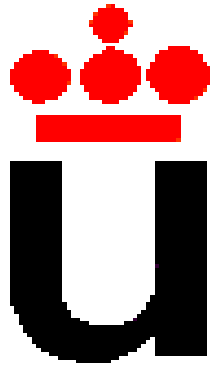






UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTOS VASODILATADORES DE  
ANANDAMIDA:  
DIFERENCIAS ENTRE LECHOS DE  
RESISTENCIA Y DE CONDUCTANCIA**

ESPERANZA HERRADÓN PLIEGO  
MADRID, 2009



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

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado “EFECTOS VASODILATADORES DE ANANDAMIDA: DIFERENCIAS ENTRE LECHOS DE RESISTENCIA Y DE CONDUCTANCIA” ha sido realizado por Dña. Esperanza Herradón Pliego en el Departamento de Farmacología y Nutrición bajo nuestra dirección.

Y para que así conste donde proceda firmamos el presente certificado en Alcorcón, a 12 de Septiembre de 2009.

Fdo. M.I Martín

Fdo. V. López-Miranda

Fdo. E. Herradón



A mi Familia  
A Juan Carlos





En primer lugar, quiero agradecer sinceramente a todas las personas que me han ayudado y asesorado en todo momento en la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias a todos por estar cerca de mí.

Por fin, **Dra. María Isabel Martín Fontelles** es el momento de agradecerle el haber confiado en mí en todo momento y el haberme dado la oportunidad de la realización de esta Tesis Doctoral. Por enseñarme tanto a nivel profesional como personal, así como tu apoyo en momentos difíciles. Es un orgullo para mí que seas codirectora de esta Tesis. Gracias por haberme acogido en tu grupo y por haber hecho posible que se cumpla un sueño. Espero que “te vaya bonito” como nueva directora del reciente creado Departamento de Farmacología, te lo mereces por ser una trabajadora incansable.

A la **Dra. Visitación López-Miranda**, mi codirectora de Tesis, me gustaría agradecerle el haberme permitido realizar esta Tesis Doctoral en el área de Cardiovascular. No tengo palabras para expresar mi gratitud por enseñarme todo lo que se del mundo de la Farmacología. Agradecerte el tiempo que has dedicado en mi formación tanto investigadora como docente. Gracias por estar disponible siempre que te he necesitado y haberme ayudado en todo momento.

Al **Dr. Carlos Goicoechea**, agradecerle su apoyo desde mi llegada al laboratorio. Gracias por tener tu puerta siempre abierta para ayudarme y resolver cualquier duda. Tu dedicación y profesionalidad es un ejemplo para mí que me ayuda a seguir hacia delante.

A las **Dras. Angela Alsasua** y **Teresa Dannert**, agradecerlas el haber colaborado en este trabajo de investigación y, haber compartido conmigo tan buenos momentos.

A los **Dres. Raquel Abalo, Rocío Girón, Eva Sanchez, Marga Suardíaz, David Pascual y Elisa Burgos**, agradeceros los buenos momentos que hemos pasado juntos en el laboratorio. Con vosotros es muy fácil trabajar, sois unos chicos estupendos.

A la casi doctora **Gema Vera**, a tí no puedo decirte nada que tú ya no sepas. Hemos empezado y terminado juntas esta etapa de nuestras vidas. Hicimos juntas los cursos de Doctorado, después leímos juntas nuestros DEAs y por fin también leeremos juntas nuestras Tesis (espero que en diferentes días), además de celebrar año tras año los cumpleaños también juntas. Suerte Gema.

A los futuros doctores **Pablo, Nancy, Cristina, Ana, Mónica y Nuria**, como podéis ver todo llega en esta vida. En algún momento seréis vosotros los que os toque escribir los agradecimientos de vuestras Tesis Doctorales, y entonces estaréis tan felices como yo porque ese momento ha llegado. Sólo deciros, ¡Ánimo chicos!

A **Maica, Lupe y Cristina**, agradeceros la ayuda que me brindáis a diario en el laboratorio. Gracias por ser tan atentas conmigo y estar disponibles siempre que os necesito.

Quiero agradecer al director del Departamento de Ciencias de la Salud III, **Dr. Ángel González**, el haberme permitido realizar la Tesis Doctoral en esta Universidad. Agradecer también a la directora del Departamento de Farmacología y Nutrición, **Dra. María Isabel Martín**, por haber acogido la lectura de esta Tesis Doctoral.

Por último, gracias a la **Comunidad de Madrid** y a la **Universidad Rey Juan Carlos**, que me han permitido disfrutar de una beca predoctoral y de una estancia predoctoral, haciendo posible la realización de este trabajo.

La investigación de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos: SAF2003-08003-C02-01 y SAF2006-13391-C03-01 del **Ministerio de Educación y Ciencia**, URJC-PGRAL-2001/11, GCO-2003-04, URJC-PIGE-02-16, PPR-2004-63, URJC-CM-2006-BIO-0604 y URJC-CM-2007-BIO-1412 de la **Universidad Rey Juan Carlos** y la **Comunidad de Madrid**.

Gracias a los laboratorios GlaxoSmithKline por suministrarnos el GW627368X y, a los laboratorios laboratorios Sanofi Recherche por suministrarnos el SR144528 y el rimonabant, utilizados en el presente trabajo de investigación.



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>1. CANNABINOIDES</b> .....	1
1.1. <i>Cannabis sativa</i> .....	1
1.2. Sistema cannabinoide endógeno.....	2
1.2.1. Receptores cannabinoide.....	3
1.2.2. Mecanismos de transducción.....	7
1.2.3. Cannabinoide endógenos.....	11
1.2.4. Síntesis, liberación y degradación de cannabinoide endógenos.....	16
1.3. Ligandos cannabinoide.....	21
1.3.1. Agonistas cannabinoide.....	21
1.3.2. Antagonistas cannabinoide.....	25
1.3.3. Inhibidores de la recaptación.....	27
1.3.4. Inhibidores de la degradación.....	28
1.4. Efectos fisiológico y farmacológico de los cannabinoide.....	30
1.4.1. Efectos en sistema nervioso central.....	31
1.4.2. Efectos antinociceptivo y analgésico.....	35
1.4.3. Efectos orexígeno.....	37
1.4.4. Efectos antiemético.....	38
1.4.5. Efectos sobre la presión intraocular.....	40
1.4.6. Efectos sobre la proliferación celular.....	41
<b>2. FISIOLÓGÍA ARTERIAL</b> .....	43
2.1. Estructura de las arterias.....	43
2.2. Clasificación de las arterias.....	45
2.3. Regulación del tono vascular.....	46
<b>3. SISTEMA VASCULAR Y CANNABINOIDES</b> .....	54
3.1. Localización del sistema endocannabinoide en tejido vascular.....	54
3.2. Efectos de los cannabinoide en el sistema vascular: estudio en humano.....	56
3.3. Efectos de los cannabinoide en el sistema vascular: estudio en animal.....	57
3.4. Mecanismos implicado en la vasorelajación ocasionado por los cannabinoide.....	61
3.4.1. Implicación de receptores.....	61
3.4.2. Implicación de diferentes vías de señalización intracelular.....	65

<b>OBJETIVOS</b> .....	69
------------------------	----

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b> .....	71
<b>2. PREPARACIÓN DE AORTA AISLADA DE RATA</b> .....	71
2.1. Obtención de la preparación.....	71
2.2. Montaje de la preparación.....	72
2.3. Protocolo experimental.....	73
<b>3. PREPARACIÓN DE LECHO MESENTÉRICO AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA</b> .....	78
3.1. Obtención de la preparación.....	78
3.2. Montaje de la preparación.....	79
3.3. Protocolo experimental.....	81
<b>4. SOLUCIONES Y COMPUESTOS UTILIZADOS</b> .....	84
4.1. Preparación de la solución fisiológica de Krebs-Henseleit.....	84
4.2. Disolución del cannabinoide anandamida.....	85
4.3. Compuestos utilizados.....	86
<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	88

## **RESULTADOS**

<b>1. ENSAYOS EN AORTA AISLADA DE RATA</b> .....	91
1.1. Valoración del efecto vasodilatador de la anandamida.....	91
1.1.1. Efecto del vehículo de la anandamida sobre la función vascular de aorta de rata.....	91
1.1.2. Efecto de la anandamida sobre el tono vascular de aorta de rata.....	92
1.2. Valoración de los mecanismos implicados en la vasorelajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata.....	94
1.2.1. Efecto de los diferentes antagonistas/inhibidores o su vehículo sobre la función vascular de aorta de rata.....	94
1.2.2. Implicación de receptores acoplados a proteína $G_{i/o}$ .....	96
1.2.3. Implicación del sistema cannabinoide.....	96
1.2.3.1. Receptores cannabinoides $CB_1$ y $CB_2$ .....	96
1.2.3.2. Receptor cannabinoide “No- $CB_1$ / No- $CB_2$ ”.....	98
1.2.4. Implicación del sistema vanilloide.....	99
1.2.5. Implicación de factores endoteliales.....	100
1.2.5.1. Óxido nítrico (NO).....	100
1.2.5.2. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).....	101
1.2.5.3. Derivados del metabolismo del ácido araquidónico (AA).....	102

1.2.6. Implicación del receptor EP <sub>4</sub> .....	107
1.2.7. Implicación del transportador de anandamida.....	108
<b>2. ENSAYOS EN LECHO MESENTÉRICO AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA.....</b>	<b>110</b>
2.1. Valoración del efecto vasodilatador de la anandamida.....	110
2.1.1. Efecto del vehículo de la anandamida sobre la función vascular de lecho mesentérico de rata.....	110
2.1.2. Efecto de la anandamida sobre el tono vascular de lecho mesentérico de rata.....	111
2.2. Valoración de los mecanismos implicados en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico de rata.....	113
2.2.1. Efecto de los diferentes antagonistas/inhibidores o su vehículo sobre la función vascular de lecho mesentérico de rata.....	113
2.2.2. Implicación de receptores acoplados a proteína G <sub>i/o</sub> .....	115
2.2.3. Implicación del sistema cannabinoide.....	116
2.2.3.1. Receptores cannabinoides CB <sub>1</sub> y CB <sub>2</sub> .....	116
2.2.3.2. Receptor cannabinoide “No-CB <sub>1</sub> / No-CB <sub>2</sub> ”.....	119
2.2.4. Implicación del sistema vanilloide.....	119
2.2.5. Implicación de canales de K <sup>+</sup> .....	120
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>149</b>





# ABREVIATURAS

**AA:** Ácido araquidónico

**“Abnormal cannabidiol”:** Trans-4-[3-metil-6-(1-metiletenil)-2-ciclohexen-1-il]-5-pentil-1,3-bencenodiol)

**AC:** Adenilato ciclase

**2-AG:** 2-araquidonilglicerol

**AM-251:** N-(piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida

**AM-281:** 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-4-morfolinil-1H-pirazol-3-carboxamida

**AM374:** Fluoruro de palmitilsulfonilo

**AM381:** Fluoruro de estearilsulfonilo

**AM404:** N-(4-hidroxifenil)araquidoniletanolamida

**AM630:** 6-iodo-2-metil-1-[2-(4morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)metadona

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**Anandamida:** Araquidoniletanolamida

**ATP:** Adenosín trifosfato

**°C:** Grado centígrado

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

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro cálcico

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

**Cannabidiol:** 2-[(1R,6R)-3-metil-6-(1-metiletenil)-2-ciclohexen-1-il]-5-pentil-1,3-bencenodiol

**Capsazepina:** N-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2benzacepina-2-carbotioamida

**Carbacol:** Carbamato de (2-hidroxietil)trimetilamonio

**CE<sub>50</sub>:** Concentración eficaz 50

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

**CGRP<sub>8-37</sub> (rata):** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina 8-37 (rata)

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

**COX-1:** Ciclooxigenasa 1

**COX-2:** Ciclooxigenasa 2

**CP55,244:** 4-[4-(1,1-dimetilheptil)-2-hidroxifenil]perhidro-2 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dihidroxi-naftaleno

**(-)CP55,940:** (-)-Cis-3-[2-hidroxil-4-(1,1-dimetilheptil) fenil]-trans-4-(3-hidroxipropil) ciclohexano

**DAG:** Diacilglicerol

**DFU:** 5,5-dimetil-3-(3fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil)fenil-2(5H)-furanona

**DGL:** Diacilglicerol lipasa

**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**+ E:** Con endotelio  
**- E:** Sin endotelio  
**EDHF:** Factor hiperpolarizante derivado del endotelio  
**EDRF:** Factor relajante derivado del endotelio  
**EEM:** Error estándar de la media  
**EET:** Ácidos epoxieicosatrienoicos  
**E<sub>máx</sub>:** Efecto máximo  
**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial  
**EP:** Receptores para prostaglandina E<sub>2</sub>  
**EP<sub>1</sub>:** Receptor para prostaglandina E<sub>2</sub> subtipo 1  
**EP<sub>2</sub>:** Receptor para prostaglandina E<sub>2</sub> subtipo 2  
**EP<sub>3</sub>:** Receptor para prostaglandina E<sub>2</sub> subtipo 3  
**EP<sub>4</sub>:** Receptor para prostaglandina E<sub>2</sub> subtipo 4  
**FAAH:** Amidohidrolasa de ácidos grasos  
**Fenilefrina:** (R)-(-)-1-(3-hidroxifenil)-2-metilaminoetanol/ Fe  
**g:** Gramo  
**GCs:** Guanilato ciclasa soluble  
**GMPC:** Guanosín monofosfato cíclico  
**GPR55:** "G protein-coupled receptor 55"  
**GW627368X:** N-(2-[4-(4,9-dietoxy-1-oxo-1,3-dihidro-2H-benzo[f]isoindol-2-il)  
**h:** Hora  
**HU-210:** Trans-11-hidroxi-  $\Delta^8$ -THC -dimetilheptilo  
**HU-211:** Cis-11-hidroxi-  $\Delta^8$ -THC -dimetilheptilo  
**i.p:** Intraperitoneal  
**Indometacina:** Ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético  
**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible  
**IP:** Receptores para prostaciclina  
**IP<sub>3</sub>:** Inositol trifosfato  
**K<sup>+</sup>:** Potasio  
**KCl:** Cloruro potásico  
**Kg:** Kilogramo  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Difosfato potásico  
**K-S:** Krebs-Henseleit  
**L-NAME:** N $\omega$ -nitro-L-argininametil éster  
**LOX:** Lipooxigenasas

**LY320135:** 4-[6-metoxi-2-(4-metoxifenil)1-benzofurano-3-carbonil]benzonitrilo

**M:** Molar

**MAGL:** Monoacilglicerol lipasa

**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**Metanandamida:** (R)(+)Araquidonil-1'-hidroxi-2'-propilamida

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

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

**min:** Minuto

**ml:** Mililitro

**MLV:** Músculo liso vascular

**mm:** Milímetro

**mM:** Milimolar

**mmHg:** Milímetros de mercurio

**mRNA:** Acido ribonucleico mensajero

**NaCl:** Cloruro sódico

**NADA.:** N-araquidoniletanolamida

**NAEs:** N-aciletanolamidas

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

**NarPE:** N-araquidonilfosfatidiletanolamina

**NAT:** N-aciltransferasa

**ng:** Nanogramo

**nM:** Nanomolar

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**nmol:** Nanomol

**nNOS:** Óxido nítrico sintasa neuronal

**NO:** Óxido nítrico

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

**17-ODYA:** Ácido 17-octadecínico

**O-1918:** (-)-1,3-dimetoxi-2-(3-3,4-trans-p-mentadieno-(1,8)-il)-orcinol

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**pCE<sub>50</sub>:** Logaritmo de la concentración eficaz 50

**PEA:** Palmitoiletanolamida

**PGG<sub>2</sub>:** Prostaglandina G<sub>2</sub>

**PGH<sub>2</sub>:** Prostaglandina H<sub>2</sub>

**PGI<sub>2</sub>:** Prostaciclina o Prostaglandina I<sub>2</sub>

**PKA:** Proteína quinasa A

**PLC:** Fosfolipasa C

**PMSF:** Fenilmetilsulfonilo

**Rimonabant:** N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida

**SAR:** Relación estructura-actividad

**SC560:** 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-trifluorometilpirazola

**sg:** Segundo

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SNC:** Sistema nervioso central

**SR144528:** N-(1,S)-endo-1,3,3-trimetilbiciclo (2,2,1)heptan-2-il)-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-(4-metilbencil)-pirazol-3-carboxamida

**TEA:** Tetraetilamonio

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TRP:** "Transient receptor potential"

**TRPV1:** "Transient receptor potential vanilloid"

**TXA<sub>2</sub>:** Tromboxano A<sub>2</sub>

**UCM707:** N-(3-furilmetil)eicosa-5,8,11,14-tetraenamida

**UI:** Unidades internacionales

**URB597:** 3'-Carbamoil-bi-fenil-3-il-ciclohexilcarbamato

**VDM11:** N-araquidonil-(2-metil-4hidroxifenil)amina

**Win 55,212-2:** (R)-(+)-[dihidro-5-metil-3-(-4-morfolinilmetil) pirrol[1,2,3-de]-1,4-benzosazin-6-il]-1-naftalenilmetanona

**$\mu$ g:** Microgramo

**$\mu$ l:** Microlitro

**$\mu$ M:** Micromolar

**$\Delta^8$ -THC:**  $\Delta^8$ -tetrahidrocannabinidiol

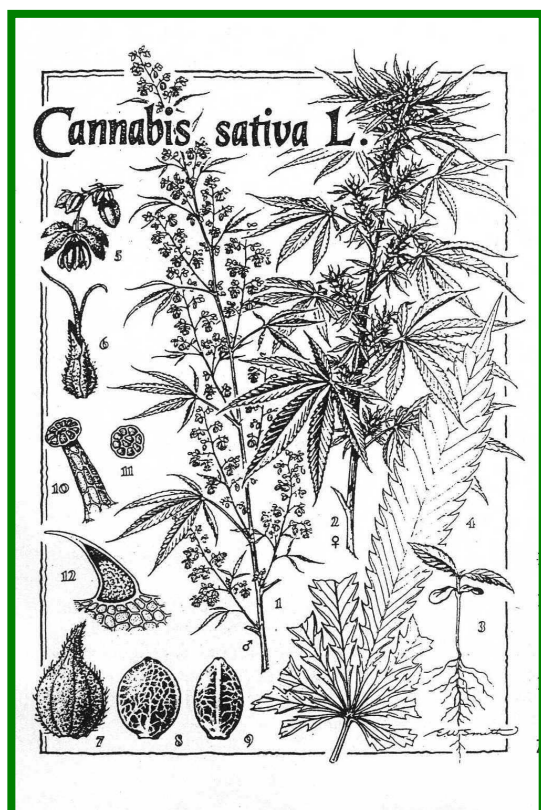
**$\Delta^9$ -THC:**  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinidiol

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. CANNABINOIDES

### 1.1. *CANNABIS SATIVA*



El *Cannabis sativa* es una planta anual que se reproduce a través de semillas y crece rápidamente en entornos soleados. La planta del cannabis es dioica, es decir, las flores macho y hembra se desarrollan en plantas diferentes. El polen producido por las plantas macho necesita corrientes de aire para ser transportado hasta las hembras y fecundarlas. Cada flor hembra da lugar a una sola semilla que madura entre tres a ocho semanas. En esta planta se han identificado más de 400 sustancias naturales, 66 de las cuales son de naturaleza similar, específicas de esta planta, y pertenecen al grupo de los **cannabinoides**.

Los cannabinoides son sustancias con una estructura carbocíclica con 21 carbonos y, generalmente formados por tres anillos: ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. Entre los 66 compuestos cannabinoides que pueden estar presentes en la planta se destaca la presencia del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC),  $\Delta^8$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC), cannabinol y cannabidiol. La presencia de éstos compuestos varía según la variedad del cannabis y, por lo general, se encuentran en la planta solamente tres o cuatro compuestos cannabinoides en concentraciones superiores al 0,1%.

En relación a los componentes no cannabinoides del *Cannabis sativa*, diferentes autores sugieren que éstos podrían, mediante múltiples mecanismos, influir sobre la actividad de los cannabinoides. Concretamente, éstos podrían potenciar y/o mitigar los efectos secundarios derivados de dichos principios activos (McPartland y Pruitt, 1999).

En la Tabla 1 se enumeran los diferentes constituyentes del *Cannabis sativa* clasificados por familias químicas.

**TABLA 1**

Constituyentes del *Cannabis sativa* clasificados por familias químicas.

FAMILIA QUÍMICA	Nº COMPUESTOS
Ácidos	21
Ácidos grasos	22
Alcoholes	7
Aldehídos	12
Aminoácidos	18
Azúcares	34
<b>CANNABINOIDES</b>	<b>66</b>
Cetonas	13
Compuestos nitrogenados	27
Elementos	9
Esteroides	11
Fenoles no cannabinoides	25
Flavonoides	21
Hidrocarburos	50
Lactonas y ésteres	13
Pigmentos	2
Proteínas, glicoproteínas, enzimas	11
Terpenos	120
Vitaminas	1

Modificado de ElSohly, 2003

## 1.2. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

En el año 1964, la estructura del principal componente psicoactivo del cannabis, el  $\Delta^9$ -THC, fue caracterizada por Gaoni y Mechoulam (Gaoni y Mechoulam, 1964). Conocida dicha estructura, se trató de identificar en qué zonas del sistema nervioso central (SNC) actuaba y a través de qué mecanismos producía sus efectos psicoactivos.



Dado que el  $\Delta^9$ -THC y otros cannabinoides naturales presentan una alta liposolubilidad, se pensó durante mucho tiempo que sus propiedades farmacológicas se debían a interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Sin embargo, estudios detallados de relación estructura-actividad (SAR) sugirieron mecanismos mediados por receptor como los responsables de los efectos ejercidos por los cannabinoides (Seltzman, 1999).

Después del descubrimiento de los receptores cannabinoides se demostró la existencia de ligandos endógenos, denominados **endocannabinoides** (Devane y cols., 1992).

### 1.2.1. Receptores cannabinoides

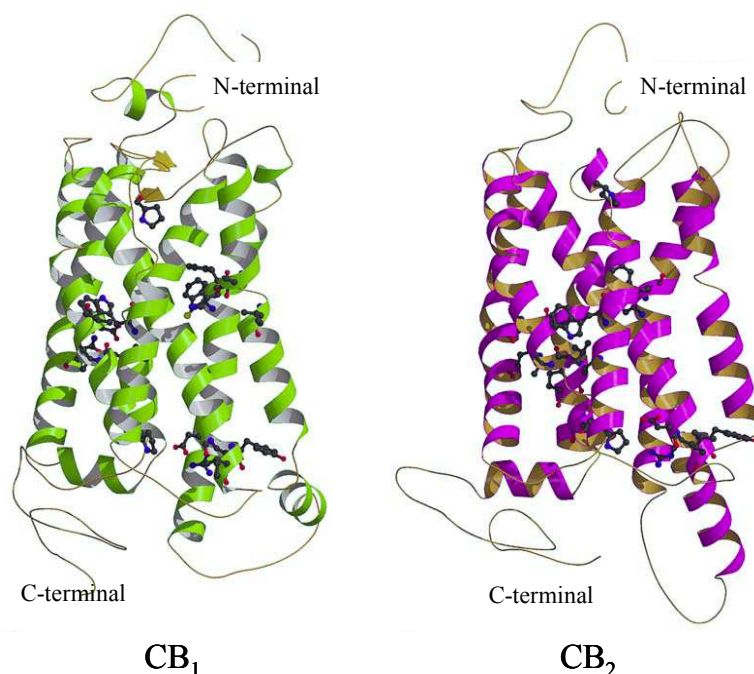
Los cannabinoides ejercen su efecto farmacológico mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta la fecha, se han clonado dos tipos de receptores cannabinoides, los **CB<sub>1</sub>** y los **CB<sub>2</sub>** (Figura 1). Estos receptores se diferencian principalmente en la secuencia de aminoácidos, en la distribución en los diferentes tejidos y en los mecanismos efectores acoplados a ellos.

El primer receptor caracterizado por métodos radiométricos fue el **receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>** (Devane y cols., 1988), cuya estructura molecular fue identificada posteriormente en diferentes especies animales (Matsuda y cols., 1990; Gerard y cols., 1991). Poco después de la caracterización molecular de los receptores CB<sub>1</sub>, Munro y colaboradores descubrieron la existencia de un segundo receptor para compuestos cannabinoides que se denominó **CB<sub>2</sub>** (Munro y cols., 1993).

Los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (G<sub>i/o</sub>) y se caracterizan por un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular y siete dominios transmembrana.

El receptor **CB<sub>1</sub>** es un polipéptido de 476 aminoácidos y media, entre otros, los efectos psicotrópicos de los cannabinoides (Ledent y cols., 1999). Este receptor se encuentra localizado principalmente en SNC donde su distribución es muy heterogénea (Herkenham y cols., 1991). El receptor **CB<sub>1</sub>** 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 (médula espinal y sustancia gris periacueductal) (Pertwee, 1997; Tsou y cols., 1998; Hampson y Deadwyler, 1999; Ong y Mackie, 1999).

Además de su localización en SNC, los receptores **CB<sub>1</sub>** también están presentes 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). Igualmente, los receptores **CB<sub>1</sub>** se hallan en terminaciones nerviosas centrales y periféricas (Pertwee, 1997; Tsou y cols., 1998; Ong y Makie, 1999).



**Figura 1.** Representación tridimensional de la estructura de los receptores cannabinoides **CB<sub>1</sub>** y **CB<sub>2</sub>**. Modificado de Montero y cols., 2005.

El **receptor CB<sub>2</sub>** es un polipéptido de 360 aminoácidos y media fundamentalmente los efectos inmunomoduladores atribuidos a los cannabinoides. A diferencia del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, se localiza principalmente a nivel periférico, y se ha descrito su localización en bazo, amígdalas y en diferentes células del sistema inmune como: leucocitos, células mieloides, macrófagos y monocitos (Galiègue y cols., 1995; Pertwee, 1997; 1998). Con posterioridad, se identificaron otras localizaciones de este receptor en tejidos que no pertenecían al sistema inmune, tales como corazón y células endoteliales (Joyeux y cols., 2002; Bouchard y cols., 2003; Zoratti y cols., 2003). No obstante, existen evidencias de la localización central de receptores cannabinoides CB<sub>2</sub>, concretamente, se ha descrito su presencia 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 humanos, los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> comparten aproximadamente un 44% de homología en su secuencia de aminoácidos, porcentaje que aumenta hasta el 68% cuando se comparan únicamente los segmentos transmembranales (Lutz, 2002).

Cuando se analizan los diferentes efectos producidos por los cannabinoides se observa que, algunos de ellos no son mediados en su totalidad por los receptores cannabinoides clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Por lo tanto, existen argumentos que indican la posible existencia de nuevas clases o subclases de receptores cannabinoides diferentes a los CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>.

Así, se han propuesto al menos dos posibles nuevos receptores cannabinoides: receptor “**CB<sub>2</sub>-like**” y “**No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>**”. Estos nuevos receptores podrían estar implicados en la modulación de la transmisión sináptica (Di Marzo y cols., 2000a; Breivogel y cols., 2001; Hoffman y cols., 2005), del sistema cardiovascular (Járai y cols., 1999; Offertáler y cols., 2003; Begg y cols., 2005) y del sistema inmune (Jaggat y cols., 1998).

El receptor “**CB<sub>2</sub>-like**” se ha propuesto como un nuevo receptor cannabinoide que tendría cierta homología con el receptor clásico CB<sub>2</sub>. Estudios llevados a cabo con la palmitoiletanolamida (PEA), aciletanolamida que no tiene afinidad por los receptores clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, muestran que los efectos antinociceptivos de ésta son bloqueados por un antagonista selectivo del receptor CB<sub>2</sub> (Calignano y cols., 1998). Otros grupos también respaldan la existencia del receptor “CB<sub>2</sub>-like” en tejidos periféricos como deferente de ratón (Griffin y cols., 1997).

El receptor “**No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>**” se ha propuesto como el responsable de ciertos efectos de los endocannabinoides en tejido neuronal, vascular e inmune. Dichos efectos sólo se inhiben parcialmente en presencia de altas concentraciones de antagonistas selectivos para el receptor CB<sub>1</sub> (Mackie y Stella, 2006). Además, resultados similares se han obtenido utilizando animales “knockout” para el receptor CB<sub>1</sub> (Járai y cols., 1999). Hasta el momento este receptor cannabinoide no ha sido clonado y sólo ha sido caracterizado funcionalmente (López-Miranda y cols., 2008).

Por otra parte, en los últimos años existen evidencias que demuestran que algunos ligandos cannabinoide clásicos son capaces de interactuar con otros tipos de receptores como el “transient receptor potential vanilloid 1” (**TRPV1**) y el “G protein-coupled receptor 55” (**GPR55**). La participación del receptor vanilloide **TRPV1** en la vasorrelajación ocasionada por algunos agonistas cannabinoide, como el Win 55,212-2, está ampliamente documentada (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). Para poder aceptar al **GPR55** como un nuevo miembro de los receptores cannabinoide es necesario la realización de diferentes ensayos que lo caractericen farmacológicamente de manera definitiva.

### 1.2.2. Mecanismos de transducción

Los mecanismos de transducción acoplados a los receptores cannabinoides son complejos y van a depender en muchas ocasiones del sistema estudiado. De manera general, la activación de los receptores cannabinoides ocasiona un cambio funcional en la estructura de las proteínas G inhibitorias ( $G_{i/o}$ ). A través de estas proteínas, los receptores cannabinoides están acoplados a diferentes sistemas efectores, y regulan la activación de **adenilato ciclasa (AC)**, **fosfolipasa C (PLC)**, **canales y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)**.

**La activación de los receptores  $CB_1$**  produce, a través de la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_{i/o}$ , inhibición de la **AC**. Ésto ocasiona un descenso de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y, por consiguiente, una disminución de la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de AMPc, como la proteína quinasa A (PKA). Como resultado final, se produce un aumento de la salida de potasio ( $K^+$ ) de la célula que ocasiona hiperpolarización de la misma, y disminución de la liberación de neurotransmisores de las terminaciones presinápticas (Pertwee, 1997; Howlett y cols., 2002).

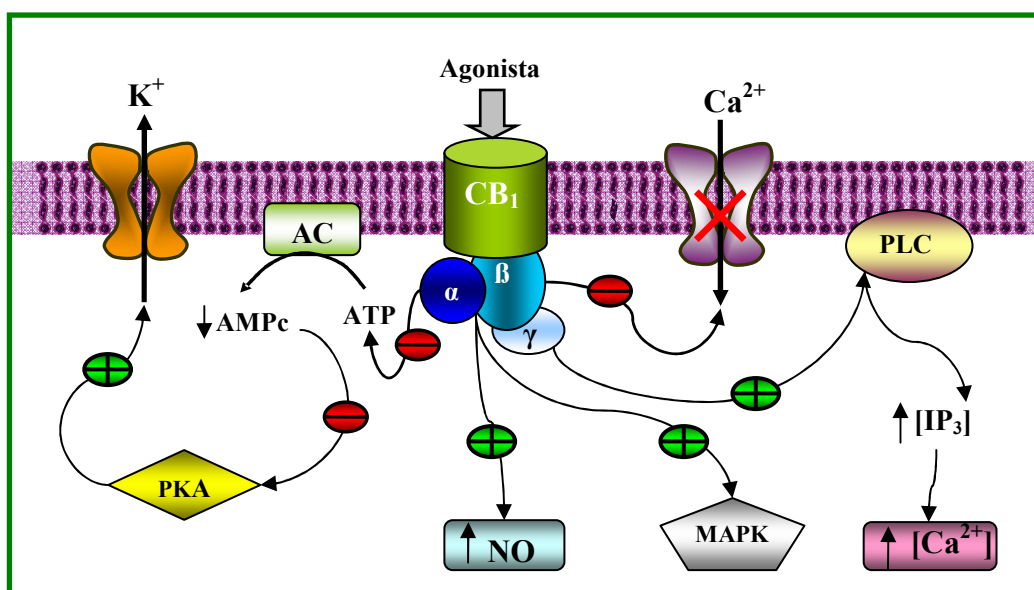
Los cannabinoides a través del receptor  $CB_1$  y de la proteína  $G_{i/o}$  también pueden regular a otros sistemas efectores como la **PLC**. Esta enzima, localizada en la membrana plasmática hidroliza al fosfatidil inositol produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ). Cuando el receptor  $CB_1$  es activado, se produce la activación de la PLC vía proteína  $G_{i/o}$ , ésto ocasiona un aumento de  $IP_3$  y a su vez ocasiona un incremento de la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular (Netzeband y cols., 1999; Howlett y Mukhopadhyay, 2000).

El receptor  $CB_1$  también puede estar acoplado a **canales de  $Ca^{2+}$**  dependientes de voltaje, como los del tipo N (Mackie y Hille, 1992) y del tipo P/Q (Twichell y cols., 1997). Estos canales son proteínas que cambian de conformación cuando se produce una variación en el potencial de membrana, permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular. El mecanismo de acción implica al dímero  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_{i/o}$  y es

independiente de la inhibición de la AC y del metabolismo del AMPc. El resultado es la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona, lo que origina en las neuronas presinápticas, donde estos canales son mayoritarios, disminución de la liberación de neurotransmisores. También se han obtenido datos que señalan que los cannabinoides pueden inhibir a otros tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , en concreto, a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L que se encuentran en la musculatura lisa arterial, esta inhibición ocasiona vasodilatación de las mismas (Howlett y Mukhopadhyay, 2000). De lo descrito anteriormente, se podría deducir que los cannabinoides producen un efecto dual sobre la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$ . Por un lado, aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por activación de la PLC, y por otro disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes. En ambos casos el efecto está mediado por el receptor  $\text{CB}_1$ , vía proteína  $\text{G}_{i/o}$ .

En diferentes tipos celulares se ha demostrado que los cannabinoides pueden actuar sobre la cascada de las **MAPK**. 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 Mollenan, 2006).

La activación del receptor cannabinoide  $\text{CB}_1$  también ocasiona aumento de la producción **de óxido nítrico (NO)**, principalmente a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Este mecanismo podría explicar el efecto vasodilatador atribuido a los cannabinoides (Fimiani y cols., 1999; Stefano, 2000). En la Figura 2 se muestra los principales mecanismos de transducción acoplados al receptor cannabinoide  $\text{CB}_1$ .

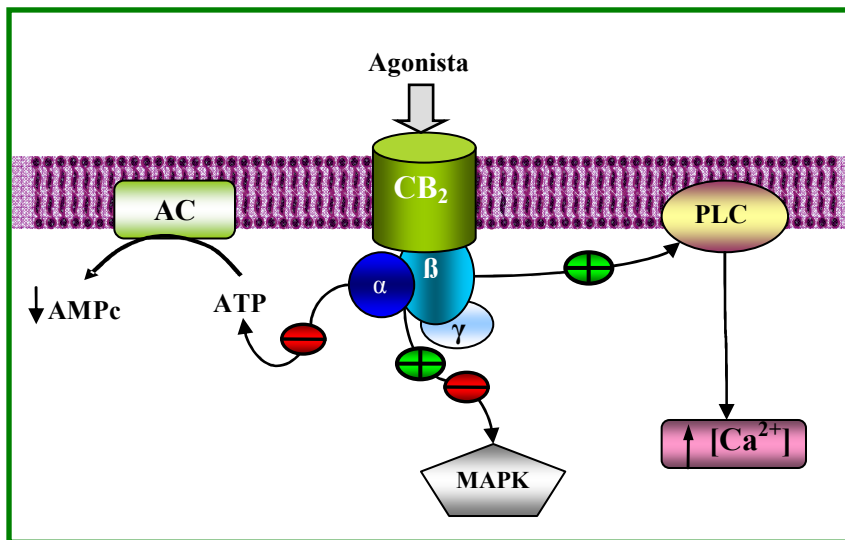


**Figura 2.** Esquema de los principales mecanismos de transducción acoplados a la estimulación del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. El estímulo de los receptores CB<sub>1</sub> por un agonista cannabinoide activa a la proteína G<sub>i/o</sub> y ocasiona la activación/inhibición de diferentes sistemas efectoros. Concretamente, se activa la enzima fosfolipasa C (PLC), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la producción de óxido nítrico (NO) mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Los sistemas efectoros que son inhibidos por activación del receptor CB<sub>1</sub> son la 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.

⊕ : activación    ⊖ : inhibición

**Los mecanismos de transducción acoplados al receptor cannabinoide CB<sub>2</sub>** están menos documentados que para el receptor CB<sub>1</sub>. De forma similar a CB<sub>1</sub>, el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> puede modular la actividad de AC y MAPK a través de las proteínas G<sub>i/o</sub> (Felder y cols., 1995; Kobayashi y cols., 2001), provocando disminución de la producción de AMPc, a través de la inhibición de AC y activación de la cascada de las MAPK. Esto, en parte, parece estar implicado en la regulación que ejercen los cannabinoides sobre el sistema inmune (Bouaboula y cols., 1996; Kaminski, 1996). Sin embargo, estudios recientes apuntan que ciertos agonistas cannabinoides al interactuar con el receptor CB<sub>2</sub> ocasionan inhibición de las MAPK, que conlleva a los cannabinoides a intervenir en procesos de inmunosupresión (Faubert Kaplan y Kaminski, 2003).

Por último mencionar que el receptor  $CB_2$  puede modular la **movilización de  $Ca^{2+}$**  intracelular de ciertos tipos de células, como las endoteliales (Zoratti y cols., 2003) a través de la activación de la **PLC**, pero a diferencia del receptor  $CB_1$ , el receptor  $CB_2$  no participa en la regulación de la funcionalidad de canales iónicos (Felder y cols., 1995). En la Figura 3 se muestra los principales mecanismos de transducción acoplados al receptor cannabinoide  $CB_2$ .



**Figura 3.** Esquema de los principales mecanismos de transducción acoplados a la estimulación del receptor cannabinoide  $CB_2$ . El estímulo de los receptores  $CB_2$  por un agonista cannabinoide activa a la proteína  $G_{i/o}$  y ocasiona la activación/inhibición de diferentes sistemas efectoros. Concretamente, se puede producir activación/inhibición de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y movilización de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular por activación de la enzima fosfolipasa (PLC). AMPc: adenosín monofosfato cíclico; ATP: Adenosín trifosfato.

⊕ : activación    ⊖ : inhibición

Respecto a los mecanismos de transducción acoplados a otros posibles receptores cannabinoide como “ $CB_2$ -like” y “No- $CB_1$ /No- $CB_2$ ” no existen trabajos o son poco concluyentes. Se ha propuesto que este último receptor estaría acoplado a proteína  $G_{i/o}$  de manera similar a los receptores cannabinoide clásicos. Cuando el receptor “No- $CB_1$ /No- $CB_2$ ” se activa, moviliza a la GC y aumenta la producción del GMPc, lo cual activa a su vez a la proteína quinasa G. Este proceso conlleva la



producción de NO (Mukhopadhyay y cols., 2002; Offertáler y cols., 2003; Begg y cols., 2005; McCollum y cols., 2007). Este mecanismo expuesto no es compartido por todos los autores (Ho y Hiley, 2003b; Offertáler y cols., 2003).

### 1.2.3. Cannabinoides endógenos

La identificación, caracterización farmacológica y localización de receptores específicos de membrana que mediaban los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides, hizo que se emprendiera la búsqueda de ligandos endógenos que activaran dichos receptores. Entre 1992 y 1995 se demostró la existencia de agonistas endógenos, que recibieron el nombre de **endocannabinoides**.

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). Entre los endocannabinoides identificados hasta el momento se encuentran: araquidoniletanolamida (**anandamida**) (Devane y cols., 1992), 2-araquidonilglicerol (**2-AG**) (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995), 2-araquidonilglicerol éter ( **noladín éter**) (Hanus y cols., 2001), O-araquidoniletanolamina (**virodamina**) (Porter y cols., 2002) y N-araquidonildopamina (**NADA**) (Huang y cols., 2002).

Los primeros dos endocannabinoides descubiertos fueron la anandamida y el 2-AG y, por lo tanto, son los más estudiados hasta el momento. La anandamida se aisló por primera vez en cerebro de cerdo en el año 1992 (Devane y cols., 1992), y tres años más tarde se aisló el 2-AG a partir de intestino de perro y cerebro de rata (Mechoulam y cols., 1995, Sugiura y cols., 1995).

La **anandamida** está formada por ácido araquidónico y etanolamina unidos por un enlace tipo amida (Figura 4). Se han detectado importantes niveles de este endocannabinoides en hipocampo, estriado y cerebelo, áreas del cerebro que corresponden con una mayor densidad de receptores CB<sub>1</sub> (Felder y cols., 1996; Bisogno y cols., 1999). También se ha detectado, pero en menor proporción, la presencia de

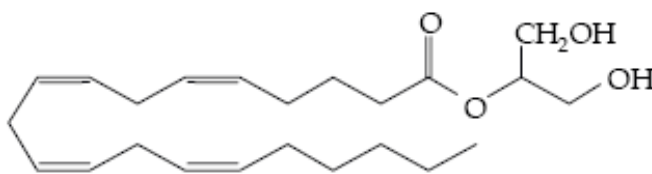
anandamida en tejidos periféricos como corazón, bazo, hígado y riñón, etc (Sugiura y cols., 2002).



**Figura 4.** Estructura química de la anandamida.

Este endocannabinoides es capaz de unirse a los dos receptores cannabinoides clásicos, CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Felder y cols., 1995). Con respecto al receptor CB<sub>1</sub>, la anandamida se comporta como un agonista puro o parcial, dependiendo del tejido y de la respuesta biológica estudiada (Pacher y cols., 2006). En cuanto al CB<sub>2</sub>, la anandamida es agonista de este receptor, pero se une a él con menor afinidad que al receptor CB<sub>1</sub> (Felder y Glass, 1998; Pertwee, 1999). La anandamida no sólo activa a los receptores cannabinoides clásicos, sino que también se une al receptor vanilloide TRPV1 de manera similar a la capsaicina (Zygmunt y cols., 1999).

