





**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**



**TESIS DOCTORAL**

**EFEECTO DE AGONISTAS CANNABINOIDES  
EN MODELOS EXPERIMENTALES DE  
NEUROPATÍA AUTONÓMICA CARDIACA.**

**CRISTINA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ**

**MADRID 2014**



DÑA. MARÍA ISABEL MARTÍN FONTELLES, CATEDRÁTICA DE FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS Y DÑA. VISITACIÓN LÓPEZ-MIRANDA GONZÁLEZ, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado “EFECTO DE AGONISTAS CANNABINOIDES EN MODELOS EXPERIMENTALES DE NEUROPATÍA AUTONÓMICA CARDIACA” ha sido realizado por Dña. Cristina González Fernández en el Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Farmacología y Nutrición, Anatomía y Embriología Humana e Histología Humana y Anatomía Patológica bajo nuestra dirección.

Y para que así conste donde proceda firmamos el presente certificado en Alorcón, a 10 de Noviembre del 2014.

Fdo. M.I Martín

Fdo. V. López-Miranda

Fdo. C. González



**A mi Familia**



Un día cualquiera del mes de mayo de hace algunos años llegué por primera vez a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos. Me fascinaron sus espacios abiertos, sus jardines verdes y sus fuentes. Ilusionada por la posibilidad de trabajar en ella, todo parecía un sueño; nada parecía indicar el camino que me acechaba tras él. Cualquiera que haya osado embarcarse en una Tesis Doctoral sabe que no es un camino fácil, que conlleva vivencias agridulces. Al igual que atravesar una rosaleda, llena de vida, con sus vivos colores, con la suavidad de los pétalos, pero también con sus espinas. Parece que uno nunca logrará salir de allí, y sin embargo, cuando se halla la salida y se mira hacia atrás, no se puede evitar que se escape una sonrisa; desde esta perspectiva los colores se vuelven a ver vivos, los pétalos vuelven a ser suaves y permanece en el olfato el agradable olor de las rosas. Y en la piel, multitud de heridas propinadas por las espinas; algunas desaparecerán sin apenas dejar rastro y otras, más profundas, cicatrizarán dejando una marca que siempre te acompañará. Y por todo, por lo bueno y por lo malo, por lo vivido y por lo aprendido, por lo que dejo y por lo que me llevo, hoy debo dar las gracias.

En primer lugar, a mis dos codirectoras de Tesis:

A la **Dra. María Isabel Martín Fontelles**, por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu grupo. Aún recuerdo tus palabras cuando llegué a él “aunque vaya corriendo como el conejito de Alicia en el País de las Maravillas, cualquier cosa que necesites no dudes en pedirla”. Y, desde luego, así ha sido, siempre dispuesta, aportando siempre el punto de vista que sólo puede aportar la voz de la experiencia. Gracias.

A la **Dra. Visitación López-Miranda**, gracias por “seleccionarme” en aquel mes de mayo y apostar por mí. Por haberme permitido realizar esta Tesis Doctoral en el área de Cardiovascular. Quiero agradecerte el tiempo y el esfuerzo que has dedicado a este trabajo aportándole valor humano. Sin tu guía y tu ayuda, esta Tesis Doctoral no habría sido posible.

Al **Dr. Carlos Goicoechea**, por estar siempre dispuesto a poner una sonrisa ante cualquier petición de ayuda o cualquier duda. He de confesar que al principio me costó, pero no tardé mucho en descubrir que, tras el “Carlos gruñón”, se esconde un gran corazón. Gracias por todo.

A la **Dra. Raquel Abalo**, espíritu incansable, inquieto, siempre en busca de nuevos retos. Gracias por ser un ejemplo de ello. ¡Ah! Y por las bombas de chocolate compartidas.

A la **Dra. Esperanza Herradón**, con la que he trabajado codo con codo. El comienzo fue difícil, aunque he aprendido mucho trabajando a tu lado. Gracias por todo lo aprendido.

A la **Dra. Rocío Girón**, aunque no he trabajado directamente contigo, gracias por tu amabilidad y por prestarme tu ayuda siempre que fue necesario.

A la **Dra. Eva Sánchez**. Aunque en el laboratorio no hemos trabajado juntas, sí lo hemos hecho en la docencia, y he de decir que ha sido un placer. Gracias por hacer que, a pesar del rigor con que trabajas, trabajar a tu lado sea mucho más fácil.

Al **Dr. David Pascual**, siempre dispuesto a echar una mano, por trabajar haciendo que el trabajo parezca más sencillo y por tu humor, siempre está bien añadir alguna risa.

A la **Dra. Gema Vera**, por ser mucho más que una buena compañera, por estar siempre dispuesta a ayudar de forma desinteresada, un alma generosa. Por estar siempre atenta a escuchar, por tus ánimos y tu comprensión. Gracias.

A la **Dra. Ana Bagüés**. Llegamos casi a la par a este laboratorio, y casi a la par hemos vivido situaciones parecidas, tú siempre un pasito por delante. Gracias por tus consejos y por haber sido un ejemplo.

A los futuros doctores, **Nancy, Miguel, Anita, María**, por todos los ratos compartidos. Ya lo sabéis y no os voy a engañar; no es fácil, pero de repente llega un día en que empiezas a ver la luz. Tampoco entonces es fácil, pero cuando te enfrentas a las últimas líneas, todo se ve de forma diferente. Mucho ánimo, vosotros también lo lograréis.

A **Maica** y a **Lupe**. ¿Qué os puedo decir? Tengo mucho que agradecer. Gracias por ser unas profesionales, siempre ayudando atentamente a todos. Pero sobre todo mil gracias por compartir risas y también momentos malos. Por escuchar, ayudar, animar, comprender, por ser el alma del laboratorio. Por vuestra capacidad de trabajo y valor humano.

A los que ya se fueron. A **Iván**, “estás loco, majareta. Pero te contaré un secreto, las mejores personas lo están” (de Alicia en el País de las Maravillas). Gracias por todo.

A **Cristina Rivas**, por tu apoyo, por estar siempre atenta a todo, hasta el más mínimo

detalle. Al **Dr. Pablo Cabezos**, porque tú también transmites “buen rollo”, deseo que la suerte te sonría y... ¡por supuesto que cuento contigo para el ágape! A **Cristina Blas**, en tiempos difíciles, espero que todo vaya a mejor, que consigas volver, que tú también consigas terminar tu Tesis Doctoral. Tienes un espíritu luchador, espero que todo te vaya bien. A la **Dra. Elisa Burgos**, aunque compartimos poco tiempo en este laboratorio, también de ti aprendí.

A todos vosotros, gracias por “los cafés”, que hacen que el ambiente en el laboratorio sea mucho más humano.

A la **Dra. Marta Miguel**, por lo muchísimo que me has enseñado. Por transmitir siempre tu gratitud a quien trabaja contigo. Todo ello hace que trabajar duro se vea recompensado. Gracias.

A todas las chicas del CIAL: a la **Dra. Marta Garcés**, mucha suerte en el futuro. A **Silvia, Paqui y Ainhoa**, por vuestro compañerismo, por hacer que el trabajo sea más agradable añadiéndole humor. Algún día vosotras os encontraréis escribiendo unas líneas como estas. Suerte y mucho ánimo.

Al **Dr. José Antonio Uranga** y al **Dr. Juan Carlos Leza** por su colaboración en este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a los **Laboratorios Sanofi-Aventis** por permitirme hacer una estancia en su Centro de investigación básica, y muy especialmente al departamento de Farmacología; al **Dr. Antonio Castro**, la **Dra. Beatriz de Miguel**, **Concepción Isidro** y **Rosa López**, por la calidez con la que me acogisteis desde el primer momento, por todo lo que aprendí con vosotros. Fue un auténtico placer. Gracias.

A todos los que han pasado por el laboratorio; doctorandos, alumnos de máster, alumnos de grado, colaboradores etc. porque de todos y cada uno de vosotros he aprendido algo, ya sea de ciencia o de la vida. Gracias por aportar diversidad y un entorno multidisciplinar.

Y por supuesto, sobre todo y ante todo, el mayor de todos los agradecimientos a mi familia. Vuestro es también este trabajo. Por apoyarme antes, durante, y después de este viaje, no tengo palabras suficientes para vosotros. A mis padres, **Javier y Angelines**, porque desde luego sin vosotros hoy no estaría aquí. Por ser siempre un referente en la vida, un ejemplo de dedicación, trabajo y honestidad en todos los aspectos de la vida. A mi hermano **Javier**, por aportar todo lo que aportan los hermanos pequeños y echar siempre una mano ante los “problemas técnicos”. A **Jose**, por ser mi compañero, siempre un apoyo. Porque me sigue asombrando tu capacidad de sacar risas de las lágrimas, por el tiempo que te he quitado para dedicárselo a este trabajo, por aguantar mi mal humor y mis agobios. Al igual que otros muchos retos, juntos hemos superado también este. A **David**, por el tiempo que te he quitado, por darme todo ese montón de pequeños momentos, por redescubrirme el mundo con otros ojos, por estar siempre en todo lo que hago. A mi angelito **Rubén**, por acompañarme siempre. Allá donde vaya, siempre te llevo conmigo.

Al **Ministerio de Educación y Ciencia**, la **Universidad Rey Juan Carlos** y la **Comunidad de Madrid** por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y la docencia.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	13
1 ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A ANTITUMORALES.....	15
2 ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	20
3 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN NEUROPATÍAS.....	30
4 CANNABINOIDES.....	31
4.1 Sistema cannabinoide endógeno.....	33
4.1.1 Receptores cannabinoides.....	33
4.1.2 Mecanismos de transducción.....	36
4.1.3 Ligandos endógenos: Endocannabinoides.....	41
4.1.4 Síntesis, Liberación y Degradación. ....	43
4.2 Ligandos cannabinoides. ....	44
4.2.1 Agonistas cannabinoides. ....	45
4.2.2 Antagonistas cannabinoides. ....	47
4.2.3 Inhibidores de la recaptación.....	48
4.2.4 Inhibidores de la degradación. ....	48
4.3 Efectos de los cannabinoides.....	48
OBJETIVOS.....	59

<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
<b>1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MODELOS DE NEUROPATÍA.....</b>	<b>63</b>
1.1 Neuropatía de origen iatrogénico por administración crónica de cisplatino.....	63
1.1.1 Animales.....	63
1.1.2 Modelo experimental de neuropatía por administración crónica de cisplatino.....	64
1.2 Diabetes Mellitus Tipo 2.....	65
1.2.1 Animales. ....	65
1.2.2 Modelo experimental de neuropatía por Diabetes Mellitus de Tipo 2	66
1.3 Parámetros generales.....	68
1.3.1 Peso. ....	68
1.3.2 Glucemia. ....	69
1.3.3 Dislipemia. ....	69
1.3.4 Liberación de insulina <i>in vitro</i> . ....	73
<b>2 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE NEUROPATÍA AUTONÓMICA</b>	
<b>CARDIOVASCULAR. ....</b>	<b>74</b>
2.1 Medida de presión arterial.....	74
2.1.1 Componentes del equipo.....	74
2.1.2 Protocolo experimental y parámetros cardiovasculares valorados.....	75
2.2 Preparación de corazón aislado y perfundido de rata (Preparación de Langendorff). ....	78
2.2.1 - Componentes del equipo. ....	79

2.2.2 - Obtención de la preparación “Corazón aislado y perfundido de rata”.....	82
2.2.3 - Parámetros valorados. ....	83
2.2.4 - Protocolo experimental. ....	84
2.3 Índice de masas. ....	85
<b>3 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES CANNABINOIDES (CB1 Y CB2) MEDIANTE WESTERN-BLOT.....</b>	<b>87</b>
<b>4 EVALUACIÓN DE CONEXINA 43 EN VENTRÍCULO IZQUIERDO DE LOS ANIMALES TRATADOS CON CISPLATINO.....</b>	<b>89</b>
4.1 Preparaciones Histológicas.....	89
4.2 Cuantificación de la expresión de Conexina 43 mediante Western-Blot....	89
<b>5 TRATAMIENTOS CON CANNABINOIDES.....</b>	<b>91</b>
<b>6 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES.....</b>	<b>93</b>
6.1 Cuantificación de los niveles Plasmáticos de Malonildialdehído (MDA).....	93
6.2 Cuantificación de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) en muestras de eluyente de corazón.....	94
6.3 Cuantificación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) mediante Western-Blot.....	96
<b>7 SOLUCIONES Y FÁRMACOS UTILIZADOS.....</b>	<b>99</b>
7.1 Preparación de la solución nutricia de Krebs-Henseleit.....	99
7.2 Soluciones utilizadas para Western-Blot.....	100
7.3 Fármacos utilizados.....	101
7.4 Disolución de los fármacos.....	101
<b>8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>103</b>

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
<b>1 MODELO DE NEUROPATÍA POR CISPLATINO. ALTERACIONES</b>	
<b>CARDIOVASCULARES.....</b>	<b>108</b>
1.1 Parámetros generales.....	108
1.1.1 Peso.....	108
1.1.2 Neuropatía periférica sensorial.....	109
1.2 Parámetros cardiovasculares.....	111
1.2.1 Presión arterial.....	111
1.2.2 Función cardíaca basal.....	112
1.3 Función cardíaca tras isquemia-reperfusión.....	115
1.4 Índice de masas.....	118
1.5 Conexina 43.....	119
1.5.1 Cuantificación de la expresión de Conexina 43 mediante Wester- Blot.....	120
1.6 Cuantificación de la expresión cardíaca de receptores cannabinoides (CB1 y CB2).....	121
<b>2 MODELO DE NEUROPATÍA POR DM2. ALTERACIONES</b>	
<b>CARDIOVASCULARES.....</b>	<b>123</b>
2.1 Parámetros generales.....	123
2.1.1 Peso.....	123
2.1.2 Glucemia.....	124
2.1.3 Dislipemia.....	125
2.1.4 Liberación de insulina <i>in vitro</i> . ....	128
2.1.5 Estrés oxidativo. ....	130

2.1.6 Neuropatía periférica sensorial. ....	131
2.2 Parámetros cardiovasculares. ....	132
2.2.1 Presión arterial. ....	133
2.2.2 Función cardiaca basal. ....	135
2.2.3 Función cardiaca tras isquemia-reperusión.....	139
2.2.4 Índice de masas.....	143
2.2.5 Cuantificación de la expresión cardiaca de receptores cannabinoides (CB1 y CB2).....	144
<b>3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE WIN 55,212-2 SOBRE PARÁMETROS CARDIOVASCULARES EN LAS RATAS ZDF.....</b>	<b>146</b>
3.1 Efecto de la administración aguda de Win sobre la presión arterial: posible implicación de los receptores cannabinoides.....	146
3.1.1 Efecto del vehículo.....	147
3.1.2 Efecto de Win.....	149
3.1.3 Efecto de los antagonistas.....	152
3.1.4 Efecto de los antagonistas + Win.....	156
3.2 Efecto de la administración aguda de Win sobre la función cardiaca basal: posible implicación de los receptores cannabinoides.....	158
3.2.1 Efecto del vehículo.....	158
3.2.2 Efecto de Win.....	160
3.2.3 Efecto de los antagonistas.....	162
3.2.4 Efecto de los antagonistas + Win.....	164
3.3 Efecto de la administración aguda de Win sobre la recuperación de la función cardiaca tras Isquemia-Reperusión: posible implicación de los	

receptores cannabinoides.....	167
3.3.1 Efecto del vehículo.....	167
3.3.2 Efecto de Win.....	169
3.3.3 Efecto de los antagonistas.....	171
3.3.4 Efecto de los antagonistas + Win.....	174
3.4 Efecto de la administración aguda de Win sobre la expresión miocárdica de la Óxido Nítrico Sintasa tras Isquemia-Reperusión.....	176
3.5 Efecto de la administración aguda de Win sobre los niveles cardiacos de Lactato Deshidrogenasa tras Isquemia-Reperusión.....	180
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>185</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>221</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>225</b>

# **ABREVIATURAS**



**AC:** Adenilato Ciclasa

**ADP:** Adenosín Difosfato

**2-AG:** 2-araquidonilglicerol

**2-AGE:** 2-araquidonil-gliceril-eter

**AMPc:** Adenosín Monofosfato Cíclico

**Anandamida:** Araquidoniletanolamida

**ANOVA:** Análisis de la Varianza

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**B:** Basal

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcio

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro cálcico

**CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:** Cloruro cálcico dihidratado

**CB1:** *Cannabinoid Binding 1*. Receptor cannabinoide de tipo 1

**CB2:** *Cannabinoid Binding 2*. Receptor cannabinoide de tipo 2

**CBC:** Cannabicromeno

**CBD:** Cannabidiol.

**CBE:** Cannabielsoina

**CBG:** Cannabigerol

**CBGM:** Monometiléter del Cannabigerol

**CBL:** Cannabiciclol

**CBN:** Cannabinol

**CBND:** Cannabinodiol

**CBT:** Cannabitriol

**CHE:** Colesterol Esterasa

**CHOD:** colesterol Oxidasa

**CK:** Creatina Quinasa

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CPT:** Cisplatino

**D<sup>8</sup>-THC:** D<sup>8</sup>-tetrahidrocannabinol

**D<sup>9</sup>-THC:** D<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol

**DAG:** Diacilglicerol

## ABREVIATURAS

---

**dl:** Decilitro

**DM:** Diabetes Mellitus

**DM1:** Diabetes Mellitus tipo 1

**DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2

**ECF:** *Enhanced Chemi-Fluorescence*

**EEM:** Error Estándar de la Media

**eNOS:** Óxido Nítrico Sintasa Endotelial

**FAAH:** Amidohidrolasa de ácidos grasos

**Fc:** Frecuencia Cardíaca

**g:** gramo

**GAPDH:** Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa

**GK:** Glicerol Quinasa

**GMPc:** Guanosín monofosfato cíclico

**GPO:** Glicerolfosfato Deshidrogenasa

**GPR55:** Receptor Acoplado a Proteína G55

**HDL:** *High Density Lipoprotein*

**H-E:** Hematoxilina-Eosina

**5-HT3:** Receptores para serotonina

**i.p.:** Intraperitoneal

**i.v.:** Intravenoso

**IDF:** *International Diabetes Federation*

**IMC:** Índice de Masas de Corazón

**IMVI:** Índice de masas del Ventrículo Izquierdo

**iNOS:** Óxido Nítrico Sintasa Inducible

**IP3:** Inositol Trifosfato

**I-R:** Isquemia-Reperfusión

**K+:** Potasio

**KCl:** Cloruro potásico

**Kg:** Kilogramo

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Difosfato potásico

**l:** litro

**LDH:** Lactato Deshidrogenasa

**LEAN:** Ratas Lean delgadas y no diabéticas

**LPL:** Lipoproteinlipasa

**lpm:** Latidos Por Minuto

**M:** Molar

**MAGL:** Monoacilglicerol Lipasa

**MAPK:** Proteína Quinasa Activada por Mitógenos

**MDA:** Malonildialdehído

**mg:** Miligramo

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfato magnésico

**MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:** Sulfato magnésico heptahidratado

**min:** Minuto

**ml:** Mililitro

**mm Hg:** Milímetros de Mercurio

**mm:** Milímetro

**mM:** Milimolar

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**NaCl:** Cloruro sódico

**NAD<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido

**NADA:** N-araquidonil-dopamina

**NADH/H<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido reducido

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonato sódico

**ng:** Nanogramo

**nM:** Nanomolar

**NO:** Óxido nítrico

**NOS:** Óxido Nítrico Sintasa

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**°C:** Grado Centígrado

**PAD:** Presión Arterial Diastólica

**PAS:** Presión Arterial Sistólica

**PDF:** Presión Diastólica final

## ABREVIATURAS

---

**PDVI:** Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo

**PEA:** Palmitoiletanolamida

**Piruvato:** Piruvato Sódico

**PKA:** Proteína Quinasa A

**PLC:** Fosfolipasa C

**POD:** Peroxidasa

**PPAR:** Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas

**PPC:** Presión de Perfusión de las Coronarias

**PVC:** Policloruro de Vinilo

**PVDF:** Fluoruro de Polivinilideno

**R:** Reperfusión

**rpm:** Revoluciones Por Minuto

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SEOM:** Sociedad Española de Oncología Médica

**SM:** Síndrome Metabólico

**SNC:** Sistema nervioso central

**TBA:** Ácido Tiobarbitúrico

**TBS:** *Buffer* Tris-salino/Tween 20

**TRPA:** *Transient Receptor Potential Ankyrin repeat domains*

**TRPV1:** *Transient Receptor Potential Vanilloid* tipo 1

**TTBS:** *Buffer* Tris-Salino/Tween 20

**U.A.:** Unidades Arbitrarias

**U.I.:** Unidades Internacionales

**VEH:** Vehículo (Tocrisolve®)

**Win:** Win 55,212-2

**ZDF:** Zucker Diabetic Fatty Rats (ratas obesas y diabéticas)

**µg:** Microgramo

**µl:** Microlitro

**µM:** Micromolar

# RESUMEN



En la actualidad, el aumento de la esperanza de vida se asocia con una mayor incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus (DM), el síndrome metabólico (SM), el cáncer o algunas patologías inflamatorias (Fontana y cols, 2014). Tanto la propia enfermedad como la terapéutica de las mismas pueden afectar al sistema nervioso y provocar lesiones como las neuropatías, que limitan la calidad de vida de los pacientes que las sufren. En función del nervio afectado, o de si el daño afecta a uno o a varios nervios, las neuropatías pueden provocar alteraciones en todo el organismo, tanto en nervios sensoriales, como motores y sistema nervioso autónomo, pudiendo afectar también al sistema cardiovascular. La afectación del sistema cardiovascular puede provocar síntomas tan variables como alteraciones en el ritmo cardíaco, alteraciones de la presión arterial con los cambios de posición, hipertensión arterial, cardiopatía o angina de pecho entre otras.

En ciertas situaciones patológicas, entre las que se encuentran las neuropatías autonómicas causadas por antitumorales o por alteraciones metabólicas, el sistema endocannabinoide se sobreexpresa o se hipersensibiliza, de manera que en este tipo de patologías los cannabinoides podrían ser una herramienta terapéutica útil. Además, los cannabinoides han demostrado tener efectos beneficiosos en las neuropatías periféricas sensoriales inducidas por antineoplásicos y en ratas diabéticas, lo que despierta el interés en los mecanismos implicados en estos efectos y su posible papel regulador en el desarrollo de complicaciones autonómicas derivadas de estas neuropatías, entre las que se encuentran las complicaciones cardiovasculares. Por todo ello, en esta Tesis Doctoral se ha planteado el estudio de la modulación del sistema endocannabinoide como posible diana terapéutica en las alteraciones cardiovasculares producidas en dos

modelos de neuropatía, la producida por antineoplásicos y la producida en situación de DM2.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido: 1) Evaluar el efecto de la neuropatía autonómica inducida por la administración crónica de cisplatino o situaciones de DM2 en el sistema cardiovascular. 2) Evaluar si la expresión de receptores cannabinoides CB1 y CB2 en ventrículo izquierdo se encuentra alterada en la neuropatía autonómica cardiovascular inducida por cisplatino o en situaciones de DM2. 3) Evaluar, en los casos que proceda, si la modulación de los receptores cannabinoides puede ofrecer beneficios terapéuticos en las alteraciones cardiovasculares inducidas por cisplatino o en situaciones de DM2.

Los resultados más importantes obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que:

- El modelo de neuropatía periférica inducida por la administración crónica de CPT en rata a la dosis de 2 mg/Kg durante 5 semanas, a pesar de manifestar signos de neuropatía periférica sensorial, no muestra signos de neuropatía autonómica a nivel cardiovascular. En este modelo experimental, no se han encontrado alteraciones en la expresión cardíaca de receptores cannabinoides CB1/CB2, pero si existen alteraciones en la expresión cardíaca de conexinas, lo que parece indicar la presencia de daño cardíaco, aunque no el suficiente para provocar alteraciones funcionales.

- El modelo de neuropatía periférica en situaciones de DM2 (ratas ZDF), manifiesta signos de neuropatía periférica sensorial, además de signos de neuropatía autonómica a nivel cardiovascular. En este modelo animal existen alteraciones en la expresión cardíaca de receptores cannabinoides CB1/CB2. La administración aguda de

Win en estos animales tiene efecto hipotensor y bradizante que resulta transitorio, no modificando la función cardíaca basal. Además, la administración aguda de un agonista cannabinoide mixto, Win 55212-2, protegió parcialmente al corazón frente al daño por I-R, siendo esta protección mediada por la modulación del equilibrio en las isoenzimas iNOS/eNOS a nivel cardíaco, pero no por la modulación de receptores cannabinoides CB1 y/o CB2.



# INTRODUCCIÓN



En la actualidad, el aumento de la esperanza de vida se asocia con una mayor incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus (DM), el síndrome metabólico (SM), el cáncer o algunas patologías inflamatorias (Fontana y cols., 2014). Tanto la propia enfermedad como la terapéutica de las mismas pueden afectar al sistema nervioso y provocar lesiones, como las neuropatías. Estas neuropatías causan complicaciones que limitan la calidad de vida de los pacientes que las sufren, ya que inducen cambios sensoriales y funcionales (Aring y cols., 2005; Markman, 2006; Stillman y cols., 2006; Windebank y cols., 2008).

En función del nervio afectado, o de si el daño afecta a un solo nervio o a varios, las neuropatías pueden provocar alteraciones en todo el organismo, tanto en nervios sensoriales, como motores y sistema nervioso autónomo (Katirji y cols., 2012). Afectan a la piel, provocando alteraciones de la sensibilidad y en la sudoración; alteraciones musculares, provocando espasmos, calambres o debilidad muscular; al sistema digestivo, pudiendo ocasionar diarrea o estreñimiento, problemas para la deglución; al sistema respiratorio, ocasionando dificultad respiratoria; al sistema urinario, provocando dificultad para iniciar la micción o incontinencia urinaria; y también al sistema cardiovascular, provocándose alteraciones en el ritmo cardiaco, alteraciones de la presión arterial con los cambios de posición, hipertensión arterial, cardiopatía o angina de pecho entre otras (Katirji y cols., 2012; Jasmin, 2012).

El tratamiento y la prevención de las neuropatías es, hoy día, un desafío sin resolver, ya que siguen siendo origen y consecuencia de muchos problemas que complican la evolución de las enfermedades crónicas o de sus tratamientos. Todo ello se ve complicado porque su etiología es compleja, pudiendo tener un origen iatrogénico (como las inducidas por antineoplásicos), o relacionado con la propia enfermedad

crónica como en el caso de la DM o del SM (Aring y cols., 2005; Markman, 2006; Stillman y cols., 2006; Windebank y cols., 2008)

Desde hace varios años el grupo de investigación del Área de Farmacología y Nutrición de la Universidad Rey Juan Carlos, apoyado por numerosos proyectos (URJC-CM-2006-BIO-0604, S-SAL/0261/2006, SAF2006-13391-C03-01, URJC-CM-2007-BIO-1412, SAF2009-12422-C02-01, S2010/BMD-2308, SAF2012-40075-C02-01), está profundizando en el estudio de las neuropatías periféricas tanto inducidas por antitumorales, como por situaciones de DM de tipo 1 y 2 (Pascual y cols., 2005; Vera y cols., 2007; Pascual y cols., 2010; Vera y cols., 2011; Vera y cols., 2012; Vera y cols., 2012; Burgos y cols., 2012; Vera y cols., 2013), así como en la identificación de nuevas dianas terapéuticas para su tratamiento, entre las que se encuentran los distintos componentes del sistema cannabinoide endógeno. Esta Tesis Doctoral amplía la experiencia de este grupo centrándose en el estudio de la neuropatía autonómica cardiovascular inducida por antitumorales y situaciones de DM2, sus posibles consecuencias, y su tratamiento a través del sistema endocannabinoide.

## 1. ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A ANTITUMORALES.

Aunque el cáncer es una enfermedad cuya incidencia aumenta cada año, los datos aportados por la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) nos indican que las cifras de mortalidad asociada al cáncer van disminuyendo. De hecho, en el 2012 en España la incidencia del cáncer era de 215.534 casos (alrededor de 2/3 partes en pacientes  $\geq 65$  años), con una tasa estandarizada por edad de 215,5 casos por 100.000 habitantes al año. La predicción para 2015 es de 227.076 nuevos casos. Por otra parte, la tendencia de la mortalidad por cáncer en España ha ido disminuyendo desde los años 90, encontrándose en tasas similares a las de los países más desarrollados. El Informe de Salud 2013 sobre Indicadores de la OECD (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo) aporta datos sobre cambios en las tasas de mortalidad por cáncer entre 1990 y 2011, y en particular para España indica que se ha producido un descenso del 13% (SEOM, 2014). Esto es un reflejo de los avances, entre otros, en el diagnóstico precoz y el tratamiento de esta enfermedad.

La eficacia de los antineoplásicos ha contribuido, en gran medida, a la mencionada disminución de la mortalidad por cáncer y de hecho, han convertido muchos procesos cancerosos en enfermedades crónicas. Sin embargo, estos fármacos conllevan efectos secundarios que pueden limitar la dosis administrada, reducir la calidad de vida y, a veces, ser causa de la interrupción precoz del tratamiento (Stillman y cols., 2006; Markman, 2006; Windebank y cols., 2008). Se sabe además, que el tratamiento con antitumorales puede afectar de distinta manera a los diferentes tejidos. Es más, los distintos componentes celulares de los mismos podrían verse afectados de manera desigual, de ahí la dificultad de encontrar fármacos que protejan de todas las complicaciones que los antitumorales producen simultáneamente.

La neurotoxicidad es una de las complicaciones más frecuentes asociada a muchos de los antitumorales más utilizados (paclitaxel, cisplatino o vincristina, entre otros), y ésta produce una limitación importante en la calidad de vida de los pacientes (Stillman y cols., 2006; Markman, 2006; Windebank y cols., 2008).

La neurotoxicidad más frecuente es la sensorial, que se caracteriza por hiperalgecias, disestesias, parestesias en manos y pies, e incluso dolor neuropático severo (Borzan y cols., 2004).

Sin embargo, además de los cambios sensoriales, esta neurotoxicidad también puede afectar al sistema motor y al vegetativo, provocando alteraciones funcionales que pueden afectar a múltiples órganos y sistemas, entre los que se incluye **el sistema cardiovascular** (Pai y cols., 2000; Vera y cols., 2006b).

Hace algunos años, las complicaciones cardiovasculares de un paciente tratado con antitumorales eran un riesgo poco evidente, ya que la supervivencia de estos pacientes era muy reducida. Sin embargo, esta supervivencia ha aumentado de forma importante, por lo que en la actualidad el conocimiento, tratamiento y prevención de estas complicaciones suponen un nuevo reto en la terapéutica del cáncer (Force y cols., 2007; Schmidinger y cols., 2008; Sereno y cols., 2008; Yeh y cols., 2009), ya que son una importante causa de morbi-mortalidad en los supervivientes de cáncer. De hecho, recientemente se ha propuesto la necesidad de hacer prevención cardio-oncológica en todos los pacientes sometidos a quimioterapia (Albini y cols., 2010). La mayoría de los estudios demuestran que los pacientes tratados con antitumorales presentan un riesgo de padecer enfermedad cardiovascular dos veces superior al de la población general, especialmente y de forma preocupante en edades inferiores a los 45 años (Van den Belt-Dusebout y cols., 2006). Se sabe además, que las complicaciones cardiovasculares

dependen del propio antitumoral, de la dosis administrada en cada ciclo, de la dosis acumulada total, de la terapia combinada, o de la concurrencia de una patología cardiovascular previa, entre otros (Pai y cols., 2000).

Entre los **problemas cardiacos asociados con la quimioterapia** se encuentran: infarto de miocardio, angina de pecho, accidentes cerebrovasculares, arritmias, miocarditis, pericarditis o disfunción ventricular izquierda (Pai y cols., 2000; Viale y cols., 2008). Los mecanismos por los que los antitumorales producen cardiotoxicidad no están claramente definidos y pueden no ser los mismos en todos los casos. Se han propuesto dos grandes hipótesis: una es el efecto directo de los antitumorales, o sus metabolitos, en el tejido cardiaco y/o vascular, y la otra es el efecto indirecto por la neuropatía autonómica que producen (De Wit y cols., 1998).

Aunque es menos conocida, el tratamiento con antitumorales también se asocia con **toxicidad vascular**. Esta toxicidad ha sido poco estudiada en clínica y se dispone también de pocos datos a nivel experimental. Esta toxicidad vascular se manifiesta como disfunción endotelial, activación de la coagulación, estimulación de fibroblastos, hipertensión o trombosis (Lopez-Miranda y cols., 2010).

Por otra parte, cualquier grupo de antitumorales podría ocasionar problemas cardiovasculares a corto o largo plazo, porque aunque de algunos esta posibilidad se conozca, de otros muchos se desconoce (Albini y cols., 2010). Esta toxicidad se puede desarrollar de manera aguda, crónica o tardía (SEOM, 2014; Dolci y cols., 2008).

- La toxicidad aguda o subaguda se observa en cualquier momento desde el inicio de la terapia antitumoral hasta dos semanas después de su administración y consiste principalmente en taquicardias supraventriculares. Estos efectos son, por lo general, transitorios y ocurren en hasta un 40% de

los pacientes; no son dependientes de la dosis ni están relacionados con el desarrollo de miocardiopatía posterior. En algunos casos pueden evolucionar desarrollando un derrame pericárdico, pudiendo llegar al fallo cardiaco, aunque desaparecen al interrumpir el tratamiento.

- La toxicidad crónica puede aparecer después de la administración de la última dosis hasta 30 meses más tarde, con un pico a los 3 meses de su última administración. Es debida al desarrollo de una miocardiopatía degenerativa dependiente de la dosis y que puede culminar en un fallo cardiaco. Las manifestaciones clínicas son indistinguibles de otras formas de fallo cardiaco y consisten en taquicardia sinusal, taquipnea, disnea, cardiomegalia, edema periférico, edema pulmonar, hepatomegalia, congestión venosa o derrame pleural entre otras.
- La toxicidad tardía consiste en descompensaciones tardías de enfermos que se han recuperado de una cardiotoxicidad subaguda. Puede aparecer 6 a 20 años después del tratamiento. Pueden aparecer arritmias graves, incluyendo taquicardias y fibrilaciones ventriculares y bloqueos.

La toxicidad cardiaca más evaluada ha sido y sigue siendo la producida por las antraciclinas, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Hirano y cols., 1993; Platel y cols., 2000; Soga y cols., 2006; Shaker y cols., 2010; De Angelis y cols., 2010; Berdichevski y cols., 2010). Sin embargo, en los últimos años, se están publicando estudios que demuestran que esta cardiotoxicidad no es exclusiva de este grupo, sino que puede aparecer con otros grupos de antitumorales como compuestos de platino, taxanos, ciclofosfamida, bevacizumab o casiopeinas (Platel y cols., 2000; Drimal y cols., 2006; Al-Majed y cols., 2006; Sudharsan y cols., 2006; Hernández-Esquivel y cols., 2006).

En cuanto a la toxicidad vascular, solamente se han demostrado cambios dramáticos en la estructura del endotelio de la aorta de animales tratados con doxorubicina y paclitaxel, que además aumentan si el tratamiento se hace conjuntamente con ambos antitumorales (Wu y cols., 2002; Yamaç y cols., 2006).

Existen estrategias de monitorización y prevención de factores de riesgo para reducir los problemas cardiovasculares en los pacientes con cáncer tratados con quimioterapia (Chanan-Khan y cols., 2004). Así se recomienda la detección precoz de pacientes con riesgo de toxicidad, comunicar rápidamente la existencia de cualquier grado de disfunción cardíaca o la toma de medicación como diuréticos o antiarrítmicos o la realización de una ecocardiografía previa al tratamiento y al finalizarlo con el fin de detectar alteraciones en la contractilidad cardíaca y en su función, aunque el principal método de prevención es limitar la dosis total acumulada de los fármacos. En el caso del tratamiento con antraciclinas (ejemplo más claro de antitumorales cardiotóxicos), se administran conjuntamente agentes cardioprotectores, como Dexrazoxano, para proteger el miocardio del daño ocasionado por estos fármacos. Sin embargo, no se dispone de datos que avalen un protocolo definido para el tratamiento y prevención de la cardiotoxicidad ocasionada por otros grupos de antitumorales (SEOM, 2014; Schlitt y cols., 2014).

### 2. ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA DIABETES MELLITUS

#### TIPO 2.

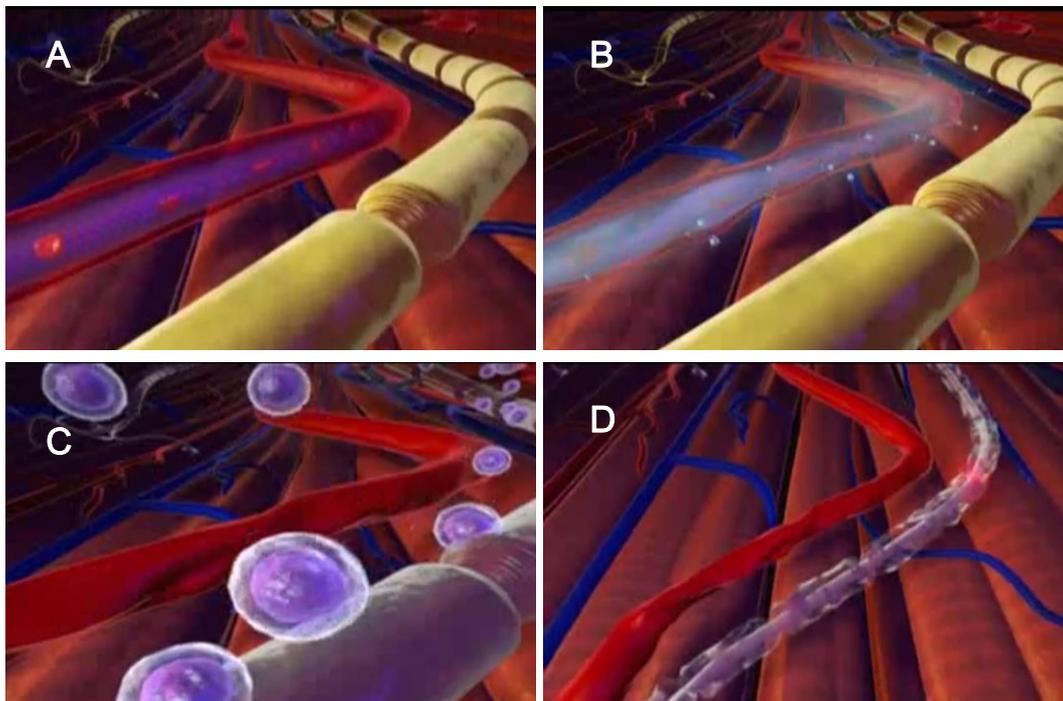
La Diabetes Mellitus de tipo 2 (DM2), también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta, es debida a que el organismo no utiliza eficazmente la insulina que sintetiza (insulinorresistencia). Es la forma más común de DM; aproximadamente el 90% de los diabéticos del mundo padecen DM2, y suele ir asociada a otros factores como obesidad abdominal, hipertensión, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, o disminución del colesterol tipo HDL (*High Density Lipoprotein*). La presencia de, al menos, tres de estos factores en un mismo paciente indica que la persona, además, padece el llamado Síndrome Metabólico (SM) (Fisher, 2009a; IDF, 2014).

La causa de la DM2-SM no se conoce bien; pudiendo ser consecuencia del sobrepeso, de la falta de actividad física, o incluso, de una predisposición genética (Groop y cols., 2001; DeFerranti y cols., 2004).

La DM2 además, suele diagnosticarse tras varios años de evolución y cuando ya han aparecido complicaciones como enfermedad cardiovascular, nefropatía diabética, enfermedad vascular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, además de otras posibles complicaciones que pueden causar la aparición de problemas crónicos y provocar una muerte prematura. En los pacientes con DM2, el riesgo de muerte es mayor que en las personas sin DM2 (Haffner, 1998; Harjai, 2003).

La neuropatía diabética sensorial es una de las complicaciones más frecuentes y que más deterioran la calidad de vida en los pacientes con DM2 (Aring y cols., 2005). Esta neuropatía es debida a la lesión de los pequeños vasos sanguíneos que irrigan los

nervios, y en consecuencia, éstos se ven dañados. En la Figura 1 se muestra la progresión del daño nervioso asociado a la DM2.



**Figura 1:** Imagen que ilustra la progresión del daño nervioso en la DM2. Modificado de Espert, 2010.

- A- Las enfermedades vasculares y de los nervios están estrechamente relacionadas; los vasos sanguíneos dependen del funcionamiento normal de los nervios, y estos a su vez dependen del adecuado flujo sanguíneo.
- B- La disfunción microvascular ocurre tempranamente en la DM2, paralelamente a la disfunción neuronal. Conforme la enfermedad progresa, la disfunción neuronal se correlaciona con el avance de las anomalías vasculares. El primer cambio patológico en la microvasculatura es la vasoconstricción, lo que contribuye a la disminución de la tensión de oxígeno y a la hipoxia. La isquemia neuronal es una característica bien establecida de la neuropatía diabética. Además, en presencia de un exceso de glucosa, el metabolismo de ésta se ve alterado por saturación enzimática. Como resultado, la glucosa es metabolizada en sorbitol y existe un aumento importante de la producción de especies reactivas de oxígeno.
- C- Las complejas interacciones metabólicas, vasculares, neurotróficas y autoinmunitarias que se derivan de todo lo anterior, generan inflamación, mal funcionamiento y, finalmente, daño permanente de las fibras nerviosas periféricas.
- D- El daño en las fibras nerviosas condiciona la pérdida del recubrimiento de las fibras nerviosas: la vaina de mielina. La pérdida de esta vaina protectora supone un retardo en la capacidad de transmisión de los nervios.

La neuropatía diabética sensorial puede llegar a aparecer en un 50% de los pacientes. Aunque puede ocasionar problemas muy diversos, los síntomas frecuentes consisten en: hormigueo, dolor, entumecimiento o debilidad en los pies y las manos.

La neuropatía asociada a la DM también puede afectar al sistema motor y al vegetativo, lo que origina alteraciones en múltiples órganos y sistemas, entre otros, el sistema cardiovascular, provocando **alteraciones tanto cardíacas como vasculares** (Fisher, 2009b).

Entre las patologías cardiovasculares más asociadas a situaciones de DM2 podemos destacar:

- Hipertensión arterial.

En pacientes con DM2, la hipertensión es muy común, hasta 2-3 veces más que en la población general. Los factores de riesgo que confluyen en el SM, entre ellos la hipertensión arterial, incrementan la mortalidad cardiovascular (Waine, 2005). Existen varias posibles explicaciones para la asociación entre hipertensión y resistencia a la insulina (Bełtowski, 2006; Fisher, 2009c):

- Estimulación de la retención de sodio y agua en los túbulos distales renales por parte de la insulina.
- Incremento de la contractilidad y resistencia vascular.
- Aumento en la estimulación simpática.
- Proliferación del músculo liso vascular.
- Alteración de la vasodilatación mediada por insulina.

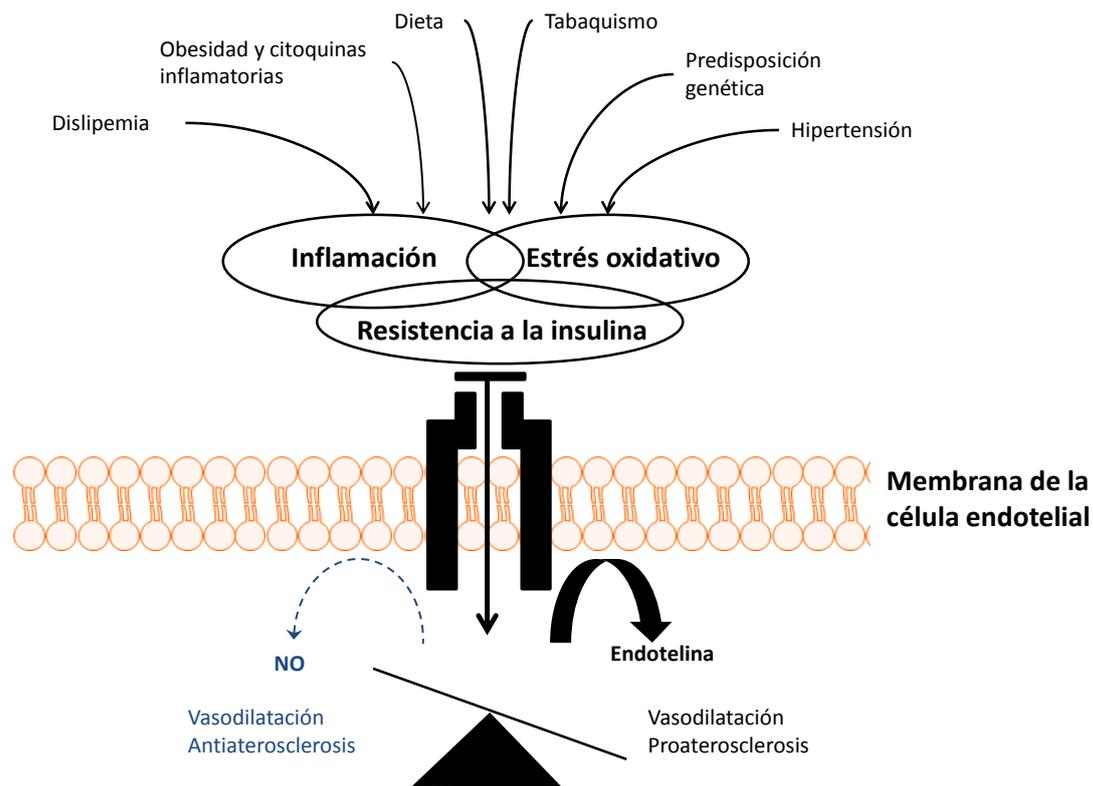
La hipertensión no tratada en pacientes con DM2 aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular (infarto de miocardio, infarto cerebral, insuficiencia cardíaca congestiva) y enfermedad microvascular (retinopatía, nefropatía). La

reducción de la presión arterial en los pacientes diabéticos reduce este riesgo. Los tratamientos agresivos para la hipertensión en pacientes con DM2 reducen las complicaciones microvasculares, los infartos cerebrales, los infartos de miocardio y la mortalidad total (Fisher, 2009c).

- Arteriosclerosis y enfermedad coronaria.

El riesgo de muerte por enfermedad coronaria es de dos a tres veces mayor en pacientes con DM2 con respecto a la población no diabética. El aumento en el riesgo cardiovascular atribuible a la DM2 es sólo explicable en parte por los factores de riesgo concomitantes (hipertensión, obesidad, dislipemia). Esto sugiere que los componentes fenotípicos de la DM2, incluyendo la hiperglucemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo, dislipemia, inflamación y alteraciones de la coagulación estén implicadas en el aumento en el riesgo de enfermedad coronaria y el incremento en la mortalidad (Rajwani y cols., 2009).

Las placas de ateroma se desarrollan a través de complicados procesos que resultan de disfunción endotelial, adhesión e infiltración de células inflamatorias, depósitos de lípidos, proliferación del músculo liso vascular y cambios en la matriz celular (Rajwani y cols., 2009) (Figura 2).



**Figura 2:** Factores que inducen disfunción endotelial en la DM2. La disfunción endotelial modifica el balance entre la producción de moléculas como el óxido nítrico (NO) y la endotelina, favoreciendo el desarrollo de aterosclerosis. Modificado de Rajwani y cols., 2009.

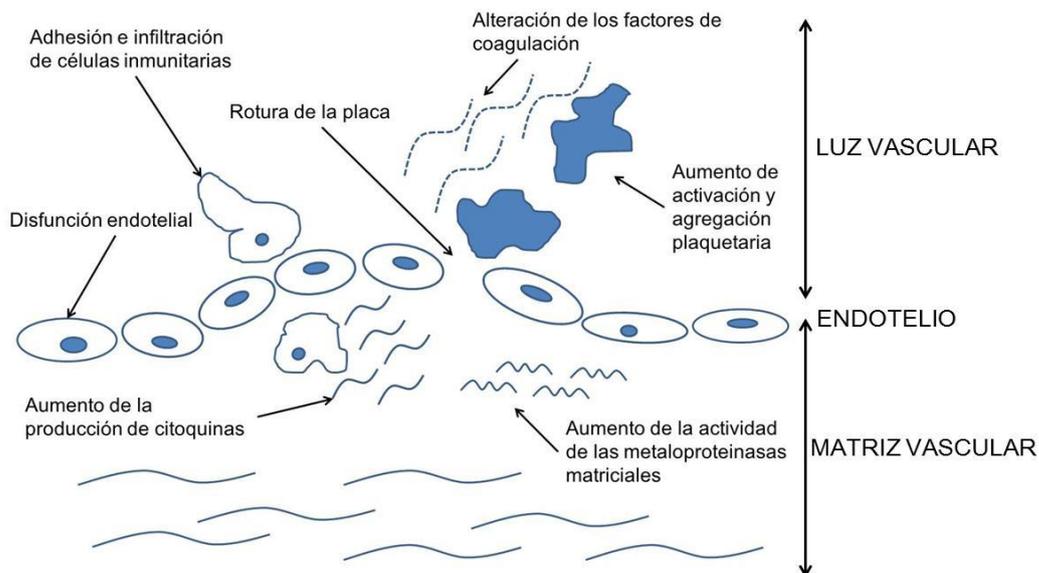
La disfunción endotelial es un factor clave en la formación de la placa y su progresión y está estrechamente relacionada con la resistencia a la insulina pudiendo preceder al desarrollo de DM2. La hiperglucemia contribuye a la aterosclerosis por múltiples mecanismos que incluyen la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Un aumento en la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales y la producción de sustancias proinflamatorias favorecen la infiltración de macrófagos y otras células inflamatorias. La DM2 está también asociada con la proliferación de las células musculares lisas vasculares. La

apoptosis de las células inflamatorias y las células de musculatura lisa contribuyen a la formación de un núcleo necrótico (Rajwani y cols., 2009).

Así, los individuos con DM2 tienen progresiones más rápidas y severas de la enfermedad coronaria, con mayor afectación de los vasos y de la arteria coronaria principal izquierda. Además, de forma frecuente, en los pacientes con DM2, la enfermedad coronaria no se acompaña de la sintomatología típica. La prevalencia de isquemia silente es mucho mayor en estos pacientes que en la población general. Este hecho está asociado con la disfunción autonómica y con la diferente sensibilidad al dolor que se encuentra en estas personas (Rajwani y cols., 2009).

- Síndromes coronarios agudos

El síndrome coronario agudo puede surgir como consecuencia de un proceso aterotrombótico, generalmente iniciado por una ruptura espontánea de una placa de ateroma coronaria. La exposición de los componentes de la placa a la sangre circulante favorece la agregación plaquetaria y la formación de trombos. La isquemia miocárdica resulta, por lo tanto, de la oclusión de un vaso por parte de un trombo (Kahn y cols., 2009). Los factores predisponentes a la ruptura de la placa se encuentran ilustrados en la Figura 3.



**Figura 3:** Factores que favorecen la aterosclerosis y la ruptura de la placa en individuos con DM2. Modificado de Kahn y cols., 2009.

La resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la hiperglucemia están asociados con disfunción endotelial, que es una pieza clave para el desarrollo y progresión de la aterosclerosis (Rajwani y cols., 2009). Además, la presencia de DM2 está ligada a un incremento de la inflamación vascular, caracterizada por una infiltración linfocítica mayor, un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias y una regulación al alza de las metaloproteinasas de la matriz (enzimas que degradan la matriz extracelular), lo que predispone a la ruptura de la placa. A esto se suma el estado protrombótico existente en la DM2 (Kahn y cols., 2009).

La DM2 aumenta el riesgo de complicaciones consecuencia del síndrome coronario agudo, como disfunción ventricular izquierda, fallo cardíaco, isquemia miocárdica recurrente, arritmias, infarto cerebral y la muerte (Kahn y cols., 2009).

- Insuficiencia cardiaca crónica

El fallo cardiaco es la incapacidad del corazón para bombear suficiente sangre oxigenada a los tejidos. El fallo cardiaco crónico puede ser causado por diferentes tipos de disfunción cardiaca, y lo más común es atribuirlo a la disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, aunque puede también ocurrir con una función sistólica correcta, por lo que se atribuiría a disfunción diastólica (Fisher, 2009d).

Existen múltiples factores de riesgo para el desarrollo de fallo cardiaco en personas con DM2 (edad, tiempo de evolución de la DM2, uso de insulina, índice de masa corporal elevado, hipertensión, enfermedad coronaria previa, retinopatía, proteinuria/presencia de albúmina en la orina, enfermedad renal...) y los más importantes de todos ellos son la hipertensión y enfermedad coronaria previa. Los pacientes diabéticos con fallo cardiaco crónico presentan una mayor tasa de muerte y hospitalización que pacientes no diabéticos (Fisher, 2009d).

La cardiomiopatía diabética puede alterar el vaciado sistólico o el llenado diastólico del ventrículo izquierdo y puede contribuir, junto con la enfermedad coronaria, a la alta prevalencia de fallo cardiaco en personas con DM2. Existen múltiples factores que pueden contribuir a la cardiomiopatía, incluyendo cambios bioquímicos y patológicos en el miocardio y los vasos (Fisher, 2009d).

- Otras enfermedades vasculares.

a) Infartos cerebrales y ataques isquémicos transitorios.

La DM2 aumenta la formación de la placa de ateroma en arterias y arteriolas de cualquier calibre en la circulación cerebral. Al igual que en la circulación coronaria, en la circulación cerebral también se producen cambios (deposición de lípidos, proliferación endotelial etc.) que causan la oclusión de los

vasos, aumentando el riesgo de infarto. La hiperglucemia puede afectar a la respuesta al infarto, reduciendo las probabilidades de un buen resultado clínico y aumentando el riesgo de hemorragia intracraneal (Fisher, 2009e).

### b) Enfermedad arterial periférica.

Es una causa común de morbilidad en pacientes con DM2 y contribuye a los problemas del pie diabético. Los factores de riesgo para la enfermedad arterial periférica en DM2 son la edad, el aumento de la presión arterial, niveles bajos de HDL, tabaquismo, otras enfermedades cardiovasculares, retinopatía, neuropatía sensorial, un pobre control de la glucemia y la edad. Los factores de riesgo para la amputación en la DM2 son: pobre control de la glucemia, la edad, el tabaquismo o la etnia a la que el paciente pertenece (especialmente la negra) (Fisher, 2009e).

### c) Disfunción eréctil.

Está estrechamente asociada con la enfermedad cardiovascular. La asociación entre DM2 y disfunción eréctil está bien establecida, es tres veces más común en hombres con DM2, y al menos la mitad de los hombres diabéticos padecerán disfunción eréctil en algún momento. La etiología es multifactorial e incluye disfunción endotelial y de la musculatura lisa y neuropatía autonómica. En hombres diabéticos, la disfunción eréctil puede estar asociada con enfermedad coronaria o isquemia miocárdica silente (Fisher, 2009e).

### d) Enfermedad vascular renal.

La estenosis de la arteria renal es muy común sobre todo en DM2 y contribuye a la insuficiencia renal y la hipertensión (Fisher, 2009e).

