

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA

***El sistema endocannabinoide y los sistemas
nicotínico y muscarínico: Química Médica frente a
las enfermedades neurodegenerativas.***

Autor/a: Aitor Herraiz Pérez

Tutor/a: D^a Dionisia Sanz del Castillo

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIO-ORGÁNICA

Octubre de 2017

Índice de contenidos:

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------|-----|
| i. | Índice de abreviaturas:..... | iii |
| ii. | Índice de figuras: | iv |
| iii. | Índice de tablas:..... | vi |
| 1. | Introducción. | 1 |
| 1.1 | Objetivos. | 1 |
| 1.2 | Origen de la química médica. | 2 |
| 1.3 | Enfermedades neurodegenerativas. ⁽³⁾ | 3 |
| 1.4 | Receptores acoplados a proteínas G. | 4 |
| 1.5 | Receptores ligados a canales iónicos..... | 7 |
| 1.6 | El sistema colinérgico..... | 8 |
| 2. | Desarrollo. | 9 |
| 2.1 | El sistema endocannabinoide. | 9 |
| 2.1.1 | Receptores del sistema endocannabinoide..... | 10 |
| 2.1.1.1 | Clásicos..... | 10 |
| 2.1.1.2 | Nuevas Rutas..... | 11 |
| 2.1.2 | Principales ligandos del sistema endocannabinoide. | 12 |
| 2.1.2.1 | Agonistas | 18 |
| 2.1.2.2 | Antagonistas..... | 19 |
| 2.2 | El sistema nicotínico..... | 20 |
| 2.2.1 | Receptores del sistema nicotínico..... | 20 |
| 2.2.1.1 | Clásicos..... | 22 |
| 2.2.1.2 | Nuevas Rutas..... | 23 |
| 2.2.2 | Principales ligandos del sistema nicotínico. | 23 |
| 2.2.2.1 | Agonistas. | 23 |
| 2.2.2.2 | Antagonistas..... | 27 |
| 2.3 | El sistema muscarínico..... | 27 |

| | | |
|---------|----------------------------------------------------|----|
| 2.3.1 | Receptores del sistema muscarínico..... | 27 |
| 2.3.2 | Principales ligandos del sistema muscarínico. | 32 |
| 2.3.2.1 | Agonistas. | 32 |
| 2.3.2.2 | Antagonistas..... | 33 |
| 2.4 | Aplicaciones terapéuticas..... | 36 |
| 3. | Conclusiones. | 39 |
| 4. | Referencias bibliográficas..... | 40 |

i. Índice de abreviaturas:

- Abn-CBD → Abnormal-cannabidol.
- ACh → Acetylcholine.
- AChEI → Acetylcholinesterase inhibitor.
- AChR → Acetylcholine receptor.
- AD → Alzheimer's disease.
- AEA → Anandamide.
- 2-AG → 2-araquidonilglicerol.
- AMP → Adenosinmonophosphate.
- ATP → Adenosine triphosphate.
- cAMP → Cyclic Adenosinmonophosphate.
- Ch → Choline.
- DAG → Diacylglycerol.
- DMABC → 3-(dimethylamino)butyl dimethylcarbamate.
- DMF → Dimethylformamide.
- FTD → Frontotemporal dementia.
- GDP → Guanosine diphosphate
- GPCRs → G protein coupled receptors.
- GTP → Guanosine triphosphate.
- HD → Huntington's Disease.
- IQM → Instituto de Química Médica.
- LPI → Lysophosphatidylinositol.
- mAChR → Muscarinic Acetylcholine receptor.
- nAChR → Nicotinic Acetylcholine receptor.
- MW → Microwaves.
- MTX → Muscarinic toxin X (X = 1-7).

NADA → N- Arachidonoyl dopamine

NAGly → N-Arachidonoyl glycine.

PD → Parkinson's Disease.

PLC → Phospholipase C.

PNS → Peripheral nervous system.

PKA → Protein kinase A.

PKC → Protein kinase C.

SEC → Sistema endocannabinoide.

SNC → Central nervous system.

TEA → Triethanolamine.

Δ^9 -THC → (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

THF → Tetrahydrofuran.

VaD → Vascular dementia.

ii. Índice de figuras:

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representación de una proteína GPCR..... | 5 |
| Figura 2. Esquematización de los diferentes modelos de acción de un agonista sobre un receptor acoplado a proteína G. | 6 |
| Figura 3. Representación básica de un receptor ligado a canal iónico..... | 7 |
| Figura 4. Estructura de la Acetilcolina (ACh)..... | 8 |
| Figura 5. Estructura de (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol..... | 9 |
| Figura 6. Estructura de Anandamida..... | 10 |
| Figura 7. Estructura de Cromenopirazol..... | 10 |
| Figura 8. Estructura de CP55940 (A) sin tritiar y (B) tritiado..... | 13 |
| Figura 9. Ligandos novedosos para el receptor CB2. | 13 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 10. Esquema sintético para la obtención de cromenopirazol, o-quinona y otros derivados..... | 14 |
| Figura 11. Ligandos cannabinoides endógenos..... | 15 |
| Figura 12. Estructuras de (A) lisofosfatidilinositol y (B) Resolvin D2. | 16 |
| Figura 13. Ligandos fitocannabinoides para GPR55..... | 17 |
| Figura 14. Estructura de AM 251. | 17 |
| Figura 15. Estructura de NAGly. | 17 |
| Figura 16. Antagonistas del receptor GPR18..... | 18 |
| Figura 17. Estructura de Metanandamida. | 19 |
| Figura 18. Estructuras de (A) SR141716A, (B) LY320135 y (C) SR144528. | 19 |
| Figura 19. Estructura de la Nicotina. | 20 |
| Figura 20. Estructura de un receptor nicotínico I. a) Visto desde “arriba” (α -rojo; β -verde y azul oscuro; δ -azul claro) b) Visto desde un lateral..... | 21 |
| Figura 21. Estructura de un receptor nicotínico II. a) Visto desde “arriba” b) Visto desde un lateral..... | 21 |
| Figura 22. Estructura de Carbamoilcolina. | 24 |
| Figura 23. Estructura de DMABC..... | 24 |
| Figura 24. Síntesis para la obtención de 3-(dimetilamino)-N,N-dimetilpirrolidina-1-carboxamida oxalato y otros derivados..... | 25 |
| Figura 25. Estructuras de (A) d-tubocurarina y (B) metilcaconitina..... | 27 |
| Figura 26. Estructura de Muscarina. | 28 |
| Figura 27. Estructuras de (A) Betanecol y (B) McN-A-343. | 29 |
| Figura 28. Estructura de Inositol (ciclohexan-1,2,3,4,5,6-hexol)..... | 30 |
| Figura 29. Estructura de pirenzepina. | 30 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 30. Resumen de la acción de los 5 receptores muscarínicos..... | 31 |
| Figura 31. Estructuras de (A) Cevimelina y (B) Vedaclidina..... | 32 |
| Figura 32. Estructura de la Pilocarpina..... | 33 |
| Figura 33. Antagonistas del receptor M ₁ : (A) Atropina; (B) Hioscina; (C) Diccloverina; (D) Tolterodina y (E) Oxibutirina..... | 33 |
| Figura 34 Estructura de telenzepina, antagonista selectivo M ₁ | 34 |
| Figura 35. Estructura de Haloperidol..... | 34 |
| Figura 36.Estructuras de (A) Galamina; (B) AF-DX 116..... | 34 |
| Figura 37. Estructuras de los antagonistas selectivos M ₃ . (A) darifenacina y (B) solifenacina..... | 35 |
| Figura 38. Estructura del Bromuro de tiotropio..... | 35 |
| Figura 39. Estructura del AF-DX 384..... | 35 |
| Figura 40. Estructura de la Xanomelina..... | 36 |
| Figura 41. Estructuras de (A) Tacrina; (B) Rivastigmina, (C) Galantamina y (D) Donezepilo..... | 37 |

iii. Índice de tablas:

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Prevalencia de las principales enfermedades neurodegenerativas, año 2011..... | 4 |
| Tabla 2.División de las subunidades de los nAChR por familias basadas en las similitudes de la secuencia proteica..... | 23 |
| Tabla 3. Agonistas nAChR (Verde → Efectos beneficiosos Rojo → Efectos negativos).... | 27 |
| Tabla 4. Clasificación de los receptores muscarínicos..... | 32 |

1. Introducción.

1.1 Objetivos.

Con este trabajo de fin de máster se ha pretendido realizar un enfoque global de algunos de los diferentes acercamientos que está realizando la ciencia para combatir las enfermedades neurodegenerativas, centrandó el estudio en el campo de la Química Médica orientada a la síntesis en laboratorio de nuevos compuestos con actividad farmacológica frente a estas enfermedades.