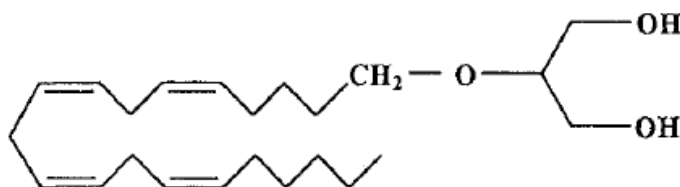
El **2-AG** está formado por ácido araquidónico y glicerol unidos por un enlace tipo éster (Figura 5). Inicialmente, el 2-AG fue detectado en intestino, bazo y páncreas, áreas donde predomina la expresión de receptores CB<sub>2</sub>, lo que hizo pensar que se trataba de un ligando periférico (Mechoulam y cols., 1995). Más tarde, este endocannabinoides se localizó en regiones del SNC como corteza, estriado, hipocampo, médula, etc (Bisogno y cols., 1999). Además, las concentraciones basales de 2-AG en el cerebro son aproximadamente dos veces superiores a los niveles de anandamida (Pacher y cols., 2006). También se ha localizado este endocannabinoides en otras localizaciones periféricas como corazón, hígado y riñón (Sugiura y cols., 2002).



**Figura 5.** Estructura química del 2-araquidonilglicerol (2-AG).

El **2-AG** tiene similar afinidad que la anandamida por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, pero a diferencia de ésta, se comporta como un agonista puro frente a los receptores CB<sub>2</sub> (Gonsiorek y cols., 2000; Pertwee y Ross, 2002).

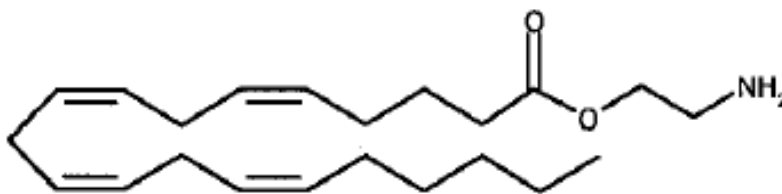
Posteriormente fue identificado un tercer endocannabinoide, el **noladín éter** (Figura 6). Su estructura química también deriva del ácido araquidónico y es metabólicamente más estable que la anandamida (Hanus y cols., 2001; Fezza y cols., 2002). Los estudios realizados por Hanus y colaboradores muestran que el noladín éter tiene una alta afinidad por los receptores CB<sub>1</sub>, y una baja afinidad por los receptores CB<sub>2</sub>, sin embargo, estudios posteriores indican que también puede considerarse un agonista puro de los receptores CB<sub>2</sub> (Shoemaker y cols., 2005). Respecto a la concentración de este endocannabinoide en cerebro también existe cierta controversia. Mientras que el grupo de Fezza demuestra niveles similares de noladín éter y anandamida en cerebro (Fezza y cols., 2002), otros estudios indican niveles bajos o casi indetectables (Oka y cols., 2003). No existen trabajos que valoren los niveles de este endocannabinoide en áreas periféricas.



**Figura 6.** Estructura química del noladín éter.

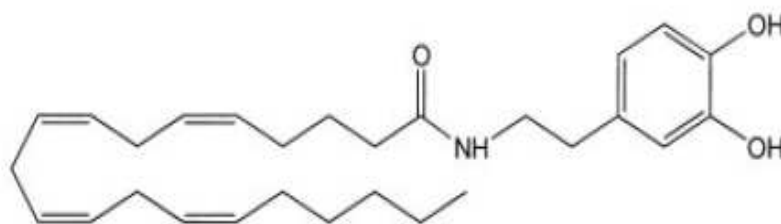
Los siguientes cannabinoides endógenos identificados fueron la **virodamina** (Porter y cols., 2002) (Figura 7) y el **NADA** (Huang, 2002) (Figura 8).

La **virodamina** está formada por ácido araquidónico y etanolamina unidos por un enlace tipo éster, lo que la diferencia de la estructura de la anandamida. Estudios “in vitro” sugieren que la virodamina se comporta como un agonista parcial/antagonista de los receptores CB<sub>1</sub>, y agonista puro de los receptores CB<sub>2</sub> (Porter y cols., 2002). Este cannabinoide endógeno se ha detectado tanto en SNC como en sistema periférico. La concentración de virodamina en las diferentes áreas del cerebro es similar a la descrita para la anandamida. En cambio, en sistema periférico, y especialmente en tejidos que expresan el receptor CB<sub>2</sub>, la concentración de virodamina es superior a la de anandamida (Porter y cols., 2002).



**Figura 7.** Estructura química de la virodamina.

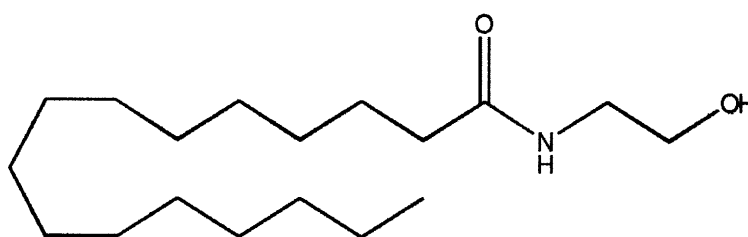
El endocannabinoide N-araquidonildopamina, **NADA**, pertenece a la familia de las N-acildopaminas aunque sin afinidad por los receptores de dopamina. Este endocannabinoide es el primer compuesto endógeno identificado en mamíferos que muestra una potencia y eficacia por el receptor TRPV1 similar a la capsaicina, además a altas dosis, es capaz de activar los receptores CB<sub>1</sub>. El NADA predomina principalmente en dos regiones del cerebro: estriado e hipocampo (Huang y cols., 2002).



**Figura 8.** Estructura química del N-araquidoldopamina (NADA).

Previamente al descubrimiento de la anandamida, ya se disponía de información sobre la existencia de otras aciletanolamidas presentes en animales superiores. Hoy en día, se pueden destacar otros miembros de esta familia relacionados con el sistema endocannabinoide, como la **PEA** (Figura 9) y la **oleamida**.

En diferentes trabajos, la **PEA** 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). A la espera de nuevos estudios, la PEA podría ser un nuevo endocannabinoide que actuaría a través de un nuevo receptor cannabinoide diferente a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Mackie y Stella, 2006).



**Figura 9.** Estructura química de la palmitoiletanolamida (PEA).

En cuanto a la **oleamida**, existe controversia sobre si esta aciletanolamida es un nuevo endocannabinoide o no. De momento, se sabe que la oleamida presenta propiedades cannabimiméticas, a pesar de mostrar una baja afinidad por los receptores cannabinoide clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Lambert y Di Marzo, 1999).

### 1.2.4. Síntesis, liberación y degradación de cannabinoides endógenos

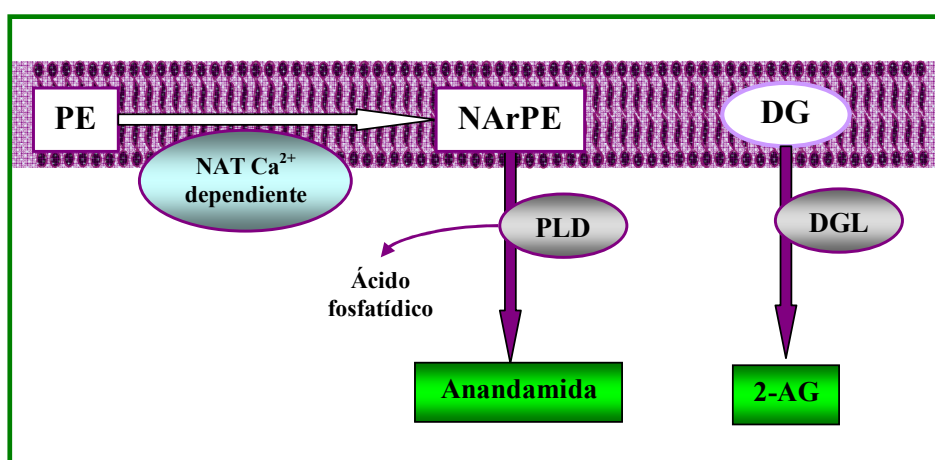
Los endocannabinoides cumplen las condiciones de todo neurotransmisor: son sintetizados y liberados a partir de diferentes tipos celulares, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y, finalmente, son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. Únicamente a diferencia de lo que ocurre en el caso de otros neurotransmisores y, dada la naturaleza lipofílica de éstos compuestos, los endocannabinoides no son almacenados sino que se sintetizan a demanda a partir de precursores lipídicos presentes en la membrana celular.

Los procesos por los que se sintetizan, liberan y degradan la anandamida y el 2-AG son los más estudiados hasta el momento, y serán los que se describan en los siguientes apartados. En cuanto a los demás endocannabinoides descritos, no existen estudios suficientes que aclaren los diferentes mecanismos implicados en la síntesis, liberación y degradación de los mismos (Bisogno y cols., 2005).

#### ■ Síntesis

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula constituye la señal que provoca la síntesis y liberación de **anandamida** y de otras N-aciletanolamidas (NAEs). Dicha síntesis se produce mediante la hidrólisis de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, denominado N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NArPE). Este precursor, a su vez, se forma a partir de la fosfatidiletanolamina por acción de una N-aciltransferasa (NAT) dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . NArPE sirve como depósito de almacenaje para los diferentes NAEs que se sintetizan y liberan en función de los requerimientos celulares. La hidrólisis de la NArPE se produce por acción de la enzima fosfolipasa D que libera ácido fosfatídico y los correspondientes tipos de N-aciletanolamidas, una de las cuales es la anandamida (Di Marzo y col., 1994). Por lo tanto, el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular promueve la síntesis y liberación del endocannabinoide (Figura 10).

La síntesis del **2-AG**, en la mayoría de los casos, se activa también por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula, vía canales  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. La ruta más probable de síntesis del 2-AG implica la actuación de una diacilglicerol lipasa (DGL) selectiva que actúa sobre el diacilglicerol, liberando la molécula del endocannabinoide (Bisogno y cols., 2005). Por otra parte, también se ha descrito que distintos estímulos, como la síntesis de trombina en las plaquetas y/o la liberación de endotelina, ocasionan la formación de éste endocannabinoide en diferentes tipos celulares (Stella y cols., 1997; Walter y cols., 2003).



**Figura 10.** Esquema de la síntesis de anandamida y 2-araquidonilglicerol (2-AG). La síntesis de anandamida se produce a partir de fosfatidiletanolamina (PE) mediante la actuación de las enzimas N-aciltransferasa (NAT) y fosfolipasa D (PLD). La síntesis de 2-AG se produce a partir de diacilglicerol (DG) mediante la actuación de la enzima diacilglicerol lipasa (DGL).  $\text{Ca}^{2+}$ : calcio; NArPE: N-araquidonilfosfatidiletanolamina.

## ■ Liberación y degradación

Como ya se ha comentado anteriormente, tanto la síntesis como la liberación de los cannabinoides endógenos se produce a demanda, aunque no se descarta la existencia de un tono basal de liberación de endocannabinoides que mantenga niveles constantes de éstos en diferentes tejidos (Pertwee, 1999).

Distintos trabajos consideran que la **liberación de anandamida** se produce por un mecanismo de difusión facilitada bidireccional a favor de gradiente (Hillard y cols., 1997). Una vez liberado el endocannabinoide, la acción de éste está limitada por dos procesos que incluyen: su recaptación al interior de la célula, y su posterior degradación enzimática. Estos procesos ejercen un control sobre los niveles de endocannabinoides presentes en los tejidos, eliminándolos rápidamente tras su acción (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005).

Hoy en día, existen numerosos trabajos que indican que la **recaptación de la anandamida** al interior celular se realiza por medio de un **transportador**. El transportador cumple las propiedades características del transporte facilitado: saturable, competitivo, dependiente de la temperatura e independiente de iones sodio y de adenosín trifosfato (ATP) (Di Marzo y cols., 1994; Hillard y cols., 1997). La presencia de este transportador se ha descrito en neuronas, células gliales y células endoteliales (Beltramo y cols., 1997; Maccarrone y cols., 2000). Sin embargo, esta teoría no puede considerarse válida hasta que no se consiga caracterizar molecularmente esta proteína transportadora.

Por otra parte, diferentes autores siguen manteniendo que, por su elevada liposolubilidad, la anandamida no precisa de un transportador para atravesar la membrana celular, y podría **difundir** a través de ella, como lo hacen los ácidos grasos de cadena larga. Estos autores consideran que la degradación de la anandamida en el interior celular podría ser suficiente para establecer un gradiente químico, que facilitara la difusión de este compuesto desde el espacio extracelular (Glaser y cols., 2003).

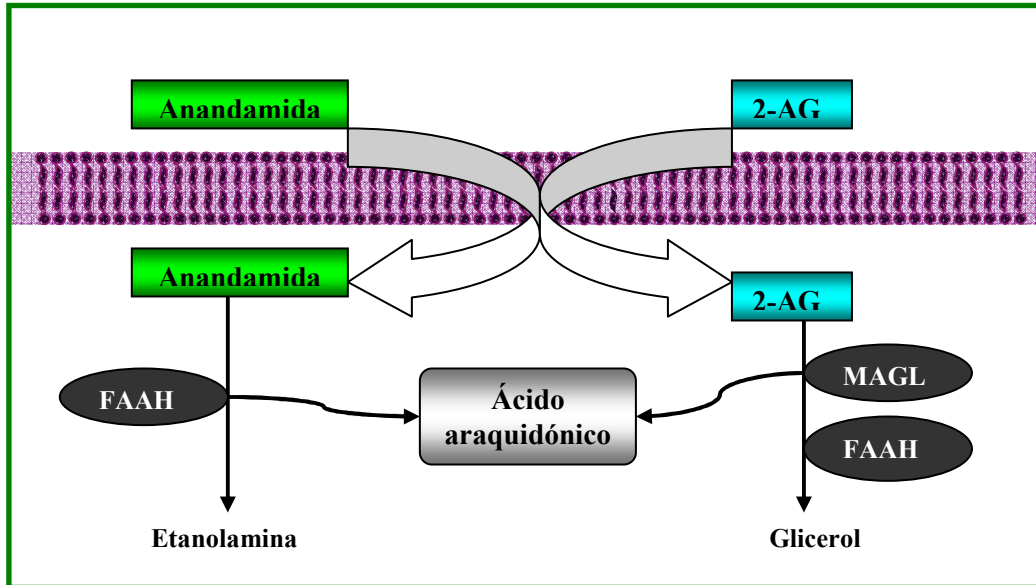
Una vez en el interior celular, la anandamida **es metabolizada por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH)**. Esta enzima hidroliza el enlace amida de la anandamida dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina, ocasionando la inactivación del endocannabinoide (Figura 11). Los productos de degradación son reincorporados a los fosfolípidos de la membrana celular.



La FAAH es una enzima integral de membrana que ha sido purificada, clonada y secuenciada en distintas especies como rata, ratón, cerdo y humanos (Cravatt y cols., 1996; Giang y Cravatt, 1997). El patrón de distribución tisular de la FAAH difiere en función de la especie considerada. Además, la presencia de FAAH es paralela a la del receptor CB<sub>1</sub>, lo que apoya el hecho de que ambas proteínas formen parte del mismo sistema endógeno (Ueda y cols., 2000). También se ha puesto de manifiesto el posible acoplamiento entre la activación de la FAAH y el funcionamiento del transportador (Maccarrone y cols., 1998).

En cuanto al **2-AG**, hasta el momento no está claro el proceso de recaptación del mismo. Algunos autores describen que tras su **liberación**, el 2-AG puede ser **recaptado** por el transportador de anandamida (Piomelli y cols., 1999), en cambio, otros sugieren que el 2-AG es recaptado por un transportador similar pero específico para este endocannabinoide (Hájos y cols., 2004).

Está documentado que la **degradación** del 2-AG en el interior celular puede ser realizada por, al menos, dos tipos de enzimas. La principal vía de degradación del 2-AG es mediante la actuación de una **monoacilglicerol lipasa (MAGL)**, que convierte este endocannabinoide en ácido araquidónico y glicerol (Goparaju y cols., 1999). Por otro lado, la **FAAH** exhibe también actividad esterasa, por lo que puede degradar el enlace éster del 2-AG, inactivándolo (Ueda, 2002) (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de las principales vías de degradación de anandamida y 2-araquidonilglicerol (2-AG). La anandamida se metaboliza por la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) en ácido araquidónico y etanolamina. El 2-AG se metaboliza por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) y por la FAAH en ácido araquidónico y glicerol.

Existen estudios que demuestran la existencia de **vías alternativas de degradación de la anandamida y el 2-AG**. Estos endocannabinoides pueden ser oxigenados directamente por la enzima ciclooxigenasa 2 (**COX-2**) y por la 12/15 lipooxigenasas (**LOX**) (Pertwee y Ross, 2002).

Diferentes trabajos han demostrado que la anandamida puede ser sustrato de la COX-2, transformándose en prostaglandina E<sub>2</sub>-etanolamida, también denominada prostamida E<sub>2</sub>. Este metabolito se une con diferente potencia a los receptores para prostaglandinas E<sub>2</sub>, EP (Ross y cols., 2002). Cuando la anandamida se degrada a través de las LOX produce 12 /15-(S) hidroxí-eicosatetraenoiletanolamida y, algunos trabajos demuestran que éstos metabolitos podrían activar a los receptores vanilloides (Pertwee y Ross, 2002).

La COX-2 metaboliza al endocannabinoide 2-AG tan efectivamente como al ácido araquidónico, lo que demuestra la capacidad innata de esta enzima por dicho sustrato. Además, dicha metabolización da lugar a la formación de compuestos derivados de las prostaglandinas (Kozak y cols., 2000). Las LOX tienen la capacidad de

metabolizar al 2-AG, pero de manera menos efectiva que la COX-2. En concreto, está demostrado que el 2-AG es metabolizado por diferentes LOX, como la 12 y 15-LOX, dando lugar a metabolitos que se comportan como ligandos de receptores nucleares (Moody y cols., 2001; Kozak y cols., 2002).

La importancia fisiológica del metabolismo de anandamida, 2-AG y de los productos resultantes del mismo aún no ha sido establecida con claridad. Con los datos disponibles hasta el momento se puede pensar que dicho metabolismo, vía COX-2 o vía LOX, podría jugar un papel regulador en el sistema cannabinoide endógeno por disminución de los niveles de anandamida o 2-AG endógenos.

### **1.3. LIGANDOS CANNABINOIDES**

Los ligandos cannabinoides son sustancias con estructuras químicas muy variadas, donde se incluyen compuestos naturales y análogos sintéticos. Los diferentes compuestos cannabinoides se clasifican en: agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides e inhibidores del sistema de recaptación y degradación de los endocannabinoides.

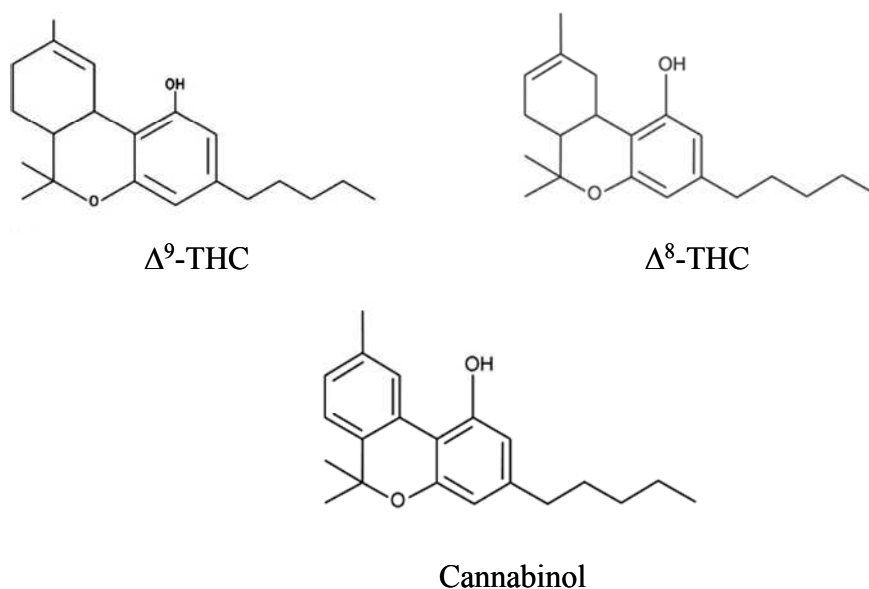
#### **1.3.1. Agonistas cannabinoides**

Existe una amplia variedad de moléculas que se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides, es decir, activadores de las respuestas mediadas por éstos. Los agonistas cannabinoides se pueden clasificar en función de su estructura química en cuatro grupos de compuestos:

##### **■ Clásicos**

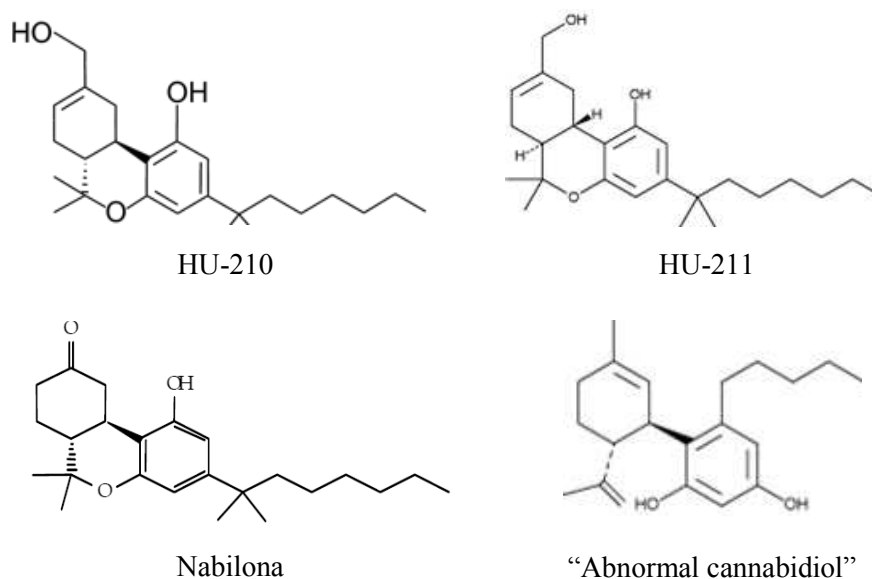
Son compuestos con estructura de dibenzopirano. Pertenecen a este grupo tanto compuestos cannabinoides naturales procedentes de la planta *Cannabis sativa*, como análogos sintéticos de éstos.

Los compuestos **cannabinoides naturales** más destacados que actúan como agonistas son el  $\Delta^9$ -**THC** (cannabinoide con mayor poder psicoactivo) (Figura 12), el  $\Delta^8$ -**THC** (posee aproximadamente el 80% de la actividad del  $\Delta^9$ -THC) (Figura 12) y el **cannabinol** (con poco poder psicoactivo) (Figura 12).



**Figura 12.** Estructura química de agonistas cannabinoides clásicos naturales.

Como **análogos sintéticos** de los compuestos naturales y con perfil agonista podemos destacar el trans-11-hidroxi- $\Delta^8$ -THC-dimetilheptilo (**HU-210**) (Figura 13), cis-11-hidroxi-  $\Delta^8$ -THC -dimetilheptilo (**HU-211**) (Figura 13), **nabilona** (Figura 13) y el trans-4- [3- metil-6- (1-metileténil)-2- ciclohexen-1-il]- 5-pentil-1,3-bencenodiol (“**abnormal cannabidiol**”) (Figura 13). El HU-210 y el HU-211 son dos compuestos derivados del  $\Delta^8$ -THC, y difieren únicamente en su configuración enantiómera (Mechoulam y cols., 1988). La nabilona es un quetocannabinoide y el único análogo sintético clásico del  $\Delta^9$ -THC que está comercializado con el nombre de Cesamet®. El “abnormal cannabidiol” es un análogo sintético del cannabinoide natural cannabidiol, que se comporta como agonista del posible receptor cannabinoide “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” (Járai y cols., 1999).



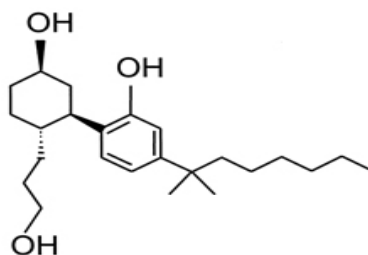
**Figura 13.** Estructura química de agonistas cannabinoides clásicos análogos sintéticos.

### ■ No Clásicos

Son compuestos análogos del  $\Delta^9$ -THC que carecen del anillo pirano. Fueron desarrollados para mantener o mejorar la actividad de los cannabinoides clásicos simplificando su estructura (Palmer y cols., 2002). Se subdividen en compuestos análogos **bicíclicos** y **tricíclicos**.

#### Bicíclicos

El principal representante de este grupo es el (-)-cis-3-[2-hidroxil-4-(1,1-dimetilheptil) fenil]-trans-4-(3-hidroxipropil) ciclohexano ((-)**CP55,940**) (Figura 14), que representa uno de los principales agonistas cannabinoides de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Este compuesto se ha convertido en un agonista estándar utilizado en análisis de afinidad a receptores cannabinoides.



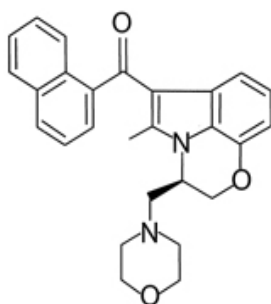
**Figura 14.** Estructura química del agonista cannabinoide (-)CP55,940.

### Tricíclicos

Los representantes más relevantes de este grupo son el **levonantradol** y el 4-[4-(1,1-dimetilheptil)-2-hidroxifenil]perhidro-2 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dihidroxinaftaleno (**CP55,244**).

### ■ Aminoalquilindoles

El principal representante es el (R)-(+)-[dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrol[1,2,3-de]-1,4-benzosazin-6-il]-1-naftalenilmetanona (**Win 55,212-2**) (Figura 15). La estructura de este cannabinoide es una modificación del analgésico conocido como pravadolina. El Win 55,212-2 es un agonista mixto, aunque posee una afinidad ligeramente superior por el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> (Felder y Glass, 1998).

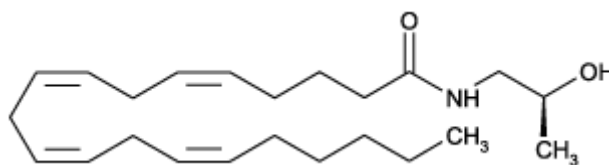


**Figura 15.** Estructura química del agonista cannabinoide Win 55,212-2.

## ■ Eicosanoides

Son una serie de compuestos, estructuralmente derivados del ácido araquidónico, cuyo principal representante es la araquidoniletanolamida (**anandamida**) (Figura 4), considerado el ligando endógeno cannabinoide por excelencia. Además de la anandamida, otros compuestos endógenos pertenecientes a este grupo son el **2-AG** (Figura 5) y la **PEA** (Figura 9).

En este grupo también se incluyen derivados sintéticos más estables a la hidrólisis enzimática que los cannabinoides endógenos. El más representativo es la (R)(+)araquidonil-1hidroxi-2'-propilamida (**metanandamida**) (Figura 16). La metanandamida posee mayor resistencia a ser catabolizada y mayor afinidad por los receptores CB<sub>1</sub> que otros cannabinoides naturales.



**Figura 16.** Estructura química del agonista cannabinoide metanandamida.

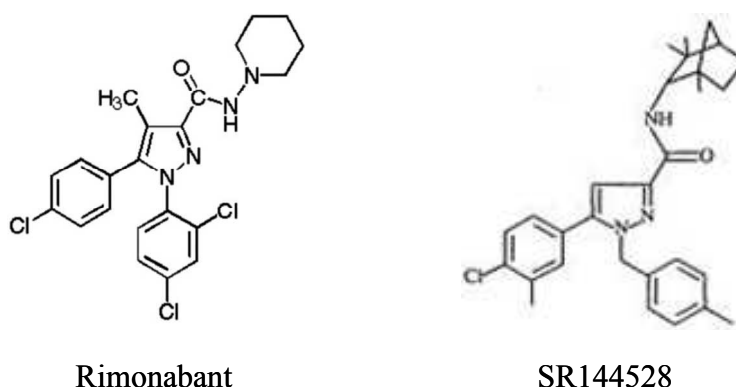
### 1.3.2. Antagonistas cannabinoides

Además de los agonistas sintéticos, se han desarrollado otros ligandos que pueden actuar como antagonistas y/o agonistas inversos de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Según su estructura química se dividen en:

#### ■ Diarilpirazoles

Los principales representantes son el N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (**rimonabant**) (Figura 17) y el N-(1,S)-endo-1,3,3-trimetilbicyclo (2,2,1) heptan-2-il)-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-(4-metilbencil)-pirazol-3-carboxamida (**SR144528**) (Figura 17).

El **rimonabant** es la molécula más potente y más ampliamente estudiada como antagonista selectivo de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> (Rinaldi-Carmona y cols., 1994). A partir de la estructura del rimonabant se han desarrollado nuevas moléculas como el N-(piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (**AM251**) y el 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-4-morfolinil-1H-pirazol-3-carboxamida (**AM281**) que también antagonizan selectivamente a los receptores CB<sub>1</sub> (Gatley y cols., 1996; Lan y cols., 1999).



**Figura 17.** Estructura química de antagonistas cannabinoides.

El **SR144528** es la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo del receptor CB<sub>2</sub> (Rinaldi-Carmona y cols., 1998). Tanto el rimonabant como el SR144528 pueden comportarse como agonistas inversos cuando se administran en ausencia de agonistas (Bouaboula y cols., 1999; Rhee y Kim, 2002).

## ■ Otros

En este apartado se han englobado todos aquellos antagonistas cannabinoides que no presentan una estructura diarilpirazol. A este grupo pertenecen los siguientes compuestos:

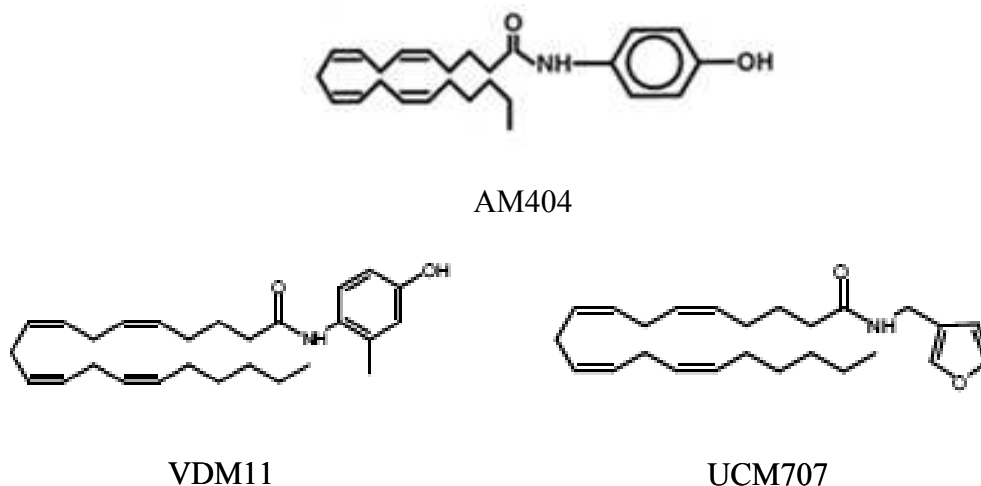


- **LY320135** (4- [6-metoxi-2- (4-metoxifenil)-1- benzofurano-3 carbonil] benzonitrilo) es un antagonista competitivo de los receptores CB<sub>1</sub> (Felder y cols., 1998).
- **AM630** (6-iodo-2-metil-1-[2- (4morfolinil)etil]-1H-indol-3-il] (4-metoxifenil) metadona), antagonista selectivo del receptor CB<sub>2</sub> (Hosohata y cols., 1997).
- **Cannabidiol** (2-[(1R, 6R)-3-metil-6-(1-metiletetil)-2-ciclohexen-1-il]-5-pentil-1,3-bencenodiol) es un fitocannabinoide que se comporta como antagonista del receptor cannabinoide “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>”, además posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Hampson y cols., 1998; Járαι y cols., 1999).
- **O1918** ((-)-1,3-dimetoxi-2-(3-3,4-trans-p-mentadieno-(1,8)-il)-orcinol), es un compuesto derivado del “abnormal cannabidiol”, que se comporta como antagonista del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” (Offertáler y cols., 2003).

### 1.3.3. Inhibidores de la recaptación

La existencia de un transportador de anandamida fue sugerida, por primera vez, en 1994 (Di Marzo y cols., 1994), aunque no fue hasta 1997 cuando se obtuvieron las primeras evidencias experimentales acerca de su presencia (Beltramo y cols., 1997).

Entre la amplia variedad de compuestos disponibles que actúan inhibiendo el transportador para anandamida podemos destacar: N-(4-hidroxifenil) araquidoniletanolamida (**AM404**) (Figura 18), N-araquidonil-(2-metil-4hidroxifenil) amina (**VDM11**) (Figura 18) y N-(3-furilmetil)eicosa-5,8, 11, 14-tetraenamida (**UCM707**) (Figura 18).



**Figura 18.** Estructura química de inhibidores del transportador de anandamida.

El **AM404** fue el primer inhibidor del transportador descrito. Este compuesto muestra una gran potencia para inhibir la recaptación de anandamida, pero al mismo tiempo es relativamente poco selectivo. Así, se ha demostrado que es capaz de activar a los receptores vanilloides TRPV1 en preparaciones arteriales (Zygmunt y cols., 2000). El **VDM11** y el **UCM707** son potentes inhibidores del transportador de anandamida, y además exhiben una elevada selectividad porque ambos compuestos carecen de afinidad por el receptor vanilloide TRPV1 y por los receptores cannabinoides (De Petrocellis y cols., 2000; López-Rodríguez y cols., 2001).

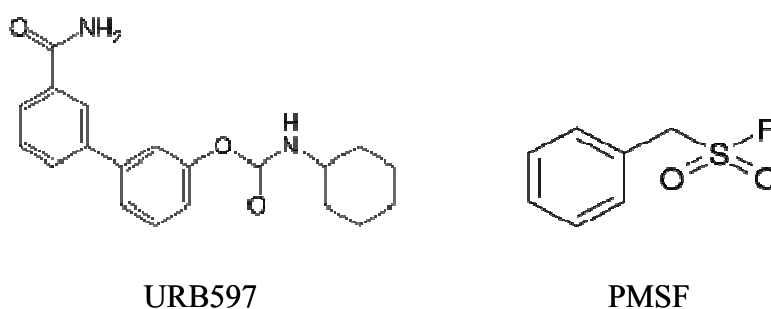
### 1.3.4. Inhibidores de la degradación

Como ya se ha descrito anteriormente, 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.

**Los inhibidores reversibles de la FAAH** se clasifican en trifluorometilcetonas,  $\alpha$ -cetoésteres y  $\alpha$ -cetoamidas. La mayoría de los compuestos pertenecientes a estos grupos no son selectivos de la FAAH, y pueden inhibir a otras enzimas e incluso al receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> (Deutsch y cols., 1997c; Bisogno y cols., 2005).

Más recientemente se ha identificado una nueva familia de inhibidores reversibles de la FAAH con estructura química de carbamatos. El miembro más destacado de esta familia es el N-ciclohexilcarbamato (**URB597**) (Figura 19). Este compuesto se caracteriza por ser un potente y selectivo inhibidor de la FAAH, que no muestra afinidad por los receptores cannabinoides, ni por el transportador de anandamida, ni por la MAGL (Tarzia y cols., 2003).

En cuanto a **los inhibidores irreversibles**, los más destacados son los fluoruros de sulfonilo. A este grupo pertenece el inhibidor inespecífico fluoruro de fenilmetilsulfonilo (**PMSF**) (Figura 19), y otros compuestos como el fluoruro de palmitilsulfonilo (**AM374**) y el fluoruro de estearilsulfonilo (**AM381**). Estos dos últimos compuestos, revisten un mayor interés debido a que muestran mayor potencia para inhibir la FAAH, además de ser altamente específicos y selectivos (Deutsch y cols., 1997b).



**Figura 19.** Estructura química de inhibidores de la FAAH.

## 1.4. EFECTOS FISIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LOS CANNABINOIDES

Los efectos que ocasiona el cannabis en el hombre se conocen desde la antigüedad. La primera referencia documentada sobre las aplicaciones médicas del *Cannabis sativa* fue en el libro titulado “Nei Ching” (2600 a.C.). Posteriormente, el uso de esta planta con fines terapéuticos se fue extendiendo desde China a otros países.

Hoy en día se atribuyen a los cannabinoides una larga lista de efectos fisiológicos, tanto en SNC como periférico. La caracterización, cada vez más exhaustiva, de dichas acciones está abriendo la posibilidad de desarrollar compuestos farmacológicamente activos sobre los receptores cannabinoides que pueden ser útiles en el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, todavía queda un largo camino por recorrer para llegar a conocer con profundidad dichos efectos, así como, los mecanismos implicados en los mismos.

La mayoría de las acciones fisiológicas de los cannabinoides son ocasionadas en SNC y parecen depender de la activación del receptor CB<sub>1</sub>, aunque tampoco se descarta que algunos de estos efectos centrales de los cannabinoides puedan estar mediados total o parcialmente por receptores CB<sub>2</sub>. Por otra parte, la contribución del receptor CB<sub>2</sub> es fundamental en los efectos mediados por los compuestos cannabinoides en sistema periférico.

En este apartado se describirán los principales efectos fisiológicos de los cannabinoides, exceptuando los efectos vasculares. **Los efectos en vasos se detallarán en profundidad en el apartado 3 de la Introducción, debido al interés que suponen para esta Tesis Doctoral.**

### 1.4.1. Efectos en sistema nervioso central

#### ■ Comportamentales y psicológicos

Los efectos comportamentales ocasionados por la administración de cannabinoides en diferentes especies animales dependen tanto del tipo de administración (crónica o aguda) como de la dosis administrada.

La administración de cannabinoides de manera aguda y a dosis bajas produce una combinación de efectos sedantes y estimulantes. Está descrito, en ratones y en otras especies animales, el efecto conocido como “palomita de maíz”. Tras la administración del cannabinoide, los animales presentan un estado de sedación/catalepsia hasta que un estímulo ocasiona que uno de ellos salte y, éste a su vez, al caer produce que otro animal también salte. Este estado de excitación sigue hasta que los animales vuelven a un estado de calma. Sin embargo, a dosis altas del cannabinoide predominan los efectos sedantes. La administración crónica de cannabinoides ocasiona fundamentalmente letargo, sedación y depresión en diferentes especies animales que se podría correlacionar con el conocido “síndrome amotivacional”. También está documentado que tras administraciones crónicas de cannabinoides, tanto psicoactivos como no, se producen déficits de memoria y aprendizaje en ratas. El deterioro ocasionado persiste tras la suspensión del tratamiento, pero pasado un tiempo se recupera la actividad normal. Parece ser que los cannabinoides al activar al receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, ocasionan inhibición de la liberación de acetilcolina y glutamato en diferentes regiones del cerebro interfiriendo así en procesos de memoria y aprendizaje (Di Marzo y cols., 1998; Lichtman y Martín, 1996; Mallet y Beninger, 1998).

Los efectos del consumo de cannabis en humanos son complejos, variables y dependen de la dosis, la vía de administración, vulnerabilidad del consumidor, etc. Según Pérez-Reyes los efectos psicológicos del  $\Delta^9$ -THC en humanos se pueden clasificar en cuatro grupos: afectivos (euforia e hilaridad), sensoriales (aumento de las percepciones), somáticos (sensación de flotar) y cognitivos (distorsión de la percepción del tiempo, pérdida de memoria, dificultad en la concentración) (Grotenhermen, 2003).

Cuando la administración del  $\Delta^9$ -THC se realiza de manera aguda y a dosis bajas o medias (2 a 20 mg aproximadamente), los principales efectos relatados son los relacionados con un aumento de la percepción sensorial, sensación de bienestar, euforia, etc. A dosis más altas, y de manera similar a lo descrito en animales, se ocasiona sedación. Los efectos no deseados surgen a dosis superiores a 20 mg y las respuestas más frecuentes consisten en episodios de ansiedad, pánico, delirios o alucinaciones, entre otras (Leweke, 2003).

Los efectos ocasionados por el consumo de cannabis de manera regular y prolongada en humanos no están claros. Sin embargo, las pocas evidencias que existen apuntan a la aparición de ligeros deterioros de la memoria y de la atención (Solowij y Grenyer, 2003). Se desconoce si estos deterioros cognitivos son reversibles tras el cese del consumo de cannabis. El consumo crónico de cannabis también se ha asociado a un aumento de la incidencia de ciertas enfermedades mentales como depresión, ansiedad y esquizofrenia. Pero, queda por determinar si el cannabis es el causante o el precipitante de dichas patologías.

## ■ Motores

En los últimos años se ha demostrado la participación del sistema cannabinoide en el control de la función motora, así como, su implicación en diferentes desórdenes motores (Pacher y cols., 2006). Esto abre las puertas a nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades como Parkinson, enfermedad de Huntington, etc (Glass y cols., 2000; Lastres-Becker y cols., 2001).