### e) Otros.

El ateroma afecta otros lechos vasculares, como al tracto gastrointestinal, que también parece estar más afectado en pacientes con DM2 y puede ser de difícil diagnóstico (Fisher, 2009e).

La afectación de arterias perinerviosas hace que los pacientes afectados no perciban el dolor, lo que puede derivar en una atención médica tardía ante, por ejemplo, un infarto (Fisher, 2009b).

### 3 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN NEUROPATÍAS

En ciertas patologías, entre las que se encuentran las neuropatías autonómicas causadas por antitumorales o por alteraciones metabólicas, el sistema endocannabinoide se sobreexpresa o se hipersensibiliza, de manera que en este tipo de patologías los cannabinoides podrían ser una herramienta terapéutica útil (Cable y cols., 2014).

Además, se ha demostrado el efecto beneficioso de los cannabinoides en neuropatías periféricas sensoriales tanto inducidas por antineoplásicos como en animales diabéticos y su posible papel modulador en el dolor neuropático (Rukwied y cols., 2003). Este hecho, justifica el interés en el estudio de su posible utilidad terapéutica en el desarrollo de complicaciones autonómicas cardiovasculares derivadas de estas neuropatías por antitumorales y/o situaciones de hiperglucemia.

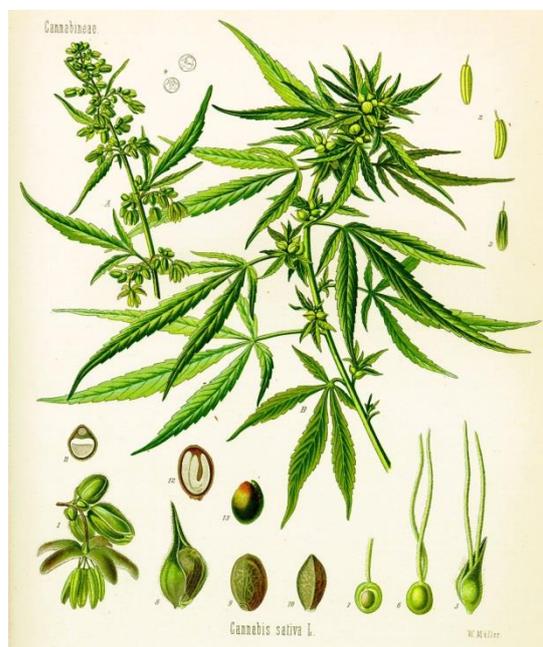
En la segunda parte de la Introducción de esta Tesis Doctoral se desarrollará brevemente la Farmacología de los cannabinoides, haciendo particular hincapié en los aspectos más relacionados con los efectos a nivel cardiovascular de estos compuestos que podrían tener relevancia en los objetivos de esta Tesis Doctoral.

## 4 CANNABINOIDES

### *Cannabis sativa*

Bautizada por Carl Linneo en 1735 como *Cannabis sativa*, la planta del cáñamo es posiblemente una de las primeras plantas cultivadas por el hombre.

Se trata de una planta herbácea, anual y dioica – las flores masculinas y femeninas se desarrollan en individuos diferentes - originaria de Asia, específicamente de las cordilleras del Himalaya (Figura 4).



**Figura 4:** Ilustración de la planta de *Cannabis sativa* realizada por Hermann Adolf Köhler, 1887

Ha sido utilizada por el ser humano desde la antigüedad para múltiples y variados usos que van desde la utilización de sus fibras para fabricar telas, lienzos, cuerdas o esteras, pasando por su uso en la gastronomía y también con fines rituales y medicinales (Iversen, 2000).

En la planta *C. sativa* se han identificado más de 400 compuestos químicos diferentes, de los cuales unos 60 presentan una estructura química similar y pertenecen al grupo de los cannabinoides (Dewey, 1986). Los principales cannabinoides presentes en la planta son el D<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol (D<sup>9</sup>-THC), el D<sup>8</sup>-tetrahidrocannabinol (D<sup>8</sup>-THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN). Otros cannabinoides presentes en la planta aparecen en cantidades variables según la variedad de *Cannabis*. Es el caso del cannabicromeno (CBC), cannabicitrol (CBL), cannabigerol (CBG), monometiléter del cannabigerol (CBGM), cannabielsoina (CBE) y cannabiodiol (CBND), cannabitriol (CBT), entre otros.

En 1964, el grupo de los investigadores Raphael Mechoulam y Yechiel Gaoni aisló el principal compuesto psicoactivo del cannabis; el D<sup>9</sup>-THC (Gaoni y cols., 1964).

El descubrimiento del D<sup>9</sup>-THC llevó a la búsqueda de posibles mecanismos de acción o la determinación de las zonas del sistema nervioso en las que actuaba. Ello supuso un gran avance en la investigación científica de las propiedades biológicas y médicas del cannabis sirviendo como punto de partida para el desarrollo de derivados con posible capacidad terapéutica, en los que se trata de separar las propiedades farmacológicas de los efectos psicoactivos.

Esta búsqueda de los mecanismos de acción de los cannabinoides, llevó a identificar el sistema cannabinoide endógeno (Seltzman, 1999; Devane y cols., 1992).

## 4.1 SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

De este sistema forman parte **receptores cannabinoides**, **ligandos endógenos** (**endocannabinoides**), así como toda la maquinaria necesaria para la **síntesis y degradación de dichos endocannabinoides**.

### 4.1.1 Receptores cannabinoides

Hasta el momento se han identificado y clonado dos tipos de receptores para cannabinoides: los receptores CB1 (*cannabinoid binding 1*) – clonado en tejido nervioso, aunque también está presente en numerosos tejidos periféricos, entre ellos el corazón y los vasos (Matsuda y cols., 1990; Devane y cols., 1988; Gebremedhin y cols., 1999; Liu y cols., 2000; Bonz y cols., 2003) - y CB2 (*cannabinoid binding 2*) – clonado en células de sistema inmunológico (Munro y cols., 1993).

Estos receptores se diferencian principalmente en la secuencia de aminoácidos, en la distribución en los diferentes tejidos y en los mecanismos efectores acoplados a ellos.

Ambos son receptores acoplados a proteínas G inhibitoras ( $G_{i/o}$ ), que se caracterizan por tener un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular y siete dominios transmembrana.

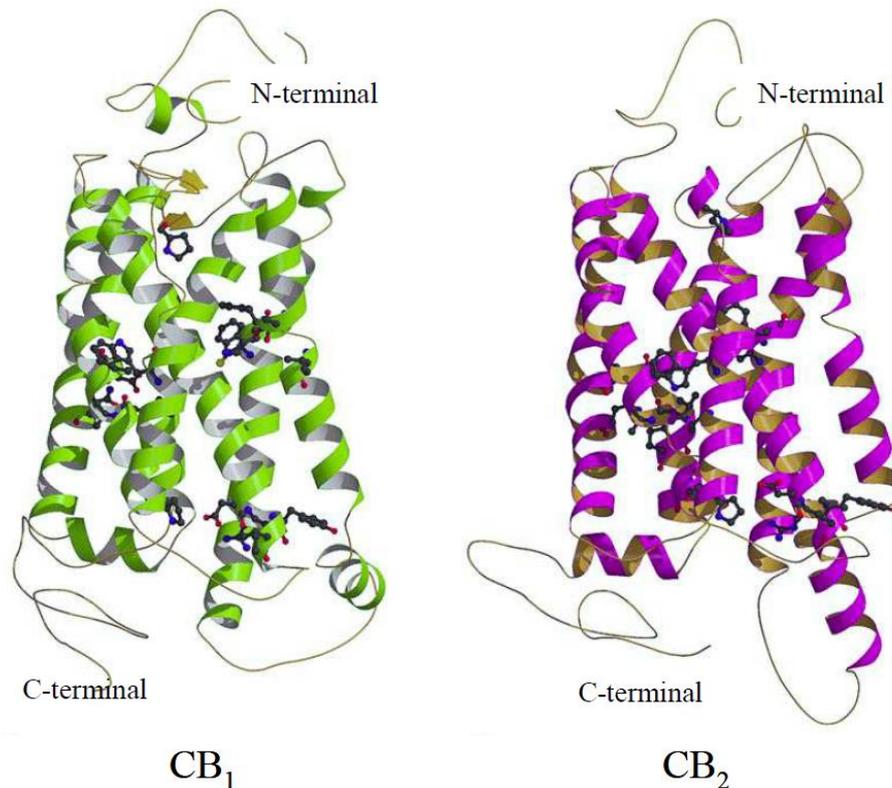
- El **receptor CB1** media, entre otros, los efectos psicotrópicos de los cannabinoides (Ledent y cols., 1999). Este receptor se encuentra localizado principalmente en SNC (Herkenham y cols., 1991a; Herkenham y cols., 1991b). El receptor CB1 se expresa abundantemente en regiones del SNC responsables del movimiento (ganglios basales, cerebelo), del procesamiento de la memoria (hipocampo, corteza cerebral) y de la modulación del dolor (medula espinal y sustancia gris

periacueductal (Pertwee, 1997; Tsou y cols., 1997; Hampson y cols., 1999; Ong y cols., 1999).

Además, los receptores CB1 también se encuentran localizados en tejidos periféricos. Se ha descrito su presencia en bazo, corazón, pulmón, endotelio vascular, músculo liso y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal (Galiègue y cols., 1995; Pertwee, 1999; Howlett y cols., 2002), además de en terminaciones nerviosas centrales y periféricas (Pertwee, 1997; Tsou y cols., 1997; Ong y cols., 1999). En la Figura 5 se encuentra representada la estructura tridimensional del receptor CB1.

- El **receptor CB2** media fundamentalmente los efectos inmunomoduladores de los cannabinoides. Se localiza fundamentalmente a nivel periférico; encontrándose en bazo, amígdalas y en diferentes células del sistema inmune (Galiègue y cols., 1995; Pertwee, 1997; Pertwee, 1998). Posteriormente se identificó su presencia en otros tejidos como corazón y células endoteliales Joyeux y cols., 2002; Bouchard y cols., 2003; Zoratti y cols., 2003).

Aunque su localización es principalmente periférica, existen evidencias de la presencia de receptores CB2 a nivel central, concretamente en la microglía y en áreas centrales relacionadas con el vómito (Carlisle y cols., 2002; Walter y cols., 2003; Van Sickle y cols., 2005). En la Figura 5 se encuentra representada la estructura tridimensional del receptor CB2.



**Figura5:** Representación tridimensional de la estructura de los receptores cannabinoides CB1y CB2. Modificado de Montero y cols., 2005.

Debido a que algunos efectos producidos por los cannabinoides no responden a la activación de estos receptores cannabinoides clásicos (CB1 y CB2), se ha propuesto la existencia de otros receptores cannabinoides no clonados hasta ahora.

Se han propuesto al menos dos nuevos posibles receptores cannabinoides: el receptor “CB2-like” y el receptor “No-CB1/No-CB2”. Estos nuevos receptores podrían estar implicados en la modulación de la transmisión sináptica (Di Marzo y cols., 2000; Breivogel y cols., 2001; Hoffman y cols., 2005), en el funcionamiento del sistema cardiovascular (Jarai y cols., 1999; Offertaler y cols., 2003; Begg y cols., 2005) y en la regulación del sistema inmune (Jaggar y cols., 1998).

- El receptor “CB2-like” se ha propuesto como un nuevo receptor cannabinoide que tendría cierta homología con el receptor clásico CB2, ya que los

efectos antinociceptivos del cannabinoide palmitoiletanolamida (PEA), que no tiene afinidad por los receptores clásicos CB1 y CB2, son bloqueados por un antagonista selectivo del receptor CB2 (Calignano y cols., 1998).

- El receptor “No-CB1/No-CB2” se ha propuesto como el responsable de ciertos efectos de los endocannabinoides en tejido neuronal, vascular e inmune. En este caso, estos efectos sólo se inhiben parcialmente en presencia de altas concentraciones de antagonistas selectivos para el receptor CB1 (Mackie y cols., 2006). Hasta el momento este receptor cannabinoide no ha sido clonado y solo ha sido caracterizado funcionalmente (López-Miranda y cols., 2008).

Se sabe también que los cannabinoides son capaces de interactuar con otros tipos de receptores diferentes a los cannabinoides, como los receptores vanilloides de tipo 1 (TRPV1) (Zygmunt y cols., 1999) o el receptor acoplado a proteína G55 (GPR55) (Ryberg y cols., 2007).

El receptor vanilloide TRPV1 participa en la vasorrelajación ocasionada por algunos agonistas cannabinoides, como el Win 55,212-2 (Zygmunt y cols., 1999; Dannert y cols., 2007).

El GPR55 es una clase de receptor huérfano de los receptores acoplados a proteínas G, del que ha sido detectado mRNA en diferentes regiones del SNC y en tejido periférico como intestino y bazo (Baker y cols., 2006; Pertwee, 2007).

### **4.1.2 Mecanismos de transducción**

En general, la unión de los cannabinoides a sus receptores activa las proteínas G inhibitorias ( $G_{i/o}$ ). Esto desencadena una cascada de segundos mensajeros que

regulan la actividad de la adenilato ciclasa, fosfolipasa C, canales y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Offertaler y cols., 2003).

Los mecanismos de transducción acoplados a los receptores cannabinoides son complejos y van a depender en ocasiones del sistema estudiado.

#### Mecanismos de transducción acoplados a la activación de CB1

Los mecanismos de transducción acoplados a la estimulación con agonistas del receptor CB1 se encuentran representados en la Figura 6.

- La estimulación con agonistas del receptor CB1 produce la inhibición de la **adenilato ciclasa** a través de la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_{i/o}$ , lo que hace disminuir los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Esto, a su vez, reduce la actividad de la proteína quinasa A (PKA) (Howlett y cols., 2002). El resultado final es un aumento de la salida de potasio ( $K^+$ ) de la célula que ocasiona la hiperpolarización de ésta y la disminución de la liberación de neurotransmisores de las terminaciones presinápticas (Pertwee, 1997; Howlett y cols., 2002). Finalmente, la activación de quinasas lleva a la fosforilación de diversas proteínas, incluyendo canales iónicos, proteínas de vesículas sinápticas, proteínas que regulan la transcripción génica y enzimas.

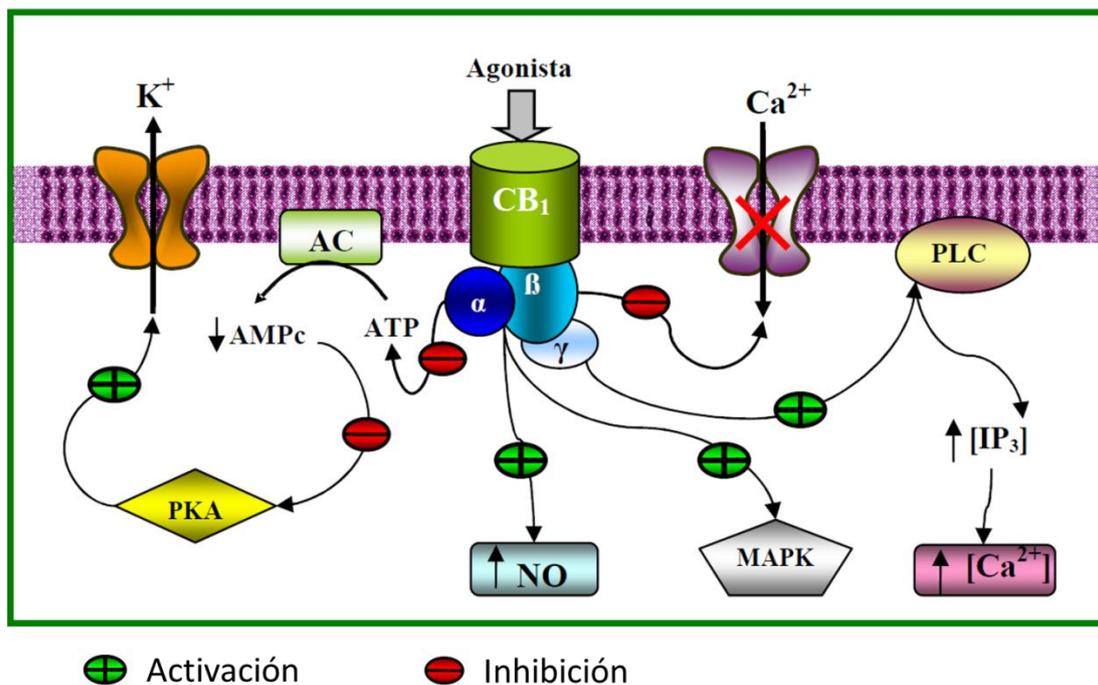
- La estimulación CB1 también pueden regular a otros sistemas efectores como la **fosfolipasa C**. A través de la proteína  $G_{i/o}$ , los cannabinoides activan la fosfolipasa C. Esta enzima hidroliza el fosfatidil inositol produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El aumento de estos segundos mensajeros ocasiona un incremento de la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular (Netzeband y cols., 1999; Howlett y cols., 2000).

- El receptor CB1 también puede estar acoplado a **canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje** produciéndose, como consecuencia de la unión de los

cannabinoides, una inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. Esto conlleva a una disminución de la liberación de neurotransmisores en las neuronas presinápticas. Esta misma inhibición, en la musculatura lisa arterial, ocasiona vasodilatación (Howlett y cols., 2000; Mackie y cols., 1992; Twitchell y cols., 1997).

- La estimulación del receptor CB1 puede actuar también sobre las **MAPK** (proteína quinasas activadas por mitógenos). Este mecanismo está involucrado en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación celular (Bouaboula y cols., 1995), en procesos de supervivencia o muerte celular (Guzmán y cols., 2001) y, en mecanismos de expresión génica (Demuth y cols., 2006).

- La activación del receptor cannabinoide CB1 también ocasiona la activación de la enzima **óxido nítrico sintasa (NOS)**, provocando así un aumento de la producción de óxido nítrico (NO). Este mecanismo es el que podría explicar el efecto vasodilatador de los cannabinoides (Fimiani y cols., 1999; Stefano, 2000).



**Figura 6:** Esquema de los principales mecanismos de transducción acoplados a la estimulación del receptor cannabinoide CB1. El estímulo de los receptores CB1 por un agonista cannabinoide activa a la proteína Gi/o y ocasiona la activación/inhibición de diferentes sistemas efectores.

- Activación de: la enzima fosfolipasa C (PLC), las proteínas quinasas activadas por nitrógenos (MAPK) y la producción de óxido nítrico (NO) mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).
  - Inhibición de: adenilato ciclasa (AC) y los canales de calcio (Ca<sup>2+</sup>) dependientes de voltaje.
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico; ATP: Adenosín trifosfato; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; K<sup>+</sup>: potasio; PKA: proteína quinasa A.

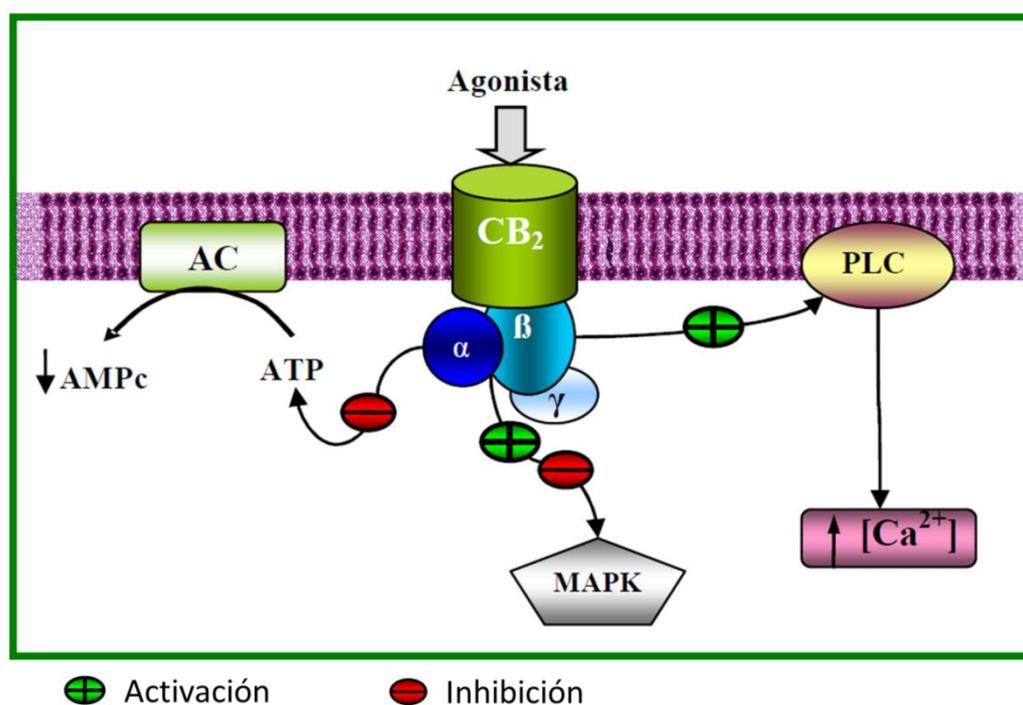
#### Mecanismos de transducción acoplados a la activación de CB2.

Los mecanismos de transducción acoplados al receptor cannabinoide CB2 son menos conocidos. De forma similar a CB1, el receptor cannabinoide CB2 a través de las proteínas G<sub>i/o</sub>, puede modular la actividad de adenilato ciclasa y MAPK (Felder y cols., 1995; Kobayashi y cols., 2001) (Figura 7).

De nuevo, la activación de los receptores CB2, mediante la inhibición de la **adenilato ciclasa** disminuye los niveles de AMPc, lo que provoca también la regulación

de la cascada de las **MAPK**. Este mecanismo parece estar implicado en la regulación que ejercen los cannabinoides sobre el sistema inmune (Bouaboula y cols., 1996; Kaminski, 1996; Faubert Kaplan y cols., 2003).

El receptor CB2 puede también modular la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de ciertos tipos de células, como las endoteliales (Zoratti y cols., 2003) a través de la activación de la fosfolipasa C, pero a diferencia del receptor CB1, el receptor CB2 no participa en la regulación de la funcionalidad de canales iónicos (Felder y cols., 1995).



**Figura7:** Esquema de los principales mecanismos de transducción acoplados a la estimulación del receptor cannabinoide CB2. El estímulo de los receptores CB2 por un agonista cannabinoide activa a la proteína Gi/o y ocasiona la activación/inhibición de diferentes sistemas efectores.

- Activación/inhibición de las proteínas quinadas activadas por mitógenos (MAPK),
- Inhibición de: adenilato ciclasa (AC) y movilización de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular por activación de la enzima fosfolipasa (PLC).

AMPc: adenosín monofosfato cíclico; ATP: Adenosín trifosfato.

#### 4.1.3 Ligandos endógenos: Endocannabinoides

El descubrimiento de la existencia de receptores cannabinoides supuso el comienzo de la búsqueda de ligandos endógenos de estos receptores, a los que se denomina endocannabinoides.

Se sabe que los ligandos endógenos de los receptores cannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, que provienen de la degradación de fosfolípidos de membrana (Piomelli, 2003).

En 1992, Devane y sus colaboradores identificaron la etanolamida del ácido araquidónico en cerebros de cerdo como el ligando con mayor afinidad por este receptor (Devane y cols., 1992). Este agonista, es más conocido como **anandamida** (del Sánscrito “a-nanda” que significa bienestar interior, alegría, felicidad suprema). Se han detectado importantes niveles de anandamida en hipocampo, estriado y cerebelo, áreas del cerebro que corresponden con una mayor densidad de receptores CB1 (Felder y cols., 1996; Bisogno y cols., 1999). También se ha detectado, aunque en menor proporción, en tejidos periféricos como corazón, bazo, hígado y riñón (Sugiura y cols., 2002). Este endocannabinoide se une a los dos receptores cannabinoides clásicos, CB1 y CB2 (Felder y cols., 1995) comportándose como un agonista. Además de a los receptores clásicos, también se une al receptor vanilloide TRPV1 (Zygmunt y cols., 1999). Posteriormente se aisló un segundo derivado natural del ácido araquidónico, el 2-araquidonilglicerol (**2-AG**), que también se une a los receptores cannabinoides CB1 y CB2, aunque presenta una mayor afinidad por el receptor CB2 (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995). El 2-AG fue detectado inicialmente en tejidos periféricos como intestino, bazo y páncreas, áreas donde predomina la expresión de receptores CB2 (Mechoulam y cols., 1995). Más tarde se localizó también en regiones del SNC

como corteza, estriado, hipocampo, médula, etc. (Bisogno y cols., 1999). También se ha localizado este endocannabinoide en otros tejidos periféricos como corazón, hígado y riñón (Sugiura y cols., 2002). Este endocannabinoide se comporta como agonista al unirse a los dos receptores cannabinoides clásicos CB1 y CB2 (Gonsiorek y cols., 2000; Pertwee y cols., 2002).

Otros ligandos endógenos son: 2-araquidonil-gliceril-éter (**noladin éter**, 2-AGE) (Hanus y cols., 2001), O-araquidonil-etanolamina (**virodamina**) (Porter y cols., 2002), N-araquidonil-dopamina (**NADA**) (Huang y cols., 2002) y palmitoiletanolamida (**PEA**) (Sugiura y cols., 2002) entre otros. El noladin éteres un agonista de los receptores CB1 y CB2 (Shoemaker y cols., 2005). En cuanto a la virodamina, estudios *in vitro* sugieren que se comporta como un agonista parcial/antagonista de los receptores CB1, y agonista puro de los receptores CB2 (Porter y cols., 2002). Este cannabinoide endógeno se ha detectado tanto en SNC como en sistema periférico. La NADA es el primer compuesto endógeno identificado en mamíferos que muestra afinidad por el receptor TRPV1, además de activar los receptores CB1. La NADA predomina principalmente en dos regiones del cerebro: estriado e hipocampo (Huang y cols., 2001). La PEA podría ser un nuevo endocannabinoide que actuaría a través de un nuevo receptor cannabinoide diferente a CB1 y CB2 (Mackie y cols., 2006) y se ha relacionado con el sistema inmune (Facci y cols., 1995), con procesos de neuroprotección (Skaper y cols., 1996) y con el sistema nociceptivo (Calignano y cols., 1998).

#### 4.1.4 Síntesis, Liberación y Degradación

Los endocannabinoides son sintetizados y liberados por las neuronas, se unen y activan receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior celular, al igual que todo neurotransmisor.

Los endocannabinoides se sintetizan a partir de la N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina, presente en la membrana celular (Di Marzo y cols., 1994; Sugiura y cols., 2002). La síntesis de la anandamida y del 2-AG es modulada por las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$ ; la entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula estimula la síntesis de estos cannabinoides. En el caso de la anandamida, por acción de la enzima fosfolipasa D (Di Marzo y cols., 1994), y para la síntesis del 2-AG, por la actuación de una diacilglicerol lipasa (Bisogno y cols., 2005).

A diferencia de otros neurotransmisores, los endocannabinoides no se almacenan en vesículas sinápticas, sino que se sintetizan a demanda, y se liberan directamente de la membrana celular. Distintos trabajos apuntan a que la liberación de anandamida se produce por difusión facilitada a favor de gradiente (Hillard y cols., 1997). Una vez liberada, los niveles presentes en los tejidos y su acción están limitados por la recaptación de la anandamida al interior de la célula, y su posterior degradación enzimática (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005).

Numerosos trabajos indican que la anandamida es recaptada por medio de un transportador de membrana (Beltramo y cols., 1997). Sin embargo, esta teoría no es aceptada de forma unánime, debido a que este transportador no ha sido caracterizado molecularmente, y algunos autores defienden que la anandamida, dada su alta liposolubilidad, es capaz de difundir a través de la membrana celular a favor de gradiente (Glaser y cols., 2003). Una vez en el interior celular, la anandamida es

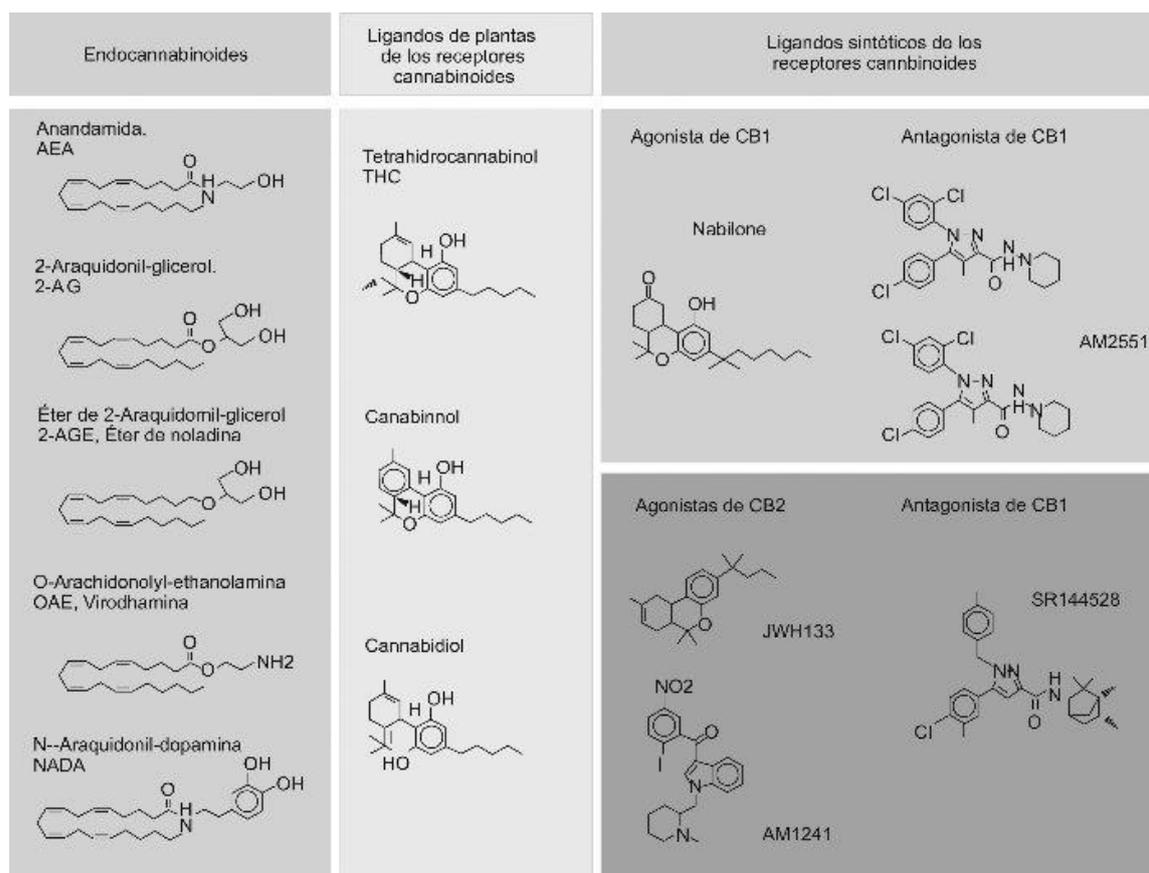
hidrolizada por la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina (Cravatt y cols., 1996; Di Marzo y cols., 1998). Los productos de degradación son reincorporados a los fosfolípidos de la membrana.

En cuanto al 2-AG también es degradado en el interior celular. No está claro su mecanismo de recaptación, se propone que pueda ser recaptado por el transportador de la anandamida (Piomelli y cols., 1999), pero otros autores sugieren que la recaptación se da gracias a un transportador específico para el 2-AG (Hajos y cols., 2004). Una vez en el interior celular, el 2-AG puede ser degradado, tanto por la FAAH como por una monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Ueda, 2002; Vandevorde y cols., 2005). La degradación mediante la MAGL sería su principal vía de degradación, que lo convertiría en ácido araquidónico y glicerol (Goparaju y cols., 1999).

### **4.2 LIGANDOS CANNABINOIDES**

Los ligandos cannabinoides son compuestos con estructuras químicas muy variadas, donde se incluyen compuestos naturales y análogos sintéticos.

Los diferentes ligandos cannabinoides se van a clasificar en: agonistas cannabinoides, antagonistas cannabinoides, inhibidores del sistema de recaptación e inhibidores de la degradación de los cannabinoides (Figura 8).



**Figura 8:** Estructura química de los endocannabinoides, de los ligandos de plantas de los receptores cannabinoides y de los ligandos sintéticos de los receptores cannabinoides. Tomado de Reichenbach y cols., 2010.

#### 4.2.1 Agonistas cannabinoides

Existe una gran cantidad de moléculas muy variadas que se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides. Éstos se pueden función de su estructura química en cuatro grupos; clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles e eicosanoides.

1- **Clásicos**- A este grupo pertenecen, tanto compuestos cannabinoides naturales, como sus análogos sintéticos.

- Los compuestos cannabinoides **naturales** más destacados que actúan como agonistas son el D<sup>9</sup>-THC (cannabinoides con mayor poder psicoactivo), D<sup>8</sup>-THC y Cannabinol.

- Los **análogos sintéticos** con perfil agonista más importantes son el HU-210, HU-211, nabilona (único análogo sintético del D<sup>9</sup>-THC) y el “abnormal cannabidiol” (análogo sintético del cannabidiol).

2- **No clásicos**- son compuestos análogos del D<sup>9</sup>-THC que carecen del anillo pirano característico de los cannabinoides clásicos. Fueron desarrollados para mantener o mejorar la actividad de éstos (Palmer y cols., 2002). Se subdividen según su estructura química en:

- Compuestos **bicíclicos** – su principal representante es el (-)-CP55,940 que representa uno de los principales agonistas de los receptores CB1 y CB2.

- Compuestos **tricíclicos** – sus principales representantes son el levonantradol y el CP55,244.

3- **Aminoalquilindoles** - son compuestos sintéticos cuya estructura química deriva de la pravadolina. El principal representante es el Win 55,212-2. Se trata de un agonista mixto, aunque posee una afinidad ligeramente superior por el receptor cannabinoide CB2 (Felder y cols., 1998).

4- **Eicosanoides** – son compuestos estructuralmente derivados del ácido araquidónico, cuyo principal representante es la anandamida, considerado el ligando endógeno cannabinoide por excelencia. Además de la anandamida, otros compuestos endógenos pertenecientes a este grupo son el 2-AG y la PEA. En este grupo también se incluyen derivados sintéticos más estables que los cannabinoides endógenos. El más representativo es la metanandamida, que posee mayor resistencia a ser catabolizada y mayor afinidad por los receptores CB1 que otros cannabinoides naturales.

#### 4.2.2 Antagonistas cannabinoides

Se han desarrollado ligandos que actúan como antagonistas de los receptores CB1 y CB2, aunque pueden comportarse como agonistas inversos cuando se administran en ausencia de agonistas (Bouaboula y cols., 1999; Rhee, 2002).

Según su estructura química se dividen en:

##### 1- **Diarilpirazoles**

Los principales representantes son:

- SR141716A (Rimonabant). La molécula más potente y más ampliamente estudiada como antagonista selectivo de los receptores cannabinoides CB1 (Rinaldi-Carmona y cols., 1994).
- SR144528. Es la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo del receptor CB2 (Rinaldi-Carmona y cols., 1998).

##### 2- **Otras series químicas**

En este apartado se han englobado todos aquellos antagonistas cannabinoides que no presentan una estructura diarilpirazol. A este grupo pertenecen compuestos como el LY320135 (antagonista competitivo de los receptores CB1), AM630 (antagonista selectivo del receptor CB2) Cannabidiol (fitocannabinoide) y el O1918 (compuesto derivado del "abnormal cannabidiol"). Tanto el Cannabidiol como el O1918 se comportan como antagonistas del receptor cannabinoide "No-CB1/No-CB2".

### 4.2.3 Inhibidores de la recaptación

Son compuestos que actúan inhibiendo el transportador para anandamida. Entre ellos podemos destacar el AM404 (primer inhibidor del transportador descrito), VDM11 y UCM707.

### 4.2.4 Inhibidores de la degradación

La degradación de la anandamida se produce fundamentalmente por acción de la FAAH. Los inhibidores de la FAAH se clasifican en función de la reversibilidad de su inhibición sobre esta enzima en inhibidores reversibles (la mayoría de ellos no son selectivos de la FAAH, y pueden inhibir a otras enzimas e incluso al receptor cannabinoide CB1) e inhibidores irreversibles (a este grupo pertenecen compuestos como el PMSF, AM374 y el AM381) (Deutsch y cols., 1997; Bisogno y cols., 2005).

## 4.3 EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES.

El sistema endocannabinoide se encuentra distribuido en multitud de sistemas, órganos y tejidos (Herkenham y cols., 1991<sup>a</sup>; Herkenham y cols., 1991<sup>b</sup>; Mailleux y cols., 1992) y tiene efectos en los tres sistemas esenciales de regulación fisiológica: el sistema neurotransmisor, inmune y endocrino (Diaz-Laviada, 2009).

En el sistema nervioso central y en tejidos periféricos, los cannabinoides, tanto endógenos como exógenos (Pertwee, 1997), participan en la regulación de muy distintas funciones como es la regulación de la transmisión del dolor, control del tono muscular y la coordinación motora, producen modificaciones del estado de ánimo, influyen en los procesos de aprendizaje y memoria desempeñando un papel importante durante el desarrollo cerebral, tienen efecto antiemético y están implicados en la regulación de la apoptosis neuronal teniendo efecto neuroprotector. Además, los

cannabinoides también disminuyen la presión intraocular, median diferentes respuestas a nivel cardiovascular e inmunológico y regulan la ingesta de alimentos.

Esta Tesis Doctoral, se centrará en los efectos que estos compuestos tienen sobre el sistema cardiovascular y particularmente sobre las alteraciones cardiovasculares ligadas a la neuropatía autonómica producida en los dos modelos anteriormente descritos de neuropatía: la producida por antineoplásicos y la producida en situación de DM2.

### LOS CANNABINOIDES EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Los efectos cardiovasculares de los cannabinoides se empezaron a estudiar a principios de los años 60, revelando en múltiples trabajos la complejidad de estos efectos en el sistema cardiovascular (Randall y cols., 2004; Pacher y cols., 2005.)

Se ha identificado la presencia de receptores CB1 en terminaciones nerviosas simpáticas postganglionares, células endoteliales y células musculares lisas vasculares y en el miocardio. Igualmente se ha identificado la expresión de receptores CB2 en el miocardio y en células endoteliales y musculo liso vascular de las coronarias humanas (Pacher y cols., 2008b).

Los efectos cardiovasculares causados por la administración de cannabinoides son muy variables entre estudios experimentales y en humanos, variando incluso de unos individuos a otros y entre diferentes especies animales. También encontramos resultados distintos según las condiciones de experimentación (animal anestesiado *vs* consciente, la vía de administración o la dosis empleada, experimentos *in vivo vs in vitro*, del tipo de preparación etc.) (Mendizábal, 2007).

Además, sus efectos no pueden ser explicados únicamente mediante un mecanismo simple o por un solo lugar de acción. Todo ello indica que los mecanismos de acción de los cannabinoides son complejos, y no bien conocidos (Hillard, 2000).

Todavía no se ha establecido una función fisiológica clara y definitiva de los cannabinoides endógenos en el sistema cardiovascular, al menos en situaciones normales. Sin embargo, algunos estudios apuntan a que el sistema endocannabinoide juega un papel importante en situaciones fisiológicas en las que las concentraciones plasmáticas de catecolaminas se encuentran aumentadas, como durante una descarga adrenérgica, o en condiciones patológicas en las que la actividad simpática se encuentra aumentada, como puede ser el caso de la hipertensión arterial (Mendizábal y cols., 2007). Además, el sistema cannabinoide se encuentra sobreexpresado en patologías cardiovasculares e incluso participa en los mecanismos fisiopatológicos de ellas (Randall y cols., 2002; Randall y cols., 2004).

En este sentido, el grupo de Wagner demostró, en un modelo de shock hemorrágico en rata, que la liberación de anandamida por parte de los macrófagos se encuentra aumentada, y puede contribuir a la hipotensión que la acompaña. Del mismo modo, en el shock endotóxico, la síntesis de 2-AG y de anandamida en las plaquetas están aumentadas. En los pacientes con shock séptico, se ha observado aumento plasmático de anandamida y 2-AG. Estos datos apuntan a que, en las células sanguíneas, la síntesis de endocannabinoides está aumentada en estado de shock, y contribuye a las secuelas cardiovasculares de este y a la respuesta hipotensora (Wagner y cols., 1998). En el contexto de isquemia cardiaca, Lagneux y Lamontagne hallaron que en la cardioprotección frente a la I-R provocada por el pretratamiento con lipopolisacárido en corazón de rata, estaban involucrados los endocannabinoides

(Lagneux y cols., 2001). En un trabajo posterior de este mismo grupo, encontraron que este efecto cardioprotector de los cannabinoides era causado a través de la activación del receptor CB2 (Lépicier y cols., 2003; Randall y cols., 2002; Randall y cols., 2004).

Por todo ello, la manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide podría suponer una novedosa aproximación terapéutica para el tratamiento de la hipertensión (Li y cols., 2003; Batkai, 2004), complicaciones asociadas al síndrome metabólico y para prevenir el daño cardíaco por isquemia reperusión (Hiley y cols., 2003; Hiley y cols., 2004).

#### A) EFECTOS EN LA PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA

La mayoría de los estudios muestran que los efectos más importantes observados tras la administración de cannabinoides en animales de experimentación son hipotensión y bradicardia (Siqueira y cols., 1979; Varga y cols., 1995; Randall y cols., 2002). Este efecto de los cannabinoides sobre la presión muestra un patrón trifásico.

- La primera fase consiste en una reducción de la presión arterial y bradicardia que dura unos segundos. Este efecto es mediado a nivel vagal (Varga y cols., 1995, Randall y cols., 2002).
- La segunda fase consiste en una respuesta presora no mediada por respuesta simpática ni por el receptor CB1. Se ha sugerido que esta respuesta presora puede ser debida a vasoconstricción directa sobre el musculo liso vascular (Varga y cols., 1995; Jarai y cols., 1999; Randall y cols., 2002; Pacher y cols., 2004; Mendizábal y cols., 2007).

- La tercera fase del efecto consiste en una disminución más prolongada de la presión arterial asociada con una moderada bradicardia. Esta tercera fase parece estar mediada por el receptor CB1 por inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores a nivel periférico, aunque no se puede descartar una acción directa sobre los vasos (Varga y cols., 1995; Lake y cols., 1997; Randall y cols., 2002; Mendizábal y cols., 2007).

No existe un consenso común en lo que se refiere a los mecanismos mediante los cuales los cannabinoides causan esta vasodilatación (Kunos y cols., 2000; Randall y cols., 2002).

Los mecanismos involucrados en el efecto vasodilatador de los cannabinoides dependen del lecho vascular y de las condiciones de experimentación. Estos efectos están ocasionados por la regulación de la neurotransmisión en el sistema nervioso simpático (tanto central como periférico), vasodilatación directa y modulación de nervios sensoriales (Kunos y cols., 2000; Mendizábal y cols., 2007), además de posibles modificaciones en la contractilidad cardíaca.

La hipertensión arterial es una de las alteraciones cardiovasculares que, frecuentemente va asociada a DM2 y SM. En la hipertensión, existe una activación del sistema endocannabinoide que actúa como mecanismo compensatorio limitando el aumento de la presión arterial. Este mecanismo hipotensor se debe a una reducción de la contractilidad cardíaca y a una reducción de la resistencia vascular por activación de los receptores CB1 vasculares y cardíacos (Bátkai y cols., 2004; Pacher y cols., 2005; Pacher y cols., 2008b). Sin embargo, no se ha evaluado este efecto de los cannabinoides en la hipertensión arterial sufrida en situaciones de SM-DM2.

## B) EFECTOS CARDIACOS

Se ha visto que los efectos de derivados cannabinoides de la planta *C. Sativa* (como el D<sup>9</sup>-THC y el cannabino), endocannabinoides (como la anandamida) y cannabinoides sintéticos (Win 55,212-2, CP55,940 y HU-210) en corazones de animales sin patología son vasodilatación coronaria y una disminución de la contractilidad cardiaca (Ford y cols., 2002; Bonz y cols., 2003; Pacher y cols., 2004; Batkai, 2004; Mendizábal y cols., 2007) y de la frecuencia cardiaca (Smiley y cols., 1976; Nahas y cols., 1985), lo que en conjunto disminuye el gasto cardiaco.

Estos efectos cardiodepresores de los cannabinoides se han evaluado en corazones de rata aislados y perfundidos en sistema de Langendorff y en aurículas humanas aisladas y estimuladas eléctricamente (Ford y cols., 2002; Bonz y cols., 2003). Estos estudios han revelado que estos efectos cardiacos se dan a través de receptores CB1, ya que son antagonizados por SR141716A (Mendizábal y cols., 2007). Estos efectos podrían estar mediados por una inhibición simpática; proponiéndose la existencia de un receptor CB1 localizado en las terminaciones nerviosas simpáticas cardiacas, cuya estimulación inhibe la liberación de NA (Ishac y cols., 1996; Niederhoffer y cols., 1999; Gardiner y cols., 2002; Niederhoffer y cols., 2003), aunque éste no es el único mecanismo propuesto, ya que se ha visto que la bradicardia causada por la anandamida y la metanandamida está mediada por receptores TRPV1 (Malinowska y cols., 2001).

Sin embargo, algunos efectos de los cannabinoides sobre el corazón no pueden ser explicados por ninguno de los mecanismos que clásicamente median respuestas cannabinoides, por lo que se propone la existencia de nuevos receptores cannabinoides que median las respuestas a anandamida en corazones aislados (Ford y cols., 2002).

Se ha descrito que el sistema endocannabinoide está involucrado en procesos de protección cardiaca frente al daño por isquemia-reperfusión (I-R) en condiciones patológicas y contribuye al preconditionamiento cardiaco por administración de endotoxina bacteriana, estrés por calor o pequeños periodos de isquemia (Hiley y cols., 2003; Pacher y cols., 2008a). La administración de endotoxina bacteriana, no solo produce shock cardiovascular, sino que es capaz de proteger al corazón frente al daño por I-R en corazones aislados y perfundidos, reduce el tamaño del infarto y mejora la recuperación funcional en la reperfusión (Lagneux y cols., 2001).

En esta cardioprotección está involucrado el sistema endocannabinoide mediante la activación de los receptores CB2. Esto se corrobora con trabajos en los que corazones pretratados con diferentes cannabinoides (endógenos o sintéticos y agonistas selectivos o no selectivos) y sometidos posteriormente a isquemia-reperfusión (I-R), recuperaron en mayor medida su funcionalidad, el tamaño del infarto se vio reducido y se disminuyeron los niveles de la lactato deshidrogenasa (LDH) y creatina quinasa (CK) (dos marcadores bioquímicos del daño isquémico). Este efecto protector parece estar mediado principalmente por receptores CB2 (Ford y cols., 2002; Lépicier y cols., 2003; Underdown y cols., 2005).

Este mismo efecto protector se reproduce en otros modelos de I-R *in vivo* (Krylaov,2001; Ugdyzhenkova, 2001; Krylaov,2002; Joyeux y cols., 2002; Lépicier y cols., 2003; Pacher y cols., 2005)en los que la administración de HU210 (Pacher y cols., 2005) Win 55,212-2 (Di Filippo, 2004) cannabidiol (Walsh y cols.,2010) o anandamida reducen el tamaño del infarto y la incidencia de arritmias ventriculares mediante la activación de receptores CB2 pero no de CB1 (Krylatov y cols., 2001; Ugdyzhenkova y cols., 2001; Ugdyzhenkova y cols., 2002; Krylatov y cols., 2002).

La protección sobre el daño por hipoxia también se ha descrito en cultivos de cardiomiocitos en los que el D<sup>9</sup>-THC redujo la liberación de LDH bajo condiciones de hipoxia a través de la activación de receptores CB2 pero no a través de CB1 (Shmist y cols., 2006).

Como ya se ha apuntado anteriormente en esta Tesis Doctoral, se conoce que el sistema endocannabinoide está involucrado tanto en procesos de protección cardíaca frente al daño por I-R en condiciones patológicas, como en la hipertensión, síndrome metabólico, infarto de miocardio y fallo cardíaco (Pacher y cols., 2008b). Un estudio reciente (Slavic y cols., 2013) demuestra que el tratamiento con cannabinoides mejora la funcionalidad y la remodelación cardíaca tras el infarto de miocardio en animales diabéticos. Todos estos datos apuntan a que la manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide podría suponer una novedosa aproximación terapéutica para el tratamiento de las alteraciones cardiovasculares que se desarrollan paralelamente a neuropatías y para prevenir el daño cardíaco por isquemia reperfusión (Li y cols., 2003; Hiley y cols., 2003; Hiley y cols., 2004; Batkai 2004), en situaciones donde este posible daño está aumentado como tras tratamiento antitumoral o en situaciones de DM2.



# **OBJETIVOS**



---

## OBJETIVOS

El tratamiento y prevención de las neuropatías y las alteraciones cardiovasculares asociadas a ellas es un desafío clínico aun no resuelto. Como ya se ha mencionado en esta Tesis Doctoral, el sistema endocannabinoide se sobreexpresa o se hipersensibiliza en ciertas situaciones patológicas entre las que se encuentran las neuropatías autonómicas causadas por antitumorales o por alteraciones metabólicas. Además, los cannabinoides han demostrado tener efecto en las neuropatías periféricas sensoriales inducidas por antineoplásicos y en ratas diabéticas, lo que despierta el interés en los mecanismos implicados en estos efectos y su posible papel regulador en el desarrollo de complicaciones autonómicas derivadas de estas neuropatías, entre las que se encuentran las complicaciones cardiovasculares. Por todo ello, resulta interesante la evaluación del sistema endocannabinoide como posible diana terapéutica en las alteraciones cardiovasculares producidas en dos modelos de neuropatía, la producida por antineoplásicos y la producida en situación de DM2.

Por lo tanto, los **objetivos** generales y específicos de esta Tesis Doctoral son:

1. Evaluar el efecto de la neuropatía autonómica inducida por la administración crónica de cisplatino o situaciones de DM2 en el sistema cardiovascular. Para llevar a cabo este objetivo se ha valorado:
  - 1.1. La presión arterial y frecuencia cardiaca, así como la función cardiaca basal y tras un proceso de isquemia-reperfusión en animales tratados crónicamente con cisplatino.
  - 1.2. La presión arterial y frecuencia cardiaca, así como función cardiaca basal y tras un proceso de isquemia-reperfusión en un modelo experimental de DM2.

## OBJETIVOS

---

2. Evaluar si la expresión de receptores cannabinoides se encuentra alterada en el sistema cardiovascular tras la administración crónica de cisplatino o en situaciones de DM2. Para llevar a cabo este objetivo se ha valorado:
  - 2.1. La expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en ventrículo izquierdo de animales tratados crónicamente con cisplatino.
  - 2.2. La expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en ventrículo izquierdo de animales obesos y diabéticos.
3. Evaluar si la modulación de los receptores cannabinoides puede ofrecer beneficios terapéuticos en las alteraciones cardiovasculares inducidas por cisplatino o en situaciones de DM2. Para llevar a cabo este objetivo se ha valorado:
  - 3.1. El efecto de la administración de un agonista cannabinoide CB1/CB2 en las alteraciones cardiovasculares en la que la expresión de receptores cannabinoides estuviese alterada y la posible implicación de dichos receptores.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



En este apartado explicaremos la metodología seguida en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, comentaremos los animales de experimentación y los modelos de neuropatías utilizados. En segundo lugar, explicaremos los diferentes tratamientos con cannabinoides y las técnicas y preparaciones empleadas. Por último, se detallará el análisis estadístico utilizado.

Todos los experimentos llevados a cabo en este estudio se diseñaron con el objeto de minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento, de acuerdo con el Real Decreto RD 53/2013 sobre animales para experimentación y otros fines científicos, y fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rey Juan Carlos.

## **1 - ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MODELOS DE NEUROPATÍA**

En la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado ratas de dos cepas diferentes en función del tipo de neuropatía a estudiar.

### **1.1 – NEUROPATÍA DE ORIGEN IATROGÉNICO POR ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE CISPLATINO.**

#### **1.1.1 - Animales.**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas con un peso comprendido entre 270 y 300 g procedentes del animalario de la Universidad Rey Juan Carlos/ Harlan-Iberica (Barcelona, España). Los animales fueron estabulados en el animalario de la Universidad Rey Juan Carlos. Se colocaron en grupos de 5 animales en jaulas transparentes (40 cm × 28cm × 25cm) con un lecho de viruta que fue reemplazada cada 2-3 días y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (20° C), humedad ambiental (60 %) y con ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Los animales

se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar de laboratorio (Harlan-Iberica, Barcelona, España) y agua corriente filtrada.

### **1.1.2 - Modelo experimental de neuropatía por administración crónica de cisplatino.**

Para llevar a cabo el desarrollo de la neuropatía por administración de cisplatino utilizamos un modelo establecido de neuropatía periférica sensorial causada por administración crónica de este antitumoral (Authier y cols., 2003).

Los animales se dividieron en los siguientes grupos de tratamiento:

- a) Control (Salino): recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina (NaCl 0.9%), una vez a la semana durante 5 semanas.
- b) Cisplatino (CPT): recibieron una inyección intraperitoneal de cisplatino a la dosis de 2 mg/Kg una vez a la semana durante 5 semanas.

Previamente a la administración del cisplatino, se administraron por vía subcutánea 2 ml de solución salina (NaCl 0.9%) con el fin de prevenir la nefrotoxicidad inducida por la administración crónica de cisplatino. Este protocolo experimental se realizó de igual manera en el caso de los animales que recibieron salino para equiparar ambos grupos.

Estudiaremos en este modelo de neuropatía la existencia de alteraciones autonómicas cardiovasculares, la posible modificación del sistema cannabinoide endógeno a este nivel y, si procede, el efecto de la administración de cannabinoides en las alteraciones observadas.

## 1.2 - DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)

### 1.2.1 - Animales.

Como modelo animal de DM2 se han utilizado ratas diabéticas y obesas - *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF) - macho de 20 semanas de vida, y su correspondiente control genético, ratas *Lean* (LEAN), delgadas y no diabéticas, de la misma edad. Los animales fueron obtenidos de Charles River Laboratories (Research Models, Barcelona, España) a las 6 semanas de vida (Oltman y cols., 2006). Esta cepa de ratas está catalogada en la literatura como un modelo de SM y DM (1.2.2 Modelo experimental de neuropatía por DM2).

Los animales fueron estabulados en el animalario de la Universidad Rey Juan Carlos. Se colocaron en grupos de (3-4) animales en jaulas transparentes (40 cm×28cm×25 cm) con un lecho de viruta que fue reemplazada cada 2-3 días y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (20° C), humedad ambiental (60 %), con ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad hasta alcanzar las 18-20 semanas de vida, momento en el que se llevaron a cabo los experimentos. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta especial energética Purina 5008 (Charles River, Barcelona, España), tal y como recomienda el proveedor, y agua corriente filtrada que fue renovada periódicamente.