Buscando conseguir una mayor amplitud se han seleccionado algunos de los receptores más importantes del organismo, cuya modulación se estudia para comprender, reducir y, en último fin, eliminar las patologías derivadas de estas enfermedades.

Para ello se ha decidido realizar, de una manera lo más didáctica posible, una revisión de los conocimientos necesarios a la hora de comenzar cualquier tipo de trabajo práctico para la obtención de nuevos potenciales candidatos a fármaco sobre estos receptores.

Se ha estimado que el primer enfoque necesario para la comprensión del tema a tratar debe partir de:

- Comprensión e interiorización de las diferentes estructuras de los receptores, de los subtipos de los mismos y de sus sitios de acción.

- Estudio de las estructuras más comunes en el desarrollo de estos compuestos y seguimiento de los diferentes fármacos ya lanzados al mercado.

- Resumen de las diferentes actividades terapéuticas observadas a lo largo de los años, así como de los receptores y ligandos que las permiten.

Como añadido se ha tratado de relacionar el estudio de estos receptores, así como el diseño de nuevos compuestos, con grupos de investigación españoles, en concreto del Instituto de Química Médica-CSIC.

1.2 Origen de la química médica.

Las primeras evidencias del empleo terapéutico de plantas y minerales (y, por tanto, de sus principios activos) data de civilizaciones antiguas (como la India o la Maya) y a lo largo de toda la historia se pueden encontrar ejemplos del uso medicinal de materias primas de la naturaleza (como las raíces de ipecacuana utilizadas en Brasil como remedio frente a la disentería o las sales de antimonio que se utilizaban en la edad media).¹

La evolución de la química médica, como la de otros muchos campos de la ciencia, está compuesta por las ideas, el conocimiento y las herramientas que han supuesto el actual conocimiento contemporáneo, lo cual, expresado de un modo más sencillo, quiere decir que no se pueden considerar sus avances por separado desde el origen del término sino ha de ser valorada dentro de todo el avance científico. *Burger*² lo definía como: “Los grandes avances de la química médica se han conseguido por dos tipos de investigadores: aquellos con el genio y la lógica adecuada para abrir nuevos campos de estudio a través de interpretaciones correctas de experimentos concretos y aquellos que han variado pacientemente las estructuras químicas activas fisiológicamente”.

Hasta mediados del siglo XX, la medicina estaba considerada un campo de estudio que pertenecía a biólogos, farmacéuticos y a los propios médicos, mientras que la química, debido a su gran importancia en el sector industrial, era considerada una mera herramienta, un apoyo a la hora de construir las bases de la medicina.

Sin embargo, el avance en las técnicas de análisis (así como más tarde en el potencial informático) nos han permitido conocer más a fondo la estructura de todos aquellos compuestos con actividad terapéutica, desentrañar los entresijos de su acción, comprender la manera en la que sus estructuras condicionan su actividad y, en definitiva, ser capaces de imitarlos.

Esto trae consigo una clara consigna, la química ya no es una herramienta de la medicina sino que es medicina en sí misma al constituir la base del diseño racional de nuevos fármacos.

Actualmente, una de las principales rutas de acción de los fármacos es la actividad sobre receptores biológicos. Este término se utiliza para designar a proteínas o glicoproteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias sobre el metabolismo celular y las respuestas derivadas del mismo.

Los receptores se clasifican según el mecanismo de acción de los mismos y en este trabajo nos centraremos en el estudio de dos de ellos: Los receptores acoplados a proteínas G y los receptores basados en la apertura de un canal iónico (en este caso, más concretamente, en los receptores nicotínicos de Acetilcolina).

1.3 Enfermedades neurodegenerativas.⁽³⁾

Las enfermedades neurodegenerativas suponen uno de los mayores riesgos de discapacidad permanente o muerte prematura entre las personas de avanzada edad en todo el mundo.

Más concretamente el Alzheimer (AD), la demencia vascular (VaD), la demencia frontotemporal (FTD), el Parkinson (PD), y la enfermedad de Huntington (HD) son las enfermedades neurodegenerativas más predominantes. Representan un gran grupo de trastornos neurológicos con perfiles clínicos y patológicos heterogéneos. La mayoría de las estrategias terapéuticas actuales proporcionan un alivio sintomático temporal, pero no dirigen la patogénesis de la enfermedad subyacente y, por lo tanto, no afectan la progresión de la enfermedad.

AD es la enfermedad neurodegenerativa más común y la principal causa de demencia en la población por encima de los 65 años de edad, se caracteriza por el deterioro de las funciones cognitivas, pérdida de memoria y cambios bruscos en la personalidad.

La segunda enfermedad neurodegenerativa más común es el PD (en términos de demencia, la segunda sería VaD) con una media de edad de comienzo de la enfermedad de entre 50 y 60 años (es decir, población aun relativamente joven) y se caracteriza por tener dos tipos de síntomas: motrices y no-motrices. Dentro del grupo de los motrices encontramos patologías como bradicinesia^{1*}, rigidez, temblores y dificultades para caminar correctamente; los síntomas no motrices serían el deterioro cognitivo y síntomas neuropsiquiátricos.

^{1*} La **bradicinesia** provoca la lentificación de los movimientos, especialmente de los movimientos voluntarios complejos. Es característica de las alteraciones de los ganglios basales, especialmente del sistema nigroestriado, y propia de la enfermedad de Parkinson.

Tabla 1. Prevalencia^{2*} de las principales enfermedades neurodegenerativas, año 2011.⁴

| Enfermedad | Casos por cada 10 ⁵ habitantes | Prevalencia | Población afectada a nivel mundial |
|-----------------------------|-------------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| Alzheimer y otras demencias | 400 | 0.50% | 35.6·10 ⁵ |
| Parkinson | 315 | 0.34% | 23.8·10 ⁵ |
| Esclerosis Múltiple | 30 | 0.03% | 2.3·10 ⁵ |

El problema con las enfermedades neurodegenerativas no solo no está controlado sino que, teniendo en cuenta el envejecimiento de la población, cada vez será más recurrente. Por ello es importante tomar medidas a nivel científico y estudiar cómo detener la enfermedad y no solo paliar sus efectos.

1.4 Receptores acoplados a proteínas G.

Con aproximadamente 850 miembros, la familia de **receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)** suponen el conjunto más grande de proteínas de señalización en multitud de organismos (no solo se encuentran presentes de manera mayoritaria en humanos sino también en ratones o gusanos, por citar varios ejemplos).

