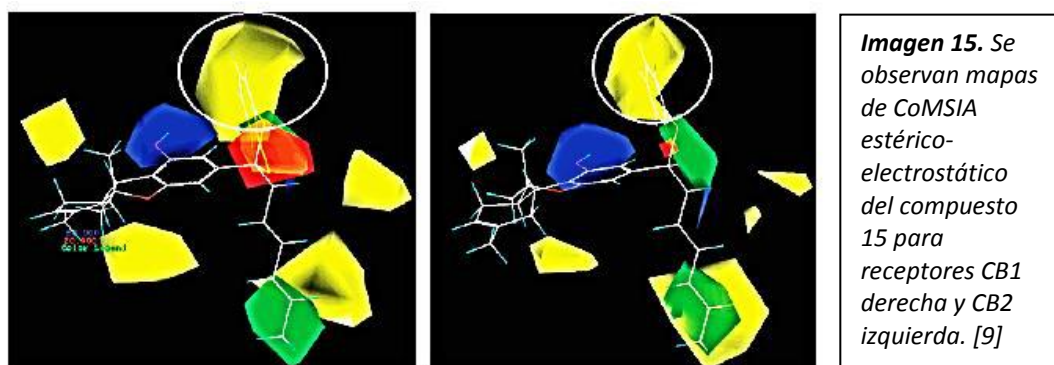
De los mapas en 3D de CoMFA y CoMSIA, se ha centrado la investigación en tres regiones principales de los ligandos cannabinoides:

En relación a la **cadena lateral alquílica**, la coloración verde en el lado izquierdo del final de la cadena muestra que grupos voluminosos aumentan la afinidad por rCB1 y rCB2. Asimismo, hay zonas amarillas en el lado derecho del final de la cadena en los modelos elaborados, que indican la existencia de campos estéricamente desfavorables, en las cuales grupos grandes reducen la afinidad de unión. Se confirma que la orientación de la cadena alquílica juega un papel importante en la determinación de la actividad biológica.

Respecto al **sistema anillo 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.

Si se compara, los análogos de CBD poseen menos afinidad de unión que los de THC lo cual puede ser explicado por los distintos requerimientos topográficos de los análogos en el anillo cíclico.

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.



Los resultados de los modelos de CoMFA y CoMSIA de los receptores CB1 y CB2 obtenidos han sido similares, y los modelos utilizados sirven como base para el diseño de nuevos prototipos de cannabinoides que pueden llegar a mejorar la actividad en los receptores CB.

IX. DISEÑO Y SÍNTESIS DE PROFÁRMACOS:

La muerte de las células ganglionares de la retina se produce de forma bifásica. **La primera fase**, influenciada por el principal factor de riesgo, la hipertensión intraocular según las teorías mecánica y vascular, mientras que **la segunda** se beneficia de la neurotoxicidad del óxido nítrico y la excitotoxicidad mediada por el glutamato, que amplifican los efectos iniciales de la lesión, favoreciendo el avance y la progresión del glaucoma.

Este ambiente favorece una situación de neurodegeneración secundaria sobre la que hemos de actuar cuando integramos la estrategia neuroprotectora a la neuropatía óptica glaucomatosa.

Sin embargo, a pesar de estos efectos beneficiosos y otros más descritos en el contexto del glaucoma, los cannabinoides no están exentos de efectos indeseados; y su administración lleva asociados efectos sistémicos adversos tales como la hipotensión, taquicardia, palpitaciones y alteraciones psicomotoras.

Para minimizar los posibles efectos secundarios adversos sistémicos y maximizar la dosis en el lugar de acción, **la aplicación tópica sería la forma ideal de administración.** Sin embargo, para hacernos una idea, tras la instilación de una gota ocular de cualquier medicamento, la pérdida de la solución instilada a través del sistema de drenaje lacrimal y la penetración pobre de la droga resulta en sólo menos del 5% de una dosis aplicada que llegará a los tejidos intraoculares [10]. Sumado a esto, los extractos naturales de cannabinoides, así como las formas sintéticas, son altamente lipofílicos y tienen baja solubilidad acuosa, creando dificultades prácticas en este modo de administración.