En condiciones no patológicas, está demostrada una alta población de receptores  $CB_1$ , así como elevadas concentraciones de los endocannabinoides anandamida y 2-AG en ganglios basales, cerebelo y regiones del cerebro relacionadas con el control del movimiento (Di Marzo y cols., 2000b; Howlett y cols., 2002). Además, la administración de cannabinoides en animales de experimentación provoca efectos

inhibitorios a nivel motor y, por el contrario, los antagonistas ocasionan aumento de la función motora (Fernández-Ruiz y cols., 2002).

En condiciones patológicas, parecen existir importantes modificaciones de los receptores CB<sub>1</sub> en los ganglios basales, tanto en estudios realizados en modelos animales como en tejido postmortem de pacientes con enfermedad de Parkinson y Huntington (Glass y cols., 2000; Lastres-Becker y cols., 2001; Fernández-Ruiz y cols., 2002). En concreto, en la enfermedad de Parkinson se ha demostrado que existe un aumento en la actividad del sistema endocannabinoide, aumentan tanto los niveles de endocannabinoides como la expresión de receptores CB<sub>1</sub> (Romero y cols., 2000; Lastres-Becker y cols., 2001). En cambio, en la enfermedad de Huntington está demostrado que existe una disminución de los niveles de receptores CB<sub>1</sub> incluso en fases presintomáticas de la enfermedad (Glass y cols., 2000; Page y cols., 2000). A la espera de nuevos resultados, todo parece indicar que el sistema endocannabinoide está involucrado en la patogénesis y/o progresión de ambas enfermedades. Es necesario ampliar los conocimientos sobre el sistema cannabinoide en este campo, para determinar cuál sería la mejor estrategia farmacológica para mejorar o retrasar la evolución de estas enfermedades y de otros trastornos motores.

### ■ Neuroprotectores

El sistema endocannabinoide podría jugar un importante papel neuroprotector en situaciones de daño neuronal agudo, como por ejemplo, en lesiones cerebrales debidas a accidentes isquémicos, traumatismos craneales, epilepsia y en trastornos neurodegenerativos crónicos, como esclerosis lateral amitrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, etc (Glass, 2001; Baker y Pryce, 2003; Jackson y cols., 2005; Ramos y cols., 2005).

En procesos neurodegenerativos agudos y crónicos se produce una liberación masiva de aminoácidos excitatorios, como el glutamato, que al interactuar con diferentes receptores como el N-metil-D-aspartato (NMDA) produce un aumento rápido y masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas, lo que ocasiona la despolarización de la membrana neuronal y mitocondrial, y provoca un deterioro funcional o muerte neuronal (Berger y Garnier, 2000). En estas condiciones, los endocannabinoides se liberan como respuesta al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activando los receptores  $\text{CB}_1$  presinápticos, lo cual ocasiona a su vez una disminución de la liberación de glutamato y por lo tanto disminución del daño neuronal (Freund y cols., 2003; Piomelli, 2003). Además, el aumento de endocannabinoides en las neuronas, debido al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, podría desempeñar un papel neuroprotector por otros mecanismos. Así, algunos autores demuestran que el mecanismo protector podría deberse a la activación de vías de señalización citoprotectivas o a la producción de factores neuroprotectores (Gómez del Pulgar y cols., 2002; Molina-Holgado y cols., 2002; Khaspekov y cols., 2004).

Cuando se desencadenan procesos neurodegenerativos agudos y graves también se produce la liberación de otras moléculas, que de la misma manera que el glutamato llevan a la muerte neuronal. La síntesis masiva de NO en neuronas y glía, y la producción de citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ocasionan muerte neuronal (Allan y Rothwell, 2001; Vexler y Ferriero, 2001). Los cannabinoides son potentes inhibidores de la producción de NO y de TNF- $\alpha$  en estos procesos (Faraci y Brian, 1994; Molina-Holgado y cols., 1997).

Otro de los mecanismos neuroprotectores atribuidos a los cannabinoides es la capacidad de reducir la temperatura corporal, dicho efecto parece estar mediado por los receptores cannabinoides  $\text{CB}_1$  (Leker y cols., 2003). La hipotermia se considera uno de los mecanismos neuroprotectores naturales, debido a que favorece la disminución del metabolismo cerebral, reduce la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, disminuye el estrés oxidativo, etc.



Los cannabinoides pueden ser igualmente neuroprotectores por su capacidad de disminuir el estrés oxidativo, punto fundamental en procesos de destrucción neuronal. El efecto antioxidante es doble, por un lado indirectamente porque disminuyen la excitotoxicidad glutamatérgica, y por lo tanto, disminuyen la formación de radicales libres generados por esta vía; y directamente porque ciertos cannabinoides actúan como antioxidantes sin participación de los receptores cannabinoides (Hampson y cols., 1998; Marsicano y cols., 2002).

Aunque, los múltiples mecanismos propuestos para explicar la acción neuroprotectora de los cannabinoides implican al receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, no se descarta la participación de otros receptores ni procesos independientes de receptor. De hecho hasta el momento, no está claro el/los mecanismo/s implicados en la neuroprotección ejercida por los cannabinoides, así como, la participación del sistema cannabinoide endógeno en dicho fenómeno.

#### **1.4.2. Efectos antinociceptivos y analgésicos**

Documentos históricos procedentes de India, Israel y Grecia revelan que el cannabis se usaba en el tratamiento del dolor de diferentes etiologías (Pacher y cols., 2006). En la actualidad, se piensa que una de las principales funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide es su papel en el control de la nocicepción.

Innumerables estudios demuestran que los cannabinoides tanto naturales, como sintéticos son capaces de producir efectos antinociceptivos en diferentes modelos animales de dolor (Walker y Huang, 2002). Así, los cannabinoides son efectivos en modelos de dolor agudo y en dolores crónicos de naturaleza neuropática e inflamatoria (Lichtman y Martin, 1991; Martin y cols., 1999; Guindon y Beaulieu, 2006).

Los mecanismos involucrados en los efectos antinociceptivos ejercidos por los cannabinoides son complejos y afectan a SNC, medula espinal y sistema nervioso periférico (Lichtman y Martín, 1991; Fox y cols., 2001; Suplita y cols., 2005; Amaya y cols., 2006). La mayoría de los trabajos coinciden en afirmar que la acción analgésica de los cannabinoides parece ejercerse principalmente a través de los receptores CB<sub>1</sub>, y es debida a la capacidad que muestran para inhibir o bloquear la transmisión del impulso nociceptivo (Lichtman y Martin, 1997; Hohmann, 2002). Como cabe esperar, la distribución anatómica de los receptores CB<sub>1</sub> coincide con áreas implicadas en la transmisión y modulación nociceptiva como son ciertas áreas del cerebro, ganglios dorsales espinales, asta dorsal y terminaciones periféricas de neuronas aferentes (Hohmann y Herkenham, 1999; Sañudo-Peña y cols., 1999; Hohmann, 2002).

Además del papel de los receptores CB<sub>1</sub>, hay nuevas evidencias que implican a los receptores CB<sub>2</sub> en la respuesta antihiperálgica ocasionada por los cannabinoides en diferentes modelos de dolor agudo, crónico y especialmente en dolencias de origen inflamatorio (Calignano y cols., 1998; Ibrahim, y cols., 2006). Se sugiere que el papel de los receptores CB<sub>2</sub> en procesos inflamatorios se debe a que éstos pueden modular la liberación de agentes inflamatorios, proinflamatorios y antiinflamatorios endógenos en células no neuronales localizadas en las proximidades de neuronas nociceptivas (Pertwee, 2001b).

Respecto al uso de los cannabinoides en el tratamiento del dolor en humanos, numerosos casos clínicos han constatado los posibles efectos beneficiosos del cannabis o derivados del  $\Delta^9$ -THC en dolores de diferente etiología (Rudich y cols., 2003; Ware y cols., 2003; Berlach y cols., 2006). En general, la respuesta analgésica de los cannabinoides en humanos es irregular, y existen variaciones importantes según el individuo y el tipo de dolor. Por lo tanto, es necesaria la realización de ensayos clínicos controlados, con un número mayor de pacientes, para esclarecer por un lado, la eficacia analgésica de los cannabinoides, y por otro la eficacia de los mismos frente a diferentes tipos de dolor. Hoy en día se dispone en Canadá, de un medicamento compuesto por dronabinol (nombre genérico internacional del  $\Delta^9$ -THC) y cannabidiol, denominado

Sativex®, que está indicado para el tratamiento del dolor neuropático en la esclerosis múltiple.

### **1.4.3. Efectos orexígenos**

A lo largo de la historia se ha utilizado el cannabis por su efecto estimulante del apetito. En la actualidad, se intenta determinar el papel del sistema cannabinoide endógeno en la regulación del apetito, el peso y el balance energético.

La regulación del apetito, el hambre y la saciedad se realiza mediante señales hormonales generadas en ciertas áreas del SNC, en sistema gastrointestinal y en tejido adiposo (Jones y cols., 2006). En éstas mismas zonas está descrita la ubicación del sistema cannabinoide endógeno, lo que puede presuponer un posible papel regulador del sistema endocannabinoide sobre la ingesta de alimentos (Bisogno y cols., 1999; Izzo y cols., 2001; Pertwee, 2001a; Coutts y Izzo, 2004; Matias y cols., 2006; Spoto y cols., 2006). Más recientemente se ha demostrado la existencia de receptores cannabinoides CB<sub>2</sub> en estómago, intestino y en tejido adiposo (Adami y cols., 2002; Cota y cols., 2003; Roche y cols., 2006).

Existen múltiples evidencias tanto del papel orexígeno de los cannabinoides como de las numerosas interacciones del sistema endocannabinoide con vías clásicas relacionadas con el control del apetito. Los cannabinoides producen un incremento de la ingesta ya sea por administración sistémica o local en SNC. Dicho efecto está atenuado en presencia del rimonabant, antagonista selectivo del receptor CB<sub>1</sub>, con lo cual se puede concluir que dicho efecto es mediado por este receptor (Jamshidi y Taylor, 2001; Willians y Kirkham, 2002). Además, si los agonistas cannabinoides estimulan el apetito, la administración de antagonistas de los receptores CB<sub>1</sub> ocasiona el efecto contrario, es decir, suprimen el apetito (Simiand y cols., 1998; Di Marzo y cols., 2001).

Entre las interacciones del sistema endocannabinoide con factores que regulan la ingesta de alimentos destacan las derivadas de la influencia de ciertas enzimas y/o factores sobre el nivel de los endocannabinoides en diferentes partes del organismo. Por ejemplo la leptina, hormona sintetizada en el tejido adiposo, actúa sobre el cerebro para disminuir la ingesta de alimento y es capaz de reducir las concentraciones de los endocannabinoides anandamida y 2-AG. Por el contrario, animales con déficit inherente del sistema de la leptina son obesos y presentan niveles elevados de endocannabinoides (Di Marzo y cols., 2001).

De la misma manera que ocurre en otros animales, en los seres humanos el consumo de cannabis y de  $\Delta^9$ -THC produce deseo de comer. Existen numerosos estudios que demuestran el beneficio que los cannabinoides aportan en pacientes que padecen caquexia y anorexia asociada a enfermedades como el cáncer y el SIDA (Struwe y cols., 1993; Jatoi y cols., 2002). En la actualidad está comercializado el Marinol® que contiene dronabinol para el tratamiento de la anorexia en pacientes con SIDA.

Por último mencionar que el antagonista cannabinoide rimonabant, comercializado con el nombre de Acomplia®, se ha usado como herramienta terapéutica en pacientes obesos para disminuir el apetito, y por consiguiente, conseguir una disminución del peso corporal. Hoy en día este medicamento ha sido retirado en diferentes países debido a la aparición de trastornos psiquiátricos graves (<http://www.emea.europa.eu>).

#### **1.4.4. Efectos antieméticos**

Otra de las propiedades ampliamente documentada de los cannabinoides es su capacidad para prevenir las náuseas y los vómitos. Estos procesos aparecen como síntomas de diferentes enfermedades del tracto gastrointestinal, SNC, oído, etc., así como, efectos secundarios de una gran variedad de fármacos, como los citotóxicos.

La náusea y el vómito están controlados en dos áreas cerebrales diferentes; el centro del vómito localizado en el bulbo, y por otro lado, el centro gatillo quimiorreceptor ubicado cerca del área postrema. El centro del vómito se puede estimular por impulsos procedentes del tubo digestivo, del sistema vestibular, de centros corticales y de la zona gatillo quimiorreceptora entre otros. Diferentes trabajos localizan al sistema endocannabinoide en éstas áreas, correlacionando así los efectos de los cannabinoides en estos procesos (Van Sickle y cols., 2001; Coutts y Izzo, 2004; Van Sickle y cols., 2005).

Los mecanismos antieméticos de los cannabinoides no están claros y se ha sugerido la participación tanto de mecanismos mediados por receptor, como independientes de éstos. En un principio se demostró en diferentes modelos animales, que la inhibición del vómito ocasionada por agonistas cannabinoides se debía fundamentalmente a la participación del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Además, estos efectos antieméticos se producían tanto en SNC por la unión a receptores CB<sub>1</sub>, localizados en áreas relacionadas con el vómito y la náusea, como en sistema periférico con la implicación de receptores CB<sub>1</sub> localizados en intestino delgado (Van Sickle y cols., 2001; Coutts y Izzo, 2004). Más recientemente, se ha descrito que el sistema endocannabinoide puede inhibir la emesis de manera fisiológica mediante la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, que se encuentran localizados en áreas de integración de los reflejos eméticos (Van Sickle y cols., 2005).

De los diferentes ensayos clínicos publicados y referentes al uso de los cannabinoides como antieméticos, se puede concluir que los cannabinoides pueden ser útiles en el tratamiento de las náuseas y vómitos secundarios a la quimioterapia antineoplásica (Tramèr y cols., 2001). En la actualidad, existen disponibles en el mercado varios fármacos cannabinoides, como el Cesamet® y el Marinol® cuyo uso está justificado cuando el paciente tratado con antineoplásicos no responde a los fármacos antieméticos convencionales.

### 1.4.5. Efectos sobre la presión intraocular

En 1971 se publica el primer trabajo que muestra que fumar cannabis reduce la presión intraocular (Hepler y Frank, 1971). Esta primera evidencia fue posteriormente contrastada por numerosos trabajos que sugieren que la administración, tanto de agonistas cannabinoides endógenos como sintéticos, es capaz de reducir la presión intraocular a través de las acciones sobre el receptor CB<sub>1</sub>, pero no sobre el receptor CB<sub>2</sub> (Pate y cols., 1995; Song y Slowey, 2000; Porcella y cols., 2001; Laine y cols., 2003).

La realización de otros estudios complementa la evidencia de la participación del sistema endocannabinoide en la reducción de la presión intraocular, poniendo de manifiesto la presencia de receptores CB<sub>1</sub> y de endocannabinoides en áreas oculares tales como músculo ciliar, epitelio pigmentado ciliar, retina, conducto de Schlemm, etc. (Porcella y cols., 2000; Stamer y cols., 2001; Lograno y Romano, 2004).

A pesar de todo, el/los mecanismo/s responsables del efecto de los cannabinoides sobre la presión ocular todavía no están claros y se han propuestos diferentes mecanismos:

- Un efecto directo de los cannabinoides que ocasionaría localmente vasodilatación, reducción de la presión capilar y de las secreciones (Korzczyn, 1980; Liu y Dacus, 1987).
- Un efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre canales de Ca<sup>2+</sup> presinápticos que implicaría una reducción del tono adrenérgico y, ésto a su vez una reducción de la producción de humor acuoso que provoca disminución de la presión capilar (Sugrue, 1997).

De los resultados anteriormente expuestos se puede deducir que los agonistas cannabinoides podrían ser útiles en el tratamiento del glaucoma por producir disminución de la presión intraocular (Chen y cols., 2005). Además, en los últimos años se estudia la posibilidad del uso de los cannabinoides en otras patologías oculares como

las retinopatías, debido al efecto neuroprotector de los cannabinoides sobre la retina (El-Remessy y cols., 2003, 2006).

#### **1.4.6. Efectos sobre la proliferación celular**

Uno de los campos de investigación sobre cannabinoides con mayor interés en la actualidad es el estudio de los efectos antiproliferativos de los mismos y su posible uso como agentes antitumorales.

Diferentes trabajos demuestran el efecto antiproliferativo ejercido tanto por cannabinoides endógenos como sintéticos en diferentes líneas tumorales, como gliomas (C6, U87), oligodendroglioma (Gos3), neuroblastoma (N18 TG2), carcinoma de colon (SW 480), cáncer de tiroides (KiMol), leucemia (CEM, HEL-92), etc (De Petrocellis y cols., 1998; Massi y cols., 2004; Herrera y cols., 2005). Más destacable es el hecho de que el tratamiento tanto sistémico como local con cannabinoides frena el crecimiento de varios tipos de xenotrasplantes de células tumorales como el carcinoma de pulmón, páncreas y piel, el glioma, etc (McKallip y cols., 2002; Casanova y cols., 2003; Sanchez y cols., 2001).

En cuanto al mecanismo de acción propuesto, diferentes autores muestran que el efecto antiproliferativo que ejercen los cannabinoides se debe a la interacción de éstos con los receptores cannabinoides que se encuentran en el tumor. Esto provoca bien un aumento de los mecanismos apoptóticos o bien una reducción de la angiogénesis de los tumores (Galve-Roperh y cols., 2000; Casanova y cols., 2003; Portella y cols., 2003; Carracedo y cols., 2006). A pesar de quedar ampliamente documentado el efecto antitumoral de los cannabinoides todavía es necesario determinar si éstos actúan únicamente en células tumorales o si los efectos antiproliferativos dependen del tipo de tumor y/o de la dosis empleada del mismo (Guzmán, 2003).

En este apartado se han descrito los principales efectos fisiológicos de los cannabinoides. Sin embargo, en los últimos años ha crecido el número de estudios publicados sobre dichos efectos y aparecen nuevas evidencias de la participación del sistema endocannabinoide en otras funciones fisiológicas que implican a otros sistemas como el reproductor, respiratorio, inmunológico, etc (Pacher y cols., 2006).



## 2. FISIOLÓGÍA ARTERIAL

Las arterias son vasos con paredes gruesas y elásticas que distribuyen la sangre desde el corazón a los diferentes tejidos. Los vasos al irse alejando del corazón se ramifican, dando lugar a una red de arterias de calibre progresivamente decreciente.

### 2.1. ESTRUCTURA DE LAS ARTERIAS

Las arterias están formadas fundamentalmente por tres capas distribuidas concéntricamente y denominadas túnica íntima, túnica media y túnica adventicia. Existen diferencias en la composición de las capas dependiendo de la funcionalidad circulatoria de las distintas clases de arterias.

#### ■ Túnica íntima

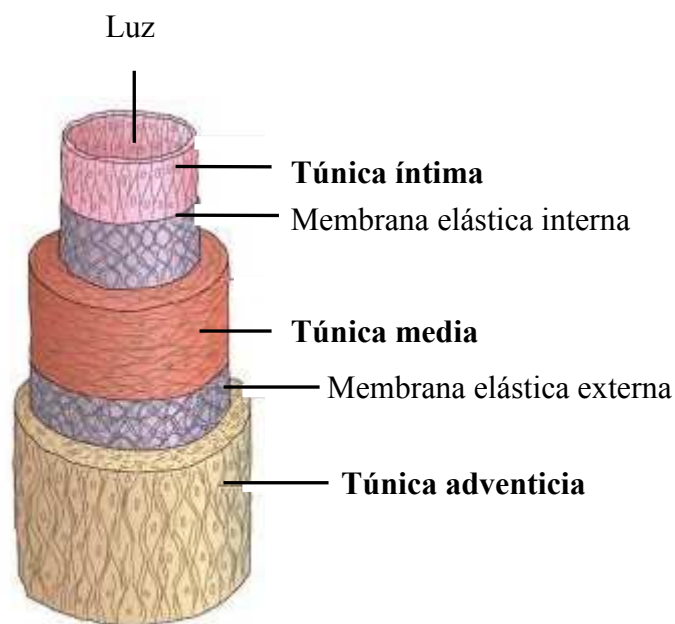
Es la capa más interna del vaso que se encuentra en contacto con la sangre, y está compuesta por el **endotelio** y la **lámina basal**. El endotelio es una monocapa continua de células aplanadas que se asienta sobre la lámina basal, estructura rica en colágeno y elastina. El endotelio vascular modula un gran número de funciones y se puede destacar su papel regulador sobre el tono vascular. Entre la túnica íntima y la túnica media se encuentra una lámina fenestrada de grosor variable denominada **lámina elástica interna**, que se encuentra en contacto con la lámina basal.

#### ■ Túnica media

Es la capa intermedia y la de mayor grosor, la cual está formada por **células musculares lisas** fusiformes y dispuestas circularmente. Esta capa es la encargada de la actividad vasomotora de la arteria, además de servir de soporte muscular al vaso. Asimismo, entre la túnica media y la adventicia se extiende la **lámina elástica externa**.

## ■ Túnica adventicia

Es la capa más externa y está formada fundamentalmente por colágeno, elastina y fibroblastos orientados longitudinalmente. Esta capa se funde gradualmente con el tejido laxo existente alrededor de los vasos. Además, a través de ella penetran vasos de calibre menor denominados **vasa vasorum** y **fibras nerviosas** que inervan las arterias. La principal función de la túnica adventicia es servir de soporte estructural a los vasos.



**Figura 20.** Esquema de la estructura en capas de las arterias.  
Modificado de Faller y cols., 2006

Por último, las diferentes capas del vaso están arropadas por la **matriz extracelular**. Esta estructura está formada fundamentalmente por colágeno y elastina, y su principal función es la de proporcionar soporte, elasticidad y resistencia a las diferentes estructuras que componen las arterias.

## 2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ARTERIAS

Las arterias se clasifican en función del tamaño, de las características de la pared vascular y de la función principal que desempeñan. Así, se pueden distinguir 3 tipos principales de arterias: elásticas, musculares y arteriolas.

### ■ Arterias elásticas

Son arterias de conductancia de gran calibre, como la arteria aorta y pulmonar, que se caracterizan por ser vasos muy flexibles. Esta elasticidad es debida a la existencia de capas fenestradas de elastina que se alternan con capas de músculo liso vascular (MLV) y fibras de colágeno en la túnica media. La túnica adventicia es relativamente fina y está compuesta por fibroblastos, haces longitudinales de fibras de colágeno y una red laxa de fibras elásticas finas. Las láminas de elastina amortiguan la alta presión de salida de la sangre del corazón, y las fibras de colágeno de la túnica adventicia limitan el estiramiento de la pared si la presión aumenta mucho. Por lo tanto, el papel fisiológico de este tipo de arterias es doble, por un lado son conductoras y por otro regulan el flujo sanguíneo.

La composición de las arterias elásticas cambia al ramificarse y disminuir de calibre, reduciéndose la proporción de fibras elásticas y aumentando la proporción de MLV, dando lugar a las arterias musculares.

### ■ Arterias musculares

Son arterias de conductancia de mediano y pequeño calibre, como las cerebrales y las coronarias. La túnica íntima, a diferencia de las arterias elásticas, es más delgada, y es difícil discernir la lámina basal. La túnica media se caracteriza por contener un gran número de capas concéntricas de células musculares lisas, lo cual le confiere gran grosor a la pared vascular. Además, la presencia de fibras elásticas y de colágeno en este tipo de arterias es menor. El grosor y la composición de la túnica adventicia varían

en función de la arteria muscular. Este tipo de arterias poseen una gran inervación del sistema nervioso autónomo. La principal función de estos vasos es la distribución eficiente de la sangre hasta los diferentes lechos vasculares.

### ■ Arteriolas

Las arteriolas son vasos de resistencia de pequeño calibre que se caracterizan por tener una pared vascular pobre en fibras elásticas, y una mayor capa de MLV que va disminuyendo según se reduce el calibre de la arteriola. La túnica adventicia es escasa en este tipo de vaso arterial. Las arteriolas, de igual manera que las arterias musculares, reciben inervación tanto simpática como parasimpática. Estos vasos junto con los capilares forman parte de los denominados vasos de intercambio, realizándose en ellos el intercambio de oxígeno y de metabolitos. Además, las arteriolas regulan la resistencia vascular periférica, de tal manera que cuando las arteriolas se dilatan la resistencia disminuye, y el flujo local aumenta.

## 2.3. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR

El sistema vascular está inervado principalmente por el sistema autónomo simpático y por terminaciones nerviosas sensoriales. Las fibras nerviosas simpáticas y las sensoriales entran a las arterias a través de la capa adventicia y forman una red nerviosa compleja, denominada “plexo de la adventicia”.

La principal función del sistema autónomo simpático es mantener el tono vascular. Concretamente, las terminaciones nerviosas simpáticas liberan noradrenalina como respuesta a numerosos factores como hormonas circulantes, y sustancias de liberación local. La noradrenalina liberada actúa sobre los receptores adrenérgicos situados en el MLV y ocasiona vasoconstricción. De esta manera, el sistema simpático que inerva las arterias contribuye a mantener el tono vascular.

Las arterias también están inervadas por terminaciones sensoriales de diferente naturaleza y que se activan frente a diversos estímulos. Estas neuronas sensoriales expresan profusamente los receptores ionotrópicos “**transient receptor potential**” (**TRP**), los cuales juegan un papel importante en la regulación del tono vascular (Messeguer y cols., 2006; Kark y cols., 2008).

Por otra parte, las arterias regulan el tono vascular mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras producidas principalmente en el endotelio vascular. Las principales **sustancias vasodilatadoras** producidas en las células endoteliales son **prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)**, **NO** y **factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)**. Entre las sustancias vasoconstrictoras se pueden destacar la endotelina y prostanoides vasoconstrictores como el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Estas sustancias son producidas y liberadas por el endotelio en respuesta a diversos estímulos como aumento del flujo sanguíneo, cambios en las fuerzas hemodinámicas o por inervación del sistema parasimpático entre otras.

A continuación, y debido al interés que ésto supone en este trabajo, se **describirán más detalladamente las sustancias producidas por el endotelio que median vasodilatación, así como la implicación de los receptores TRPV1** (pertenecientes a la familia de los receptores TRP).

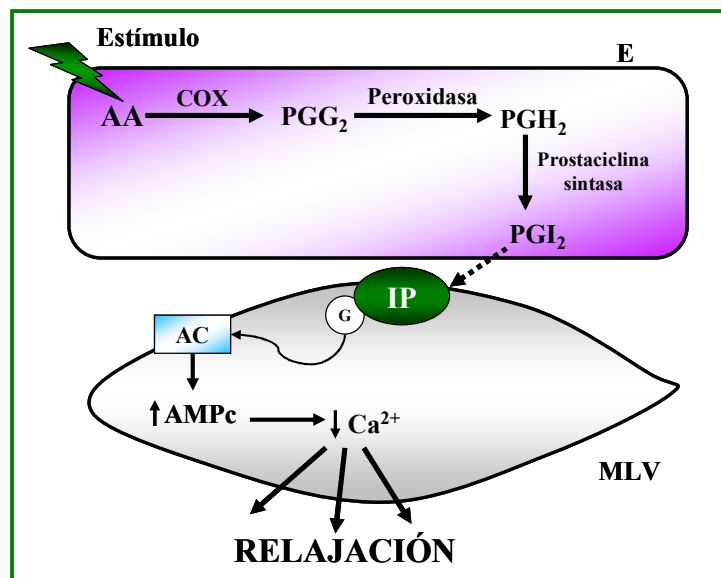
## ■ Prostaciclina

En 1976 fue identificado por el grupo de Moncada el primer agente vasoactivo derivado del endotelio, que se denominó **prostaciclina** o **prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)**.

La PGI<sub>2</sub> se produce a partir del ácido araquidónico (AA). En primer lugar, el AA por vía de las ciclooxigenasas (COX-1, COX-2) se convierte en prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), que por una reacción de reducción por medio de una peroxidasa, se transforma en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Por último, la PGH<sub>2</sub> se convierte en PGI<sub>2</sub> mediante una reacción de isomerización, catalizada por la enzima prostaciclina sintasa.

La prostaciclina actúa principalmente a través de los receptores de membrana para prostaciclina, denominados IP. Los receptores IP pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G que se encuentran localizados en todos los tejidos del organismo. Destaca la presencia de estos receptores en plaquetas y en células del MLV (Stitham y cols., 2007).

Las principales funciones de la prostaciclina son inhibir la agregación plaquetaria, reducir el remodelamiento de las células del MLV y ocasionar vasodilatación (Mitchell y cols., 2008). Concretamente, la relajación que produce la  $\text{PGI}_2$  se lleva a cabo cuando ésta se une a los receptores IP que están ubicados en la membrana de las células del MLV. Ésto provoca la activación de la AC a través de la proteína G, lo que ocasiona la formación de AMPc, disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y, por lo tanto relajación del MLV (Mitchell y cols., 2008).



**Figura 21.** Esquema de la biosíntesis de prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) en el endotelio (E) y su mecanismo de acción en el músculo liso vascular (MLV). Diferentes estímulos provocan la liberación de ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de membrana. Una vez liberado el AA por acción de las ciclooxigenasas (COX) se transforma en prostaglandina  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ) y ésta por una reacción de reducción y posterior isomerización se convierte en  $\text{PGI}_2$ . A continuación, la  $\text{PGI}_2$  actúa sobre los receptores para prostaciclina (IP) que están acoplados a proteína G y se encuentran en el MLV. Ésto provoca la activación de la adenilato ciclasa (AC), aumento de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y disminución del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular y, por lo tanto relajación del MLV.

## ■ Óxido nítrico

Sobre la década de los ochenta, el grupo de Furchgott y Zawadzki concluyeron que las células endoteliales liberaban una sustancia vasodilatadora no identificada a la que denominaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Más tarde este mediador fue caracterizado e identificado como **óxido nítrico (NO)** (Furchgott y Zawadzki, 1980; Moncada y cols., 1991).

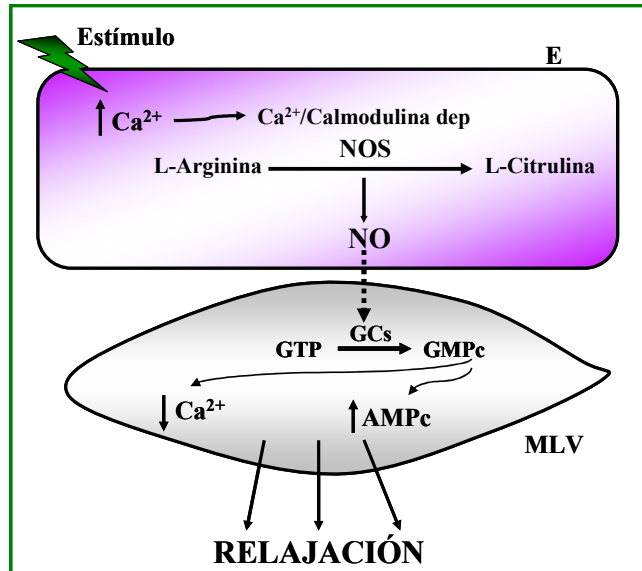
El NO es un gas incoloro, no cargado, compuesto por un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno y además posee un electrón desapareado. Todo ello confiere a este mediador la capacidad de difundir fácilmente por las membranas, y ser una especie muy reactiva con un tiempo de vida media muy corta.

A partir de L-arginina y oxígeno se produce la síntesis de citrulina y NO, reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Se han caracterizado tres isoformas de la NOS, dos de las cuales se expresan de manera constitutiva, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), y la tercera de naturaleza inducible (iNOS).

La eNOS es la isoforma implicada en la relajación del tono vascular. Se localiza principalmente en la membrana de las células endoteliales, y de forma minoritaria en otras células como epiteliales y neuronas (Förstermann y cols., 1991; Pollock y cols., 1992). Esta isoforma de la NOS es  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina dependiente, es decir, su activación requiere una elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y esto provoca a su vez la activación de la calmodulina (Moncada y cols., 1991).

En las células endoteliales se produce la biosíntesis de NO cuando éstas son activadas por diferentes estímulos. Cuando esto ocurre se induce la entrada o la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular que activa a la calmodulina, y ésta a su vez a la eNOS que produce NO a partir de la L-arginina. El NO producido difunde a través de la membrana celular hasta el MLV donde activa a la guanilato ciclasa soluble (GCs) y aumenta así los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPC). El aumento de la concentración de GMPC ocasiona relajación del MLV por activación de diferentes

mecanismos entre los cuales se pueden destacar: disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los miocitos por inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento de la concentración de AMPc, etc (Mitchell y cols., 2008).



**Figura 22.** Esquema de la biosíntesis de óxido nítrico (NO) en el endotelio (E) y su mecanismo de acción en el músculo liso vascular (MLV). Cuando por un determinado estímulo se produce un aumento de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular en las células endoteliales se ocasiona la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima calmodulina dependiente, y ésto produce la síntesis de NO a partir de L-arginina. El NO difunde hasta el MLV y provoca activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y aumenta los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Este aumento de GMPc en el MLV ocasiona relajación del mismo por diferentes mecanismos como disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  ó aumento de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). GTP: guanosín trifosfato.

### ■ Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

Tras diferentes estudios llevados a cabo en diversos territorios vasculares se comprobó que la relajación endotelio dependiente ocasionada por diversas sustancias o no se bloqueaba o se bloqueaba parcialmente en presencia de inhibidores de la NOS y de las COX (Garland y Mcpherson, 1992; Waldron y Garland, 1994). Por lo tanto, la relajación endotelio dependiente no está mediada sólo por prostaciclina y NO, sino también por otro factor que se caracteriza por ocasionar hiperpolarización de las células del MLV. A este nuevo factor liberado por el endotelio e implicado en el



mantenimiento del tono vascular se le denominó **factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)** (Félétou y Vanhoutte, 1988).

Desde que se descubrió la existencia del EDHF se ha especulado con la posible naturaleza química del mismo, y se han propuesto diferentes candidatos de los cuales podemos destacar el cannabinoide endógeno anandamida (Randall y cols., 1996), sin embargo, esta premisa no parece confirmarse (White y Hiley 1997; Zygmunt y cols., 1997). Hoy en día todavía se desconoce la identidad química del EDHF, y tampoco se conoce con seguridad, el mecanismo de acción del mismo.

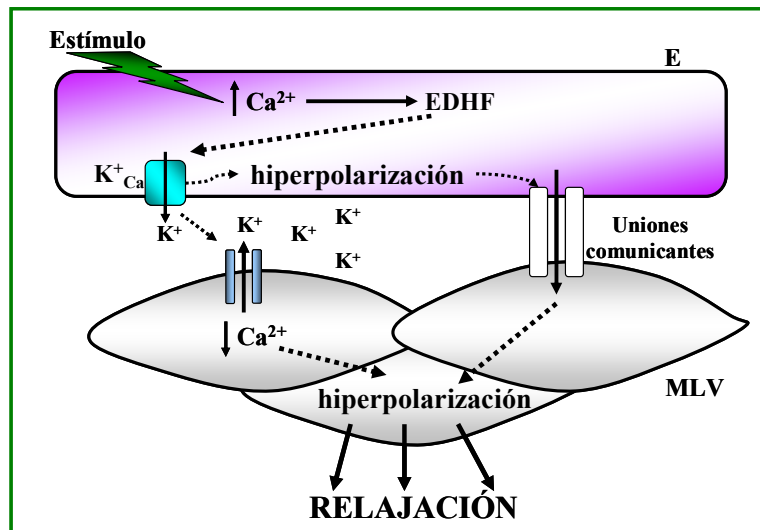
El EDHF parece estar implicado fundamentalmente en las relajaciones endotelio dependiente de vasos de menor calibre, y se conoce con certeza que la síntesis y liberación del mismo requiere el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el endotelio. El aumento de este ión en las células endoteliales puede ser provocado como respuesta a la estimulación de receptores acoplados a proteína G mediante un agonista o también por sustancias que lo incrementan de manera independiente de receptor, como ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Busse y cols., 1988; Illiano y cols., 1992; Busse y cols., 2002; Si y cols., 2006).

Sin descartar un efecto directo del EDHF sobre el MLV, actualmente se sugiere que la respuesta mediada por el EDHF al aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  en las células endoteliales, provoca la activación de canales de  $\text{K}^+$   $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes de baja e intermedia conductancia que se encuentran localizados en estas células, lo que provoca la hiperpolarización del endotelio. La transmisión de la hiperpolarización al MLV podría realizarse principalmente por dos mecanismos:

- A través de las uniones comunicantes existentes entre las células endoteliales y las células del MLV adyacente.
- Además, la apertura de los canales de  $\text{K}^+$   $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes de las células endoteliales provocaría la salida de  $\text{K}^+$  al espacio mioendotelial, lo que ocasionaría la hiperpolarización del MLV.

La participación de las uniones comunicantes y de los iones de  $K^+$  en la hiperpolarización del MLV no necesariamente son mecanismos excluyentes, es decir, pueden ocurrir simultánea o secuencialmente y, también pueden actuar de manera sinérgica (Busse y cols., 2002; Félétou y Vanhoutte, 2006).

El EDHF junto a los otros factores derivados del endotelio que ocasionan relajación, juega un papel importante en la homeostasis cardiovascular tanto en animales como en humanos. Además, ciertos autores apuntan a que la participación del EDHF podría ser esencial en procesos patológicos en los cuales se vea comprometida la producción de NO (Félétou y Vanhoutte, 2006; Vanhoutte y cols., 2009).



**Figura 23.** Esquema de la biosíntesis del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) en el endotelio (E) y sus posibles mecanismos de acción. Diferentes estímulos provocan el aumento de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en las células endoteliales y ocasionan la salida de potasio ( $K^+$ ) por canales de potasio calcio dependientes ( $K^+_{Ca}$ ). El acúmulo de  $K^+$  en el espacio mioendotelial ocasiona relajación del MLV por hiperpolarización del mismo implicando a diferentes mecanismos. Además, la salida de  $K^+$  de las células endoteliales ocasiona también hiperpolarización de las mismas y mediante las uniones comunicantes de éstas con los miocitos adyacentes ocasiona a su vez hiperpolarización del MLV, y por lo tanto relajación del mismo.

## ■ “Transient receptor potential vanilloid” TRPV1

Los receptores TRPV1 pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos TRP. Este receptor es un canal catiónico inespecífico permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  que está formado por seis segmentos transmembrana, con una región anfipática entre el segmento 5 y 6 que forma el conducto del canal (Messeguer y cols., 2006). Este receptor es activado por calor, protones y, por agonistas como la capsaicina y la anandamida. Tras la activación de los receptores TRPV1 se pueden liberar sustancias tales como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P, neurokinina A, ATP y NO. Estas sustancias median respuestas cardiovasculares tales como taquicardia y vasodilatación (Ralevic y cols., 2002).

El receptor TRPV1 es importante en este trabajo debido a que numerosos estudios vinculan a dicho receptor con los efectos vasorrelajantes de los cannabinoides tanto en arterias de conductancia como de resistencia (Zigmunt y cols., 1999; Dannert y cols., 2007). Concretamente, los cannabinoides al activar a los receptores TRPV1 ocasionan un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  en las terminaciones nerviosas sensoriales, que inervan las arterias a través de la capa adventicia de las arterias, lo que provoca la liberación del CGRP desde dichas terminaciones (Ralevic y cols., 2002). Este péptido al unirse a los receptores para CGRP1, ubicados en el MLV, activan a las proteínas  $G_s$  y, ésto ocasiona un aumento del AMPc a través de la AC, ocasionando vasodilatación de las arterias (Juaneda y cols., 2000).

### 3. SISTEMA VASCULAR Y CANNABINOIDES

En el apartado 1.4 de la Introducción se ha ahondado en algunos de los efectos fisiológicos de los cannabinoides, pero quedan por detallar los efectos vasculares de los mismos, tratados aparte por el interés que estos suponen en esta Tesis Doctoral.

Desde hace tiempo, es conocida la hipotensión y la taquicardia que produce la marihuana cuando es fumada. Este aumento de la frecuencia cardiaca, asociada a vasodilatación periférica, también se observa cuando el principal componente de la marihuana, el  $\Delta^9$ -THC, es administrado por vía intravenosa (Hillard, 2000). Sin embargo, hoy en día se sabe que los mecanismos que median en los efectos vasculares de los cannabinoides tanto naturales, sintéticos como endógenos son complejos, y los resultados obtenidos dependen de las condiciones experimentales, de la especie animal y del territorio vascular que se estudie (Randall y cols., 2004; Pacher y cols., 2005).

Para poder aclarar los efectos implicados en las acciones de los cannabinoides tanto endógenos, como exógenos en el sistema vascular se revisarán los estudios más relevantes sobre este tema realizados tanto en humanos, como en animales (“in vivo” e “in vitro”). Además, se detallarán los posibles mecanismos implicados en la vasorrelajación ocasionada por los cannabinoides por el interés que esto supone en esta Tesis Doctoral.

#### 3.1. LOCALIZACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN TEJIDO VASCULAR

La presencia de los diferentes componentes del sistema endocannabinoide en el tejido vascular ha sido demostrada por diferentes técnicas a lo largo de los últimos años. Estos estudios, además, han ayudado a comprender mejor los complejos efectos vasculares de los cannabinoides.

El **receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>** ha sido localizado en las principales estructuras del tejido vascular. La presencia de este receptor en las terminaciones nerviosas perivasculares ha quedado demostrada en arterias de resistencia y de conductancia de pequeño calibre, sin existir trabajos vinculantes al respecto en arterias de conductancia de gran calibre (Zygmunt y cols., 1999; Domenicali y cols., 2005). En el MLV se ha detectado la presencia de mRNA del receptor CB<sub>1</sub> en arterias de conductancia, en cambio, en el MLV de arterias de resistencia la presencia de este receptor es baja o nula (Sugiura y cols., 1998; Domenicali y cols., 2005; Rajesh y cols., 2008). En el endotelio vascular, tanto de arterias de resistencia como de conductancia, está demostrada la presencia del receptor CB<sub>1</sub> (Domenicalli y cols., 2005; Lepicier y cols., 2007; McCollum y cols., 2007; Rajesh y cols., 2007).