**Tabla 1:** Composición comparativa de las dietas estándar y Purina 5008 con las que fueron alimentados los animales.

DIETA	Dieta estándar	Purina 5008
Ingredientes	Harina de trigo Trigo molido Maíz molido Harina de gluten de maíz	Harina de trigo Trigo molido Maíz molido Melaza Harina de soja Harina de pescado Grasa animal Harina de carne Harina de alfalfa
Proteínas	14%	23 %
Grasa	4 %	6.5 %
Tipo de grasas añadidas	Aceite de soja	Grasa animal porcina
Energía metabolizable.	2.9 Kcal/g	3.3 Kcal/g

Únicamente señalar que para garantizar el mantenimiento del bienestar animal, a medida que los animales fueron desarrollando la DM2 fue necesario separarlas en grupos más pequeños y aumentar la frecuencia de reemplazo de la viruta. Este hecho se debió a que el desarrollo de poliuria en los animales hace el lecho se manche más y se pueda favorecer la aparición de infecciones.

### 1.2.2 - Modelo experimental de neuropatía por DM2.

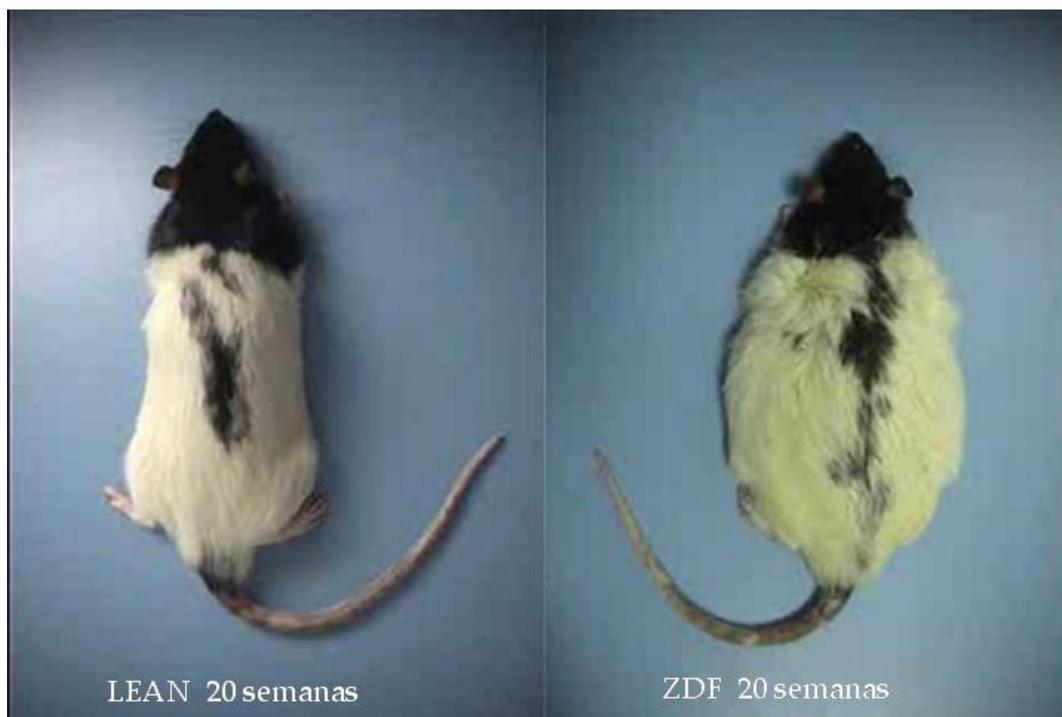
Las ratas ZDF (Figura 9) son un modelo de SM y DM no dependiente de insulina que empieza a desarrollar hiperglucemia y resistencia a la insulina aproximadamente a las 7 semanas de vida, alcanzando los niveles de glucosa en sangre unos valores máximos y

mantenidos de 500 mg/dl alrededor de las 15-16 semanas de vida de los animales (Peterson y cols., 1990).

Los experimentos desarrollados en esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo cuando las ratas alcanzaron las 18-20 semanas de vida. En este punto temporal, está descrito que los animales presentan neuropatía periférica sensorial (Vera y cols., 2012) además de otras complicaciones asociadas a esta patología como: obesidad, niveles elevados de glucosa en sangre, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, nefropatía y alteraciones de la cicatrización (Charles River, 2011).

Como control de estos animales se utilizaron ratas LEAN de la misma edad.

En este modelo de neuropatía, estudiaremos la existencia de alteraciones autonómicas cardiovasculares, la posible modificación del sistema cannabinoide endógeno a este nivel y, si procede, el efecto de la administración de cannabinoides en las alteraciones observadas.



**Figura 9:** Modelo animal de DM2; ratas ZDF y su correspondiente control genético LEAN. Ambos machos de 20 semanas de vida.

### 1.3 – PARÁMETROS GENERALES

#### 1.3.1 Peso

Durante el tiempo que los animales, tanto los tratados con CPT como los animales con DM2, estuvieron estabulados se llevó a cabo una valoración periódica del peso de los mismos en varios puntos temporales.

- En el caso de los animales tratados con CPT, se tomó una medida de peso inicial, previo al comienzo del tratamiento y una vez a la semana siempre antes de la administración del antitumoral hasta el final del tratamiento.

- En el caso de los animales ZDF y sus controles LEAN, el peso se tomó en un punto inicial que corresponde con la 6<sup>a</sup> semana de vida y una vez a la semana hasta alcanzar la semana 19<sup>a</sup> de vida.

Además, en los animales diabéticos, se evaluaron los niveles de glucemia y lípidos como parámetros de control del estado general de los mismos.

### 1.3.2 Glucemia

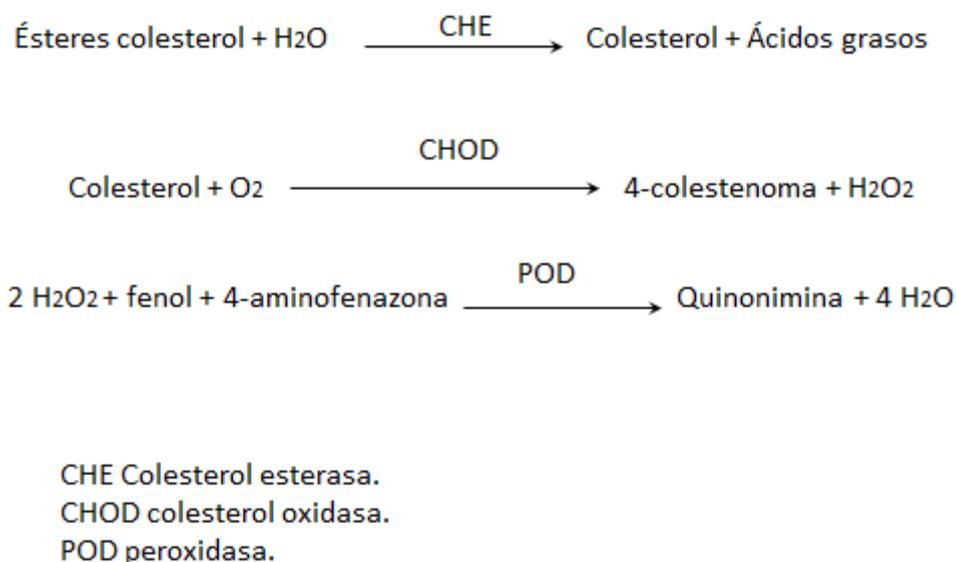
Los niveles de glucosa en sangre se midieron en las ratas en las semanas 7, 12 y 17 de vida. Se eligieron estos puntos temporales que corresponden con el inicio (7 semanas) un punto intermedio (12 semanas) y el punto final, antes del sacrificio (17 semanas) con el fin de mantener un seguimiento del desarrollo de la diabetes. Esta determinación se realizó en ayunas; 12 horas antes de la medición de la glucemia se retiró la comida de los animales. Las muestras de sangre para la determinación de glucosa se obtuvieron mediante punción de la vena de la cola y se determinaron los niveles usando un glucómetro y tiras reactivas (Glucocard TM sensor, Arkray, Inc. Kyoto, Japan).

### 1.3.3 Dislipemia

Los niveles de lípidos se midieron en plasma únicamente en la semana 19 (ver apartado 2.1.2 - Protocolo experimental y parámetros cardiovasculares valorados). En este caso no se pudo llevar a cabo el seguimiento en distintos puntos temporales debido a un problema metodológico; se comenzó la medición de los lípidos utilizando un analizador portátil CardioChek®; sin embargo, al usar las muestras de sangre obtenidas de estos animales, los niveles de lípidos superaban el límite de detección del aparato. Por ello, se optó por utilizar otros métodos y únicamente se determinaron estos parámetros al finalizar el protocolo experimental. Se cuantificaron los niveles de colesterol total y triglicéridos mediante sendos kits comerciales:

- Colesterol. La determinación del colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular.

Los niveles de colesterol se midieron usando un kit comercial basado en un método enzimático-colorimétrico (Spinreac, S.A., Barcelona España). El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción reflejada en la figura 10:



**Figura 10:** Esquema de las reacciones catalizadas por las enzimas colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD) y peroxidasa (POD) que partiendo de ésteres de colesterol y mediante una cadena de reacciones forman un compuesto coloreado proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

La determinación de los niveles de colesterol se llevó a cabo de la siguiente manera: se pipetearon 10 µl de la muestra o el patrón (con una concentración de 200 mg/dl de colesterol) junto con 1 ml del reactivo del kit, el cual se comercializa listo para su uso. Se mezcló y se incubó 10 minutos entre 15 y 25°C. La intensidad del color

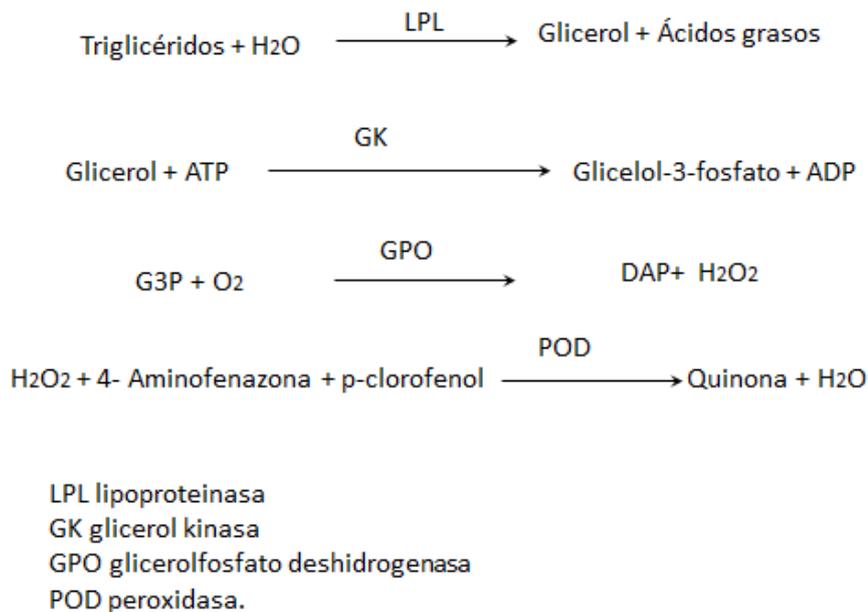
formado se midió espectrofotométricamente a 540 nm. Esta intensidad es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada, desde el límite de detección (0.46 mg/dl) hasta el límite de linealidad (600 mg/dl).

La cantidad de colesterol se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Absorbancia Muestra} / \text{Absorbancia Patrón} \times 200 \text{ mg/dl (Concentración patrón)} =$$
  
mg/dl de colesterol de la muestra.

- Triglicéridos. Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos puede elevar los niveles de triglicéridos. Diversas patologías, como ciertas disfunciones hepáticas o DM pueden estar asociadas con su elevación.

Los niveles de triglicéridos se midieron usando un kit comercial (Spinreac, S.A., Barcelona España), mediante un método enzimático basado en la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres por la acción de la lipoproteinlipasa (LPL). El glicerol se fosforila por la presencia de la enzima glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) dando lugar en presencia de glicerol quinasa (GK) y ATP a glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P reacciona con el oxígeno dando lugar a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por acción de la enzima glicerol fosfato oxidasa (GPO). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con la 4-aminofenazona (4-AF) y el p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD), produciendo un compuesto de coloración rosácea (Figura 11): la intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra de plasma.



**Figura 11:** Esquema simplificado de las reacciones enzimáticas que producen un compuesto coloreado (Quinona), proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra de plasma.

La determinación de los niveles de Triglicéridos se llevó a cabo de la siguiente manera, siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante; se pipetearon 10 µl de la muestra o el patrón (con una concentración de 200 mg/dl de triglicéridos) junto con 1 ml del reactivo del kit, el cual se comercializa listo para su uso. Se mezcló y se incubó 10 minutos entre 15 y 25° C. La intensidad del color formado se midió espectrofotométricamente a 540 nm. Esta intensidad es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada, desde el límite de detección (0.530 mg/dl) hasta el límite de linealidad (1000 mg/dl).

La cantidad de triglicéridos se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Absorbancia Muestra} / \text{Absorbancia Patrón} \times 200 \text{ mg/dl (Concentración Patrón)} = \text{mg/dl de triglicéridos de la muestra.}$$

#### 1.3.4 Liberación de insulina *in vitro*.

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los islotes pancreáticos de los animales obesos y diabéticos, en la semana 19-20 de vida de estos animales se realizó un ensayo de aislamiento y cultivo *in vitro* de islotes pancreáticos para evaluar la liberación de insulina por parte de los mismos en un medio con diferentes concentraciones de glucosa.

Para ello se extrajo el páncreas de los animales, se limpió de grasa y se digirió con colagenasa P (Laboratorios Roche. Mannheim, Alemania) en un baño a 37°C con agitación. Una vez digerido el tejido, éste se lavó con solución de Hanks y los islotes se aislaron bajo la lupa. Una vez aislados se trasladaron en grupos de 4 a tubos de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 37°C en atmósfera con 95% O<sub>2</sub> 5%CO<sub>2</sub> en 1 ml de medio de cultivo (Ringer) conteniendo diferentes concentraciones de glucosa (2, 6, 8, 10, 15 o 20 mM). Con cada uno de los páncreas se realizó una curva de respuesta a glucosa, coincidiendo por lo tanto el número de ensayos con el número de animales. Al final de la incubación, se recogió una alícuota del medio de cada uno de los tubos y se mantuvo congelada a -80°C para la posterior cuantificación de la cantidad de insulina presente en el medio. La cuantificación de insulina se realizó mediante la técnica ELISA, utilizando un kit comercial (Mercodia). Uppsala, Suecia).

## **2 – EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE NEUROPATÍA AUTONÓMICA CARDIOVASCULAR.**

Esta Tesis Doctoral se ha centrado, dentro de la evaluación del desarrollo de neuropatía autonómica cardiovascular, en el estudio de la presión arterial y de la función cardiaca.

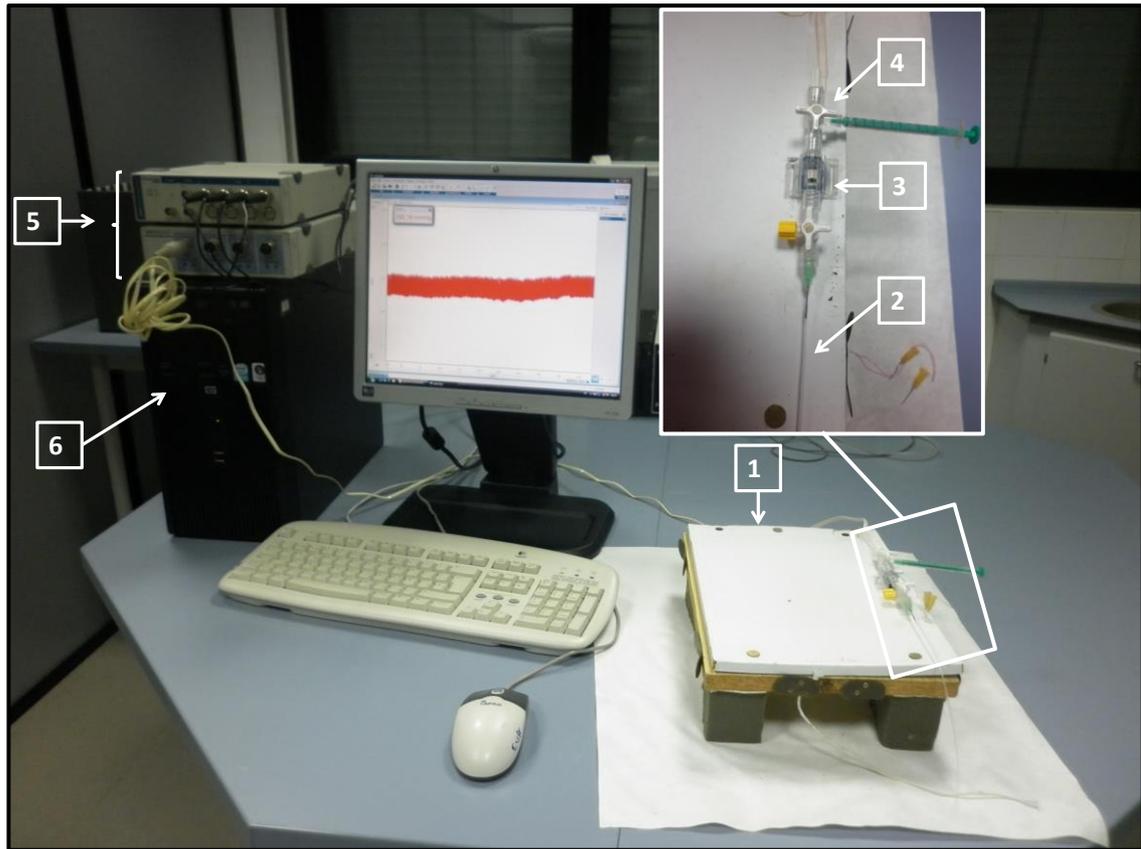
### **2.1 - MEDIDA DE PRESIÓN ARTERIAL**

En primer lugar explicaremos los componentes del equipo de medida de la presión arterial directa, seguido del protocolo experimental y los parámetros valorados.

#### **2.1.1 - Componentes del equipo.**

Los diferentes componentes del equipo de medida de presión arterial directa, se encuentran identificados en la figura 12.

1. Una cama con un sistema de ganchos laterales para mantener sujeto al animal.
2. Cánula de PVC que se introduce en la arteria carótida.
3. Transductores de presión (Cibertec, S.A., Madrid, España) para el registro de la presión arterial.
4. Llave de tres vías que conecta el sistema con una jeringa.
5. Sistema PowerLab/400 (PanLab S.A., Barcelona, España) formado por una unidad de amplificación y filtrado de señal conectado a un ordenador para registrar la presión arterial durante todo el experimento.
6. Ordenador para el registro y tratamiento de datos con el programa informático Chart 4.1 para Windows.



**Figura 12:** Equipo de medida de la presión arterial directa. (1) Cama, (2) cánula, (3) transductor de presión (4) llave de tres vías, (5) sistema PowerLab/400, (6) ordenador.

### 2.1.2 - Protocolo experimental y parámetros cardiovasculares valorados.

Los animales fueron anestesiados con equitesín; una mezcla de hidrato de cloral 2.1 g, pentobarbital sódico 0.46 g, MgSO<sub>4</sub> 1.06 g, propilén glicol 21.4 ml, etanol (90%) 5.7 ml, H<sub>2</sub>O 23 ml) (Pascual y cols., 2005; González y cols., 2011).

Cuando los animales estuvieron anestesiados se colocaron en posición decúbito supino en la cama para medida de presión arterial *in vivo* (ver apartado 2.1.1 Componentes del equipo). Se realizó una incisión en la zona ventromedial del cuello y se procedió a separar y cortar la piel, dejando un campo quirúrgico en forma de ojal lo suficientemente amplio para las manipulaciones posteriores (Ver figura 13). A través del ojal, se separaron los paquetes musculares hasta lograr acceder al paquete vasculo-nervioso formado por la arteria carótida y el nervio vago. Se separó dicho nervio y, una

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

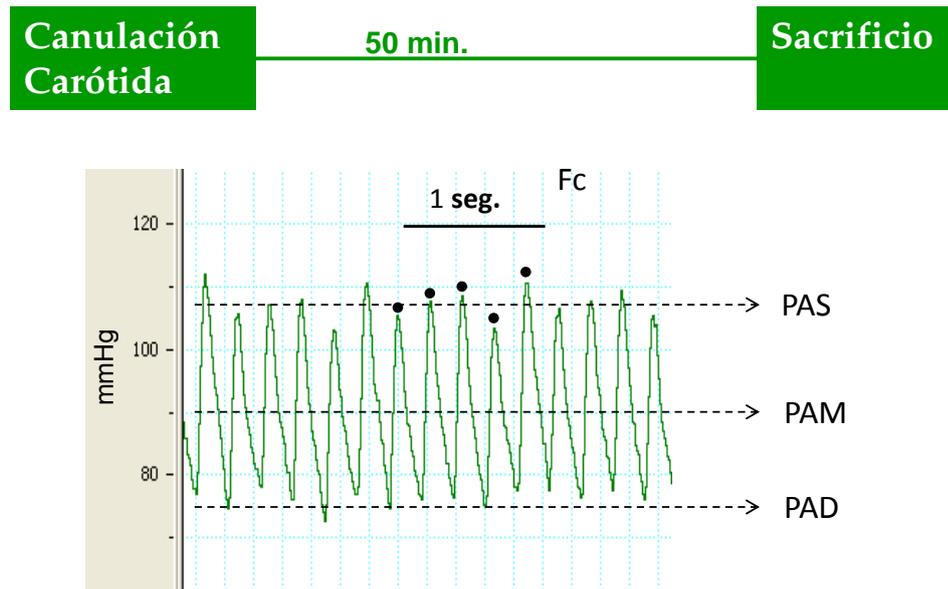
vez aislada la arteria, se pasaron por debajo de ésta dos hilos, ligando el correspondiente en la parte distal, y dejando iniciado el nudo correspondiente en la parte proximal para la posterior ligadura de la cánula. Una vez estuvo preparada de esta forma la carótida, se colocó una pinza de arteria por encima del nudo proximal iniciado. Esta pinza tiene como misión interrumpir la circulación para permitir realizar una pequeña incisión a través de la cual se introdujo una cánula de PVC que se sujetó a la arteria mediante un doble nudo con un hilo de costura. Una vez bien sujeta la cánula, se soltó la pinza para restablecer de nuevo la circulación. Esta cánula se encontraba acoplada a una jeringuilla que contenía heparina sódica (150 U.I./rata) (Hospira Productos Farmacéuticos y Hospitalarios S.L. Madrid, España); la cual se inyectó lentamente en un volumen de suero fisiológico de 0.2 ml con el fin de evitar la posterior coagulación sanguínea durante el ensayo (Abaloy cols., 2009).



**Figura 13:** Imagen del campo quirúrgico en forma de ojal realizado para la medición de la presión arterial

Una vez realizada la canulación, se registraron de manera continuada durante 50 minutos los siguientes parámetros cardiovasculares (Figura 14):

- Presión Arterial Media (PAM)
- Presión Arterial Sistólica (PAS)
- Presión Arterial Diastólica (PAD)
- Frecuencia cardiaca (Fc).



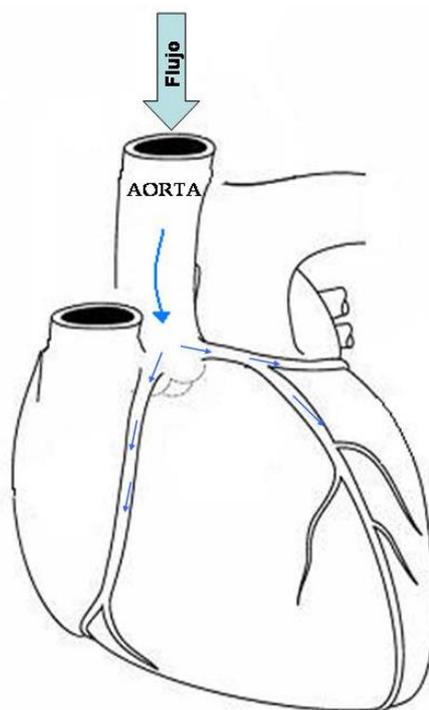
**Figura 14:** Esquema del protocolo experimental llevado a cabo en la medida de presión arterial. PAM Presión Arterial Media, PAS Presión Arterial sistólica, PAD Presión Arterial Diastólica y Fc Frecuencia Cardíaca.

Una vez finalizado el protocolo de registro de la presión arterial, los animales fueron sacrificados por desangrado. La sangre de los animales ZDF y sus correspondientes controles (LEAN) se recogió en tubos eppendorf con anticoagulante, para posterior separación del plasma. Éste se mantuvo congelado a  $-80^{\circ}$  C hasta su uso en determinaciones bioquímicas (Ver apartados: 1.3.3 Dislipemia y 5.1 Cuantificación de los niveles Plasmáticos de Malonildialdehído (MDA)).

### 2.2 - PREPARACIÓN DE CORAZÓN AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA

#### (Preparación de Langendorff)

En 1895, Oscar Langendorff (1853-1909) describió un sistema de perfusión para corazón aislado de mamíferos (Zimmer, 1998). Este sistema permite trabajar con corazones aislados y estudiar diferentes parámetros que determinan su funcionalidad. La técnica se basa en el mantenimiento de la actividad del miocardio gracias a la perfusión retrógrada de una solución nutritiva oxigenada y mantenida a 37°C a través de la aorta ascendente a todo el territorio coronario, de modo que queda asegurada la nutrición y oxigenación del músculo cardiaco (Figura 15).



**Figura 15:** Esquema de la perfusión retrógrada a través de la aorta ascendente a todo el territorio coronario.

Este sistema de perfusión, se encuentra acoplado a un sistema de registro que permite la monitorización de la actividad cardiaca durante el experimento.

A continuación, explicaremos los componentes del equipo de Langendorff, el método de obtención de la preparación “corazón aislado de rata”, los parámetros valorados en esta preparación y, por último, el protocolo experimental seguido.

### **2.2.1 - Componentes del equipo**

En las Figuras 16 y 17 se muestra un esquema de los componentes del sistema de Langendorff.

El equipo consta de un sistema de perfusión y otro de registro:

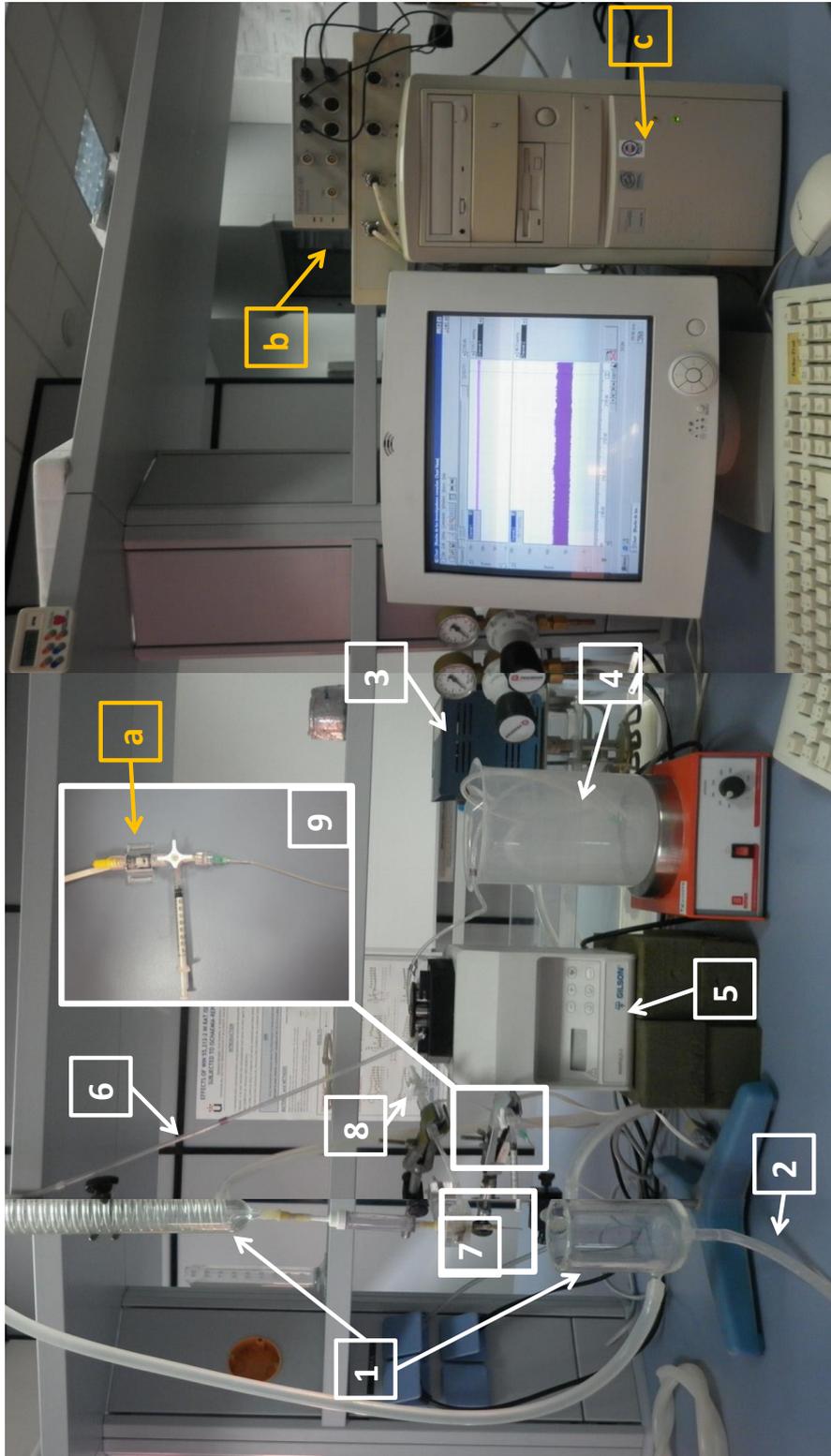
#### A) Sistema de perfusión está formado por:

1. Baño de órganos que consta de una copa de baño de órganos y un refrigerante de serpentín para el montaje de la preparación de corazón aislado.
2. Sistema de desagüe para recoger la solución nutritiva ya perfundida.
3. Baño de termostatzado acoplado al serpentín. El agua de este baño circula a través de una doble camisa de la que consta el serpentín, de forma que calienta la solución nutritiva y la mantiene a 37°C durante todo el experimento (Lépicier y cols., 2003).
4. Vaso de precipitados que se utilizó como reservorio de la solución nutritiva, que se mantuvo constantemente en agitación y burbujeada con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>).
5. Bomba peristáltica (Gilson Inc, Estados Unidos) que permite regular el flujo de perfusión.
6. Tubos flexibles para la conducción de la solución nutritiva desde el vaso de precipitados hasta el sistema de baño de órganos.
7. Cánula de acero inoxidable para fijar y perfundir la aorta.

8. Transductor de presión acoplado a la cánula lateral del sistema de Langendorff para el registro de Presión de Perfusión Coronaria.
9. Sistema para registro de parámetros de función del ventrículo izquierdo. Este sistema consta de un balón de látex que se introduce en el ventrículo izquierdo, y que está conectado, a través de una cánula y la correspondiente llave de tres vías, a una jeringa de precisión y a un transductor de presión formando un circuito independiente relleno de agua destilada. El circuito acoplado a la jeringa se utilizó para ajustar una presión inicial dentro del balón de 5-10 mmHg, siendo ésta la presión diastólica final inicial.

B) Sistema de registro formado por:

- a. Transductores de presión (Cibertec, S.A. Madrid, España) para el registro de la actividad cardiaca, uno acoplado a la cánula y balón inserto en el ventrículo izquierdo y otro conectado lateralmente a la cánula en la que se fijó la aorta.
- b. Sistema PowerLab/400 (PanLab SA, Barcelona, España) formado por una unidad de adquisición de datos y un amplificador de señal conectado a un ordenador para registrar la función cardiaca durante todo el experimento.
- c. Ordenador para el registro y tratamiento de datos con el programa informático Chart 4.1 para Windows.



**Figura 16:** Equipo de corazón aislado y perfundido de rata. (1) Baño de órganos compuesto por copa y refrigerante de serpiente, (2) desagüe, (3) baño termostatzado, (4) solución nutritiva, (5) bomba peristáltica, (6) tubos para la conducción de la solución nutritiva, (7) cánula de acero inoxidable (ver figura 17), (8) transductor de presión, (9) sistema para registro de función del ventrículo izquierdo compuesto a su vez por: (a) transductor de presión, (b) PowerLab/400, (c) ordenador.



**Figura 17:** Imagen detalle del corazón sujeta a la cánula. Se corresponde con el número 7 de la figura 16.

### 2.2.2 - Obtención de la preparación “Corazón aislado y perfundido de rata”

Para la obtención de la preparación “Corazón aislado y perfundido de rata”, en los animales previamente desangrados, se realizó una incisión en la línea media desde el abdomen hasta el cuello, retirando el esternón por completo y exponiendo la cavidad torácica. Los corazones se extrajeron rápidamente y se sumergieron en solución de Krebs-Henseleit a 4°C. El frío permite detener momentáneamente el metabolismo del corazón para preservarlo hasta el momento de su colocación en el sistema de perfusión. Esta es la principal desventaja de este método de montaje, ya que el corazón es sometido a una isquemia desde el momento de la extracción hasta que éste es colocado en el sistema de Langendorff. Esta isquemia podría suponer un acondicionamiento cardíaco. Sin embargo, está descrito que el periodo óptimo para establecer este acondicionamiento en corazones de rata es de 3 minutos, y es especialmente marcado cuando estos pequeños periodos de isquemia se repiten. La isquemia que los corazones sometidos a esta extracción tendrán que soportar dura únicamente unos segundos, siendo tiempo insuficiente como para suponer un acondicionamiento cardíaco (Vegh y cols., 1992).

Para colocar el corazón en el sistema de Langendorff, se localizó la aorta, se limpió de grasa y tejido conectivo y a través de ella se insertó la cánula de acero inoxidable a la que se fijó la aorta con un hilo. De esta manera, el corazón se perfundió retrógradamente con solución nutritiva. El volumen de perfusión se ajustó a un flujo constante de 20 ml/min para los valores basales.

Cuando el corazón se encontró sujeto a la cánula y, por lo tanto, perfundido, se localizó el orificio de la vena pulmonar; a través de él y atravesando la válvula mitral, se introdujo el balón de látex en el ventrículo izquierdo (Gonzalez y cols., 2011).

### **2.2.3 - Parámetros valorados**

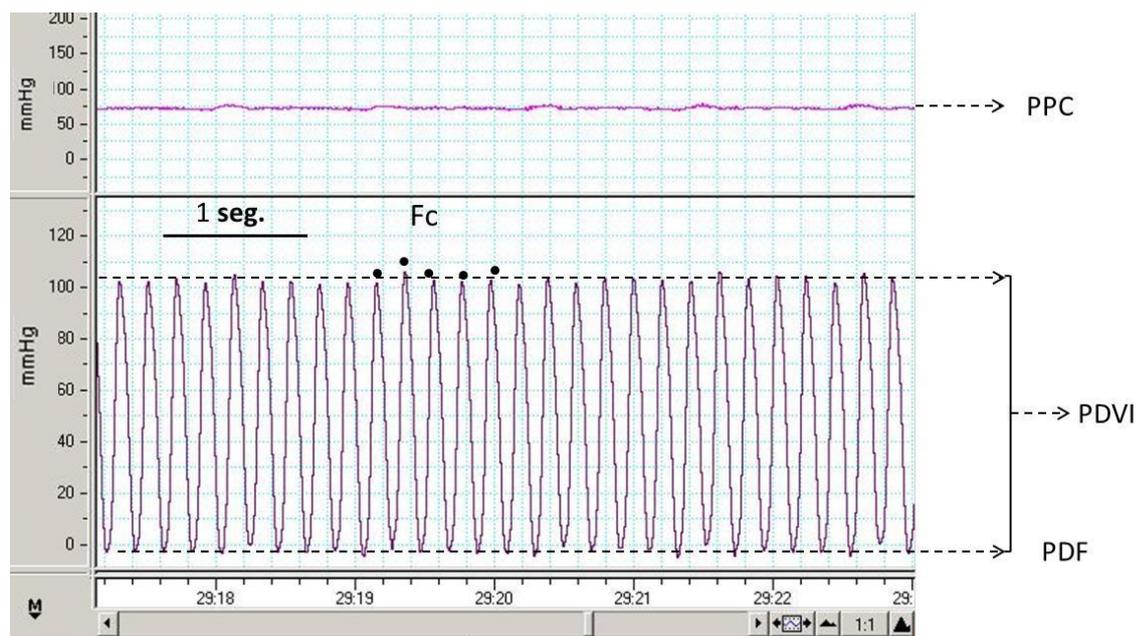
Los parámetros de función cardíaca valorados fueron (Figura 18):

- Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) Cuando se mantiene un flujo de perfusión constante, como es nuestro caso (20 ml/min), este valor es una función directa del diámetro de los vasos coronarios.

- Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) calculada como la diferencia entre los valores de presión sistólica y diastólica ventricular. Este parámetro es un indicador de la contractilidad miocárdica.

- Presión Diastólica Final (PDF) calculada como el valor mínimo de presión ejercida por el ventrículo izquierdo en la diástole ventricular. Esta presión fue fijada al principio del experimento entre 5 y 10 mmHg ajustando el volumen del balón de látex.

- Frecuencia Cardíaca (Fc) calculada a partir de la señal obtenida de la presión ventricular izquierda.

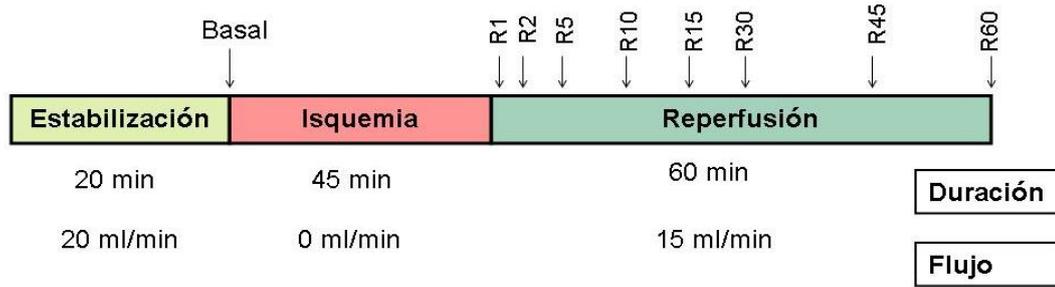


**Figura 18:** Esquema de los parámetros de función cardíaca valorados. PPC Presión de Perfusión de las Coronarias, PDVI Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo, PDF Presión Diastólica Final, Fc Frecuencia Cardíaca.

#### 2.2.4 - Protocolo experimental.

Una vez aislados los corazones, éstos se mantuvieron durante un periodo de estabilización de 20 minutos con un flujo constante de 20 ml/min para recoger los parámetros de función cardíaca basal. A continuación los corazones fueron sometidos a un periodo de isquemia global (0 ml/min) de 45 minutos seguido de 60 minutos de reperfusión. La recuperación funcional cardíaca se optimizó durante la reperfusión reduciendo el volumen del flujo en la reperfusión al 75% del flujo pre-isquémico inicial; esto es, 15 ml/min (Randall y cols., 1997). Durante los 60 minutos de la reperfusión, la función cardíaca fue monitorizada de forma continua (Figura 19).

Los parámetros cardíacos se tomaron tras los 20 minutos de estabilización (Basal) y a lo largo del periodo de reperfusión en el minuto 1 (R1), minuto 2 (R2), minuto 5 (R5), minuto 10 (R10), minuto 15 (R15), minuto 30 (R30), minuto 45 (R45) y minuto 60 (R60).



**Figura 19:** Esquema del protocolo experimental llevado a cabo en la valoración de la función cardiaca basal y tras el periodo de isquemia/reperusión en los corazones de los diferentes grupos experimentales. R – Reperusión. Minutos: 1 (R1), 2 (R2), 5 (R5), 10 (R10), 15 (R15), 30 (R30), 45 (R45) y 60 (R60).

Además, en todos estos puntos temporales, se recogieron muestras de eluyente que se mantuvieron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores determinaciones bioquímicas (ver apartado 5.2 de Material y Métodos).

### 2.3. ÍNDICE DE MASAS

Una vez finalizado el experimento de función cardiaca, el corazón fue pesado con el fin de determinar los índices de masas del corazón. Se eliminó todo el tejido que pudiera estar adherido al corazón, y se pesó éste en su totalidad, obteniéndose así el peso del corazón. Posteriormente, las aurículas se cortaron y se eliminó la pared del ventrículo derecho, dejando aislado el ventrículo izquierdo (que incluye el septo y la pared del ventrículo izquierdo), y una vez aislado también fue pesado, obteniéndose así el peso del ventrículo izquierdo (Bregagnollo y cols., 2007).

A partir de estos valores se calcularon:

- Índice de masa cardiaca (IMC) calculado como peso del corazón (mg)/peso corporal (g)

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) calculado como peso del ventrículo izquierdo (mg)/ peso corporal (g).

Posteriormente, el ventrículo izquierdo se mantuvo congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores determinaciones de expresión de proteínas mediante Western-Blot (ver apartado 5.3 de Material y Métodos).

### 3 - CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES CANNABINOIDES (CB1 Y CB2) MEDIANTE WESTERN-BLOT.

Como ya se anticipó en el apartado 1.1 de la metodología, en esta Tesis Doctoral, se quiso conocer si en el desarrollo de la neuropatía autonómica cardiovascular se producían modificaciones en el sistema endocannabinoide a nivel cardiovascular. Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) en músculo cardiaco utilizando muestras de ventrículo izquierdo recogidas, en el caso de los animales tratados con CPT, tras las 5 semanas de tratamiento, y en el caso de los animales ZDF, cuando estos alcanzaron las 20 semanas de vida.

Tras la homogeneización del tejido, se realizó la determinación y ajuste de los niveles de proteínas en las muestras de homogeneizado de corazón. Las proteínas se separan por electroforesis mediante el sistema Mini-Protean (Biorad) utilizando los correspondientes geles comerciales (Biorad), y con un tampón de electroforesis (Tris-glicina/SDS) durante 30 minutos. A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF (Biorad) con un tampón de transferencia (Tris-glicina/metanol) durante 40 minutos. Después, las membranas son bloqueadas durante otra hora, a temperatura ambiente mediante un buffer de bloqueo (Biorad).

Las membranas ya bloqueadas se incuban toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario específico que fueron los siguientes:

- Anticuerpos policlonales de conejo para CB<sub>1</sub> (Affinity Bioreagent) en una dilución 1:500 en buffer TTBS (Tris-salino/Tween 20).
- Anticuerpos policlonales de conejo para CB<sub>2</sub> (Cayman Chemical Company) en una dilución 1:500 en buffer TTBS (Tris-salino/Tween 20).

- Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control usando anticuerpos monoclonales de ratón (Abcam) en una dilución 1:5000 en buffer TTBS (Tris-salino/Tween 20).

Al día siguiente, las membranas fueron lavadas y posteriormente incubadas durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-rabbit/anti-mouse IgG que tiene ligada una fosfatasa alcalina (Thermo scientific, U.S.A.) diluido 1:10000 en buffer TTBS. Por último las membranas se lavan de nuevo y se tratan con reactivo ECF (*EnhancedChemi-Fluorescence*) (Amersham Biosciences, U.S.A.) y se revelan mediante quimiofluorescencia. La fosfatasa alcalina cataliza la conversión del sustrato ECF en un producto fluorescente a 540-560nm. Para el escaneado y cuantificación de proteínas se utiliza el escáner de fluorescencia modelo Tiphon 9210 (General Electric Healthcare).

La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría con el programa *Image J*, que es de libre disposición en la red.

#### **4 - EVALUACIÓN DE CONEXINA 43 EN VENTRÍCULO IZQUIERDO DE LOS ANIMALES TRATADOS CON CISPLATINO.**

Se evaluó si existían alteraciones en la expresión de Conexina 43 en los corazones de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas. Para ello se valoró la existencia de dicha proteína en cortes histológicos y se cuantificó su expresión mediante Western-Blot.

##### **4.1 PREPARACIONES HISTOLÓGICAS**

Los corazones procedentes de los animales tratados crónicamente con CPT o salino (considerados como grupo control) se fijaron en solución de formaldehído al 10 % en PBS, para su posterior inclusión en parafina. Una vez embebidos en parafina se cortaron con micrótopo en secciones de 5 mm. A continuación, las preparaciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) y posteriormente se marcaron con anticuerpo para Conexina 43. La observación se realizó con un microscopio bajo el objetivo de 20 aumentos.

##### **4.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CONEXINA 43 MEDIANTE WESTERN-BLOT.**

Con el fin de conocer si los niveles de expresión de la Conexina 43 se encontraban alterados en los animales tratados crónicamente con CPT, se procedió a cuantificar mediante Western-Blot los niveles de esta proteína en homogeneizados de ventrículo izquierdo de corazones procedentes de estos animales. Se siguió una metodología muy similar a la detallada anteriormente (ver apartado 3 de Material y Métodos) para el caso de receptores cannabinoides CB1 y CB2 para homogeneizar y determinar la cantidad de proteína del tejido. Únicamente, mencionar que en este caso, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario específico

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

para Conexina 43: anticuerpos de ratón para Conexina 43 (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:10000 en buffer TTBS (Tris-salino/Tween 20). Como control se utilizó Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando anticuerpos de ratón (Abcam) en una dilución 1:5000 en buffer TTBS (Tris-salino/Tween 20).

## 5 - TRATAMIENTOS CON CANNABINOIDES

Una vez establecidos los modelos de neuropatía y evaluados, tanto el desarrollo de neuropatía autonómica cardiovascular como la modificación de la expresión de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) a nivel cardiaco, se determinó, cuando procedió, si el tratamiento con cannabinoides podría afectar a los parámetros cardiovasculares estudiados.

Para ello, los animales se dividieron en grupos de 5-7 para los diferentes tratamientos con cannabinoides:

- **Vehículo** (grupo control) (VEH). Los animales recibieron una inyección i.p. de una mezcla de Tocrisolve® : solución salina (v/v, 1:9) (Ver apartado 6.4 de Material y Métodos)
- **Win 55,212-2** (Win). Los animales recibieron una inyección i.p. del agonista mixto Win a la dosis de 1mg/Kg.
- **AM251** (AM251). Los animales recibieron una inyección i.p. del antagonista selectivo CB1, AM251 a la dosis de 1mg/Kg.
- **AM630** (AM630). Los animales recibieron una inyección i.p. del antagonista selectivo CB2, AM630 a la dosis de 1mg/Kg.
- **AM251 + Win** (AM251+Win) Los animales recibieron una inyección i.p. de AM251 (1mg/Kg) seguida, 20 minutos después, de una inyección i.p. de Win (1 mg/Kg).
- **AM630 + Win** (AM630+Win). Los animales recibieron una inyección i.p. de AM630 (1mg/Kg) seguida, 20 minutos después, de una inyección i.p. de Win (1 mg/Kg).

El volumen máximo administrado en los animales por vía i.p. fue de 0.5 ml. La administración de la dosis de Win (1 mg/Kg) se eligió teniendo en cuenta que es efectiva para complicaciones como la neuropatía periférica sensorial en modelos experimentales de diabetes (Vera y cols., 2012) y de neuropatía iatrogénica por la administración de cisplatino (Vera y cols., 2007).

Los diferentes tratamientos se administraron tras anestésiar al animal y canular la arteria carótida (ver apartado 2.1 de Material y Métodos). El protocolo experimental seguido queda reflejado en la Figura 20.

Se tomaron valores de los parámetros de presión arterial analizados (ver apartado 2.1.2 de Material y Métodos) a los 10 minutos tras la canulación de la carótida (Basal), 30 minutos tras la canulación de la carótida, (tiempo que se correspondió con el efecto máximo del tratamiento) y 50 minutos tras la canulación de la carótida (tiempo en que el efecto había desaparecido).



**Figura 20:** Esquema del protocolo experimental llevado a cabo en la medida de presión arterial en los animales tratados con cannabinoides.

Tras el registro de presión arterial, se llevó a cabo la evaluación de la función cardíaca (ver apartado 2.2 de Material y Métodos) de los animales.

## 6 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES.

En aquellos grupos experimentales en los que la administración de los cannabinoides causó modificación en los parámetros cardiovasculares estudiados, se llevaron a cabo determinaciones bioquímicas y moleculares con el fin de dilucidar el posible mecanismo implicado en dicho efecto.

Las determinaciones bioquímicas y moleculares que se llevaron a cabo fueron las siguientes:

### 6.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICAS DE LOS NIVELES DE MALONILDIALDEHIDO (MDA).

Una vez medida la presión arterial y en el momento del sacrificio del animal, la sangre se recogió en tubos eppendorf que contenían citrato al 3.15% como anticoagulante. Se centrifugaron a 3600rpm durante 30 minutos a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación se separó el plasma y se mantuvo congelado a -80°C.

Los niveles plasmáticos de MDA se midieron mediante una reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Álvarez y cols., 2007). Las muestras de plasma se mezclaron en una proporción 1:1 v/v con ácido tricloracético (Sigma Aldrich, Madrid, España) 0.6M en HCl (Panreac, Barcelona, España). Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 20 minutos con el fin de precipitar las proteínas presentes en el plasma y eliminar cualquier interferencia. Transcurridos estos 20 minutos, las muestras se centrifugaron a 1500g durante 15 minutos y se aisló el sobrenadante libre de proteínas. A este sobrenadante se le añadió en una proporción 1:5 v/v TBA (Sigma aldrich, Madrid, España) 120mM disuelto en tampón Tris (Sigma Aldrich, Madrid, España) 260mM a pH7. Esta mezcla se mantuvo a 97°C durante 30 minutos para favorecer la reacción entre el MDA y el TBA, formándose un compuesto MDA-TBA (1:2). Este compuesto, de coloración rojiza, tiene

un coeficiente de absorción molar de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en el espectro visible (535nm). Para la medida de la absorbancia, se pusieron 190  $\mu\text{l}$  de la mezcla resultante en placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro (Biotek HT Synergy, Estados Unidos). La concentración de MDA se calcula a partir de la absorbancia según la ley de Lambert-Beer.

$$A = C \times a \times B$$

Donde: A = absorbancia.

C = concentración de MDA

a = coeficiente de absorción molar.

b = longitud de la muestra (para 190  $\mu\text{l}$  corresponde con 0.6 cm)

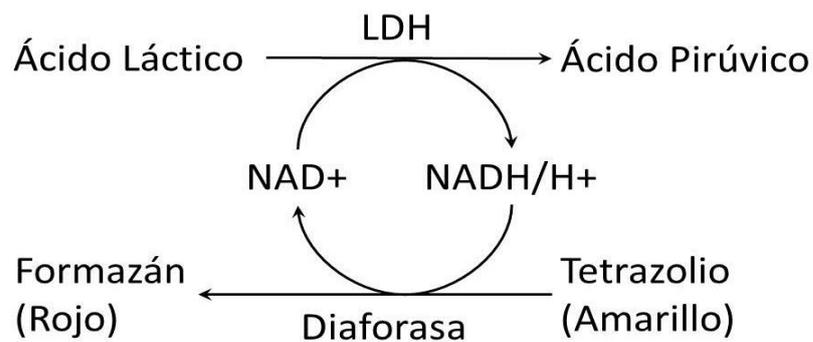
### **6.2 – CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) EN MUESTRAS DE ELUYENTE DE CORAZÓN.**

La LDH es una enzima intracelular que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo. Ante una destrucción de tejido, como es el caso de un infarto de miocardio, la LDH pasa a la sangre, por lo que se utiliza como prueba indicativa de la existencia de muerte celular.

Como indicador de necrosis miocárdica, se midieron los niveles de LDH presentes en el eluyente de la perfusión de corazón. Se recogieron muestras de este eluyente en todos los puntos temporales (ver apartado 2.2.4 de Material y Métodos) y se mantuvieron congelados a  $-80^\circ\text{C}$ .

Los niveles de LDH se midieron usando un kit comercial (Roche-Boehringer, Mannheim, Alemania), que consiste en un método colorimétrico que permite la medición de la actividad del LDH utilizando una mezcla de reactivos que contiene lactato,

NAD<sup>+</sup>(nicotinamida adenina dinucleótido), diaforasa y sal de tetrazolio. En un primer paso, el NAD<sup>+</sup> es reducido a NADH/H<sup>+</sup> por la enzima LDH al catalizar la transformación de lactato a piruvato. En un segundo paso, se mide la formación de NADH/H<sup>+</sup> en la reacción anterior mediante una reacción acoplada en la que la diaforasa (un catalizador incluido en la mezcla de reacción) transfiere el H<sup>+</sup> del NADH/H<sup>+</sup> a la sal de tetrazolio (de color amarillo); este por lo tanto se reduce, dando como producto formazán, lo que confiere a la solución color rojo. Los dos pasos de reacción se encuentran ilustrados en la figura 21. La cantidad e intensidad de color debido al formazán solubilizado puede medirse espectrofotométricamente a 490 nm.



**Figura 21:** Esquema de los dos pasos de reacción enzimática que permite la medición de la actividad de la LDH. LDH Lactato Deshidrogenasa, NAD<sup>+</sup> nicotinamida adenina dinucleótido, NADH/H<sup>+</sup> nicotinamida adenina dinucleótido reducido.

El porcentaje de LDH se calculó mediante la fórmula:  $[LDH]_{test}/[LDH]_{control} \times 100$  (Lee y cols., 2010).

Donde: [LDH] test = niveles de LDH en el eluyente.

[LDH] control = Niveles de LDH en el medio control.

### 6.3 - CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS) Y ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL (eNOS) MEDIANTE WESTERN-BLOT.

El óxido nítrico (NO) derivado del endotelio es generado fisiológicamente dentro de los cardiomiocitos por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y contribuye a la modulación de la relajación miocárdica, el tono diastólico y el consumo de oxígeno. Sin embargo, en ciertos estados patológicos, como la DM, se expresa en los cardiomiocitos la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS). Este hecho parece contribuir a la disfunción miocárdica asociada a estas patologías.

Con el fin de comprobar si en balance en la expresión de iNOS/eNOS estaba implicado en este caso, se cuantificaron los niveles de expresión ambas enzimas en músculo cardiaco utilizando las muestras de ventrículo izquierdo recogidas tras los correspondientes experimentos y que se habían mantenido congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Gonzalez y cols., 2011).