Los GPCRs muestran una estructura común con 7 dominios transmembrana, con el extremo amino terminal en el exterior y el carboxilo en el interior de la célula. Las zonas variables específicas de los distintos receptores suelen localizarse en extremo amino terminal que es el que se encarga del reconocimiento del ligando. También existen zonas variables en el extremo carboxilo terminal y en los *loops* intracelulares que conectan los segmentos transmembrana.

Las proteínas transmembrana son activadas por la unión de un estímulo o ligando en el espacio extracelular (Figura 1), a partir de dicha unión se transduce la información dentro de la célula y provoca una respuesta a través de cambios conformacionales. Estos

^{2*} La **prevalencia** es la proporción de casos existentes de una enfermedad, en una población definida y en un momento determinado. Representa la sobrecarga de una enfermedad en una población y es muy importante desde el punto de vista de la planificación de las políticas sanitarias o se comparan diferentes efectos de una misma enfermedad en dos o más poblaciones diferentes.

cambios activan las proteínas G heterotriméricas que ejecutan a su vez una vía de señalización a través del reclutamiento y activación de enzimas celulares.⁵

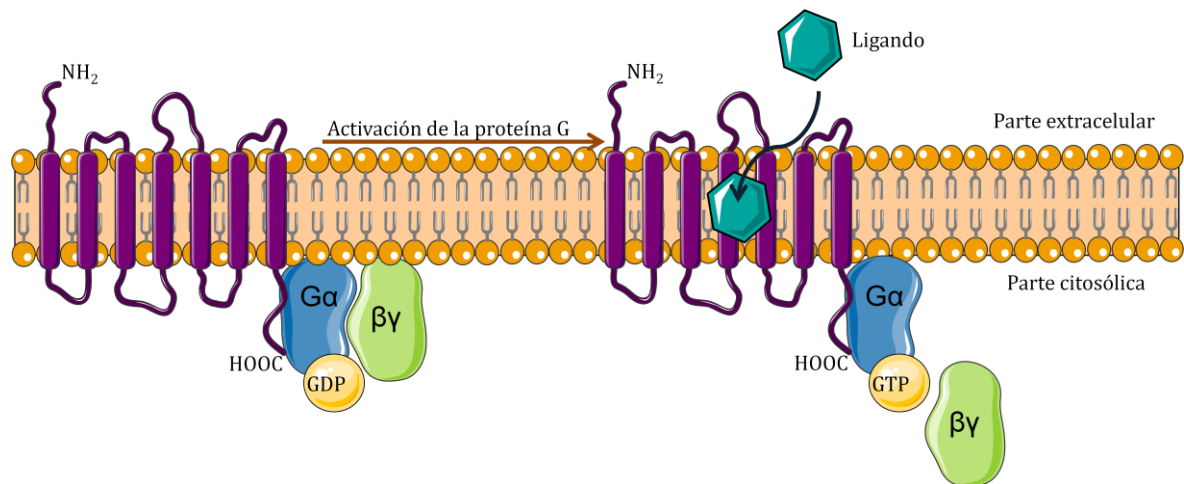


Figura 1. Representación de una proteína GPCR. (Modificado desde ⁶)

La interacción del ligando con la proteína GPCR es altamente específica y provoca una respuesta celular eficiente, lo cual es vital tanto para la salud de la célula como para el organismo.

El modelo clásico de GPCR describe este tipo de receptores como un interruptor rígido en equilibrio entre la forma inactiva y la forma activada (unida al ligando), dividiendo los posibles ligandos que se unan al receptor en agonistas (si generan la máxima respuesta estimulando del mismo modo todos los caminos posibles), agonistas parciales (si la respuesta nunca llega a producirse con tanta efectividad como en un agonista completo) y antagonistas (no producen respuesta pero compiten en la interacción con el sitio activo contra los agonistas). Sin embargo, en los últimos tiempos se ha evidenciado la existencia de una **selectividad funcional** causada por la posibilidad de adoptar una amplia variedad de conformaciones según la naturaleza del estímulo que las provoca (ligandos, otros receptores, modificaciones post-translacionales...). Esta flexibilidad conformacional determina la capacidad del receptor para interactuar con los mecanismos de señalización (lo que, por otra parte, explica como los ligandos que actúan uniéndose en los puntos de unión son diferentes a los ligandos endógenos que pueden alterar la función del receptor o activar otras rutas de señalización). De este modo la obtención de ligandos activos ha dejado de ser únicamente específica para la unión con un receptor sino que pasa a ser específica para una respuesta concreta (Figura 2).^{6,7}

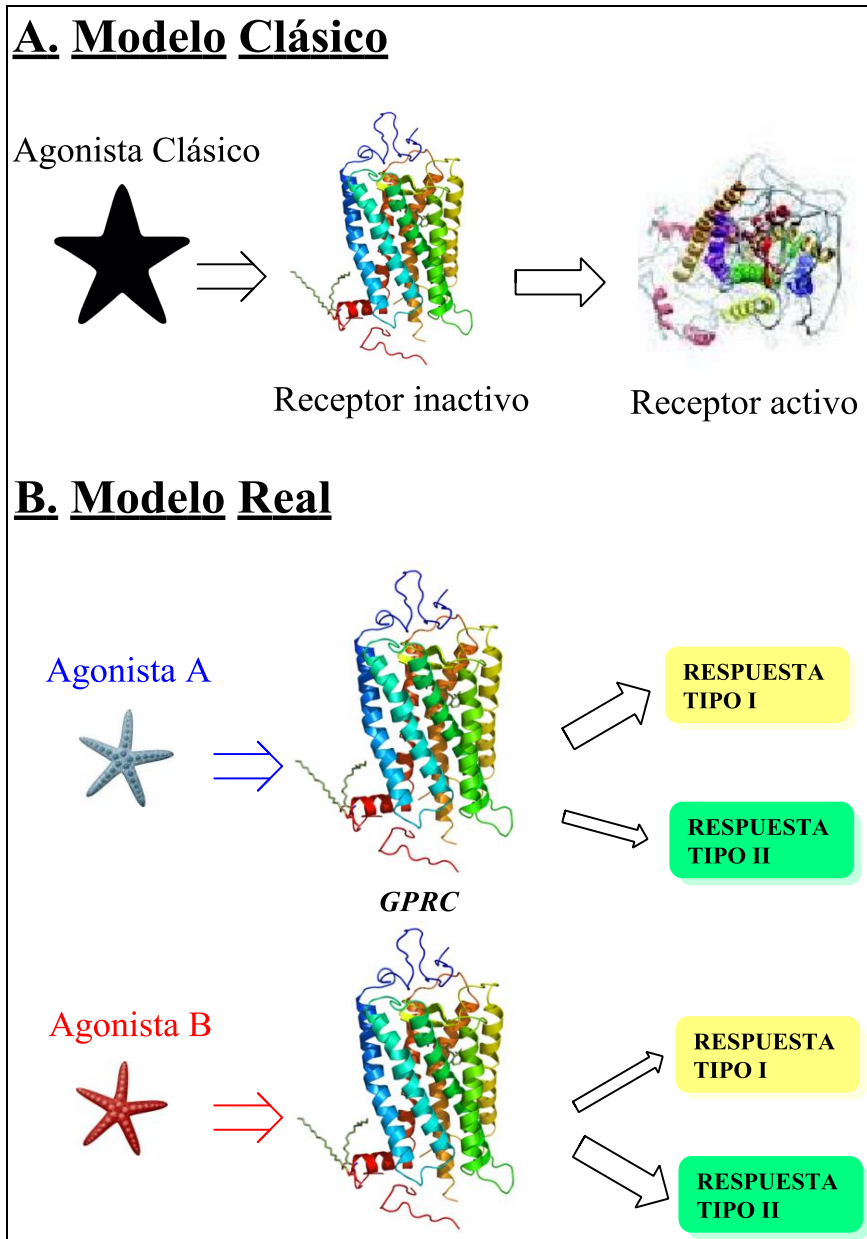


Figura 2. Esquematización de los diferentes modelos de acción de un agonista sobre un receptor acoplado a proteína G.