En cuanto al **receptor cannabinoide CB<sub>2</sub>**, todas las evidencias apuntan a que únicamente se ubica en las células endoteliales tanto de arterias de resistencia como de conductancia (Zoratti y cols., 2003; Rajesh y cols., 2007).

Respecto a la ubicación en el sistema vascular de otros posibles receptores cannabinoideos diferentes a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, sólo se ha demostrado con estudios funcionales la ubicación del receptor “**No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>**” en el endotelio vascular de arterias de resistencia y de conductancia (Járai y cols., 1999; Mukhopadhyay y cols., 2002; O’Sullivan y cols., 2004b).

Como ya se ha comentado ampliamente en el apartado 1.2.4 de la Introducción, los endocannabinoideos se sintetizan a demanda, a partir de precursores que se encuentran en la membrana celular. Está demostrado que en el sistema vascular, tanto las células endoteliales como las terminaciones nerviosas que inervan dicho tejido, son capaces de sintetizar endocannabinoideos, como la anandamida y el 2-AG (Deutsch y cols., 1997a; Mechoulam y cols., 1998; Sugiura y cols., 1998; Ishioka y Bukoski, 1999). Además, la liberación de endocannabinoideos desde las células endoteliales o desde las terminaciones nerviosas parece estar ocasionadas por el aumento del Ca<sup>2+</sup> en estas estructuras (Sugiura y cols., 1998; Ishioka y Bukoski, 1999).

Por otra parte, células sanguíneas como macrófagos y plaquetas son también capaces de sintetizar cannabinoides endógenos, por lo que esta vía es una importante fuente de endocannabinoides en el sistema vascular (Wagner y cols., 1997; Varga y cols., 1998).

Por último, se ha demostrado funcionalmente la presencia de la enzima FAAH en cultivo de células endoteliales (Maccarrone y cols., 2000), así como, en estudios funcionales en arterias de resistencia y de conductancia (Ho y Randall, 2007; Kozłowska y cols., 2008). Este hecho es importante porque estas enzimas pueden jugar un papel importante en los efectos vasculares de los endocannabinoides.

### **3.2. EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES EN EL SISTEMA VASCULAR: ESTUDIOS EN HUMANOS**

En humanos, la administración aguda de los cannabinoides ocasiona taquicardia de manera dosis dependiente. Esta elevación de la frecuencia cardiaca es máxima a los pocos minutos de la administración, y va desapareciendo lentamente en las 3 horas siguientes. Además, diferentes trabajos muestran que la taquicardia va acompañada de un aumento de la noradrenalina circulante y que el efecto es sensible a rimonabant, por tanto el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> estaría implicado en este proceso (Huestis y cols., 2001; Jones, 2002).

En cambio cuando la administración se realiza de manera crónica, el cannabinoide ocasiona bradicardia e hipotensión. Estas diferencias en los parámetros cardiovasculares tras administraciones agudas o crónicas pueden ser debidas a la aparición de tolerancia, a las diferentes condiciones experimentales del ensayo, a las dosis utilizadas o al historial de uso de drogas de los pacientes (Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007).

También se ha descrito que tras la administración de cannabinoides se produce un incremento leve de la presión arterial. Este aumento depende de la exposición, aguda o crónica, de la dosis y de la situación postural del individuo. Se produce un incremento de la presión arterial cuando la persona está sentada, pero disminuye cuando la persona está de pie. Además, los cambios posturales bruscos y rápidos ocasionan hipotensión ortostática, que se relaciona con disminución de la resistencia vascular periférica (Jones, 2002).

En cualquier caso, los efectos de los cannabinoides en humanos son difíciles de evaluar y de contrastar debido a que el número de trabajos de investigación realizados al respecto son relativamente menores que los existentes con animales de experimentación. Además, la mayoría de los estudios en humanos se han realizado con  $\Delta^9$ -THC.

### **3.3. EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES EN EL SISTEMA VASCULAR: ESTUDIOS EN ANIMALES**

#### **■ Estudios “in vivo”**

En animales de experimentación el número de trabajos publicados, relacionados con los efectos vasculares de los cannabinoides, es amplio y, se pone de manifiesto que los mecanismos implicados son complejos y, a veces, dependen de la especie animal y de la metodología usada.

Parte de la complejidad de los efectos “in vivo” de los cannabinoides en el sistema vascular se debe a que éstos actúan de manera directa sobre los vasos y el corazón, pero también pueden intervenir modulando el tono autónomo tanto en áreas centrales, como en sistema nervioso periférico. Parece ser que las acciones periféricas de los cannabinoides son las que juegan un papel predominante en los efectos vasculares de los mismos, al menos cuando son administrados de manera sistémica y a

las dosis utilizadas habitualmente por los diferentes investigadores (Randall y cols., 2002; Pacher y cols., 2005).

En la mayoría de los estudios llevados a cabo en animales anestesiados como rata, ratón, conejo y perro se observa el efecto hipotensor de los cannabinoides (Varga y cols., 1995; Lake y cols., 1997; Járai y cols., 1999; Niederhoffer y cols., 2003; Ralevic, 2003). Sin embargo, desde el punto de vista metodológico, el anestésico empleado puede alterar la intensidad del efecto hipotensor del cannabinoide (Vidrio y cols., 1996) y, el efecto también puede variar según el animal respire o no espontáneamente (Vidrio y cols., 1996; Niederhoffer y cols., 2003).

En general la administración intravenosa de cannabinoides, como anandamida y  $\Delta^9$ -THC, en animales anestesiados ocasiona bradicardia y una respuesta hemodinámica trifásica que consiste en (Varga y cols., 1995; Pacher y cols., 2004):

Fase I: Bradicardia acompañada por una leve hipotensión inicial que dura unos segundos.

Fase II: Un efecto presor transitorio de origen desconocido.

Fase III: Una caída prolongada de la presión sanguínea que dura al menos 10 minutos.

Está demostrado que la fase I es debida a una respuesta vagal porque dicha fase está ausente en animales previamente vagotomizados cervicalmente (Varga y cols., 1995). Además, en el caso de la anandamida algunos autores implican al sistema vanilloide en la bradicardia e hipotensión inicial ocasionada por este endocannabinoide, descartando al receptor  $CB_1$  (Malinowska y cols., 2001).



La fase II tampoco se anula en presencia de antagonistas de los receptores CB<sub>1</sub> o en animales “knockout” para dicho receptor (Jarái y cols., 1999; Pacher y cols., 2004), y tampoco se bloquea en presencia de inhibidores  $\alpha$ -adrenérgicos, y en animales previamente desmedulados (Varga y cols., 1995). Desvinculando así al sistema simpático y a los receptores CB<sub>1</sub> en el efecto presor de la fase II.

La hipotensión de la fase III parece estar mediada por el receptor CB<sub>1</sub> y es producida por inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores a nivel periférico (Varga y cols., 1995; Malinowska y cols., 2001). Tampoco hay que descartar que este segundo efecto hipotensor ocasionado por los cannabinoides pudiera ser debido a un efecto directo de éstos sobre los diferentes lechos vasculares, lo que provoca la relajación de los mismos (Randall y cols., 2002). Hay que señalar que el orden de potencia hipotensora de los cannabinoides se correlaciona con la mayor actividad psicotrópica del cannabinoide, y con la mayor afinidad de estos ligandos por el receptor CB<sub>1</sub> (Lake y cols., 1997).

En relación a las modificaciones que sobre la presión arterial ocasionan los cannabinoides cuando se administran en animales conscientes, existen diferencias respecto a las obtenidas en animales anestesiados. En ratas conscientes, la administración de cannabinoides produce una respuesta hipertensiva al administrar el cannabinoide, observándose solamente disminución de la presión arterial a dosis altas del mismo (Stein y cols., 1996; Gardiner y cols., 2001). Esta respuesta hipertensiva se bloquea en presencia de inhibidores ganglionares junto con antagonistas de los receptores para angiotensina II y de vasopresina. Por tanto, estos resultados implican una vía neurohormonal en dicha respuesta. Una vez bloqueada esta vía se puede observar una leve hipotensión al administrar el cannabinoide (Randall y cols., 2004).

## ■ Efectos “in vitro”

La mayoría de los estudios en órgano aislado muestran que los cannabinoides ocasionan relajación. Sin embargo, existen divergencias entre los diferentes mecanismos propuestos en la relajación ocasionada por los cannabinoides y, ello se debe a que los estudios “in vitro” se realizan en diferentes condiciones experimentales, con distintas especies animales, utilizando lechos vasculares distintos o con diferentes tipos de compuestos cannabinoides (Randall y cols., 2004).

El primer trabajo que describió la vasorrelajación producida por el endocannabinoide anandamida fue el grupo de Ellis en arteriolas cerebrales de conejo (Ellis y cols., 1995). Con posterioridad, se fueron realizando más estudios que corroboraban dicho hallazgo, confirmándose que la anandamida ocasionaba relajación concentración dependiente en diferentes especies animales (Randall y cols., 1996; 1997; Hillard, 2000). La mayoría de los trabajos mencionados se han realizado en arterias de resistencia y de conductancia de pequeño calibre (arteriolas y arterias musculares, respectivamente). Los estudios sobre los efectos vasculares de la anandamida en arterias de conductancia de gran calibre (arterias elásticas) son menores y muestran resultados heterogéneos (Holland y cols., 1999; Mukhopadhyay y cols., 2002; O’Sullivan y cols., 2005).

Además de los estudios realizados con anandamida, el efecto vascular de otros endocannabinoides como el 2-AG y el NADA, también ha sido evaluado. En general, estos cannabinoides ocasionan vasorrelajación tanto en vasos de resistencia como de conductancia (Kagota y cols., 2001; O’Sullivan y cols., 2004a). De la misma manera, cannabinoides sintéticos como el Win 55,212-2, HU-210 y CP55,940, son vasodilatadores tanto en arterias de conductancia como en arterias de resistencia (White y Hiley, 1998; Fleming y cols., 1999; Wagner y cols., 2001; Dannert y cols., 2007).

### **3.4. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA VASORRELAJACIÓN OCASIONADA POR LOS CANNABINOIDES**

Como ya hemos comentado, mientras que el efecto vasodilatador de los cannabinoides se ha demostrado en la mayoría de los territorios vasculares, no está claro el/los posibles mecanismos implicados.

Para poder entender con mayor claridad los mecanismos implicados en la relajación ocasionada por los cannabinoides, en los siguientes apartados de esta Tesis Doctoral se expondrán los mismos en función del tipo de arteria y del cannabinoide (endocannabinoide o cannabinoide sintético) que cause dicho efecto. Además, en la descripción de los mecanismos implicados se comenzará por exponer la participación de receptores (cannabinoides y no cannabinoides), seguida de la posible participación de diferentes vías de señalización intracelular.

#### **3.4.1. Implicación de receptores**

##### **■ Receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>**

La participación del receptor CB<sub>1</sub> en el efecto vasodilatador de los cannabinoides ha sido evaluada en un gran número de trabajos. En algunas tipos de arterias de resistencia y de conductancia de pequeño calibre, como lecho mesentérico y arteria coronaria, se ha implicado de manera parcial al receptor CB<sub>1</sub> en la relajación ocasionada por los endocannabinoides, anandamida y NADA (Deutsch y cols., 1997a; Chaytor y cols., 1999; Liu y cols., 2000; Kagota y cols., 2001; O'Sullivan y cols., 2004a,b). En cambio, otros autores no comparten esta afirmación a pesar de que los experimentos se han llevado a cabo en el mismo tipo de arterias y con los mismos agonistas cannabinoides (Plane y cols., 1997; Chataigneau y cols., 1998; Grainger y Boachie-Ansah, 2001; Harris y cols., 2002; O'Sullivan y cols., 2004a). La mayoría de los trabajos realizados en esos mismos territorios vasculares con agonistas sintéticos como Win 55,212-2 y HU-210 involucran parcialmente al receptor CB<sub>1</sub> en la

vasorrelajación ocasionada por los mismos (White y Hiley, 1998; Gebremedhin y cols., 1999; Wagner y cols., 2001), aunque otros lo descarten (White y Hiley, 1998; Ho y Hiley, 2003a).

Los estudios llevados a cabo en arterias de conductancia de gran calibre como la aorta concluyen que el receptor CB<sub>1</sub> no estaría implicado en la relajación ocasionada por los endocannabinoides anandamida y NADA (Mukhopadhyay y cols., 2002; O'Sullivan y cols., 2005). Mientras que el único trabajo realizado con un agonista cannabinoide sintético como el Win 55,212-2 en este tipo de arterias, implica parcialmente al receptor CB<sub>1</sub> en la vasorrelajación del mismo (Dannert y cols., 2007).

En relación al receptor CB<sub>2</sub>, no existen muchos estudios que evalúen la implicación de este receptor en la relajación ocasionada por los diferentes agonistas cannabinoide. Este receptor no parece mediar la relajación ocasionada por los endocannabinoides anandamida y virodamina en arterias de resistencia y de conductancia (White y cols., 2001; Ho y Hiley, 2004; Romano y Lograno, 2006; Kozłowska y cols., 2008). El receptor CB<sub>2</sub> tampoco participa en la relajación ocasionada por Win 55,212-2 en arterias de resistencia (Ho y Hiley, 2003a). Por otra parte, en arterias de conductancia este receptor estaría implicado parcialmente en la relajación ocasionada por  $\Delta^9$ -THC y Win 55,212-2 (O'Sullivan y cols., 2005; Dannert y cols., 2007).

A la vista de los datos expuestos, se podría concluir que no existe un claro consenso respecto a la implicación de los receptores cannabinoide clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en la relajación ocasionada por los diferentes agonistas cannabinoide. Seguramente, las discrepancias o diferencias en la implicación de los mismos dependen del territorio vascular, de la especie estudiada y del agonista cannabinoide en cuestión (Randall y cols., 2004).

## ■ Otros receptores

Debido a que la relajación vascular ocasionada por los diferentes agonistas cannabinoídes no siempre podía ser atribuida a la acción de los receptores cannabinoídes clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, se propuso la implicación de nuevos receptores. Existen dos propuestas importantes al respecto. Por un lado, la implicación del receptor cannabinoíde denominado “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>”; y por otro lado, el clásico receptor vanilloíde TRPV1.

La posible existencia de un nuevo receptor cannabinoíde diferente a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> ya lo anunció el grupo de Wagner en el año 1999. Este grupo demostró, en arteria mesentérica de rata, que la anandamida y su análogo estable, metanandamida, ocasionaban una importante relajación vascular que sólo podía ser inhibida en presencia de concentraciones de rimonabant muy superiores a las necesarias para bloquear al receptor cannabinoíde CB<sub>1</sub> (Wagner y cols., 1999).

En la misma línea de resultados, el grupo de Járai mostró que el endocannabinoíde anandamida mantiene la vasorrelajación endotelio dependiente en ratones “knockout” para los receptores cannabinoídes clásicos, así se demuestra la existencia de un nuevo receptor endotelial para la anandamida diferente a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Este autor al receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” lo denomina también como “**receptor endotelial para anandamida**” (Járai y cols., 1999). A partir de estos trabajos, otros autores también confirman la participación de un nuevo receptor cannabinoíde diferente a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, sensible a rimonabant y localizado en el endotelio vascular en la relajación causada por la anandamida (White y cols., 2001; Mukhopadhyay y cols., 2002; O’Sullivan y cols., 2004b).

El receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” está implicado en la relajación ocasionada por la anandamida en lechos de resistencia y de conductancia de pequeño calibre (Járai y cols., 1999; White y cols., 2001; O’Sullivan y cols., 2004b), y hay indicios de la participación de este receptor en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en vasos de conductancia de gran calibre (Mukhopadhyay y cols., 2002).

En la actualidad se descarta que el receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” sea un receptor exclusivo para anandamida, porque existen trabajos que muestran la participación de este receptor en la relajación ocasionada por otros endocannabinoides como NADA, virodamina, y oleamida (O’Sullivan y cols., 2004a; Hoi y Hiley, 2006; Kozłowska y cols., 2008).

La similitud estructural entre anandamida y olvanil, agonista del receptor vanilloide **TRPV1**, sugería la posibilidad de interacción entre ambos sistemas (Begg y cols., 2005).

El primer trabajo que estudió esta posibilidad fue el realizado por el grupo de Zygmunt (Zygmunt y cols., 1999). En este trabajo se demostró que la relajación endotelio independiente que ocasiona la anandamida en arteria hepática es inhibida en presencia de capsazepina, antagonista del receptor TRPV1 o en presencia de antagonistas del receptor para CGRP (Zygmunt y cols., 1999). Posteriormente, otros autores también demuestran tanto en arterias de resistencia como de conductancia de pequeño calibre la participación total o parcial de los receptores TRPV1 en la relajación ocasionada por la anandamida (Harris y cols., 2002; O’Sullivan y cols., 2004b). Sin embargo, y aunque existen menor número de trabajos al respecto, todos los datos parecen indicar que en grandes arterias, como la aorta, la anandamida no media su relajación por intervención del receptor TRPV1 (O’Sullivan y cols., 2005).

El receptor TRPV1 también participa en la vasorrelajación causada por otros agonistas cannabinoides, como metanandamida, NADA,  $\Delta^9$ -THC, Win 55,212-2 y NADA, en arterias de resistencia y de conductancia (O’Sullivan y cols., 2004a; Breyne y Vanheel, 2006; Mukhopadhyay y cols., 2002; O’Sullivan y cols., 2005; Dannert y cols., 2007).

Por lo tanto, existe cierto consenso en admitir que algunos agonistas cannabinoides pueden activar al receptor vanilloide TRPV1, produciendo la liberación del CGRP, potente vasodilatador, desde las terminaciones nerviosas perivasculares. Además, hay estudios que demuestran que sólo la componente endotelio independiente

de la relajación ocasionada por los cannabinoides es bloqueada por capsazepina o por antagonistas del receptor CGRP (Pacher y cols., 2005; López-Miranda y cols., 2008).

El diferente grado de participación del receptor TRPV1 en las acciones vasculares de los cannabinoides, puede depender de la densidad del receptor y/o de la densidad de las terminaciones nerviosas perivasculares en los diferentes territorios vasculares (López-Miranda y cols., 2008).

### **3.4.2. Implicación de diferentes vías de señalización intracelular**

En este apartado se ha optado por clasificar los mecanismos en función de la estructura del vaso implicada. Así, los cannabinoides pueden actuar en el endotelio, MLV o en las terminaciones nerviosas perivasculares.

#### **■ Mecanismos dependientes de endotelio**

Tanto en arterias de resistencia como de conductancia se ha demostrado la participación del endotelio en el efecto vasodilatador de los cannabinoides (Zygmunt y cols., 1997; Pratt y cols., 1998; Grainger y Bochie-Ansah, 2001; Mukhopadhyay y cols., 2002).

Además, dicha vasorrelajación endotelio dependiente se relaciona con la liberación y síntesis de factores derivados del endotelio tales como **EDHF**, **NO** y **metabolitos derivados del AA**. La síntesis de estos factores puede estar mediada por receptor, pero también podrían sintetizarse por la acción directa de los cannabinoides. En todos los casos, estos factores endoteliales difunden hacia el MLV ocasionando relajación vascular por diferentes mecanismos (ver apartado 2.3 de la Introducción).

En arterias de resistencia, diferentes trabajos describen que la relajación endotelio dependiente ocasionada por los endocannabinoides es mediada por EDHF, vinculando la liberación de EDHF a la activación del receptor CB<sub>1</sub> o del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” (O’Sullivan y cols., 2004 a,b). En cambio, en arterias de conductancia la

relajación endotelio dependiente de los endocannabinoides es mediada mayoritariamente por NO, estando la síntesis del mismo también ligada a la activación del receptor CB<sub>1</sub> y “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” (Mukhopadhyay y cols., 2002; Romano y Lograno, 2006).

Por otra parte, los cannabinoides también pueden ocasionar relajación endotelio dependiente sin implicación de los receptores cannabinoides. Así, la relajación ocasionada por los endocannabinoides anandamida y virodamina en diferentes territorios vasculares depende parcialmente de la metabolización de los mismos (Pratt y cols., 1998; Fleming y cols., 1999; Grainger y Boachie-Ansah, 2001; Kozłowska y cols., 2008). Estos trabajos implican a dos posibles vías metabólicas, la **vía de las COX** y la **vía del citocromo P450**. Aunque hasta el momento no se han identificado exactamente los metabolitos del AA implicados en la vasorrelajación ocasionada por los endocannabinoides, hay datos que muestran que cuando la vía de las COX está implicada, se forma algún tipo de prostaglandina vasoactiva que podría ocasionar relajación del MLV (Fleming y cols., 1999; Grainger y Boachie-Ansah, 2001; Kozłowska y cols., 2008); y si lo que se activa es la vía del citocromo P450 se sintetizaría alguna clase/s de ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) hiperpolarizantes que podrían actuar sobre diferentes tipos de canales en el MLV, preferentemente canales de K<sup>+</sup> (Pratt y cols., 1998).

### ■ Mecanismos dependientes de MLV

En los efectos vasculares ocasionados por los cannabinoides dependientes de MLV se han involucrado fundamentalmente dos posibles mecanismos: la actuación a través de receptores cannabinoides y, la acción directa de éstos sobre canales (White y Hiley, 1998; Kagota y cols., 2001; Romano y Lograno, 2006).

Diferentes trabajos muestran que los receptores cannabinoides localizados en MLV, están implicados en la relajación endotelio independiente ocasionada por los mismos. Concretamente, se involucra al receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en la



vasorrelajación causada por cannabinoides tanto en arterias de resistencia y de conductancia de pequeño calibre, sin existir datos concluyentes en arterias de conductancia de gran calibre (White y Hiley, 1997, 1998; Kagota y cols., 2001; O'Sullivan y cols., 2004a,b). Destacar que ciertos trabajos muestran que los cannabinoides a través del receptor CB<sub>1</sub> pueden activar canales de diferente naturaleza (Gebremedhin y cols., 1999; Ishioka y Bukoski, 1999).

En cuanto al otro mecanismo propuesto, algunos estudios demuestran que los cannabinoides ocasionan hiperpolarización del MLV mediante la activación de canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (Plane y cols., 1997; White y Hiley, 1997; Randall y Kendall, 1998; White y cols., 2001; Romano y Lograno, 2006). Tampoco se descarta que los cannabinoides puedan activar otros tipos de canales de K<sup>+</sup> o nuevos tipos de canales de K<sup>+</sup>, diferentes a los descritos hasta el momento (Randall y cols., 1997; White y Hiley, 1997; Randall y Kendall, 1998; Zygmunt y cols., 1997). Determinar exactamente qué canales parecen estar implicados es difícil porque podría depender tanto del territorio vascular como del agonista cannabinoide implicado.

### ■ Mecanismos dependientes de las terminaciones nerviosas perivasculares

Como ya se comentó en el apartado 2.3 de la Introducción, las arterias están inervadas principalmente por terminaciones nerviosas simpáticas y sensoriales. Diferentes trabajos demuestran la participación de los cannabinoides en la modulación de la transmisión simpática y sensorial en arterias de resistencia (Ralevic y cols., 2002; Ralevic, 2003; Duncan y cols., 2004 a,b; Wilkinson y cols., 2007).

Los cannabinoides tanto endógenos como sintéticos pueden modular la transmisión simpática porque al activar a los receptores CB<sub>1</sub>, ubicados presinápticamente, inhiben la liberación de noradrenalina de las terminaciones simpáticas de las arterias y, por tanto pueden ocasionar inhibición de la contracción neurogénica simpática (Ralevic, 2003), ocasionando vasorrelajación. A pesar de no

estar clonados nuevos receptores cannabinoides, existen indicios que demuestran también la posibilidad de la participación de nuevos receptores implicados en la transmisión nerviosa simpática (Ralevic y Kendall, 2002).

Por otro lado, los cannabinoides a través de los receptores cannabinoides y de los receptores TRPV1 pueden modular la transmisión nerviosa sensorial. Así, está demostrado que los agonistas cannabinoides endógenos y sintéticos inhiben la vasorrelajación neurogénica sensorial en arterias de resistencia (Ralevic, 2003). Este efecto está mediado principalmente por los receptores CB<sub>1</sub> ubicados presinápticamente, pero de la misma manera que ocurre en la transmisión simpática, no se descarta la participación de nuevos receptores cannabinoides en la modulación de la transmisión nerviosa sensorial (Ralevic, 2003; Duncan y cols., 2004b).

# OBJETIVOS



En las últimas décadas ha aumentado el interés de la comunidad científica en estudiar los efectos fisiológicos y farmacológicos de los cannabinoides. De hecho, el sistema endocannabinoide se ha convertido en una nueva diana terapéutica. Cada día se identifican nuevos cannabinoides endógenos, nuevos derivados sintéticos y nuevas acciones fisiofarmacológicas de éstos, por lo que podemos decir que éste es un campo en continua evolución. Por ello, en esta Tesis Doctoral, como **primer objetivo** nos hemos planteado, hacer una revisión actualizada del sistema cannabinoide y sus efectos fisiofarmacológicos que sirva de Introducción a este tema.

Dentro de los efectos fisiofarmacológicos de los cannabinoides, los relacionados con el sistema vascular han adquirido importancia en los últimos años. Aunque estos efectos se conocen desde hace mucho tiempo, hoy en día todavía no existe un consenso claro acerca de si todos los territorios vasculares son sensibles a los efectos de los cannabinoides y cuáles son los mecanismos implicados.

Por ello, y para contribuir al conocimiento de los efectos vasculares de los cannabinoides, el **segundo objetivo planteado en esta Tesis Doctoral** es evaluar el efecto vascular del mismo cannabinoide, en este caso el endocannabinoide, anandamida, en dos territorios vasculares de diferente naturaleza.

**Para ello se evaluó:**

1. El efecto de la anandamida y su mecanismo de acción en una arteria de conductancia de gran calibre como la aorta de rata.
2. El efecto de la anandamida y su mecanismo de acción en un territorio de resistencia como lecho mesentérico de rata.



# MATERIAL Y MÉTODOS





## **1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

En la realización de este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho adultas, con un peso comprendido entre 250-325 g, procedentes de Harlan Ibérica (Barcelona, España). Los animales se colocaron en jaulas de 5 animales cada una y fueron estabulados en el animalario de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid. Los animales se mantuvieron a una temperatura ambiente de 22° C, humedad no superior al 60% y con fotoperiodos de 12 horas luz/oscuridad. La comida y agua se suministraron “ad libitum” hasta el momento del experimento. Para una perfecta aclimatación de los animales a las condiciones establecidas se dejó un periodo mínimo de adaptación de los mismos de 4 días desde el momento de su llegada hasta el día del experimento.

## **2. PREPARACIÓN DE AORTA AISLADA DE RATA**

En esta Tesis Doctoral se valoró el efecto del endocannabinoide, anandamida, en el sistema vascular. Para ello, se estudió dicho efecto en dos territorios diferentes:

- a.- En una arteria elástica de gran calibre: arteria aorta y,
- b.- En un lecho de resistencia: lecho mesentérico.

Las preparaciones elegidas para la realización de este trabajo se utilizan frecuentemente en nuestro laboratorio para valorar la funcionalidad vascular.

### **2.1. Obtención de la preparación**

Los animales fueron sacrificados por decapitación y posterior desangrado. Tras una incisión en la zona media del tórax se extrajo cuidadosamente la porción torácica de la aorta y se introdujo inmediatamente en una placa Petri que contenía solución de Krebs-Henseleit (K-H) fría.

A continuación, se eliminaron los restos de sangre del interior de la aorta y se procedió a la limpieza de la misma, eliminando el tejido conectivo y adiposo perivascolar. Una vez limpia, se cortó la arteria en anillos transversales de 3 a 4 mm de longitud con cuidado de no dañar el tejido.

En el caso de experimentos con anillos desprovistos de endotelio, éste se eliminó por raspado de la pared interior de la arteria previamente al montaje de la misma.

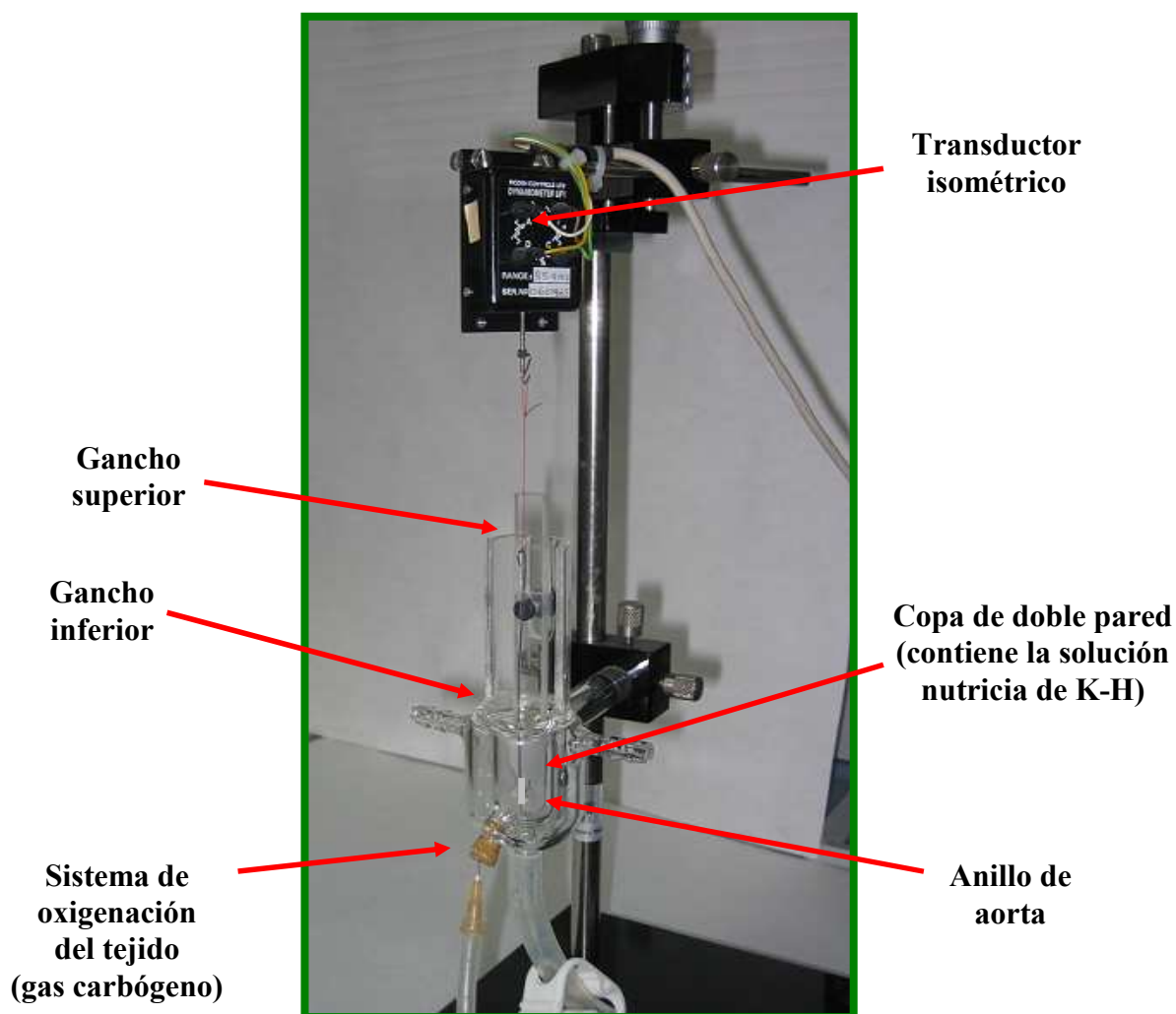
## **2.2. Montaje de la preparación**

El montaje de la preparación de aorta de rata se hizo en baño de órganos. Los anillos fueron fijados verticalmente con dos ganchos de acero inoxidable y suspendidos en copas de 5 ml de capacidad. Las copas contenían solución de K-H a 37°C burbujeada con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>).

El gancho inferior está fijo y el gancho superior se conectó a un transductor isométrico (Cibertec S.A, Madrid, España) que registró los cambios en el tono de la preparación. Para el registro de dichos cambios en el tono vascular se utilizó un sistema de adquisición de señales analógicas Powerlab/4e (paquete informático Chart 4.1).

Una vez montados, los anillos de aorta se sometieron a una tensión inicial de 2 g seguido de un periodo de estabilización de 90 minutos. Durante este periodo se realizaron lavados sucesivos de la preparación a intervalos de 15 minutos y reajustando la tensión a 2 g cuando fuera necesario.

En la Figura 24 se muestra un esquema del sistema de montaje de la preparación de aorta aislada de rata en baño de órganos.

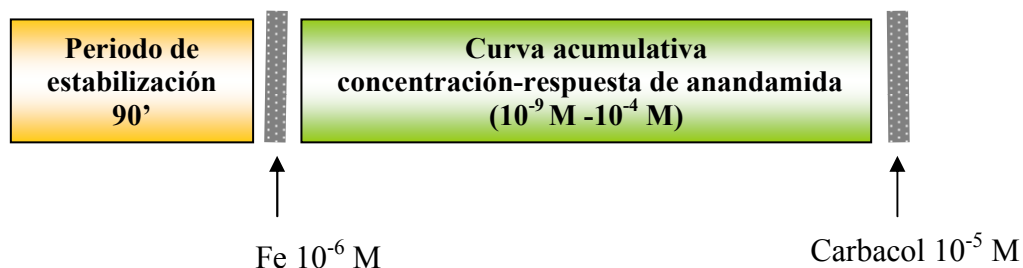


**Figura 24.** Sistema de montaje de la preparación de aorta aislada de rata en baño de órganos.

### 2.3. Protocolo experimental

Tras el periodo de estabilización de la preparación se comenzó el experimento propiamente dicho. Se realizó una precontracción submaximal de la preparación con fenilefrina (Fe) ( $10^{-6}$  M) y una vez estable el tono vascular se llevó a cabo la curva acumulativa concentración-respuesta del agonista cannabinoide anandamida ( $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M). La administración de las concentraciones crecientes de agonista se realizó cada 7-10 minutos, tiempo medio necesario para que se alcance el efecto máximo de cada concentración administrada. Para finalizar, se comprobó la funcionalidad endotelial de la preparación añadiendo al baño de órganos el agonista muscarínico, carbacol, a la

concentración de  $10^{-5}$  M. En la Figura 25 se muestra el protocolo seguido para valorar el efecto vascular de la anandamida en la preparación de aorta aislada de rata.



**Figura 25.** Protocolo experimental para valorar el efecto vascular de la anandamida en la preparación de aorta aislada de rata.

Estos experimentos se llevaron a cabo tanto en arterias intactas, como en arterias desnudas de endotelio. Preparaciones con contracciones a Fe inferiores a 0.5 g y superiores a 1.2 g se descartaron. De la misma manera, se consideraron arterias intactas aquellas que presentaron una relajación superior al 70% tras la administración de carbacol, y arterias sin endotelio las que tenían una relajación inferior al 10% tras la administración de carbacol. Se descartaron aquellos anillos de aorta que presentaron relajaciones intermedias tras la administración de carbacol.

Una vez comprobado que la anandamida ocasionaba efectos vasculares sobre la preparación de aorta aislada de rata se realizaron diferentes experimentos para evaluar el/los mecanismo/s de acción implicados en dicho efecto. A continuación, se detallan los antagonistas y/o inhibidores utilizados para dicho fin.

- La implicación de **receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$**  se valoró con la administración de **toxina pertussis**, inhibidor específico de dicha proteína (Petitcolin y cols., 2001).

- La participación de **receptores cannabinoides** se valoró con la administración de los siguientes antagonistas de los mismos:
  - **Rimonabant**, antagonista selectivo del receptor **CB<sub>1</sub>** (Rinaldi-Carmona y cols., 1994).
  - **SR144528**, antagonista selectivo del receptor **CB<sub>2</sub>** (Rinaldi-Carmona y cols., 1998).
  - **O1918**, antagonista del receptor cannabinoide descrito en el sistema vascular y denominado “**No-CB<sub>1</sub>/ No-CB<sub>2</sub>**” (Offertáler y cols., 2003).
  
- La participación del **sistema vanilloide** se evaluó con la administración de los siguientes antagonistas:
  - **Capsazepina**, antagonista selectivo del receptor **TRPV1** (Jakab y cols., 2005).
  - **CGRP<sub>8-37</sub>**, antagonista selectivo del receptor **CGRP** (Ralevic y cols., 2000).
  
- La participación del **NO** en los efectos vasculares de la anandamida se evaluó con la administración de **L-NAME**, inhibidor específico de la eNOS (Engler y cols., 2000).
  
- La implicación del **EDHF** se valoró con la administración conjunta de las toxinas **apamina** y **charibdotoxina** (Pérez-Vizcaino y cols., 1999).
  
- La implicación de **metabolitos derivados del AA** se evaluó con la administración de los siguientes inhibidores:
  - La **metabolización** de la anandamida en AA y etanolamina por la enzima **FAAH** se valoró con **URB597**, inhibidor selectivo de dicha enzima (Batkái y cols., 2004).

- La participación de la **vía del citocromo P450** se valoró con **17-ODYA**, inhibidor específico de dicha enzima (Grainger y Boachie-Ansah, 2001).
- La participación de la **vía de las COX** se valoró con los siguientes inhibidores:
  - **Indometacina**, inhibidor no selectivo de las COX (Tep-areenan y cols., 2003).
  - **SC560**, inhibidor selectivo de la **COX-1** (Bolla y cols., 2004).
  - **DFU**, inhibidor selectivo de la **COX-2** (Riendeau y cols., 1997).
  
- La implicación del **receptor EP<sub>4</sub>** en los efectos vasculares de la anandamida se evaluó con la administración del antagonista selectivo, **GW627368X** (Wilson y cols., 2006).
  
- La participación del **transportador de anandamida** en el efecto de la misma se valoró con la administración de **AM404**, inhibidor de dicho transportador (Grainger y Boachie-Ansah, 2001).

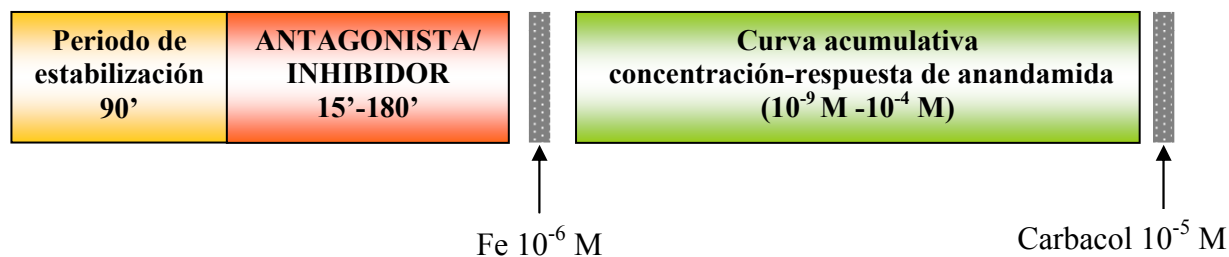
En la Tabla 2 se muestran, por orden alfabético, los antagonistas/inhibidores mencionados anteriormente, así como, la concentración y el tiempo de incubación usados en cada caso concreto.

**TABLA 2**

Concentraciones y tiempos de incubación de los antagonistas/inhibidores empleados en los ensayos de aorta de rata

<b>ANTAGONISTA/ INHIBIDOR</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>TIEMPO INCUBACIÓN (min)</b>
AM404	10 $\mu$ M	30
APAMINA	100 nM	30
CAPSAZEPINA	100 nM	30
CHARIBDOTOXINA	100 nM	30
CGRP <sub>8-37</sub> (rata)	3 $\mu$ M	30
DFU	0.1 $\mu$ M	30
GW627368X	1 y 3 $\mu$ M	30
INDOMETACINA	10 $\mu$ M	30
L-NAME	100 $\mu$ M	30
O1918	10 $\mu$ M	15
17-ODYA	5 $\mu$ M	30
RIMONABANT	1 y 3 $\mu$ M	15
SC560	1 $\mu$ M	30
SR144528	1 y 3 $\mu$ M	15
TOXINA PERTUSSIS	300 ng/ml	180
URB597	1 $\mu$ M	30

Los diferentes antagonistas/inhibidores utilizados para evaluar el/los mecanismo/s de acción implicados en los efectos vasculares de la anandamida, y expuestos anteriormente, se añadieron al baño de órganos antes de proceder a la contracción submaximal con Fe. En la Figura 26 se muestra el protocolo seguido para valorar el efecto vascular de la anandamida en presencia de antagonistas/inhibidores en la preparación de aorta aislada de rata.



**Figura 26.** Protocolo experimental para valorar el efecto vascular de la anandamida en presencia de antagonistas/inhibidores en la preparación de aorta aislada de rata.

### 3. PREPARACIÓN DE LECHO MESENTÉRICO AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA

#### 3.1. Obtención de la preparación

De igual forma que en la preparación de aorta de rata, los animales fueron sacrificados por decapitación y posterior desangrado. A continuación se realizó una incisión en la zona abdominal y se desplazó lateralmente y con cuidado la masa intestinal, para poder acceder a la arteria mesentérica superior. Para canular la arteria mesentérica superior se realizó una pequeña incisión justo en la unión con la porción abdominal de la aorta, luego se introdujo una cánula de polietileno de 40 mm de sección, que se sujetó mediante un doble nudo con hilo quirúrgico a la arteria mesentérica superior. Para evitar la coagulación sanguínea, el lecho fue perfundido durante la obtención de la preparación con solución K-H que contenía heparina sódica (40 UI/ml) a temperatura constante (37°C) y oxigenada con gas carbógeno.