Tras la homogeneización del tejido, se realizó la determinación y ajuste de los niveles de proteínas en las muestras de homogeneizado de corazón. A continuación, las muestras fueron mezcladas con tampón de muestra Laemmli (BioRad, Estados Unidos) (SDS 10%, H<sub>2</sub>O destilada, glicerol 50%, Tris HCl 1M pH 6,8, ditioneitol y azul de bromofenol) con beta mercaptoetanol (50  $\mu\text{L}$  por mL de Laemmli). Posteriormente 20  $\mu\text{L}$  (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de esta mezcla se colocaron en un gel de electroforesis. Una vez separadas las proteínas por peso molecular en el gel, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Reino Unido) por un sistema de transferencia semihúmeda (BioRad, Estados Unidos) incubándose con los anticuerpos específicos correspondientes que fueron los siguientes:

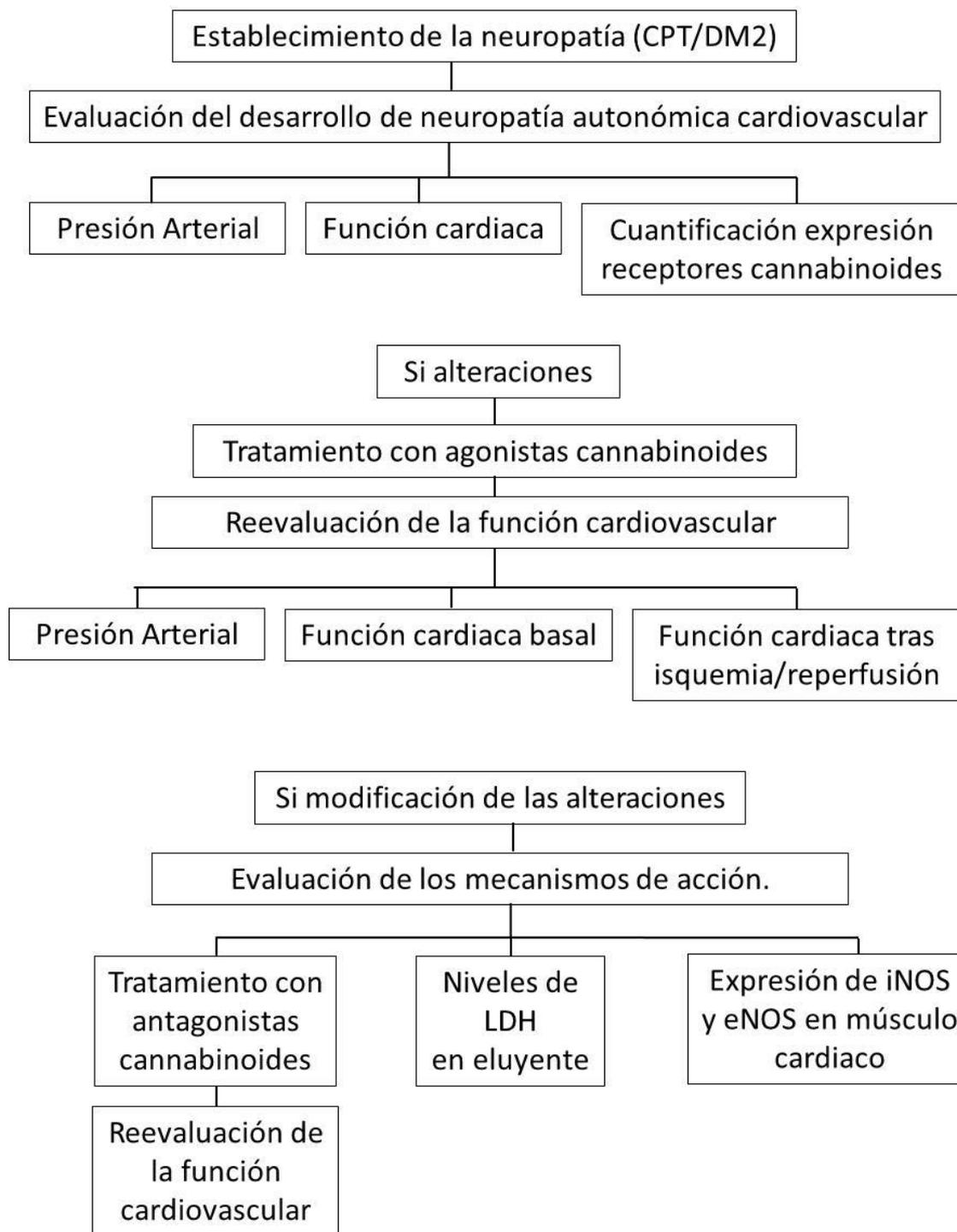
a) Anticuerpos policlonales de conejo para la iNOS (Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos) en una dilución 1:1000 en TBS-Tween.

b) Anticuerpos policlonales de conejo para la eNOS (Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos) en una dilución 1:1000 en TBS-Tween.

c) Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno usando anticuerpos monoclonales de ratón (Ambion, Austin, Tejas, Estados Unidos) que reconoce la totalidad de moléculas de GAPDH.

Las proteínas marcadas con los anticuerpos fueron visualizadas mediante una película de rayos X por quimioluminiscencia siguiendo las recomendaciones del proveedor (Amersham ibérica, Madrid, España). La autorradiografía fue cuantificada por densitometría con el programa *Image J*.

En la Figura 22 se encuentra representado un esquema del protocolo experimental llevado a cabo en esta Tesis Doctoral.



**Figura 22:** Esquema general del protocolo experimental llevado a cabo en esta Tesis Doctoral. CPT- cisplatino, DM2 Diabetes Mellitus tipo 2, LDH Lactato Deshidrogenasa, iNOS-Óxido Nítrico Sintasa Inducible, eNOS- Óxido Nítrico Sintasa Endotelial.

## 7 SOLUCIONES Y FÁRMACOS UTILIZADOS

### 7.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN NUTRICIA DE KREBS-HENSELEIT.

Como solución nutricia para la realización de los experimentos se ha utilizado la solución fisiológica de Krebs-Henseleit modificada para corazón, que fue desarrollada por Hans Krebs y Kurt Henseleit en 1932 (Krebs y cols., 1932).

Consiste en una solución de agua bidestilada que contiene una concentración de iones, sales y nutrientes equivalente a la que encontraríamos en los fluidos corporales.

La composición de esta solución está detallada en la tabla 2.

**Tabla 2:** Composición de la solución nutricia de Krebs-Henseleit modificada para corazón.

SOLUCIÓN KREBS-HENSELEIT	CONCENTRACIÓN
NaCl	118 mM
KCl	4.7 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
D(+)- Glucosa anhidra	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
Piruvato	2 mM

En el caso de los animales con DM2, no se añadió piruvato a la solución de Krebs-Henseleit, ya que en la bibliografía consultada no añadían este elemento en la solución nutricia para la perfusión de corazones de animales ZDF.

Las diferentes sales y la glucosa necesarias para la preparación de la solución de Krebs-Henseleit modificada fueron suministradas por Panreac Química S.A., (Barcelona, España).

### 7.2 - SOLUCIONES UTILIZADAS PARA WESTERN-BLOT.

Las diferentes soluciones utilizadas para la determinación de la expresión de proteínas mediante Western-Blot se prepararon de la siguiente manera:

- **Tampón de electroforesis (Tris-glicina/SDS).** El tampón utilizado para la electroforesis se elaboró diluyendo el tampón Tris-glicina/SDS comercial (Biorad) (10X) en agua bidestilada en una proporción 1:10, añadiendo metanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en una proporción 2:10 y SDS 10% (sodio dodecil sulfato) en una concentración final del 0.1%.
- **Tampón de transferencia (Tris-glicina/metanol).** El tampón utilizado para la transferencia se elaboró diluyendo el tampón Tris-glicina/metanol comercial (10X) (Biorad) en agua bidestilada en una proporción 1:10.
- **Buffer TTBS (Tris-salino/Tween 20).** Se elaboró diluyendo el tampón TBS Tris-salino comercial (10X) (Biorad) en agua bidestilada en proporción 1:10 y añadiendo Tween 20 (Biorad) en una proporción final de 0.05%.
- **Buffer de bloqueo.** Se elaboró diluyendo en tampón TTBS un 3% de leche en polvo desnatada (Biorad).

### 7.3 – FÁRMACOS UTILIZADOS

- **AM251** (N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2, 4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide). Suministrado por Tocris Cookson Ltd., (Bristol, Reino Unido).
- **AM630** (6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl) ethyl]-1H-indol-3-yl] (4-methoxyphenyl) methanone). Suministrado por Tocris Cookson Ltd., (Bristol, Reino Unido).
- **Cisplatino**. (*cis*-Diammineplatinum (II) dichloride). Suministrado por Sigma-Aldrich (España).
- **Tocrisolve®** Suministrado por Tocris Cookson Ltd., (Bristol, Reino Unido).
- **Win 55,212-2** (R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl) pyrrolo [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate). Suministrado por Tocris Cookson Ltd., (Bristol, Reino Unido).

### 7.4– DISOLUCIÓN DE LOS FÁRMACOS

- **CPT**. Se disolvió en solución salina (NaCl 0.9%) y fue sonicado hasta su completa disolución.

Dado que los cannabinoides son compuestos muy liposolubles y la disolución de estos compuestos supone un problema adicional, utilizamos diferentes vehículos para la disolución de los diferentes compuestos cannabinoides empleados en esta Tesis Doctoral.

- **AM251 y AM630** se disolvieron de la siguiente manera: la cantidad de antagonista correspondiente al peso del animal, se disolvió en etanol absoluto (Panreac Química S.A., Barcelona, España) en una proporción 1:1 (p/v) y posteriormente se añadió (1:1, v/v) una mezcla de etanol (Panreac Química S.A., Barcelona, España): Tween 80 (Merck, Schuchardt, Alemania) (1:2, p/p). Posteriormente, el etanol se eliminó por evaporación en una bomba de vacío, y una vez eliminado, se fue añadiendo suero salino (en volúmenes crecientes) hasta un total de 0.5 ml de homogeneizado (Pertwee y cols., 1992).
- **Vehículo de Win.** Una mezcla de Tocrisolve® y solución salina (NaCl 0.9%) en una proporción 1:9 v/v; de forma similar al procedimiento seguido para la disolución del Win pero sin añadir el cannabinoide.
- **Win.** Se disolvió primero en Tocrisolve® en una proporción de 50 µl por cada 0.4 mg de Win, y posteriormente se añadió solución salina en una proporción 1:9 v/v.

## 8 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las unidades de medida de cada uno de los parámetros valorados en esta Tesis

Doctoral se encuentran detalladas en la tabla 3:

**Tabla 3:** Unidades de medida de los diferentes parámetros evaluados.

PARÁMETRO	UNIDADES
Peso	g
Glucemia	mg/dl
Lípidos (Colesterol, HDL, Triglicéridos)	mg/dl
Presión arterial (PAM / PAS / PAD)	mm Hg
Fc	Latidos por minuto (lpm)
PPC	mm Hg
PDVI	mm Hg
PDF	mm Hg
Índices de masas (IMC / IMVI)	mg/g
MDA	$\mu$ M
LDH	% (respecto al control)
Expresión Proteica	Unidades Arbitrarias (U.A.)
Insulina	$\mu$ g / l / islote

Los valores de los parámetros estudiados en esta Tesis Doctoral se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.) de los datos obtenidos de los grupos de animales ( $n$ ). Ésta puede variar entre 6-9 en el caso de la neuropatía por administración de CPT. En el caso de los animales LEAN y ZDF la  $n$  puede variar entre 15-20 para parámetros generales y entre 4-7 para los parámetros evaluados en

los animales tratados, ya que en este último caso los animales se subdividieron en grupos de tratamiento.

Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa informático Prisma 4 (*GraphPad Software Inc*).

La comparación estadística de los parámetros estudiados entre los distintos grupos experimentales se ha evaluado mediante la realización de un análisis de la varianza (test ANOVA) de una/dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni.

Se han considerado diferencias estadísticamente significativas valores de  $P \leq 0.05$ .

# RESULTADOS



En este apartado se detallarán los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. En primer lugar se expondrá la caracterización de las alteraciones cardiovasculares en un modelo de neuropatía cardiovascular inducida por Cisplatino (CPT) y en segundo lugar la caracterización de las alteraciones cardiovasculares en un modelo de neuropatía cardiovascular inducida por Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Una vez caracterizadas estas alteraciones se evaluará la modificación de la expresión a nivel cardíaco de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) y en los casos que procedan, el efecto del tratamiento con cannabinoides sobre los parámetros cardiovasculares estudiados.

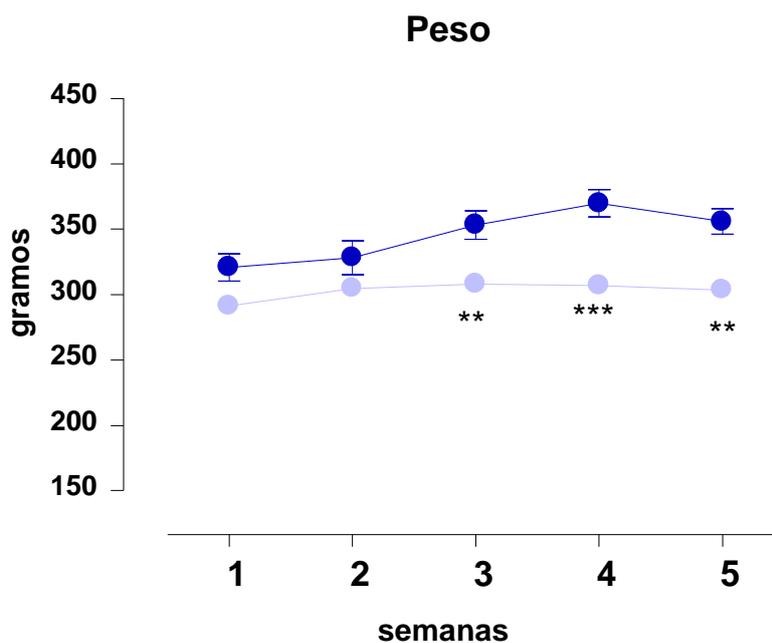
# 1 MODELO DE NEUROPATÍA POR CISPLATINO: ALTERACIONES CARDIOVASCULARES

## 1.1 PARÁMETROS GENERALES

### 1.1.1 Peso

Los animales del grupo CPT 2 mg/Kg y los animales del grupo Control (Salino) mostraron un peso similar al inicio del protocolo experimental (CPT:  $291.30 \pm 8.12$  g (n=10)  $P > 0.05$  vs Salino:  $320.60 \pm 10.37$  g (n=15),  $P > 0.05$ ).

Los animales del grupo Control mostraron a lo largo de todo el seguimiento un aumento en la ganancia de peso corporal; sin embargo, los animales del grupo CPT 2 mg/kg mantuvieron el peso a lo largo de las 5 semanas de tratamiento con dicho antitumoral, no produciéndose un aumento en la ganancia de peso de los animales. Hay que señalar además, que el peso de los animales del grupo CPT 2 mg/Kg fue significativamente menor que el correspondiente al mismo punto temporal en animales Control a partir de la 3ª semana de tratamiento. Así, en la 3ª semana de tratamiento y en la 5ª (última semana de tratamiento) los valores de peso fueron: CPT:  $308 \pm 5.45$  g (n=10) vs Salino:  $353.20 \pm 10.72$  g (n=15)  $P < 0.01$ , y CPT:  $303.40 \pm 3.85$  g (n=10) vs Salino:  $377.47 \pm 10.56$  g (n=15)  $P < 0.01$  (Figura 22), respectivamente.



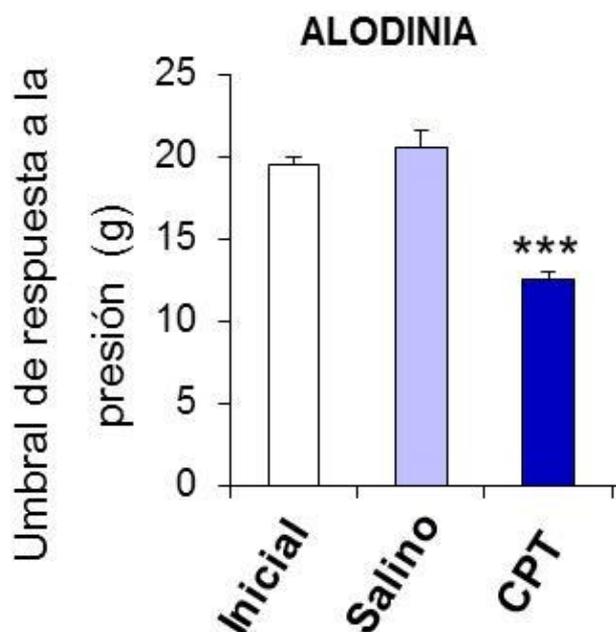
**Figura 22.** Evolución del peso corporal de los animales tras el tratamiento semanal durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/kg i.p. (CPT) o el tratamiento con Salino (Salino) considerado grupo Control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Salino).

Por tanto, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas provocó una reducción en la ganancia de peso de los animales.

### 1.1.2 Neuropatía periférica sensorial

Con el fin de evaluar el desarrollo de neuropatía periférica en estos animales, se evaluó la alodinia, medida como umbral de respuesta a la presión, mediante la técnica de los filamentos de Von Frey al final del tratamiento con el antitumoral. En la Figura 23 se representa el umbral de respuesta a la presión antes de comenzar el tratamiento (Inicial) y tras 5 semanas de tratamiento con Salino (Control) o CPT 2 mg/kg. Al final del

tratamiento, los animales tratados con Salino no mostraron alteraciones en su umbral de respuesta a la presión, sin embargo, los animales tratados con CPT 2 mg/Kg vieron disminuido significativamente dicho umbral de respuesta.



**Figura 23.** Umbral de respuesta a la presión antes de comenzar el tratamiento (Inicial) y tras un tratamiento semanal durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg (CPT) i.p. o Salino i.p. (Salino), considerado grupo Control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs Salino).

Por lo tanto, se puede afirmar que el tratamiento con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas provocó neuropatía periférica sensorial en estos animales.

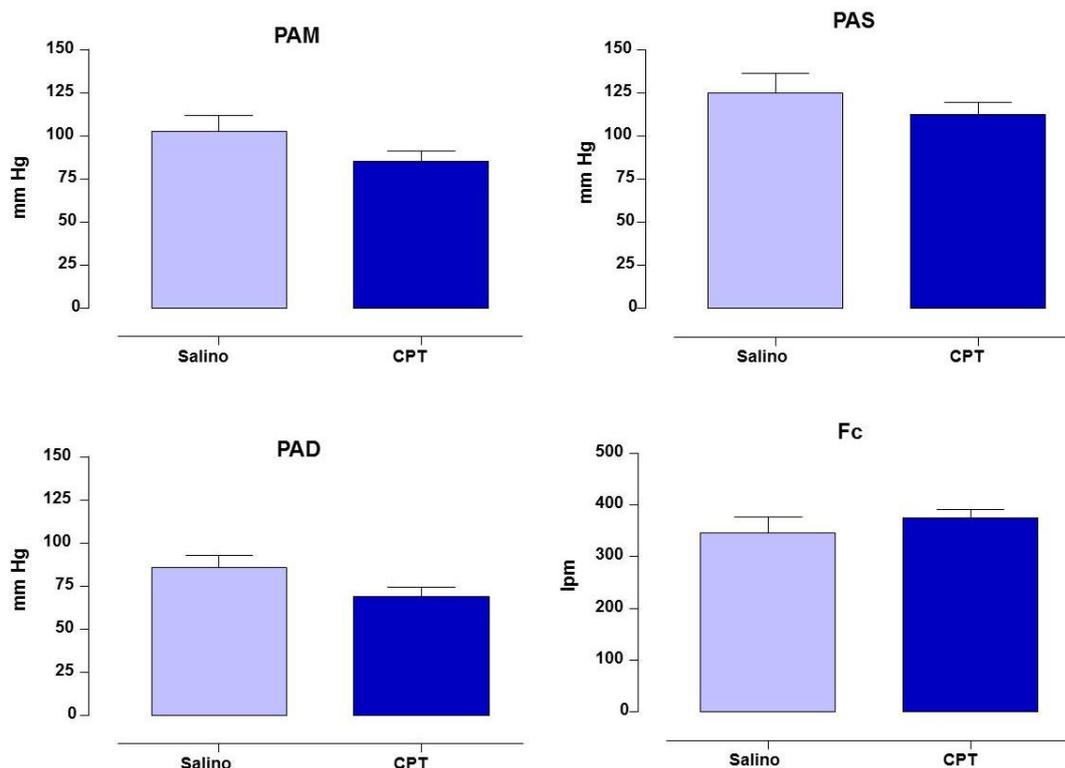
## 1.2 PARÁMETROS CARDIOVASCULARES

Para investigar el desarrollo de neuropatía autonómica a nivel cardiovascular tras el tratamiento con CPT2mg/kg durante 5 semanas, se seleccionaron como parámetros a evaluar: la medida de presión arterial directa *in vivo* y la función cardíaca *in vitro*.

### 1.2.1 Presión arterial

Como se ha detallado en el apartado de metodología de esta Tesis Doctoral, se valoró, de manera directa por canulación, la presión arterial y frecuencia cardíaca de los animales de los diferentes grupos experimentales al finalizar los distintos tratamientos (Salino o CPT 2 mg/kg i.p. semanalmente durante 5 semanas).

En la Figura 24 se muestran los valores de Presión Arterial Media (PAM), Sistólica (PAS), Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardíaca (Fc) obtenidos al final de los diferentes tratamientos (5 semanas). El grupo de animales tratado con CPT2 mg/kg mostró valores de PAM, PAS, PAD y Fc similares a los obtenidos en los animales del grupo Control (Salino). Así, PAM: CPT:  $85,36 \pm 6,14$  mmHg (n=9) vs Salino:  $102,82 \pm 8,71$  mmHg (n=6),  $P > 0.05$ ; PAS: CPT:  $112,48 \pm 7,06$  mmHg (n=9) vs Salino:  $125,08 \pm 11,13$  mmHg (n=6),  $P > 0.05$ ; PAD: CPT:  $68,69 \pm 5,75$  mmHg (n=9) vs Salino:  $85,60 \pm 7,30$  mm Hg (n=6),  $P > 0.05$ ; Fc: CPT:  $374,62 \pm 16,63$  latidos/minuto (n=9) vs Salino:  $346,08 \pm 30,92$  latidos/minuto (n=6),  $P > 0.05$ .



**Figura 24.** Presión Arterial Media (PAM), Sistólica (PAS), Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardíaca (Fc) de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o tratados con Salino (Control). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Lpm Latidos por minuto.

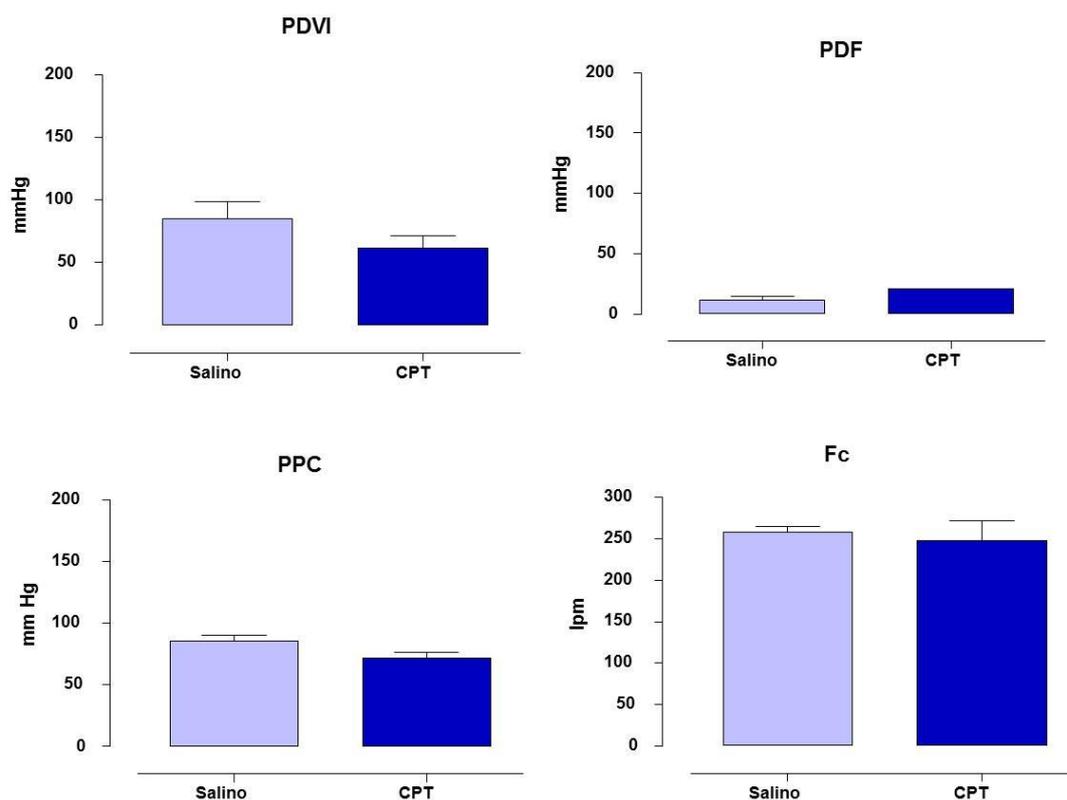
Por tanto, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg durante 5 semanas no modificó ni la presión arterial ni la frecuencia cardíaca en los animales.

### 1.2.2. Función cardíaca basal

Para determinar si el tratamiento con CPT 2 mg/kg afectaba la función cardíaca basal de los animales, se evaluó la misma en la preparación de corazón aislado y perfundido tras los diferentes tratamientos llevados a cabo (Salino o CPT 2 mg/kg i.p. semanalmente durante 5 semanas).

---

En la figura 25 se muestran los diferentes parámetros de función cardiaca valorados en los dos grupos experimentales (Salino y CPT 2 mg/Kg). El tratamiento de los animales con CPT 2 mg/Kg no produjo ninguna alteración en los parámetros de función ventricular izquierda evaluados (Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF)), en el flujo coronario (Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC)) y en la Frecuencia Cardiaca (Fc), obteniéndose en este grupo experimental valores similares al grupo de animales tratados con Salino (grupo Control). Así, PDVI:CPT:  $62,00 \pm 9,56$  mmHg (n=5) vs Salino:  $85,54 \pm 13,36$  mmHg (n=9),  $P > 0.05$ ; PDF: CPT:  $20,69 \pm 0,64$  mmHg (n=5) vs Salino:  $11,85 \pm 3,12$  mmHg (n=9),  $P > 0.05$ ; PPC: CPT:  $72,20 \pm 3,99$  mmHg (n=5) vs Salino:  $85,44 \pm 5,02$  mmHg (n=9),  $P > 0.05$ ; Fc: CPT:  $247,44 \pm 23,80$  lpm (n=5) vs Salino:  $258,37 \pm 6,62$  lpm (n=9),  $P > 0.05$ .



**Figura 25.** Parámetros de función cardiaca basal (Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardiaca (Fc)) de corazones de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o tratados con Salino (Control). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Lpm latidos por minuto.

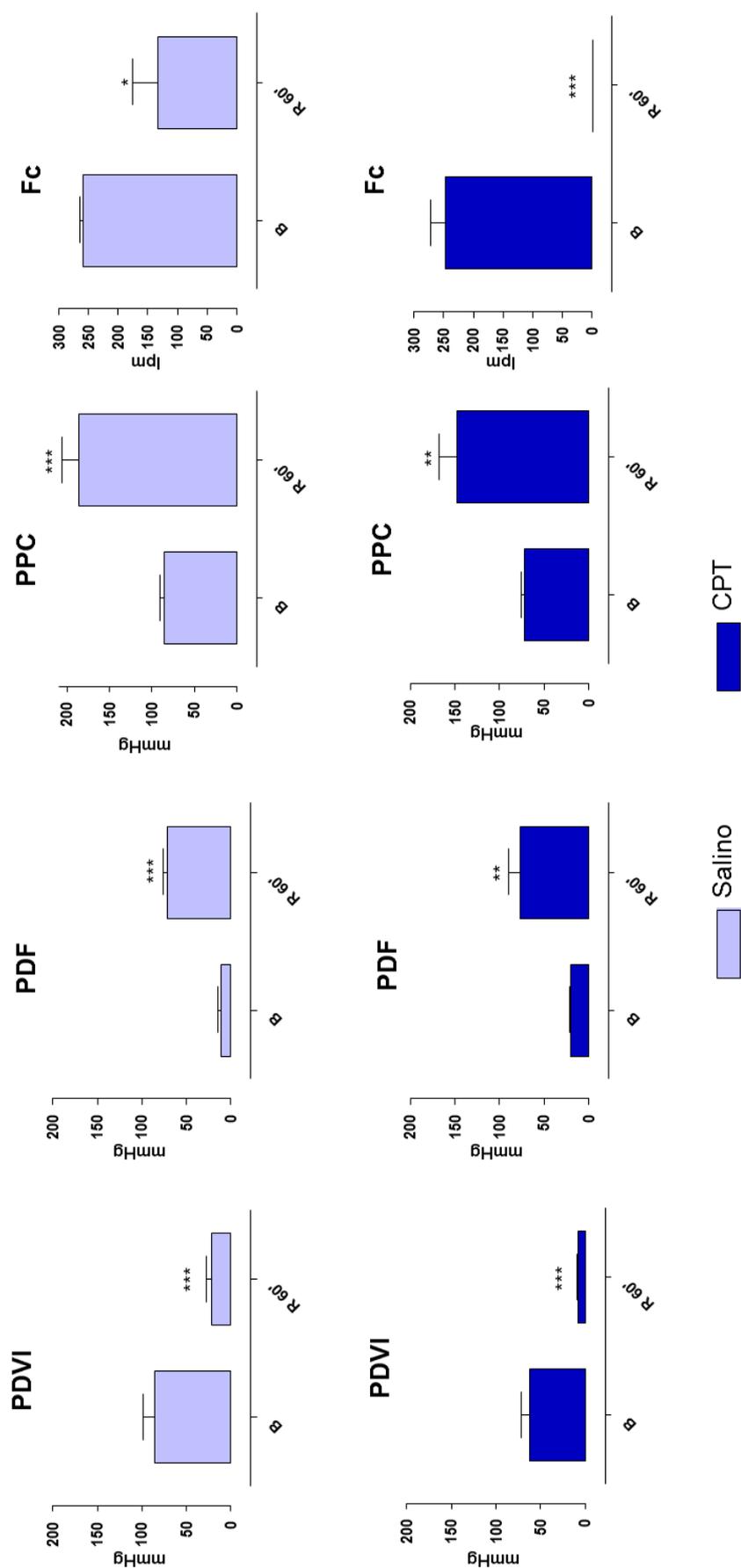
Estos resultados muestran, por tanto, que el tratamiento con CPT 2 mg/Kg durante 5 semanas no provocó alteraciones significativas en la función cardiaca basal de los animales.

### 1.3 FUNCIÓN CARDIACA TRAS ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

A pesar de que no se observaron alteraciones en los parámetros de funcionalidad cardiaca basal en los corazones tras el tratamiento con CPT 2 mg/Kg durante 5 semanas, se sabe que el tratamiento con antitumorales aumenta el riesgo de padecer isquemia cardiaca (Yeh y cols., 2004). Además, el daño cardiaco causado por el proceso de isquemia reperfusión (I-R) podría ser mayor en corazones tras el tratamiento con antitumorales que en corazones no sometidos a estos tratamientos. Por ello, se quiso evaluar si el daño por I-R era mayor en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg i.p. semanalmente durante 5 semanas que en animales Control, tratados con Salino con ese mismo protocolo de administración.

Tras un proceso de I-R tanto la función cardiaca de animales tratados con Salino como la de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg se daña claramente, disminuyendo de forma significativa la capacidad contráctil (PDVI) y dilatadora (PDF) ventricular izquierda y la frecuencia cardiaca (Fc), así como incrementándose también de forma significativa la presión de perfusión de las coronarias (PPC). En la figura 26 se muestran las representaciones de PDVI, PDF, PPC y Fc en situación basal y tras 60 minutos de reperfusión en los animales de los grupos experimentales mencionados.

No se observaron diferencias significativas en el daño de la función cardiaca post- isquemia entre los animales del grupo CPT 2 mg/Kg y Salino. En la tabla 4 se muestran los valores de PDVI, PDF, PPC y Fc tras un proceso de I-R en los animales de los grupos experimentales mencionados, a diferentes tiempos durante el proceso de reperfusión tras la isquemia.



**Figura 26:** Parámetros de función cardíaca (Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc)), en situación basal, antes de la isquemia (B) y tras 60 minutos de reperusión tras isquemia (R60') en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o el tratamiento con Salino (Control). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Salino). Lpm latidos por minuto.

**Tabla 4:** Valores de función cardiaca (Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardiaca (Fc)) durante diferentes tiempos (minutos) del periodo de reperfusión tras isquemia en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o tratados con Salino (Control). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Lpm latidos por minuto.

Tiempo reperfusión	PDVI, mmHg		PDF, mmHg	
	Salino	CPT	Salino	CPT
1'	20,5 $\pm$ 6,5	13,2 $\pm$ 3,8	65,2 $\pm$ 6,3	66,6 $\pm$ 7,0
2'	14,9 $\pm$ 3,3	8,4 $\pm$ 0,5	61,8 $\pm$ 9,4	77,5 $\pm$ 4,2
5'	16,1 $\pm$ 3,9	8,0 $\pm$ 0,3	69,0 $\pm$ 5,9	83,3 $\pm$ 5,2
10'	18,1 $\pm$ 4,7	9,1 $\pm$ 1,0	67,8 $\pm$ 5,6	79,0 $\pm$ 7,9
15'	19,2 $\pm$ 4,8	8,8 $\pm$ 0,6	67,9 $\pm$ 4,9	77,5 $\pm$ 8,7
30'	21,0 $\pm$ 5,3	14,0 $\pm$ 3,9	68,7 $\pm$ 5,2	73,2 $\pm$ 12,5
45'	22,6 $\pm$ 5,5	13,0 $\pm$ 4,0	69,0 $\pm$ 4,1	75,1 $\pm$ 12,2
60'	22,5 $\pm$ 5,2	8,5 $\pm$ 0,3	71,0 $\pm$ 5,5	77,5 $\pm$ 12,0

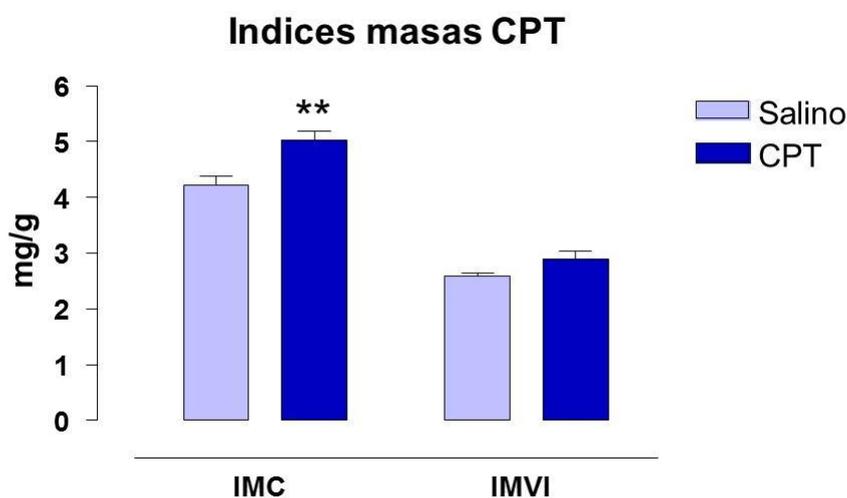
Tabla 4: continuación

Tiempo reperfusión	PPC, mmHg		Fc, lpm	
	Salino	CPT	Salino	CPT
1'	153,4 $\pm$ 9,9	131,2 $\pm$ 14,2	51,6 $\pm$ 34,4	0,0 $\pm$ 0,0
2'	145,6 $\pm$ 11,1	125,7 $\pm$ 13,0	59,6 $\pm$ 29,9	0,0 $\pm$ 0,0
5'	148,1 $\pm$ 12,1	124,4 $\pm$ 13,4	70,1 $\pm$ 28,3	0,0 $\pm$ 0,0
10'	158,1 $\pm$ 12,8	127,5 $\pm$ 14,9	89,9 $\pm$ 35,8	0,0 $\pm$ 0,0
15'	164,1 $\pm$ 12,8	130,5 $\pm$ 15,4	110,1 $\pm$ 37,0	0,0 $\pm$ 0,0
30'	173,7 $\pm$ 13,3	138,8 $\pm$ 15,7	136,7 $\pm$ 43,9	76,2 $\pm$ 47,9
45'	177,5 $\pm$ 15,6	143,8 $\pm$ 17,2	134,9 $\pm$ 43,0	46,1 $\pm$ 46,1
60'	186,3 $\pm$ 19,8	148,2 $\pm$ 19,3	133,7 $\pm$ 42,4	0,0 $\pm$ 0,0

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas no provocó un agravamiento en el daño cardíaco por I-R .

#### 1.4 ÍNDICE DE MASAS

La figura 27 muestra los valores de Índice de Masa de Corazón (IMC) y de Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) en los animales tras los diferentes tratamientos. En los animales tratados con CPT 2 mg/Kg i.p. semanalmente durante 5 semanas se obtuvo un IMC significativamente superior que en los animales que habían sido tratados con Salino con el mismo protocolo de administración. IMC: CPT:  $5,03 \pm 0,16$  mg/g (n=4) vs Salino:  $4,23 \pm 0,15$  mg/g (n=5),  $P < 0.01$ . Sin embargo, el IMVI resultó similar en ambos grupos de animales: CPT:  $2,90 \pm 0,14$  mg/g (n=4) vs Salino:  $2,59 \pm 0,06$  g (n=5),  $P > 0.05$ .

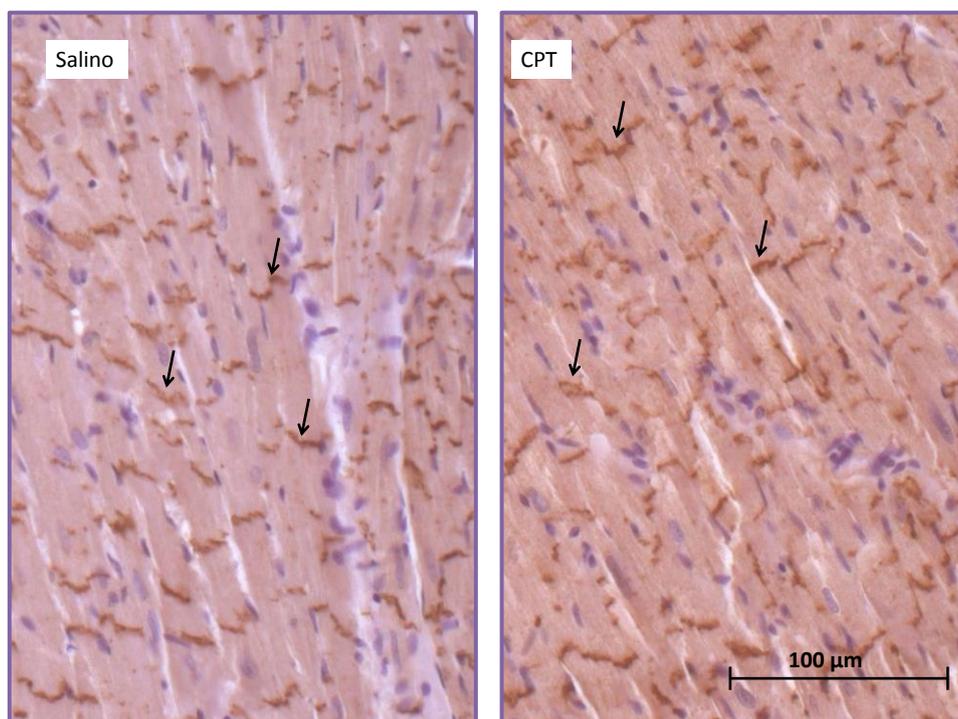


**Figura 27.** Índice de Masas del Corazón (IMC) y del Índice de Masas del Ventrículo Izquierdo (IMVI) de corazones de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o tratados con Salino (Control). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*  $P < 0.01$  vs Salino).

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas provocó un aumento en el índice de masa cardíaco que no parece ser debido a un aumento en la masa ventricular izquierda.

### 1.5 CONEXINA 43

Una vez finalizado el experimento de función cardíaca, puesto que no se encontraron alteraciones en los parámetros funcionales estudiados, pero sí alteraciones en el IMC, se quiso conocer si existían alteraciones a nivel histológico en los corazones de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas. Los cortes de los corazones fijados y teñidos se observaron con un microscopio bajo el objetivo de 20 aumentos (Figura 28).

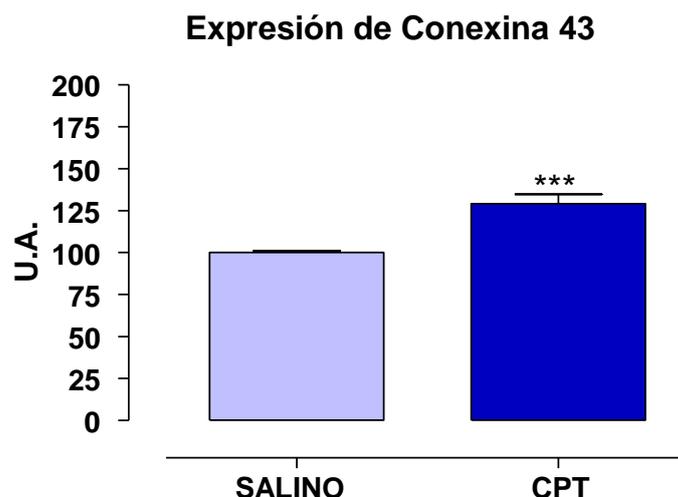


**Figura 28.** Imágenes de microscopía óptica (20x) de preparaciones de tejido cardíaco contrastadas con hematoxilina y marcadas con anticuerpo anti-Conexina 43 (color marrón) de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o el tratamiento con Salino (Control).

En la imagen se puede apreciar que la Conexina 43 está presente en ambos tipos de preparaciones, y que no ha modificado su localización; los discos intercalares de los cardiomiocitos. Sin embargo, para conocer si el tratamiento antitumoral modifica la expresión de Conexina 43 es necesaria la cuantificación de los niveles de dicha proteína mediante Western-Blot.

### 1.5.1 Cuantificación de la expresión de Conexina 43 mediante Western-Blot.

Entre los estudios que se llevaron a cabo, se quiso cuantificar, mediante Western Blot, los niveles de Conexina 43 expresada en los corazones de estos animales. La Conexina 43 es una proteína estructural que se une para formar uniones *gap* en los vertebrados. Estas uniones *gap* permiten el paso de pequeños iones y moléculas, conectando directamente el citoplasma de células adyacentes. Las uniones *gap* son esenciales para muchos procesos fisiológicos, entre ellos, la despolarización coordinada del músculo cardíaco. En la Figura 29 se representan los niveles de Conexina 43 en los corazones de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg o Salino i.p. durante 5 semanas: CPT:  $129 \pm 5.73$  (n=8) vs Salino:  $100.00 \pm 1.22$  U.A. (n=8),  $P < 0.001$ . En los animales tratados con CPT 2 mg/Kg durante 5 semanas se observó un aumento significativo de la cantidad de Conexina 43 en tejido cardíaco.



**Figura 29.** Expresión de niveles de Conexina 43 en homogeneizados de ventrículo izquierdo de corazones procedentes de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o tratadas con Salino (Control). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs Salino). U.A. Unidades Arbitrarias.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas provocó un aumento en la expresión de Conexina 43 en el miocardio.

## 1.6 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN CARDIACA DE RECEPTORES CANNABINOIDES (CB1 Y CB2)

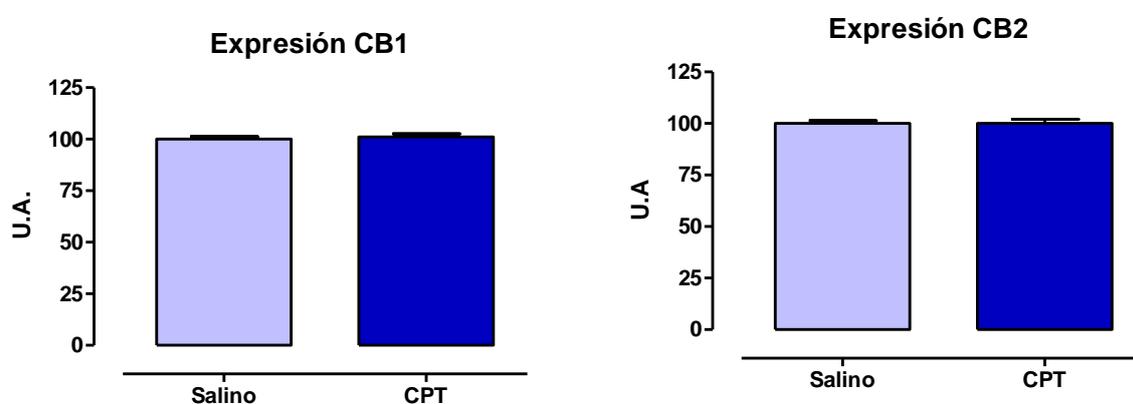
A pesar de que no se encontró afectación de la funcionalidad cardiovascular en los animales sometidos los diferentes tratamientos llevados a cabo (Salino o CPT 2 mg/kg i.p. semanalmente durante 5 semanas), y dado que sí se encontraron alteraciones a nivel histológico en el corazón, se quiso conocer si paralelamente a ellas se producían modificaciones en el sistema endocannabinoide a nivel cardiaco. Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2)

## RESULTADOS

---

en músculo cardiaco mediante Western Blot, utilizando muestras de ventrículo izquierdo recogidas tras las 5 semanas de tratamiento.

Cuando se analizó la expresión de receptores cannabinoides CB1 y CB2 en tejido cardiaco procedente de los diferentes grupos experimentales se pudo observar que la expresión miocárdica de los mismos en animales tratados con CPT 2 mg/kg i.p. semanalmente durante 5 semanas fue similar a la encontrada en los animales tratados con Salino (Control) siguiendo esta misma pauta de administración; CB1: CPT:  $101.12 \pm 1.49$  U.A. (n=8) vs Salino:  $100 \pm 1.19$  U.A. (n=8),  $P > 0.05$ ; CB2: CPT:  $100 \pm 1.33$  U.A. (n=8) vs Salino:  $100 \pm 2.02$  U.A. (n=8),  $P > 0.05$  (Figura 30).



**Figura 30.** Niveles de expresión de receptores cannabinoides CB1 y CB2 en homogeneizados de ventrículo izquierdo de corazones procedentes de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino 2 mg/kg i.p. (CPT) o tratados con Salino (Control). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-9 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. U.A.: Unidades Arbitrarias.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas no provocó alteraciones en la expresión miocárdica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

---

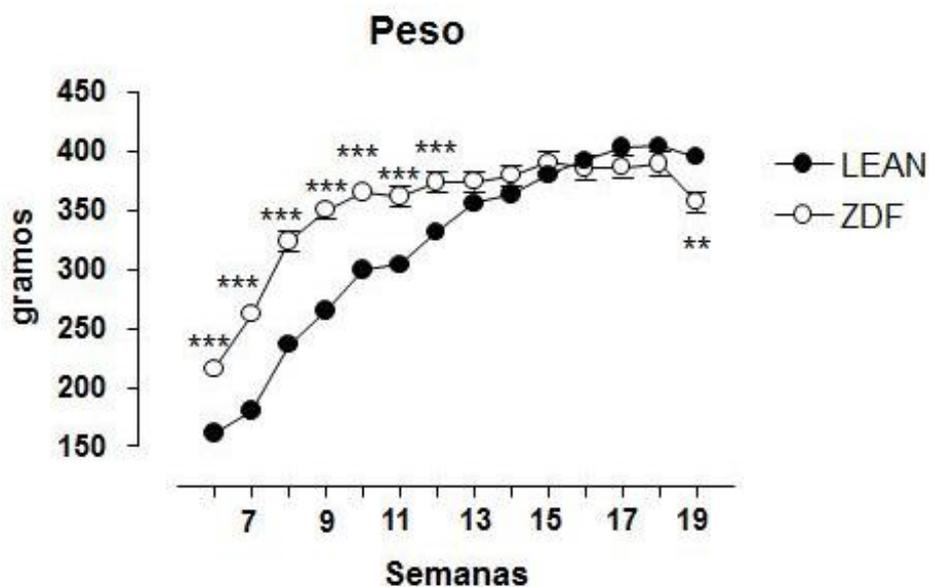
## 2. MODELO DE NEUROPATÍA POR DM2. ALTERACIONES CARDIOVASCULARES.

### 2.1 PARÁMETROS GENERALES

#### 2.1.1 Peso

La obesidad es uno de los principales factores asociados a la DM2. El grupo de animales ZDF muestran desde el inicio de protocolo experimental, a las 6 semanas de vida, un peso corporal significativamente superior al del grupo de animales LEAN de la misma edad (ZDF:  $215,63 \pm 3,88$  g (n=7) *vs* LEAN:  $161,13 \pm 3,19$  g (n=7),  $P < 0.001$ ).

Hay que señalar, sin embargo, que esta diferencia fue reduciéndose a lo largo de las semanas de seguimiento de los animales, resultando el peso corporal de los animales ZDF y LEAN similar a las 13 semanas de vida (ZDF:  $374,29 \pm 8,93$  g (n=15) *vs* LEAN:  $355,57 \pm 4,17$  g (n=15),  $P > 0.05$ ) y a las 18 semanas de vida (ZDF:  $389,71 \pm 10,03$  g (n=15) *vs* LEAN  $404,14 \pm 5,04$  g (n=15),  $P > 0.05$ ). Más aún, los animales del grupo ZDF presentaron un peso corporal significativamente menor al de los animales del grupo LEAN al final del tratamiento (semana 19-20 de vida de los animales): ZDF:  $357,14 \pm 8,65$  g (n=15) *vs* LEAN:  $395,00 \pm 4,16$  g (n=15),  $P < 0.01$  (Figura 31).



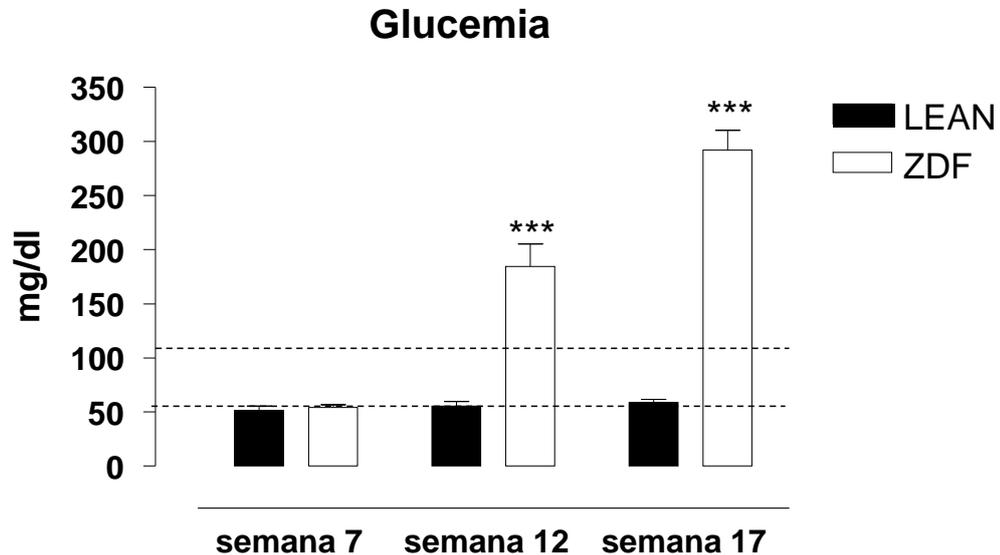
**Figura 31.** Evolución del peso corporal de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo Control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 15-20 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  vs LEAN).

Los animales ZDF desde edades tempranas tienen pesos superiores a los de los animales no obesos. El aumento en el peso de los animales diabéticos va disminuyendo con la edad e incluso llega a ser menor que en los animales control.

### 2.1.2 Glucemia

A las 7 semanas de vida, las glucemias de los animales ZDF y LEAN fueron similares (ZDF:  $54,41 \pm 2,58$  mg/dl ( $n=20$ ) vs LEAN:  $51,45 \pm 4,18$  mg/dl ( $n=20$ ),  $P > 0.05$ ). A partir de ese momento, la glucemia de los animales LEAN se mantuvo en esos mismos niveles a lo largo de toda la vida del animal; sin embargo, los niveles de glucosa en sangre de los animales ZDF fueron aumentando a lo largo de las semanas resultando significativamente superiores a las glucemias de los animales LEAN a partir

de la semana 12 (ZDF:  $284,45 \pm 20,71$  mg/dl (n=20) vs LEAN:  $55,65 \pm 4,18$  mg/dl (n=20),  $P < 0.001$ ) (Figura 32).



**Figura 32.** Evolución de la glucemia de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo Control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 15-20 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs LEAN). Las líneas discontinuas horizontales representan el rango de normalidad en cuanto a la glucemia.

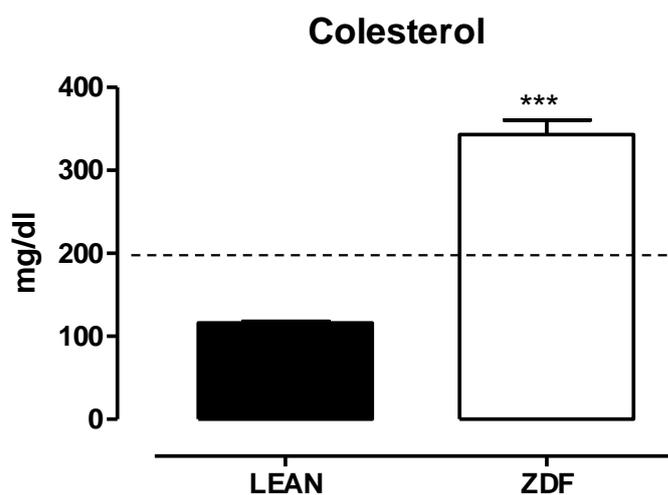
Si se considera que la normalidad, en cuanto a la glucemia en ayunas, está entre 50 y los 109 mg/dl (Lesniewskiy cols., 2008), se puede afirmar que el grupo de animales ZDF desarrollada DM a partir de las 12 semanas de vida.

### 2.1.3 Dislipemia

La dislipemia se valoró mediante la determinación de los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos en la semana 19-20 de vida, al finalizar el seguimiento de los animales.

Colesterol total

A las 19-20 semanas de vida, los niveles plasmáticos de colesterol total de los animales ZDF fueron significativamente superiores a los de los animales Control (LEAN) (ZDF:  $343.08 \pm 17.49$  mg/dl (n=15) vs LEAN:  $116.01 \pm 2.02$  mg/dl (n=15),  $P < 0.001$ ). Si se considera que la normalidad, en cuanto a los niveles de colesterol total, está en valores menores de 200 mg/dl (Vora y cols., 1996), se puede afirmar que el grupo de animales ZDF tiene hipercolesterolemia (Figura 33).

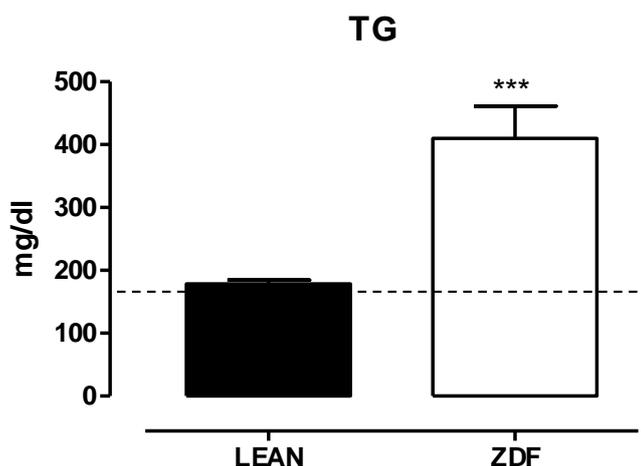


**Figura33.** Niveles de colesterol en plasma en la semana 19-20 de vida de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo Control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 15-20 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs LEAN). La línea discontinua horizontal representa el límite máximo considerado de normalidad en cuanto a los niveles plasmáticos de colesterol.