(Modificado desde ⁷)

Este tipo de receptores se ve implicado en la aparición de enfermedades neurodegenerativas tales como AD, VaD, FTD, PD y HD.

1.5 Receptores ligados a canales iónicos.

Como su propio nombre indica, el propósito de estos receptores es ejercer un control sobre el flujo de iones, esquematizado en la Figura 3, (son muy numerosos pero los más comunes son Na^+ , K^+) que pasan a través de la membrana celular (ya sea hacia dentro o hacia fuera). Por tanto son responsables de convertir una señal química (interacción con un ligando que será, en todos los casos, un neurotransmisor) en una señal eléctrica (y viceversa).

Los receptores ligados a los canales de iones pertenecen a la familia de los receptores de *cys-loop*. Todos los canales de esta familia tienen cinco subunidades (*pentameric*) que forman un poro a través de la membrana. Cada subunidad individual atraviesa la membrana cuatro veces. Cada sección transmembrana se denomina de M1 a M4. La subunidad M2 es la subunidad más importante, contiene una hélice alfa que controla la apertura y el cierre de la entrada de iones.

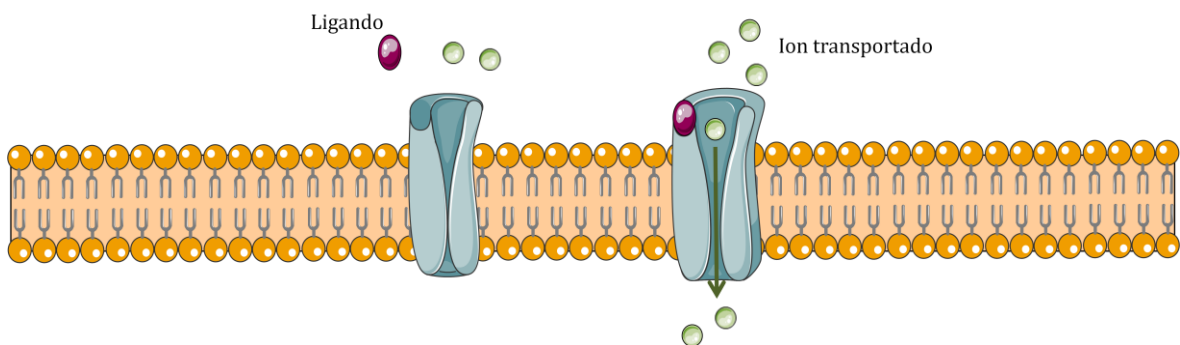


Figura 3. Representación básica de un receptor ligado a canal iónico.

(Modificado desde ⁸)

Cuando una señal necesita ser transmitida a través de la sinapsis, una célula nerviosa presináptica liberará un ligando neurotransmisor (como la Acetilcolina, ACh, Figura 4) mediante exocitosis. La célula postsináptica se encuentra en el otro lado de la sinapsis y expresa los receptores unidos a canales de iones en su superficie. Cuando el neurotransmisor se une al receptor, el canal se abre y los iones fuera de la célula pueden ahora entrar en el citoplasma de la célula postsináptica. Esto afecta la carga eléctrica interna de la célula y producirá una respuesta en la célula postsináptica que, por ejemplo, puede provocar la apertura de otros canales.⁹

1.6 El sistema colinérgico.

Conjunto de receptores, junto a sus correspondientes ligandos, también conocidos como **receptores de Acetilcolina, AChR**, y que deben sus funciones a su relación con la actividad de la *Acetilcolina*. Está formado por los **receptores nicotínicos de Acetilcolina (nAChR)** que se describirán en el apartado 2.2 y los **receptores muscarínicos de Acetilcolina (mAChR)** que serán objeto de estudio en el apartado 2.3.

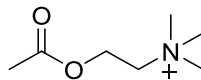


Figura 4. Estructura de la Acetilcolina (ACh).

La Acetilcolina es un neurotransmisor endógeno de gran importancia puesto que actúa tanto en el sistema nervioso periférico (PNS) como en el sistema nervioso central (SNC), viéndose implicado en un gran número de procesos.

En el PNS ejerce de “*motor neuronal*”, por lo que está directamente implicado con el medio de acción de nuestro organismo de transmitir las ordenes a los músculos, y es el principal neurotransmisor del sistema nervioso autónomo (implicado tanto en el sistema nervioso simpático como en el parasimpático).

En el SNC actúa no solo como neurotransmisor sino también como neuromodulador, teniendo múltiples funciones en las regiones colinérgicas del cerebro.

2. Desarrollo.

2.1 El sistema endocannabinoide.

Antes de hablar en profundidad del sistema endocannabinoide (en adelante, SEC) es importante conocer el origen de este término.

La mundialmente conocida planta del cannabis (*Cannabis sativa*) fue catalogada por primera vez en 1765 y sus múltiples usos (alimento, fibras textiles, aceite de semillas...) han sido ampliamente explotados en su continente de origen, Asia (más concretamente en zonas próximas a la cordillera del Himalaya). Sin embargo, sus usos más conocidos son los derivados de sus efectos terapéutico y recreativo (siendo este último el que, sin lugar a dudas, le ha proporcionado más fama a lo largo de la historia).

En el siglo XX comenzó a usarse en Europa como analgésico y para tratar dolores crónicos como el reuma, así como para reducir la incidencia de espasmos musculares e incluso problemas respiratorios como el asma.

Los principales avances con respecto a su farmacología son relativamente recientes, de la última década del siglo XX:

- Identificación en 1964 del principio activo principal presente en la planta *Cannabis sativa*, el **(-)- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)**.¹⁰ El *tetrahidrocannabinol* es un cannabinoide **exógeno**, es decir, formado fuera del cuerpo humano.

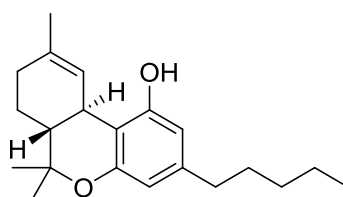


Figura 5. Estructura de (-)- Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

- Descubrimiento (e incluso clonación) de los receptores **CB1** y **CB2**.^{11,12} A partir de este punto, a las sustancias con actividad análoga a la del principal compuesto sobre los principales receptores se las conoce como “cannabinoides”.

- También en la década de los 90 se consiguió el hito de identificar el primer cannabinoide **endógeno** (la *anandamida*, AEA).¹³

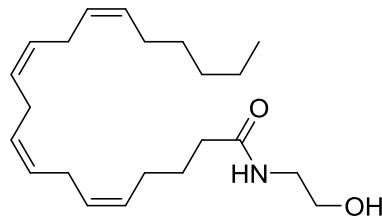
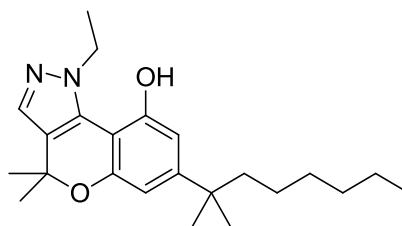


Figura 6. Estructura de Anandamida.