Una vez canulada la arteria mesentérica superior se diseccionó el lecho mesentérico. Para ello, con una fina tijera y comenzando por el ciego y bordeando el intestino, se va cortando cuidadosamente hasta dejar completamente separado el lecho mesentérico del intestino. Por último, y para la completa separación del lecho se seccionó la arteria mesentérica superior de la arteria aorta abdominal.



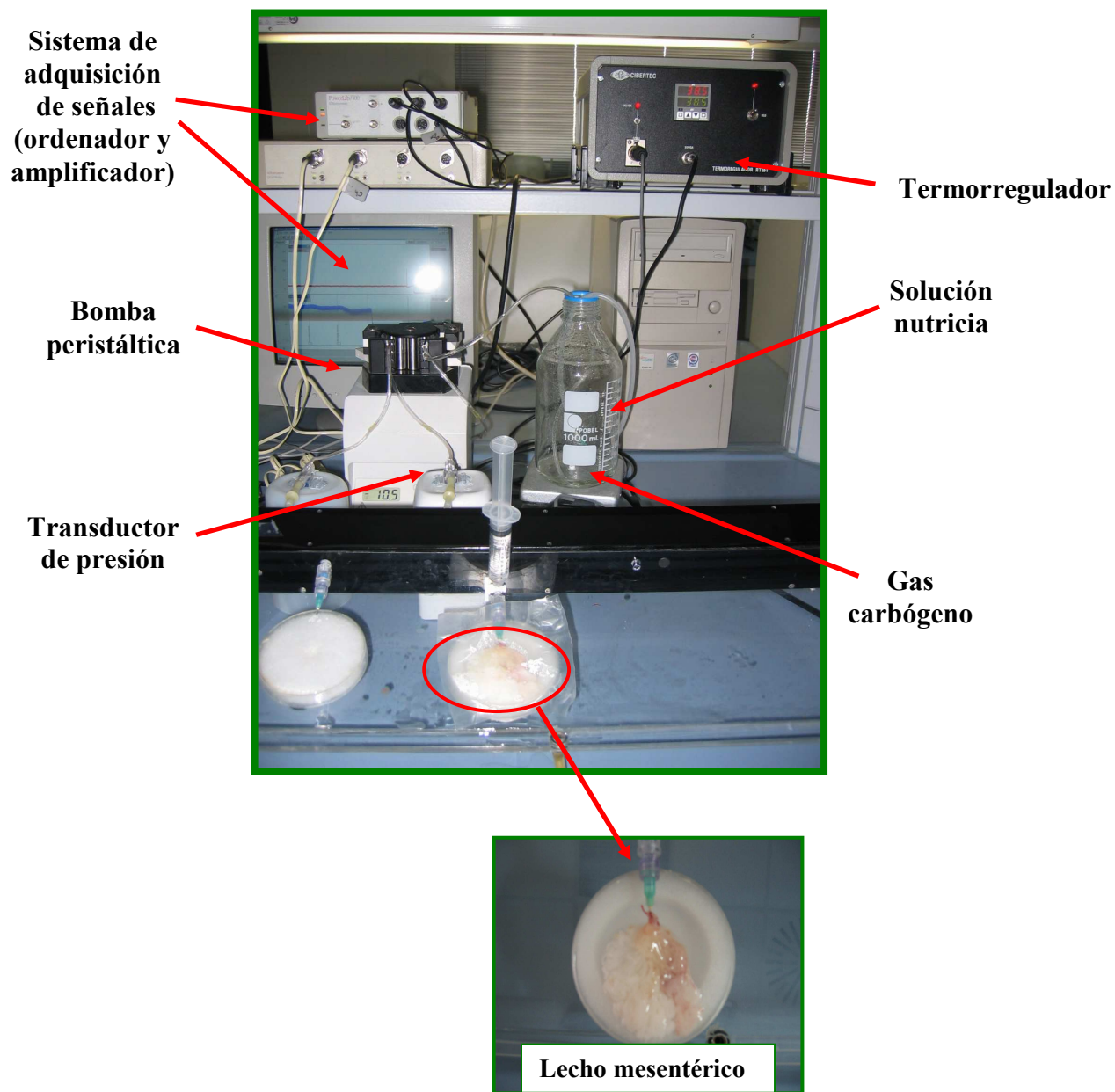
En ocasiones, los experimentos se llevaron a cabo en preparaciones sin endotelio. La manera de eliminar el endotelio en el lecho mesentérico se describe en el apartado 3.3 de Material y Métodos.

### **3.2. Montaje de la preparación**

Una vez separado el lecho mesentérico del animal, éste se conectó a través de una cánula a un transductor de presión (Transpac IV, laboratorios Abbott, Irlanda), que registra los cambios de presión de perfusión en la preparación. Este transductor se acopló a su vez a un sistema de adquisición de señales analógicas Powerlab/4e (paquete informático Chart 4.1).

A continuación, el lecho mesentérico se perfundió con solución K-H a un flujo constante de 2 ml/min, burbujeado con gas carbógeno y usando una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, EE.UU). Para mantener la preparación a una temperatura constante de 37°C se utilizó un termorregulador (RTM-1, Cibertec S.A, Madrid, España). Una vez montado el lecho mesentérico, la preparación se sometió a un periodo de estabilización de 30 minutos.

En la Figura 27 se muestra el sistema de perfusión necesario para realizar los ensayos en lecho mesentérico aislado y perfundido de rata.



**Figura 27.** Sistema de montaje de la preparación de lecho mesentérico aislado y perfundido de rata.

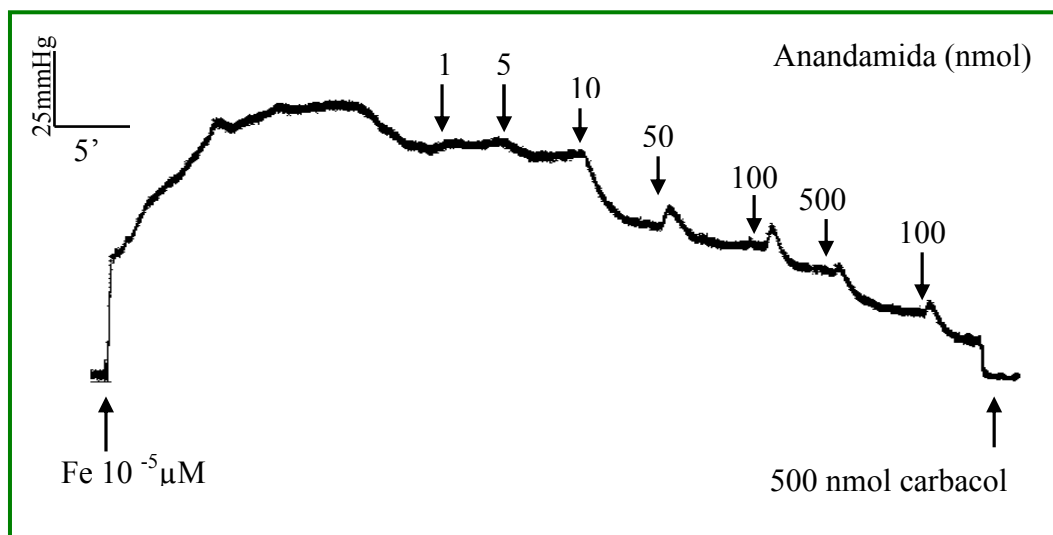
### 3.3. Protocolo experimental

Tras someter el lecho mesentérico a un periodo de estabilización de 30 minutos se inició el experimento propiamente dicho. La preparación se perfundió continuamente con Fe a la concentración de  $10^{-5}$  M, con lo que se logró una contracción submaximal. Una vez estable dicha contracción, se realizó la curva acumulativa concentración-respuesta del agonista cannabinoide anandamida (1 nmol-1000 nmoles). La administración del cannabinoide se realizó en bolo y en concentraciones crecientes. Las administraciones en bolo no excedieron en volumen a 50  $\mu$ l para evitar un cambio significativo en el flujo de perfusión de la preparación. Cada concentración se administró inmediatamente después que la anterior ejerciera su efecto máximo, es decir, aproximadamente cada 4-6 minutos. Para comprobar la funcionalidad endotelial, después de realizar la curva acumulativa concentración-respuesta de anandamida se añadieron 500 nmoles de carbacol en bolo. Estos experimentos se llevaron a cabo tanto en lechos mesentéricos intactos como en lechos denudados de endotelio.

En los experimentos en los que se requirió un lecho desprovisto de endotelio se procedió de la siguiente manera: después del periodo de estabilización se perfundió el lecho mesentérico con una solución de deoxicolato sódico al 0.3% durante 40 sg (Cusma-Pelógia y cols., 1993). A continuación, se sometió el lecho a un nuevo periodo de estabilización de 30 minutos. Terminado este periodo se precontrajo la preparación con Fe y se realizó la curva acumulativa concentración-respuesta de anandamida como se expuso anteriormente.

Aquellos lechos con contracciones a Fe inferiores a 40 mmHg y superiores a 100 mmHg se desecharon. De la misma manera, se consideraron lechos intactos aquellos que presentaron una relajación superior al 70% tras la administración de carbacol, y lechos sin endotelio los que tienen una relajación inferior al 12% tras la administración de carbacol. Se descartaron aquellos lechos que presentaron relajaciones intermedias tras la administración de carbacol.

La Figura 28 muestra un registro de la curva acumulativa concentración-respuesta de anandamida llevados a cabo en lecho mesentérico aislado y perfundido de rata, y en la que se especifica el protocolo experimental seguido.



**Figura 28.** Registro de una curva acumulativa concentración-respuesta de anandamida en lecho mesentérico aislado y perfundido de rata. Las flechas de la parte superior del registro señalan los puntos de administración del cannabinoide.

Una vez comprobado que la anandamida ocasiona efectos vasculares sobre la preparación de lecho mesentérico aislado y perfundido de rata, se realizaron diferentes experimentos para evaluar el/los mecanismo/os de acción implicados en dicho efecto. A continuación, se detallan los antagonistas e inhibidores utilizados para dicho fin.

- La implicación de **receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$**  se valoró mediante la administración de **toxina pertussis**, inhibidor específico de dicha proteína (Schultz y cols., 1998). En este caso en concreto, la toxina pertussis se inyectó intraperitonealmente a la dosis de  $10 \mu\text{g/Kg}$  48 horas antes del experimento. Los animales pertenecientes a este grupo experimental se sacrificaron pasado este tiempo y, a continuación, se procedió de la misma manera que en los otros grupos experimentales.

- La participación de **receptores cannabinoides** se valoró mediante la administración de los siguientes antagonistas de los mismos:
  - **AM251**, antagonista selectivo del receptor **CB<sub>1</sub>** (Stanford y cols., 2001).
  - **AM630**, antagonista selectivo del receptor **CB<sub>2</sub>** (Wilkinson y cols., 2007).
  - **O1918**, antagonista del receptor “**No-CB<sub>1</sub>/ No-CB<sub>2</sub>**” (Hoi y Hiley, 2006).
  
- La participación del **sistema vanilloide** se valoró mediante la administración de **capsazepina**, antagonista selectivo del receptor **TRPV1** (Wilkinson y cols., 2007).
  
- La implicación de **canales de K<sup>+</sup>** se evaluó mediante la administración de **TEA**, inhibidor inespecífico de dichos canales (Mendizábal y cols., 2001).

En la Tabla 3 se muestran, por orden alfabético, los antagonistas/inhibidores mencionados anteriormente, así como, la concentración y el tiempo de incubación usados en cada caso concreto.

**TABLA 3**

Concentraciones y tiempos de incubación de los antagonistas/inhibidores empleados en lecho mesentérico aislado y perfundido de rata

ANTAGONISTA/INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN	TIEMPO INCUBACIÓN (min)
AM251	1 y 3 $\mu$ M	30
AM630	1 y 3 $\mu$ M	30
CAPSAZEPINA	1 y 3 $\mu$ M	30
O1918	10 $\mu$ M	30
TEA	10 mM	30
TOXINA PERTUSSIS	10 $\mu$ g/Kg	---

Cuando las curvas acumulativas concentración-respuesta de la anandamida se realizaron en presencia de antagonistas/inhibidores, exceptuando la toxina pertussis, éstos se añadieron a la perfusión antes que la Fe. Los antagonistas e inhibidores se mantuvieron en la perfusión durante toda la realización del experimento.

## 4. SOLUCIONES Y COMPUESTOS UTILIZADOS

### 4.1. Preparación de la solución fisiológica de Krebs-Henseleit

Como solución nutricia para la realización de los experimentos en las dos preparaciones vasculares se ha utilizado la solución fisiológica de Krebs-Henseleit (López-Miranda y cols., 2004). Esta solución fisiológica se preparó a partir de una solución madre constituida por las sales que se indican en la Tabla 4.

**TABLA 4**

Concentración de las sales que constituyen la solución madre de Krebs-Henseleit

SALES	CONCENTRACIÓN (M)
NaCl	1.41
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.014
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.014
KCl	0.056
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.023

La solución de K-H se preparó diariamente mezclando 84 ml de la solución madre con 2 g de glucosa y 2 g de bicarbonato sódico. A continuación, se enrasó hasta un litro con agua destilada y se agitó hasta homogenización de la misma.

La Tabla 5 muestra la concentración final de sales y glucosa en la solución de K-H utilizada en los experimentos de este trabajo.

**TABLA 5**

Concentración de glucosa y de las diferentes sales empleadas en la solución de Krebs-Henseleit.

<b>SALES</b>	<b>CONCENTRACIÓN (mM)</b>
NaCl	118
KCl	4.75
MgSO <sub>4</sub>	1.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25
CaCl <sub>2</sub>	2.54
<b>GLUCOSA</b>	11.0

La glucosa y las diferentes sales necesarias para la preparación de la solución de K-H fueron suministradas por Panreac Química S.A. (Barcelona, España).

#### **4.2. Disolución del cannabinoide anandamida**

Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio estableció que el DMSO al 0.5% es un vehículo idóneo para disolver la anandamida sin afectar la funcionalidad vascular (López-Miranda y cols., 2004). Por tanto, en este trabajo se ha utilizado dicho vehículo para disolver la anandamida.

Para la realización de los experimentos en aorta de rata, se hizo una solución madre de anandamida que corresponde a una concentración de  $10^{-2}$  M. Para ello, se eliminó, por evaporación, el etanol de 700  $\mu$ l de solución comercial de anandamida (5mg/ml), empleando una bomba de vacío (Aspirador A-3S, EYELA, Japón) y leve calentamiento. A continuación, el residuo resultante se dispersó en 1 ml de DMSO al 0.5%, para conseguir una disolución madre de molaridad  $10^{-2}$  M. Para asegurar una dispersión homogénea, la solución de DMSO al 0.5% se va añadiendo en volúmenes de 100  $\mu$ l de manera creciente y con continua agitación.

En los experimentos en lecho mesentérico de rata, la disolución del endocannabinoide se realizó de la misma manera excepto que la concentración de la solución madre de anandamida fue  $2 \times 10^{-2}$  M.

Para la realización de las curvas acumulativas concentración-respuesta de anandamida en los dos tipos de preparaciones empleadas en este trabajo de investigación fue necesario hacer diluciones de las soluciones madre descritas anteriormente. Estas diluciones se hicieron seriadamente mezclando 1 volumen de la solución correspondiente con 9 volúmenes de agua destilada.

Las soluciones madre y las diluciones fueron siempre preparadas en el mismo día del experimento y protegidas de la luz. Las agitaciones se realizaron con vortex.

### 4.3. Compuestos utilizados

A continuación se citan los antagonistas/inhibidores y los diferentes compuestos utilizados, así como los disolventes empleados para la disolución de los mismos. Además, se especifica la casa comercial de la que se obtuvieron.

- **AM251 (N-piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H pirazola-3-carboxamida).** Tocris Cookson (Bristol, Reino Unido).
- **AM404 (N-(4-hidroxi-fenil)-5,8,11,14-eicosatetraenamida).** Tocris Cookson (Bristol, U.K).
- **AM630 (6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il(4 metoxifenil) metanona).** Tocris Cookson (Bristol, Reino Unido).
- **Anandamida (N-araquidoniletanolamida).** Tocris Cookson (Bristol, Reino Unido).
- **Apamina.** Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **Capsazepina (N-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzacepina-2-carbotioamida).** Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **Carbacol (carbamato de (2-hidroxi)etil)trimetilamonio).** Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).



- **CGRP<sub>8-37</sub> (rata)**. Tocris Cookson (Bristol, Reino Unido).
- **Charibdotoxina**. Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **Deoxicolato sódico**. Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **DFU (5,5-dimetil-3-(3fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil)fenil-2(5H)-furanona)**. Donado por Merck Sharp & Dohme (Madrid, España).
- **DMSO (dimetilsulfóxido)**. Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- **Fenilefrina ((R)-(-)-1-(3-hidroxifenil)-2-metilaminoetanol)**. Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **GW627368X (N-(2-[4-(4,9-dietoxy-1-oxo-1,3-dihidro-2H-benzo[f]isoindol-2-il)fenil]-acetil)bencenosulfonamida)**. Donado por GlaxoSmithKline (Stevenage, Reino Unido).
- **Heparina Sódica**. Laboratorios Rovi S.A. (Madrid, España).
- **Indometacina (ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético)**. Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **L-NAME (Nω-nitro-L-argininametil ester)**. Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **O1918 (1,3-dimetoxi-5-metil-2[(1R,6R)-3metil-6-(1-metiletetil)-2-ciclohexen-1-il]-benceno)**. Tocris Cookson (Bristol, Reino Unido).
- **17-ODYA (ácido 17-octadecinoico)**. Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **Rimonabant (N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazola-3-carboxamida)**. Donado por Sanofi Recherche (Montpellier, Francia).
- **SC560 (5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-trifluorometilpirazola)**. Donado por laboratorios Menarini (Barcelona, España).
- **SR144528 (N-((1S)-endo-1, 3, 3-trimetil biciclo (2.2.1) heptan-2il)-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-(4-metilbencil) pirazola-3-carboxamida)**. Donado por Sanofi Recherche (Montpellier, Francia).
- **TEA (tetraetilamonio)**. Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Reino Unido).
- **Toxina pertussis**. Research Biochemicals International (RBI, EE.UU)

- **URB597 (3'-carbamoil-bi-fenil-3-il-ciclohexilcarbamato).** Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Minnesota, EE.UU).

Apamina, carbacol, CGRP<sub>8-37</sub> (rata), charibdotoxina, fenilefrina, L-NAME, TEA y toxina pertussis se disolvieron en agua destilada.

AM251, AM404, AM630, capsazepina, DFU, indometacina, O1918, 17-ODYA, rimonabant, SC560, SR144528 y URB597 se disolvieron en etanol.

Deoxicolato sódico se disolvió en suero salino.

Tanto en la preparación de aorta como de lecho mesentérico utilizadas, el etanol puede modificar la funcionalidad de la preparación (López-Miranda y cols., 2004). Por lo tanto, y para evitar dicha modificación en la preparación de aorta de rata la concentración total de etanol añadida nunca fue superior a 0.017 M; y en la preparación de lecho mesentérico la concentración máxima utilizada de etanol en la perfusión fue del 0.1%.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las contracciones ocasionadas por Fe en la preparación de aorta aislada se expresaron en gramos, y en la preparación de lecho mesentérico aislado y perfundido de rata se expresaron en mmHg.

Las respuestas obtenidas para la anandamida en ambas preparaciones estudiadas se expresaron como el tanto por ciento de relajación del tono inducido por Fe, considerando la altura de la contracción con Fe como el 100% en ambas preparaciones. Además, se calculó la concentración eficaz 50 (CE<sub>50</sub>), concentración de anandamida que produce la mitad del efecto máximo (E<sub>máx</sub>), a partir de las curvas concentración-respuesta de anandamida. El cálculo de la pCE<sub>50</sub> se realizó con el programa informático Prisma 4.

$$Y = \text{mínimo} + (\text{máximo} - \text{mínimo}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{pendiente})})$$

**Mínimo:** efecto obtenido a la menor concentración utilizada; **pendiente:** pendiente de la curva; **máximo:** efecto obtenido a la mayor concentración utilizada; **X:** logaritmo de la concentración; **Y:** efecto obtenido a la concentración X.

Los resultados numéricos de esta Tesis Doctoral se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de los valores obtenidos. Para los ensayos en aorta, “n” corresponde al número de animales utilizados para cada grupo experimental (4-9 animales), y se obtiene de 2-3 preparaciones de cada animal. De la misma manera, en los ensayos en lecho mesentérico aislado y perfundido, “n” corresponde al número de animales empleados para cada grupo experimental y que fue de 4 a 6 animales.

Las comparaciones estadísticas de las contracciones ocasionadas por Fe y de los valores obtenidos de pCE<sub>50</sub> en ambas preparaciones se realizaron mediante el test de la *t* de Student para datos no pareados. Las comparaciones estadísticas de las curvas acumulativas concentración-respuesta de los ensayos realizados en aorta y en lecho mesentérico se realizaron mediante un análisis de varianza (test ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Bonferroni/Dunn. Se han considerado diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad de  $P \leq 0.05$ . El programa informático empleado en el análisis estadístico fue Prisma 4.



# RESULTADOS

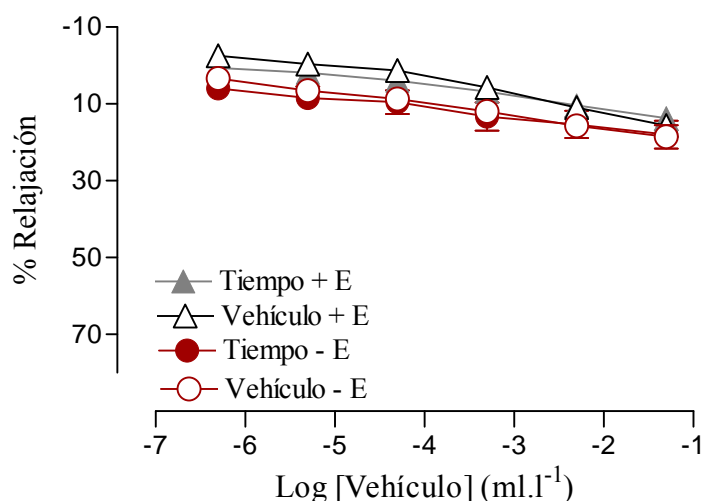


## 1. ENSAYOS EN AORTA AISLADA DE RATA

### 1.1. VALORACIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR DE LA ANANDAMIDA

#### 1.1.1. Efecto del vehículo de la anandamida sobre la función vascular de aorta de rata

Los cannabinoides son compuestos altamente liposolubles. Ésto supone un problema adicional que obliga a disolver estos compuestos en solventes de diferente naturaleza química. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se demostró que el DMSO 0.5% es un vehículo idóneo para disolver la anandamida y evaluar su efecto vascular porque no modifica la funcionalidad de la preparación (López-Miranda y cols., 2004). El **DMSO 0.5%** no produjo cambios en el tono vascular de la preparación de aorta de rata precontraída con Fe ni en anillos intactos, ni en los denudados de endotelio, obteniéndose valores similares al grupo tiempo correspondiente (Figura 29).



**Figura 29.** Efecto del vehículo (DMSO 0.5%) sobre el tono vascular de anillos de aorta de rata intactos (+E) y denudados de endotelio (-E) precontraídos con Fe  $10^{-6}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

De la misma manera, este vehículo no modificó la funcionalidad endotelial (relajación ocasionada por  $10^{-5}$  M de carbacol) en anillos de aorta intactos y denudados de endotelio (Tabla 6).

**TABLA 6**

Relajaciones ocasionadas por carbacol en anillos de aorta de rata intactos (+E) y denudados de endotelio (-E) en los grupos experimentales de tiempo y vehículo

GRUPO EXPERIMENTAL	RELAJACIÓN CARBACOL $10^{-5}$ M (%)
<b>Tiempo + E</b>	88.21±4.34
Vehículo (DMSO 0.5%) + E	91.70±6.72
<b>Tiempo - E</b>	6.16±0.82
Vehículo (DMSO 0.5%) - E	2.52±0.47

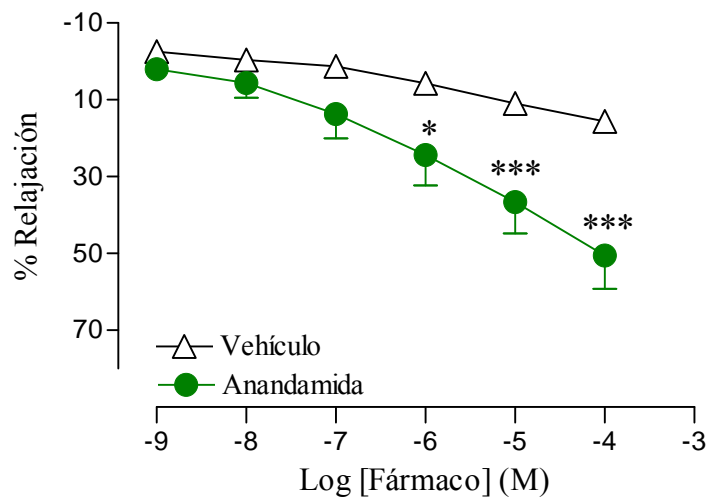
Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

### 1.1.2. Efecto de la anandamida sobre el tono vascular de aorta de rata

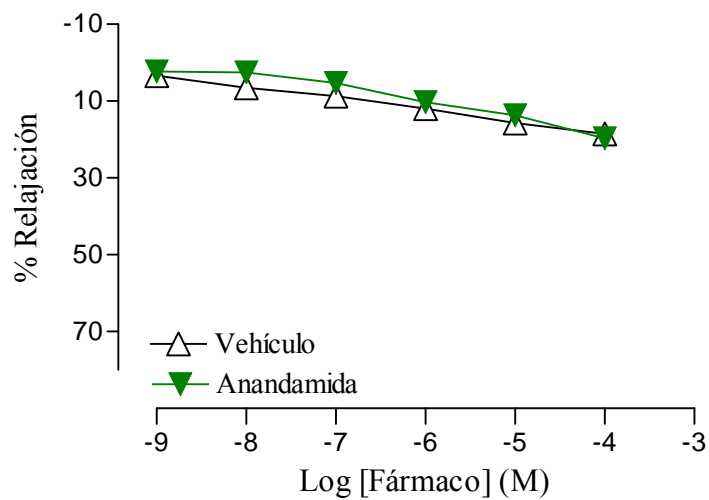
En **preparaciones intactas**, la anandamida ocasionó una disminución concentración-dependiente en el tono vascular que resultó estadísticamente significativa respecto a la obtenida en los anillos del grupo vehículo correspondiente (anandamida +E:  $E_{m\acute{a}x}$  50.60±8.70% (n=6)  $P < 0.001$  vs vehículo +E:  $E_{m\acute{a}x}$  15.68±2.53% (n=5)) (Figura 30a). Contrariamente a lo que sucedía en arterias intactas, la anandamida no ocasionó vasorrelajación en anillos de aorta **denudados de endotelio** (anandamida -E:  $E_{m\acute{a}x}$  19.81±3.14% (n=6) vs vehículo -E:  $E_{m\acute{a}x}$  18.60±2.95% (n=5)) (Figura 30b).



a)



b)



**Figura 30.** Efecto de la anandamida sobre el tono vascular de anillos de aorta de rata intactos (a) y denudados de endotelio (b) precontractados con  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs vehículo).

**Dado que la respuesta vasodilatadora de la anandamida en aorta de rata únicamente se observó en anillos con endotelio, el resto de los experimentos llevados a cabo en esta preparación se realizaron con el endotelio intacto.**

## **1.2. VALORACIÓN DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA VASORRELAJACIÓN OCASIONADA POR LA ANANDAMIDA EN AORTA DE RATA**

### **1.2.1. Efecto de los diferentes antagonistas/inhibidores o su vehículo sobre la función vascular de aorta de rata**

Para valorar el efecto de los diferentes antagonistas/inhibidores utilizados en este trabajo sobre la función vascular de la preparación, se evaluó el efecto que la administración de los mismos ocasionaba sobre el tono basal (tono de la preparación tras el período de estabilización y antes de comenzar el experimento propiamente dicho), sobre la contracción producida por  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$  y sobre la vasorrelajación ocasionada por  $10^{-5} \text{ M}$  de carbacol.

Ninguno de los antagonistas/inhibidores utilizados en este trabajo modificó significativamente el tono basal de la preparación cuando fueron administrados tras el periodo de estabilización de la misma y antes de la precontracción de los anillos con Fe, resultando la máxima variación encontrada de 0.10 g (Tabla 7).

En todos los grupos experimentales, excepto en el grupo L-NAME  $100 \mu\text{M}$ , la precontracción ocasionada por la administración de  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$  resultó similar entre sí y a la obtenida en el grupo de tiempo. Todas las precontracciones a Fe de los diferentes grupos experimentales excepto en el grupo de L-NAME estaban dentro de los parámetros de inclusión establecidos en esta Tesis Doctoral. De la misma manera, en todos los grupos experimentales excepto en el grupo L-NAME  $100 \mu\text{M}$ , la administración de carbacol a la concentración de  $10^{-5} \text{ M}$  provocó una disminución en el tono vascular que fue superior al 70%, valor mínimo necesario fijado en este trabajo como criterio de inclusión para considerar las preparaciones intactas (Tabla 7).

En aquellos grupos en los que el vehículo del antagonista era etanol, también se evaluó el efecto de dicho vehículo en la función vascular de la preparación. El etanol a la concentración de 0.017 M no modificó ni el tono basal, ni la precontracción por Fe, ni la relajación por carbacol en anillos intactos de aorta de rata (Tabla 7).

**TABLA 7**

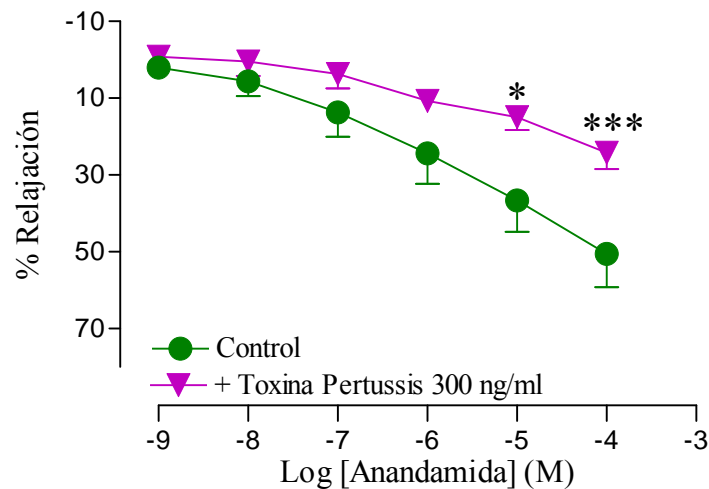
Variación en el tono basal, precontracción producida por Fe y relajación ocasionada por carbacol en los grupos control experimentales de antagonistas/inhibidores y el vehículo etanol en anillos intactos de aorta de rata.

GRUPO EXPERIMENTAL	$\Delta$ TONO VASCULAR BASAL (g)	CONTRACCIÓN Fe $10^{-6}$ M (g)	RELAJACIÓN CARBACOL $10^{-5}$ M (%)
<b>Tiempo</b>	0.04±0.02	0.92±0.06	88.21±4.34
Vehículo (etanol absoluto)	0.02±0.01	0.98±0.12	94.85±12.01
Toxina pertussis 300 ng/ml	0.08±0.01	1.14±0.09	79.45±7.48
Rimonabant 1 $\mu$ M	0.03±0.01	1.07±0.11	73.66±7.32
Rimonabant 3 $\mu$ M	0.01±0.01	0.92±0.08	76.31±4.84
SR144528 1 $\mu$ M	0.05±0.02	0.90±0.09	76.98±3.57
SR144528 3 $\mu$ M	0.05±0.01	0.76±0.08	73.76±5.15
Rimonabant+SR144528 1 $\mu$ M	0.04±0.02	0.96±0.15	79.02±12.16
O1918 10 $\mu$ M	0.08±0.01	1.16±0.08	78.23±6.00
Capsazepina 100 nM	0.02±0.01	0.86±0.06	75.32±7.12
CGRP <sub>8-37</sub> 3 $\mu$ M	0.05±0.01	0.95±0.11	81.66±4.38
L-NAME 100 $\mu$ M	0.00±0.02	1.44±0.09 <sup>***</sup>	6.12±1.28 <sup>***</sup>
Apamina+Charidobtoxina 100 nM	0.03±0.01	1.04±0.09	87.88±12.82
URB597 1 $\mu$ M	0.04±0.01	1.06±0.10	89.08±6.40
17-ODYA 5 $\mu$ M	0.06±0.04	0.97±0.07	73.73±3.64
Indometacina 10 $\mu$ M	0.04±0.02	1.09±0.09	75.22±3.13
SC560 1 $\mu$ M	0.08±0.02	1.05±0.10	78.40±7.86
DFU 0.1 $\mu$ M	0.04±0.00	0.94±0.10	83.97±9.26
GW627368X 1 $\mu$ M	0.04±0.01	1.06±0.03	72.31±6.82
GW627368X 3 $\mu$ M	0.07±0.01	1.17±0.12	74.07±7.96
AM404 10 $\mu$ M	0.10±0.02	1.00±0.08	80.26±1.76

Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales. \*\*\*P<0.001 vs control (tiempo).

## 1.2.2. Implicación de receptores acoplados a proteína $G_{i/o}$

El pretratamiento de los anillos con **toxina pertussis** a la concentración de 300 ng/ml abolió la relajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata, obteniéndose valores similares al grupo tiempo (toxina pertussis 300 ng/ml:  $E_{m\acute{a}x}$   $24.32 \pm 4.19\%$   $P < 0.001$ ,  $pCE_{50}$   $3.87 \pm 0.10$   $P < 0.001$  (n=4) vs anandamida:  $E_{m\acute{a}x}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $pCE_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 31).



**Figura 31.** Efecto de toxina pertussis sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $Fe\ 10^{-6}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

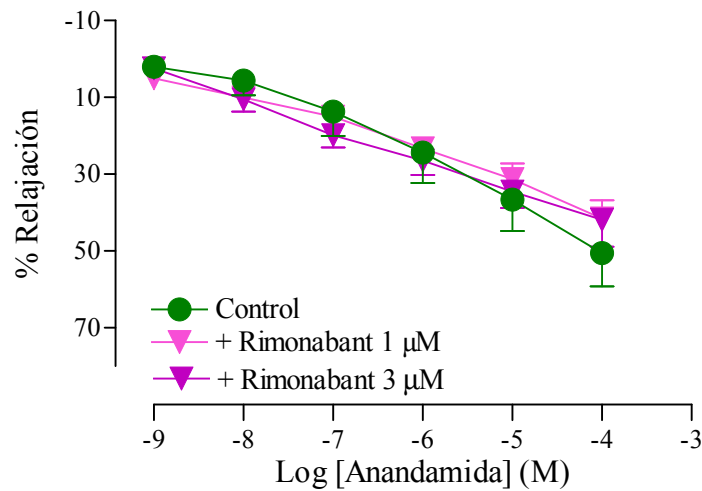
## 1.2.3. Implicación del sistema cannabinoide

### 1.2.3.1. Receptores cannabinoides $CB_1$ y $CB_2$

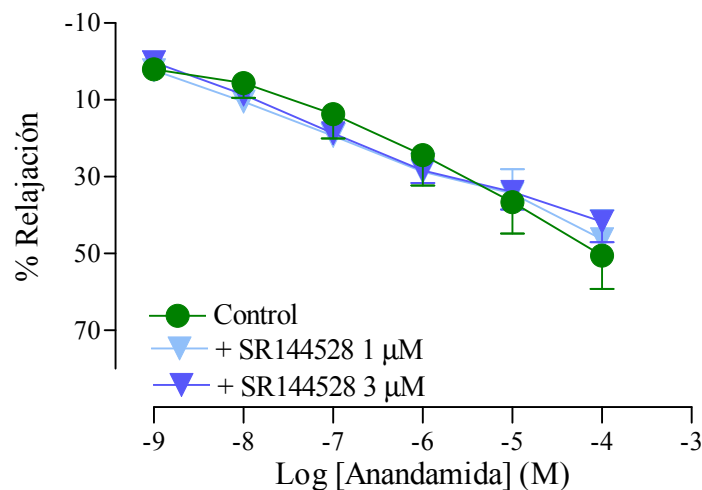
El pretratamiento de las preparaciones con **rimonabant** a las concentraciones de 1 y 3  $\mu M$  no modificó la vasorrelajación ocasionada por anandamida en la preparación de aorta (rimonabant 1  $\mu M$ :  $E_{m\acute{a}x}$   $41.64 \pm 4.80\%$ ,  $pCE_{50}$   $5.90 \pm 0.02$  (n=6); rimonabant 3  $\mu M$ :  $E_{m\acute{a}x}$   $41.95 \pm 4.80\%$ ,  $pCE_{50}$   $6.01 \pm 0.04$  (n=8) vs anandamida:  $E_{m\acute{a}x}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $pCE_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 32a). De la misma manera, el pretratamiento de las preparaciones con **SR144528** a las concentraciones de 1 y 3  $\mu M$  tampoco ocasionó

ninguna modificación en la vasorrelajación producida por anandamida en aorta de rata (SR144528 1  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $46.36 \pm 4.80\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $6.10 \pm 0.10$  (n=5); SR144528 3  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $41.76 \pm 5.35\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.98 \pm 0.07$  (n=5) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 32b).

a)

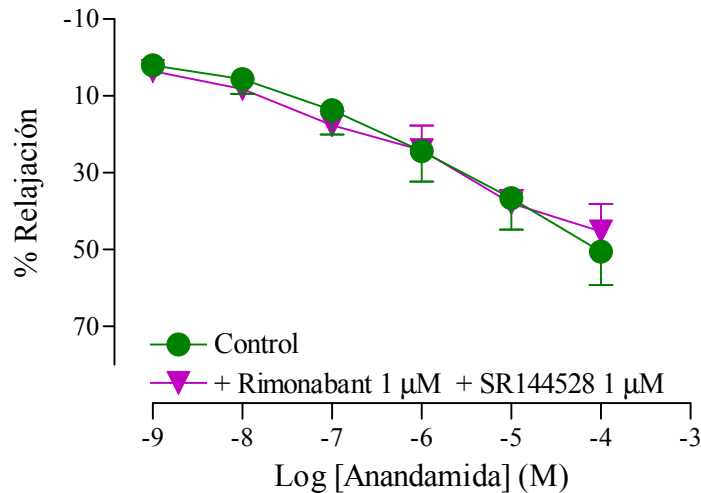


b)



**Figura 32.** Efecto de rimonabant (a) y SR144528 (b) sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

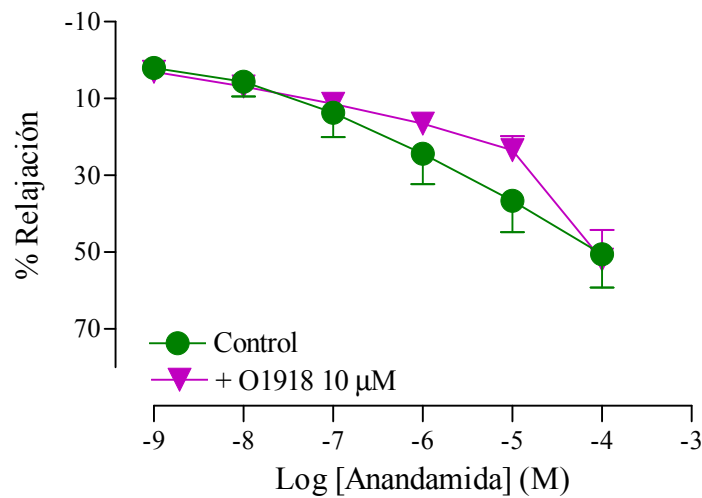
Más aún, el pretratamiento de los anillos con **ambos antagonistas** a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , administrados conjuntamente, tampoco modificó la vasorrelajación ocasionada por anandamida en aorta de rata (rimonabant 1  $\mu\text{M}$  + SR144528 1  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $45.37 \pm 7.15\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $6.01 \pm 0.04$  (n=4) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 33).



**Figura 33.** Efecto de rimonabant y SR144528 administrados conjuntamente sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

### 1.2.3.2. Receptor cannabinoide “No-CB<sub>1</sub>/ No-CB<sub>2</sub>”

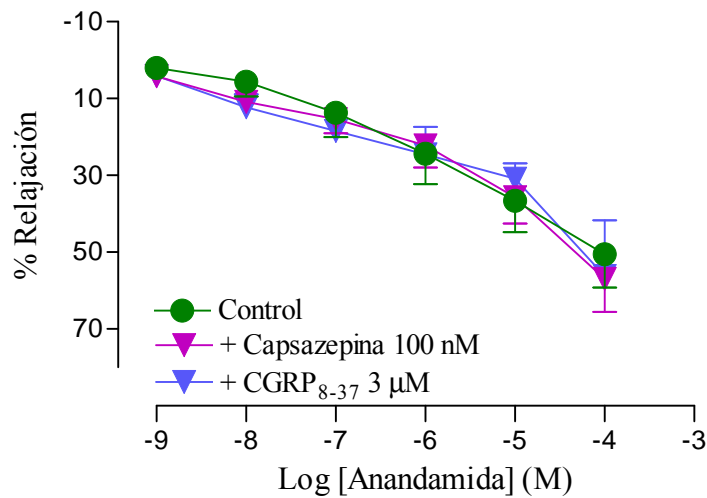
El pretratamiento de las preparaciones con **O1918** a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  ocasionó un desplazamiento significativo a la derecha en la curva concentración-respuesta de anandamida en aorta de rata (O1918 10  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $52.05 \pm 7.77\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.30 \pm 0.12$   $P < 0.001$  (n=4) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 34).