### Triglicéridos

Por otra parte, a las 19-20 semanas de vida, los niveles plasmáticos de triglicéridos de los animales ZDF fueron significativamente superiores a los de los animales Control (LEAN) (ZDF:  $409.88 \pm 51.66$  mg/dl (n=15) vs LEAN:  $178.58 \pm 6.03$  mg/dl (n=15),  $P < 0.001$ ).

Si se considera que la normalidad, en cuanto a los niveles plasmáticos de triglicéridos, se encuentra entre 40 y 160 mg/dl (Vora y cols., 1996), se puede afirmar que el grupo de animales ZDF tiene hipertrigliceridemia (Figura 34).



**Figura 34.** Niveles de triglicéridos en plasma en la semana 19-20 de vida de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo Control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 15-20 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs LEAN). La línea discontinua horizontal representa el límite máximo considerado de normalidad en cuanto a los niveles plasmáticos de triglicéridos.

Así, se podría decir que el grupo de animales ZDF ha desarrollado hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

### 2.1.4 Liberación de insulina *in vitro*

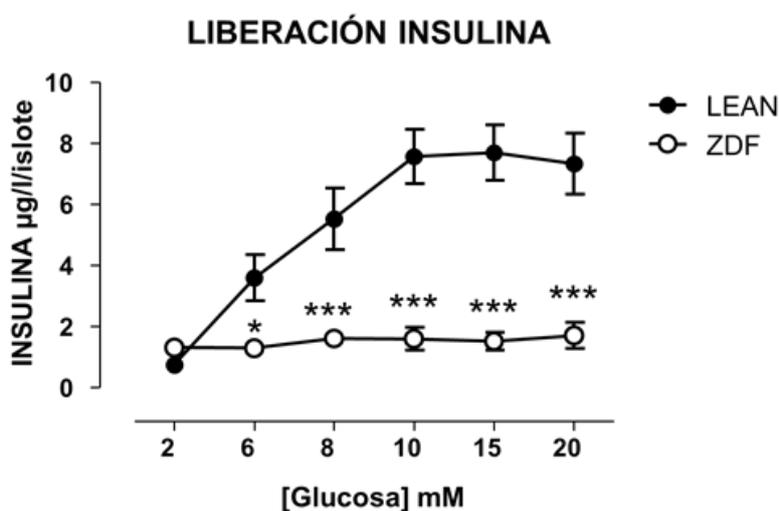
Al finalizar el protocolo experimental, a la semana 19-20 de los animales, se realizó un ensayo de aislamiento y cultivo *in vitro* de islotes pancreáticos para evaluar la liberación de insulina por parte de los mismos en un medio con diferentes concentraciones de glucosa (Jones y cols., 2010).

Los islotes procedentes de los animales Control (LEAN) a las 19-20 semanas de vida, respondieron al aumento de la concentración de glucosa del medio liberando mayor cantidad de insulina. Este efecto alcanzó su efecto máximo a una concentración de 10 mM de glucosa. Los islotes procedentes de los animales diabéticos (ZDF) a las 20 semanas de vida no fueron capaces de responder al aumento de la concentración de glucosa en el medio.

En la tabla 5 se muestran los valores de concentración de insulina en el medio tras una hora de incubación, tanto de los islotes procedentes de los animales LEAN como de los animales ZDF. En la figura 35 se muestra la representación gráfica de la respuesta a diferentes concentraciones de glucosa de los islotes pancreáticos de estos animales.

**Tabla 5.** Valores concentración de insulina ( $\mu\text{g}$  de insulina/litro/islote) de los islotes pancreáticos procedentes de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo Control tras una hora de incubación en un medio con diferentes concentraciones de glucosa. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-7 ensayos. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\* $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  vs LEAN).

[glucosa] (mM)	LEAN	ZDF
2	0.74 $\pm$ 0.13	1.30 $\pm$ 0.22
6	3.59 $\pm$ 0.75	1.28 $\pm$ 0.21 *
8	5.52 $\pm$ 1.01	1.60 $\pm$ 0.19 ***
10	7.56 $\pm$ 0.89	1.59 $\pm$ 0.38 ***
15	7.69 $\pm$ 0.91	1.50 $\pm$ 0.29 ***
20	7.33 $\pm$ 1.00	1.70 $\pm$ 0.43 ***



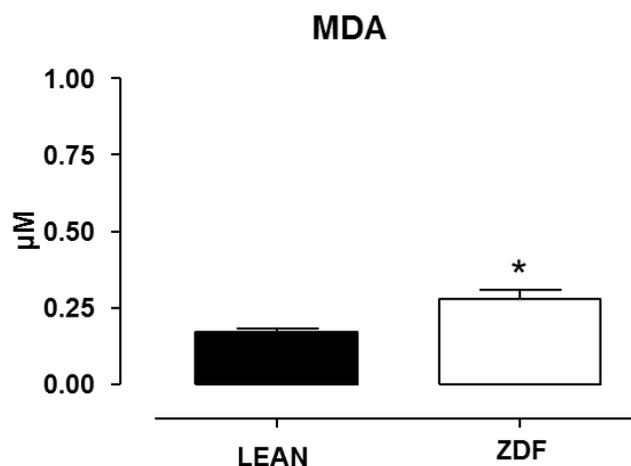
**Figura 35.** Concentración de insulina ( $\mu\text{g}$  de insulina/litro/islote) de los islotes pancreáticos procedentes de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo Control tras una hora de incubación en un medio con diferentes concentraciones de glucosa. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-7 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\* $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  vs LEAN).

### 2.1.5 Estrés oxidativo

Existe la evidencia, tanto en estudios clínicos como experimentales, de que existe una estrecha relación entre la hiperglucemia, el estrés oxidativo y las complicaciones diabéticas. Los niveles altos de glucosa en sangre determinan una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Estos, a su vez, llevan a cambios químicos en prácticamente todos los componentes celulares, determinando modificaciones en las proteínas y en el ADN y llevando a la peroxidación lipídica. La medición del malonildialdehído (MDA) (un producto de esta peroxidación lipídica) es una herramienta útil para evaluar el estrés oxidativo del organismo (Piconi y cols., 2003).

Dada esta relación entre el estrés oxidativo y las complicaciones diabéticas, se evaluaron los niveles de MDA en el plasma de estos animales.

A las 19-20 semanas de vida, los niveles plasmáticos de MDA de los animales ZDF fueron significativamente superiores a los de los animales Control (LEAN): ZDF:  $0,28 \pm 0,28 \mu\text{M}$  (n=5) vs LEAN:  $0,17 \pm 0,014 \mu\text{M}$  (n=5)  $P < 0.05$  (Figura 36).

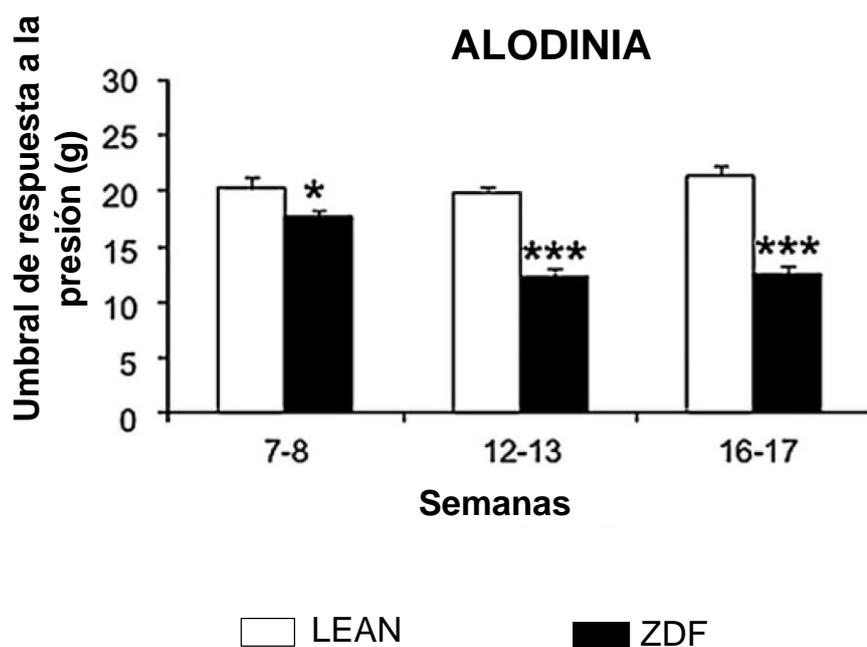


**Figura 36.** Niveles plasmáticos de Malonildialdehído (MDA) en la semana 19-20 de vida de los animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo Control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P < 0.05$  vs LEAN).

Por lo tanto, se puede afirmar que los animales ZDF tienen un mayor estrés oxidativo que los animales LEAN a las 19-20 semanas de vida.

### 2.1.6 Neuropatía periférica sensorial

Con el fin de evaluar el desarrollo de neuropatía periférica en estos animales, se evaluó la alodinia, medida como umbral de respuesta a la presión, mediante la técnica de los filamentos de Von Frey. Desde el principio del protocolo experimental (semana 6-7 de vida de los animales) los animales diabéticos presentan un umbral de respuesta a la presión significativamente menor que el de los animales LEAN. Esta disminución en el umbral de respuesta se fue agravando a lo largo del protocolo experimental (Figura 37).



**Figura 37.** Representación de los valores del umbral de respuesta a la presión de los animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 15-20 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\* $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  vs LEAN).

Los animales diabéticos presentan alodinia, signo claro de que han desarrollado neuropatía periférica sensorial.

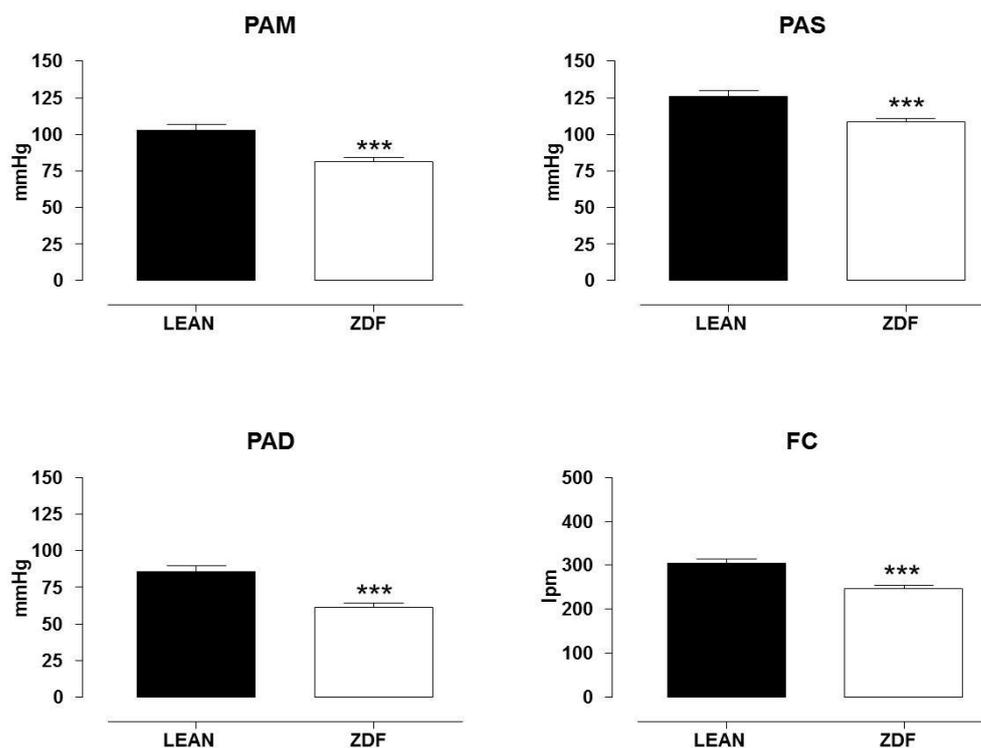
## 2.2 PARÁMETROS CARDIOVASCULARES

Con el fin de evaluar el desarrollo de neuropatía autonómica a nivel cardiovascular en estos animales, se seleccionaron como parámetros a evaluar: la medida de presión arterial directa y frecuencia cardíaca *in vivo* y la función cardíaca basal *in vitro*.

### 2.2.1 Presión arterial

Como se ha detallado en el apartado de metodología de esta Tesis Doctoral, se valoró, de manera directa por canulación, la presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales ZDF y LEAN al final del seguimiento, (19-20 semanas de vida).

Los valores de PAM, PAS, PAD y Fc, 10 minutos después de la canulación, fueron significativamente menores en el grupo de animales ZDF respecto a los obtenidos en el grupo de animales LEAN. Así, PAM: ZDF:  $81,27 \pm 3,11$  mmHg (n=15) *vs* LEAN:  $102,85 \pm 3,92$  mmHg (n=15),  $P < 0.001$ ; PAS: ZDF:  $108,61 \pm 2,35$  mmHg (n=15) *vs* LEAN:  $125,83 \pm 4,03$  mmHg (n=15),  $P < 0.001$ ; PAD: ZDF:  $61,33 \pm 3,08$  mmHg (n=15) *vs* LEAN:  $85,73 \pm 3,88$  mmHg (n=15),  $P < 0.001$ ; Fc: ZDF:  $246,97 \pm 7,84$  lpm (n=15) *vs* LEAN:  $305,15 \pm 10,02$  lpm (n=15),  $P < 0.001$  (Figura 38).



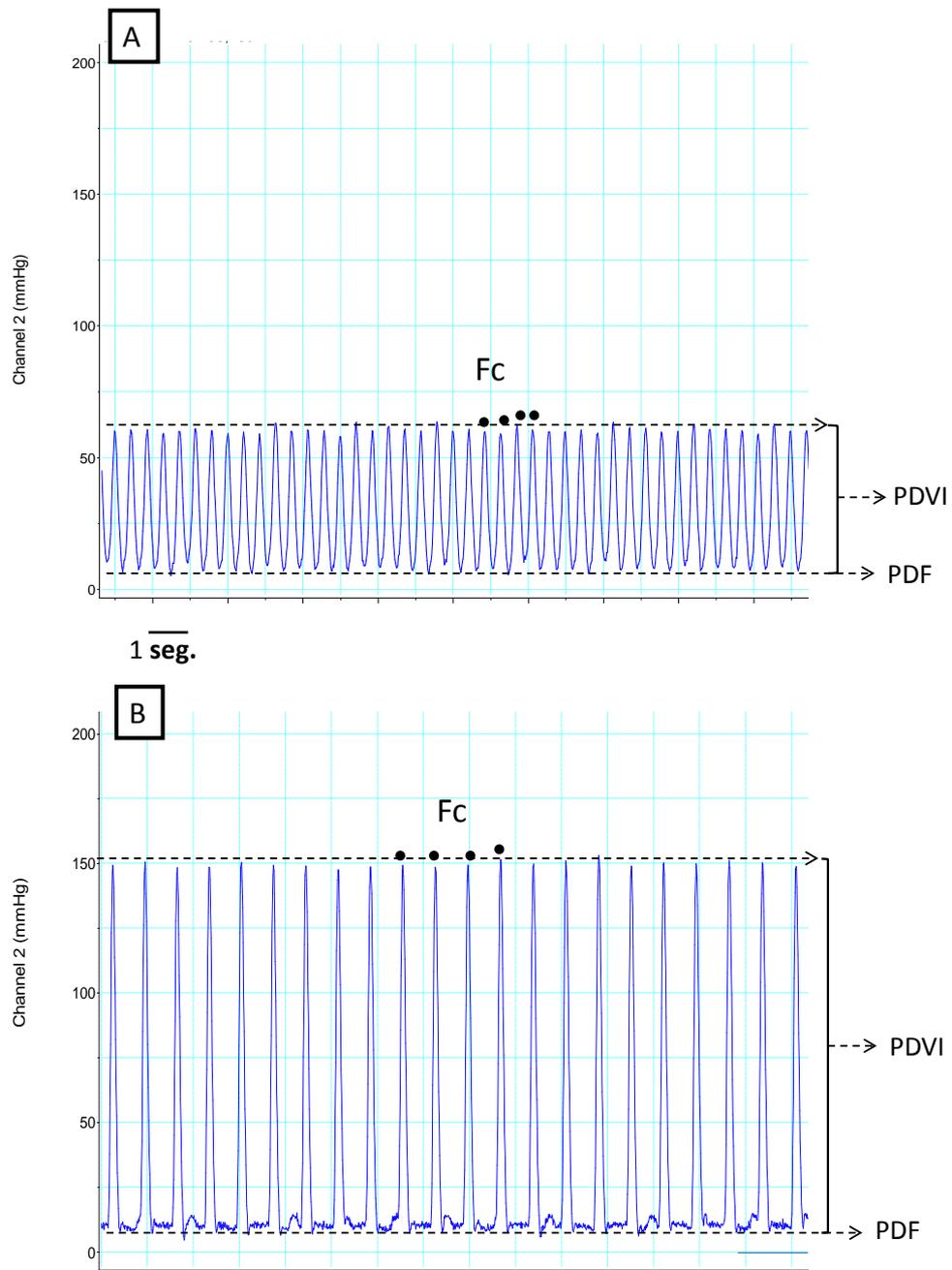
**Figura 38.** Presión arterial media (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) y Frecuencia Cardiaca (FC) basales (10 minutos después de la canulación de la carótida) de los animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 15-20 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs LEAN).

Por lo tanto, se puede afirmar que los animales diabéticos (ZDF), a las 19-20 semanas de vida, tenían hipotensión y bradicardia, lo que podrían ser signos compatibles con una disfunción autonómica cardiovascular.

### 2.2.2 Función cardiaca basal

Debido a que la diabetes es un factor de riesgo para la aparición de alteraciones cardiacas tales como disfunción ventricular izquierda o alteraciones del ritmo cardiaco, y a la vista de los resultados obtenidos hasta ahora, se quiso evaluar si en los animales obesos y diabéticos (ZDF), respecto a los delgados y no diabéticos (LEAN), existía alguna alteración en la función cardiaca basal. Ésta se evaluó en la preparación de corazón aislado y perfundido a las 19-20 semanas de vida donde el sobrepeso, hiperglucemia y dislipemia estaban claramente establecidos, como se ha mostrado en los apartados anteriores de Resultados de esta Tesis Doctoral.

En la figura 39 se muestra un registro representativo de la función ventricular izquierda en los dos grupos experimentales (ZDF y LEAN). En este registro se puede apreciar una menor frecuencia cardíaca y una mayor fuerza de contracción en el animal ZDF respecto al LEAN.



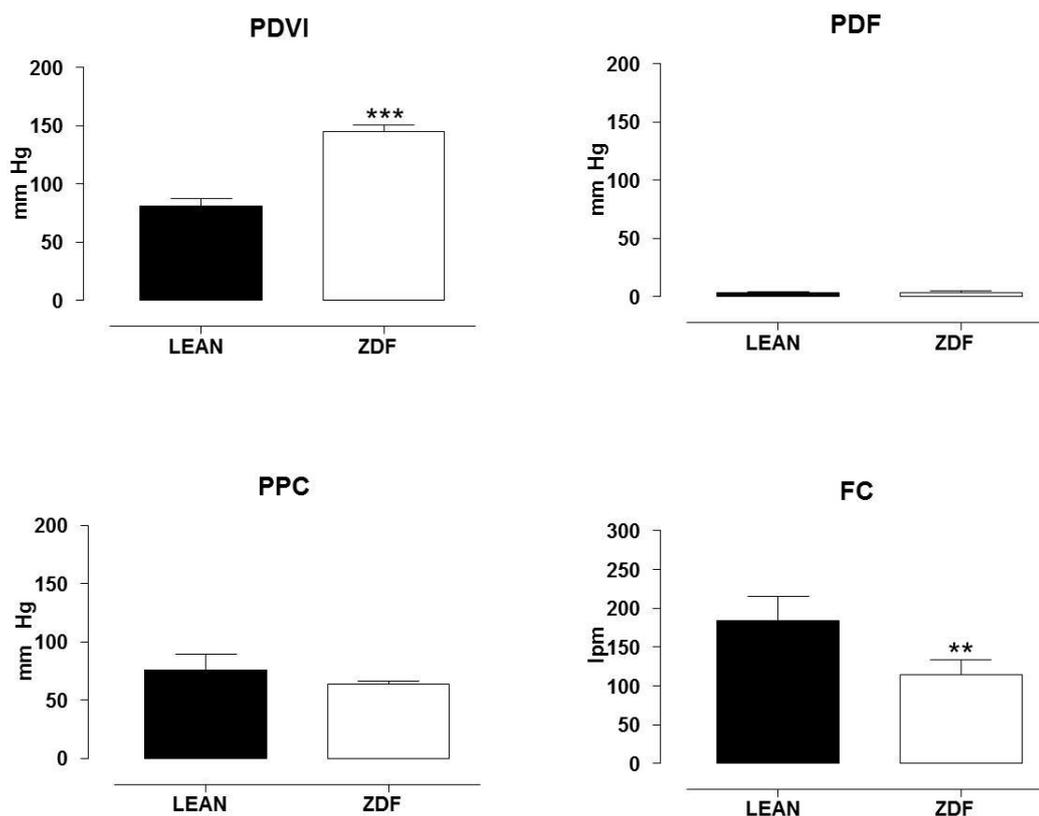
**Figura 39.** Imagen del registro del transductor acoplado al balón inserto en el ventrículo izquierdo del grupo de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control (A) y de animales obesos y diabéticos (ZDF) (B). Fc: Frecuencia Cardíaca; PDVI: Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo; PDF Presión Diastólica Final. Se puede apreciar una menor Fc y una mayor fuerza de contracción (PDVI) en el animal ZDF respecto al LEAN.

---

Este resultado visual se ve reflejado en los resultados numéricos (Figura 40). El grupo de animales ZDF presentó unos valores de PDVI (contractilidad ventricular izquierda) estadísticamente superiores a los de los animales del grupo LEAN (ZDF:  $145,35 \pm 5,65$  mmHg (n=4) vs LEAN:  $80,84 \pm 7,09$  mmHg (n=5),  $P < 0.001$ ).

Los valores de frecuencia cardiaca fueron significativamente inferiores en los animales ZDF respecto a los animales LEAN (ZDF:  $114,06 \pm 19,81$  lpm (n=4) vs LEAN:  $184,40 \pm 31,04$  lpm (n=5),  $P < 0.01$ ).

No se encontraron, sin embargo, diferencias significativas en los valores de PDF y PPC al comparar los resultados del grupo ZDF con los del grupo LEAN. Así, PDF: ZDF:  $4,06 \pm 1,14$  mmHg (n=4) vs LEAN:  $3,41 \pm 0,67$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; PPC: ZDF:  $64,05 \pm 2,11$  mmHg (n=4) vs LEAN:  $75,76 \pm 14,05$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ .



**Figura 40.** Parámetros de función cardíaca (Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc)) basal (tras 20 minutos de estabilización) de los animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  vs LEAN). Lpm latidos por minuto.

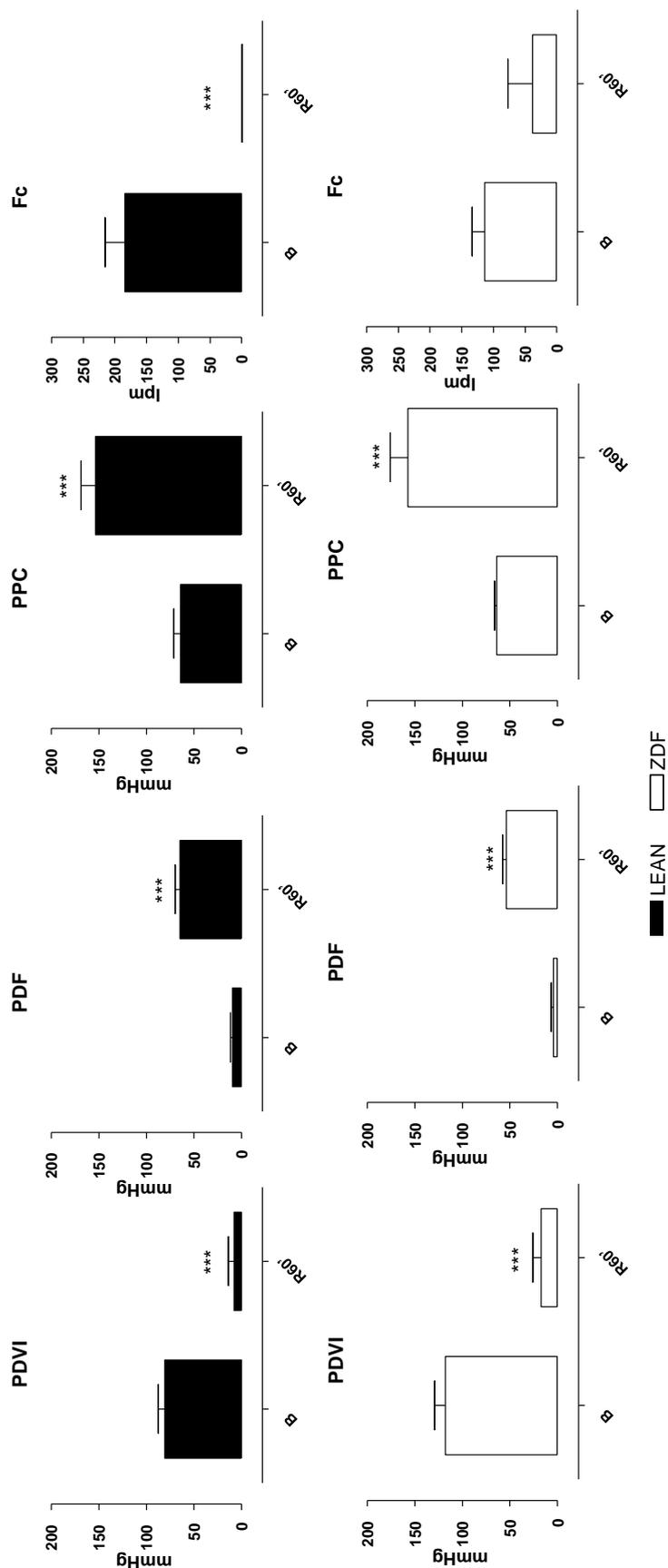
Se podría, por lo tanto, afirmar que en los animales ZDF la funcionalidad cardíaca está alterada, confirmándose la bradicardia observada en los ensayos *in vivo*, acompañada de un aumento en la contractilidad ventricular izquierda, algo que podría ser compatible con un estado de pre-insuficiencia cardíaca.

### 2.2.3 Función cardiaca tras isquemia-reperfusión

Dados los resultados obtenidos en la evaluación de la función cardiaca basal, se evaluó si el daño por I-R era mayor en los animales ZDF que en los LEAN. Tal y como se ha comentado en la Introducción, la DM conduce a un aumento de la incidencia de isquemia cardiaca, así como aumento de la mortalidad tras la isquemia (Haffner, 1998; Harjai y cols., 2003). Existen evidencias científicas de que la cardiomiopatía diabética puede contribuir a este aumento en el daño tras la isquemia (Lehto y cols., 1996).

La figura 41 muestra los cambios observados tras el proceso de I-R en los diferentes parámetros de función cardiaca respecto a la función cardiaca basal (previa a la isquemia) tanto en los corazones de los animales ZDF como en los de los animales Control (LEAN). Tras la isquemia y en el minuto 60 de reperfusión, todos los parámetros de función cardiaca se ven alterados en ambos grupos experimentales. Así, existe una disminución significativa tanto de la capacidad contráctil (PDVI) y dilatadora (PDF) ventricular izquierda, como de la frecuencia cardiaca (Fc), acompañado de un aumento de la presión de perfusión de las coronarias (PPC).

En la tabla 6 y en la figura 42 se muestran los parámetros de función cardiaca PDVI, PDF, PPC y Fc tras el proceso de I-R tanto en los animales ZDF como en los animales LEAN. El daño en la función cardiaca tras el proceso de I-R resultó similar en ambos grupos de animales.



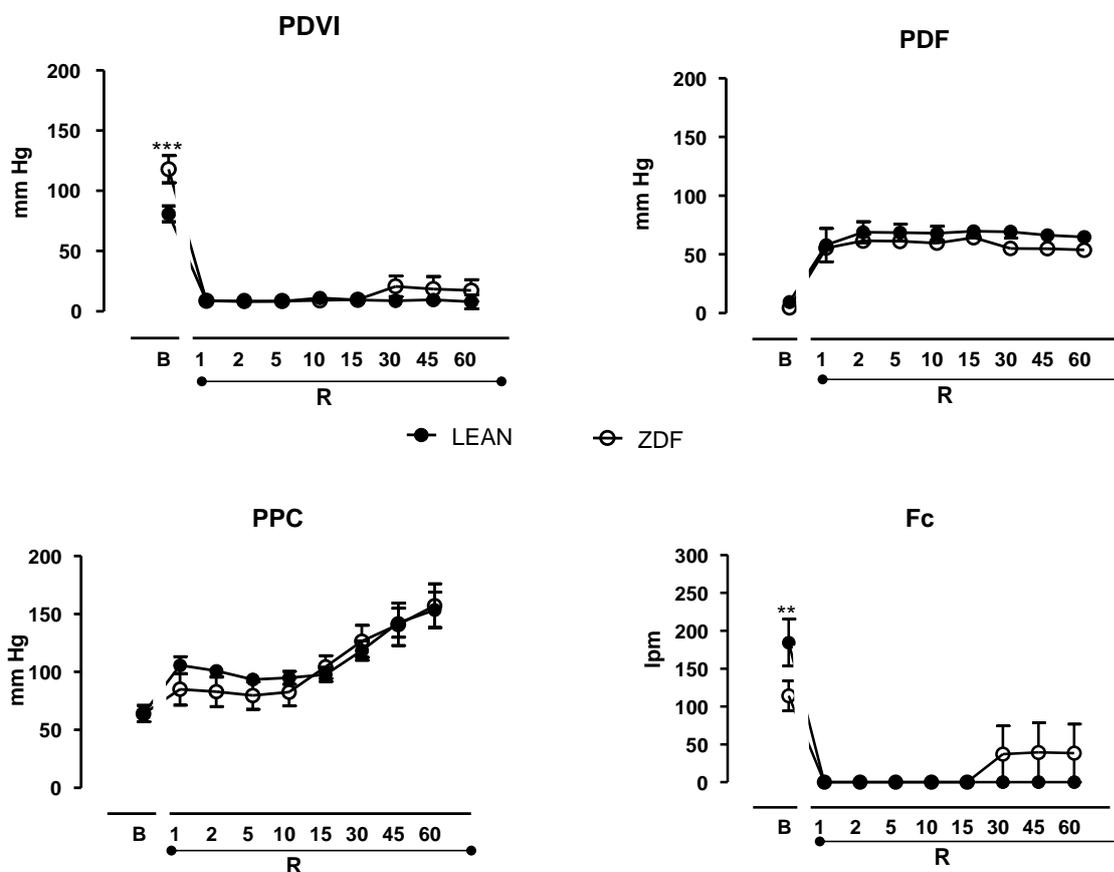
**Figura 41.** Parámetros de función cardíaca (Presión Desarrollada por el Ventriculo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc)), en situación basal, antes de la isquemia (B) y tras 60 minutos de reperfusion tras isquemia (R60') en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\*\*\*\* P<0.001 vs B).

**Tabla 6:** Valores de función cardiaca, (Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardiaca (Fc)) durante diferentes tiempos (minutos) del periodo de reperfusión tras isquemia en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre grupos ( $P > 0.05$  vs LEAN). Lpm latidos por minuto.

Tiempo reperfusión	PDVI, mmHg		PDF, mmHg	
	LEAN	ZDF	LEAN	ZDF
1'	8,75 $\pm$ 0,30	8,71 $\pm$ 0,76	58,01 $\pm$ 14,16	55,51 $\pm$ 3,41
2'	8,16 $\pm$ 5,00	8,52 $\pm$ 0,79	68,95 $\pm$ 9,10	61,64 $\pm$ 5,44
5'	8,48 $\pm$ 0,17	8,52 $\pm$ 0,90	68,56 $\pm$ 7,17	61,21 $\pm$ 4,31
10'	11,21 $\pm$ 2,45	9,10 $\pm$ 1,08	67,97 $\pm$ 6,07	59,73 $\pm$ 3,71
15'	9,34 $\pm$ 1,36	9,81 $\pm$ 0,88	69,63 $\pm$ 5,43	64,26 $\pm$ 2,55
30'	8,79 $\pm$ 0,81	20,78 $\pm$ 8,55	69,34 $\pm$ 5,46	55,08 $\pm$ 4,17
45'	9,49 $\pm$ 0,99	18,67 $\pm$ 10,29	66,48 $\pm$ 5,25	54,84 $\pm$ 5,19
60'	7,97 $\pm$ 5,80	17,31 $\pm$ 8,83	64,84 $\pm$ 4,82	53,71 $\pm$ 4,04

**Tabla 6: continuación.**

Tiempo reperfusión	PPC, mmHg		Fc, lpm	
	LEAN	ZDF	LEAN	ZDF
1'	105,88 $\pm$ 7,42	85,15 $\pm$ 13,73	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2'	100,95 $\pm$ 5,48	83,04 $\pm$ 13,04	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
5'	93,70 $\pm$ 4,71	79,66 $\pm$ 11,73	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10'	94,84 $\pm$ 5,55	82,60 $\pm$ 12,02	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
15'	97,92 $\pm$ 6,13	104,28 $\pm$ 9,87	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
30'	118,54 $\pm$ 8,45	126,56 $\pm$ 13,81	0,00 $\pm$ 0,00	37,20 $\pm$ 37,20
45'	142,42 $\pm$ 12,51	141,11 $\pm$ 18,23	0,00 $\pm$ 0,00	39,18 $\pm$ 39,18
60'	153,59 $\pm$ 15,44	157,24 $\pm$ 18,82	0,00 $\pm$ 0,00	38,38 $\pm$ 38,38

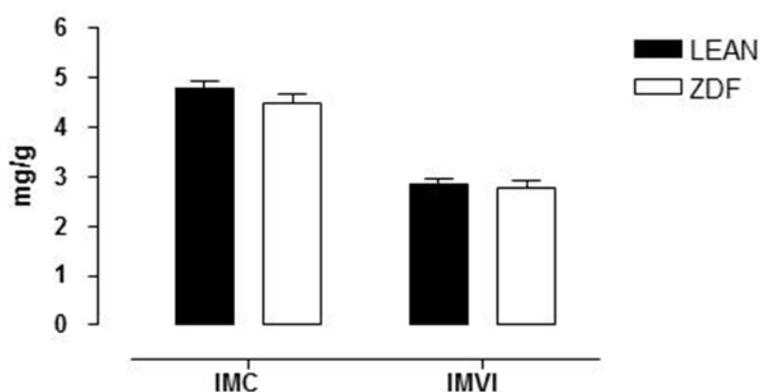


**Figura 42.** Parámetros de función cardíaca (Presión Desarrollada por el Ventriculo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc)) durante diferentes tiempos (minutos) del periodo de reperfusión tras isquemia en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. B: basal; R: reperfusión.

En los corazones de los animales diabéticos, no se encontró un agravamiento en el daño cardíaco por I-R, respecto a animales no diabéticos.

### 2.2.4 Índice de masas

La figura 43 muestra que los valores de Índice de Masa de Corazón (IMC) y de Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) en los animales diabéticos (ZDF) y en los animales Control (LEAN) fueron similares. Así, IMC: (ZDF:  $4,48 \pm 0,19$  mg/g (n=4) vs LEAN:  $4,77 \pm 0,14$  mg/g (n=5),  $P>0.05$ ); IMVI: (ZDF:  $2,77 \pm 0,13$  mg/g (n=4) vs LEAN:  $2,85 \pm 0,11$  mg/g (n=5),  $P>0.05$ ).



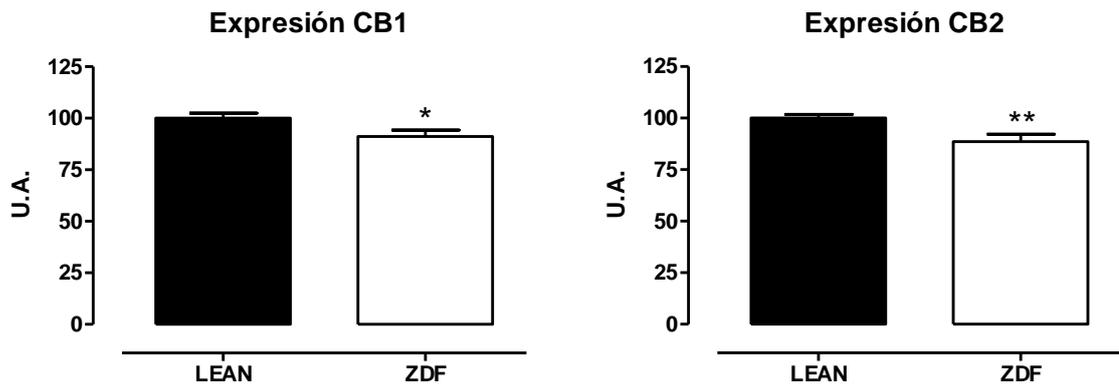
**Figura 43:** Índice de Masas del Corazón (IMC) y el Índice de Masas del Ventrículo Izquierdo (IMVI) de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados.

Los animales diabéticos, no mostraron alteraciones en el IMC ni en el IMVI, respecto a animales Control, no diabéticos.

### 2.2.5 Cuantificación de la expresión cardiaca de receptores cannabinoides (CB1 Y CB2)

En ciertas patologías, entre las que se encuentran las neuropatías autonómicas causadas por alteraciones metabólicas, el sistema endocannabinoide se sobreexpresa o se hipersensibiliza (Cable y cols., 2014). Por ello, tras la evaluación de la afectación de la funcionalidad cardiovascular en los animales ZDF, se quiso conocer si en los corazones de estos animales se producían modificaciones en el sistema endocannabinoide. Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) en músculo cardiaco utilizando muestras de ventrículo izquierdo de animales ZDF y LEAN a las 19-20 semanas de vida.

Cuando se comparó la expresión cardiaca de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 mediante Western-Blot, se encontró una disminución significativa en la expresión de dichos receptores en los animales ZDF respecto a los animales del grupo LEAN; CB1: ZDF:  $91.11 \pm 3.21$  U.A. (n=9) *vs* LEAN:  $100 \pm 2.44$  U.A. (n=9),  $P < 0.05$ ; CB2: ZDF:  $88.63 \pm 3.59$  U.A (n=9) *vs* LEAN:  $100 \pm 1.84$  U.A (n=9),  $P < 0.01$  (Figura 44).



**Figura 44.** Niveles de expresión de receptores cannabinoides CB1 y CB2 en homogeneizados de ventrículo izquierdo de corazones procedentes de animales obesos y diabéticos (ZDF) y de animales no obesos y no diabéticos (LEAN), considerado como grupo control, a las 19-20 semanas de vida. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 7-9 corazones. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  vs LEAN). U.A.: Unidades Arbitrarias.

A la vista de estos resultados se podría decir que la expresión ventricular izquierda de receptores CB1 y CB2 está disminuida en situaciones de SM.

Por ello, y dado que únicamente se observaron alteraciones cardiovasculares y una modificación en la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 a nivel cardiaco en el modelo de neuropatía diabética, se quiso estudiar el efecto de la administración de un agonista cannabinoide no selectivo sobre las alteraciones cardiovasculares observadas en las ratas ZDF.

### **3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE WIN 55,212-2 SOBRE PARÁMETROS CARDIOVASCULARES EN LAS RATAS ZDF**

Tras los resultados obtenidos, y una vez confirmado que los animales ZDF habían desarrollado a las 20 semanas de vida, tanto la sintomatología típica del SM (hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia), como signos claros de haber desarrollado neuropatía autonómica cardiovascular (hipotensión y bradicardia y alteración de la funcionalidad cardíaca), así como una reducción en la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, se procedió a valorar si el tratamiento agudo con un cannabinoide no selectivo, Win 55,212-2, podría modificar los parámetros cardiovasculares que se vieron alterados en esta situación y si los receptores cannabinoides CB1 y CB2 estaban implicados en su efecto.

#### **3.1 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE WIN SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL: POSIBLE IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES.**

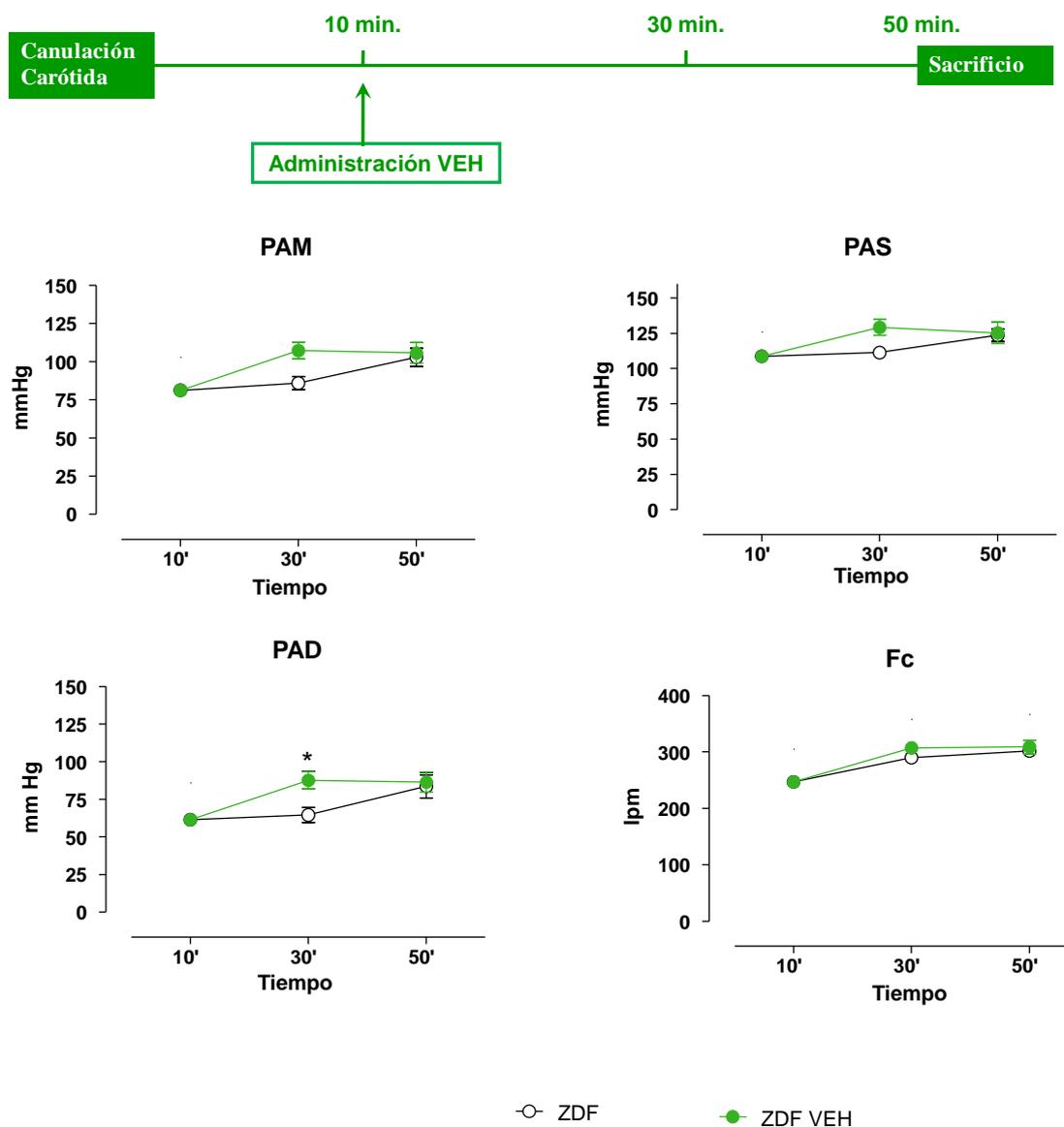
Tal y como se ha descrito en el apartado “Material y Métodos” de esta Tesis Doctoral, se registraron de manera directa durante 50 minutos los parámetros de PAM, PAS, PAD y Fc en los distintos grupos experimentales. En las figuras de este apartado se muestran los cambios en dichos parámetros en animales ZDF a lo largo de este periodo de registro.

### 3.1.1 Efecto del vehículo

Los cannabinoides son compuestos altamente liposolubles. Esto supone un problema adicional que obliga a disolver estos compuestos en solventes de diferente naturaleza química. Por ello, resulta necesario evaluar el efecto del vehículo utilizado para disolver estos compuestos sobre las funciones a valorar.

A los 30 minutos, la administración i.p. de Tocrisolve®, el vehículo utilizado para la disolución de los cannabinoides en esta Tesis Doctoral, produjo un ligero aumento en los valores de PAM, PAS y PAD en el grupo de animales ZDF tratados (ZDF VEH) cuando se comparan con los animales del grupo de animales ZDF sin tratar, que resultó significativo en el caso de la PAD. Así, PAM: ZDF VEH:  $107.33 \pm 5.47$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $85.97 \pm 4.29$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; PAS: ZDF VEH:  $129.23 \pm 5.60$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $111.38 \pm 3.79$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; PAD: ZDF VEH:  $87.59 \pm 5.66$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $64.54 \pm 5.02$  mmHg (n=4),  $P < 0.05$ ; Fc: ZDF VEH:  $307.06 \pm 9.06$  lpm (n=5) *vs* ZDF:  $289.88 \pm 10.5$  lpm (n=4),  $P > 0.05$  (Figura 46).

## RESULTADOS



**Figura 46.** Presión arterial media (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) y Frecuencia Cardíaca (Fc) 10, 30 y 50 minutos después de la canulación de la arteria carótida de animales obesos y diabéticos tratados con vehículo cannabinoide (Tocrisolve®) (ZDF VEH) y animales obesos y diabéticos no tratados, considerados como grupo control (ZDF). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\*  $P < 0.05$  vs ZDF). En la parte superior se representa el protocolo experimental llevado a cabo en la medida de presión arterial y administración de vehículo. Lpm: latidos por minuto.

Este ligero aumento en los valores de PAM, PAS y PAD provocado por la administración del vehículo había desaparecido por completo en el minuto 50, siendo dichos valores similares a los encontrados en el grupo de animales sin tratar. Así, PAM: ZDF VEH:  $105,73 \pm 6,79$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $102,84 \pm 5,99$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; PAS: ZDF VEH:  $125,32 \pm 7,67$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $123,68 \pm 4,46$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; PAD: ZDF VEH:  $86,38 \pm 6,78$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $83,49 \pm 7,68$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; Fc: ZDF VEH:  $308,98 \pm 11,96$  lpm (n=5) *vs* ZDF:  $301,80 \pm 10,61$  lpm (n=4),  $P > 0.05$  (Figura 46).

El tratamiento con el vehículo no produjo modificaciones importantes en los valores de presión arterial y frecuencia cardiaca en los animales ZDF.

### 3.1.2 Efecto de Win

Una vez valorado el efecto del vehículo sobre la presión arterial en las ratas ZDF y dado que éste no ocasionaba ninguna modificación relevante en ella, se procedió a evaluar si la administración aguda de Win podría corregir los signos de neuropatía autonómica cardiovascular (hipotensión y bradicardia) observados en los animales ZDF.

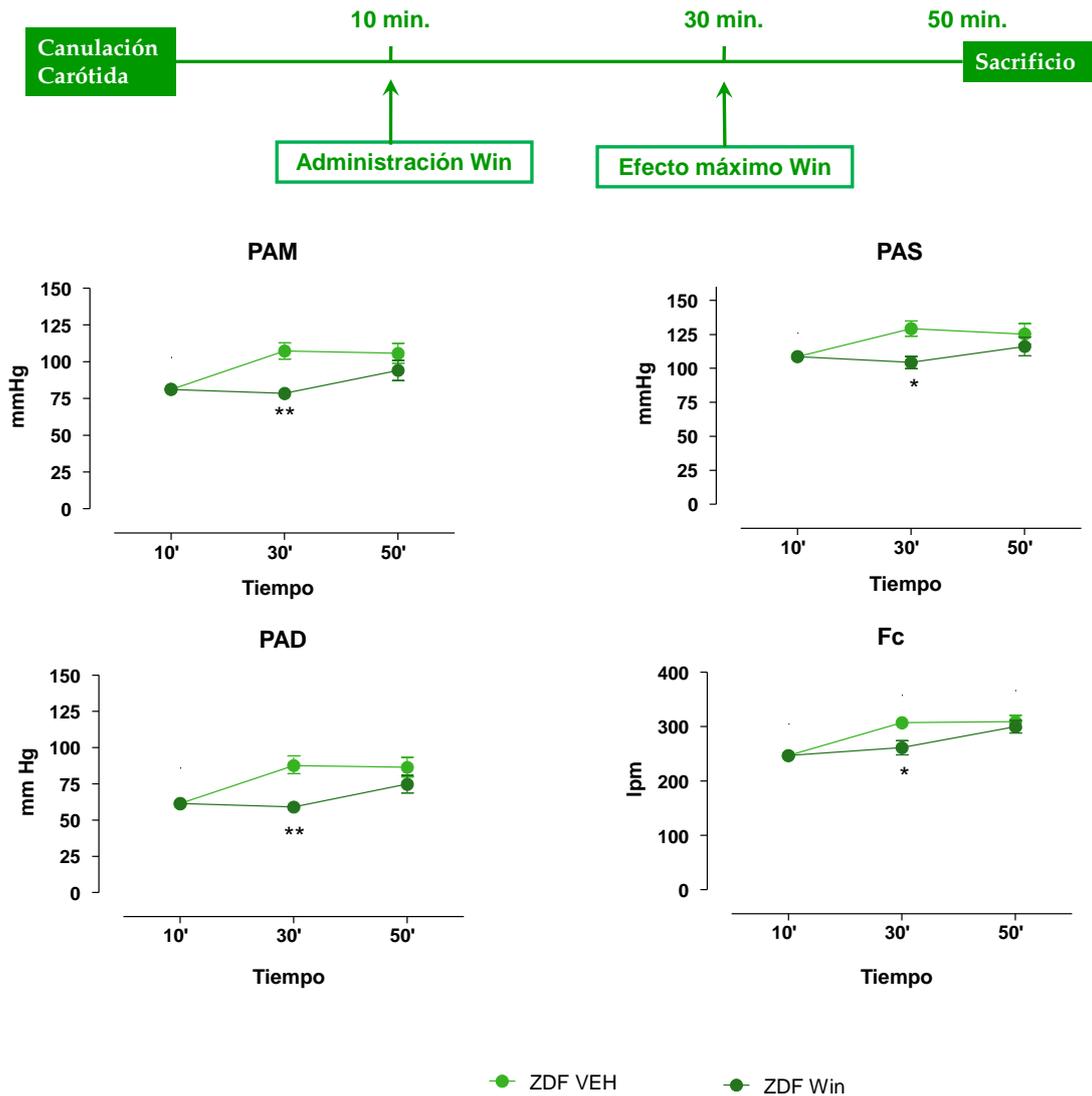
En general, la administración de cannabinoides en animales anestesiados ocasiona bradicardia y tiene efecto hipotensor. En los animales ZDF anestesiados, la administración aguda de Win 1mg/Kg provocó una caída en PAM, PAS, PAD y Fc que fue máxima a los 30 minutos del protocolo experimental, cuando se comparan dichos valores con los de ratas ZDF tratadas con vehículo en el mismo punto temporal del

## RESULTADOS

---

protocolo experimental. PAM: ZDF Win:  $78,51 \pm 3,66$  mmHg (n=6) *vs* ZDF VEH:  $107,33 \pm 5,47$  mmHg (n=5),  $P < 0.01$ ; PAS: ZDF Win:  $104,30 \pm 4,52$  mmHg (n=6) *vs* ZDF VEH:  $129,23 \pm 5,60$  mmHg (n=5),  $P < 0.05$ ; PAD: ZDF Win:  $58,94 \pm 3,20$  mmHg (n=6) *vs* ZDF VEH:  $87,59 \pm 5,66$  mmHg (n=5),  $P < 0.01$ ; Fc: ZDF Win:  $261,43 \pm 12,97$  lpm (n=6) *vs* ZDF VEH:  $307,06 \pm 9,06$  lpm (n=5),  $P < 0.05$  (Figura 47).

Sin embargo, este efecto hipotensor y bradicardizante de Win había desaparecido en el minuto 50 del protocolo. PAM: ZDF Win:  $94,15 \pm 6,81$  mmHg (n=6) *vs* ZDF VEH:  $105,73 \pm 6,79$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; PAS: ZDF Win:  $116,05 \pm 6,79$  mmHg (n=6) *vs* ZDF VEH:  $125,32 \pm 7,67$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; PAD: ZDF Win:  $74,68 \pm 6,13$  mmHg (n=6) *vs* ZDF VEH:  $86,38 \pm 6,78$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; Fc: ZDF Win:  $299,70 \pm 11,53$  lpm (n=6) *vs* ZDF VEH:  $308,98 \pm 11,96$  lpm (n=5),  $P > 0.05$  (Figura 47).



**Figura 47.** Presión Arterial Media (PAM), Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardiaca (Fc) 10, 30 y 50 minutos después de la canulación de la arteria carótida de animales obesos y diabéticos tratados con Win (ZDF Win) y animales obesos y diabéticos tratados con vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®), considerados como grupo control (ZDF VEH). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  vs ZDF VEH). En la parte superior se representa el protocolo experimental llevado a cabo en la medida de presión arterial y administración de vehículo o Win y momento en que se observó el efecto máximo del cannabinoide. Lpm: latidos por minuto.

La administración de Win 1 mg/Kg i.p. produce en ratas ZDF un efecto hipotensor y bradicardizante transitorio que desaparece a los 50 minutos del protocolo, no corrigiendo la hipotensión y bradicardia observadas en estos animales (ver apartado 2.2.1 de Resultados).

### **3.1.3 Efecto de los antagonistas**

Los resultados obtenidos hasta ahora parecían mostrar que la administración aguda de Win 1mg/kg era capaz de provocar modificaciones transitorias en la presión arterial de ratas ZDF ejerciendo un efecto hipotensor y bradicardizante.

Para conocer si estos efectos causados por el Win estaban mediados por receptores cannabinoides, se procedió a evaluar si los receptores CB1 y CB2 estaban involucrados en el efecto de la administración aguda de Win sobre los parámetros modificados.