El último tipo de cannabinoide, que por otro lado es el que más implica a la química, son los cannabinoides **exógenos sintéticos**. Un ejemplo es el *cromenopirazol* sintetizado en el Instituto de Química Médica – CSIC (Figura 7, compuesto 7 en Figura 10)).¹⁴



Cromenopirazol
(IQM-CSIC)

Figura 7. Estructura de Cromenopirazol.

2.1.1 Receptores del sistema endocannabinoide.

2.1.1.1 Clásicos

Hoy en día se conocen dos receptores cannabinoides, CB1 y CB2. Hasta la fecha no se ha conseguido demostrar la existencia de más receptores GPCRs relacionados con el SEC aunque, como se describirá más adelante, existen candidatos potenciales.

- **Receptor CB1:** Este receptor se encuentra presente en multitud de tejidos periféricos (bazo, neuronas periféricas, útero, timo, corazón, testículos...) pero donde se encuentra en mayor proporción es en el sistema nervioso central (SNC).

Se han encontrado evidencias de la acción de este receptor sobre los estímulos causantes del apetito, sobre el sistema psicomotriz y también de su efecto analgésico

El receptor CB1 es un heterorreceptor pre-sináptico que modula la liberación de neurotransmisores cuando se activa de una manera, dependiente de una dosis, estereoselectiva y sensible a la toxina *pertussis*.¹¹

· **Receptor CB2:** Está distribuido principalmente en el sistema inmune, pero recientemente también se ha localizado en microglia y elementos vasculares. Se relaciona este receptor principalmente con procesos inflamatorios y de modulación inmunológica.^{12,15}

2.1.1.2 Nuevas Rutas

Pese a que, como anteriormente se ha indicado, solamente se han identificado dos receptores cannabinoides (CB1 y CB2), existen estudios farmacológicos que revelan la posibilidad de que existan nuevos receptores cannabinoides al observar efectos en ratones transgénicos (los cuales no poseen ninguno de estos receptores) tratados con ligandos cannabinoides. Por ello, aunque aún no se ha conseguido demostrar la pertenencia al SEC, se ha propuesto la existencia de otros GPCRs muy relacionados con el SEC, GPR55¹⁶ y GPR18¹⁷.

·**Receptor GPR55:** En 1999 se identificó un nuevo receptor acoplado a proteína G, el GPR55, cuyo comportamiento ante los ligandos cannabinoides (entre otros ensayos, en los comentados anteriormente en ratones transgénicos) parece indicar que pueda pertenecer al SEC. Este receptor se ha encontrado como participe en diversos procesos fisiológicos en los sistemas nervioso, vascular e inmune, en el intestino, células óseas y también en procesos patológicos en líneas celulares cancerosas.

Actualmente se está investigando su implicación en el control de la inflamación y de las funciones vasculares, del dolor neuropático, diabetes y su estudio en el tratamiento de enfermedades como la osteoporosis y en tratamientos contra el cáncer.^{18,19}

·**Receptor GPR18:** La clonación de este GPCR se describió en 1997. Es el receptor más desconocido de los citados pero también se está estudiando su pertenencia

al SEC. Su distribución en condiciones fisiológicas y patológicas no se conoce con exactitud, pero parece encontrarse en bazo, endometrio, testículos y en condiciones patológicas en células de melanoma metastásicas. A nivel estructural, GPR18 está más relacionado con GPR55 que con los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

Desde el punto de vista del descubrimiento de fármacos, la búsqueda de ligandos selectivos a estos receptores es un gran reto, abriendo diversas vías de investigación prometedoras debido a su potencial terapéutico.^{20,21}

2.1.2 Principales ligandos del sistema endocannabinoide.

Los ligandos cannabinoides presentan una amplia diversidad estructural, se ha usado una clasificación en tres grupos principales: *Principales ligandos del receptor CB1*, *principales ligandos del receptor CB2* y *ligandos endógenos*.

- Principales ligandos del receptor CB1.

Fueron el primer tipo de ligandos en ser descubiertos y ello propicia que sean el tipo del que se conoce más información, son los más estudiados y, de hecho, son los únicos cannabinoides utilizados a nivel clínico.

El principal y más importante es el ya mencionado *(-)- Δ^9 -tetrahidrocannabinol*, posee efectos psicoactivos, como la mayoría de los fitocannabinoides (o cannabinoides naturales, exógenos), y ello limita en gran medida su uso terapéutico. Actúa como agonista tanto de CB1 como de CB2 pero se destaca dentro del primer grupo por mostrar más selectividad hacia este receptor.

La empresa Pfizer desarrolló a finales del siglo XX una serie de miméticos de cannabinoides con estructuras análogas a las de los fitocannabinoides, con la intención de simplificar la estructura de éstos. El compuesto catalogado como *CP55940* es el prototipo de este grupo (Figura 8). Actualmente, el principal compuesto utilizado en los ensayos de afinidad por los receptores CB1 y CB2 es un derivado tritiado de este compuesto (Figura 8).

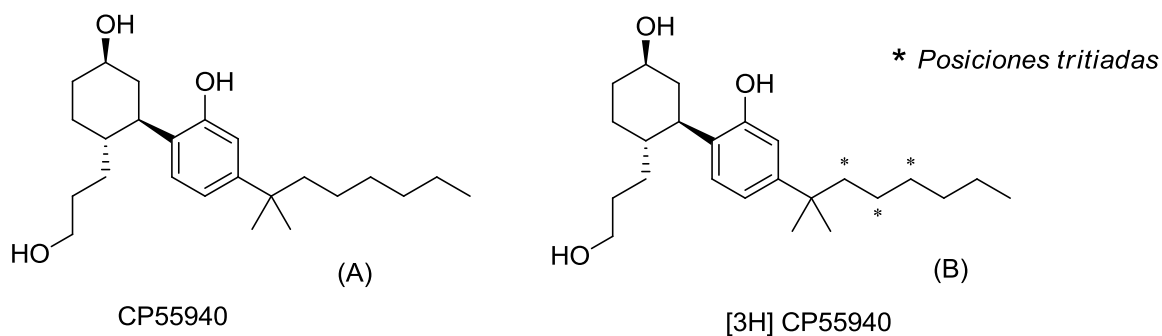


Figura 8. Estructura de CP55940 (A) sin tritiar y (B) tritiado.

El grupo de investigación del Instituto de Química Médica del CSIC, liderado por la Doctora Nadine Jagerovic, publicó el descubrimiento de un cromenopirazol (Figura 7) con actividad agonista CB1 periférica.¹⁴

- Principales ligandos del receptor CB2.

Las principales líneas de investigación (tanto a nivel académico como farmacéutico) han dirigido sus más recientes investigaciones hacia la modulación de este receptor. El principal motivo es que los agonistas selectivos de CB2 carecerían de los efectos psicoactivos presentes en los agonistas del receptor CB1 y, por tanto, carecerían de las limitaciones en usos terapéuticos.²²

La empresa farmacéutica *Sterling Winthrop* desarrolló un potente agonista frente a CB1 y CB2 (con ligera selectividad por CB2) que supone un compuesto de referencia a nivel farmacológico, el WIN55212²³ (Figura 9). Un ejemplo de agonista selectivo de CB2 es el compuesto AM1241 (Figura 9), del grupo de los aminoalquilinoides.