**Figura 34.** Efecto de O1918 sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

#### 1.2.4. Implicación del sistema vanilloide

Ni el pretratamiento con **capsazepina** a la concentración de 100 nM, ni el llevado a cabo con **CGRP<sub>8-37</sub>** a la concentración de 3  $\mu\text{M}$  produjeron ninguna modificación en la vasorrelajación causada por anandamida en la preparación de aorta (capsazepina 100 nM:  $E_{\text{máx}}$   $57.03 \pm 8.72\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.99 \pm 0.13$  (n=4); CGRP<sub>8-37</sub> 3  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $56.27 \pm 15.00\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $6.09 \pm 0.16$  (n=4) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 35).



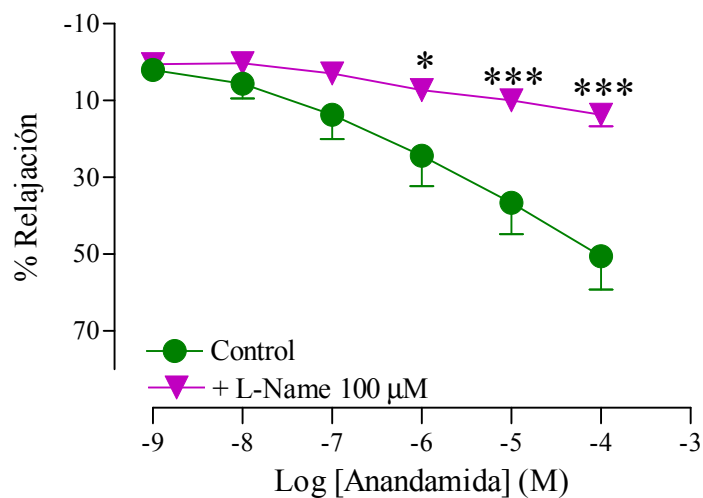
**Figura 35.** Efecto de capsazepina y de CGRP<sub>8-37</sub> sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con Fe 10<sup>-6</sup> M. Los datos representan la media ± EEM de 4-9 animales.

## 1.2.5. Implicación de factores endoteliales

### 1.2.5.1. Óxido nítrico (NO)

El pretratamiento de las preparaciones con **L-NAME** a la concentración de 100 μM abolió la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata, obteniéndose valores similares al grupo de tiempo (L-NAME 100 μM:  $E_{m\acute{a}x}$  13.81±2.94%  $P < 0.001$ ,  $pCE_{50}$  2.56±0.23  $P < 0.001$  (n=4) vs anandamida:  $E_{m\acute{a}x}$  50.60±8.70%,  $pCE_{50}$  5.92±0.04 (n=6)) (Figura 36).

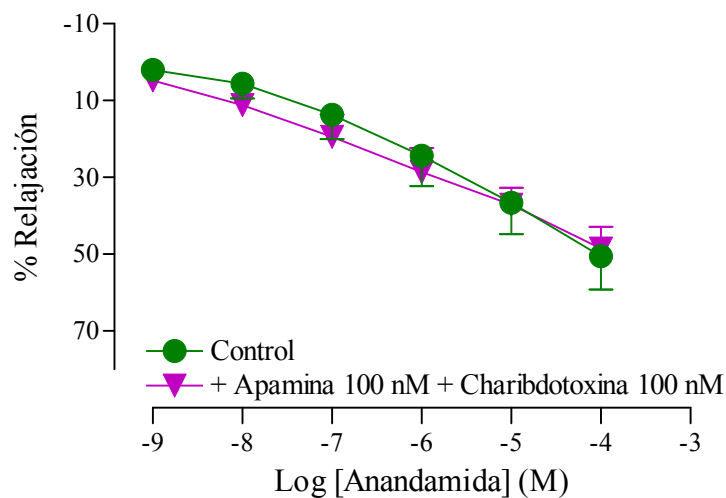




**Figura 36.** Efecto de L-NAME sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $\text{Fe } 10^{-6}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

### 1.2.5.2. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

El pretratamiento de las preparaciones con **apamina** y **charibdotoxina**, administradas conjuntamente, no modificó la vasorrelajación causada por anandamida en preparaciones de aorta (apamina 100 nM + charibdotoxina 100 nM:  $E_{\text{máx}}$   $48.60 \pm 5.66\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $6.20 \pm 0.10$  (n=4) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 37).



**Figura 37.** Efecto de apamina y charibdotoxina administradas conjuntamente sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con Fe  $10^{-6}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

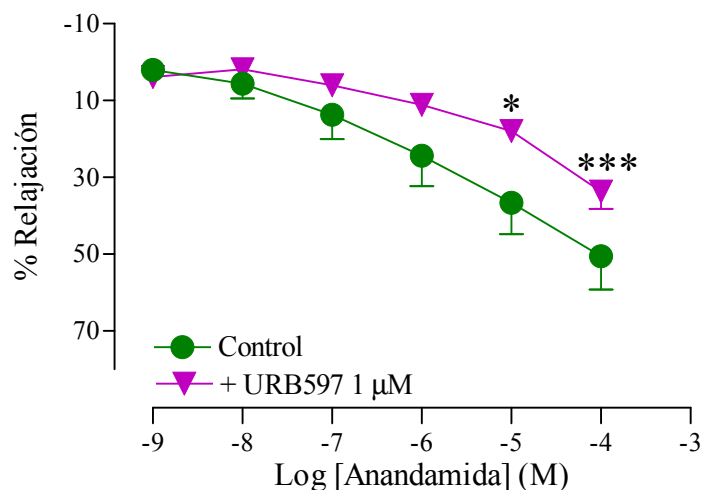
### 1.2.5.3. Derivados del metabolismo del ácido araquidónico (AA)

Con el objetivo de valorar si derivados del metabolismo del AA estaban implicados en la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata se procedió a estudiar, en primer lugar, si la anandamida es metabolizada por la enzima FAAH a AA y etanolamina y, posteriormente, si podrían estar implicadas las siguientes vías metabólicas del AA:

- Vía del citocromo P450
- Vía de las COX

#### ■ Enzima FAAH

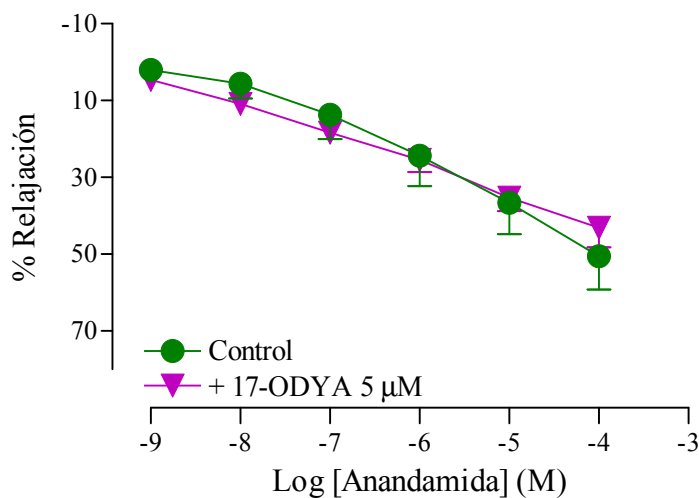
El pretratamiento de los anillos con el inhibidor selectivo de la FAAH, **URB597** a la concentración de 1  $\mu$ M, inhibió parcial pero significativamente la vasorrelajación ocasionada por anandamida en aorta de rata (URB597 1  $\mu$ M:  $E_{m\acute{a}x}$   $33.83 \pm 5.00\%$   $P < 0.001$ ,  $pCE_{50}$   $4.50 \pm 0.04$   $P < 0.001$  (n=4) vs anandamida:  $E_{m\acute{a}x}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $pCE_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  (n=6)) (Figura 38).



**Figura 38.** Efecto de URB597 sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

### ■ Vía del citocromo P450

El pretratamiento de la preparación con un inhibidor selectivo del citocromo P450, **17-ODYA** a la concentración de  $5 \mu\text{M}$ , no produjo ninguna modificación en la vasorrelajación causada por anandamida en aorta de rata (17-ODYA  $5 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $43.21 \pm 5.11\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $6.01 \pm 0.03$  ( $n=9$ ) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.92 \pm 0.04$  ( $n=6$ )) (Figura 39).

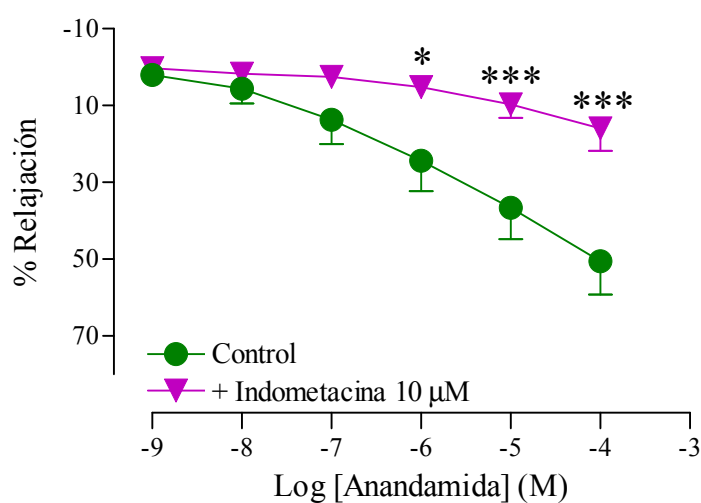


**Figura 39.** Efecto de 17-ODYA sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

### ■ Vía de las COX (COX-1 y COX-2)

Para determinar la implicación de la vía de las COX se utilizó, en primer lugar, un inhibidor inespecífico de estas enzimas, indometacina.

El pretratamiento de las preparaciones con **indometacina** a la concentración de  $10 \mu\text{M}$ , abolió la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata, obteniéndose valores similares al grupo de tiempo (indometacina  $10 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $16.01 \pm 5.80\%$   $P < 0.001$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $3.07 \pm 0.09$   $P < 0.001$ ,  $(n=5)$  vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $5.92 \pm 0.04$   $(n=6)$ ) (Figura 40).

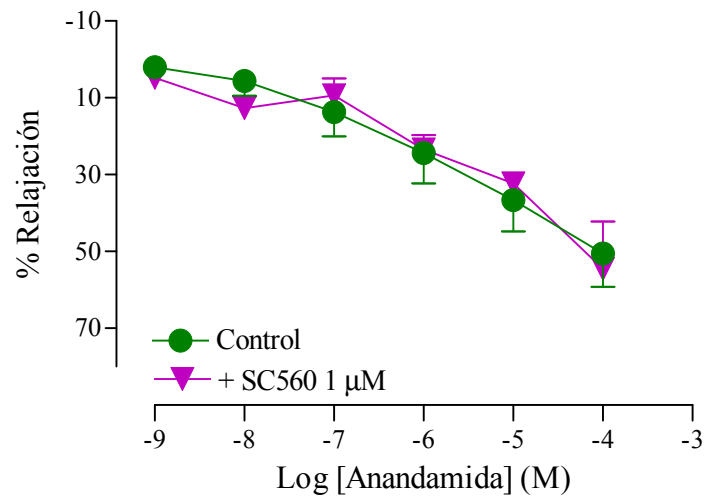


**Figura 40.** Efecto de indometacina sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

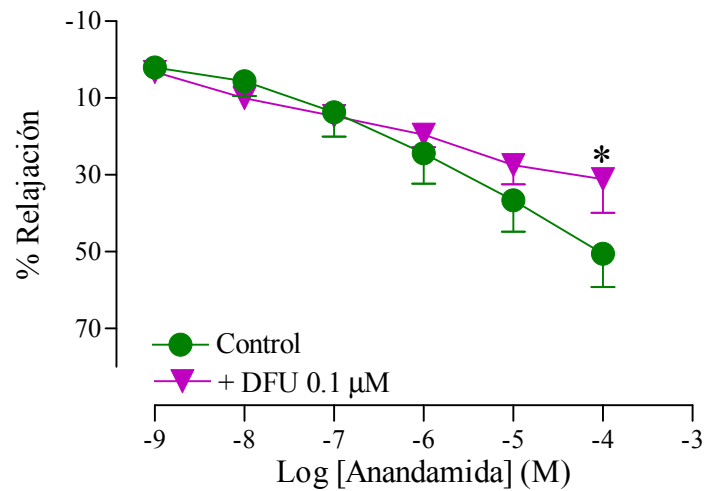
A la vista de los resultados obtenidos con indometacina, se valoró también qué isoforma/s de esta enzima estarían implicadas en la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata. Con este fin, se utilizó el inhibidor específico de la **COX-1**, SC560, y el inhibidor específico de la **COX-2**, DFU.

El pretratamiento con **SC560** a la concentración  $1 \mu\text{M}$  no ocasionó ninguna modificación en la relajación ocasionada por anandamida en las preparaciones de aorta de rata (SC560  $1 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}} 54.60 \pm 12.33\%$ ,  $p\text{CE}_{50} 5.81 \pm 0.11$  ( $n=5$ ) vs anandamida:  $E_{\text{máx}} 50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50} 5.92 \pm 0.04$  ( $n=6$ )) (Figura 41a). Sin embargo, el pretratamiento de las preparaciones con **DFU**, a la concentración de  $0.1 \mu\text{M}$ , modificó parcialmente y de manera significativa la vasorrelajación ocasionada por anandamida en aorta de rata (DFU  $0.1 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}} 31.21 \pm 8.73\%$   $P < 0.05$ ,  $p\text{CE}_{50} 4.97 \pm 0.07$   $P < 0.001$  ( $n=4$ ) vs anandamida:  $E_{\text{máx}} 50.60 \pm 8.70\%$ ,  $p\text{CE}_{50} 5.92 \pm 0.04$  ( $n=6$ )) (Figura 41b).

a)



b)

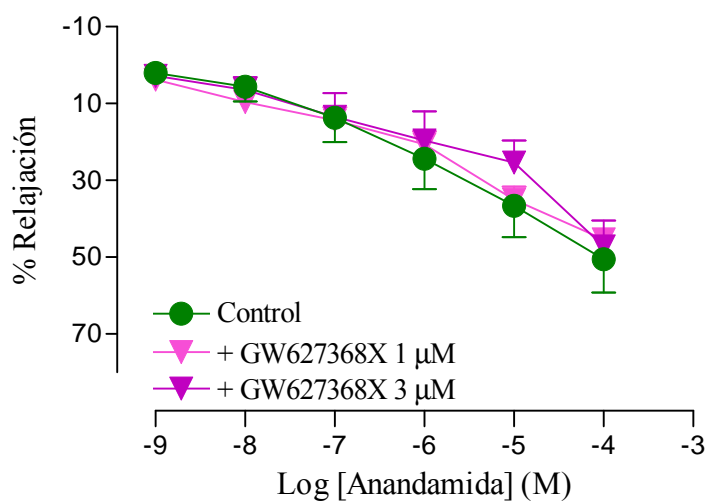


**Figura 41.** Efecto de SC560 (a) y DFU (b) sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con Fe  $10^{-6}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales (\* $P < 0.05$  vs anandamida).

### 1.2.6. Implicación del receptor EP<sub>4</sub>

En el apartado anterior se ha demostrado la implicación de la vía metabólica de la COX-2 en la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata. Está demostrado que la metabolización de la anandamida por mediación de la COX-2 origina prostaglandina E<sub>2</sub>, este metabolito ejerce sus acciones farmacológicas a través de los receptores para prostaglandinas E<sub>2</sub>, EP (Kozak y Marnett, 2002; Davis y cols., 2004). De las diferentes clases de receptores EP, el receptor EP<sub>4</sub> se ha demostrado que media respuestas vasodilatadoras y está localizado en el sistema cardiovascular (Narumiya y cols., 1999). Debido a ello, en esta Tesis Doctoral se ha evaluado la implicación del receptor EP<sub>4</sub> en la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata.

El pretratamiento de las preparaciones con el antagonista selectivo de los receptores EP<sub>4</sub>, **GW627368X**, a la concentración de 1 μM, no modificó la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata (GW627368X 1 μM: E<sub>máx</sub> 46.00±1.00%, pCE<sub>50</sub> 5.77±0.08 (n=4) vs anandamida: E<sub>máx</sub> 50.60±8.70%, pCE<sub>50</sub> 5.92±0.04 (n=6)) (Figura 41). Sin embargo, cuando se utilizó a la concentración de 3 μM ocasionó un desplazamiento significativo a la derecha en la curva concentración-respuesta de anandamida en la preparación de aorta (GW627368X 3 μM: E<sub>máx</sub> 47.32±6.82%, pCE<sub>50</sub> 5.43±0.10 P<0.001 (n=4) vs anandamida: E<sub>máx</sub> 50.60±8.70%, pCE<sub>50</sub> 5.92±0.04 (n=6)) (Figura 42).



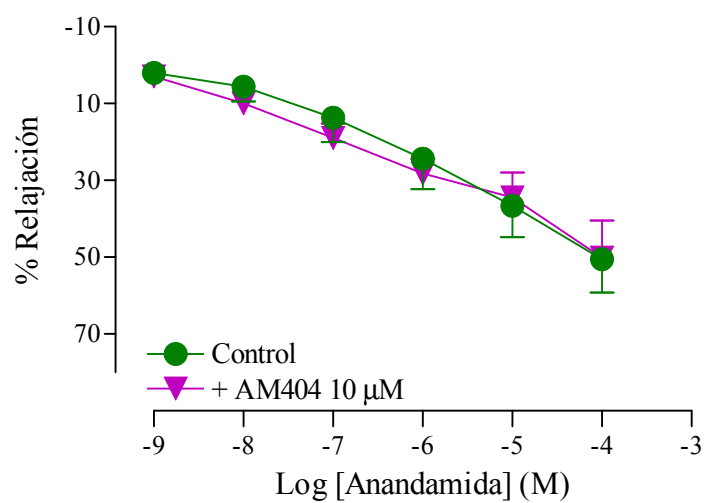
**Figura 42.** Efecto de GW627368X sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con Fe  $10^{-6}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

### 1.2.7. Implicación del transportador de anandamida

Dado que la implicación de mecanismos intracelulares en la vasorrelajación causada por anandamida en aorta de rata parece clara a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo y, que se ha propuesto la existencia de un transportador que facilita la entrada de la anandamida al interior celular (Glaser y cols., 2005), se ha evaluado la implicación de dicho transportador en la relajación ocasionada por anandamida en aorta de rata con el inhibidor del mismo, **AM404**.

El pretratamiento de las preparaciones con AM404 a la concentración de 10  $\mu$ M no modificó la vasorrelajación ocasionada por anandamida en aorta de rata (AM404 10  $\mu$ M:  $E_{m\acute{a}x}$  48.00 $\pm$ 89.71%,  $pCE_{50}$  6.10 $\pm$ 0.10 (n=6) vs anandamida:  $E_{m\acute{a}x}$  50.60 $\pm$ 8.70%,  $pCE_{50}$  5.92 $\pm$ 0.04 (n=6)) (Figura 43).





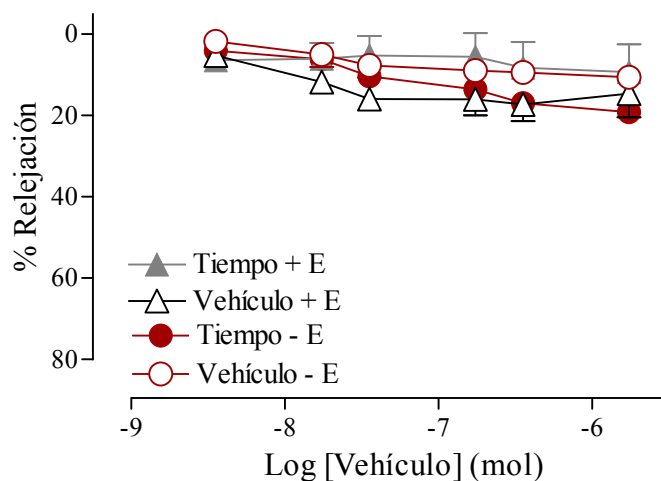
**Figura 43.** Efecto de AM404 sobre la relajación ocasionada por anandamida en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con Fe  $10^{-6}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-9 animales.

## 2. ENSAYOS EN LECHO MESENTÉRICO AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA

### 2.1. VALORACIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR DE LA ANANDAMIDA

#### 2.1.1. Efecto del vehículo de la anandamida sobre la función vascular de lecho mesentérico de rata

De la misma manera que en la preparación de aorta, el vehículo utilizado para disolver la anandamida para los ensayos en lecho mesentérico aislado fue el DMSO 0.5%. Este vehículo no produjo cambios en el tono vascular de la preparación precontraída con Fe ni en lechos intactos ni denudados de endotelio, obteniéndose valores similares al grupo de tiempo correspondiente (Figura 44).



**Figura 44.** Efecto del vehículo (DMSO 0.5%) sobre el tono vascular de lechos mesentéricos de rata intactos (+E) y denudados de endotelio (-E) precontraídos con  $\text{Fe}^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales.

Este vehículo tampoco modificó la funcionalidad endotelial (relajación ocasionada por 500 nmoles de carbacol) en lechos mesentéricos intactos y denudados de endotelio (Tabla 8).

**TABLA 8**

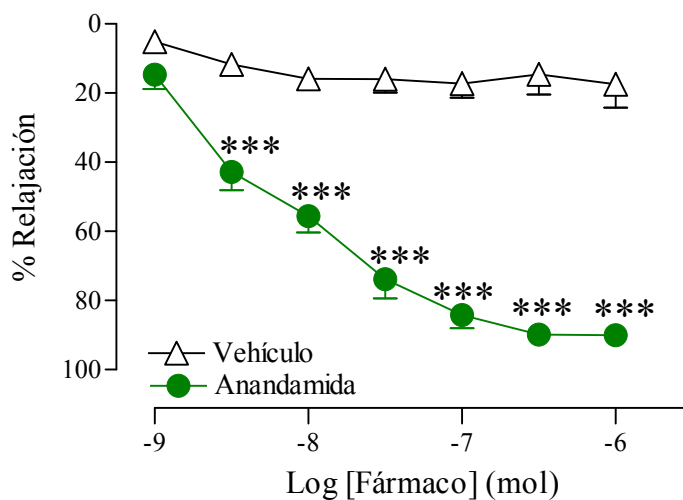
Relajaciones ocasionadas tras la administración de carbacol en los grupos experimentales de tiempo y vehículo en lechos mesentéricos de rata intactos y denudados de endotelio

GRUPO EXPERIMENTAL	RELAJACIÓN CARBACOL 500 nmoles (%)
<b>Tiempo + E</b>	76.60±7.44
Vehículo (DMSO 0.5%) + E	70.93±2.92
<b>Tiempo - E</b>	3.70±1.64
Vehículo (DMSO 0.5%) - E	8.36±4.28

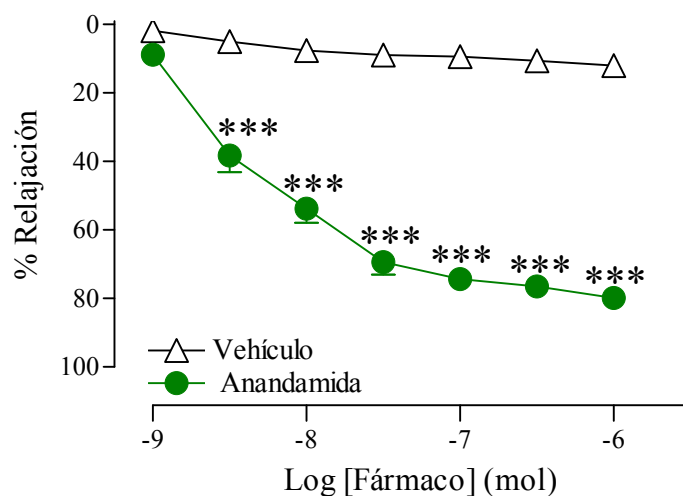
### 2.1.2. Efecto de la anandamida sobre el tono vascular de lecho mesentérico de rata

En **preparaciones intactas**, la anandamida ocasionó una disminución en el tono vascular que resultó concentración-dependiente y estadísticamente significativa respecto a la obtenida en los lechos del grupo vehículo correspondiente (anandamida +E:  $E_{m\acute{a}x}$  90.16±2.58% (n=6),  $P<0.001$  vs vehículo +E:  $E_{m\acute{a}x}$  17.57±6.72% (n=7)) (Figura 45a). De la misma manera, en **preparaciones denudadas** de endotelio, la anandamida ocasionó una disminución en el tono vascular que resultó concentración-dependiente y estadísticamente significativa respecto a la obtenida en los lechos del grupo de vehículo correspondiente (anandamida -E:  $E_{m\acute{a}x}$  79.96±1.40% (n=6),  $P<0.001$  vs vehículo -E:  $E_{m\acute{a}x}$  12.07±2.74% (n=4)) (Figura 45b).

a)



b)



**Figura 45.** Efecto de la anandamida sobre el tono vascular de lechos mesentéricos de rata intactos (a) y denudados de endotelio (b) precontraídos con  $Fe^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales (\*\*\*P<0.001 vs vehículo).

Además, cuando se compararon estadísticamente ambos grupos experimentales no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos (anandamida +E:  $E_{m\acute{a}x}$   $90.16 \pm 2.58\%$  (n=6) vs anandamida -E:  $E_{m\acute{a}x}$   $79.96 \pm 1.40\%$  (n=6)).

**Por tanto, la respuesta vasodilatadora de la anandamida es endotelio independiente. Por ello, el resto de experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se realizaron en lechos mesentéricos desnudos de endotelio.**

## **2.2. VALORACIÓN DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA VASORRELAJACIÓN OCASIONADA POR LA ANANDAMIDA EN LECHO MESENTÉRICO DE RATA**

### **2.2.1. Efecto de los diferentes antagonistas/inhibidores o su vehículo sobre la función vascular de lecho mesentérico de rata**

Al igual que en la preparación de aorta, para valorar el efecto de los diferentes antagonistas/inhibidores utilizados en esta Tesis Doctoral sobre la función vascular de la preparación, se evaluó el efecto que la administración de los mismos ocasionaba sobre el tono basal (tono de la preparación tras el período de estabilización y antes de comenzar el experimento propiamente dicho), sobre la contracción producida por  $Fe\ 10^{-5}\ M$  y sobre la vasorrelajación ocasionada por 500 nmoles de carbacol. En el caso del grupo experimental de toxina pertussis, esta toxina fue administrada “in vivo” 48 h antes del experimento propiamente dicho y, por tanto, el tono basal obtenido en estas preparaciones se midió en presencia de la misma.

Ninguno de los antagonistas/inhibidores utilizados en este trabajo modificó significativamente el tono basal de la preparación cuando fueron administrados tras el periodo de estabilización de la misma y antes de la precontracción de los lechos con Fe, resultando la máxima variación encontrada de 5 mmHg (Tabla 9). Tampoco hubo modificaciones en el tono basal de las preparaciones en presencia de toxina pertussis, obteniéndose en estas preparaciones valores del tono basal similares al resto de los grupos experimentales y al grupo de tiempo (toxina pertussis:  $10.86\pm 1.29$  (n=4) vs control tiempo:  $10.62\pm 1.61$  (n=4)).

La precontracción ocasionada por la administración de Fe  $10^{-5}$  M en todos los grupos experimentales estaba dentro de los parámetros de inclusión establecidos en este trabajo. Además, todas las precontracciones de Fe de los diferentes grupos experimentales, excepto en los grupos de AM630 y capsazepina, resultó similar entre sí y a la obtenida en el grupo de tiempo.

De la misma manera, en todos los grupos experimentales, la administración de carbacol a la concentración de 500 nmoles provocó una disminución en el tono vascular que fue inferior al 12%, valor máximo fijado en este trabajo como criterio de inclusión para considerar las preparaciones denudadas de endotelio (Tabla 9).

En aquellos grupos en los que el vehículo del antagonista era etanol, también se evaluó el efecto de dicho vehículo en la función vascular de la preparación. El etanol al 0.1% no modificó ni el tono basal, ni la precontracción por Fe, ni la relajación por carbacol en lechos mesentéricos denudados de endotelio (Tabla 9).

TABLA 9

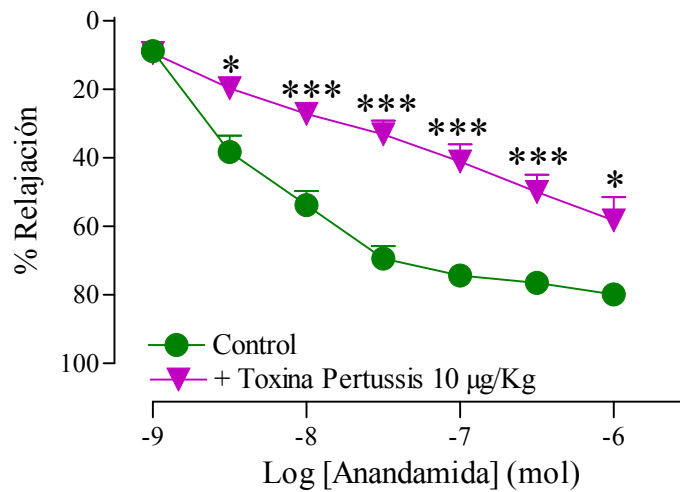
Variación en el tono basal, precontracción inducida por Fe y relajación ocasionada por carbacol en los grupos control experimentales de antagonistas/inhibidores y el vehículo etanol en preparaciones de lecho mesentérico de rata denudados de endotelio.

GRUPO EXPERIMENTAL	ΔTONO VASCULAR	CONTRACCIÓN	RELAJACIÓN
	BASAL (mmHg)	Fe 10 <sup>-5</sup> M (mmHg)	Carbacol 500 nmoles (%)
<b>Tiempo</b>	0.67±0.15	46.05±2.88	3.70±1.64
Vehículo (etanol absoluto)	1.71±1.00	51.46±0.42	10.44±8.19
Toxina pertussis 10 µg/Kg	---	43.17±3.76	7.78±3.53
AM251 1 µM	1.49±1.11	54.12±4.97	2.97±1.07
AM251 3 µM	1.48±0.36	51.76±4.36	7.61±2.11
AM630 1 µM	0.24±0.99	67.78±0.38 <sup>***</sup>	8.75±2.88
AM630 3 µM	1.67±1.01	77.32±5.54 <sup>**</sup>	7.19±3.31
AM251 1 µM + AM630 1 µM	2.07±0.24	70.82±13.24	7.60±2.29
O1918 10 µM	1.55±1.05	50.55±5.92	9.25±1.39
Capsazepina 1 µM	0.71±1.32	86.54±13.34 <sup>*</sup>	5.82±2.29
Capsazepina 3 µM	0.47±0.42	63.09±5.23 <sup>*</sup>	12.40±0.60
TEA 10 mM	2.30±1.81	49.44±2.38	11.21±4.91

Los datos representan la media ± EEM de 4-6 animales. \*P<0.05, \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 vs control (tiempo)

### 2.2.2. Implicación de receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>

El pretratamiento de los animales con **toxina pertussis** (10 µg/Kg, i.p, 48 h) inhibió parcial y significativamente la vasorrelajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos denudados de endotelio (toxina pertussis 10 µg/Kg: E<sub>máx</sub> 58.33±6.81% P<0.05, pCE<sub>50</sub> 5.33±0.50 P<0.001 (n=5) vs anandamida: E<sub>máx</sub> 79.96±1.40%, pCE<sub>50</sub> 8.23±0.03 (n=6)) (Figura 46).



**Figura 46.** Efecto de toxina pertussis sobre la relajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos de rata desnudos de endotelio precontraídos con  $\text{Fe}^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales (\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  vs anandamida).

## 2.2.3. Implicación del sistema cannabinoide

### 2.2.3.1. Receptores cannabinoides $\text{CB}_1$ y $\text{CB}_2$

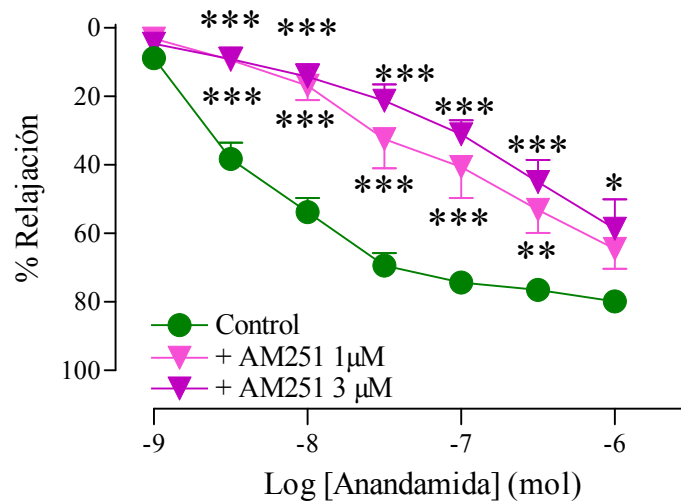
El pretratamiento de las preparaciones con **AM251** a la concentración de  $1 \mu\text{M}$  ocasionó un desplazamiento significativo a la derecha en la curva concentración-respuesta de anandamida en preparaciones desnudas de endotelio (AM251  $1 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $64.63 \pm 5.73\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $6.86 \pm 0.04$   $P<0.001$  ( $n=5$ ) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $79.96 \pm 1.40\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $8.23 \pm 0.03$  ( $n=6$ )) (Figura 47a). El pretratamiento de las preparaciones con AM251 a la concentración de  $3 \mu\text{M}$  ocasionó un desplazamiento a la derecha de la curva concentración-dependiente de la anandamida e inhibió significativamente el  $E_{\text{máx}}$  de la misma (AM251  $3 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $58.69 \pm 8.62\%$   $P<0.05$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $6.52 \pm 0.02$   $P<0.001$  ( $n=5$ ) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $79.96 \pm 1.40\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $8.23 \pm 0.03$  ( $n=6$ )) (Figura 47a).

El pretratamiento de las preparaciones con **AM630** a las concentraciones de  $1$  y  $3 \mu\text{M}$  ocasionó un desplazamiento a la derecha significativo y concentración dependiente, de la curva concentración-respuesta de anandamida en lechos mesentéricos desnudos de endotelio (AM630  $1 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$   $70.58 \pm 4.08\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$

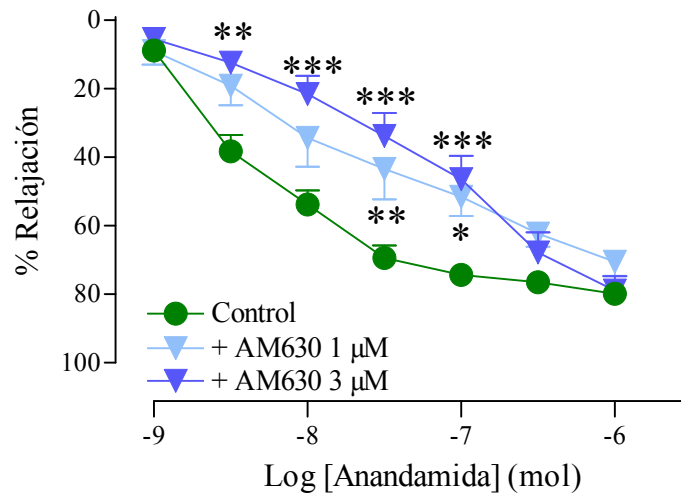


$7.37 \pm 0.04$   $P < 0.001$  ( $n=4$ ); AM630  $3 \mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}} 78.98 \pm 4.18\%$ ,  $p\text{CE}_{50} 7.17 \pm 0.03$   $P < 0.001$  ( $n=4$ ) vs anandamida:  $E_{\text{máx}} 79.96 \pm 1.40\%$ ,  $p\text{CE}_{50} 8.23 \pm 0.03$  ( $n=6$ ) (Figura 47b).

a)

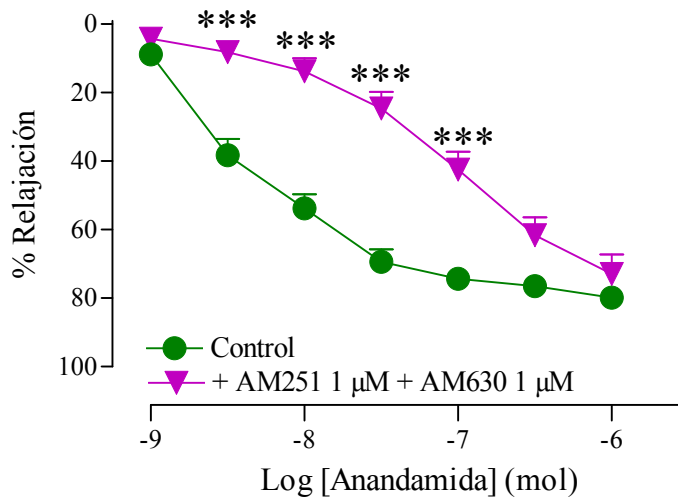


b)



**Figura 47.** Efecto de AM 251 (a) y AM630 (b) sobre la relajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos de rata desnudos de endotelio precontraídos con  $\text{Fe}^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

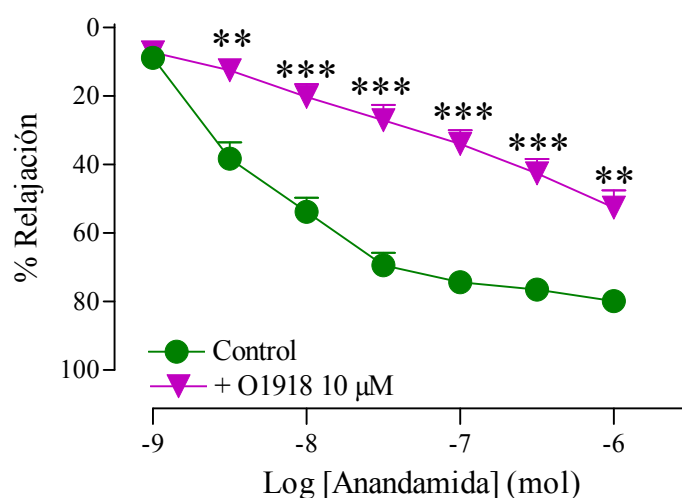
Cuando el pretratamiento de los anillos se hizo con ambos antagonistas, administrados conjuntamente a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , también se ocasionó un desplazamiento significativo a la derecha de la curva concentración-respuesta de anandamida en lechos mesentéricos denudados de endotelio (AM251 1  $\mu\text{M}$  + AM630 1  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$  73.01 $\pm$ 5.69%,  $p\text{CE}_{50}$  6.95 $\pm$ 0.01  $P < 0.001$  (n=4) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$  79.96 $\pm$ 1.40%,  $p\text{CE}_{50}$  8.23 $\pm$ 0.03 (n=6)). Además, cuando se comparó este grupo experimental con los grupos de AM251 1  $\mu\text{M}$  y AM630 1  $\mu\text{M}$ , se obtuvieron sólo diferencias significativas en la  $p\text{CE}_{50}$  del grupo AM630 (AM251 1  $\mu\text{M}$ :  $p\text{CE}_{50}$  6.86 $\pm$ 0.04; AM630 1  $\mu\text{M}$ :  $p\text{CE}_{50}$  7.37 $\pm$ 0.04  $P < 0.001$  (n=4) vs AM251 1  $\mu\text{M}$  + AM630 1  $\mu\text{M}$ :  $p\text{CE}_{50}$  6.95 $\pm$ 0.01 (n=4)) (Figura 48). Este resultado indica un efecto sinérgico cuando los antagonistas son administrados conjuntamente.



**Figura 48.** Efecto de AM251 y AM630 administrados conjuntamente sobre la relajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos de rata denudados de endotelio precontraídos con  $\text{Fe}^{5+}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales (\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

### 2.2.3.2. Receptor cannabinoide “No-CB<sub>1</sub>/ No-CB<sub>2</sub>”

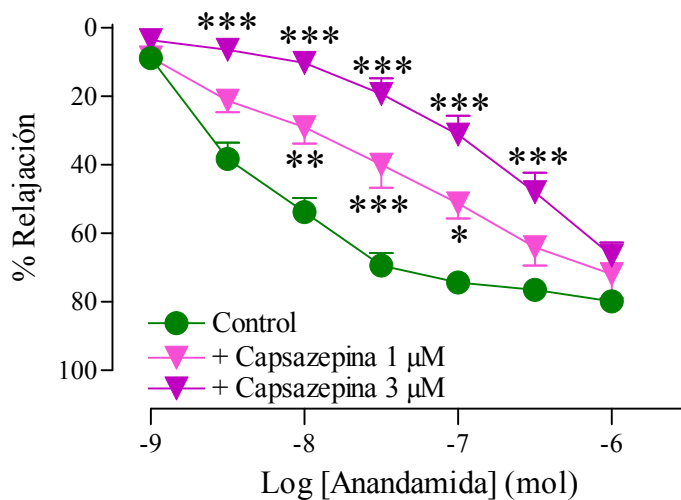
El pretratamiento de las preparaciones con **O1918** a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  inhibió parcial y significativamente la vasorrelajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos denudados de endotelio (O1918 10  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$  52.67 $\pm$ 5.05%  $P < 0.01$ ,  $p\text{CE}_{50}$  6.45 $\pm$ 0.03  $P < 0.001$  (n=4) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$  79.96 $\pm$ 1.40%,  $p\text{CE}_{50}$  8.23 $\pm$ 0.03 (n=6)) (Figura 49).