Algunas de las soluciones a este problema implicaron el uso de aceite mineral ligero como vehículo, pero resultó ser irritante para el ojo humano.

Recientemente, se ha tratado de aumentar la solubilidad mediante el uso de diferentes **microemulsiones** así como el empleo de **ciclodextrinas** (oligosacáridos macrocíclicos) para aplicación tópica en el ojo, los cuales han proporcionado resultados muy esperanzadores en varias líneas de investigación.

Estas últimas formulaciones con ciclodextrinas han sido ya usadas eficientemente para administrar el cannabinoide sintético *WIN-55,212-2* tópicamente en pacientes con glaucoma. [10]

Otra estrategia considerada para incrementar su solubilidad consiste en el desarrollo de cannabinoides conjugados con polietilenglicol(PEG); polímero usado comúnmente como excipiente en numerosas formulaciones ya que mejora la estabilidad, solubilidad y aumenta el tiempo de permanencia en el organismo de diversas moléculas. Se sintetizaron derivados de *Rimonabant* (antagonista CB1) conjugados a un polímero de polietilenglicol mediante un espaciador de longitud variable dando lugar a compuestos hidrosolubles.

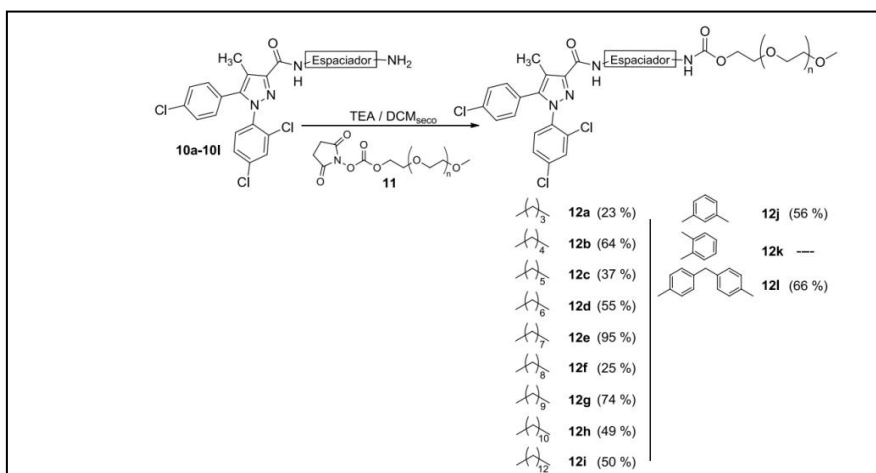


Imagen 16. La preparación de los conjugados PEG-aminoalquilpirazolcarboxamidas se realizó siguiendo el esquema de síntesis representado a continuación. El **mPEG-2000 activado 11** reaccionó con las aminas de las **diarilpirazolcarboxamidas 10a-10j y 10l** en presencia de **TEA** con rendimientos de moderados a buenos. [11]

Para realizarse el estudio de solubilidad en agua, se tomó el cannabinoide conjugado **12f** y se suspendió en un exceso de agua desionizada, a pH neutro y se sonicó.

Se formó un gel, al crear una red 3D que retenía agua. De esta forma, se evaluó de forma aproximada la solubilidad de los conjugados disolviendo una cantidad de cada uno de ellos en agua desionizada hasta su disolución.

Estos datos se recogen en la tabla a continuación; estimando el coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$) y la solubilidad en agua ($\log S$) de compuestos químicos. Como se esperaba, la solubilidad en agua disminuye al aumentar el valor de $\log P$. [11]


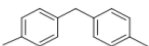
Compuesto	Espaciador	Solubilidad aprox. (mg/mL)	$\log S_{\text{exp}}$	$\log P$ (ALOGPS 2.1)
12b	(CH ₂) ₄	101	-1.392	1.60
12c	(CH ₂) ₅	102	-1.391	1.70
12d	(CH ₂) ₆	109	-1.364	1.82
12f	(CH ₂) ₈	86	-1.472	2.03
12g	(CH ₂) ₉	88	-1.463	2.13
12j		47	-1.731	2.10
12l		25	-2.023	2.73

Tabla 1. Solubilidad de los conjugados en agua desionizada.