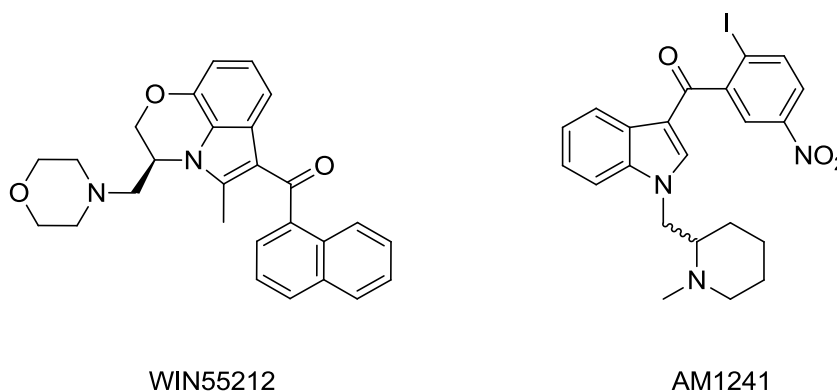
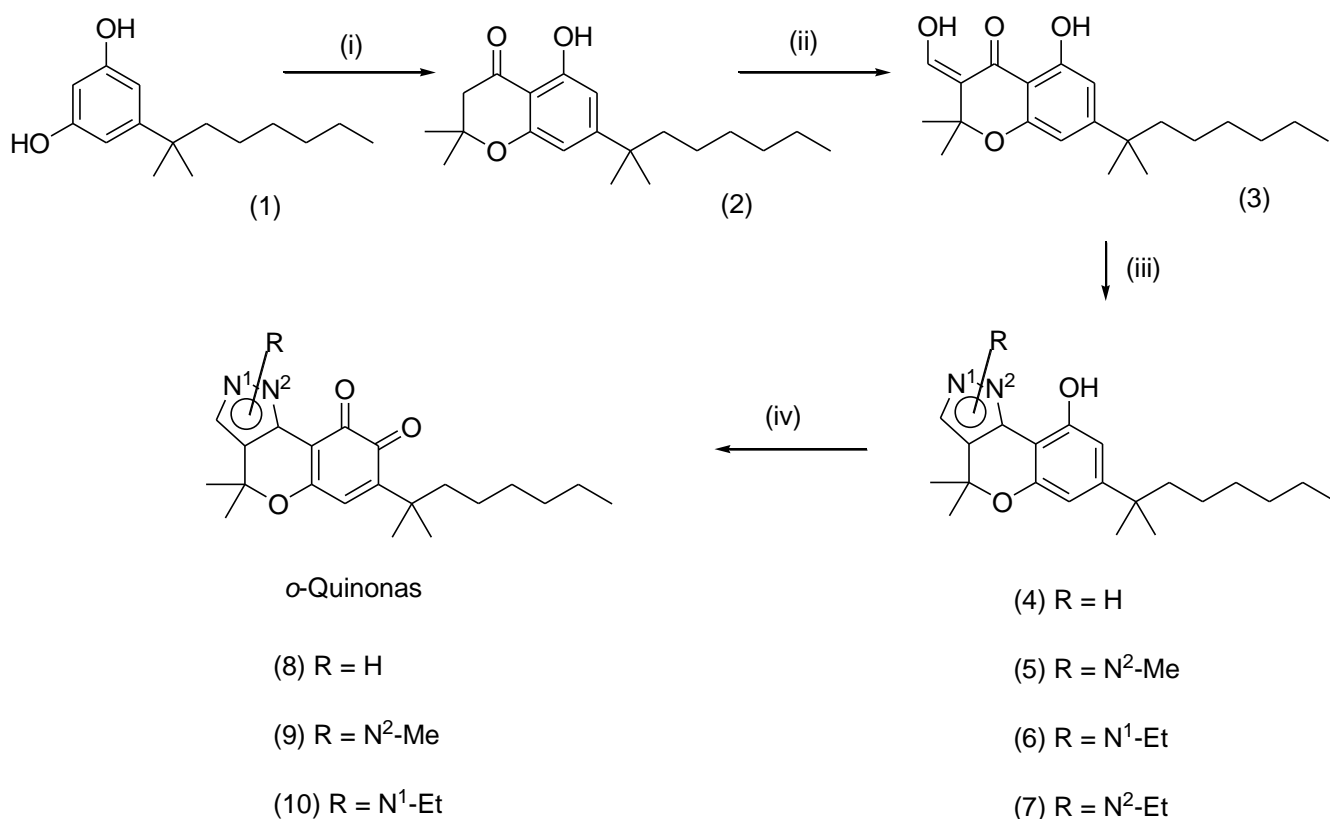


Figura 9. Ligandos novedosos para el receptor CB2.

Un reciente ejemplo de agonista selectivo CB2 es la *o*-quinona cannabinoide (cuya ruta sintética se indica en la Figura 10) descubierta por el grupo de la Doctora Jagerovic, compuesto con un futuro prometedor puesto que en ensayos *in vitro* e *in vivo* presenta actividad antitumoral frente al cáncer de mama.²⁴



Condiciones de reacción:

- (i) Ácido 3,3-dimetilacrilico; CH₃SO₃H; P₂O₅; 70 °C; MW; 10 min.
- (ii) 1^o (NaH; THF; MW; 46 °C; 20 min) - 2^o (Formiato de etilo; THF; MW; 46 °C, 20 min).
- (iii) H₂N-NHR; EtOH; 16 h, RT o 10 min, MW.
- (iv) Ácido 2-yodobenzóico; DMF; 30 min; T^a Amb.

Figura 10. Esquema sintético para la obtención de cromenopirazol, *o*-quinona y otros derivados.^{14,24}

- Principales ligandos endógenos.

El hecho de que haya receptores característicos de este tipo de compuestos en el sistema nervioso central hace que surja directamente la idea de que pueda existir un

compuesto dentro de nuestro organismo que sea el responsable de su actividad. De hecho, lo que conocemos como SEC está formado por los receptores, las enzimas responsables de la síntesis y degradación de los cannabinoides y los *ligandos cannabinoides endógenos*.

En 1992 se consiguió aislar por primera vez un ligando endógeno, el ya mencionado AEA (Figura 6), cuyo nombre desarrollado es *N-araquidoniletanolamida*, los posteriores ligandos endógenos descubiertos (4 en total) comparten con este un factor común: todos son derivados del ácido araquidónico (Figura 11).

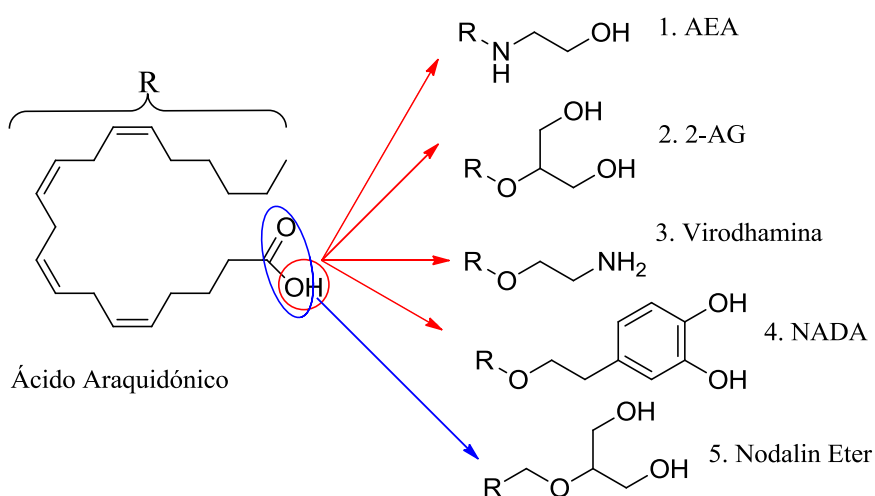


Figura 11. Ligandos cannabinoides endógenos.

Estos ligandos endógenos actúan como moduladores y transmisores de las señales neuronales, y una de sus principales funciones es la de servir como mensajeros sinápticos. Hay evidencias de que son sintetizados por las neuronas bajo demanda mediante la degradación de precursores lipídicos de la membrana, se liberan mediante un proceso de polarización inducida, e inmediatamente después son transportados hacia el interior de otra célula. Por lo tanto se consumen inmediatamente después de haber sido producidos y, por tanto, no se acumulan.