**Figura 49.** Efecto de O1918 sobre la relajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos de rata denudados de endotelio precontraídos con  $\text{Fe}^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

### 2.2.4. Implicación del sistema vanilloide

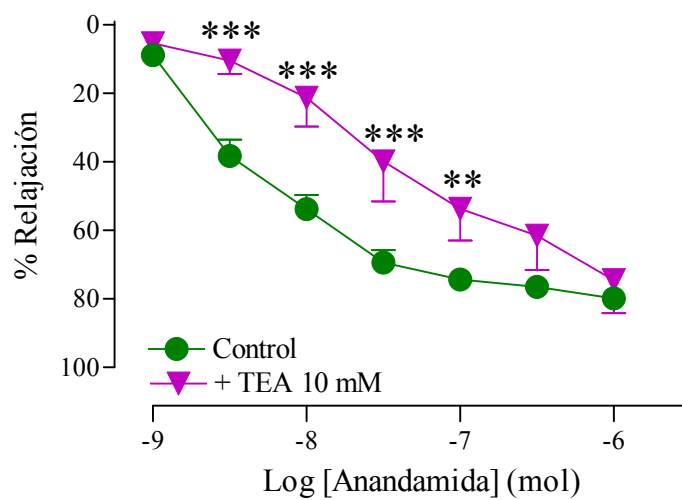
El pretratamiento de las preparaciones con **capsazepina** a las concentraciones de 1 y 3  $\mu\text{M}$  ocasionó un desplazamiento a la derecha, significativo y concentración dependiente, de la curva concentración-respuesta de anandamida en lechos mesentéricos denudados de endotelio (capsazepina 1  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$  71.97 $\pm$ 7.00%,  $p\text{CE}_{50}$  7.32 $\pm$ 0.02  $P < 0.001$  (n=4); capsazepina 3  $\mu\text{M}$ :  $E_{\text{máx}}$  66.58 $\pm$ 3.85%,  $p\text{CE}_{50}$  6.63 $\pm$ 0.02  $P < 0.001$  (n=4) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$  79.96 $\pm$ 1.40%,  $p\text{CE}_{50}$  8.23 $\pm$ 0.03 (n=6)) (Figura 50).



**Figura 50.** Efecto de capsazepina sobre la relajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos de rata desnudos de endotelio precontraídos con  $\text{Fe}^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).

### 2.2.5. Implicación de canales de $\text{K}^+$

El pretratamiento de las preparaciones con un inhibidor inespecífico de los canales de  $\text{K}^+$ , TEA, a la concentración de 10 mM, ocasionó un desplazamiento significativo a la derecha en la curva concentración-respuesta de anandamida en lechos mesentéricos desnudos de endotelio (TEA 10 mM:  $E_{\text{máx}}$   $74.57 \pm 9.69\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $7.24 \pm 0.03$   $P < 0.001$  ( $n=5$ ) vs anandamida:  $E_{\text{máx}}$   $79.96 \pm 1.40\%$ ,  $p\text{CE}_{50}$   $8.23 \pm 0.03$  ( $n=6$ )) (Figura 51).



**Figura 51.** Efecto de TEA sobre la relajación ocasionada por anandamida en lechos mesentéricos de rata desnudos de endotelio precontraídos con  $\text{Fe}^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs anandamida).



# DISCUSIÓN





La vasorrelajación ocasionada por los cannabinoides, tanto naturales como sintéticos, ha sido ampliamente evaluada en diferentes territorios vasculares. (Randall y cols., 2002; Pacher y cols., 2005; López-Miranda y cols., 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios al respecto han sido realizados en arterias de resistencia y en arterias de conductancia de pequeño calibre, existiendo un menor número de trabajos en grandes arterias de conductancia, como la arteria aorta.

En este trabajo de investigación, se ha pretendido evaluar el efecto del mismo endocannabinoide en un territorio vascular de conductancia de gran calibre (aorta), poco estudiado hasta el momento, y compararlo con el efecto en un territorio de resistencia (lecho mesentérico), ampliamente estudiado en la bibliografía. La anandamida es el cannabinoide elegido en este trabajo. Este endocannabinoide produce relajación en una gran variedad de lechos vasculares como arteria cerebral (Gebremedhin y cols., 1999), coronaria (Grainger y Boachie-Ansah, 2001), mesentérica (Járai y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Harris y cols., 2002) y hepática (Zygmunt y cols., 1997).

Esta Tesis Doctoral constituye el primer estudio en el que se realiza una evaluación paralela y comparativa de los mecanismos implicados en los efectos vasculares de un endocannabinoide en una arteria de conductancia y un lecho de resistencia. Así, se quiere demostrar si bajo las mismas condiciones metodológicas, la misma especie animal, y utilizando el mismo agonista cannabinoide existen diferencias en los mecanismos de acción del cannabinoide en dos territorios vasculares de diferente naturaleza.

En nuestras condiciones experimentales, la anandamida ocasionó una vasorrelajación concentración dependiente tanto en aorta como en lecho mesentérico de rata. El efecto máximo vasorrelajante alcanzado con la anandamida en aorta fue aproximadamente del 50%, mientras que en lecho mesentérico fue del 80%. Sin embargo, en ambos territorios vasculares la potencia de la anandamida para causar vasorrelajación fue similar (aorta  $pCE_{50}$   $8.22 \pm 0.04$  vs lecho mesentérico  $pCE_{50}$

8.23±0.03). Los efectos vasculares de la anandamida en aorta han sido evaluados solamente en dos trabajos realizados por Mukhopadhyay y O'Sullivan (Mukhopadhyay y cols., 2002; O'Sullivan y cols., 2005). Mientras que Mukhopadhyay describe que la relajación ocasionada por la anandamida es de un 60% en aorta de conejo, O'Sullivan sólo demuestra una leve relajación (20%) producida por la anandamida en aorta de rata. Nuestros resultados en aorta son similares a los obtenidos por el grupo de Mukhopadhyay, pero diferentes a los conseguidos por O'Sullivan a pesar de estar realizados en la misma especie animal. Seguramente, las diferencias existentes entre nuestro resultado y el de este último autor podrían ser atribuidas a diferencias metodológicas. El grupo de O'Sullivan utilizó en su trabajo como vehículo de la anandamida etanol a la concentración de 10 mM, mientras que en este estudio se usó como vehículo DMSO al 0.5% para disolver el endocannabinoide. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que la relajación ocasionada por la anandamida disuelta en etanol es inferior a la obtenida con la anandamida disuelta en DMSO (López-Miranda y cols., 2004). Por tanto, la respuesta vascular de la anandamida en aorta de rata puede variar dependiendo del vehículo utilizado para disolver este endocannabinoide.

En esta Tesis Doctoral, la relajación máxima ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico es similar a la descrita por otros autores en este mismo territorio vascular (Randall y cols., 1996; Randall y Kendall, 1998; Járαι y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Harris y cols., 2002). Sin embargo, la potencia de la anandamida varía respecto a la obtenida por otros autores como Randall y Wagner (Randall y Kendall, 1998; Wagner y cols., 1999). Concretamente, cuando se comparó la  $CE_{50}$  para la anandamida en lecho mesentérico obtenida en este trabajo respecto a los parámetros señalados por los autores citados anteriormente, se obtuvieron diferencias significativas entre ellas (Randall:  $EC_{50}$  28.6±11.5 nmol; Wagner:  $EC_{50}$  79±3 nmol vs Tesis Doctoral  $EC_{50}$  6±1 nmol). Si se considera que los experimentos se han llevado a cabo en el mismo territorio vascular, y en la misma especie animal, seguramente las diferencias obtenidas sean debidas a la anandamida y/o el vehículo utilizado. En nuestro trabajo la anandamida se obtuvo de los laboratorios Tocris Bioscience y se disolvió en DMSO,

mientras que en los trabajos de Randall y Wagner la anandamida fue sintetizada en laboratorios particulares o independientes, y se disolvió en una emulsión “aceite inerte”/agua y en una mezcla de emulfor/etanol/salino respectivamente. Como ya se ha comentado anteriormente, el empleo de uno u otro disolvente para disolver la anandamida podría modificar la respuesta vascular de la misma (López-Miranda y cols., 2004).

**Por tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que la anandamida es más eficaz para causar vasorrelajación en lecho mesentérico que en aorta, lo que podría sugerir que el sistema endocannabinoide tiene mayor participación en la regulación de la relajación en lechos de resistencia que en arterias de gran calibre.**

### **Participación del endotelio en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida**

La implicación del endotelio en la relajación ocasionada por la anandamida en aorta y lecho mesentérico se evaluó realizando las curvas concentración-respuesta del agonista cannabinoide en presencia y en ausencia de endotelio en estos territorios vasculares.

En aorta de rata la relajación causada por la anandamida se anuló en arterias desnudas de endotelio, en cambio, en lecho mesentérico la vasorrelajación producida por la anandamida fue similar en presencia o ausencia de endotelio. Estos datos demuestran que la participación del endotelio en la relajación ocasionada por la anandamida va a depender del territorio vascular.

Que el endotelio vascular no esté implicado en la relajación producida por la anandamida en lechos de resistencia está ampliamente demostrado por diferentes autores (Randall y cols., 1996; White y Hiley, 1997; Wagner y cols., 1999; Harris y cols., 2002). En cambio, existen pocos datos respecto a la participación del endotelio en

la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en arterias de gran calibre (Mukhopadhyay y cols., 2002; O'Sullivan y cols. 2005). El trabajo de Mukhopadhyay demuestra que la relajación ocasionada por la anandamida en aorta de conejo es parte endotelio dependiente y parte endotelio independiente. Sin embargo, O'Sullivan demuestra que la leve vasorrelajación producida por la anandamida en aorta de rata resulta endotelio independiente. De nuevo los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral difieren de los de otros trabajos aunque estén llevados a cabo en el mismo territorio vascular. El grupo de O'Sullivan disuelve la anandamida en etanol y, como ya se ha comentado, ésto puede ocasionar que la respuesta vascular de la anandamida se altere, y por lo tanto también los mecanismos implicados en dicha vasorrelajación (López-Miranda y cols., 2004). En el caso del trabajo de Mukhopadhyay, los datos nos llevan a pensar que la participación del endotelio en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida depende de la especie utilizada. De hecho, diferentes trabajos realizados en la misma clase de arterias pero de diferentes especies animales apoyan esta idea. Por ejemplo, cuando se estudia la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en arteria coronaria el efecto es parcialmente endotelio dependiente en arterias procedentes de vacas y ovejas y endotelio independiente en vasos procedentes de ratas (Pratt y cols., 1998; Grainger y Boachie-Ansah y cols., 2001; White y cols., 2001).

**Por tanto, en esta Tesis Doctoral se demuestra que en rata la vasorrelajación ocasionada por la anandamida es estrictamente endotelio dependiente en arterias de gran calibre, pero independiente de éste en lechos de resistencia. Estos resultados sugieren que la participación del endotelio en la relajación producida por la anandamida es más importante en grandes arterias. Además, la complejidad en la fisiología del sistema endocannabinoide es evidente y podemos decir que la relajación ocasionada por la anandamida también va a depender de la especie estudiada.**

## **Participación de los receptores cannabinoides en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida**

Se sabe que la anandamida ocasiona relajación a través de la activación de los receptores cannabinoides clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, que se encuentran acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>, sensible a toxina pertussis (Gebremedhin y cols., 1999; Liu y cols., 2000; O'Sullivan y cols., 2004b; Romano y Lograno, 2006). Además, existen evidencias de que el receptor cannabinoide “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>”, posiblemente también acoplado a proteína G<sub>i/o</sub>, podría igualmente participar en los efectos vasculares de los cannabinoides (Mukhopadhyay y cols., 2002; Begg y cols., 2003; Offertáler y cols., 2003).

Con el objetivo de valorar la participación de los receptores cannabinoides en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida se llevaron a cabo diferentes estrategias farmacológicas. En primer lugar, se bloqueó la proteína G<sub>i/o</sub> con toxina pertussis en ambos territorios vasculares, lo que permitiría establecer, en una primera aproximación, si receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub> están implicados en la relajación causada por la anandamida.

En presencia de toxina pertussis, la anandamida no produjo ningún efecto vasodilatador en aorta de rata. En cambio, el bloqueo con esta toxina en lecho mesentérico ocasionó solamente una inhibición parcial de la relajación producida por este endocannabinoide. Por lo tanto, los datos obtenidos muestran que en ambos territorios vasculares la anandamida ocasiona vasorrelajación a través de receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>, aunque el grado de participación de los mismos es diferente. Dado que nuestros resultados demuestran que en aorta de rata la anandamida ocasiona vasorrelajación endotelio dependiente, se podría deducir que este endocannabinoide actuaría a través de receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub> localizados en el endotelio, o bien que algún mediador generado en el endotelio actuase a través de receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub> localizados bien en el mismo endotelio o en otra capa de la arteria. En cambio, en lecho mesentérico la relajación ocasionada por la anandamida

resultó ser endotelio independiente, por lo tanto, es lógico pensar que la anandamida podría actuar a través de receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , pero ubicados en el MLV y/o en las terminaciones nerviosas perivasculares. Resultados similares respecto a la implicación de receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$  en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida han sido descritos tanto en aorta como en arterias de resistencia (White y Hiley, 1997; Mukhopadhyay y cols., 2002; O'Sullivan y cols., 2005), aunque estos trabajos no determinan claramente la ubicación de los mismos.

**Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que en arterias de gran calibre la vasorrelajación causada por la anandamida está mediada principalmente por receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , mientras que en lechos de resistencia sólo existe una participación parcial de dichos receptores en la relajación producida por la anandamida.**

Una vez demostrada la participación de receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$  en la relajación ocasionada por anandamida tanto en aorta como lecho mesentérico, nos preguntamos qué receptores cannabinoides acoplados a proteína  $G_{i/o}$  podrían estar implicados en la relajación producida por el endocannabinoide en ambos territorios vasculares. En este trabajo se ha valorado la participación de los receptores cannabinoides clásicos  $CB_1$ ,  $CB_2$ , y del receptor cannabinoide “No- $CB_1$ /No- $CB_2$ ” propuesto como posible receptor implicado en los efectos vasculares de los cannabinoides (Begg y cols., 2005).

Para estudiar la implicación de los receptores cannabinoides clásicos  $CB_1$  y  $CB_2$  en el efecto vascular de la anandamida en aorta se utilizaron antagonistas selectivos de ambos receptores cannabinoides: rimonabant, antagonista selectivo del receptor  $CB_1$  (Rinaldi-Carmona y cols., 1994), y SR144528 antagonista selectivo del receptor  $CB_2$  (Rinaldi-Carmona y cols., 1998). Las concentraciones tanto de rimonabant como de SR144528 utilizadas en este trabajo fueron 1 y 3  $\mu$ M. La concentración de 1  $\mu$ M ha sido ya utilizada por nuestro grupo y por otros autores para evaluar la participación de

estos receptores en la vasorrelajación causada por los cannabinoides en arterias de gran calibre (O'Sullivan y cols., 2005; Dannert y cols., 2007). La concentración de 3  $\mu\text{M}$  de ambos antagonistas se ha utilizado con el fin de determinar si la inhibición ocasionada por estos antagonistas en la vasorrelajación producida por la anandamida era concentración dependiente (Dannert y cols., 2007).

En este trabajo ni el rimonabant ni el SR144528 a las dos concentraciones ensayadas modificaron la relajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata. Más aún, tampoco se obtuvo ninguna modificación en la relajación causada por el endocannabinoide cuando estos antagonistas son administrados conjuntamente a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Estos datos sugieren que los receptores cannabinoides clásicos,  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$ , no están implicados en la relajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata, y confirman los datos obtenidos por otros grupos en vasos de gran calibre (Mukhopadhyay y cols., 2002; O'Sullivan y cols., 2005).

Considerando que la anandamida se une con alta afinidad al receptor cannabinoide  $\text{CB}_1$  ( $\text{K}_i$  89 nM) (Devane y cols., 1992), el hecho de que este receptor no medie la relajación ocasionada por la anandamida podría ser debido a que este receptor no se exprese en arteria aorta. Hasta el momento, no existen trabajos en esta especie animal sobre la expresión del receptor  $\text{CB}_1$  en este territorio vascular. En cambio, se ha detectado mRNA tanto en endotelio como en MLV de aorta humana, y se descarta la presencia del receptor  $\text{CB}_1$  en el endotelio vascular de aorta de conejo (Sugiura y cols., 1998; McCollum y cols., 2007). Por lo tanto, es probable que el receptor cannabinoide  $\text{CB}_1$  se exprese poco o no se exprese en las células endoteliales de aorta de rata, y por ello aunque se utilicen concentraciones elevadas de rimonabant no se observe inhibición en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en este tejido.

La nula participación del receptor  $\text{CB}_2$  en la vasorrelajación causada por la anandamida podría deberse a dos razones: a) la baja afinidad que presenta la anandamida por el receptor  $\text{CB}_2$  ( $\text{K}_i$  371 nM) (Devane y cols., 1992), b) que el receptor cannabinoide  $\text{CB}_2$  tampoco se exprese en el endotelio vascular. Igual que en el caso del receptor  $\text{CB}_1$ , no existen trabajos que demuestren si este receptor está localizado en el

endotelio vascular de aorta de rata. En cambio, sí está demostrado que ni en el endotelio, ni en el MLV de aorta humana se expresa el receptor CB<sub>2</sub> (Sugiura y cols., 1998).

Como ya se ha comentado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” no ha sido clonado, pero existen herramientas farmacológicas para poder valorar funcionalmente la implicación del mismo en los efectos vasculares de los cannabinoides. Se han propuesto dos antagonistas que actúan sobre el receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” y que bloquean las acciones vasculares mediadas por este: cannabidiol y O1918 (Járai y cols., 1999; Offertáler y cols., 2003). En la preparación de aorta de rata, se evaluó la implicación de este receptor utilizando el O1918 a la concentración 10 µM. Esta concentración se utiliza habitualmente para bloquear los efectos vasculares mediados por este receptor (Offertáler y cols., 2003).

En la valoración de la implicación del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” en la relajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata, se obtuvo un desplazamiento a la derecha de la curva concentración-respuesta de la anandamida en presencia de O1918 que resultó significativo, lo que sugirió un antagonismo competitivo. Por lo tanto, estos resultados indican que el receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” está implicado en la vasorrelajación de la anandamida en aorta de rata. Un trabajo previo en aorta de conejo sugiere que la relajación ocasionada por la anandamida está mediada por un receptor cannabinoide, sensible a altas concentraciones de rimonabant, y localizado en el endotelio vascular (Mukhopadhyay y cols., 2002). Nuestros resultados son compatibles con los obtenidos por el grupo de Mukhopadhyay, con la ventaja de que se ha demostrado la participación del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” con antagonistas específicos para dicho receptor.

Los antagonistas rimonabant y SR144528 no han podido ser utilizados para valorar la implicación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en la vasorrelajación causada por la anandamida en lecho mesentérico de rata, debido a que son fármacos donados por los laboratorios Sanofi-Aventis, y en el momento de la realización de estos experimentos no teníamos posibilidad de volver a solicitarlos a dicho laboratorio. Por lo tanto, se han



utilizado otros antagonistas selectivos de dichos receptores que son comercializados por los laboratorios Tocris Bioscience. Así, como antagonista selectivo del receptor CB<sub>1</sub> se utilizó, el compuesto AM251 (K<sub>i</sub> 7.49 nM) (Gatley y cols., 1996), y como antagonista selectivo del receptor CB<sub>2</sub> se utilizó AM630 (K<sub>i</sub> 31.2 nM) (Hosohata y cols., 1997). Ambos antagonistas presentan una afinidad similar al rimonabant (K<sub>i</sub> 11.5 nM) y el SR144528 (K<sub>i</sub> 0.6 nM) para unirse a los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> respectivamente. Las concentraciones utilizadas de ambos antagonistas en este trabajo fueron de 1 y 3 μM. Las concentraciones de 1 μM tanto de AM251 como de AM630, se han utilizado previamente en otros estudios para valorar la implicación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en los efectos vasculares de los cannabinoides (White y cols., 2001; Hoi y Hiley, 2006). Además, en este estudio también se ha valorado si la inhibición ocasionada por estos antagonistas en la relajación producida por la anandamida era concentración dependiente, y para ello se ha utilizado la concentración de 3 μM de AM251 y de AM630.

La vasorrelajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico se inhibió parcialmente tanto en presencia del antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, AM251, como en presencia del antagonista del receptor CB<sub>2</sub>, AM630. Además, no se hallaron diferencias significativas en la inhibición producida por estos dos antagonistas a las dos concentraciones utilizadas. Estos resultados indican que tanto el receptor CB<sub>1</sub> como el receptor CB<sub>2</sub> están implicados parcialmente en la relajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico de rata.

Los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la implicación del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en la relajación producida por la anandamida son similares a los obtenidos por otros autores (Randall y cols., 1996; White y Hiley, 1997; O'Sullivan y cols., 2004b). Además, existen estudios inmunohistoquímicos en lecho mesentérico de rata que demuestran que el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> está localizado fundamentalmente en las terminaciones nerviosas que inervan la capa adventicia de estas arterias (Domenicali y cols., 2005).

Respecto a la implicación del receptor CB<sub>2</sub> en la relajación causada por la anandamida en lecho mesentérico, existen pocos trabajos que evalúen la implicación de este receptor en dicha relajación, debido a que la anandamida presenta mayor afinidad por el receptor CB<sub>1</sub> que por el receptor CB<sub>2</sub>. Los pocos estudios existentes al respecto demuestran que el receptor CB<sub>2</sub> no está implicado en la vasorrelajación producida por la anandamida en arterias de conductancia de pequeño calibre (White y cols., 2001; Romano y Lograno, 2006) y tampoco en la relajación causada por anandamida en arterias de resistencia (Ho y Hiley, 2003a). Por lo tanto, nuestros datos difieren de los obtenidos por otros autores. Esto podría deberse bien al territorio vascular evaluado o bien, a la especie utilizada (Randall y cols., 2004).

Debido a que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han implicado la participación parcial de ambos receptores clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico de rata, se evaluó si la administración conjunta de ambos antagonistas de estos receptores producía un bloqueo mayor en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en este territorio vascular. Al administrar conjuntamente estos antagonistas se obtuvo una inhibición ligeramente superior en la relajación producida por la anandamida que al administrarlos separadamente. Sin embargo, el grado de participación de los receptores cannabinoides clásicos en el efecto vascular de la anandamida en lecho mesentérico es parcial y en torno al 50%, existiendo un grado de implicación importante también de otros mecanismos independientes de estos receptores.

Además de la valoración de los receptores clásicos cannabinoides, y de manera similar a los experimentos realizados en aorta, se valoró la implicación del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico. Para ello, se utilizó el antagonista de dicho receptor, O1918, a la concentración de 10 µM, concentración válida para evaluar la implicación del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” en arterias de resistencia (Offértaler y cols., 2003).

Sorprendentemente, los resultados obtenidos demuestran que la vasorrelajación producida por la anandamida es inhibida parcialmente en presencia del O1918. Por lo tanto, el receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” también estaría implicado parcialmente en la relajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico de rata. Todos los trabajos realizados en arterias de resistencia demuestran cierta participación del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>”, pero en la vasorrelajación endotelio dependiente ocasionada por la anandamida (Járai y cols., 1999; Wagner y cols., 1999). Por lo tanto, este trabajo demuestra por primera vez en arterias de resistencia de rata, que el receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” estaría implicado en la vasorrelajación endotelio independiente ocasionada por la anandamida.

**De nuevo se demuestran en esta Tesis Doctoral diferencias en los mecanismos implicados en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en arterias de conductancia de gran calibre respecto a lechos de resistencia. Este trabajo descarta la participación de los receptores cannabinoides clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, e implica parcialmente al receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” en la relajación endotelio dependiente producida por la anandamida en vasos de conductancia de gran calibre. Mientras que, en lechos de resistencia se involucra a los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” en la relajación endotelio independiente ocasionada por la anandamida.**

### **Participación del receptor TRPV1 en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida**

Otro mecanismo propuesto para explicar el efecto vasodilatador ocasionado por los cannabinoides es mediante la activación de los receptores TRPV1. Tras la activación de dichos receptores se puede liberar de forma minoritaria NO, ATP o sustancia P, pero mayoritariamente se libera CGRP (Ralevic y cols., 2002). Por lo tanto, el efecto mediado por el receptor TRPV1 se puede demostrar utilizando antagonistas de

dicho receptor, como la capsazepina, o bien antagonistas del receptor CGRP, como el CGRP<sub>8-37</sub>.

En este trabajo, la implicación del receptor TRPV1 en la vasorrelajación ocasionada por anandamida en aorta de rata se valoró utilizando antagonistas tanto del receptor TRPV1 como del receptor CGRP. Estos antagonistas han sido empleados por otros autores para demostrar la participación del receptor TRPV1 en los efectos vasculares de los cannabinoides (Mukhopadhyay y cols., 2002; Poblete y cols., 2005; Dannert y cols., 2007). Las concentraciones utilizadas fueron 100 nM de capsazepina y 3  $\mu$ M de CGRP<sub>8-37</sub>, dichas concentraciones han sido empleadas en arterias de conductancia de gran calibre para valorar la implicación del receptor TRPV1 (Dannert y cols., 2007).

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que ni la inhibición del receptor TRPV1, por capsazepina, ni la inhibición del receptor CGRP, por el CGRP<sub>8-37</sub>, modifican la relajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata. Por tanto, estos datos indican que el receptor TRPV1 no participa en la relajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata. No hay muchos datos en la literatura que evalúen la implicación de este receptor en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en arterias de gran calibre, y el único trabajo que lo evalúa descarta también su implicación (O'Sullivan y cols., 2005). Trabajos previos realizados en arterias de resistencia y de conductancia de pequeño calibre sugieren que sólo la relajación endotelio independiente ocasionada por la anandamida es mediada por el receptor TRPV1 (Járai y cols., 1999; Zygmunt y cols., 1999). En este trabajo la relajación ocasionada por la anandamida es exclusivamente endotelio dependiente y no está mediada por el receptor TRPV1, lo que estaría en consonancia con los datos mencionados anteriormente (Járai y cols., 1999; Zygmunt y cols., 1999).

La participación del receptor TRPV1 en la relajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico se ha valorado utilizando únicamente la capsazepina. Las concentraciones utilizadas de capsazepina fueron 1 y 3  $\mu\text{M}$ . Ambas concentraciones de capsazepina son utilizadas en lechos de resistencia para valorar la participación del receptor TRPV1 en los efectos vasculares de los cannabinoides (Zygmunt y cols., 1999; Ralevic y cols., 2000; White y cols., 2001).

En este trabajo se demuestra que la capsazepina inhibe competitivamente y de manera concentración dependiente la vasorrelajación endotelio independiente ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico de rata. Estos resultados están en consonancia con los expuestos por otros autores en esta misma clase de arterias (Zygmunt y cols., 1999; O'Sullivan y cols., 2004b; Domenicali y cols., 2005) y confirman el hecho de que el receptor TRPV1 únicamente está implicado en la vasorrelajación endotelio independiente ocasionada por la anandamida.

**De nuevo, en esta Tesis Doctoral se demuestra la participación de diferentes mecanismos en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida dependiendo del territorio vascular. En arterias de conductancia de gran calibre el receptor TRPV1 no está involucrado en la relajación producida por la anandamida, en cambio, en lechos de resistencia este receptor juega un papel importante en la relajación ocasionada por este endocannabinoide. Seguramente, estas diferencias en la participación del receptor TRPV1 en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida están en función de la contribución del endotelio en dicha relajación, de la densidad del receptor TRPV1 y/o de la densidad de las terminaciones nerviosas perivasculares entre los diferentes territorios vasculares (López-Miranda y cols., 2008).**

## **Participación de mediadores endoteliales en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata**

Teniendo en cuenta que la relajación causada por la anandamida en aorta de rata es endotelio dependiente, se ha valorado en este trabajo qué posibles factores endoteliales están implicados en la relajación de la anandamida en este territorio vascular. Concretamente, se evaluó la implicación de NO, EDHF y metabolitos derivados del AA.

La implicación de la síntesis de NO se comprobó con L-NAME, inhibidor de la eNOS, a la concentración 100  $\mu$ M. Las toxinas apamina y charibdotoxina administradas conjuntamente a la concentración de 100 nM, inhiben la liberación de EDHF. Las concentraciones utilizadas de cada uno de los inhibidores expuestos anteriormente son efectivas para evaluar la implicación de NO y EDHF en los efectos vasculares de los cannabinoides (Randall y cols., 1997; O'Sullivan y cols., 2005; Dannert y cols., 2007).

La relajación ocasionada por la anandamida en presencia de L-NAME se anuló. En cambio, en presencia de apamina y charibdotoxina, la relajación producida por la anandamida no se afectó. Este resultado indica que la producción y liberación de NO es fundamental en la vasorrelajación de la anandamida y se descarta la participación del EDHF en la misma. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los descritos por Mukhopadhyay en aorta de conejo (Mukhopadhyay y cols., 2002). Este autor demuestra que la relajación endotelio dependiente de la anandamida es mediada por la producción de NO a través de un receptor diferente a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Además, estudios llevados a cabo en células endoteliales de aorta demuestran que la metanandamida, análogo estable de la anandamida, y el “abnormal cannabidiol”, agonista del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>”, también estimulan la producción de NO (McCollum y cols., 2007).

**Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral se demuestra que la anandamida ocasiona vasorrelajación a través de la liberación y producción de NO y se podría sugerir que la activación del receptor “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” ocasiona la producción de NO en arterias de conductancia de gran calibre.**

Tras demostrar el papel que juega el NO en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida, se ha valorado también si la producción de sustancias vasoactivas derivadas del metabolismo del AA podrían participar en la relajación producida por la anandamida en aorta de rata. Como ya se expuso en la Introducción de este trabajo, la anandamida es metabolizada por la enzima FAAH a AA y etanolamina (Deutsch y cols., 1997b). Para valorar si la metabolización de la anandamida ocasiona sustancias derivadas del AA que medien la vasorrelajación ocasionada por este endocannabinoide se utilizó el URB597, inhibidor selectivo de la FAAH, a la concentración de 1  $\mu$ M. El URB597 a la concentración empleada en este trabajo se ha utilizado en trabajos previos para valorar la implicación del metabolismo de los endocannabinoides en los efectos vasculares de los mismos (Kozłowska y cols., 2008).

En presencia de URB597 se produjo una parcial y significativa inhibición de la relajación producida por la anandamida en aorta de rata. Este resultado nos indica que parte de la vasorrelajación de la anandamida es debida a la producción de sustancias vasoactivas procedentes de la metabolización de la misma a AA. La implicación de metabolitos de la anandamida en los efectos relajantes de la misma ha sido ya demostrada en arterias de conductancia de pequeño calibre (Pratt y cols., 1998; Grainger y Boachie-Ansah, 2001). Sin embargo, en arterias gran calibre no existen trabajos que demuestren la implicación del metabolismo de la anandamida en la vasorrelajación ocasionada por ella. Por lo tanto, esta Tesis Doctoral constituye el primer trabajo realizado en arterias de conductancia de gran calibre que implica a metabolitos vasoactivos derivados del AA en el efecto vasorrelajante de la anandamida. Otros autores han demostrado también un mecanismo similar en arterias de

conductancia humanas (arteria pulmonar) para el endocannabinoide virodamina. (Kozłowska y cols., 2008).

Una vez demostrado que la metabolización de la anandamida a AA a través de la FAAH es un paso necesario en la vasorrelajación causada por este endocannabinoide se investigó que vías metabólicas del AA podrían estar implicadas. El AA puede ser metabolizado por tres sistemas enzimáticos: las lipooxigenasas, el citocromo P450 y las COX (COX-1, COX-2). Hay evidencias que demuestran, en diferentes territorios vasculares, que los efectos de los endocannabinoides pueden estar mediados principalmente por metabolitos derivados de la vía del citocromo P450 o de la vía de las COX (Pratt y cols., 1998; Fleming y cols., 1999; Grainger y Boachie-Ansah, 2001; Watanabe y cols., 2003; Ho y Randall, 2007; Kozłowska y cols., 2008). Por lo tanto, en este trabajo nos hemos centrado en la evaluación de estas dos vías metabólicas.

Para valorar la implicación de metabolitos derivados de la vía del citocromo P450 en la relajación ocasionada por la anandamida se utilizó el 17-ODYA a la concentración de 5  $\mu$ M. La implicación de metabolitos derivados de la vía de las COX se evaluó con indometacina, a la concentración de 10  $\mu$ M. Ambos inhibidores, a las concentraciones citadas anteriormente, han sido utilizados previamente en otros trabajos para valorar los efectos vasculares de los cannabinoides (Grainger y Boachie-Ansah, 2001; Dannert y cols., 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata no se modificó en presencia del 17-ODYA, pero se observó una inhibición total de la misma en presencia de indometacina. Por lo tanto, la principal ruta metabólica implicada en la relajación producida por la anandamida en aorta de rata es la vía de las COX. Hasta la fecha, no existen trabajos en arterias de gran calibre que impliquen la vía de las COX en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida. Por lo tanto, es la primera vez que en ratas se describe este hecho en arterias de conductancia de gran calibre. Existe un trabajo similar realizado en arterias de naturaleza similar (arteria pulmonar humana) que describe que



la vasorrelajación ocasionada por la virodamina es bloqueada parcialmente en presencia de inhibidores de las COX (Kozłowska y cols., 2008).

Una vez demostrado que la vía de las COX está implicada en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida se concretó qué isoenzima de las COX está involucrada en dicha vasorrelajación. Con este fin, se utilizó SC560, inhibidor específico de la COX-1, a la concentración de 1  $\mu$ M, y DFU, inhibidor específico de la COX-2, a la concentración de 0.1  $\mu$ M. Las concentraciones utilizadas de ambos inhibidores son válidas para evaluar la implicación de la COX-1 y de la COX-2 en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida (Riendeau y cols., 1997; Bolla y cols., 2004).

Nuestros resultados demuestran que la relajación provocada por la anandamida es inhibida parcialmente en presencia de DFU, inhibidor selectivo de la COX-2, pero no en presencia de SC560, inhibidor de la COX-1. Existen trabajos previos que evalúan la participación de la COX-2 en la vasorrelajación ocasionada por los cannabinoides en arterias de resistencia, pero no en arterias de conductancia. Por lo tanto, esta Tesis Doctoral es, de nuevo, el primer trabajo que demuestra que la vasorrelajación inducida por la anandamida en una arteria de conductancia de gran calibre está mediada por metabolitos de la COX-2. Además, debido a que no existen diferencias entre las curvas concentración-respuesta de la anandamida en presencia de los inhibidores URB597, inhibidor de la FAAH, y DFU, inhibidor de la COX-2, seguramente la vía más probable de metabolización de la anandamida implique un primer paso de metabolización a través de la FAAH, actuando a continuación la COX-2.

Está descrito que la prostaglandina PGE<sub>2</sub>-etanolamida es el principal producto derivado de la metabolización de la anandamida por acción sucesiva de la FAAH y de la COX-2 (Kozak y Marnett, 2002). Esta prostaglandina ejerce sus efectos vasculares a través de los receptores EP: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>. En este trabajo se ha valorado la implicación sólo del receptor EP<sub>4</sub> por dos motivos: a) este receptor media respuestas vasodilatadoras; y b) es el más abundante de todos en el tejido vascular (Narumiya y cols., 1999; Davis y cols., 2004; Wilson y Giles, 2005). Para valorar la implicación del receptor EP<sub>4</sub> en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata se ha

utilizado el antagonista selectivo GW627368X a la concentración de 1 y 3  $\mu$ M (Wilson y cols., 2006).

La vasorrelajación ocasionada por la anandamida en presencia de GW627368X fue inhibida parcialmente y sólo a la concentración más alta utilizada. Además, se observó que el grado de inhibición de este antagonista fue similar al obtenido por URB597 y DFU. Por tanto, estos datos podrían indicar que el producto derivado de la metabolización de la anandamida a través de la FAAH y de la COX-2 actuaría sobre ese receptor. No existen trabajos ni en arterias de conductancia ni en arterias de resistencia que evalúen la implicación de receptores EP<sub>4</sub> en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida y que permita discutir los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

**En esta Tesis Doctoral se demuestra que la vasorrelajación ocasionada por la anandamida es mediada, en parte, por metabolitos derivados del AA ocasionados a partir de la metabolización de la anandamida. Concretamente, la FAAH en un primer paso metabolizaría a la anandamida en AA y etanolamina, a continuación el AA sería sustrato de la COX-2 y un metabolito no identificado en este trabajo actuaría a través del receptor EP<sub>4</sub> ocasionando relajación.**

Debido a lo relevante de los resultados obtenidos, es necesario recordar que la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en aorta se anuló en presencia de L-NAME y de indometacina. Estos datos sugieren que podría existir un nexo entre la eNOS y las COX. Se ha demostrado que el NO puede regular la activación de la COX-1 y de la COX-2, y que metabolitos derivados de la vía de las COX pueden inhibir o incrementar la producción y liberación de NO (Di Rosa y cols., 1996; Salvemini, 1997). Por lo tanto, con los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir que podría haber algún mecanismo de regulación entre ambas enzimas.

Con los resultados obtenidos hasta el momento en aorta de rata, la metabolización de la anandamida parece un mecanismo probable implicado en la vasorrelajación del endocannabinoide. Para que la FAAH metabolice a la anandamida es necesario que ésta pase al interior de las células endoteliales (Ho y Randall, 2007). Hasta el momento existen dos teorías: a) la anandamida atraviesa la membrana mediante un proceso de difusión pasiva (Glaser y cols., 2003; McFarland y Barker, 2004); b) la anandamida sea recaptada al interior celular mediante un transportador específico (Hillard y cols., 1997; Fowler y Jacobsson, 2002).

Como ya se mencionó en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la anandamida puede utilizar un transportador específico de membrana para pasar al interior celular. Por ello, en este trabajo se ha evaluado la posible implicación de este transportador para anandamida en la vasorrelajación ocasionada por la misma en aorta de rata. Con este fin, se ha utilizado un inhibidor del mismo, el AM404, a la concentración de 10  $\mu$ M. (Grainger y Boachie-Ansah, 2001). Es importante advertir que el AM404, por si solo, puede activar a los receptores vanilloides y ocasionar vasorrelajación (Zigmunt y cols., 2000), pero nuestros resultados muestran que la concentración de AM404 usada en este trabajo no interfiere en la función vascular de la aorta (Ver Tabla 7).

La vasorrelajación ocasionada por la anandamida en aorta de rata no se modificó en presencia del AM404. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la anandamida no utiliza dicho transportador para atravesar la membrana celular o bien que este transportador no se localiza en este territorio vascular. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por otros autores en arterias de resistencia (Chaytor y cols., 1999; Grainger y Boachie-Ansah, 2001). Probablemente, el transportador de la anandamida se exprese en mayor proporción en arterias de resistencia que en arterias de conductancia, y por ello estos autores sugieren que el transporte de la anandamida es necesario para la relajación ocasionada por este endocannabinoide en dichos territorios vasculares (Chaytor y cols., 1999; Grainger y Boachie-Ansah, 2001).

**En esta Tesis Doctoral los datos indican que el transporte de la anandamida no es un paso limitante en la vasorrelajación ocasionada por ella. Se podría, por tanto, sugerir que la anandamida atraviesa la membrana celular por difusión pasiva.**

### **Participación de canales de $K^+$ en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico de rata**

En arterias de resistencia ha sido propuesto, por diferentes autores, que los canales de  $K^+$  podrían ser una vía importante involucrada en la vasorrelajación endotelio independiente ocasionada por los cannabinoides (Randall y Kendall, 1998; White y Hiley, 1998; Gebremedhin y cols., 1999). Por tanto, en este trabajo se ha valorado la implicación de estos canales en la relajación inducida por la anandamida en lecho mesentérico de rata.

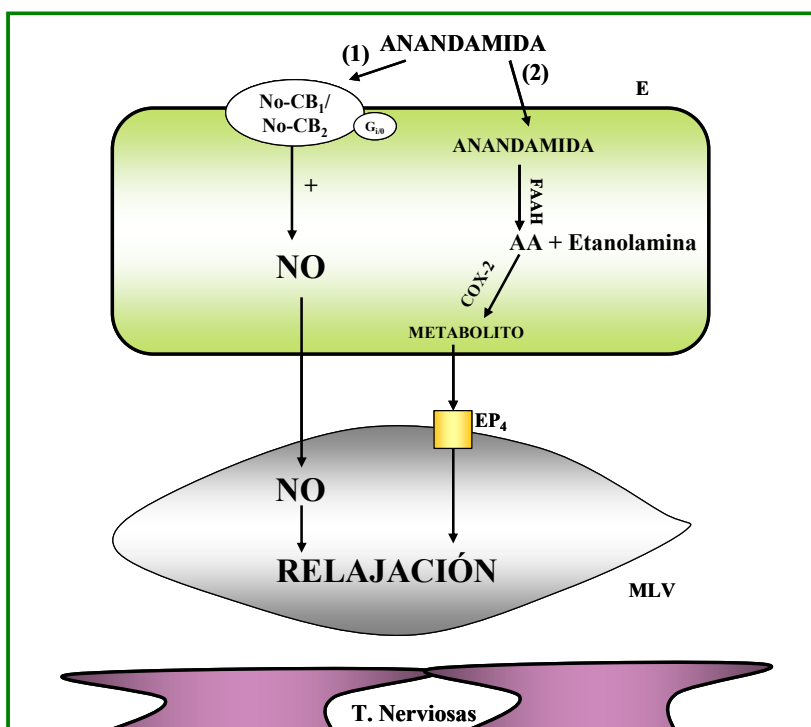
La evaluación de la implicación de canales de  $K^+$  en los efectos vasculares de la anandamida se ha realizado utilizando un inhibidor inespecífico de los mismos, TEA, a la concentración de 10 mM. Este antagonista es válido para evaluar la participación de canales de  $K^+$  en la vasorrelajación producida por los cannabinoides en arterias de resistencia (White y Hiley, 1997).