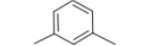
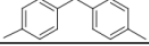
Compuesto	Espaciador	K _i (nM) CB ₁	K _i (nM) CB ₂
12a	(CH ₂) ₃	50%	>40μM
12b	(CH ₂) ₄	53%	>40μM
12c	(CH ₂) ₅	55%	62%
12d	(CH ₂) ₆	2806 ± 642	5487 ± 2095
12e	(CH ₂) ₇	1680 ± 1000	8840 ± 3000
12f	(CH ₂) ₈	640 ± 161	3327 ± 1046
12g	(CH ₂) ₉	532 ± 81	12180 ± 397
12h	(CH ₂) ₁₀	334 ± 105	12600 ± 6000
12i	(CH ₂) ₁₂	1200 ± 400	8343 ± 591
12j		1083 ± 80	66%
12l		255 ± 67	54%
Rimonabant ^a		1.8	> 1000
Δ ⁹ -THC ^a		40.7	36.4

Tabla 2. Desplazamiento del radioligando en células con recCB y constantes de afinidad (K_i)

La afinidad por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ de los nuevos compuestos sintetizados se evaluó mediante la realización de ensayos de desplazamiento del radioligando [3H]-CP55940 en células transfetadas con receptores humanos CB₁ y CB₂. Los valores de desplazamientos se expresaron en constantes de afinidad (K_i) como se muestra en la tabla 2. [11]

Cuatro de los diarilpirazoles conjugados a PEG estudiados (compuestos **12f**, **12g**, **12h** y **12l**) mostraron valores de constantes de afinidad submicromolar (334 - 640nM) para el receptor CB₁. Sin embargo, ninguno de los diarilpirazoles conjugados a PEG estudiados mostró una afinidad significativa por el receptor cannabinoide CB₂ respecto al receptor CB₁.

X. CONCLUSIONES:

El sistema endocannabinoide juega un papel imprescindible en la fisiología ocular, en el control de la presión intraocular y correcto trofismo de las células ganglionares presentes en la retina. En los últimos años, diversos estudios se han centrado en la

obtención de información acerca de las vías de acción de estos compuestos, beneficiosos a nivel oftalmológico y considerados actualmente como verdaderas opciones terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades como la del glaucoma.

Estos compuestos son capaces de actuar y mantener regulado el principal factor de riesgo que afecta a esta patología, al ejercer como hipotensores oculares. Este efecto todavía presenta gran complejidad para entender su funcionamiento, aunque parece estar claro que es llevado a cabo por los receptores CB1 debido a su amplia distribución en el tejido ocular, principalmente en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar y en la malla trabecular.

Por otro lado, la afinidad de los cannabinoides por rCB1, rCB2 y otros receptores como el receptor vanilloides (TRPV1) ha constatado su efecto neuroprotector frente a la degeneración secundaria de las células ganglionares en la retina, posibilitando frenar la apoptosis celular.

En la actualidad, la investigación se centra en preparaciones de carácter cannabinoide para aplicación tópica, puesto que han mostrado menores efectos secundarios frente a otras vías de administración. La correcta disolución de cannabinoides en vehículos disolventes como el *Tocrisolve* o ciclodextrinos como el *2-hidroxiopropil*, han permitido ya obtener soluciones para aplicación tópica ocular.

Por otro lado, la PEG-ilación de estos compuestos cannabinoides constituye otra posible alternativa para mejorar la solubilidad, que a la vez permite favorecer la selectividad de estos conjugados.

Pese a que estos avances dan cierta esperanza para el futuro uso clínico de estos compuestos, todavía requieren más pruebas sobre su seguridad y ensayos clínicos con el fin de confirmar su utilidad en el tratamiento del ojo glaucomatoso.

XII. BIBLIOGRAFÍA:

[1]. Quigley and Broman "Number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020", 2006; *Br J Ophthalmol*.90(3):262-7, Mar 2006

[2]. 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>.