1. AEA → La *N-araquidoniletanolamida* fue el primer endocannabinoide endógeno aislado. Agonista parcial de los receptores CB1 y CB2 que no muestra selectividad por ninguno de ellos.¹³

2. 2-AG → *2-araquidonoilglicerol*²⁵; Se aisló del intestino de un perro. Aunque tampoco muestra selectividad frente a ninguno de los dos receptores CB, es un agonista muy potente.²⁶
3. Virodhamina → *O-araquidonoiletanolamina*²⁷; Actúa como agonista parcial/antagonista de manera selectiva frente a CB1, mientras que para CB2 actúa como agonista puro.
4. NADA → *N-araquidonoildopamina*²⁸; Tampoco muestra selectividad, actúa como agonista frente a CB1 y CB2.
5. Nodalin Eter → *2-araquidonilgliceroleter*²⁹; Se aisló a partir de cerebro porcino. Es el único que elimina el grupo carbonilo de su estructura (de hecho es la única diferencia estructural frente al 2-AG). Es un agonista selectivo CB1.

- **Ligandos relacionados con nuevas rutas.**^{30,31}

Para los dos receptores más nuevos comentados se han descubierto un número limitado de ligandos selectivos, como es lógico teniendo en cuenta los tiempos necesarios para el descubrimiento de los mismos. Sin embargo, se ha comprobado que una variedad de ligandos cannabinoides ha mostrado acción en un medio con la presencia de receptores GPR55 y sin la de los receptores CB1 y CB2.

El lípido *lisofosfatidilinositol* (LPI) (Figura 12), sin embargo, si ha mostrado una actividad selectiva para el receptor GPR55, al igual que la AEA (Figura 6) o *el Resolvin D2* (Figura 12).

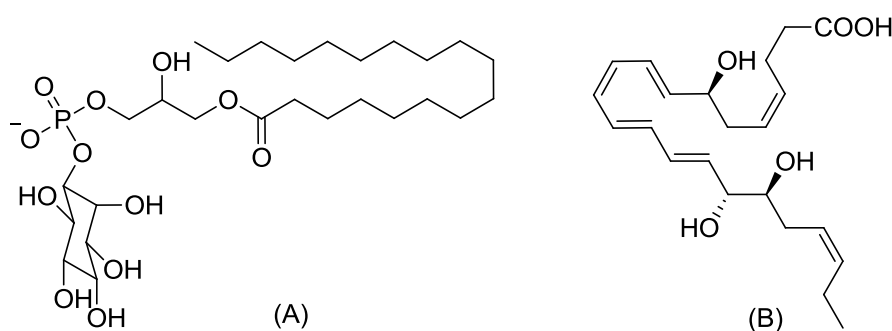


Figura 12. Estructuras de (A) *lisofosfatidilinositol* y (B) *Resolvin D2*.

Otros ejemplos de fitocannabinoides son el O-1602³² o el *abnormal-cannabidol* (Abn-CBD)³² (Figura 13).

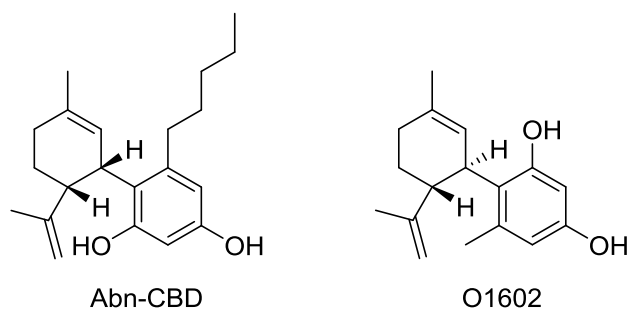


Figura 13. Ligandos fitocannabinoides para GPR55.

Por último, como ligandos sintéticos se puede destacar el pirazol AM251^{33,34} (Figura 14) mientras que otros ligandos como el CP55940 (Figura 8) o el WIN55212 (Figura 9) no muestran actividad para este receptor.

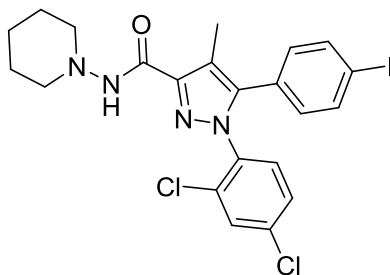


Figura 14. Estructura de AM 251.

El receptor GPR18 se activa frente a ligandos endógenos como el NAGly (*N-araquidonilglicina*, Figura 15), y frente a otros ligandos ya mencionados como el AEA y el Abn-CBD.

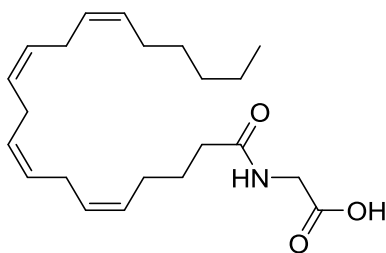
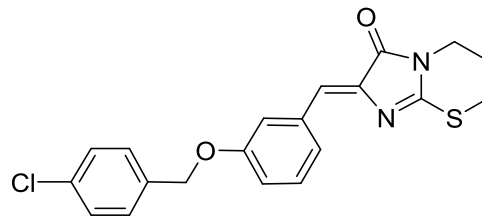
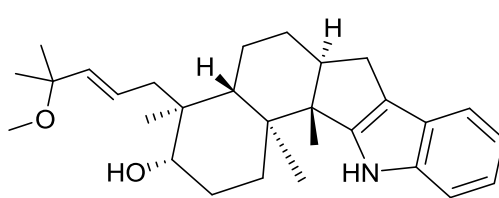


Figura 15. Estructura de NAGly.

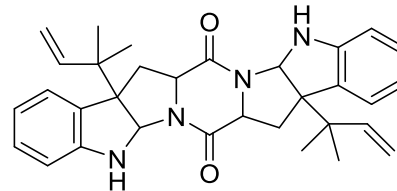
También es activado por la acción de antagonistas como: CID85469571³⁵, Indoloditerpeno³⁶, amauromina³⁷ (Figura 16).



CID85469571



Indoloterpene



Amauromina

Figura 16. Antagonistas del receptor GPR18.

2.1.2.1 Agonistas

Existe una amplia batería de moléculas capaces de activar el receptor y competir con el ligando endógeno. Se pueden clasificar en cuatro principales grupos según su estructura química: cannabinoides clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

- El grupo de los cannabinoides **clásicos** incluye compuestos con estructura de dibenzopirano como el (Δ^9 -THC) (Figura 5).
- Los cannabinoides **no clásicos** son análogos bicíclicos o tricíclicos de este ligando que carecen del anillo de benzopirano, como por ejemplo el ligando desarrollado por Pfizer (el CP55940, Figura 8).
- Por otra parte, dentro del grupo de los **aminoalquilindoles** encontramos el ligando WIN55212 (Figura 9). Esta familia de compuestos difiere estructuralmente a los cannabinoides clásicos y no clásicos, pero son un grupo de cannabimiméticos que interacciona con los receptores cannabinoides pese a sus diferencias estructurales.
- Por último, al grupo de los **eicosanoides** pertenecen compuestos derivados del ácido araquidónico como por ejemplo el AEA. Existen derivados sintéticos más resistentes a la hidrólisis como la *metanamida* (Figura 17).³⁸

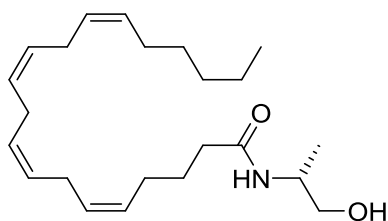


Figura 17. Estructura de Metanandamida.