Nuestros resultados demuestran que la vasorrelajación producida por la anandamida en lecho mesentérico fue inhibida parcialmente en presencia de TEA. Por lo tanto, los canales de  $K^+$  están implicados parcialmente en la vasorrelajación producida por la anandamida en lecho mesentérico de rata. Nuestro trabajo confirma los resultados obtenidos por otros autores en arterias de resistencia y de conductancia de pequeño calibre respecto a la implicación de dichos canales en los efectos vasculares de la anandamida (Plane y cols., 1997; Randall y Kendall, 1998; Ishioka y Bukoski, 1999; White y cols., 2001; Romano y Lograno, 2006).

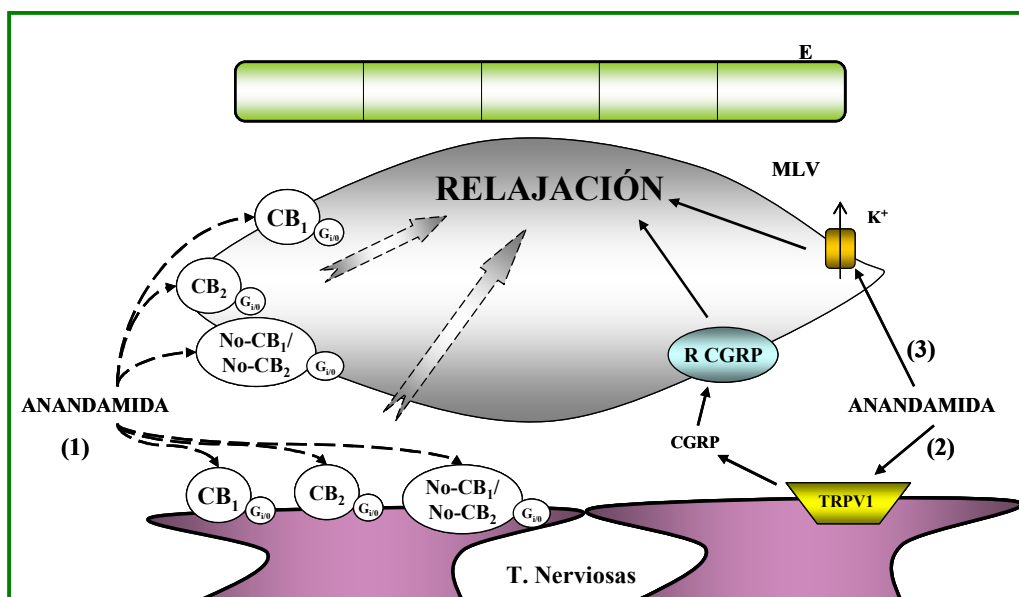
Quedaría pendiente determinar si la activación de los canales de  $K^+$  es un mecanismo de acción directa de la anandamida sobre estos canales, o bien la anandamida al unirse a los receptores cannabinoides actuaría sobre los canales de  $K^+$ .

**En esta Tesis Doctoral se demuestra que los canales de  $K^+$  también están involucrados parcialmente en la relajación ocasionada por la anandamida en lecho mesentérico de rata.**

A continuación, y como resumen de los mecanismos implicados en la vasorrelajación ocasionada por la anandamida en arterias de gran calibre y en lechos de resistencia se exponen dos figuras explicativas (Figuras 52, 53).



**Figura 52.** Esquema general de los posibles mecanismos implicados en la vasorrelajación ocasionada por anandamida en arteria aorta de rata. La anandamida ocasiona vasorrelajación principalmente por dos mecanismos. (1) La anandamida al unirse al receptor endotelial “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>” promueve la producción de óxido nítrico (NO) que al difundir al músculo liso vascular (MLV) ocasiona varorrelajación del mismo. (2) Además, la anandamida al ser metabolizada secuencialmente por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), y por la ciclooxigenasa 2 (COX-2) genera algún metabolito, no identificado en este trabajo, que tiene afinidad por el receptor para prostaglandina E<sub>2</sub> subtipo 4 (EP<sub>4</sub>), y ocasiona vasorrelajación del MLV. AA: ácido araquidónico; E: endotelio; T. Nerviosas: terminaciones nerviosas.



**Figura 53.** Esquema general de los posibles mecanismos implicados en la vasorrelajación ocasionada por anandamida en lecho mesentérico de ratona. La anandamida ocasiona vasorrelajación principalmente por tres mecanismos. (1) La anandamida mediante la activación de los receptores cannabinoides  $CB_1$ ,  $CB_2$  y “No- $CB_1$ /No- $CB_2$ ” ubicados en el músculo liso vascular (MLV) o en las terminaciones nerviosas (T. Nerviosas) produce vasorrelajación del MLV. (2) La anandamida mediante la activación del receptor “transient receptor potential vanilloid” (TRPV1) libera el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) que difunde al MLV e interacciona con receptores específicos para el mismo (R CGRP) y ocasiona vasorrelajación del MLV. (3) Por último, la anandamida ocasiona hiperpolarización del MLV, y por consiguiente relajación del mismo al activar canales de potasio ( $K^+$ ) en el MLV. E: endotelio.





# CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos de la evaluación de los mecanismos implicados en los efectos vasculares ocasionados por la anandamida en una arteria de conductancia de gran calibre y en un lecho de resistencia podemos concluir que:

**1. La anandamida ocasiona vasorrelajación tanto en arterias de conductancia de gran calibre como en lechos de resistencia. La potencia de la anandamida para causar vasorrelajación es similar en ambos territorios vasculares, mientras que, la eficacia para causar vasorrelajación es superior en lechos de resistencia que en arterias de gran calibre.**

**2. La vasorrelajación ocasionada por la anandamida es endotelio dependiente en arterias de gran calibre, mientras que, en lechos de resistencia resulta endotelio independiente.**

**3. La vasorrelajación ocasionada por la anandamida en arterias de gran calibre es mediada por el receptor cannabinoide “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>”, mientras que, en lechos de resistencia se demuestra la participación de los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y “No-CB<sub>1</sub>/No-CB<sub>2</sub>”.**

**4. La vasorrelajación ocasionada por la anandamida en arterias de gran calibre no es mediada por el receptor TRPV1, en cambio, este receptor sí está implicado en la vasorrelajación de la anandamida en lechos de resistencia.**

**5. En arterias de gran calibre, la vasorrelajación endotelio dependiente ocasionada por la anandamida es mediada parcialmente por su metabolización, a través de las enzimas FAAH y COX-2. Los receptores para prostaglandinas E<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub>, estarían implicados en dicho mecanismo.**

**6. En lechos de resistencia, la vasorrelajación endotelio independiente ocasionada por la anandamida es mediada parcialmente a través de canales de  $K^+$ .**

# BIBLIOGRAFÍA



Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, de Caro G, Coruzzi G, Soldani G. Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol*. 2002; 135(7): 1598-1606.

Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Rev Neurosci*. 2001; 2(10): 734-744.

Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, Tanaka M. Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain*. 2006; 124(1-2): 175-183.

Baker D, Pryce G. The therapeutic potential of cannabis in multiple sclerosis. *Expert Opin Invest Drugs*. 2003; 12(4): 561-567.

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

Bátkai M, Pacher P, Osei-Hyaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, Offertáler L, Mackie K, Rudd MA, Bukoski RD, Kunos G. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*. 2004; 110(14): 1996-2002.

Begg M, Mo FM, Offertáler L, Bátkaí S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G. G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current. *J Biol Chem*. 2003; 278(46): 46188- 46194.

Begg M, Pacher P, Bátkaí S, Osei-Hyaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Therp*. 2005; 106(2): 133-145.

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.

Berger R, Garnier Y. Perinatal brain injury. *J Perinat Med*. 2000; 28(4): 261-285.

Berlach DM, Shir Y, Ware MA. Experience with the synthetic cannabinoid nabilone in chronic noncancer pain. *Pain Med*. 2006; 7(1): 25-29.

Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 256(2): 377-380.

Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005; 81(2): 224-238.

Bolla M, You D, Loufrani L, Levy BI, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension*. 2004; 43(6): 1264-1269.

Bouaboula M, Dussossoy D, Casellas P. Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses. *J Biol Chem*. 1999; 274(29): 20397-20405.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*. 1995; 312(Pt2): 637-641.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. Signalling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem*. 1996; 237(3): 704-711.

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

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

Breyne J, Vanheel B. Methanandamide hyperpolarizes gastric arteries by stimulation of TRPV1 receptors on perivascular CGRP containing nerves. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47(2): 303-309.

Busse R, Edwards G, Féléto M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*. 2002; 23(8): 374-380.

Busse R, Fichtner H, Luckhoff A, Kohlhardt M. Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol*. 1988; 255(4 Pt 2): H965-H969.

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

Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2(1): 69-82.

Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blázquez C, Garcia S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, González-Feria L, Piris MA, Iovanna JL, Guzmán M, Velasco G. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*. 2006; 9(4): 301-312.

Casanova L, Blázquez C, Fernández-Aceñero MJ, Villanueva C, Huffman J, Jorcano JL, Guzmán M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*. 2003; 111(1): 43-50.

Chataigneau T, Feletou M, Thollon C, Villeneuve N, Vilaine JP, Duhault J, Vanhoutte PM. Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 1998; 123(5): 968-974.



Chaytor AT, Martin PEM, Evans WH, Randall MD, Griffith TM. The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J Physiol*. 1999; 520 (Pt 2): 539-550.

Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo V. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 330(4): 1062-1106.

Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*. 2003; 112(3): 423-431.

Coutts AA y Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4(6): 572-579.

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.

Cusma-Pelógia N, Oliveira SF, Nigro D, de Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB. Endothelium inactivation in in vitro perfused vascular beds. Comparison of methods. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1993; 29(3): 157-163.

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

Davis RJ, Murdoch CE, Ali M, Purbrick S, Ravid R, Baxter GS, Tilford N, Sheldrick RL, Clark KL, Coleman RA. EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol*. 2004; 141(4): 580-585.

De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett*. 2000; 483(1): 52-56.

De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, and Di Marzo V. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(14): 8375-8380.

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

Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, Moore LC. Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest*. 1997a; 100(6): 1538-1546.

Deutsch DG, Lin S, Hill WA, Morse KL, Salehani D, Arreaza G, Omeir RL, Makriyannis A. Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997b; 231(1): 217-221.

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

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988; 34(5): 605-673.

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.

Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Martin BR. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem.* 2000a; 75(6): 2434-2444.

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

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járαι Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature.* 2001; 410(6830): 822-825.

Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, and Brotchie JM. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2000b; 14(10): 1432-1438.

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

Di Rosa M, Ialenti A, Iannaro A, Sautebin L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1996; 54(4): 229-238.

Domenicali M, Ros J, Fernandez-Varo G, Cejudo-Martin P, Crespo M, Morales-Ruiz M, Briones AM, Campistol J-M, Arroyo V, Vila E, Rodés J, Jimenez W. Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut.* 2005; 54(4): 522-527.

Duncan M, Kendall DA, Ralevic V. Characterization of cannabinoid modulation of sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004a; 311(1): 411-419.

Duncan M, Millns P, Smart D, Wright JE, Kendall DA, Ralevic V. Noladin ether, a putative endocannabinoid, attenuates sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed via a non-CB1/CB2 G(i/o) linked receptor. *Br J Pharmacol.* 2004b; 142(3): 509-518.

Ellis EF, Moore SF, Willoughby KA. Anandamide and delta 9-THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin. *Am J Physiol.* 1995; 269(6 Pt 2): H1859-H1864.

El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol.* 2006; 168(1): 235-244.

El-Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S, Abou-Mohamed G, Tsai NJ, Roon P, Caldwell RB, Caldwell RW, Green K, Liou GI. Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am J Pathol.* 2003; 163(5): 1997-2008.

ElSohly MA. Componentes químicos del cannabis. En: Cannabis y cannabinoides. Editores: Franjo Grotenhermen, Ethan Russo, Ricardo Navarrete Varo. Ed: Castellarte S.L. Murcia (España). 2003; pp. 57-67.

Engler MB, Engler MM, Browne A, Sun YP, Sievers R. Mechanisms of vasorelaxation induced by eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in WKY rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2000; 131(8): 1793-1799.

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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(8): 3376-3380.

Faller y cols., 2006. Corazón y sistema vascular. En: Estructura y función del cuerpo humano. Editores: Adolf Faller, Michael Schünke, Gabriele Schünke. Ed: Paidotribo S.L. Barcelona (España). 2006; pp. 219-274.

Faraci FM, Brian JE. Nitric Oxide and the cerebral circulation. *Stroke.* 1994; 25(3): 692-703.

Faubert Kaplan BL, Kaminski NE. Cannabinoids inhibit the activation of ERK MAPK in PMA/IO-stimulated mouse splenocytes. *Int Immunopharmacol.* 2003; 3(10-11): 1503-1510.

Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38: 179-200.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, Koppel GA, Brownstein M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284(1): 291-297.

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

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 1996; 393(2-3): 231-235.

Félétou M., Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988; 93(3): 515-524.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(6): 1215-1225.

Fernández-Ruiz J, Lastres-Becker I, Cabranes A, González S, Ramos JA. Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66(2-3): 263-273.

Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R, Di Marzo V. Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett.* 2002; 513(2-3): 294-298.

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. *Cell Signal.* 1999; 11(3): 189-193.

Fleming I, Schermer B, Popp R, Busse R. Inhibition of the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cannabinoid receptor agonists. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(4): 949-960.

Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(5): 1788-1792.

Fowler CJ, Jacobsson SO. Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide--targets for drug development?. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66(2-3): 193-200.

Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain.* 2001; 92(1-2): 91-100.

Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 2003; 83(3): 1017-1066.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288(5789): 373-376.

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

Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M. Antitumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med.* 2000; 6(3): 313-319.

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, elucidation and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.* 1964; 86: 1646-1947.

Gardiner SM, March JE, Kemp PA., Bennett T. Regional haemodynamic responses to the cannabinoid agonist, WIN 55212-2, in unconscious, normotensive rats, and in hypertensive, transgenic rats. *Br J Pharmacol.* 2001; 133(3): 445-453.

Garland JG, Mcpherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hiperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1992; 105(2): 429-435.

Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol.* 1996; 307(3): 331-338.

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. *Am J Physiol.* 1999; 276(6 Pt 2): H2085-H2093.

Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 1991; 279(Pt 1): 129-134.

Giang DK, Cravatt BF. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(6): 2238-2242.

Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG. Evidence against the presence of anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(7): 4269-4274.

Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG. Anandamide transport: A critical review. *Life Sci.* 2005; 77(14): 1584-1604.

Glass M. The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001; 25(4): 743-765.

Glass M, Dragunow M, Faull RL. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience.* 2000; 97(3): 505-519.

Gómez Del Pulgar T, De Ceballos ML, Guzmán M, Velasco G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277(39): 36527-36533.

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

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

Grainger J, Boachie-Ansah G. Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(5): 1003-1012.

Griffin G, Fernando SR, Ross RA. Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol*. 1997; 339(1): 53-61.

Grotenhermen F. Efectos del cannabis y de los cannabinoides. En: Cannabis y cannabinoides. Editores: Franjo Grotenhermen, Ethan Russo, Ricardo Navarrete Varo. Ed: Castellarte S.L. Murcia (España). 2003; pp. 89-101.

Guindon J, Beaulieu P. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*. 2006; 50(7): 814-823.

Guzmán M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(10): 745-755.

Guzmán M, Galve-Roperh I, Sánchez C. Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22(1): 19-22.

Hájos 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. *Eur J Neurosci*. 2004; 19(11): 2991-2996.

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(14): 8268-8273.

Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci*. 1999; 65(6-7): 715-723.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98(7): 3662-3665.

Harris D, McCulloch AI, Kendall DA, Randall MD. Characterization of vasorelaxant responses to anandamide in the rat mesenteric arterial bed. *J Physiol*. 2002; 539(Pt 3): 893-902.

Hepler RS, Frank IM. Marijuana smoking and intraocular pressure. *JAMA*. 1971; 217(10): 1392-1394.

Herkenham M, Lynn AB, De Costa BR, Richfield EK. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*. 1991; 547(2): 267-274.

Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, Guzmán M, Velasco G. p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Lett*. 2005; 579(22): 5084-5088.

Hillard CJ. Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 294(1): 27-32.

Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrhian A, Campell WB. Accumulation of N-arachidonylethanolamide (Anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*. 1997; 69(2): 631-638.

Ho WS, Hiley CR. Endothelium-independent relaxation to cannabinoids in rat-isolated mesenteric artery and role of Ca<sup>2+</sup> influx. *Br J Pharmacol*. 2003a; 139(3): 585-597.

Ho WS, Hiley CR. Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 2003b; 138(7): 1320-1332.

Ho WS, Hiley CR. Vasorelaxant activities of the putative endocannabinoid virodhamine in rat isolated small mesenteric artery. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56(7): 869-875.

Ho WS, Randall MD. Endothelium-dependent metabolism by endocannabinoid hydrolases and cyclooxygenases limits vasorelaxation to anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol*. 2007; 150(5): 641- 651.

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. *Eur J Neurosci*. 2005; 22(9): 2387-2391.

Hohmann AG. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids*. 2002; 121(1-2): 173-190.

Hohmann AG, Herkenham M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*. 1999; 92(4): 1171-1175.

Hoi PM, Hiley CR. Vasorelaxant effects of oleamide in rat small mesenteric artery indicate action at a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(5): 560-568.

Holland M, John Challiss RA, Standen NB, Boyle JP. Cannabinoid CB1 receptors fail to cause relaxation, but couple via Gi/Go to the inhibition of adenylyl cyclase in carotid artery smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(3): 597-604.

Hosohata K, Quock RM, Hosohata Y, Burkey TH, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. AM630 is a competitive cannabinoid receptor antagonist in the guinea pig brain. *Life Sci*. 1997; 61(9): 115-118.

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

Howlett AC, Mukhopadhyay S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids*. 2000; 108(1-2): 53-70.

<http://www.emea.europa.eu>

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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(12): 8400-8405.

Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry*. 2001; 58(4): 322-328.

Ibrahim MM, Rude ML, Stagg NJ, Mata HP, Lai J, Vanderah TW, Porreca F, Buckley NE, Makriyannis A, Malan TP Jr. CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain*. 2006; 122(1-2): 36-42.

Illiano S, Nagao T, Vanhoutte PM. Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br J Pharmacol*. 1992; 107(2): 387-392.

Ishioka N, Bukoski RD. A role for N-arachidonylethanolamine (anandamide) as the mediator of sensory nerve-dependent  $Ca^{2+}$ -induced relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 289(1): 245-250.

Izzo AA, Mascolo N, Capasso F. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr Opin Pharmacol*. 2001; 1(6): 597-603.

Jackson SJ, Diemel LT, Pryce G, Baker D. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J Neurol Sci*. 2005; 233(1-2): 21-25.

Jaggari 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(1-2): 189-199.

Jakab B, Helyes Z, Varga A, Bolcskei K, Szabo A, Sandor, Elekes K, Börzsei R, Keszthelyi D, Pintér E, Petho G, Németh J, Szolcsányi J. Pharmacological characterization of the TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2005; 517(1-2): 35-44.

Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*. 2001; 134(6): 1151-1154.

Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdán RK, Zimmer A, Kunos G. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(24): 14136-14141.

Jatoi A, Windschitl HE, Loprinzi CL, Sloan JA, Dakhil SR, Mailliard JA, Pundaleeka S, Kardinal CG, Fitch TR, Krook JE, Novotny PJ, Christensen B. Dronabinol versus megestrol acetate versus combination therapy for cancer-associated anorexia: a North Central Cancer Treatment Group study. *J Clin Oncol*. 2002; 20(2): 567-573.

Jones MP, Dille JB, Drossman D, Crowell MD. Brain-gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships. *Neurogastroenterol Motil*. 2006; 18(2): 91-103.

Jones RT. Cardiovascular system effects of marijuana. *J Clin Pharmacol*. 2002; 42(11): 58S-63S.



Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2002; 55(3): 619-625.

Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 2000; 21(11): 432-438.

Kagota S, Yamaguchi Y, Nakamura K, Sugiura T, Waku K, Kunitomo M. 2-Arachidonoylglycerol, a candidate of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Eur J Pharmacol*. 2001; 415(2-3): 233-238.

Kaminski, NE. Immune regulation by cannabinoid compounds through the inhibition of the cyclic AMP cascade and altered gene expression. *Biochem Pharmacol*. 1996; 52(8): 1133-1140.

Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pásztor ET, Erdei N, Czikora A, Papp Z, Edes I, Pórszász R, Tóth A. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol*. 2008; 73(5): 1405-1412.

Khaspekov LG, Brenz Verca MS, Frumkina LE, Hermann H, Marsicano G, Lutz B. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci*. 2004; 19(7): 1691-1698.

Kobayashi Y, Waku K, Sugiura T. Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J Biochem*. 2001; 129(5): 665-669.

Korczyn AD. The ocular effects of cannabinoids. *Gen Pharmacol*. 1980; 11(5): 419-423.

Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, Dubois RN, Brash AR, Marnett LJ. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonoylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem*. 2002; 277(26): 23278-23286.

Kozak KR, Marnett LJ. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002; 66(2-3): 211-220.

Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 2000; 275(43): 33744-33749.

Kozłowska H, Baranowska M, Schlicker E, Kozłowski M, Laudański J, Malinowska B. Virodhamine relaxes the human pulmonary artery through the endothelial cannabinoid receptor and indirectly through a COX product. *Br J Pharmacol*. 2008; 155(7): 1034-1042.

Laine K, Jarvinen K, and Jarvinen T. Topically administered CB(2)-receptor agonist, JWH-133, does not decrease intraocular pressure (IOP) in normotensive rabbits. *Life Sci*. 2003; 72(7): 837-842.

Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats is mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 281(3): 1030-1037.

Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic?. *Curr Med Chem*. 1999; 6(8): 757-773.

Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, Makriyannis A. Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci*. 1999; 1(2): E4.

Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos M, Zeng BY, Jenner P, Ramos JJ, Fernández-Ruiz JJ. Increased cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci*. 2001; 14(11): 1827-1832.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmetier M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduce addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*. 1999; 283(5400): 401-404.

Leker RR, Gai N, Mechoulam R, Ovadia H. Drug-induced hypothermia reduces ischemic damage: effects of the cannabinoid HU-210. *Stroke*. 2003; 34(8): 2000-2006.

Lépicier P, Lagneux C, Sirois MG, Lamontagne D. Endothelial CB1-receptors limit infarct size through NO formation in rat isolated hearts. *Life Sci*. 2007; 81(17-18): 1373-1380.

Leweke FM. Efectos agudos del cannabis y de los cannabinoides. En: Cannabis y cannabinoides. Editores: Franjo Grotenhermen, Ethan Russo, Ricardo Navarrete Varo. Ed: Castellarte S.L. Murcia (España). 2003; pp. 317-324.

Lichtman AH, Martin BR. Delta-9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology*. 1996; 126(2): 125-131.

Lichtman AH, Martin BR. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991; 258(2): 517-523.

Lichtman AH, Martin BR. The selective cannabinoid antagonist SR 141716A blocks cannabinoid-induced antinociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997; 57(1-2): 7-12.

Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J*. 2000; 346 (Pt 3): 835-840.

Liu JH, Dacus AC. Central nervous system and peripheral mechanisms in ocular hypotensive effect of cannabinoids. *Arch Ophthalmol*. 1987; 105(2): 245-248.

Lograno MD, Romano MR. Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *Eur J Pharmacol*. 2004; 494(1): 55-62.

López-Miranda V, Herradón E, Dannert MT, Alasua A, Martín MI. Anandamide vehicles: a comparative study. *Eur J Pharmacol*. 2004; 505(1-3): 151-161.

López-Miranda V, Herradón E, Martín MI. Vasorelaxation caused by cannabinoids: mechanisms in different vascular beds. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008; 6(4): 335-346.

López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Lastres-Becker I, González S, Fernández-Ruiz J, Ramos JA. Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors. *J Med Chem*. 2001; 44(26): 4505-4508.

Lutz B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002; 66(2-3): 123-142.

Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem*. 2000; 275(18): 13484-13492.

Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agrò AF. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem*. 1998; 273(48): 32332-32339.

Mackie K., Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(9): 3825-3829.

Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J*. 2006; 8(2): E298-E306.

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 Arch Pharmacol*. 2001; 364(6): 562-569.

Mallet PE, Beninger RJ. The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR-141716A attenuates the memory impairment produced by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacology*. 1998; 140(1): 11-19.

Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB<sub>1</sub>. *J Neurochem*. 2002; 80(3): 448-456.

Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI. Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain*. 1999; 82(2): 199-205.

Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP, Parolaro D. Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 308(3): 838-845.

Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(8): 3171-3180.

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.

McCollum L, Howlett AC, Mukhopadhyay S. Anandamide-mediated CB1/CB2 cannabinoid receptor-independent nitric oxide production in rabbit aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 321(3): 930-937.

McFarland MJ, Barker EL. Anandamide transport. *Pharmacol Ther*. 2004; 104(2):117-135.

McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood*. 2002; 100(2): 627-634.

Mcpartland JM, Pruitt PL. Side effects of pharmaceuticals not elicited by comparable herbal medicines: the case of tetrahydrocannabinol and marijuana. *Altern Ther Health Med*. 1999; 5(4): 57-62.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewich M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995; 50(1): 83-90.

Mechoulam R, Feigenbaum JJ, Lander N, Segal M, Jarge TUC, Hiltunen AJ, Consroe P. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia*. 1988; 44(9): 762-764.

Mechoulam R, Frider E, Ben-Shabat S, Meiri U, Horowitz M. Carbachol, an acetylcholine receptor agonist, enhances production in rat aorta of 2-arachidonoyl glycerol, a hypotensive endocannabinoid. *Eur J Pharmacol*. 1998; 362(1): R1-R3.

Mendizábal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol*. 2007; 151(4): 427-440.

Mendizábal VE, Orliac ML, Adler-Graschinsky E. Long-term inhibition of nitric oxide synthase potentiates effects of anandamide in the rat mesenteric bed. *Eur J Pharmacol*. 2001; 427(3): 251-262.

Messequer A, Planells-Cases R, Ferrer-Montiel A. Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr Neuropharmacol*. 2006; 4(1): 1-15.

Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*. 2008; 93(1): 141-147.

Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci*. 2002; 22(22): 9742-9753.

Molina-Holgado F, Lledo A, and Guaza C. Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport*. 1997; 8(8): 1929-1933.

- Moncada S., Palmer RM., Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43(2): 109-142.
- Montero C, Campillo NE, Goya P, Páez JA. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur J Med Chem.* 2005; 40(1): 75-83.
- Moody JS, Kozak KR, Ji C, Marnett LJ. Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase. *Biochemistry.* 2001; 40(4): 861-866.
- Mukhopadhyay S, Chapnick BM, Howlett AC. Anandamide-induced vasorelaxation in rabbit aortic rings has two components: G protein dependent and independent. *Am J Physiol.* 2002; 282(6): H2046-H2054.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 365(6441): 61-65.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999; 79(4): 1193-1226.
- Netzeband JG, Conroy SM, Parsons KL, Gruol DL. Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca<sup>2+</sup> signals in cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci.* 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 Arch Pharmacol.* 2003; 367(5): 434-443.
- O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA). *Br J Pharmacol.* 2004a; 141(5): 803-812.
- O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2004b; 142(3): 435-442.
- O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Vascular effects of delta9-tetrahydrocannabinol (THC), anandamide and N-arachidonoyldopamine (NADA) in the rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol.* 2005; 507(1-3): 211-221.
- Offertáler L, Mo F, Bátkai 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. *Mol Pharmacol.* 2003; 63(3): 699-705.
- Oka S, Tsuchie A, Tokumura A, Muramatsu M, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Sugiura T. Ether-linked analogue of 2-arachidonoylglycerol (noladin ether) was not detected in the brains of various mammalian species. *J Neurochem.* 2003; 85(6): 1374-1381.
- Ong WY, Mackie K. A light and electron microscopic study of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience.* 1999; 92(4): 1177-1191.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* 2005; (168): 599-625.

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice. *J Physiol*. 2004; 558(Pt 2): 647-657.

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

Page KJ, Besret L, Jain M, Monaghan EM, Dunnett SB, Everitt BJ. Effects of systemic 3-nitropropionic acid-induced lesions of the dorsal striatum on cannabinoid and mu-opioid receptor binding in the basal ganglia. *Exp Brain Res*. 2000; 130(2): 142-150.

Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A. Cannabinergic ligands. *Chem Phys Lipids*. 2002; 121(1-2): 3-19.

Pate DW, Järvinen K, Urtti A, Jarho P, Järvinen T. Ophthalmic arachidonylethanolamide decreases intraocular pressure in normotensive rabbits. *Curr Eye Res*. 1995; 14(9): 791-797.

Pérez-Vizcaino F, Cogolludo AL, Zaragoza-Arnez F, Fajardo S, Ibarra M, Lopez-Lopez JG, Tamargo J. Vasodilator effects of sodium nitroprusside, levcromakalim and their combination in isolated rat aorta. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(7): 1419-1426.

Pertwee RG. Cannabinoid and the gastrointestinal tract. *Gut*. 2001a; 48(6): 859-867.

Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*. 2001b; 63(5): 569-611.

Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan?. *Br J Pharmacol*. 2007; 152(7): 1092-1101.

Pertwee RG. Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochem Soc Trans*. 1998; 26(2): 267-272.

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Pharmacol Ther*. 1997; 74(2): 129-180.

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem*. 1999; 6(8): 635-664.

Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002; 66(2-3): 101-121.

Petitcolin MA, Vandeputte C, Spitzbarth-Regrigny E, Bueb JL, Capdeville-Atkinson C, Tschirhart E. Lack of involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins in norepinephrine-induced vasoconstriction of rat aorta smooth muscle. *Biochem Pharmacol*. 2001; 61(4): 485-491.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(11): 873-884.

Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(10): 5802-5807.

Plane F, Holland M, Waldron GJ, Garland CJ, Boyle JP. Evidence that anandamide and EDHF act via different mechanisms in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 1997; 121(8): 1509-1511.

Poblete IM, Orliac ML, Briones R, Adler-Graschinsky E, Huidobro-Toro JP. Anandamide elicits an acute release of nitric oxide through endothelial TRPV1 receptor activation in the rat arterial mesenteric bed. *J Physiol.* 2005; 568(Pt 2): 539-551.

Pollock JS, Klinghofer V, Föstermann U, Murad F. Endothelium oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.* 1992; 309(3): 402-404.

Porcella A, Maxia C, Gessa GL, Pani L. The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur J Neurosci.* 2000; 12(3): 1123-1127.

Porcella A, Maxia C, Gessa GL, Pani L. The synthetic cannabinoid WIN55212-2 decreases the intraocular pressure in human glaucoma resistant to conventional therapies. *Eur J Neurosci.* 2001; 13(2): 409-412.

Portella G, Laezza C, Laccetti P, De Petrocellis L, Di Marzo V, Bifulco M. Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J.* 2003; 17(12): 1771-1773.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301(3): 1020-1024.

Pratt PF, Hillard CJ, Edgmond WS, Campbell WB. N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *Am J Physiol.* 1998; 274(1 Pt 2): H375-H381.

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Hasko G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari Z, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. CB2-receptor stimulation attenuates TNF- $\alpha$ -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol.* 2007; 293(4): H2210-H2218.

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hasko G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF- $\alpha$ -induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(2): 347-357.

Ralevic V. Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission. *Eur J Pharmacol.* 2003; 472(1-2): 1-21.

Ralevic V, Kendall DA. Cannabinoids inhibit pre- and postjunctionally sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol.* 2002; 444(3): 171-181.

Ralevic V, Kendall DA, Randall MD, Smart D. Cannabinoid modulation of sensory neurotransmission via cannabinoid and vanilloid receptors: roles in regulation of cardiovascular function. *Life Sci.* 2002; 71(22): 2577-2594.

Ralevic V, Kendall DA, Randall MD, Zygmunt PM, Movahed P, Högestätt ED. Vanilloid receptors on capsaicin-sensitive sensory nerves mediate relaxation to methanandamide in the rat isolated mesenteric arterial bed and small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2000; 130(7): 1483-1488.

Ramos JA, Gonzalez S, Sagredo O, Gomez-Ruiz M, Fernandez-Ruiz J. Therapeutic potential of the endocannabinoid system in the brain. *Mini Rev Med Chem.* 2005; 5(7): 609-617.

Randall MD, Alexander SPH, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 229(1): 114-120.

Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 95(2): 191-202.

Randall MD, Kendall DA. Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol.* 1998; 346(1): 51-53.

Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2004; 142(1): 20-26.

Randall MD, McCulloch AI, Kendall DA. Comparative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat isolated mesentery. *Eur J Pharmacol.* 1997; 333(2-3):191-197.

Rhee MH, Kim SK. SR144528 as inverse agonist of CB2 cannabinoid receptor. *J Vet Sci.* 2002; 3(3): 179-184.

Riendeau D, Percival MD, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Falgoutyret JP, Ford-Hutchinson AW, Gordon R, Greig G, Gresser M, Guay J, Kargman S, Léger S, Mancini JA, O'Neill G, Ouellet M, Rodger IW, Thérien M, Z. Wang, J.K. Webb, Wong E, Xu L, Young RN, Zamboni R, Prasit P, Chan CC. Biochemical and pharmacological profile of a tetra substituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol.* 1997; 121(1): 105-117.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrie J, Breliere J, Le Fur G. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 1994; 350(2-3): 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, Brelière JC, Le Fur GL. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284(2): 644-650.

Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol.* 2006; 126(2): 177-187.



- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol*. 2005; 40(1): 2-14.
- Romano MR, Lograno MD. Cannabinoid agonists induce relaxation in the bovine ophthalmic artery: evidences for CB1 receptors, nitric oxide and potassium channels. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(8): 917-925.
- Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernández-Ruiz JJ, de Yébenes JG, Ramos JA. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci*. 2000; 66(6): 485-494.
- Ross RA, Craib SJ, Stevenson LA, Pertwee RG, Henderson A, Toole J, Ellington HC. Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 301(3): 900-907.
- Rudich Z, Stinson J, Jeavons M, Brown SC. Treatment of chronic intractable neuropathic pain with dronabinol: case report of two adolescents. *Pain Res Manag*. 2003; 8(4): 221-224.
- Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci*. 1997; 53(7): 576-582.
- Sánchez C, de Ceballos ML, Gómez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzmán M. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res*. 2001; 61(15): 5784-5789.
- Sañudo-Peña MC, Strangman NM, Mackie K, Walker JM, Tsou K. CB1 receptor localization in spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. *Acta Pharmacol Sin*. 1999; 20(12): 1115-1120.
- Schultz JE, Hsu AK, Barbieri JT, Li PL, Gross GJ. Pertussis toxin abolishes the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in intact rat heart. *Am J Physiol*. 1998; 275(2 Pt 2): H495-H500.
- Seltzman HH. Structure and receptor activity for classical cannabinoids. *Curr Med Chem*. 1999; 6(8): 685-704.
- Shoemaker JL, Joseph BK, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL. The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 314(2): 868-875.
- Si H, Heyken WT, Wölflé SE, Tysiac M, Schubert R, Grgic I, Vilianovich L, Giebing G, Maier T, Gross V, Bader M, de Wit C, Hoyer J, Köhler R. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *Circ Res*. 2006; 99(5): 537-544.
- Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrie P. SR 141716, a CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav Pharmacol*. 1998; 9(2): 179-181.

Skaper SD, Facci L, Romanello S, Leon A. Mast cell activation causes delayed neurodegeneration in mixed hippocampal cultures via the nitric oxide pathway. *J Neurochem.* 1996; 66(3): 1157-1166.

Solowij N y Grenyer BFS. Efectos psíquicos y cognitivos a largo plazo. En: Cannabis y cannabinoides. Editores: Franjo Grotenhermen, Ethan Russo, Ricardo Navarrete Varo. Ed: Castellarte S.L. Murcia (España). 2003; pp. 373-387.

Song ZH, Slowey CA. Involvement of cannabinoid receptors in the intraocular pressure-lowering effects of WIN55212-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292(1): 136-139.

Spoto B, Fezza F, Parlongo G, Battista N, Sgro E, Gasperi V, Zoccali C, Maccarrone M. Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Biochimie.* 2006; 88(12): 1889-1897.

Stamer WD, Golightly SF, Hosohata Y, Ryan EP, Porter AC, Varga E, Noecker RJ, Felder CC, Yamamura HI. Cannabinoid CB1 receptor expression, activation and detection of endogenous ligand in trabecular meshwork and ciliary process tissues. *Eur J Pharmacol.* 2001; 431(3): 277-286.

Stanford SJ, Gitlin JM, Mitchell JA. Identification of two distinct vasodilator pathways activated by ATP in the mesenteric bed of the rat. *Br J Pharmacol.* 2001; 133(6): 825-832.

Stefano GB. Endocannabinoid immune and vascular signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2000; 21(12): 1071-1081.

Stein EA, Fuller SA, Edgmond WS, Campbell WB. Physiological and behavioural effects of the endogenous cannabinoid, arachidonylethanolamine (anandamide), in the rat. *Br J Pharmacol.* 1996; 119(1): 107-114.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* 1997; 388(6644): 773-778.

Stitham J, Arehart EJ, Gleim SR, Douville KL, Hwa J. Human prostacyclin receptor structure and function from naturally-occurring and synthetic mutations. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007; 82(1-4): 95-108.

Struwe M., Kaempfer SH., Geiger CJ., Pavia AT., Plasse TF., Shepard KV., Ries K., Evans TG. Effect of dronabinol on nutritional status in HIV infection. *Ann Pharmacother.* 1993; 27(7-8): 827-831.

Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66(2-3): 173-193.

Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonylglycerol a possible vasomodulator?. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 243(3): 838-843.

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. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 215(1): 89-97.

Sugrue MF. New approaches to antiglaucoma therapy. *J Med Chem.* 1997; 40(18): 2793-2809.

Suplita RL 2nd, Gutierrez T, Fegley D, Piomelli D, Hohmann AG. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology.* 2005; 49(8): 1201-1209.

Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Piersanti G, Mor M, Rivara S, Plazzi PV, Park C, Kathuria S, Piomelli D. Design, synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamic acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *J Med Chem.* 2003; 46(12): 2352-2360.

Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 2003; 465(1-2): 125-132.

Tramèr MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting, quantitative systematic review. *BMJ.* 2001; 323(7303): 16-21.

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1998; 85(2): 393-411.

Twichell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 1997; 78(1): 43-50.

Ueda N. Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 68-69: 521-534.

Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem Phys Lipids.* 2000; 108(1-2): 107-121.

Van Sickle DD, 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.

Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. Cannabinoids inhibit emesis through CB<sub>1</sub> receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology.* 2001; 121(4): 767-774.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2009; 196(2): 193-222.

Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol.* 1995; 278(3): 279-283.

- Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J*. 1998; 12(11): 1035-1044.
- Vexler ZS, Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*. 2001; 6(2): 99-108.
- Vidrio H, Sanchez-Salvatori MA, Medina M. Cardiovascular effects of (-)-11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996; 28(2): 332-336.
- Wagner JA, Járαι Z, Batkai S, Kunos G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol*. 2001; 423(2-3): 203-210.
- Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature*. 1997; 390(6659): 518-521.
- Wagner JA, Varga K, Járαι Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension*. 1999; 33(1 Pt 2): 429-434.
- Waldron GJ., Garland CJ. Contribution of both nitric oxide and a change in membrana potential to acetylcholine-induced relaxation in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1994; 112(3): 831-836.
- Walker JM, Huang SM. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther*. 2002; 95(2): 127-135.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*. 2003; 23(4): 1398-1405.
- Ware MA, Doyle CR, Woods R, Lynch ME, Clark AJ. Cannabis use for chronic non-cancer pain: results of a prospective survey. *Pain*. 2003; 102(1-2): 211-216.
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*. 2003; 424(6947): 434-438.
- White R, Hiley CR. A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1997; 122(8): 1573-1584.
- White R, Hiley CR. The actions of some cannabinoid receptor ligands in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1998; 125(3): 533-541.
- White R, Ho WS, Bottrill FE, Ford WR, Hiley CR. Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 2001; 134(4): 921-929.
- Wilkinson JD, Kendall DA, Ralevic V. Delta 9-tetrahydrocannabinol inhibits electrically-evoked CGRP release and capsaicin-sensitive sensory neurogenic vasodilatation in the rat mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol*. 2007; 152(5): 709-716.

Williams CM., Kirkham TC. Reversal of delta 9-THC hyperphagia by SR141716 and naloxone but not dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 71(1-2): 333-340.

Wilson RJ, Giblin GM, Roomans S, Rhodes AA, Cartwright KA, Shield VJ, Brown J, Wise A, Chowdhury J, Pritchard S, Coote J, Noel LS, Kenakin T, Burns-Kurtis CL, Morrison V, Gray DW, Giles H. GW627368X ((N-(2-[4-(4, 9-diethoxy-1-oxo-1, 3-dihydro-2H-benzo[f]isoindol-2-yl)phenyl]-acetyl) benzenesulphonamide): a novel, potent and selective prostanoid EP4 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2006; 148(3): 326-339.

Wilson RJ, Giles H. Piglet saphenous vein contains multiple relaxatory prostanoid receptors: evidence for EP4, EP2, DP and IP receptor subtypes. *Br J Pharmacol.* 2005; 144(3): 405-415.

Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates  $Ca^{2+}$  signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2003; 140(8): 1351-1361.

Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Högestätt ED. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol.* 2000; 396(1): 39-42.

Zygmunt PM, Högestätt ED, Waldeck K, Edwards G, Kirkup AJ, Weston AH. Studies on the effects of anandamide in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol.* 1997; 122(8): 1679-1686.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørgård 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.