[2.1]. L.P. Diaz: 'Glaucoma: a world health problem for its frequency and clinical course toward blindness' *Medisan*;18(2):249. p.249-260. 2014

[2.2]. J.M. Diaz; 'Current prevention and glaucoma treatment' *Rev.Med.Clin. Condes*; 21(6) p.891-900. 2010

[2.3]. Khan AO. 'Genetics of primary glaucoma'. *Curr Opin Ophthalmol*; 22: p.347-355. 2011

[2.4]. Leske MC, Wu SY, Nemesure B, Hennis A.' Incident openangle glaucoma and ocular perfusion pressure'. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 52: 7943. 2011

[2.6]. R.T. Piñero, M. Lora y M.I. Andres 'Glaucoma; patogenia, diagnóstico y tratamiento' *OFFARM*, vol.24, nº2 p.88-96. Feb 2005

- [2.65]. J.E.M.de Escalona Rojas: 'Análisis de los flujos vasculares en el glaucoma crónico simple y en el glaucoma de presión normal' *Editorial Universidad de Granada*, p.21-46
- [2.7]. J.Flammer and M. Mozaffarieh, 'What is the present pathogenic concept of glaucomatous optic neuropathy?' *Surv Ophthalmol*. Basel(Switzerland), Vol52, nº6 p.162-173. Nov 2007
- [2.8]. B.Z. Aldana, I.M. Rodriguez, N.T.Pineda; 'Cannabinoides and their possible use in the treatment of glaucoma'. *Rev Cubana Farm*; 45(3): p.349-448. 2011
- [2.9]. T. I, P. RG y A.-B. A., «Cannabinoids and glaucoma, » *Br J Ophthalmol*, . pp. 708-713, Mayo 2004
- [3.]. A. I Fraguas Sanchez, A.M. Fernandez-Carballido y A.I. Torres-Suarez; 'Cannabinoides: una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias'*An.Real Acad.Farm. Vol.80, Nº3 pag.555--577. 2014*
- [4]. J. T, P. DW y L. K, «Cannabinoids in the treatment of glaucoma.,» *Pharmacol Ther*. 95, pp. 203-220, 2002.
- [5]. Chen J,, Matias I,, Dinh T,, et al. (2005) Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun*.; p.1062– 1067. 2005
- [5.5]. J.A.R. Atance; 'Efectos terapeuticos de los cannabinoides' Editorial *Instituto Investigacion Neuroquimica UCM*, p.7-92, Madrid. 2017
- [6]. *Sociedad Española de Investigacion sobre Cannabinoides(SEIC)*. Autores: Sara Gonzalez, Maria Gomez, Jose Antonio Ramos, Angel Pazos, Fernando Berrendero, Ines Diaz. 'Guía básica sobre los cannabinoides'. Madrid. p. 13-75
- [6.5]. V.A. Shevyrin and Y.Y. Morzherin: 'Cannabinoids: structures, effects and classification' *Russian Chemical Bulletin*,Vol. 64, nº6. p-1249-1266. 2005
- [7]. 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.
- [8]. S. Pinar-Sueiroa, R. Rodríguez-Puertasb y E. Vecinoa,:' Aplicaciones de los cannabinoides en glaucoma' *Arch. Soc. Esp. Oftalmol*;86(1):16–23. 2011
- [8.5]. R. Mechoulam, L. Hanus; 'The cannabinoids: an overview. Therapeutic implications in comiting and nausea after cancer chemotherapy, in appetite promotion, in MS and in neuroprotection' *Pain Res Manage*;6(2):p.67-73. 2011
- [9]. 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 chainon the structural requirements for binding to cannabinoid receptors CB1 and CB2.,» *J. Med. Chem.*, pp. 50, 2875-2885, 2007.
- [10]. I Tomida, R G Pertwee, A Azuara-Blanco; 'Cannabinoids and glaucoma' *Br. J. Ophthalmol*; p.708–713. 2004
- [11]. L. M. Capellán, 'Síntesis y estudio de nuevos compuestos cannabinoides hidrosolubles'; Madrid, p.81-113. 2012