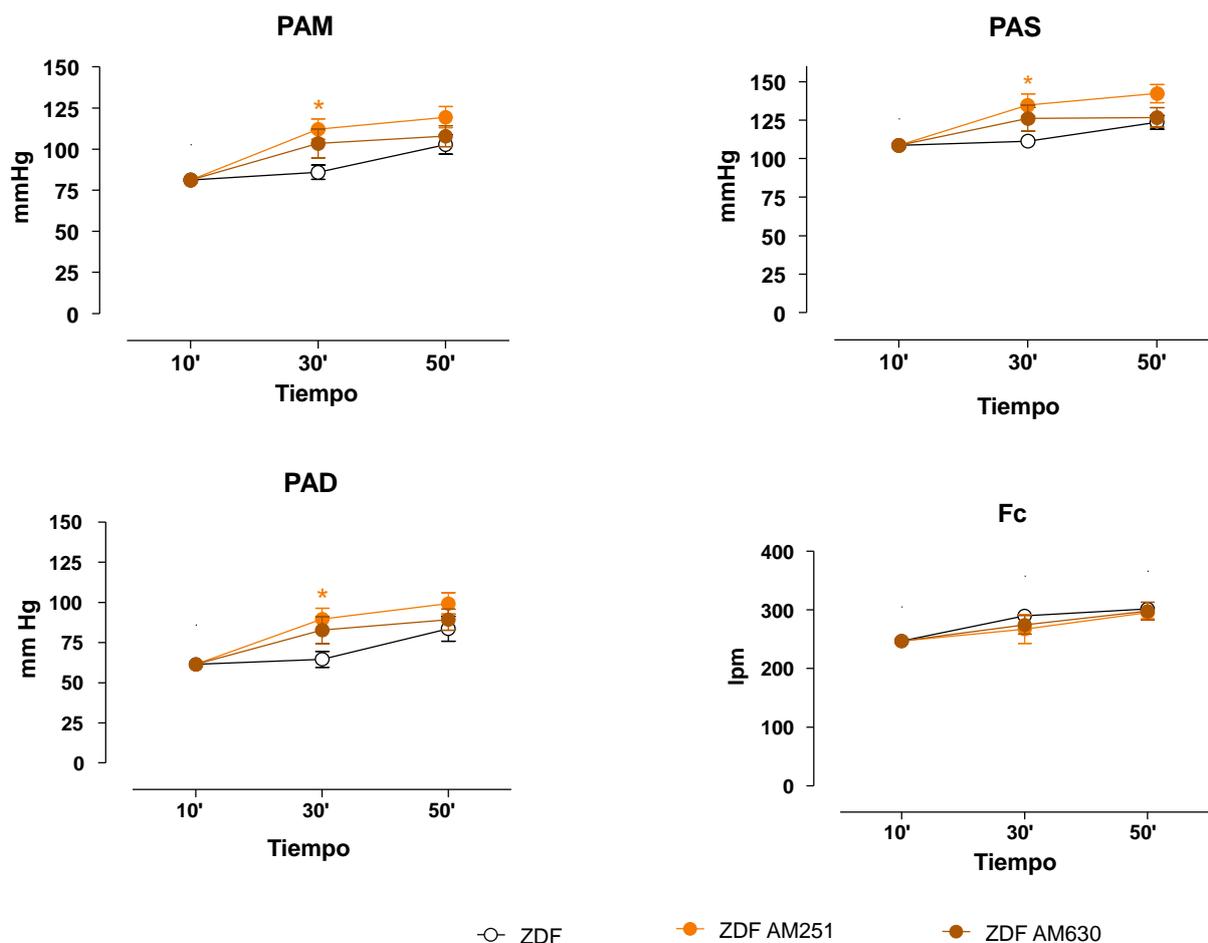
En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación había comprobado que la administración, tanto crónica como aguda del vehículo utilizado para la disolución de los antagonistas cannabinoides AM251 y AM630 (Tween 80) en ratas Wistar, no tenía efectos cardiovasculares (Abalo y cols., 2009). Por ello, y dado el alto coste de estos animales y que únicamente se hacía una administración aguda del mismo, no se realizó la evaluación del efecto de dicho vehículo sobre los parámetros cardiovasculares en ratas ZDF.

Previamente a evaluar la implicación que los receptores cannabinoides CB1 y CB2 podían tener en el efecto de Win, se evaluó si los antagonistas tenían algún efecto “*per se*” sobre la presión arterial en los animales ZDF.

La administración de AM251 1mg/kg a las ratas ZDF ocasionó un ligero, aunque significativo aumento de la presión arterial (PAM, PAS y PAD) en rata ZDF anestesiada en el minuto 30 del protocolo experimental, si bien no modificó la Fc (Tabla 7, Figura 48). Es importante señalar que este aumento en la presión arterial había desaparecido en el minuto 50 del protocolo.

La administración de AM630 1mg/kg a las ratas ZDF no ocasionó ninguna modificación en los parámetros de presión arterial analizados (PAM, PAS, PAD y Fc) en rata ZDF anestesiada durante el tiempo de registro del protocolo experimental (Tabla 7, Figura 48).

## RESULTADOS



**Figura 48.** Presión Arterial Media (PAM), Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardiaca (Fc) 10, 30 y 50 minutos después de la canulación de la arteria carótida de animales obesos y diabéticos tratados con AM251 1mg/kg (ZDF AM251), AM630 1mg/kg (ZDF AM630), y animales obesos y diabéticos no tratados, considerados como grupo control (ZDF). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. (\* $P < 0.05$  vs ZDF).

**Tabla 7:** Presión Arterial Media (PAM), Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardiaca (Fc) a los 30 minutos en animales obesos y diabéticostratados con AM251 1mg/kg (ZDF AM251), AM630 1mg/kg (ZDF AM630), y animales obesos y diabéticos no tratados, considerados como grupo control (ZDF). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\*P < 0.05 vs ZDF).

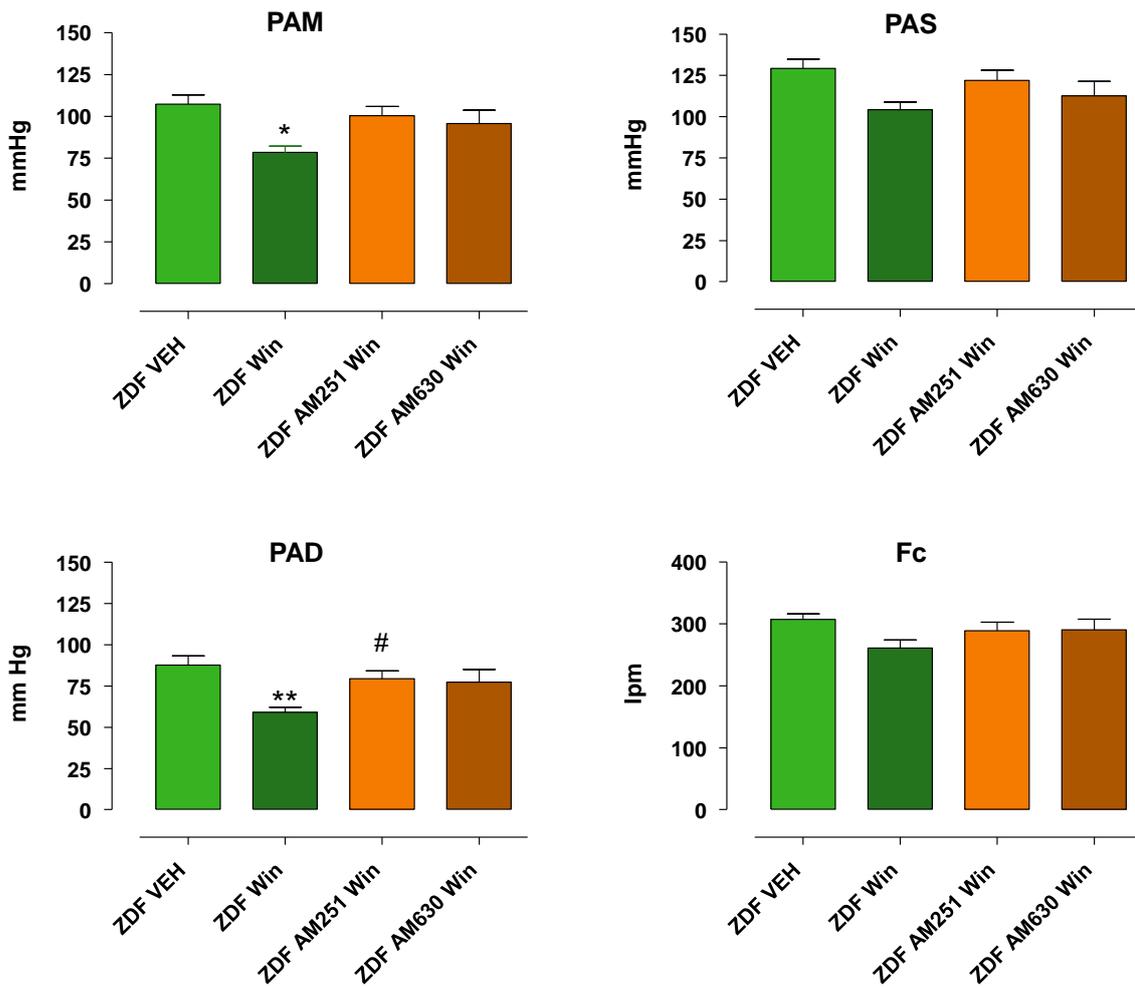
PAM, mmHg			PAS, mmHg		
ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630
85.97 $\pm$ 4.29	<b>112,19<math>\pm</math>6,28*</b>	103,45 $\pm$ 8,68	111.38 $\pm$ 3.79	<b>134,75<math>\pm</math>7,24*</b>	126,22 $\pm$ 8,42

Tabla 7: continuación.

PAD, mmHg			Fc, lpm		
ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630
64.54 $\pm$ 5.02	<b>89,61<math>\pm</math>6,76*</b>	82,66 $\pm$ 8,44	289.88 $\pm$ 10.5	267,27 $\pm$ 24,52	274,57 $\pm$ 15,85

### 3.1.4 Efecto de los antagonistas + Win.

La administración de los antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 produjo un bloqueo del efecto hipotensor y bradicardizante que Win había provocado en las ratas ZDF, si bien ese bloqueo únicamente fue significativo en el caso del AM251 y sólo en la PAD. Así, PAM: ZDF AM251+Win:  $100,52 \pm 5,34$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $78,51 \pm 3,66$  mmHg (n=6)  $P > 0,05$ ; ZDF AM630+Win:  $95,62 \pm 8,14$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $78,51 \pm 3,66$  mmHg (n=6)  $P > 0,05$ ; PAS: ZDF AM251+Win:  $122,08 \pm 5,99$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $104,3 \pm 4,5$  mmHg (n=6),  $P > 0,05$ , ZDF AM630+Win:  $112,55 \pm 8,73$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $104,3 \pm 4,5$  mmHg (n=6)  $P > 0,05$ ; PAD: ZDF AM251+Win:  $79,37 \pm 4,74$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $58,94 \pm 3,2$  mmHg (n=6)  $P < 0,05$ , ZDF AM630+Win:  $77,24 \pm 7,67$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $58,94 \pm 3,2$  mmHg (n=6)  $P > 0,05$ ; Fc: ZDF AM251+Win:  $289,23 \pm 13,87$  lpm (n=5) *vs* ZDF Win:  $261,43 \pm 12,97$  lpm (n=6)  $P > 0,05$ ; ZDF AM630+Win:  $290,50 \pm 17,14$  lpm (n=5) *vs* ZDF Win:  $261,43 \pm 12,97$  lpm (n=6)  $P > 0,05$  (Figura 49).

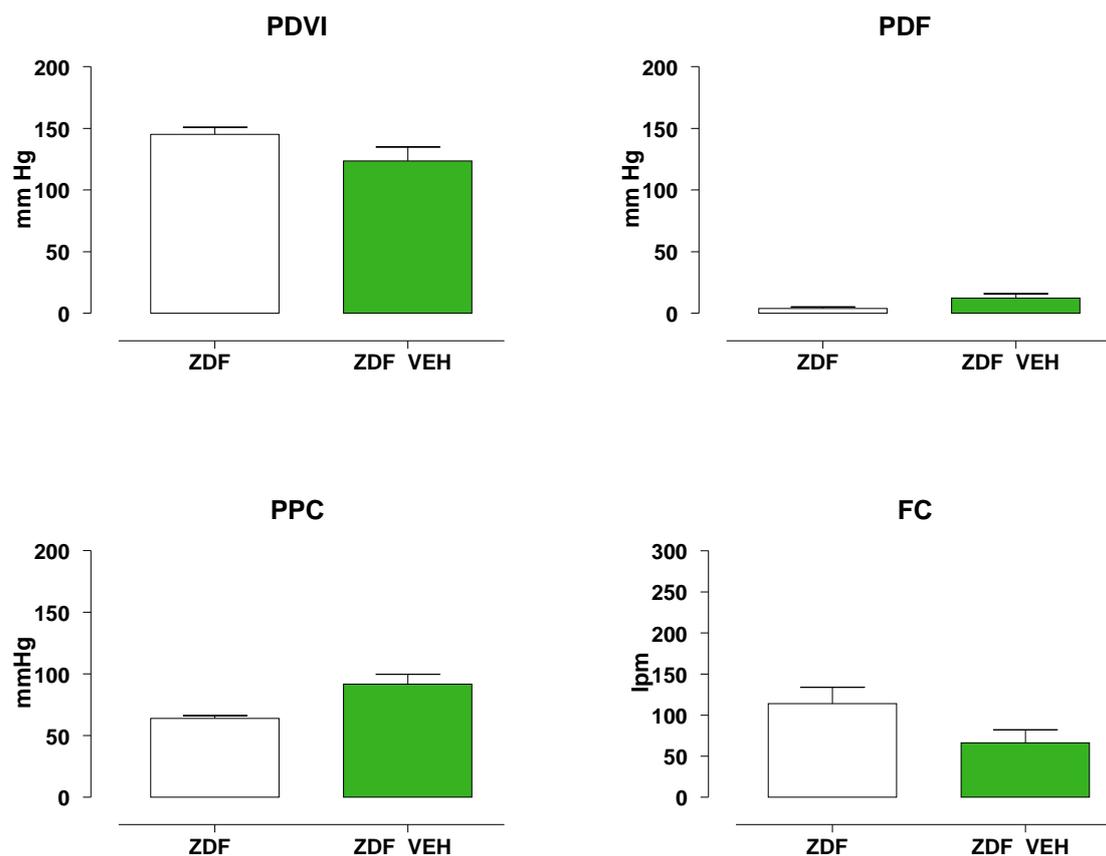


**Figura 49.** Efecto del bloqueo de los receptores cannabinoides CB1 o CB2 previo a la administración de Win en la Presión Arterial Media (PAM), Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardiaca (Fc) en el minuto 30 en animales obesos y diabéticos tratados con AM251 1mg/kg y Win 1mg/Kg (ZDF AM251 Win), AM630 1mg/kg y Win 1mg/Kg (ZDF AM630 Win), y animales obesos y diabéticos tratados con Win 1mg/Kg, considerados como grupo control (ZDF Win). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  vs ZDF VEH; # $P < 0.05$  vs ZDF Win).

## 3.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE WIN SOBRE LA FUNCIÓN CARDIACA BASAL: POSIBLE IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES

### 3.2.1 Efecto del vehículo.

De la misma manera que sobre la presión arterial, también se evaluó el efecto del Tocrisolve® sobre la funcionalidad cardiaca basal. Así, cuando se compararon los parámetros de función cardiaca del grupo de animales ZDF tratado con vehículo (ZDF VEH) con los del grupo de animales ZDF sin tratamiento, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. PDVI: ZDF VEH:  $123,56 \pm 11,51$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $145,35 \pm 5,65$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; PDF: ZDF VEH:  $12,56 \pm 3,46$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $4,06 \pm 1,14$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; PPC: ZDF VEH:  $91,73 \pm 7,92$  mmHg (n=5) *vs* ZDF:  $64,05 \pm 2,11$  mmHg (n=4),  $P > 0.05$ ; Fc: ZDF VEH:  $75.77 \pm 16.37$  lpm (n=5) *vs* ZDF:  $114,06 \pm 19,81$  lpm (n=4),  $P > 0.05$  (Figura 50).

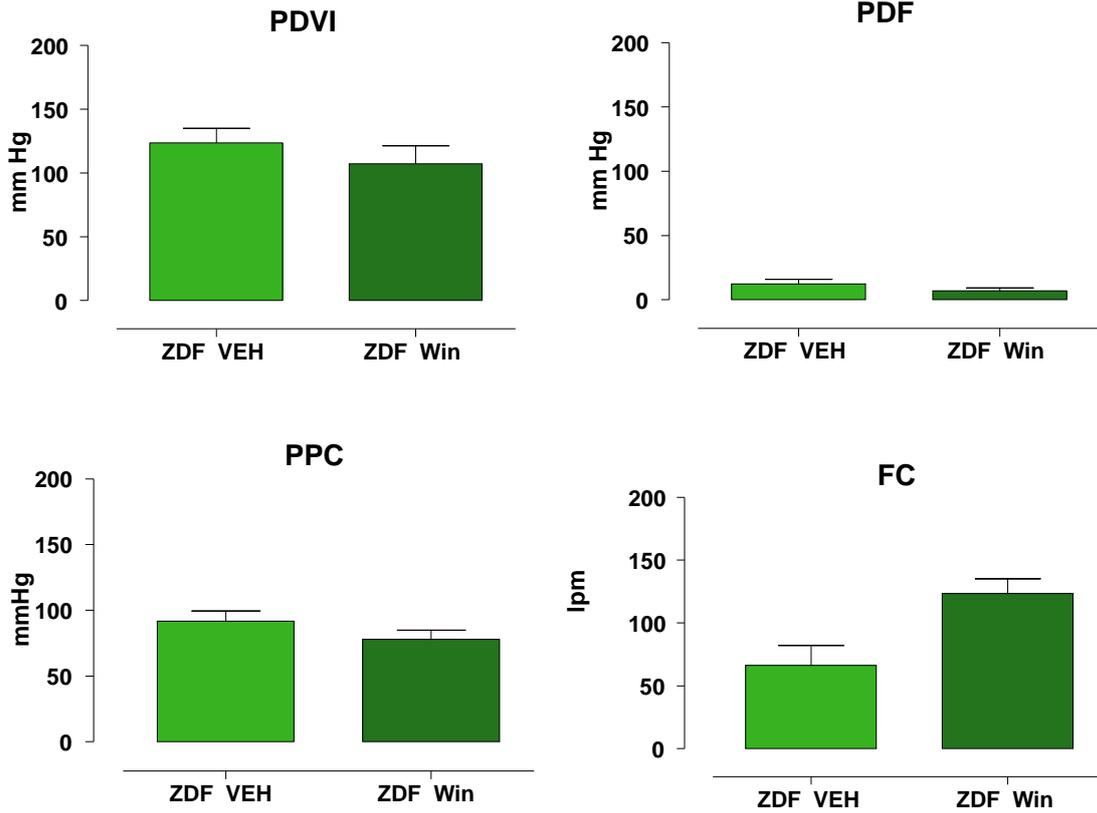


**Figura 50.** Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc) basal (tras 20 minutos de estabilización) de animales obesos y diabéticos tratados con vehículo cannabinoide (Tocrisolve®) (ZDF VEH) y animales obesos y diabéticos no tratados, considerados como grupo control (ZDF). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados.

La administración i.p. del vehículo utilizado para la disolución de los cannabinoides, no produjo ninguna modificación en los valores de funcionalidad cardíaca basal en los animales ZDF.

### 3.2.2 Efecto de Win.

Cuando se estudia el efecto de la administración aguda de Win en los animales ZDF (ZDF Win) sobre la función cardíaca basal tampoco se observaron modificaciones en relación a los animales tratados con el vehículo (ZDF VEH) en ninguno de los parámetros evaluados (PDVI, PDF, PPC o Fc). PDVI: ZDF Win:  $107,27 \pm 14,07$  mmHg (n=7) *vs* ZDF VEH:  $123,56 \pm 11,51$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; PDF: ZDF Win:  $7,16 \pm 2,14$  mmHg (n=7) *vs* ZDF VEH:  $12,56 \pm 3,46$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; PPC: ZDF Win:  $77,93 \pm 7,1$  mmHg (n=7) *vs* ZDF VEH:  $91,73 \pm 7,92$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; Fc: ZDF Win:  $123,50 \pm 11,78$  lpm (n=7) *vs* ZDF VEH:  $75,77 \pm 15,79$  lpm (n=5),  $P > 0.05$  (Figura 51).



**Figura 51.** Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc) basal (tras 20 minutos de estabilización) de animales obesos y diabéticos tratados con Win (ZDF Win) y animales obesos y diabéticos tratados con vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®), considerados como grupo control (ZDF VEH). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-7 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados.

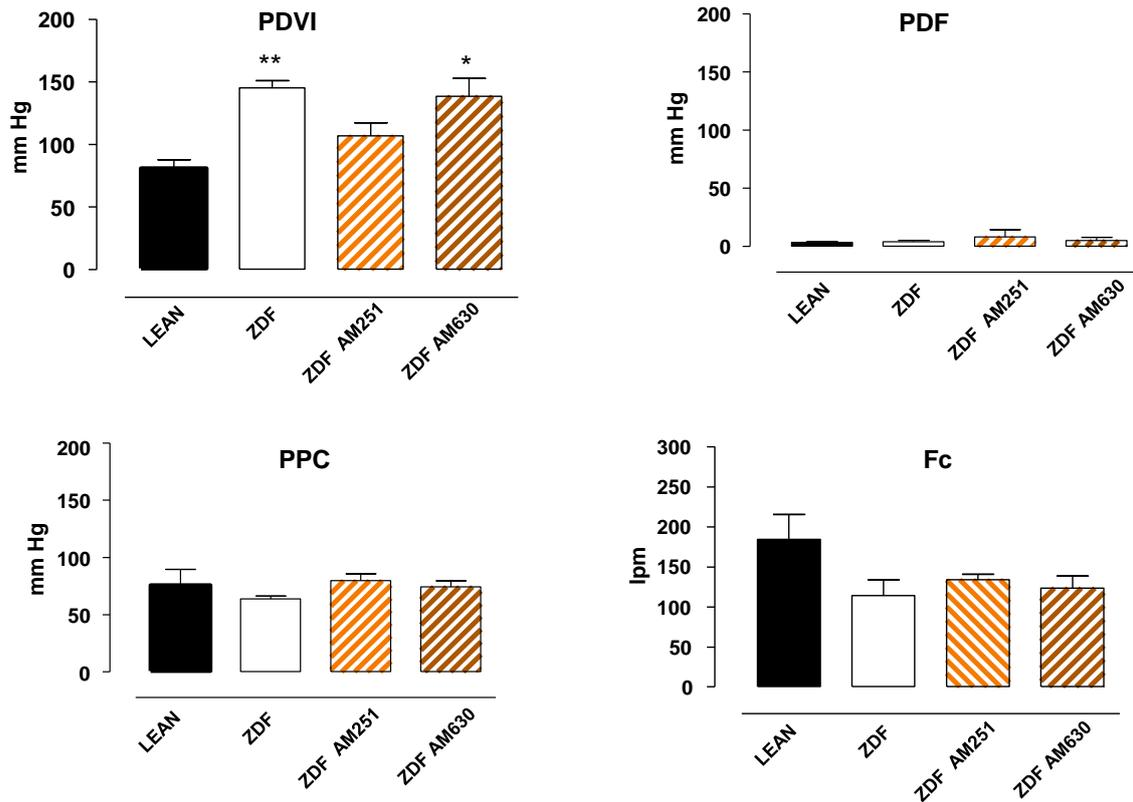
El tratamiento agudo con Win 1mg/kg no fue capaz de corregir las alteraciones observadas en la función cardíaca basal de animales ZDF (ver apartado 2.2.2 Resultados).

### 3.2.3 Efecto de los antagonistas

Los resultados obtenidos hasta ahora parecían mostrar que la administración aguda de Win 1mg/kg no provoca modificaciones sobre la función cardiaca basal de ratas ZDF. Aun así comprobamos el efecto que la administración de los antagonistas tenía sobre esta función.

Para conocer si estos efectos causados por el Win estaban mediados por receptores cannabinoides, se procedió a evaluar si los receptores CB1 y CB2 estaban involucrados en el efecto de la administración aguda de Win sobre los parámetros modificados.

La administración de AM251 1mg/kg o la administración de AM630 1mg/kg no modificaron los parámetros de función cardiaca analizados (PDVI, PDF, PPC y Fc) en las ratas ZDF (Tabla 8 y Figura 52).



**Figura 52.** Presión Desarrollada por el Ventriculo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardiaca (Fc) basal (tras 20 minutos de estabilización) de animales obesos y diabéticos tratados con AM251 1mg/kg (ZDF AM251), AM630 1mg/kg (ZDF AM630), y animales obesos y diabéticos no tratados, considerados como grupo control (ZDF). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados.

## RESULTADOS

**Tabla 8:** Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardiaca (Fc) basal (tras 20 minutos de estabilización) en animales obesos y diabéticos tratados con AM251 1mg/kg (ZDF AM251), AM630 1mg/kg (ZDF AM630), y animales obesos y diabéticos no tratados, considerados como grupo control (ZDF). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre grupos ( $P > 0.05$  vs ZDF).

PDVI, mmHg			PDF, mmHg		
ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630
145,35 $\pm$ 5,65	106,88 $\pm$ 10,47	138,70 $\pm$ 14,06	4,06 $\pm$ 1,14	8,17 $\pm$ 6,29	5,17 $\pm$ 2,65

Tabla 8: continuación.

PPC, mmHg			Fc, lpm		
ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630
64,05 $\pm$ 2,11	79,71 $\pm$ 6,08	74,49 $\pm$ 5,03	114,06 $\pm$ 19,81	133,85 $\pm$ 6,73	123,37 $\pm$ 14,73

### 3.2.4 Efecto de los antagonistas + Win

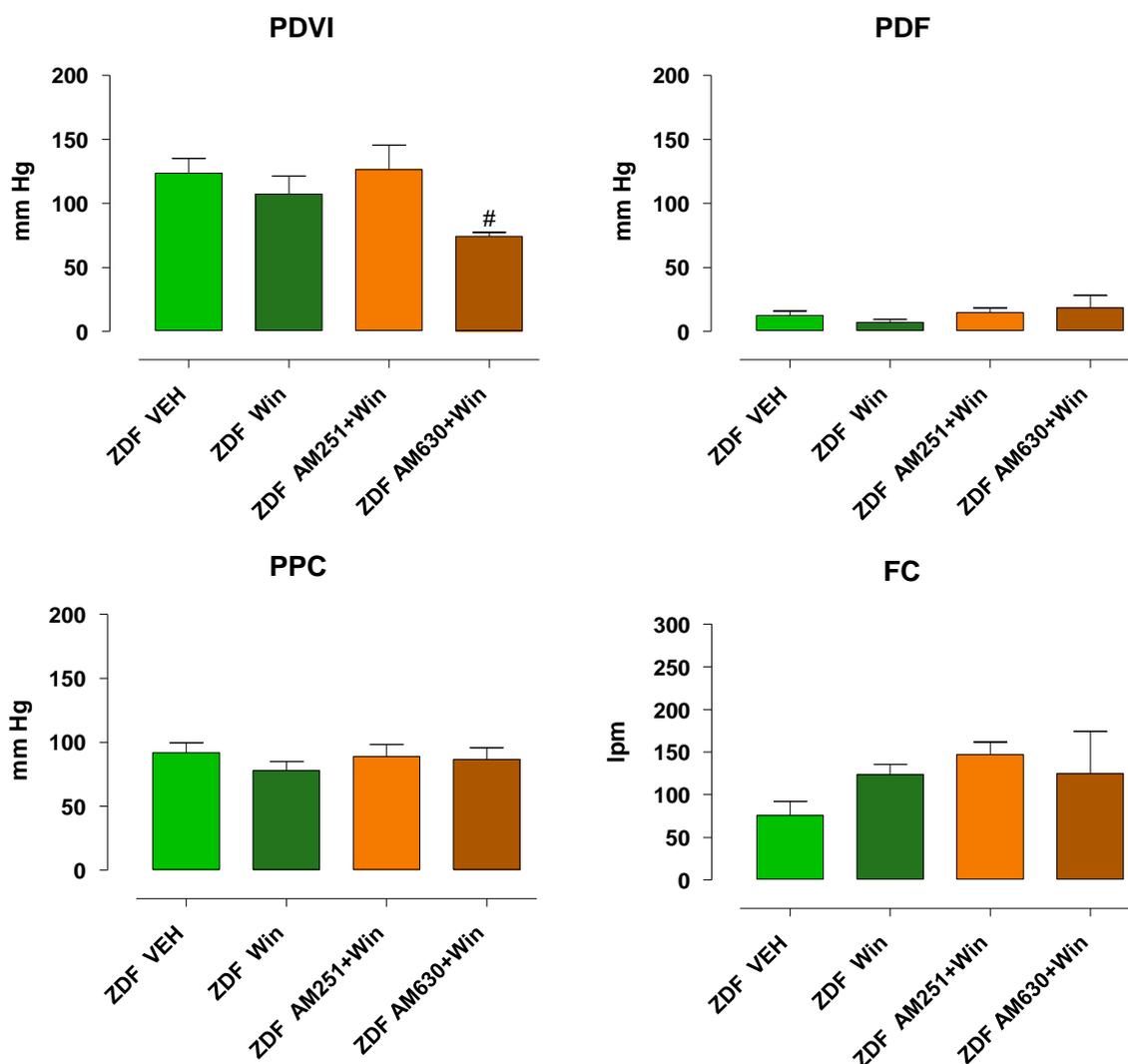
Aunque el agonista cannabinoide Win no había producido ninguna modificación sobre función cardiaca basal, pero dado que se había observado una disminución a nivel cardiaco, concretamente del ventrículo izquierdo, de la expresión de receptores CB1 y CB2, se quiso conocer si la administración de antagonistas previa al Win ocasionaba algún cambio en la función cardiaca basal de ratas ZDF.

Cuando administramos los antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 (AM251) y CB2 (AM630) previamente a Win, observamos que únicamente la administración de AM630 produjo una disminución significativa de la PDVI (ZDF

---

AM251+Win:  $126,39 \pm 19,24$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $107,27 \pm 14,07$  mmHg (n=7)  $P > 0.05$ , (ZDF AM630+Win:  $74,11 \pm 3,34$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win  $107,27 \pm 14,07$  mmHg (n=7)  $P < 0.05$ ) (Figura 53).

Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en ninguno de los demás parámetros de función cardiaca analizados tras la administración de ambos antagonistas previamente a Win. Así, PDF: ZDF AM251+Win:  $14,69 \pm 3,80$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $7,16 \pm 2,14$  mmHg (n=7)  $P > 0.05$ , ZDF AM630+Win:  $18,44 \pm 9,80$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win  $7,16 \pm 2,14$  mmHg (n=7)  $P > 0.05$ ; PPC: ZDF AM251+Win  $88,95 \pm 9,47$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win  $77,93 \pm 7,11$  mmHg (n=7)  $P > 0.05$ , ZDF AM630+Win  $86,57 \pm 9,03$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win  $77,93 \pm 7,11$  mmHg (n=7)  $P > 0.05$ ; Fc: ZDF AM251+Win  $88,95 \pm 9,47$  lpm (n=3) *vs* ZDF Win  $77,93 \pm 7,11$  lpm (n=7)  $P > 0.05$ , ZDF AM630+Win  $86,57 \pm 9,03$  lpm (n=5) *vs* ZDF Win  $77,93 \pm 7,11$  lpm (n=7)  $P > 0.05$  (Figura 53).



**Figura 53.** Efecto del bloqueo de los receptores cannabinoides CB1 o CB2 previo a la administración de Win. Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc) basal (tras 20 minutos de estabilización) de animales obesos y diabéticos tratados con Win 1 mg/Kg + AM251 1mg/kg (ZDF AM251+Win), Win 1 mg/Kg +AM630 1mg/kg (ZDF AM630+Win), y animales obesos y diabéticos tratados con Win (ZDF Win), considerados como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-7 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (# $P < 0.05$  vs ZDF Win).

---

### 3.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE WIN SOBRE LA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIACA TRAS I-R: POSIBLE IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES.

#### 3.3.1 Efecto del vehículo

Dado que el vehículo utilizado contiene aceite de soja en su composición, y ya que existen estudios que relacionan la soja con un efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares y una reducción en el daño tras algunos tipos de isquemia (Schreihöfer y cols., 2009), también se evaluó el efecto de Tocrisolve® sobre la recuperación de la función cardiaca tras un proceso de I-R. En la tabla 9 se muestran los valores de función cardiaca evaluados después de la isquemia y durante la reperfusión en animales ZDF tratados con vehículo (ZDF VEH) y no tratados (ZDF).

En los corazones procedentes de animales ZDF que habían sido tratados con vehículo (ZDF VEH), los parámetros de funcionalidad cardiaca evaluados (PDVI, PDF, PPC o Fc) durante el periodo de reperfusión, fueron similares a los de los corazones procedentes de animales que no había sido tratados con vehículo (Tabla 9).

## RESULTADOS

**Tabla 9:** Valores de función cardiaca, (Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardiaca (Fc)), durante diferentes tiempos (minutos) del periodo de reperfusión tras isquemia en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales obesos y diabéticos tratados con vehículo (Tocrisolve®) (ZDF VEH) y animales obesos y diabéticos no tratados (ZDF), considerados como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre grupos ( $P > 0.05$  vs ZDF). Lpm: latidos por minuto.

Tiempo reperfusión	PDVI, mm Hg		PDF, mm Hg	
	ZDF	ZDF VEH	ZDF	ZDF VEH
1'	8,71 $\pm$ 0,76	9,06 $\pm$ 1,10	55,51 $\pm$ 3,41	56,68 $\pm$ 11,58
2'	8,52 $\pm$ 0,79	9,81 $\pm$ 0,76	61,64 $\pm$ 5,44	74,92 $\pm$ 4,45
5'	8,52 $\pm$ 0,90	9,30 $\pm$ 1,02	61,21 $\pm$ 4,31	76,25 $\pm$ 4,85
10'	9,10 $\pm$ 1,08	8,87 $\pm$ 0,94	59,73 $\pm$ 3,71	76,10 $\pm$ 6,64
15'	9,81 $\pm$ 0,88	9,03 $\pm$ 0,50	64,26 $\pm$ 2,55	66,06 $\pm$ 6,73
30'	20,78 $\pm$ 8,55	9,92 $\pm$ 0,50	55,08 $\pm$ 4,17	71,09 $\pm$ 9,41
45'	18,67 $\pm$ 10,29	9,41 $\pm$ 0,37	54,84 $\pm$ 5,19	70,39 $\pm$ 7,54
60'	17,31 $\pm$ 8,83	8,98 $\pm$ 0,19	53,71 $\pm$ 4,04	71,99 $\pm$ 8,53

**Tabla 9: continuación.**

Tiempo reperfusión	PPC, mm Hg		Fc, lpm	
	ZDF	ZDF VEH	ZDF	ZDF VEH
1'	85,15 $\pm$ 13,73	92,09 $\pm$ 26,78	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2'	83,04 $\pm$ 13,04	140,50 $\pm$ 32,54	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
5'	79,66 $\pm$ 11,73	141,30 $\pm$ 33,06	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10'	82,60 $\pm$ 12,02	148,54 $\pm$ 32,23	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
15'	104,28 $\pm$ 9,87	160,22 $\pm$ 28,74	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
30'	126,56 $\pm$ 13,81	182,28 $\pm$ 32,69	37,20 $\pm$ 37,20	0,00 $\pm$ 0,00
45'	141,11 $\pm$ 18,23	193,20 $\pm$ 31,61	39,18 $\pm$ 39,18	0,00 $\pm$ 0,00
60'	157,24 $\pm$ 18,82	197,55 $\pm$ 34,82	38,38 $\pm$ 38,38	0,00 $\pm$ 0,00

---

El tratamiento con el vehículo utilizado para la disolución de Win no produjo modificaciones en la recuperación de la funcionalidad cardiaca tras un proceso de I-R, por lo que no interferiría en el efecto que el cannabinoide, Win, pudiese ejercer.

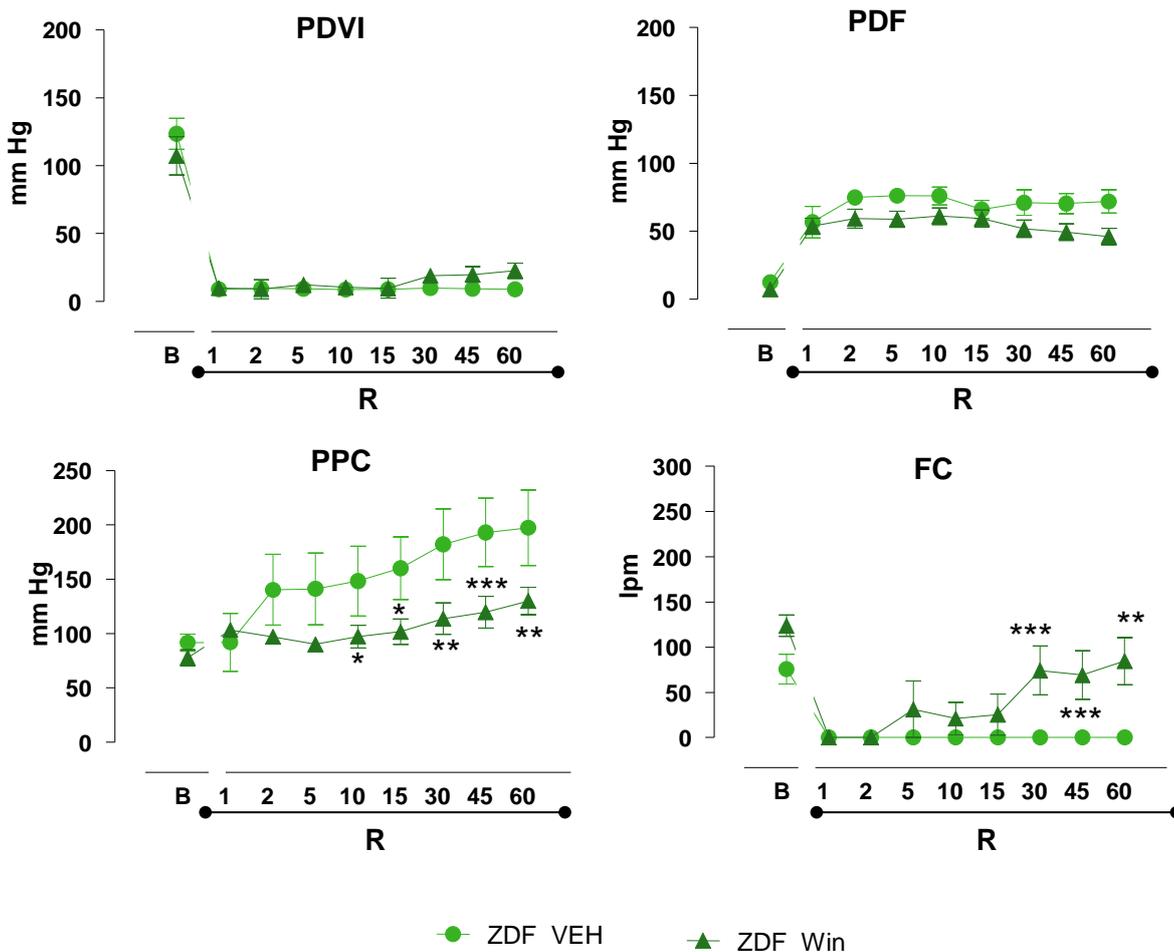
### 3.3.2 Efecto de Win

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que la administración aguda de Win 1mg/kg no era capaz de corregir las alteraciones cardiovasculares observadas en animales ZDF. Sin embargo, se evaluó si tras un periodo de isquemia, el cannabinoide podría ser capaz de proteger frente al daño por I-R. Diferentes estudios muestran que los cannabinoides son capaces de proteger frente al daño por I-R cardiaca, cerebral o hepática (Lépicier y cols., 2006; Pacher y cols., 2008a; Pacher y cols., 2008b). Sin embargo, no hay datos sobre si esta protección se ejerce en situaciones donde el riesgo cardiovascular es alto como es el SM o la DM2.

Cuando los corazones procedentes de animales ZDF tratados con Win 1mg/kg i.p. se sometían a un proceso de I-R se observó que la PPC y la Fc se recuperaban significativamente mejor que dichos parámetros en los corazones de las ratas ZDF tratadas con vehículo (ZDF VEH). El agonista cannabinoide Win claramente previno el incremento significativo de la PPC tras la isquemia (ZDF Win:  $130,16 \pm 12,60$  mmHg (n=7) vs ZDF VEH:  $197,55 \pm 34,82$  mmHg (n=4),  $P < 0.01$ ) y la significativa reducción de la Fc tras la misma (ZDF Win:  $84,45 \pm 26,02$  mmHg (n=7) vs ZDF VEH:  $0,00 \pm 0,00$  mmHg (n=4),  $P < 0.001$ ). Es importante señalar que los valores de PPC y Fc en el minuto 60 del proceso de reperfusión fueron además similares a los que se encontraron en la función basal.

## RESULTADOS

Sin embargo, no hubo diferencias en la recuperación de la capacidad contráctil y dilatadora del ventrículo izquierdo (PDVI y PDF) de los animales ZDF tratados con Win. PDVI: ZDF Win:  $22,63 \pm 5,76$  mmHg (n=7) vs ZDF VEH:  $8,98 \pm 0,19$  mmHg (n=4),  $P>0.05$ ; PDF: ZDF Win:  $46,16 \pm 6,02$  mmHg (n=7) vs ZDF VEH:  $71,99 \pm 8,53$  mmHg (n=4),  $P>0.05$  (Figura 54).



**Figura 54.** Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc) durante diferentes tiempos (minutos) del periodo de reperfusión tras isquemia en de animales obesos y diabéticos tratados con Win 1 mg/Kg (ZDF Win), y animales obesos y diabéticos tratados con el vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®), considerados como grupo control (ZDF VEH). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-7 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  vs ZDF VEH). Lpm: latidos por minuto.

Por tanto, el agonista cannabinoide Win, aunque no fue capaz de prevenir las alteraciones observadas en la presión arterial *in vivo* (ver apartado 3.1.2 de Resultados), ni en la función cardíaca basal de los animales ZDF (ver apartado 3.2.2 de Resultados), sí previno parcialmente el daño cardíaco causado por I-R en los corazones de los animales ZDF.

### **3.3.3 Efecto de los antagonistas**

De igual manera que en apartados anteriores se quisieron conocer los efectos causados por el Win estaban mediados por receptores cannabinoideos, y comenzamos evaluando el efecto de los antagonistas “per se” sobre la función cardíaca tras I-R.

De la misma manera, tras el proceso de I-R, la recuperación de la función cardíaca en las ratas ZDF (Control) y las tratadas con el antagonista de los receptores cannabinoideos CB1 (AM251) fue similar. Sin embargo, en los corazones de los animales tratados con el antagonista de los receptores CB2 (AM630), se observaron valores de PPC significativamente menores que los obtenidos tras la I-R de animales Control, si bien no existieron diferencias significativas en el resto de los parámetros cardíacos evaluados (Tabla 10).

## RESULTADOS

**Tabla 10:** Valores de función cardiaca, (Presión desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardiaca (Fc)) durante diferentes tiempos (minutos) del periodo de reperfusión tras la isquemia en preparaciones de corazón aislado de animales obesos y diabéticos tratados AM251 1 mg/Kg (ZDF AM251), AM630 1 mg/Kg (ZDF AM630) y animales obesos y diabéticos no tratados (ZDF), considerados como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre los grupos ( $P > 0.05$  vs ZDF). Lpm: latidos por minuto.

Tiempo reperfusión	PDVI, mmHg			PDF, mmHg		
	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630
1'	8,71 $\pm$ 0,76	10,58 $\pm$ 1,93	9,84 $\pm$ 0,75	55,51 $\pm$ 3,41	56,81 $\pm$ 3,77	54,85 $\pm$ 10,10
2'	8,52 $\pm$ 0,79	7,77 $\pm$ 0,40	8,56 $\pm$ 0,22	61,64 $\pm$ 5,44	75,48 $\pm$ 4,97	64,61 $\pm$ 8,80
5'	8,52 $\pm$ 0,90	8,57 $\pm$ 0,08	8,99 $\pm$ 0,45	61,21 $\pm$ 4,31	77,65 $\pm$ 7,61	66,17 $\pm$ 7,04
10'	9,10 $\pm$ 1,08	12,74 $\pm$ 3,93	8,60 $\pm$ 0,14	59,73 $\pm$ 3,71	75,00 $\pm$ 10,10	68,40 $\pm$ 7,01
15'	9,81 $\pm$ 0,88	9,30 $\pm$ 0,96	9,10 $\pm$ 0,45	64,26 $\pm$ 2,55	74,60 $\pm$ 10,18	71,17 $\pm$ 8,84
30'	20,78 $\pm$ 8,55	8,33 $\pm$ 0,16	14,22 $\pm$ 3,68	55,08 $\pm$ 4,17	74,12 $\pm$ 12,26	68,24 $\pm$ 9,14
45'	18,67 $\pm$ 10,29	8,17 $\pm$ 0,00	12,97 $\pm$ 3,32	54,84 $\pm$ 5,19	75,00 $\pm$ 12,34	72,31 $\pm$ 9,22
60'	17,31 $\pm$ 8,839	8,41 $\pm$ 0,40	12,07 $\pm$ 3,49	53,71 $\pm$ 4,04	75,24 $\pm$ 12,26	74,18 $\pm$ 6,19

Tabla 10 continuación:

Tiempo reperusión	PPC, mmHg			Fc, lpm		
	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630	ZDF	ZDFAM251	ZDFAM630
1'	85,15±13,73	123,73±5,40	107,71±9,46	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00±0,00
2'	83,04±13,04	121,30±1,70	106,71±9,10	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00±0,00
5'	79,66±11,73	119,43±1,71	103,20±9,51	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00±0,00
10'	82,60±12,02	122,51±2,93	104,17±9,13	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00±0,00
15'	104,28±9,87	129,08±3,14	108,92±9,90	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00±0,00
30'	126,56±13,81	139,95±3,42	114,13±9,93	37,20±37,20	0,00 ±0,00	0,00±0,00
45'	141,11±18,23	144,34±2,94	119,92±10,94	39,18±39,18	0,00 ±0,00	0,00±0,00
60'	157,24±18,82	149,83±3,97	122,26±12,99*	38,38±38,38	0,00 ±0,00	0,00±0,00

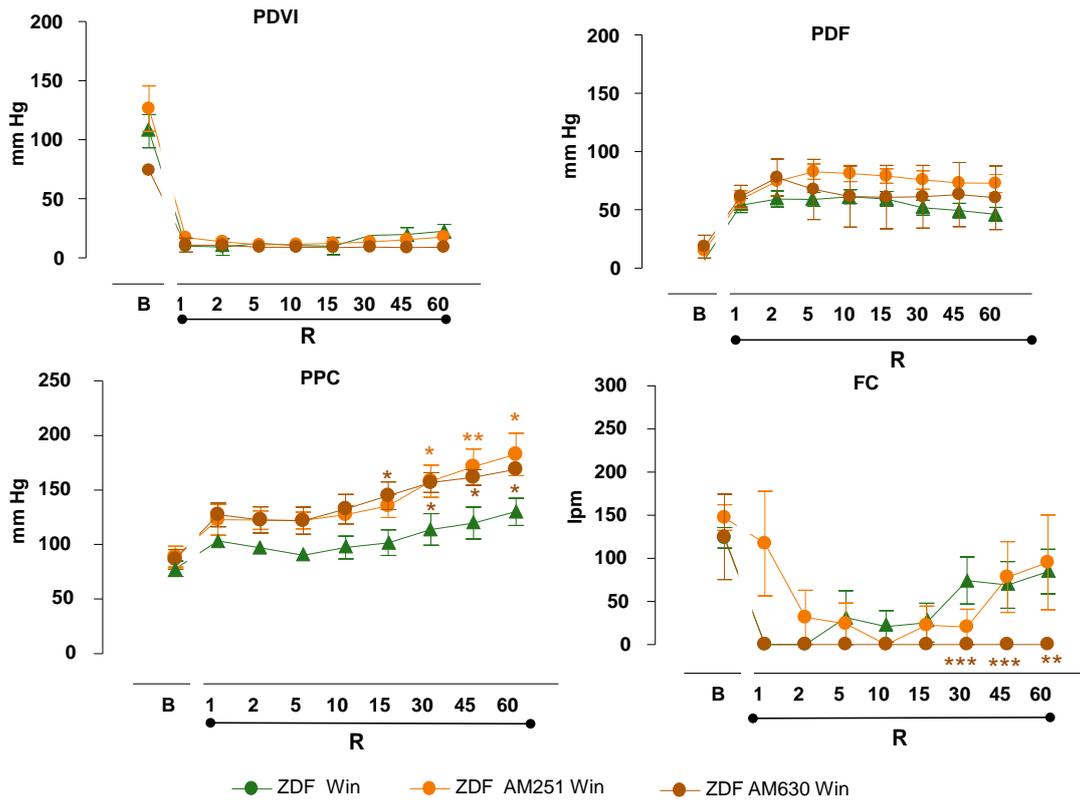
Así, la administración de los antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 no ocasionó modificaciones ni de presión arterial y frecuencia cardiaca, ni en ninguno de los parámetros de función cardiaca basal en estos animales, aunque en el caso del antagonista de los receptores CB2 (AM630), mejoró ligeramente la recuperación de la PPC tras el proceso de I-R.

### 3.3.4 Efecto de los antagonistas + Win

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la administración de Win no modificó la función cardíaca basal en los animales ZDF pero si ocasionó una recuperación parcial del daño por I-R. A continuación se muestran los resultados sobre la posible implicación de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en dicho efecto.

La administración aguda de AM251 (1 mg/Kg) bloqueó significativamente el efecto protector de Win en la PPC: ZDF: AM251±Win:  $182.77 \pm 19.47$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $130.16 \pm 12.60$  mmHg (n=5),  $P < 0.05$ , no encontrándose diferencias en los demás parámetros cardíacos evaluados (PDVI, PDF y Fc). Así, PDVI: ZDF AM251+Win R60':  $17.68 \pm 3.41$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win R60':  $22.63 \pm 5.76$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; PDF: ZDF AM251+Win R60':  $72.60 \pm 7.63$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win R60':  $46.16 \pm 6.02$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; Fc: ZDF AM251+Win R60':  $95.25 \pm 54.91$  lpm (n=5) *vs* ZDF Win R60':  $84.45 \pm 26.02$  lpm (n=5),  $P > 0.05$  (Figura 55).

De igual manera, la administración aguda de AM630 (1 mg/Kg) bloqueó significativamente el efecto protector de Win en la PPC y en la Fc. Así, PPC: ZDF AM630±Win  $169.12 \pm 6.34$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win:  $130.16 \pm 12.60$  mmHg (n=5),  $P < 0.05$ ; Fc: AM630+Win R60':  $0.00 \pm 0.00$  lpm (n=5) *vs* ZDF Win R60':  $84.45 \pm 26.02$  lpm (n=5),  $P < 0.05$ , no encontrándose diferencias en los demás parámetros cardíacos evaluados. Así, PDVI: AM630+Win R60':  $8.96 \pm 0.27$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win R60':  $22.63 \pm 5.76$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$ ; PDF: AM630+Win R60':  $60.26 \pm 27.19$  mmHg (n=5) *vs* ZDF Win R60':  $46.16 \pm 6.02$  mmHg (n=5),  $P > 0.05$  (Figura 55).



**Figura 55:** Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI), Presión Diastólica Final (PDF), Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) y Frecuencia Cardíaca (Fc) durante diferentes tiempos (minutos) del periodo de reperfusión tras isquemia en de animales obesos y diabéticos tratados con AM251 1 mg/Kg y Win 1 mg/Kg (ZDF AM251 Win), animales obesos y diabéticos tratados con AM630 1 mg/Kg y Win 1 mg/Kg (ZDF AM630 Win) y animales obesos y diabéticos tratados con Win 1 mg/Kg (ZDF Win), considerados como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4-6 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs ZDF Win).

La administración aguda de AM251 1mg/Kg bloqueó el efecto de Win con respecto a la mejora de la PPC tras el proceso de I-R (ver apartado 3.3.2 de Resultados).

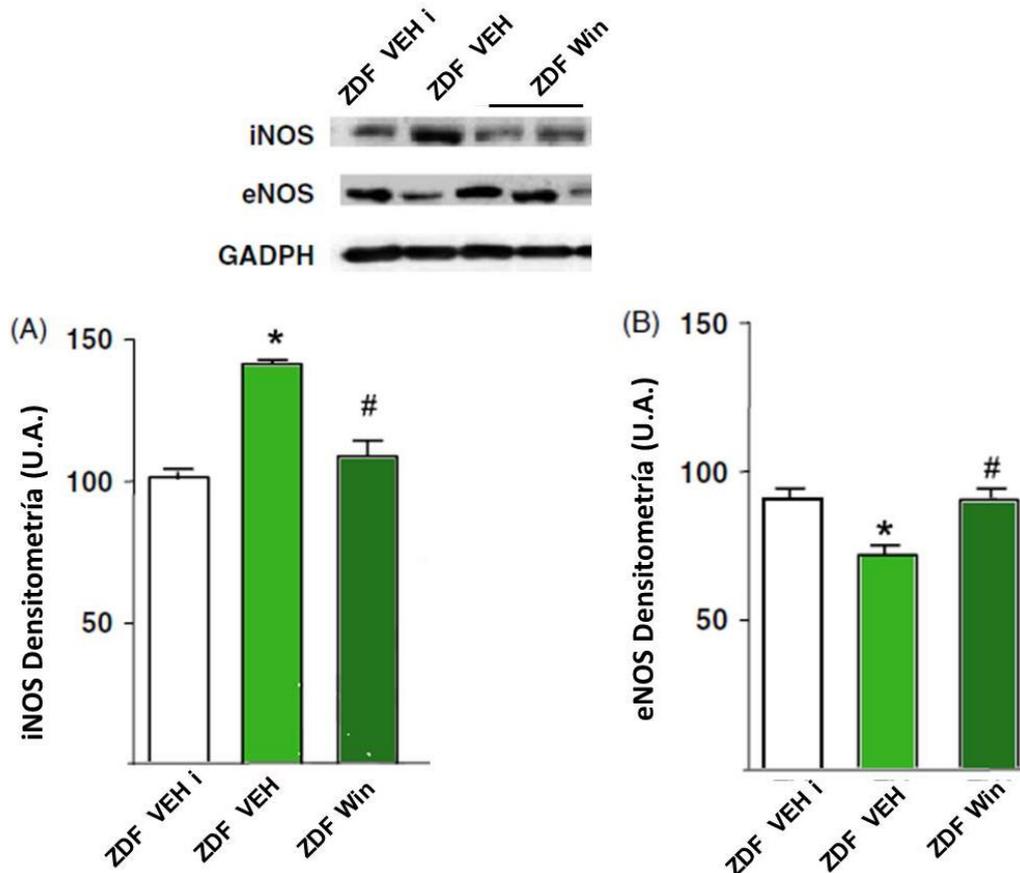
La administración aguda de AM630 1mg/Kg bloqueó el efecto de Win con respecto a la mejora de PPC y la Fc tras el proceso de I-R (ver apartado 3.3.2 de Resultados).

### 3.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE WIN SOBRE LA EXPRESIÓN MIOCÁRDICA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) TRAS EL PERIODO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El Óxido Nítrico (NO) es generado fisiológicamente dentro de los cardiomiocitos por la Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), y puede modular la relajación cardíaca, el tono diastólico y el consumo de oxígeno. Sin embargo, en ciertas patologías como la DM, la forma inducible de la Óxido Nítrico Sintasa (iNOS) aumenta su expresión en los cardiomiocitos y se sugiere que contribuye a la disfunción cardíaca asociada a estas patologías. Además, en el proceso de I-R, la reacción de grandes cantidades de NO con radicales superóxido forman peroxinitrito, que puede inducir un aumento en los efectos deletéreos.

Tras someter a los corazones a un proceso de I-R, en homogeneizados de ventrículo izquierdo de los animales tratados con vehículo, la expresión miocárdica de iNOS aumenta de forma significativa, mientras que la expresión ventricular izquierda de eNOS disminuye significativamente (Figura 56).

La administración de Win 1 mg/kg en las ratas ZDF previene el aumento en la expresión miocárdica de iNOS y la disminución en la expresión miocárdica de eNOS tras el proceso de I-R. Es más, en los corazones de los animales tratados con Win, la expresión de ambas enzimas fue similar a la observada en corazones no sometidos a isquemia (Figura 57).



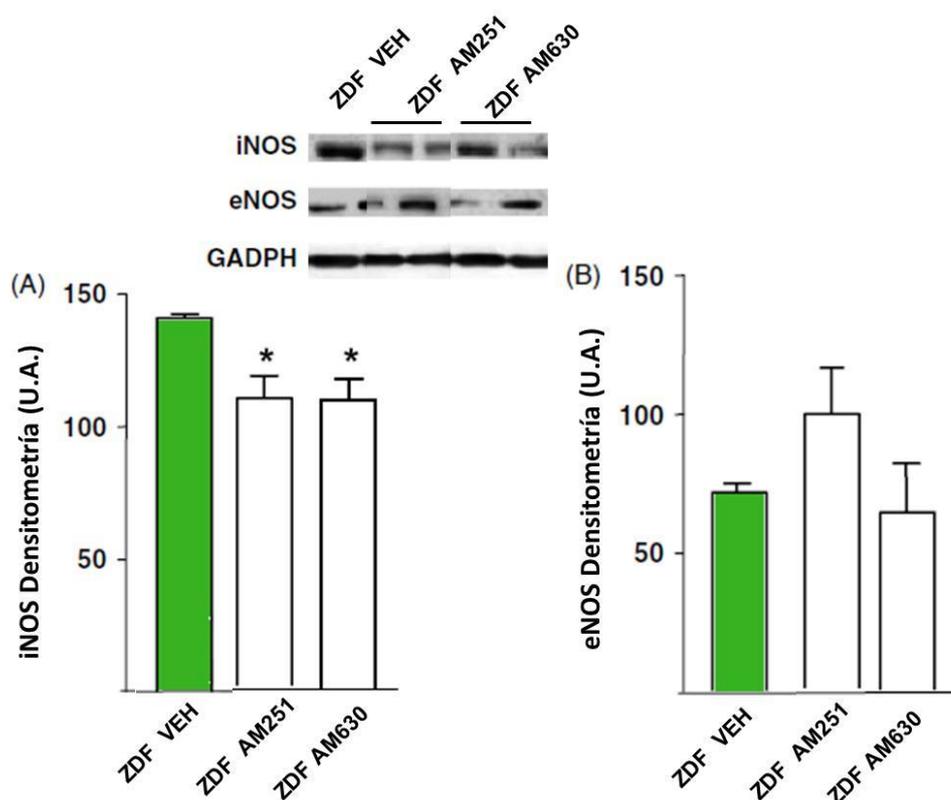
**Figura 56.** Expresión de iNOS (A) y eNOS (B) en homogeneizados de ventrículo izquierdo de corazones procedentes de animales obesos y diabéticos tratados con Win 1 mg/Kg sometidos a un proceso de I-R (ZDF Win), animales obesos y diabéticos tratados con el vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®) sometidos a un proceso de I-R (ZDF VEH) y de animales obesos y diabéticos tratados con el vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®) previamente al proceso de I-R (ZDF VEH<sub>i</sub>). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-7 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P < 0.05$  vs ZDF VEH<sub>i</sub>; # $P < 0.05$  vs ZDF VEH). U.A.: Unidades Arbitrarias.

La administración aguda de Win previno la modificación en la expresión de iNOS y eNOS provocada por un proceso de I-R.

Cuando se comparó la expresión miocárdica de iNOS y eNOS tras un proceso de I-R en corazones de animales tratados con los antagonistas de los receptores

## RESULTADOS

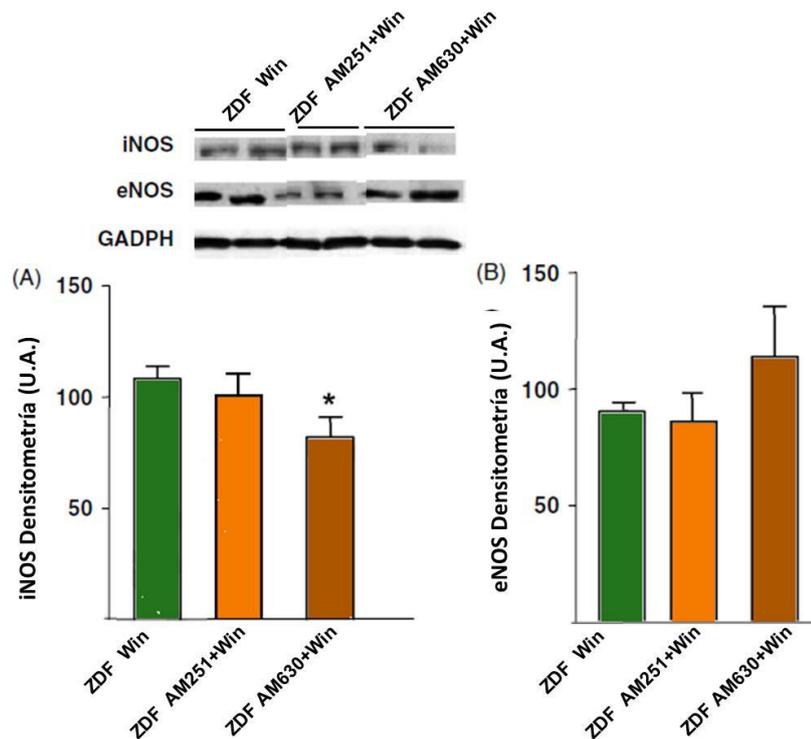
cannabinoides CB1 (AM251) y CB2 (AM630), con la de los animales tratados con vehículo, se observó que la administración de ambos antagonistas produjo una disminución significativa en la expresión de iNOS, pero no modificó significativamente la expresión miocárdica de eNOS (Figura 57).



**Figura 57.** Expresión de iNOS (A) y eNOS (B) en homogeneizados de ventrículo izquierdo de corazones procedentes de animales obesos y diabéticos tratados con AM250 1 mg/Kg sometidos a un proceso de I-R (ZDF AM251), animales obesos y diabéticos tratados con AM630 1 mg/Kg sometidos a un proceso de I-R (ZDF AM630) y animales obesos y diabéticos tratados con el vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®) sometidos a un proceso de I-R (ZDF VEH) y de animales obesos y diabéticos tratados con el vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®) previamente al proceso de I-R (ZDF VEH<sub>i</sub>), considerados como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-7 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P < 0.05$  vs ZDF VEH<sub>i</sub>; # $P < 0.05$  vs ZDF VEH). U.A.: Unidades Arbitrarias.

Cuando se administraron los antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 (AM251) y CB2 (AM630) con el fin de estudiar su implicación en el efecto de Win sobre la expresión miocárdica de iNOS y eNOS, se observó que el AM251 no alteró las modificaciones en la expresión de la iNOS y/o eNOS ocasionadas por Win.

Sin embargo, AM630 no sólo no bloqueó el efecto del Win sobre la expresión de la iNOS, sino que lo potenció reduciendo aún más los niveles de ésta. De igual manera, el antagonista de los receptores CB2 aumentó el efecto de Win sobre la expresión de eNOS, si bien este aumento no resultó significativo (Figura 58).



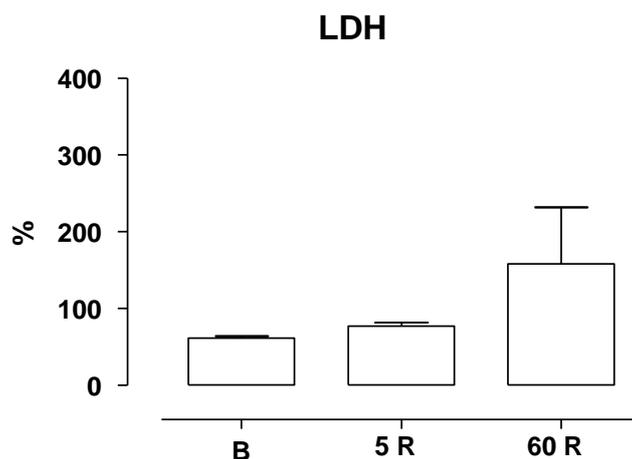
**Figura 58.** Expresión de iNOS (A) y eNOS (B) en homogeneizados de ventrículo izquierdo de corazones procedentes de animales obesos y diabéticos tratados con AM250 1 mg/Kg y Win 1 mg/Kg sometidos a un proceso de I-R (ZDF AM251+Win), animales obesos y diabéticos tratados con AM630 1 mg/Kg y Win 1 mg/Kg sometidos a un proceso de I-R (ZDF AM630+Win) y animales obesos y diabéticos tratados con Win 1 mg/Kg sometidos a un proceso de I-R (ZDF Win), considerados como grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5-7 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados (\* $P < 0.05$  vs ZDF Win). U.A.: Unidades Arbitrarias.

Así, la modulación del receptor CB2 está implicado en la regulación del balance iNOS y eNOS provocado por Win en corazones en situaciones patológicas de SM sometidos a un proceso de I-R.

### **3.5 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE WIN SOBRE LOS NIVELES CARDIACOS DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) TRAS ISQUEMIA-REPERFUSIÓN**

La LDH es una enzima intracelular cuyos niveles son un indicativo de muerte celular. Como indicador de necrosis miocárdica, se midieron los niveles de LDH presentes en el eluyente de la perfusión de corazón.

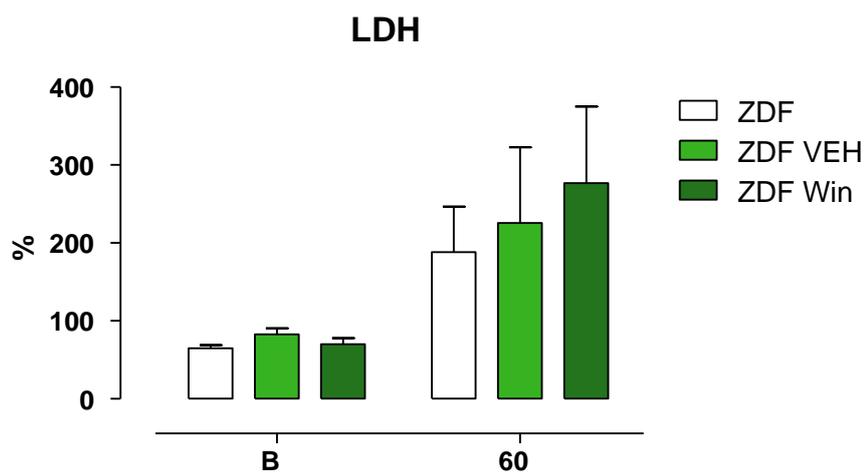
Cuando se evaluaron los niveles de LDH en el eluyente de corazones de los animales ZDF antes y después de la isquemia, en los minutos 5 y 60 de la reperfusión, se encontró un ligero aumento, aunque no significativo, de la cantidad de LDH tras el proceso de I-R (Figura 59).



**Figura 59.** Niveles de LDH en eluyente de corazón aislado y perfundido durante diferentes tiempos (minutos 5 y 60) del periodo de reperfusión tras isquemia (5R y 60R) y en el punto basal (tras 20 minutos de estabilización), considerado como punto control, de animales obesos y diabéticos no tratados (ZDF). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. del % de LDH de 4-5 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados.

La administración de Tocrisolve® en los animales no produjo cambios en los niveles de LDH detectados tras la I-R respecto a dichos niveles en ratas ZDF que no se habían tratado. Así, dichos niveles fueron similares en el minuto 60 de reperfusión en los corazones procedentes de ambos grupos de animales. Así, LDH: ZDF VEH:  $225,86 \pm 97,09$  % (n=4) vs ZDF:  $188,40 \pm 58,30$  % (n=4),  $P > 0.05$  (Figura 61).

La administración de Win1mg/kg tampoco provocó modificaciones en los niveles de LDH de los corazones de los animales ZDF (ZDF Win) cuando se compararon con los niveles obtenidos de eluyente procedentes de corazones de animales ZDF tratados con vehículo tras la isquemia. Así, LDH: ZDF Win:  $276,69 \pm 98,16$  % (n=6) vs ZDF VEH:  $225,86 \pm 97,09$  % (n=4),  $P > 0.05$  (Figura 60).



**Figura 60.** Niveles de LDH en eluyente de corazón aislado y perfundido en el minuto 60 del periodo de reperfusión tras la isquemia de animales obesos y diabéticos tratados con Win 1 mg/Kg (ZDF Win) y animales obesos y diabéticos tratados con el vehículo del cannabinoide (Tocrisolve®), considerado como grupo control (ZDF VEH). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. del % de LDH de 4 animales. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni para analizar los resultados. Los animales obesos y diabéticos no tratados (ZDF) aparecen representados a modo de referencia.

# DISCUSIÓN



En esta Tesis Doctoral se han evaluado signos de neuropatía autonómica cardiovascular inducida por la administración crónica de CPT y en situaciones de DM2. Además, se ha evaluado si en las alteraciones cardiovasculares observadas el sistema endocannabinoide se veía alterado, y si era así, el posible efecto de agonistas cannabinoides.

El modelo de neuropatía inducida por la administración de CPT 2 mg/Kg durante 5 semanas, no refleja alteraciones cardiovasculares significativas, ni tampoco modificaciones en la expresión cardíaca de receptores cannabinoides. Sin embargo, en el modelo de DM2 en rata, se han encontrado alteraciones cardiovasculares compatibles con una neuropatía autonómica cardiovascular y alteraciones en la expresión cardíaca de receptores cannabinoides. Más aún, la administración aguda del agonista cannabinoide Win fue capaz de prevenir parcialmente el daño por I-R cardíaco en esas situaciones. Esta protección frente al daño por isquemia-reperfusión no parece estar mediada por receptores cannabinoides CB1 o CB2, y en ella estaría involucrada una regulación del equilibrio iNOS-eNOS a nivel cardíaco.

### NEUROPATÍA POR ADMINISTRACIÓN DE CISPLATINO

El CPT es un fármaco ampliamente utilizado en la lucha contra el cáncer, sin embargo, desafortunadamente, el tratamiento con CPT conlleva múltiples efectos colaterales, entre ellos náuseas, vómitos, mielosupresión, reacciones de sensibilidad, nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad gastrointestinal, depresión de la médula ósea y cardiotoxicidad (El-Awady y cols., 2011).

La administración crónica de CPT en rata es un modelo ampliamente utilizado como modelo experimental de neuropatía periférica (sensorial, entérica o cardiovascular). Son muchos los autores en la bibliografía que describen la sintomatología que acompaña a la neuropatía periférica que se desarrolla en este modelo; neuropatía sensorial (alodinia, hiperalgesia), neuropatía entérica, que va acompañada de sintomatología gastrointestinal (anorexia, náusea, diarrea), o neuropatía cardiovascular, manifestada como disminución de la presión arterial y bradicardia (Authier y cols., 2003; Cabezos y cols., 2010; Vera y cols., 2011; El-Awady y cols., 2011; Vera y cols., 2013).

En esta Tesis Doctoral, la administración de CPT en rata a la dosis de 2 mg/Kg durante 5 semanas provocó en los animales una reducción en la ganancia de peso, teniendo, al final del tratamiento un peso menor al de los animales no tratados, y el desarrollo de anorexia. Este resultado está en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores, que describen igualmente una reducción en la ganancia de peso en los animales tratados con CPT (Authier y cols., 2003; Vera y cols., 2006a). Tal y como describe el grupo de Vera, esta reducción en la ganancia de peso va asociada a cambios en el comportamiento alimentario de los animales, ya que muchos

---

antineoplásicos, entre ellos el CPT, provocan anorexia, náuseas y vómitos (Vera y cols., 2006a).

De igual manera, la disminución del umbral de respuesta a la presión, indicativo del desarrollo de alodinia mecánica en estos animales, es compatible con los hallazgos descritos por diferentes autores en modelos de neuropatía por la administración de CPT en rata, tanto en nuestro laboratorio (Vera y cols., 2007; Vera y cols., 2011; Vera y cols., 2013) como por otros autores (Authier y cols., 2003; Hori y cols., 2010; Viana-Cardoso y cols., 2011).

La toxicidad cardiovascular es un efecto adverso conocido de la quimioterapia. Esta toxicidad puede manifestarse de diferentes maneras; desde elevación de la tensión arterial, alteraciones del ritmo cardiaco, hipotensión, disfunción ventricular, hasta una insuficiencia cardiaca irreversible (Nuver y cols., 2005; El-Awady y cols., 2011).

La toxicidad cardiaca más evaluada es la producida por las antraciclinas, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Hirano y cols., 1993; Platel y cols., 2000; Soga y cols., 2006; Shaker y cols., 2010; De Angelis y cols., 2010; Berdichevski y cols., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que la cardiotoxicidad no es exclusiva de este grupo, sino que puede aparecer con otros grupos de antitumorales como compuestos de platino, taxanos, ciclofosfamida, bevacizumab o casoipeinas (Platel y cols., 2000; Drimal y cols., 2006; Al-Majed y cols., 2006; Sudharsan y cols., 2006; Hernández-Esquivel y cols., 2006). Estudios que analizan el efecto de la administración de CPT en animales ponen de manifiesto que la administración de este antitumoral se asocia con cardiotoxicidad (Pai y cols., 2000). Las alteraciones cardiacas descritas incluyen disminución de la presión arterial, así como una disminución en la frecuencia cardiaca, debido a la cardiotoxicidad que el CPT produce en el nodo sino-auricular, lo que conduce a la

bradicardia (El-Sawalhi y cols., 2014). En cuanto a la funcionalidad cardiaca *in vitro*, está descrito que el tratamiento con CPT en rata provoca disfunción ventricular izquierda y depresión de la contractilidad de los cardiomiocitos. Estas alteraciones pueden estar relacionadas con alteraciones mitocondriales, estrés oxidativo y un aumento en la apoptosis de las células cardiacas (El-Sawalhi y cols., 2014; Ma y cols., 2010).

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, tras la administración crónica de CPT (2 mg/Kg), no muestran alteraciones significativas ni en la presión arterial y frecuencia cardiaca *in vivo* de los animales, ni en la funcionalidad cardiaca en corazón aislado y perfundido. Esta diferencia en los resultados puede deberse a las diferentes pautas de administración del antitumoral (número de administraciones, dosis por administración, dosis acumulativa etc.).

Los autores que evalúan la cardiotoxicidad del CPT en roedores administran este antitumoral a dosis acumulativas menores o iguales (5-10 mg) a la utilizadas en nuestro estudio (10 mg dosis acumulada) pero en administración única (El-Awady y cols., 2011; Ciftci y cols., 2011; Hussein y cols., 2012, El-Sawalhi y cols., 2014); Tal y como se apuntó en la Introducción de esta Tesis Doctoral, se sabe que las complicaciones cardiovasculares dependen, entre otros factores, del antitumoral, de la dosis administrada en cada ciclo y de la dosis acumulada total (Pai y cols., 2000). Por lo tanto, esta diferencia en los resultados, se podría deber a estas diferencias en la dosificación del antitumoral.

Dado que el grado en que aparecen estos signos es dosis dependiente, sería necesario ensayar dosis mayores de este antitumoral con el fin de comprobar si, aumentando la dosis pero siguiendo esta misma pauta de administración semanal aparecen signos de neuropatía autonómica cardiovascular.

---

Por otra parte, en el modelo de neuropatía periférica inducida por la administración crónica de CPT se ha descrito que, con esta misma pauta de administración, los animales muestran signos de neuropatía periférica a otros niveles como, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal (Authier y cols., 2003; Cabezos y cols., 2010; Vera y cols., 2011). Este hecho puede deberse a una diferencia en la susceptibilidad a la aparición de neuropatía en los diferentes sistemas; de hecho la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) describe que en pacientes tratados con compuestos derivados del platino aparecen alteraciones sensitivas hasta en un 85-95% de los pacientes, mientras que en el caso de otras alteraciones, como por ejemplo las alteraciones gastrointestinales aparecen en un 50% de los pacientes.

La mayoría de los estudios demuestran que en los pacientes con cáncer tratados, existe una morbilidad y mortalidad cardiovascular mayor que en la población general, especial y preocupantemente en pacientes con edades inferiores a los 45 años (Van den Belt-Dusebout y cols., 2006). Entre los problemas cardiacos asociados con la quimioterapia se han descrito infarto de miocardio y angina de pecho. Por ello se quiso evaluar si el tratamiento con CPT modificaba el curso en la recuperación de la funcionalidad cardiaca después de un periodo de I-R, haciendo al tejido cardiaco más sensible a este tipo de daño. En nuestro caso, los animales tratados con CPT 2 mg/Kg durante 5 semanas mostraron una recuperación de la funcionalidad cardiaca similar a la observada en los animales tratados con salino con la misma pauta de administración. Tal y como se ha apuntado anteriormente, la toxicidad cardiaca más evaluada es la producida por las antraciclinas. Diferentes estudios han demostrado que el tratamiento con estos antitumorales agrava el daño cardiaco en modelos de I-R (Bozcali y cols., 2012; Mokni y cols., 2012; Gharanei y cols., 2013). Sin embargo, la posibilidad de que el

## DISCUSIÓN

---

CPT aumente el daño cardíaco causado por un proceso de I-R es una hipótesis poco explorada, por lo que sería necesario ampliar los estudios en este aspecto, ensayando otras dosis y/o pautas de administración del antitumoral.

Por otra parte, los animales tratados con CPT2 mg/Kg i.p. durante 5 semanas presentaban un IMC significativamente menor que el que presentaron los animales control. El IMVI, sin embargo, fue similar en ambos grupos de animales. Este efecto de disminución del ratio peso del corazón/peso corporal ya ha sido descrito por otros autores. El grupo de Ma describió, en ratones tratados con CPT a la dosis de 10 mg/kg al día por vía i.v. durante 1 semana (70 mg de dosis acumulativa), valores significativamente menores tanto del peso absoluto del corazón, como del cociente entre el peso del corazón/peso corporal. En este mismo trabajo evaluaron los índices de masas de otros órganos, como hígado y riñón, encontrando diferencias únicamente en los valores de peso del corazón. Además, estos autores describen que la diferencia en la masa cardíaca se encontraba también ligada a disfunción en la contractilidad cardíaca. Estos hallazgos son posiblemente debidos a que el CPT provoca cambios celulares deletéreos como disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico y aumento de la apoptosis de los cardiomiocitos, lo que conlleva como resultado tanto una disminución tanto de la contractilidad, como de la masa cardíaca (Ma y cols., 2010; Xu y cols., 2014).

Las conexinas, son proteínas estructurales que se unen para formar enlaces *gap* en los vertebrados, y la Conexina 43 es un miembro de esta familia. Como ya se ha apuntado anteriormente en esta Tesis Doctoral, las uniones *gap* permiten el paso de pequeños iones y moléculas, conectando directamente el citoplasma de células adyacentes, y son de especial importancia en el corazón, ya que hacen posible la

---

despolarización coordinada del músculo cardiaco. Los resultados muestran que existe un aumento en la expresión de Conexina 43 en corazones de animales tratados con CPT.

La expresión de conexinas, y más particularmente de Conexina 43, ha sido estudiada fundamentalmente en diferentes tipos de líneas celulares. En cultivos celulares expuestos a diferentes tipos de daño (sobrecarga de calcio, estrés oxidativo o irradiación ultravioleta entre otros), se ha visto un aumento en la expresión de Conexina 43 en las células. Además, el aumento en la expresión de Conexina 43 parece estar ligado a un aumento de la resistencia celular frente a estos daños (Jane y cols., 2003; Azzamy cols., 2003). La expresión de esta proteína en tejido cardiaco de animales tratados con CPT no ha sido muy estudiada. El hecho de que en los corazones de los animales tratados con CPT aparezca un aumento de la expresión de Conexina 43 podría estar indicando la existencia de daño cardiaco en estos animales, y la sobreexpresión de dicha proteína se habría producido como mecanismo para contrarrestar ese daño. Sería necesario llevar a cabo más estudios en este sentido para poder alcanzar una conclusión al respecto. Es necesario además señalar que en nuestro estudio, a pesar de haber encontrado un aumento en la expresión de conexinas no se ha observado una modificación en la función cardiaca basal. Estos datos, junto con los descritos por Ma y cols. sugieren que ese daño tisular es previo a la sintomatología cardiaca y que se puede dar a dosis más bajas que las que además producen alteraciones funcionales. Este hecho es importante porque si fuese detectado previamente permitiría prevenir alteraciones funcionales posteriores.

En cuanto al interés del uso de cannabinoides para el tratamiento o prevención de neuropatía autonómica cardiovascular causada por el tratamiento CPT, se ha descrito la importancia de la modulación del sistema endocannabinoide en enfermedades cardiovasculares, mostrando este sistema como una posible diana terapéutica en este tipo de alteraciones (Cunha y cols.,2011). Existen datos que muestran que la modulación del sistema endocannabinoide resulta útil sobre la toxicidad vascular causada por CPT (Herradón y cols., 2008), por lo que podrían también ser fármacos de interés para el tratamiento de la cardiotoxicidad asociada a este antitumoral. Además, los cannabinoides ya han demostrado su posible papel modulador en el dolor neuropático en pacientes (Rukwied y cols., 2003). Si a esto sumamos que los cannabinoides han mostrado jugar un interesante papel en la terapéutica del cáncer, debido a su eficacia antiproliferativa, todo parece indicar que los cannabinoides podrían ser unos buenos candidatos para ser utilizados en el tratamiento de neuropatía cardiovascular asociada al tratamiento con CPT (Grimaldi y cols., 2011).

En ciertas patologías, entre las que se encuentran las neuropatías causadas por antitumorales, el sistema endocannabinoide se sobreexpresa o se hipersensibiliza. Se ha visto que el tratamiento con CPT puede modificar el tono cannabinoide en sistema nervioso central, causando un aumento de la expresión de la FAAH (hidrolasa de ácidos grasos amida, enzima que degrada los cannabinoides endógenos), aunque esta sobreexpresión no se da en todas las localizaciones del sistema nervioso central. En este mismo trabajo, en el que se analizó la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en Sistema Nervioso Central, no se encontraron alteraciones en la expresión de los mismos (Guindon y cols., 2013).

---

En esta Tesis Doctoral, hemos evaluado la expresión cardíaca de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en tejido cardíaco de animales tratados con CPT. En nuestro caso, el tratamiento con CPT no modificó la expresión de los receptores cannabinoides. Aunque, como se ha señalado anteriormente, se ha descrito una sobreexpresión del sistema endocannabinoide tras el tratamiento con CPT, la expresión miocárdica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 tras el tratamiento crónico con este fármaco no se ha descrito hasta este momento, al igual que se ha descrito en SNC (Guindon y cols., 2013). Más investigaciones serían necesarias para determinar si con dosis superiores o diferentes pautas de administración de CPT, podríamos encontrar alteraciones en este sentido.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que el modelo de neuropatía periférica inducida por la administración crónica de CPT en rata a la dosis de 2 mg/Kg durante 5 semanas, a pesar de manifestar signos de neuropatía periférica sensorial, no muestra signos de neuropatía autonómica a nivel cardiovascular. Esto puede ser debido a refractariedad en la aparición de daño cardíaco en comparación con neuropatía a otros niveles.

En este modelo animal existen alteraciones en la expresión cardíaca de conexinas, lo que parece indicar la presencia de daño cardíaco, aunque no el suficiente para provocar alteraciones funcionales.

Por otra parte, no se han encontrado alteraciones en la expresión cardíaca de receptores cannabinoides CB1/CB2.

Para conocer definitivamente si el sistema endocannabinoide es una diana terapéutica en las alteraciones cardiovasculares producidas por CPT sería necesario profundizar en estos aspectos.

---

## NEUROPATÍA POR DM2.

Las ratas ZDF (Zucker Diabetic Fatty) son un modelo de SM y DM no dependiente de insulina que empieza a desarrollar hiperglucemia y resistencia a la insulina aproximadamente a las 7 semanas de vida, alcanzando los niveles de glucosa en sangre unos valores máximos y mantenidos de 500 mg/dl alrededor de las 15-16 semanas de vida de los animales (Peterson y cols., 1990). En esta Tesis Doctoral, el seguimiento de los parámetros generales de los animales (peso, glucemia) se realizó desde la semana 7 de vida de los animales hasta las 18-20 semanas de vida de los animales. Sin embargo, los estudios funcionales se llevaron a cabo cuando las ratas alcanzaron las 18-20 semanas de vida, punto temporal en el que está descrito que los animales presentan neuropatía periférica sensorial (Vera y cols., 2012) además de otras complicaciones asociadas a esta patología como: obesidad, niveles elevados de glucosa en sangre, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, nefropatía y alteraciones de la cicatrización (Charles River, 2011).

En nuestro trabajo se pudo comprobar que el grupo de animales ZDF mostró, al principio del protocolo, un peso corporal superior al del grupo de animales LEAN. Sin embargo, esta diferencia de peso entre los grupos fue reduciéndose a lo largo de las semanas llegando, a las 13 semanas de vida, a tener pesos similares. Al llegar a la semana 19-20 de vida, los animales ZDF presentaron incluso un peso corporal menor al de los animales LEAN. Los resultados, en cuanto al peso corporal, concuerdan completamente con los datos de la casa comercial que suministra el modelo. Describen que los pesos de los animales ZDF son superiores a los de los animales LEAN ya desde la semana 6, alcanzando estos animales pesos por encima de los 380 g e, igualmente, hacia la semana 20 comienzan la pérdida de peso llegando a mostrar valores inferiores

## DISCUSIÓN

---

a los de las ratas LEAN (control) (Charles River, 2011). Otros autores han descrito una reducción en la ganancia de peso de estos animales entre las semanas 12 y 24 de vida, lo que refleja el severo estado de la diabetes en esta edad, lo que correspondería con un estado de DM2 no controlada (Wang y cols., 2004; Fredersdorf y cols., 2004). El grupo de Fredersdorf demostró que los animales ZDF tratados con insulina no muestran este comportamiento en el peso; por el contrario, los animales que reciben insulina, continúan su aumento de peso frente los animales no tratados que estabilizan su peso o incluso comienzan la pérdida del mismo (Fredersdorf y cols., 2004). En este sentido, los parámetros bioquímicos analizado, así como la capacidad de secreción de insulina observada en las ratas ZDF analizadas en esta Tesis Doctoral así lo muestran también (ver más adelante).

En cuanto a los parámetros bioquímicos, las ratas ZDF a las 19-20 semanas de edad, presentan niveles de glucosa en sangre 4-5 veces superiores a los encontrados en las ratas LEAN, y unos valores de colesterol total, HDL y triglicéridos en sangre superiores a los de los animales control. En estudios realizados por otros autores, se obtuvieron resultados similares en cuanto a peso corporal y parámetros bioquímicos en ratas ZDF y sus respectivos controles de edad (Peterson y cols., 1990; Wang y cols., 2004; Lesniewski y cols., 2008; Song y cols., 2008).

El grupo de Vora describe en este modelo de rata en la semana 12 de vida, valores de colesterol en plasma de 182 mg/dl y de 410 mg/dl de triglicéridos. Sin embargo, en la semana 36 los valores se dispararon a 423 mg/dl de colesterol y 969 mg/dl de triglicéridos. Los valores muestran, a la semana 19-20 de vida, valores de colesterol de 343 mg/dl y de 409 mg/dl de triglicéridos, resultados que se encuentran dentro del rango descrito por estos autores (Voray cols., 1996).

En cuanto a la glucemia, la casa que comercializa estos animales describe, que hacia la semana 20 de vida, estos animales alcanzan concentraciones de glucosa en sangre tras 4 horas de ayuno de aproximadamente 30 mM (lo que correspondería con 550 mg/dl). La diferencia con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, que se encuentran en torno a 300 mg/dl, puede deberse al periodo de ayuno al que los animales han sido sometidos.

Es importante incidir en el hecho de que la glucemia de estos animales alcanza niveles muy superiores al considerado "rango de normalidad". Este dato puede justificarse con el hecho de que los islotes pancreáticos de estos animales muestran una funcionalidad *in vitro* mucho menor a la mostrada por los islotes de los animales LEAN. De hecho, los islotes de los animales diabéticos no son capaces de responder al incremento en la concentración de glucosa en el medio.

La función de las células  $\beta$  pancreáticas es la de liberar insulina y juegan un papel muy importante en la homeostasis de nutrientes. Estas células son capaces de medir las concentraciones extracelulares de glucosa, provocando el proceso de secreción. Además, los ácidos grasos también son capaces de inducir la liberación de insulina, aunque la presencia de glucosa es necesaria para desencadenar este efecto. La elevación postprandial de la glucosa genera una respuesta secretora aguda en la célula  $\beta$ ; sin embargo, en condiciones patológicas tales como la diabetes, la glucosa y los ácidos grasos se mantienen en niveles elevados de forma crónica. En estas circunstancias, se convierten en sustancias tóxicas que pueden provocar la muerte de las células  $\beta$ , un concepto llamado "glucolipotoxicidad"; las células  $\beta$  no pueden activar una respuesta adaptativa y pierden su capacidad de detoxificación. Esta situación

## DISCUSIÓN

---

conduce al desarrollo de DM2 (Poitout y cols., 2008). Este proceso se divide en tres fases; adaptativa, detoxificativa y glucolipototoxicidad.

En la fase de adaptación, hay cambios funcionales que mantienen la secreción de insulina y, por lo tanto, los niveles de glucosa en sangre a pesar del exceso de nutrientes. En la fase detoxificativa, se activan procesos detoxificantes que activan la respuesta secretora de las células  $\beta$  siendo ésta cada vez mayor. Cuando se establece la glucolipototoxicidad, la respuesta compensatoria de las células  $\beta$  falla y la respuesta secretora es nula.

Los resultados se corresponden con la última fase de este proceso, en un estado avanzado de DM2, en la que los mecanismos de compensación han fallado y los islotes de estos animales no responden a las concentraciones de glucosa del medio, lo que lleva a una elevación exagerada de la glucemia plasmática.

Tal y como se ha apuntado anteriormente en esta Tesis Doctoral, existe la evidencia de que existe una estrecha relación entre los niveles altos de glucosa en sangre, el estrés oxidativo y las complicaciones diabéticas. La hiperglucemia provoca una producción elevada de especies reactivas de oxígeno. Estos, a su vez, llevan a cambios químicos en prácticamente todos los componentes celulares provocando modificaciones en las proteínas y en el ADN y llevando a la peroxidación lipídica. La medición del malonildialdehído (MDA), un producto de esta peroxidación lipídica, es una herramienta útil para evaluar el estrés oxidativo del organismo (Piconi y cols., 2003). Los valores elevados de MDA en plasma de los animales ZDF en la semana 19-20 de vida indican la existencia de un estrés oxidativo elevado en estos animales, hecho que es perfectamente explicable dados los niveles de glucemia y la dislipemia encontrados en estos animales.

La neuropatía diabética es una de las complicaciones más frecuentes asociadas a la DM y tiene un tremendo impacto en la calidad de vida del paciente. Los pacientes con neuropatía diabética sensorial experimentan una gran variedad de sensaciones incluyendo dolor espontáneo, hiperalgesia y alodinia. Con el fin de evaluar el desarrollo de neuropatía periférica sensorial en estos animales, se evaluaron los umbrales de respuesta a la presión mediante la técnica de los filamentos de Von Frey. Los animales diabéticos desarrollan alodinia, signo claro de que han desarrollado neuropatía periférica sensorial.

La disfunción autonómica es una de las manifestaciones características de la neuropatía diabética, y es la causante de las manifestaciones más molestas y discapacitantes de la neuropatía periférica diabética, tal vez con la excepción del dolor, y la responsable de una proporción significativa de la mortalidad y morbilidad asociadas a la enfermedad. Se producen síntomas muy diversos que afectan a las funciones urogenital, digestiva, pupilomotora, sudomotora y cardiovascular. En esta Tesis Doctoral se ha centrado en las alteraciones autonómicas cardiovasculares que se desarrollan debido a la DM2 en los animales ZDF. Las manifestaciones clínicas de la neuropatía autonómica cardiovascular suelen empezar con taquicardia en reposo o hipotensión postural, que puede ser un síntoma muy discapacitante de neuropatía autonómica (Said, 2007).

En esta Tesis Doctoral se evaluaron los valores de presión arterial directa y frecuencia cardíaca en animales ZDF anestesiados. Pudimos observar que los valores de presión arterial, tanto media, como sistólica y diastólica fueron menores en los animales diabéticos comparados con los animales control, además de presentar bradicardia. En estudios realizados por otros autores se obtuvieron resultados similares

## DISCUSIÓN

---

en cuanto a frecuencia cardiaca; en concreto, el grupo de Fredersdorf describe la existencia de bradicardia en animales ZDF anestesiados comparados con sus controles (LEAN), si bien sus experimentos describen esta bradicardia mediante su medida indirecta, utilizando la técnica de tail-cuff (Fredersdorf y cols., 2004). Sin embargo, existen trabajos que obtienen resultados dispares. El grupo de Lesniewski obtuvo valores de presión arterial en animales ZDF superiores a los de los animales LEAN, si bien estos autores evaluaron la presión arterial en animales conscientes (Lesniewski y cols., 2008). En el grupo de Song, sin embargo, no observaron diferencias en la presión arterial en los animales diabéticos de 20 semanas de vida; en este caso, la presión arterial se tomó de forma directa en animales anestesiados canulando la arteria iliaca (Song y cols., 2008). Las diferencias entre los resultados de nuestro estudio y los obtenidos por diferentes autores podría deberse a la diferencia en las técnicas utilizadas para la medida de la presión arterial y la frecuencia cardiaca en estos animales. Como se apuntó en la introducción de esta Tesis Doctoral, la DM2 suele ir asociada, en muchos casos, a hipertensión llegando a ser la prevalencia de hasta 2-3 veces más que en la población general (Waine, 2005). Sin embargo, en pacientes diabéticos con neuropatía autonómica cardiovascular, podemos encontrar otro tipo de sintomatología como es la taquicardia en reposo, fallo en la respuesta cardiovascular al ejercicio, hipotensión ortostática y complicaciones durante la anestesia (Dimitropoulos y cols., 2014).

La DM2 está asociada con cardiomiopatía caracterizada por disfunción tanto en la contractilidad, como en la relajación cardiaca y disfunción autonómica. La disfunción en la contractilidad es muy común en pacientes con DM1 y DM2. Se ha visto que la incidencia de insuficiencia cardiaca congestiva es de 2,5 a 5 veces superior en

pacientes diabéticos y es independiente de la edad, de la existencia de hipertensión o enfermedad coronaria (Song y cols., 2008).

En la presente Tesis Doctoral, en corazones aislados y perfundidos de ratas ZDF a las 20 semanas de edad (fase crónica de DM2), encontramos un aumento en la fuerza de contracción (PDVI) ventricular izquierda, mientras que la frecuencia cardiaca basal es menor que en los animales LEAN. Por otra parte, los valores de PDF y PPC fueron similares en ambos grupos de animales.

En modelos animales de DM1, se ha descrito la presencia de disfunción en la contractilidad cardiaca (El-Omar y cols., 2003). Sin embargo, la información sobre la función cardiaca en modelos animales de DM2 es bastante reducida, e incluso contradictoria. Nuestros resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por Fredersdorf, pero en clara oposición con los experimentos de Zhou.

El grupo de Fredersdorf, en animales ZDF de 19 semanas y mediante ecocardiograma, describen un aumento en la fracción de eyección y la fracción de acortamiento en los animales diabéticos en comparación con los no diabéticos (Fredersdorf y cols., 2004). La fracción de eyección y la fracción de acortamiento son índices de la función sistólica del ventrículo izquierdo. La fracción de eyección es el indicador más importante del funcionamiento cardiaco y mide la disminución del volumen del ventrículo izquierdo del corazón en sístole con respecto a la diástole, por lo que una fracción de eyección del 50% significa que el corazón, al contraerse, reduce el volumen de su ventrículo izquierdo a la mitad. La fracción de acortamiento es aquella que mide el acortamiento sistólico de las fibras circunferenciales del ventrículo izquierdo. Un aumento en ambos parámetros indica un aumento en la función contráctil del

corazón, resultados que se encuentran en consonancia con los obtenidos en esta Tesis Doctoral.

Curiosamente, estos resultados están en claro contraste con los experimentos de Zhou, que mostraron una reducción significativa de la función contráctil (fracción de acortamiento) determinada por ecocardiografía en ratas ZDF de 20 semanas de edad. Aunque la medición se realizó igualmente mediante ecocardiograma *in vivo*, la diferencia en los resultados puede deberse al anestésico utilizado en este estudio, ya que el pentobarbital sódico tiene efectos cardiodepresores (Zhou y cols., 2000).

Por otro lado, estudios *in vitro* de corazones aislados y perfundidos de ratas ZDF demuestran la existencia de cambios en la función contráctil basal de estos animales. El grupo de Wang describió la función cardíaca basal de corazones de animales ZDF a las 6, 12 y 24 semanas de vida; estos autores obtuvieron resultados similares a los obtenidos en esta Tesis Doctoral en cuanto a la frecuencia cardíaca, que fue significativamente menor en los animales ZDF. El flujo coronario, en estos corazones a las 12 semanas, fue menor en los animales ZDF, aunque esta diferencia desaparece a las 24 semanas. Sin embargo, contrariamente a los hallazgos obtenidos en esta Tesis Doctoral, no encontraron diferencias en la Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo en ninguna de las edades estudiadas (Wang y cols., 2004).

Un aumento en la función contráctil del ventrículo izquierdo es un indicador, en principio, de mejora en la función cardíaca. Sin embargo, la fracción de eyección supranormal puede estar asociada a un ventrículo hipertrófico, con una cavidad pequeña y poco distensible o, lo que es lo mismo, disfunción diastólica (Aeschlimann y cols., 2006). Los mecanismos por los que se da lugar a este aumento en la contractilidad cardíaca observada en este estudio en animales diabéticos puede ser

---

complejo, y los experimentos llevados a cabo en este estudio no son suficientes para describirlos. Una explicación para este fenómeno puede ser la reducción de la poscarga, ya que en los animales ZDF hemos observado una disminución en la presión arterial. Un aumento en la contractilidad cardíaca puede ser el mecanismo por el que se intente compensar esta hipotensión.

Además, se ha descrito que las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio se encuentran alteradas en las arterias coronarias de las ratas ZDF antes de que aparezca disfunción endotelial en otros territorios vasculares como la aorta o el lecho mesentérico, manifestándose desde las 16-20 semanas de edad de los animales (Oltman y cols., 2006). Sin embargo en este trabajo no hemos detectado esta disfunción, ya que la diferencia basal de la CPP observada en las ratas ZDF en relación con sus respectivos controles de edad, las ratas LEAN, aunque no resultó significativa, variaron en torno a 64 mmHg en los animales diabéticos y 76 mmHg en los animales LEAN.

La diabetes conduce a una mayor incidencia de isquemia miocárdica así como a una mayor mortalidad después de la isquemia. El aumento de la incidencia de la isquemia se podría atribuir a la enfermedad vascular que acompaña a la diabetes. Sin embargo, no existen evidencias científicas de que la cardiopatía diabética contribuya a un aumento en el daño tras la isquemia. Algunos autores, en ensayos clínicos, encuentran un aumento de la mortalidad tras la isquemia debido a cambios miocárdicos en pacientes diabéticos (Lehto y cols., 1994; Paulson, 1997). Sin embargo, los estudios experimentales con modelos animales de diabetes muestran resultados dispares, encontrando aumento, disminución o la inexistencia de cambios en cuanto a la sensibilidad del corazón diabético frente a la isquemia (Feuvray y cols., 1997; Wang y

cols., 2004). Estas diferencias en cuanto a la sensibilidad del corazón frente a la lesión por isquemia depende de las condiciones experimentales, estando determinado por la duración y severidad de la diabetes, el grado de la isquemia o el sustrato metabólico utilizado. En general, parece que los estudios que muestran una menor sensibilidad del corazón diabético frente a la isquemia son aquellos que utilizan un modelo de diabetes de corta duración, utilizan glucosa como único sustrato metabólico y/o ensayan modelos de isquemia global. Por otro lado, los estudios que utilizan modelos de diabetes de mayor duración, añaden ácidos grasos como sustrato metabólico en el líquido nutricio y/o utilizan un modelo de isquemia de bajo flujo, mostraron una mayor sensibilidad del corazón diabético frente a la isquemia (Paulson, 1997).

En esta Tesis Doctoral, tal y como era de esperar, cuando los corazones de los animales ZDF se sometieron a 45 minutos de isquemia global, seguidos de 60 minutos de reperfusión, observamos daño funcional a nivel cardiaco. Además, los resultados muestran que los daños causados por la I-R en los corazones de ratas ZDF son mayores que los observados en ratas no diabéticas. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos con otros autores en ratones diabéticos db/db, así como en ratas ZDF (Aasum y cols., 2003; Yue y cols., 2005; La Bonte y cols., 2008). Sin embargo, están en clara oposición con los resultados obtenidos por Wang en ratas ZDF de 24 semanas de edad, en las que se observó que, después de 30 minutos de isquemia de bajo flujo, la recuperación de la función cardiaca fue mayor en las ratas ZDF comparadas con su correspondiente control de edad (Wang y cols., 2004). Tal y como se ha apuntado anteriormente, esta variabilidad observada en los resultados pueden ser debida a múltiples factores como la severidad, duración y el tipo de isquemia

---

(bajo flujo vs. isquemia global), o la duración o gravedad de la enfermedad diabética (Feuvray, 1997; Paulson, 1997).

En esta Tesis Doctoral se quiso también comprobar si los índices de masas cardiacos eran diferentes entre las ratas ZDF y LEAN y si eso pudiese justificar los resultados obtenidos en la funcionalidad cardiaca. Hay que decir que, cuando se analizaron el IMC y el IMVI de los animales, no se encontraron diferencias significativas en el IMC ni en el índice de masas del ventrículo izquierdo IMVI después de la I-R entre los dos grupos de animales (ZDF / LEAN).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por el grupo de Fredersdorf. Estos autores miden, mediante ecocardiograma en animales ZDF de 19 semanas de edad, tanto el diámetro diastólico interno del ventrículo izquierdo como el espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo, no encontrando ninguna diferencia significativa entre los animales ZDF y los animales control LEAN, lo que indica la ausencia de dilatación cardiaca. De igual modo, tampoco encontraron diferencias en el peso absoluto del corazón de estos animales ni en la masa del ventrículo izquierdo entre los diferentes grupos (Fredersdorf y cols., 2004).

El grupo de Wang describe, a la semana 24 de vida de estos animales, que no existen diferencias en el ratio Peso de Corazón/Peso corporal (IMC) (Wang y cols., 2004). Sin embargo, estos mismos autores describen que, en semanas anteriores, esta relación de pesos (IMC) es menor en los animales ZDF que en sus controles de edad. Esta disminución transitoria del IMC en estos animales se corresponde con el aumento de peso corporal de estos animales, lo que hace que el ratio peso del corazón/peso corporal sea menor, seguida de la pérdida de peso que sufren posteriormente estos animales, lo que provoca que esta diferencia en el cociente peso del corazón/peso

corporal entre animales ZDF y sus controles LEAN desaparezca, lo que podría también explicar los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

El sistema endocannabinoide juega un importante papel en la regulación del metabolismo y la homeostasis energética. Se ha sugerido que en la obesidad y trastornos metabólicos asociados puede existir un aumento en la actividad del sistema endocannabinoide, pudiendo hacer que la terapia con cannabinoides resulte más eficaz para algunas complicaciones en los trastornos metabólicos que en condiciones no patológicas (Pacher y cols., 2006; Cable y cols., 2014).

Además, se ha demostrado el efecto beneficioso de los cannabinoides en neuropatías periféricas sensoriales en animales diabéticos (Vera y cols., 2012). Se ha descrito también que el sistema endocannabinoide está involucrado en procesos de protección cardiaca frente al daño por I-R en condiciones patológicas (Pacher y cols., 2008a).

Todo ello justifica el interés en el estudio de la posible utilidad terapéutica de los cannabinoides para el tratamiento de las alteraciones cardiovasculares que se desarrollan paralelamente a neuropatías y para prevenir el daño cardiaco por I-R en situaciones donde este posible daño está aumentado como en situaciones de DM2 (Li y cols., 2003; Hiley y cols., 2003; Hiley y cols., 2004; Batkai 2004). La presente Tesis Doctoral constituye el primer estudio que describe el efecto de la administración de agonistas cannabinoides en los parámetros cardiovasculares de animales con DM2.

Se evaluó la existencia de alguna modificación en el sistema endocannabinoide en los animales ZDF. Otros autores han evaluado la expresión del sistema endocannabinoide en situaciones de obesidad y SM, aumento en las concentraciones plasmáticas de anandamida y 2-AG, una actividad aumentada de las enzimas que

---

hidrolizan los endocannabinoides (FAAH y MAGL) o alteraciones de la expresión del receptor CB1 en tejido adiposo. Por ello se quiso conocer si existían alteraciones en el sistema endocannabinoide a nivel cardiaco. En este caso se evaluó la expresión cardiaca de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 mediante Western-Blot. Los resultados encontrados revelaron que en los animales obesos y diabéticos, esta expresión está disminuida respecto a los animales no diabéticos. Así, podría ser posible que el aumento del tono endocannabinoide en situaciones de DM2, diese lugar a una regulación a la baja de receptores CB1 y/o CB2 a nivel cardiaco con el fin de compensar los efectos cardiovasculares de estos mediadores endógenos.

En esta Tesis Doctoral se ensayó el efecto de la administración aguda de Win a la dosis de 1 mg/Kg por vía i.p. sobre la presión arterial y frecuencia cardiaca de las ratas ZDF. Tal y como se indicó en la introducción de esta Tesis Doctoral, la mayoría de los estudios muestran que los efectos más importantes observados tras la administración de cannabinoides en animales de experimentación son hipotensión y bradicardia (Siqueira y cols., 1979; Varga y cols., 1995; Randall y cols., 2002). En ratas ZDF, la administración aguda de Win produjo una disminución transitoria de la presión arterial y en la frecuencia cardiaca *in vivo* de los animales que fue máxima en el minuto 30 del protocolo experimental. Sin embargo, este efecto de Win desapareció por completo en el minuto 50 del protocolo. Estos resultados están en concordancia con el hecho de que en condiciones patológicas, cuando hay presencia de adiposidad abdominal, como es el caso del síndrome metabólico, los cannabinoides pueden perder su efecto hipotensor (Sarzani y col., 2008), lo que también podría ir en consonancia con la regulación a la baja de los receptores cannabinoides a nivel cardiovascular. Este podría ser el caso de los animales ZDF, ya que éstos son considerados un modelo

## DISCUSIÓN

---

experimental de síndrome metabólico y DM2 (Peterson y cols., 1990; Shafir y cols., 1992) por lo que esta posibilidad podría ocurrir en nuestras condiciones experimentales. Desafortunadamente, los datos tanto en humanos como en animales son escasos, por lo que serían necesarios más estudios sobre este aspecto.

Cuando se ensayaron los efectos de los antagonistas sobre la presión arterial, se observó que éstos provocaban una elevación de la presión arterial tanto media, como sistólica y diastólica, que si bien únicamente fue significativa en el caso del AM251. Este efecto hipertensor no se observa en animales control (LEAN) (datos no mostrados), lo que podría estar indicando la existencia de un tono endocannabinoide aumentado en los animales diabéticos respecto a los que no lo son. Se sabe que los niveles circulantes de cannabinoides endógenos, así como la actividad de las enzimas que degradan estos compuestos en algunos tejidos, se encuentran aumentados en obesidad y diabetes (Cable y cols., 2014). La mayoría de los estudios muestran que la administración de cannabinoides en animales de experimentación provoca hipotensión (Siqueira y cols., 1979; Varga y cols., 1995; Randall y cols., 2002), por lo que, el efecto observado en la presión arterial de estos animales tras la administración de los antagonistas cannabinoides, podría estar reflejando un bloqueo en los efectos hipotensores de los cannabinoides endógenos en estos animales.

Por otro lado, la administración de Win no modificó la función cardiaca basal en los animales ZDF. Estos resultados muestran que no hay cambios sustanciales a nivel del miocardio después de la administración aguda de estos fármacos, y concuerdan con los hallazgos obtenidos en otros autores, como Lépicier y cols., que describen la ausencia de efectos en los parámetros cardiacos basales después de la administración de agonistas selectivos de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en corazones

---

aislados y perfundidos de animales no diabéticos, aunque estos se administraron en la solución de perfusión (Lépicier y cols., 2003; Lépicier y cols., 2007). En nuestro caso, la administración de cannabinoides se ensayó en corazones de animales en condiciones patológicas, en las que, como se ha señalado anteriormente, la expresión del sistema endocannabinoide está disminuida. Aun así, los agonistas cannabinoides no ejercieron ningún efecto sobre la función cardíaca basal de los animales obesos y diabéticos. La administración de los antagonistas cannabinoides tampoco provocó cambios en la función cardíaca basal de estos animales. Sin embargo, cuando se administra el antagonista de los receptores CB2 junto con el agonista Win, encontramos una disminución en la contractilidad del ventrículo izquierdo. Este dato es sorprendente dado que ninguno de los cannabinoides por separado ha ejercido ningún efecto. Podría ser posible que ambos compuestos actuaran sobre otra diana molecular simultáneamente para ejercer este efecto. De hecho, se sabe que tanto Win como AM630 pueden actuar sobre otras dianas diferentes de los receptores CB1/CB2, entre las que se encuentran canales de potasio, canales de sodio, receptores para serotonina (5-HT<sub>3</sub>), Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPAR) o los receptores TRPA (Pertwee, 2010). Serían necesarios más experimentos para evaluar esta posibilidad.

Sin embargo, y a pesar de los resultados obtenidos hasta ahora, que parecían indicar el poco efecto que la administración de Win tenía sobre los parámetros cardiovasculares analizados, se quiso seguir investigando si el sistema endocannabinoide podría ser una diana terapéutica en casos de isquemia cardíaca en situaciones de SM-DM2. De hecho, existe un marcado interés en los cannabinoides y sus propiedades protectoras frente al daño por I-R (Joyeux, 2002; Shmist y cols., 2006). La mayor parte de estudios sobre cannabinoides relacionados con la protección

cardiaca frente al daño por I-R muestran una reducción clara del tamaño del infarto en corazones de animales no diabéticos sometidos a isquemia, aunque no todos evalúan el efecto de los cannabinoides en la recuperación de la funcionalidad cardiaca (Underdown y cols., 2005; Hajrasouliha, 2008). Lépicier y cols., en dos trabajos distintos (Lépicier y cols., 2003; Lépicier y cols., 2007) observaron que la administración de dos endocannabinoides diferentes (palmitoiletanolamida y 2-araquidonilglicerol) o dos agonistas sintéticos (ACEA y JW015) causaban una mejora en la recuperación de la funcionalidad cardiaca tras la isquemia en corazones de animales sin patologías. Estos autores sugirieron que este efecto se debía principalmente a la mejora de la PPC y/o la contractilidad ventricular. Sin embargo, no existen muchas investigaciones que evalúen si este efecto cardioprotector de los cannabinoides frente a la isquemia se da también en animales con alteraciones metabólicas como es la DM2.

Hasta la fecha, este es el primer trabajo que muestra un efecto cardioprotector de los cannabinoides en el corazón tras I-R en animales diabéticos. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que la administración aguda del agonista mixto Win, mejora significativamente la función cardiaca después del daño por I-R en animales diabéticos. Aunque no hubo recuperación de la función ventricular, la presión de perfusión en las coronarias se mantuvo (PPC) y la frecuencia cardiaca (Fc) se recuperó por completo con el tratamiento con Win en ratas ZDF, llegando a mostrar estos parámetros, al final del periodo de reperfusión, valores similares a los que encontramos en la función basal. Este efecto protector de Win sobre la recuperación de la función cardiaca tras la I-R en las ratas ZDF fue completamente bloqueado por la administración del antagonista cannabinoide selectivo de los receptores CB2, AM630 y

---

parcialmente bloqueado por la administración del antagonista cannabinoide selectivo de los receptores CB1, AM251 (únicamente bloqueó el efecto de Win sobre la PPC).

Es importante resaltar que en esta Tesis Doctoral, los cannabinoides fueron administrados *in vivo*, y los experimentos de cardioprotección frente a I-R se llevaron a cabo en preparaciones de corazón aislado y perfundido. Sin embargo, otros autores han utilizado este mismo protocolo de trabajo y han demostrado esta cardioprotección conferida por los cannabinoides (Hydock y cols., 2009). Por lo tanto, podríamos concluir que nuestro protocolo experimental es válido para confirmar la cardioprotección de Win tras la isquemia en ratas ZDF.

Los resultados obtenidos están, en parte, en concordancia con otros estudios que evalúan el efecto cardioprotector de los cannabinoides en la lesión por I-R y que describen este efecto protector del miocardio como resultado de la activación de los receptores CB2 localizados en el mismo (Lépicier y cols., 2003; Lépicier y cols., 2007). Otros investigadores, utilizando modelos animales de I-R, también han demostrado que la cardioprotección de los cannabinoides frente al daño por isquemia está mediada por la activación de los receptores CB2, pero no de los receptores cannabinoides CB1 (Krylatov y cols., 2001; Krylatov y cols., 2002; Ugdyzhekova y cols., 2002; Di Filippo, 2004). En otros tipos de I-R, como la cerebral, se ha demostrado que la activación del receptor cannabinoide CB2 contribuye a proteger el cerebro durante la I-R a través de la modulación de la respuesta inflamatoria (Zhang y cols., 2009). Además, Sheng demostró que el cannabinoide sintético Win inhibía la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo el NO producido por la iNOS a través de la activación de los receptores CB1 y CB2, pero siendo una inhibición más potente cuando se estimulan los receptores CB2 (Sheng, 2005).

En el corazón, la distinta localización de los receptores CB1 y CB2 podría explicar la diferente contribución de estos receptores en los efectos protectores de los cannabinoides. En el corazón se expresan tanto receptores CB1 como receptores CB2; sin embargo, los receptores CB1 se localizan principalmente en las células endoteliales de las arterias, mientras que los receptores CB2 se localizan principalmente en los cardiomiocitos. Se ha visto que el efecto de relajación vascular de los endocannabinoides en las ratas está mediada, al menos en parte, por los receptores CB1, lo que podría explicar que, en este trabajo, la disminución de la PPC (lo que indica vasorrelajación de las arterias coronarias) tras el proceso de I-R provocada por la administración de Win sea bloqueada por el antagonista del receptor CB1 (Kuno y cols., 2000). Sin embargo, la protección contra la hipoxia en cardiomiocitos está mediada por el receptor CB2, lo que puede explicar que la administración del antagonista de los receptores CB2 bloqueara el efecto de Win sobre la recuperación cardíaca tras I-R (Lépicier y cols., 2007).

También en el trabajo de Lépicier, se asocia el papel protector frente a la hipoxia en cardiomiocitos mediada por el receptor CB2 con una modificación en la producción de NO (Lépicier y cols., 2007). Por ello, aunque en esta Tesis Doctoral no se han evaluado los niveles de NO en el plasma de estos animales, sí se evaluó la expresión de iNOS y eNOS en los corazones de los animales ZDF y su posible implicación en el efecto protector de Win frente al daño por I-R cardíaco.

El óxido nítrico (NO) derivado del endotelio es generado fisiológicamente dentro de los cardiomiocitos por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y está involucrado en la relajación miocárdica, en el tono diastólico y en el consumo de oxígeno desde preparaciones de cardiomiocitos aislados, corazones aislados o modelos *in vivo* (Xie y

---

cols., 1996, Shah, 2000). Sin embargo, en ciertas patologías, como es la diabetes, la forma inducible de la óxido nítrico Sintasa (iNOS) aumenta su expresión y se sugiere que esto contribuye a la disfunción miocárdica (Zhou y cols., 2000; El-Omar y cols., 2003). Este aumento de la expresión de iNOS, provoca la sobreproducción de NO. El NO reacciona con el anión superóxido, dando como resultado la formación de peroxinitrito lo que causa la apoptosis de las células cardíacas (Song y cols., 2008).

El papel del NO en la isquemia y la reperfusión sigue siendo controvertido y aún no ha sido bien definido (Imagawa y cols., 1999; Kanno y cols., 2000). En varios trabajos se ha demostrado que se comporta como un agente protector en la lesión por reperfusión (Lefer y cols., 1993; Das y cols., 1998; Xi y cols., 1999). Sin embargo, en la diabetes el panorama es diferente: el papel beneficioso del NO en la reducción de la lesión por reperfusión post-isquémica en corazones de animales diabéticos desaparece (Zingarelli, 2002). Esto se justifica por el hecho de que en los corazones de animales diabéticos existe un incremento en la expresión de iNOS y una disminución de la expresión de eNOS, que conllevaría una sobreproducción de NO por parte de la iNOS (Smith, 1997; Stockklauster-Farber, 2000; Hink, 2001; Anozato, 2002; Song y cols., 2008; Lesniewski y cols., 2008). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral están en concordancia con los descritos por otros autores e indican que la expresión de la iNOS se encuentra incrementada y la de la eNOS se encuentra disminuida en corazones de ratas ZDF sometidos a I-R. El incremento de la expresión de iNOS, que da como resultado un aumento en la producción de NO, y que podría amplificar el proceso inflamatorio provocado por la diabetes puede estar relacionado con el daño por I-R cardíaca (Arstall, 1999). Es bien conocido que la generación de Especies Reactivas de Oxígeno está particularmente elevada en la reoxigenación. Estas especies reactivas

## DISCUSIÓN

---

de oxígeno reaccionan con el NO, dando como resultado la formación de peroxinitrito, el cual contribuye a aumentar el daño cardiaco en animales diabéticos tras un proceso de I-R (Ceriello y cols., 2002; El-Omar y cols., 2003; Marfella y cols., 2004).

Se ha descrito que los cannabinoides son neuroprotectores en modelos experimentales de isquemia cerebral modulando, entre otras cosas, la producción de óxido nítrico por parte de la iNOS (Leker, 1999; Fernández-López, 2006; Durmaz, 2008). Por este motivo, se quiso conocer si en el efecto protector del agonista cannabinoide Win, sobre el daño por I-R estaba involucrada la expresión cardiaca de iNOS y eNOS. En la presente Tesis Doctoral se puede observar que, tras la isquemia, en los corazones de los animales tratados con Win, existía una disminución en la expresión de iNOS y un incremento en la expresión de eNOS en estos corazones respecto a los corazones de los animales tratados con vehículo. Es más, los niveles de expresión cardiaca de ambas enzimas fueron similares a los observados en corazones no sometidos a un proceso de I-R. Por lo tanto, el efecto protector de Win frente al daño por isquemia parece ser dual: por un lado la disminución del NO producido por la iNOS, y por otro lado la restauración de la expresión fisiológica de eNOS en el tejido miocárdico. Esta Tesis constituye el primer trabajo que evalúa la prevención de los cambios en la expresión de las isoenzimas NOS inducidos por el daño por I-R en corazones de animales diabéticos tras la administración de un agonista cannabinoide. Los efectos sobre la iNOS han sido descritos por otros autores en células del SNC (Sheng, 2005; Fernández-López, 2006), pero esta es la primera vez que se describe el efecto de Win en la expresión miocárdica de iNOs y de eNOS tras la isquemia, y en situaciones de DM2.

En relación con la implicación de los receptores cannabinoides sobre esta modificación de la expresión miocárdica de iNOS y eNOS tras la isquemia inducida por

---

Win en los corazones diabéticos, no se encuentra una implicación clara de los receptores en esta modulación enzimática inducida por Win. De forma interesante, los antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 (AM251) y CB2 (AM630), por sí mismos, produjeron una disminución en la expresión de iNOS, pero no modificaron la expresión miocárdica de la eNOS tras el proceso de I-R. Cuando se administran los antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 (AM251) y CB2 (AM630) con el fin de bloquear el efecto de Win sobre la expresión miocárdica de iNOS y eNOS, se observa que AM251 no alteró la modificación de la expresión de la iNOS ni de la eNOS provocada por Win. Sin embargo, AM630 potenció el efecto del Win sobre la expresión de la iNOS reduciendo aún más los niveles de esta enzima, no produciendo ninguna modificación en la expresión miocárdica de la eNOS. De nuevo, la implicación de otra diana molecular podría ser posible (Pertwee, 2010).

En otros tejidos y bajo diferentes condiciones, se ha demostrado que la activación del receptor CB2 protege del daño por I-R modulando la respuesta inflamatoria. Sheng demostró que Win inhibía la producción de mediadores inflamatorios en astrocitos incluyendo el NO producido por la iNOS a través de la activación de los receptores CB1 y CB2, pero siendo una inhibición más potente cuando se estimulan los receptores CB2 (Sheng, 2005), mientras que el grupo de Zheng, en I-R cerebral, ha demostrado que la activación del receptor cannabinoide CB2 contribuye a proteger el cerebro durante la I-R a través de la modulación de la respuesta inflamatoria (Zhang y cols., 2009).

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que los receptores CB1 o CB2 no están involucrados en los cambios provocados por Win en la

## DISCUSIÓN

---

expresión de NOS, de manera similar a los resultados obtenidos en función cardiaca basal. Por lo tanto, este efecto debe estar mediado por otros receptores o mecanismos.

En un estudio reciente, el grupo de Ribeiro obtuvo resultados similares en cultivos de células gliales; tanto Win como otros agonistas selectivos de los receptores CB1 y CB2 redujeron la inducción de iNOS y la generación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, los antagonistas de los receptores CB1 y CB2 por sí mismos también redujeron la inducción de iNOS y la generación de especies reactivas de oxígeno. Es más, parece que la vía de señalización por la que se dan estos efectos es la misma tanto para los agonistas como para los antagonistas (reducción de la fosforilación de ERK1/2 (kinasa regulada por señal extracelular y de cPLA2 (fosfolipasa A2 citosólica)). Es importante señalar que estas vías no están descritas como vías de señalización acopladas a los receptores CB1 y CB2, lo que vuelve a sugerir que Win y antagonistas cannabinoides puedan causar este efecto mediante un mecanismo independiente de los receptores CB1 y CB2 (Ribeiro y cols., 2013). En un trabajo publicado en 2010 por el grupo de Kozela, se muestra que el THC y el cannabidiol pueden disminuir la producción y la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\beta$ ) en microglía activada a través de mecanismos independientes de receptores CB1 y CB2 (Kozela y cols., 2010). De hecho, tanto agonistas como antagonistas de los receptores cannabinoides pueden activar múltiples receptores y canales, como receptores GPR55, TRPV,  $\beta$ -adrenérgicos, colinérgicos, opioides, receptores de glutamato, canales de calcio, potasio o sodio entre otros (Pertwee, 2010).

Puesto que la recuperación funcional cardiaca y los cambios en la expresión de iNOS y eNOS tras la I-R inducidos por Win parecen no estar mediados por los mismos mecanismos, sería interesante buscar alguna relación entre la modulación de la

---

expresión miocárdica de NOS y la recuperación funcional cardiaca de los corazones diabéticos sometidos a isquemia. Algunos estudios en corazones no diabéticos muestran que una modulación selectiva de la expresión miocárdica de iNOS (reduciéndola) y/o de la expresión de eNOS (preservándola) reduce el daño cardiaco tras la isquemia (Wildhirt y cols., 1997; Han y cols., 2003). De hecho, los inhibidores selectivos de iNOS, redujeron el daño cardiaco provocado por I-R preservando el flujo coronario, reduciendo los niveles de creatinquinasa y lactato deshidrogenasa (LDH) en eluyente, y/o disminuyendo la relajación ventricular (PDF). En el presente estudio, la recuperación de la funcionalidad cardiaca inducida por Win tras la I-R en corazones diabéticos, claramente afecta a la PPC preservándola, y a la frecuencia cardiaca, pero no se mejoró la funcionalidad ventricular izquierda.

Aunque sería necesaria una mayor investigación en este sentido, por ejemplo, administrando inhibidores selectivos de NOS. Los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que la modulación de la expresión cardiaca de NOS inducida por Win, podría contribuir a la recuperación funcional cardiaca tras I-R en corazones de animales diabéticos.

Por otro lado, en esta Tesis Doctoral, se evaluaron los niveles de LDH en el eluyente de los corazones de los animales ZDF como indicador de muerte celular en estos corazones. En este sentido, se encuentra un ligero aumento, aunque no significativo, de la cantidad de LDH tras el proceso de I-R. La administración de Win en estos animales no provocó cambios de los niveles de LDH en el eluyente de estos corazones. Aunque sería de esperar un aumento de LDH como consecuencia de daño celular tras la isquemia, en este caso el aumento no resulta significativo, tal vez como consecuencia del alto error obtenido en el ensayo, sobre todo en los valores tras la

isquemia. Por ello, tampoco resulta sorprendente que Win no modifique la cantidad de esta enzima encontrada en el eluyente. Por ello, serían necesarios un mayor número de ensayos con el fin de reducir el error en los resultados.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que el modelo de neuropatía periférica inducida por hiperglucemia en ratas ZDF, manifiesta signos de neuropatía periférica sensorial, además de signos de neuropatía autonómica a nivel cardiovascular.

En este modelo animal existen alteraciones en la expresión cardíaca de receptores cannabinoides CB1/CB2.

La administración aguda de Win en estos animales provoca un efecto hipotensor y bradizardizante que resulta transitorio, no modificando la función cardíaca basal. Sin embargo, la administración aguda de Win fue capaz de proteger parcialmente al corazón de los animales obesos y diabéticos frente al daño por I-R, siendo esta protección mediada por ambos receptores cannabinoides CB1 y CB2.

Además, la administración aguda de Win fue capaz de modular el equilibrio en las isoenzimas iNOS/eNOS, estando implicada esta modulación en el efecto protector del Win frente a la isquemia.

En la modulación del equilibrio iNOS/eNOS no parecen estar implicados los receptores cannabinoides CB1 o CB2. Sin embargo, para conocer definitivamente este efecto sería necesaria una mayor investigación en este aspecto. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral servirían de base para futuras investigaciones en este campo.

# CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se puede concluir que:

- **Neuropatía por administración de cisplatino:**

1. La administración de cisplatino 2 mg/Kg durante 5 semanas en rata no produce alteraciones funcionales en presión arterial, función cardíaca basal o función cardíaca tras un proceso de Isquemia-Reperusión.
2. La administración de cisplatino 2 mg/Kg durante 5 semanas provoca alteraciones en la expresión cardíaca de conexina, lo que indica la presencia de daño cardíaco subyacente, pero que no es suficiente para provocar alteraciones funcionales.
3. La administración de cisplatino 2 mg/Kg durante 5 semanas no produce alteraciones en la expresión cardíaca de receptores cannabinoides CB1 y CB2.

- **Neuropatía por Diabetes Mellitus de Tipo2:**

4. En un modelo animal de DM2, se presenta neuropatía periférica sensorial conjuntamente con neuropatía autonómica a nivel cardiovascular.
5. En un modelo animal de DM2, existe alteración de la expresión cardiaca de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.
6. En un modelo animal de DM2, la administración aguda de un agonista cannabinoide CB1/CB2 provoca un efecto hipotensor y bradicardizante transitorio, pero no modifica la función cardiaca basal.
7. En un modelo experimental de DM2, la administración aguda de un agonista cannabinoide CB1/CB2 es capaz de proteger parcialmente al corazón frente al daño por Isquemia-Reperfusión. Esta protección está mediada por la modulación del equilibrio iNOS/eNOS cardiaco y no por receptores cannabinoides CB1 y/o CB2.

# **BIBLIOGRAFÍA**



# A

---

Aasum E, Hafstad AD, Severson DL, Larsen TS. Age-dependent changes in metabolism, contractile function and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice. *Diabetes* 2003; 52: 434-441.

Abalo R, Cabezos P, López-Miranda V, Vera G, González C, Castillo M, Fernández-Pujol R, Martín MI. Selective lack of tolerance to delayed gastric emptying after daily administration of WIN 55,212-2 in the rat. *Neurogastroenterology & Motility* 2009; 21(9): 1002-e80.

Aeschlimann N, Urzúa J, Lema G, Canessa R, Carvajal C, Irrarrázaval MJ, Balkenhol M. Comparación de respuesta hemodinámica a variaciones de carga de pacientes con fracciones de eyección disminuidas o aumentadas. *Revista Chilena de Anestesia* 2006; 35: 145-150.

Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, de Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102(1): 14-25.

Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacological Research* 2006; 53(3): 278-286.

Álvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007; 321(1): 381-388.

Anozato ML. Oxidative Stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACE and ARB. *Kidney International* 2002; 61(1): 186-194.

Aring AM, Jones DE, Falko JM. Evaluation and prevention of diabetic neuropathy. *American Family Physician* 2005; 71(11): 2123-8.

---

Arstall MA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circulation Research* 1999; 85(9): 829-840

Authier N, Gillet J, Fialip J, Eschalier A, Coudore F. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Experimental Neurology* 2003; 182(1): 12-20.

Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Expression of CONNEXIN43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Research* 2003; 63(21): 7128-7135.

## B

---

Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006; 27(1): 1-4.

Bátkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Csiszar A, Bátkai S. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* 2004; 110: 1996-2002.

Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 2005; 106(2): 133-145.

Bełtowski J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *Journal of Hypertension* 2006; 24(5): 789-801.

Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; 277(5329): 1094-1097.

Berdichevski A, Meiry G, Milman F, Reiter I, Sedan O, Eliyahu S, Duffy HS, Youdim MB, Binah O. TVP1022 protects neonatal rat ventricular myocytes against doxorubicin-induced functional derangements. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2010; 332(2): 413-420.

Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos J, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 256(2): 377-380.

Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2005; 81(2): 224-238.

Bonz A, Laser M, Kullmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, Ertl G, Wagner JA. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2003; 41(4): 657-664.

Borzan J, Lagraize SC, Fuchs PN. Effect of chronic vincristine treatment on mechanical withdrawal response and pre-pulse inhibition in the rat. *Neuroscience letters* 2004; 364(2): 110-113.

Bouaboula M, Dussosoy D, Casellas P. Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(29): 20397-20405.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemical Journal* 1995; 312: 637-641.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Fur G, Casellas P. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. *European Journal of Biochemistry* 1996; 237(3): 704-711.

Bouchard J, Lépicier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sciences* 2003; 72(16): 1859-1870.

Bozcali E, Dedeoglu DB, Karpuz V, Suzer O, Karpuz H. Cardioprotective effects of zofenopril, enalapril and valsartan against ischaemia/reperfusion injury as well as doxorubicin cardiotoxicity. *Acta Cardiologica* 2012; 67(1): 87-96.

---

Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, Cicogna AC. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supraaortic stenosis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2007; 88(2): 225-233.

Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Molecular Pharmacology* 2001; 60(1): 155-163.

Burgos E, Gómez-Nicola D, Pascual D, Martín MI, Nieto-Sampedro M, Goicoechea C. Cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents the development of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. Possible involvement of spinal glial cells. *European Journal of Pharmacology* 2012; 682(1): 62-72.

## C

---

Cabezos P, Vera G, Martín-Fontelles M, Fernández-Pujol R, Abalo R. Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica. *Neurogastroenterology & Motility* 2010; 22(7): 797-e225.

Cabezos PA, Vera G, Castillo M, Fernández-Pujol R, Martín MI, Abalo R. Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica. *Autonomic Neuroscience* 2008; 141(1-2): 54-65.

Cable JC, Tan GD, Alexander SP, O'Sullivan SE. The effects of obesity, diabetes and metabolic syndrome on the hydrolytic enzymes of the endocannabinoid system in animal and human adipocytes. *Lipids Health Disease* 2014; 13: 43.

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998; 394(6690): 277-281.

Carlisle S, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral G. Differential expression of the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *International Immunopharmacology* 2002; 2(1): 69-82.

Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, Berrino L, Rossi F, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 2002; 51(4): 1076-1082.

Chanan-Khan A, Srinivasan S, Czuczman MS. Prevention and management of cardiotoxicity from antineoplastic therapy. *The Journal of Supportive Oncology* 2004; 2(3): 251-256.

Charles River. *Animal Model of Disease. Metabolic, Renal and cardiovascular*. [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rm\\_rm\\_d\\_animal\\_models\\_of\\_disease.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rm_rm_d_animal_models_of_disease.aspx) 2011 [Consulta: sábado 11 de octubre de 2014].

Charles River. *RenaSci: ZDF Rat Model of Type 2 Diabetes*. [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/zdf/rm\\_rm\\_r\\_zdf\\_rat\\_renasci\\_zdf\\_model\\_type2\\_diabetes.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/zdf/rm_rm_r_zdf_rat_renasci_zdf_model_type2_diabetes.aspx) 2011 [Consulta: sábado 11 de octubre de 2014].

Ciftci O, Ozdemir I, Vardi N, Gurbuz N. Novel platinum-N-heterocyclic carbene complex is more cardiotoxic than cis-platin in rats. *Human & Experimental Toxicology* 2011; 30(9): 1342-1349.

Coskun R, Turan MI, Turan IS, Gulapoglu M. The protective effect of thiamine pyrophosphate, but not thiamine, against cardiotoxicity induced with cisplatin in rats. *Drug and Chemical Toxicology* 2014; 37(3): 290-294.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996; 384(6604): 83-87.

Cunha P, Romão AM, Mascarenhas-Melo F, Teixeira HM, Reis F. Endocannabinoid system in cardiovascular disorders – new pharmacotherapeutic opportunities. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2011; 3: 350-360.

## D

---

Dannert M, Alsasua A, Herradon E, Martín M, López-Miranda V. Vasorelaxant effect of Win 55,212-2 in rat aorta: new mechanisms involved. *Vascular Pharmacology* 2007; 46(1): 16-23.

---

Das DK, Kalfin R, Maulik N, Engelman RM. Coordinated role of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide in cardioprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 865: 297-308.

De Angelis A, Piegari E, Cappetta D, Marino L, Filippelli A, Berrino L, Ferreira-Martins J, Zheng H, Hosoda T, Rota M, Urbanek K, Kajstura J, Leri A, Rossi F, Anversa P. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation* 2010; 121(2): 276-292.

De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004; 110(16): 2494-2497.

De Filippis. Local administration of WIN 55,212-2 reduces chronic granuloma-associated angiogenesis in rat by inhibiting NF-kappaB activation. *Journal of Molecular Medicine* 2007; 85(6): 635-645.

De Wit R, van den Berg H, Burghouts J, Nortier J, Slee P, Rodenburg C, Keizer J, Fonteyn M, Verweij J, Wils J., Initial high anti-emetic efficacy of granisetron with dexamethasone is not maintained over repeated cycles. *British Journal of Cancer* 1998; 77 (9): 1487-1491.

Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sciences* 2006; 78(6): 549-563.

Deutsch DG, Omeir R, Arreaza G, Salehani D, Prestwich GD, Huang Z, Howlett A. Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochemical Pharmacology* 1997; 53(3): 255-260.

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology* 1988; 34(5): 605-613.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson, D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258(5090): 1946-1949.

Dewey WL. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1986; 38(2): 151-178.

Di Filippo C. Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75(3): 453-459.

Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Journal of Neurochemistry* 2000; 75(6): 2434-2444.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994; 372(6507): 686-691.

Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences* 1998; 21(12): 521-528.

Diaz-Laviada I. Sistema cannabinoide endógeno: aspectos bioquímicos e implicación fisiológica. En: Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides. Editor: Sociedad Española de Investigación sobre cannabinoides (SEIC) 2009; 9-27.

Dimitropoulos G, Tahrani AA, Stevens MJ. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes* 2014; 5(1): 17-39.

Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity systematic review of the literature and recommendations for use. *American Journal of Clinical Pathology* 2008; 130(5): 688-695.

Drimal J, Zurova-Nedelceva J, Knezl V, Sotnikova R, Navarova J. Cardiovascular toxicity of the first line cancer chemotherapeutic agents: doxorubicin, cyclophosphamide, streptozotocin and bevacizumab. *Neuroendocrinology letters* 2006; 27 (2): 176-179.

---

Durmaz R. The protective effect of dexanabinol (HU-211) on nitric oxide and cysteine proteasemediated neuronal death in focal cerebral ischemia. *Neurochemical Research* 2008; 33(9): 1683-1691.

## E

---

El-Awady EE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *European Journal of Pharmacology* 2011; 650(1): 335-341.

El-Omar MM, Lord R, Draper NJ, Shah AM. Role of nitric oxide in posthypoxic contractile dysfunction of diabetic cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure* 2003; 5(3): 229-239.

El-Sawalhi MM, Ahmed LA. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions* 2014; 207: 58-66.

Espert R. *Neuropatía diabética (v.o inglés)*. [http://www.dailymotion.com/video/xbryg3\\_neuropatia-diabetica-v-o-ingles\\_school](http://www.dailymotion.com/video/xbryg3_neuropatia-diabetica-v-o-ingles_school) 2010 [Consulta: sábado, 11 octubre de 2014].

## F

---

Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92(8): 3376-3380.

Faubert Kaplan BL, Kaminski NE. Cannabinoids inhibit the activation of ERK MAPK in PMA/Io-stimulated mouse splenocytes. *International Immunopharmacology* 2003; 3(10): 1503-1510.

Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; 38(1): 179-200.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology* 1995; 48(3): 443-450.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen, DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Letters* 1996; 393(2): 231-235.

Fernández-López D. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatric Research* 2006; 60(2): 169-173.

Feuvray D, Lopaschuk GD. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased. *Cardiovascular Research* 1997; 34(1): 113-120.

Fimiani C, Mattocks D, Cavani F, Salzet M, Deutsch DG, Pryor S, Bilfinger TV, Stefano GB. Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cellular Signaling* 1999; 11(3): 189-193.

Fisher M. Diabetic dyslipidaemia. En: Heart disease and diabetes. Editor: Fisher M. Editorial: Oxford University Press. Oxford (UK) 2009a; 27-38.

Fisher M. Diabetic autonomic neuropathy and sudden death in diabetes. En: Heart disease and diabetes. Editor: Fisher M. Editorial: Oxford University Press. Oxford (UK) 2009b; 119-129.

Fisher M. Hypertension in diabetes. En: Heart disease and diabetes. Editor: Fisher M. Editorial: Oxford University Press. Oxford (UK) 2009c; 39-50.

Fisher, M. Chronic heart failure in diabetes. En: Heart disease and diabetes. Editor: Fisher M. Editorial: Oxford University Press. Oxford (UK) 2009d; 83-93.

Fisher M. Other vascular disease in diabetes. En: Heart disease and diabetes. Editor: Fisher M. Editorial: Oxford University Press. Oxford (UK). 2009e; 95-106.

Fontana L, Kennedy BK, Longo VD, Seals D, Melov S. Medical research: Treat ageing. *Nature* 2014; 511 (7510): 405-407.

---

Force T, Krause DS, Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7(5): 332-344.

Ford WR, Honan SA, White R, Hiley CR. 2002, Evidence of a novel site mediating anandamide-induced negative inotropic and coronary vasodilator responses in rat isolated hearts. *British Journal of Pharmacology* 2002 Mar; 135(5): 1191-1198.

Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovascular Pathology* 2004; 13(1): 11-19.

## G

---

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

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society* 1964; 86(8): 1646-1647.

Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennett T. Complex regional haemodynamic effects of anandamide in conscious rats. *British Journal of Pharmacology* 2002; 135(8): 1889-1896.

Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1999; 45(6): 2085-2093.

Gharanei M, Hussain A, Janneh O, Maddock HL. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 268(2): 149-156.

Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(7): 4269-4274.

Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell, D, Hipkin RW. Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Molecular Pharmacology* 2000; 57(5): 1045-1050.

González C, Herradón E, Abalo R, Vera G, Pérez-Nievas BG, Leza JC, Martín MI, López-Miranda V. Cannabinoid/agonist WIN 55,212-2 reduces cardiac ischaemia - reperfusion injury in Zucker diabetic fatty rats: role of CB2 receptors and iNOS/eNOS. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* 2011; 27(4): 331-340.

Goparaju S, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 1999; 57(4): 417-423.

Grimaldi C, Capasso A. The endocannabinoid system in the cancer therapy: an overview. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18: 1575-1583.

Groop L, Orho-Melander M J. The dysmetabolic syndrome. *Internal Medicine* 2001; 250(2): 105-120.

Guindon J, Lai Y, Takacs SM, Bradshaw HB, Hohmann AG. Alterations in endocannabinoid tone following chemotherapy-induced peripheral neuropathy: effects of endocannabinoid deactivation inhibitors targeting fatty-acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase in comparison to reference analgesics following cisplatin treatment. *Pharmacological Research* 2013; 67(1): 94-109.

## H

---

Haffner SM. Epidemiology of type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 1998; 21(3): C3-C6.

Hajos N, Kathuria S, Dinh T, Piomelli D, Freund TF. Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus: Effects of low

---

temperature and the transport inhibitor AM404. *European Journal of Neuroscience* 2004; 19(11): 2991-2996.

Hajrasouliha AR, Tavaloki S. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *European Journal of Pharmacology* 2008; 579(1-3): 246-252

Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sciences* 1999; 65(6): 715-723.

Han H, Kaiser R, Hu K, Laser M, Ertl G, Bauersachs J. Selective modulation of endogenous nitric oxide formation in ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Basic Research in Cardiology* 2003; 98(3): 165-174.

Harjai KJ, Stone GW, Boura J, Mattos L, Chandra H, Cox D, Grines L, O'Neill W, Grines C. Comparison of outcomes of diabetic and nondiabetic patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology* 2003; 91(9): 1041-1045.

Herkenham M, Groen BGS, Lynn AB, De Costa BR, Richfield EK. Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. *Brain research* 1991a; 552(2): 301-310.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience* 1991b; 11(2): 563-583.

Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Pavón N, Carvajal K, Moreno-Sánchez R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212(1): 79-88.

Herradón E, González C., Martín M.I., López-Miranda V. Endothelial dysfunction caused by chronic cisplatin treatment is improved the synthetic cannabinoid, Win 55,212-2. *Hypertension* 2008; 52: 768.

Hiley CR, Ford WR. Endocannabinoids as mediators in the heart: a potential target for therapy of remodelling after myocardial infarction? *British Journal of Pharmacology* 2003; 138(7): 1183-1184.

- Hiley CR, Ford WR. Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biological Reviews* 2004; 79(1): 187-205.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *Journal of Neurochemistry* 1997; 69(2): 631-638.
- Hillard CJ. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2000; 61(1): 3-18.
- Hink U. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation Research* 2001; 88(2): E14-E22.
- Hirano S, Wakazono K, Agata N, Iguchi H, Tone H. Comparison of cardiotoxicity of pirarubicin, epirubicin and doxorubicin in the rat. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 1993; 20(4): 153-160.
- Hoffman AF, Macgill AM, Smith D, Oz M, Lupica CR. Species and strain differences in the expression of a novel glutamate-modulating cannabinoid receptor in the rodent hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 2005; 22(9): 2387-2391.
- Hori K, Ozaki N, Suzuki S, Sugiura Y. Upregulations of P2X(3) and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. *Pain* 2010; 149(2): 393-405.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews* 2002; 54(2): 161-202.
- Howlett AC, Mukhopadhyay S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry and Physics of Lipids* 2000; 108(1): 53-70.
- Huang SM, Bisogno T, Petros TJ, Chang SY, Zavitsanos PA, Zipkin RE, Sivakumar R, Coop A, Maeda DY, De Petrocellis L, Burstein S, Di Marzo V, Walker JM. Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(46): 42639-42644.

---

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(12): 8400-8405.

Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S. Ameliorating effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discoveries & Therapeutics* 2012; 6(3): 147-156.

Hydock DS, Lien CY, Hayward R. Anandamide preserves cardiac function and geometry in an acute doxorubicin cardiotoxicity rat model. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2009; 14(1): 59-67

## I

---

Imagawa J, Yellon DM, Baxter GF. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *British Journal of Pharmacology* 1999; 126(3): 701-708.

IDF International Diabetes Federation. 2014 <http://www.idf.org/about-diabetes> [Consulta: sábado, 11 octubre de 2014].

Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *British Journal of Pharmacology* 1996; 118(8): 2023-2028.

Iversen LL. *The science of marijuana*. Editorial: Oxford University Press 2000.

## J

---

Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 1998; 76(1): 189-199.

Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(24): 14136-14141.

Jasmin L. *Autonomic neuropathy*. 2012, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000776.htm> [Consulta: sábado, 11 octubre de 2014].

Jones HB, Nugent D, Jenkins R. Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains. *International Journal of Experimental Pathology* 2010; 91(3): 288-301.

Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovascular Research* 2002; 55(3): 619-625.

## K

---

Kahn M, Wheatcroft S. Acute coronary syndromes in diabetes. En: Heart disease and diabetes. Editor: Fisher M. Editorial: Oxford University Press. Oxford (UK) 2009; 63-71.

Kaminski NE. Immune regulation by cannabinoid compounds through the inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and altered gene expression. *Biochemical Pharmacology* 1996; 52(8): 1133-1114

Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL, Billiar TR. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2000; 101(23): 2742-2748.

Katirji B, Koontz D. Disorders of peripheral nerves. En: Bradley's Neurology in Clinical Practice. 6ª edición. Editorial: Saunders Elsevier 2012.

---

Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugiura T. Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *Journal of Biochemistry* 2001; 129(5): 665-669.

Kozela E, Pietr M, Juknat A, Rimmerman N, Levy R, Vogel Z. Cannabinoids delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285 (3): 1616-1626.

Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 1932; 210: 33-66.

Krylatov AV, Ugdyzhekova DS, Bernatskaya NA, Maslov LN, Mekhoulam R, Pertwee RG, Stephano GB. Activation of type II cannabinoid receptors improves myocardial tolerance to arrhythmogenic effects of coronary occlusion and reperfusion. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2001; 131(6): 523-525.

Krylatov AV, Uzhachenko RV, Maslov LN, Bernatskaya NA, Makriyannis A, Mechoulam R, Pertwee RG, Sal'nikova OM, Stefano JB, Lishmanov Y. Endogenous cannabinoids improve myocardial resistance to arrhythmogenic effects of coronary occlusion and reperfusion: a possible mechanism. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002; 133(2): 122-124.

Kunos G, Járai Z, Bátkai S, Goparaju SK, Ishac EJ, Liu J, Wang L, Wagner JA. Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chemistry and Physics of Lipids* 2000; 108(1): 159-168.

L

---

La Bonte LR, Davis-Gorman G, Stahl GL, McDonagh PF. Complement inhibition reduces injury in the type 2 diabetic heart following ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2008; 294(3): 1282-1290.

Lagneux C, Lamontagne D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *British Journal of Pharmacology* 2001; 132(4): 793-796.

Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats is mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 281(3): 1030-1037.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999; 283(5400): 401-404.

Lee JY, Shin J, Lee EH, Baek S, Ku SW, Kim JU. Comparison of the effects of propofol and pentobarbital on hydrogen peroxide-stimulated hepatic SNU761 cells. *Korean Journal of Anesthesiology* 2010; 58(3): 277-282.

Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, Grayson J, Lefer AM. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99(4): 684-691.

Lehto S, Pyörälä K, Miettinen H, Rönnemaa T, Palomäki P, Tuomilehto J, Laakso M. Myocardial infarct size and mortality in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* 1994; 236(3): 291-297.

Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Predictors of stroke in middle-aged patients with non-insulin-dependent diabetes. *Stroke* 1996; 27(1): 63-68.

Leker RR. Dexanabinol; a novel neuroprotective drug in experimental focal cerebral ischemia. *Journal of the Neurological Sciences* 1999; 162 (2): 114-119

Lépicier P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D. Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006; 102(2): 155-166.

Lépicier P, Bouchard J, Lagneux C, Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *British Journal of Pharmacology* 2003; 139(4): 805-815.

Lépicier P, Lagneux C, Sirois MG, Lamontagne D. Endothelial CB1-receptors limit infarct size through NO formation in rat isolated hearts. *Life Sciences* 2007; 81(17): 1373-1380.

---

Lesniewski LA, Donato AJ, Behnke BJ, Woodman CR, Laughlin MH, Ray CA, Delp MD. Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt diabetes and hypertension. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2008; 294(4): 1840-1850.

Li J, Kaminski NE, Wang DH. Anandamide-Induced Depressor Effect in Spontaneously Hypertensive Rats Role of the Vanilloid Receptor. *Hypertension* 2003; 41(3): 757-762.

Li J, Wood WH 3rd, Becker KG, Weeraratna AT, Morin PJ. Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 2006; 26(20): 2860-2872.

Lin JH, Yang J, Liu S, Takano T, Wang X, Gao Q, Willecke K, Nedergaard M. Connexin Mediates Gap Junction-Independent Resistance to Cellular Injury. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(2): 430-441.

Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochemical Journal* 2000; 346: 835-840.

López-Miranda V, Herradon E, Gonzalez C, Martin MI. Vascular toxicity of chemotherapeutic agents. *Current Vascular Pharmacology* 2010; 8(5): 692-700.

López-Miranda V, Herradon E, Martin MI. Vasorelaxation caused by cannabinoids: mechanisms in different vascular beds. *Current Vascular Pharmacology* 2008; 6(4): 335-346.

## M

---

Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shen Y, Ren J. Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2010; 37(4): 460-465.

- Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89(9): 3825-3829.
- Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *The AAPS journal* 2006; 8(2): E298-E306.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: A comparative receptor binding radioautography and "in situ" hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992; 48(3): 655-668.
- Malinowska B, Kwolek G, Göthert M. Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1-and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2001; 364(6): 562-569.
- Mancia G. Optimal control of blood pressure in patients with diabetes reduces the incidence of macro and microvascular events. *Journal of Hypertension* 2007; 25(1): S7-12.
- Marfella R, Di Filippo C, Esposito K, Nappo F, Piegari E, Cuzzocrea S, Berrino L, Rossi F, Giugliano D, D'Amico M. Absence of inducible nitric oxide synthase reduces myocardial damage during ischemia reperfusion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Diabetes* 2004; 53(2): 454-462.
- Markman M. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: underreported and underappreciated. *Current Pain and Headache Reports* 2006; 10(4): 275-278.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346(6284): 561-564.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 1995; 50(1): 83-90.

---

Mendizábal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *British Journal of Pharmacology* 2007; 151(4): 427-440.

Mokni M, Hamlaoui-Guesmi S, Amri M, Marzouki L, Limam F, Aouani E. Grape seed and skin extract protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat heart. *Cardiovascular Toxicology* 2012; 12(2): 158-165.

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

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365(6441): 61-65.

## N

---

Netzeband JG, Conroy SM, Parsons KL, Gruol DL. Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca<sup>2+</sup> signals in cerebellar granule neurons in culture. *The Journal of Neuroscience* 1999; 19(20): 8765-8777.

Niederhoffer N, Schmid K, Szabo B. The peripheral sympathetic nervous system is the major target of cannabinoids in eliciting cardiovascular depression. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2003; 367(5): 434-443.

Niederhoffer N, Szabo B. Effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on sympathetic cardiovascular regulation. *British Journal of Pharmacology* 1999; 126(2): 457-466.

Nuver J, Smit AJ, van der Meer J, van den Berg MP, van der Graaf WT, Meinardi MT, Sleijfer DT, Hoekstra HJ, van Gessel AI, van Roon AM, Gietema JA. Acute chemotherapy-induced cardiovascular changes in patients with testicular cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(36): 9130-9137.

# O

---

Offertaler L, Mo FM, Batkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Molecular Pharmacology* 2003; 63(3): 699-705.

Oltman C, Richou L, Davidson E, Coppey L, Lund D, Yorek M. Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2006; 291(4): H1780-1787.

Ong W, Mackie K. A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience* 1999; 92(4): 1177-1191.

# P

---

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2005; (168): 599-625.

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice. *The Journal of Physiology* 2004; 558(2): 647-657.

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

Pacher P, Hasko G. Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *British Journal of Pharmacology* 2008a; 153(2): 252-262.

Pacher P, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Godlewski G, Batkai S, Kunos G. Modulation of the endocannabinoid system in cardiovascular disease: therapeutic potential and limitations. *Hypertension* 2008b; 52(4): 601-607.

Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Safety* 2000; 22(4): 263-302.

- 
- Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A. Cannabinergic ligands. *Chemistry and physics of lipids* 2002; 121(1): 3-19.
- Pasamontes V, Martín M, De Giorgio R, Chiarlone A, Abalo R. Autonomic neuropathy induced by chronic cisplatin in the gastrointestinal tract. *FENS Forum Abstracts* 2006; 3: A148.22.
- Pascual D, Goicoechea C, Burgos E, Martín MI. Antinociceptive effect of three common analgesic drugs on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2010; 95(3): 331-337.
- Pascual D, Goicoechea C, Suardiaz M, Martín MI. A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. *Pain* 2005; 118(1): 23-34.
- Paulson DJ. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovascular Research* 1997; 34(1): 104-112.
- Pertwee R, Stevenson L, Elrick D, Mechoulam R, Corbett A. Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *British Journal of Pharmacology* 1992; 105(4): 980-984.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Therapy* 1997; 38(1): 44-48.
- Pertwee RG. Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochemical Society Transactions* 1998; 26(2): 267-272.
- Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Current Medicinal Chemistry* 1999; 6: 635-664.
- Pertwee R, Ross R. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2002; 66(2): 101-121.
- Pertwee R. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *British Journal of Pharmacology* 2007; 152(7): 984-986.

Pertwee R.G. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17 (14): 1360–1381.

Peterson RG, Shaw WN, Neel M, Little LA, Eichberg J. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR Journal* 1990; 32(3): 16-19.

Piconi L, Quagliario L, Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003; 41(9): 1144-1149.

Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(10): 5802-5807.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience* 2003; 4(11): 873-884.

Platel D, Pouna P, Bonoron-Adèle S, Robert J. Preclinical evaluation of the cardiotoxicity of taxane–anthracycline combinations using the model of isolated perfused rat heart. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2000; 163(2): 135-140.

Poitout V, Robertson RP. Glucolipototoxicity: fuel excess and  $\beta$ -cell dysfunction. *Endocrine Reviews* 2008; 29(3): 351-366.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 301(3): 1020-1024.

## R

---

Rajwani A, Wheatcroft S. Coronary heart disease in diabetes. En: Heart disease and diabetes. Editor: Fisher M. Editorial Oxford University Press. Oxford (UK). 2009; 51-61.

---

Randall MD, Gardiner SM, Bennett T. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the ((mREN-2)27) transgenic hypertensive rat. *Cardiovascular Research* 1997; 33: 400-409.

Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacology & Therapeutics* 2002; 95(2): 191-202.

Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *British Journal of Pharmacology* 2004; 142(1): 20-26.

Reichenbach V, Ros J, Jiménez W. Cannabinoides endógenos en la enfermedad hepática: muchos dardos para una sola diana. *Gastroenterología y Hepatología* 2010; 33(4): 323-329.

Rhee MH. Original Articles: SR144528 as Inverse Agonist of CB2 Cannabinoid Receptor. *Journal of Veterinary Science* 2002; 3(3): 179-184.

Ribeiro R, Wen J, Li S, Zhang Y. Involvement of ERK1/2, cPLA2 and NF- $\kappa$ B in microglia suppression by cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2013; 100-101: 1-14.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Capud D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters* 1994; 350(2): 240-244.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Breliere JC, Le Fur GL. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 284(2): 644-650.

Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism* 2005; 40(1): 2-14.

Rukwied R, Watkinson A, McGlone F, Dvorak M. Cannabinoid agonists attenuate capsaicin-induced responses in human skin. *Pain* 2003; 102(3): 283-288.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley P. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology* 2007; 152(7): 1092-1101.

## S

---

Said G. Diabetic neuropathy—a review. *Nature Clinical Practice Neurology* 2007; 3(6): 331-340.

Sarzani R, Salvi F, Dessì-Fulgher, P, Rappelli A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *Journal of Hypertension* 2008; 26(5): 831-843.

Schlitt A, Jordan K, Vordermark D, Schwamborn J, Langer T, Thomssen C. Cardiotoxicity and oncological treatments. *Deutsches Ärzteblatt international* 2014; 111(10): 161-168.

Schmidinger M, Zielinski CC, Vogl UM, Bojic A, Bojic M, Schukro C, Ruhsam M, Hejna M, Schmidinger H. Cardiac toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(32): 5204-5212.

Schreihof DA, Redmond L. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury *in vitro*. *Neuroscience* 2009; 158(2): 602-609.

Seltzman HH. Structure and receptor activity for classical cannabinoids. *Current Medicinal Chemistry* 1999; 6(8): 685-704.

SEOM. *El Cáncer en España 2014*. 2014, <http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/104582-el-cancer-en-espana-2014> [Consulta: sábado, 11 octubre de 2014].

SEOM. *Informe de Salud 2013 sobre Indicadores de la OECD*. 2014, <http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/104582-el-cancer-en-espana-2014?start=6#content> [Consulta: sábado, 11 octubre de 2014].

---

Sereno M, Brunello A, Chiappori A, Barriuso J, Casado E, Belda C, De Castro J, Feliu J, González-Barón M. Cardiac toxicity: old and new issues in anti-cancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* 2008; 10(1): 35-46.

Shah AM. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 2000; 45(1): 148-155.

Shaker O, Sourour DA. How to protect doxorubicin-induced cardiomyopathy in male albino rats? *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2010; 55(3): 262-268.

Sheng WS. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia* 2005; 49(2): 211-219.

Shmist YA, Goncharov I, Eichler M, Shneyvays V, Isaac A, Vogel Z, Shainberg A. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cell from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 283(1-2): 75-83.

Shoemaker JL, Joseph BK, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL. The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; 314(2): 868-875.

Siqueira SW, Lapa AJ, Ribeiro do Valle J. The triple effect induced by delta 9-tetrahydrocannabinol on the rat blood pressure. *European Journal of Pharmacology* 1979; 58(4): 351-357.

Skaper SD, Facci L, Romanello S, Leon A. Mast cell activation causes delayed neurodegeneration in mixed hippocampal cultures via the nitric oxide pathway. *Journal of Neurochemistry* 1996; 66(3): 1157-1166.

Slavic S, Lauer D, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Grzesiak A, Trappiel M, Thöne-Reineke C, Baulmann J, Paulis L, Kappert K, Kintscher U, Unger T, Kaschina E. Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome. *Journal of Molecular Medicine* 2013; 91(7): 811-823.

Smiley KA, Karler R, Turkanis SA. Effects of cannabinoids on the perfused rat heart. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1976; 14(4): 659-675.

- Smith JM. Inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME improves ventricular performance in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1997; 29(9): 2393-2402
- Soga M, Kamal FA, Watanabe K, Ma M, Palaniyandi S, Prakash P, Veeraveedu P, Mito S, Kunisaki M, Tachikawa H. Effects of angiotensin II receptor blocker (candesartan) in daunorubicin-induced cardiomyopathic rats. *International Journal of Cardiology* 2006; 110(3): 378-385.
- Song D, Kuo K, Yao R, Hutchings SR, Pang CC. Inducible nitric oxide synthase depresses cardiac contractile function in Zucker diabetic fatty rats. *European Journal of Pharmacology* 2008; 579(1): 253-259.
- Stefano GB. Endocannabinoid immune and vascular signaling. *Acta Pharmacologica Sinica* 2000; 21(12): 1071-1082.
- Stillman M, Cata JP. Management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Current Pain and Headache Reports* 2006; 10(4): 279-287.
- Stockklauster-Farber K. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1535(1): 10-20.
- Sudharsan PT, Mythili Y, Selvakumar E, Varalakshmi P. Lupeol and its ester exhibit protective role against cyclophosphamide-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2006; 47(2): 205-210.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2002; 66(2): 173-192.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 215(1): 89-97.

---

# T

---

Trigg ME, Higa GM. Chemotherapy-induced nausea and vomiting: antiemetic trials that impacted clinical practice. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 2010; 16(4): 233-244.

Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena M, Mackie K, Walker J. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1997; 83(2): 393-411.

Twitchell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 1997; 78(1): 43-50.

# U

---

Ueda N. Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2002; 68: 521-534.

Ugdyzhekova DS, Krylatov AV, Bernatskaya NA, Maslov LN, Mechoulam R, Pertwee RG. Activation of cannabinoid receptors decreases the area of ischemic myocardial necrosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002; 133(2): 125-126.

Underdown NJ, Hiley CR, Ford WR. Anandamide reduces infarct size in rat isolated hearts subjected to ischemia-reperfusion by a novel cannabinoid mechanism. *British Journal of Pharmacology* 2005; 146(6): 809-816.

# V

---

Van Den Belt-Dusebout AW, Nuver J, De Wit R, Gietema JA, Ten Bokkel Huinink WW, Rodrigus PT, Schimmel EC, Aleman BM, Van Leeuwen FE. Long-term risk of cardiovascular disease in 5-year survivors of testicular cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(3): 467-475.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005; 310(5746): 329-332.

Vandevorde S, Lambert DM. Focus on the three key enzymes hydrolysing endocannabinoids as new drug targets. *Current Pharmaceutical Design* 2005; 11(20): 2647-2668.

Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *European Journal of Pharmacology* 1995; 278(3): 279-283.

Vegh A, Komori S, Szekeres L, Parratt JR. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovascular Research* 1992; 26(5): 487-495.

Vera G, Chiarlone A, Martín MI, Abalo R. Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats. *Autonomic Neuroscience* 2006a; 126: 81-92.

Vera G, Martín MI, De Giorgio R, Chiarlone AP, Abalo R. Autonomic neuropathy induced by chronic cisplatin in the gastrointestinal tract. *FENS Forum Abstracts* 2006b; 3: A148.22.

Vera G, Chiarlone A, Cabezos PA, Pascual D, Martín MI, Abalo R. WIN 55,212-2 prevents mechanical allodynia but not alterations in feeding behaviour induced by chronic cisplatin in the rat. *Life Sciences* 2007; 81(6): 468-479.

Vera G, Castillo M, Cabezos P, Chiarlone A, Martín, M., Gori A, Pasquinelli G, Barbara G, Stanghellini V, Corinaldesi R. Enteric neuropathy evoked by repeated cisplatin in the rat. *Neurogastroenterology & Motility* 2011; 23(4): 370-e163.

Vera G, López-Miranda V, Herradón E, Martín MI, Abalo R. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2012; 102(2): 335-343.

Vera G, Cabezos PA, Martín MI, Abalo R. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2013; 105: 205-212.

---

Viale PH, Yamamoto DS. Cardiovascular toxicity associated with cancer treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing* 2008; 12(4): 627-638.

Viana-Cardoso KV, da Silva MT, Júnior RC, Peixoto Junior AA, Pinho LG, Santos AA, Ribeiro RA, Rola FH, Gondim Fde A. Repeated cisplatin treatments inhibit gastrointestinal motility and induces baroreflex changes and mechanical hyperalgesia in rats. *Cancer Investigation* 2011; 29(7): 494–500.

Vora JP, Zimsen SM, Houghton DC, Anderson S. Evolution of Metabolic and Renal Changes in the ZDF/Drt-fa Rat Model of Type II Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 1996; 7: 113-117.

## W

---

Wagner JA, Varga K, Kunos G. Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *Journal of Molecular Medicine* 1998; 76(12): 824-836.

Waine C The metabolic syndrome: The whole is more than the sum of its parts. *Journal of Men's Health and Gender* 2005; 2: 170-178.

Walsh SK, Hepburn CY, Kane KA, Wainwright CL. Acute administration of cannabidiol in vivo suppresses ischaemia-induced cardiac arrhythmias and reduces infarct size when given at reperfusion. *British Journal of Pharmacology* 2010; 160(5): 1234-1242.

Walter, L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(4): 1398-1405.

Wang P, Chatham JC. Onset of diabetes in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats leads to improved recovery of function after ischemia in the isolated perfused heart. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism* 2004; 286(5): E725-736.

Wassink AMJ, Olijhoek JK, Visseren FLJ. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *European Journal of Clinical Investigation* 2007; 37(1): 8-17.

Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, Weismüller S, Dudek RR, Akiyama K, Reichart B. Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96(5): 1616-1623.

Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2008; 13(1): 27-46.

Wu S, Ko Y, Teng M, Ko Y, Hsu L, Hsueh C, Chou Y, Liew C, Lee Y. Adriamycin-induced Cardiomyocyte and Endothelial Cell Apoptosis: *in vitro* and *in vivo* Studies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34(12): 1595-1607.

## X

---

Xi L, Jarrett NC, Hess ML, Kukreja RC. Myocardial ischemia/reperfusion injury in the inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Life sciences* 1999; 65(9): 935-945.

Xie YW, Wolin MS. Role of Nitric Oxide and Its Interaction with Superoxide in the Suppression of Cardiac Muscle Mitochondrial Respiration Involvement in Response to Hypoxia/Reoxygenation. *Circulation* 1996; 94(10): 2580-2586.

Xu Y, Wang C, Li Z. A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress (Review). *Molecular and Clinical Oncology* 2014; 2(1): 3-7.

## Y

---

Yamaç D, Elmas C, Özogul C, Keskil Z, Dursun A. Ultrastructural damage in vascular endothelium in rats treated with paclitaxel and doxorubicin. *Ultrastructural Pathology* 2006; 30(1-2): 103-110.

Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, Durand JB, Gibbs H, Zafarmand AA, Ewer MS. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation* 2004; 109(25): 3122-3131.

---

Yeh ET, Bickord CL. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy Incidence, Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 53(24): 2231-2247.

Yue TL, Bao W, Gu JL, Cui J, Tao L, Ma XL, Ohlstein EH, Jucker BM. Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic Fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Diabetes* 2005; 54(2): 554-562.

## Z

---

Zhang M, Adler MW, Abood ME, Ganea D, Jallo J, Tuma RF. CB2 receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Microvascular Research* 2009 Jun; 78(1): 86-94.

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(4): 1784-1789.

Zimmer H. The isolated perfused heart and its pioneers. *Physiology* 1998; 13(4): 203-210.

Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates Ca<sup>2+</sup> signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 2003; 140(8): 1351-1362.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; 400(6743): 452-457.