2.1.2.2 Antagonistas

A diferencia de los ligandos agonistas, los antagonistas bloquean el receptor e impiden la activación de éste con el ligando agonista endógeno.

El compuesto más utilizado dentro de los compuestos antagonistas es el pirazol *SR141716A* (Figura 18)^{33,34}, mostrando una selectividad mayor por CB1 que por CB2. A partir de este ligando, se han desarrollado otros antagonistas selectivos (CB1) como *AM-251* (Figura 12) y *LY320135* (Figura 18), cuya estructura molecular difiere de SR.

Como representante de antagonista selectivo de CB2 encontramos el *SR144528* (Figura 18).

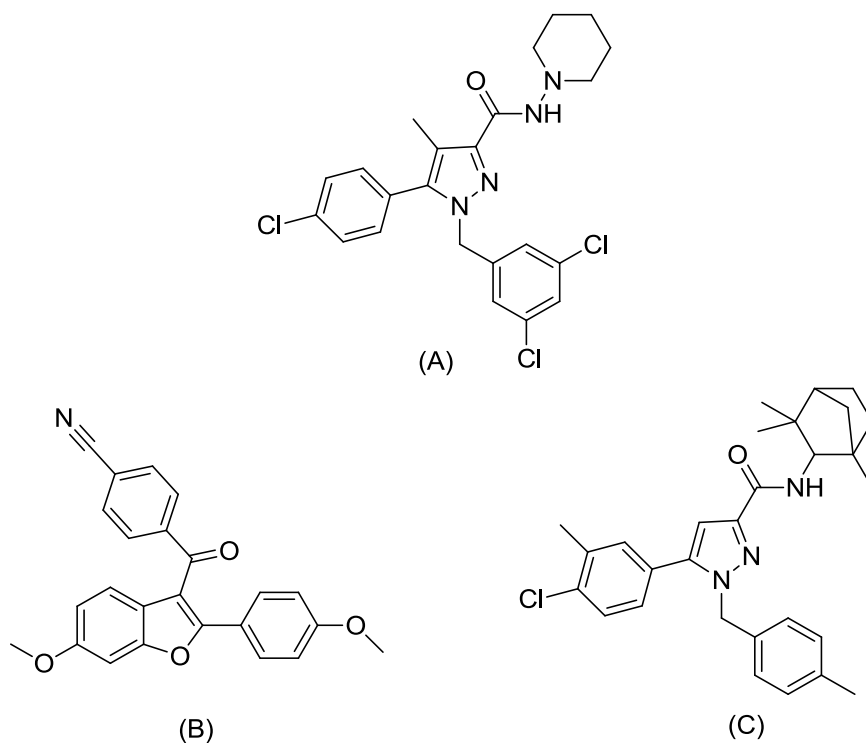


Figura 18. Estructuras de (A) *SR141716A*, (B) *LY320135* y (C) *SR144528*.

2.2 El sistema nicotínico.

2.2.1 Receptores del sistema nicotínico

Los nAChR son receptores proteicos que responden, además de a la acción de la *Acetilcolina*, ante un ligando agonista exógeno como es la *nicotina* (Figura 19). Son receptores de la familia de los pentaméricos “*cys-loop*”, que son un tipo de receptores ligados a canales iónicos.

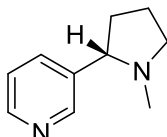


Figura 19. Estructura de la Nicotina.

Los estudios clásicos de las acciones del curare y de la nicotina hicieron de éste el receptor farmacológico prototípico hace más de un siglo. Aprovechando las estructuras especializadas que han evolucionado para mediar la neurotransmisión colinérgica y las toxinas naturales que bloquean la actividad motora, se aislaron y caracterizaron los receptores nicotínicos periféricos y luego centrales.

Las toxinas de diferentes venenos de serpiente, marcadas con radioisótopos, fueron utilizadas por *Changeux et al.* en 1990³⁹ para ensayar el receptor colinérgico aislado *in vitro*. Las toxinas tienen afinidades extremadamente altas y velocidades lentas de disociación del receptor, sin embargo la interacción es no covalente. *In situ* e *in vitro*, su comportamiento es similar al esperado para un antagonista de alta afinidad. Dado que la neurotransmisión colinérgica es el mediador de la actividad motora en vertebrados y mamíferos marinos un gran número de toxinas peptídicas, terpenoides y alcaloides que bloquean los receptores nicotínicos han evolucionado para mejorar los mecanismos de caza de los depredadores o para proteger a las especies vegetales y animales de esos mismos depredadores.^{40,41}

Cada unidad del receptor se compone de 5 subunidades ordenadas alrededor de un poro acuoso para el paso de iones a través de la bicapa lipídica (con una estequiometría definida, por ejemplo: $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (Figura 20), esta composición se corresponde a lo encontrado en los receptores de la unión neuromuscular y en una variedad de raya marina conocida como *Torpedo*)⁴². Estas subunidades se dividen a su vez en cuatro subunidades transmembrana (nombradas de M1 a M4, Figura 21).

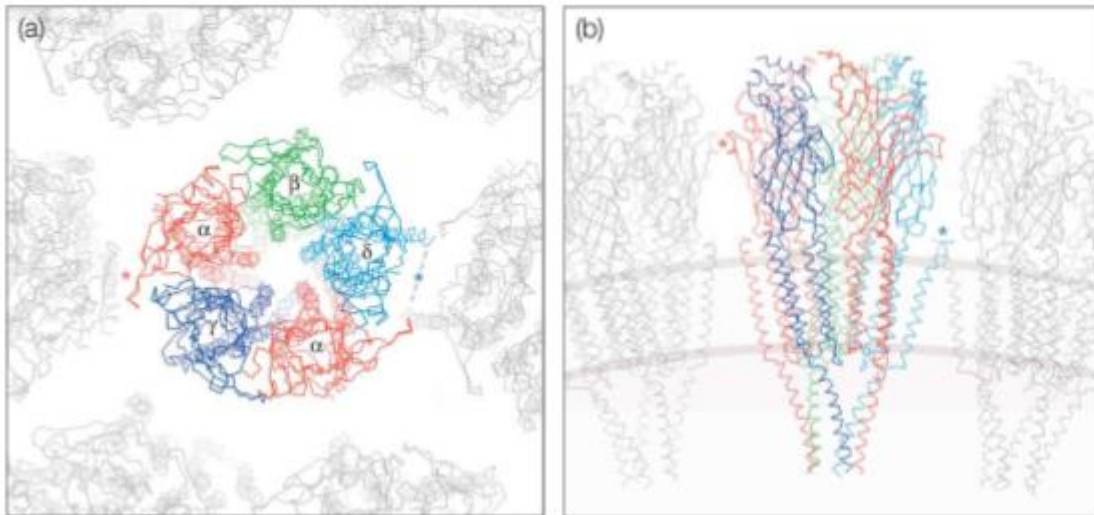


Figura 20. Estructura de un receptor nicotínico I. a) Visto desde “arriba” (α -rojo; β -verde γ -azul oscuro; δ -azul claro) b) Visto desde un lateral.⁴³

Los nAChR regulan la neurotransmisión postsináptica en la unión neuromuscular y en los ganglios autónomos periféricos; en el SNC controla, en gran medida, la liberación de neurotransmisores presinápticos. Tanto en los ganglios como en la unión neuromuscular existen distintos tipos de receptores nicotínicos para los que existen fármacos selectivos capaces de seleccionar entre ellos.

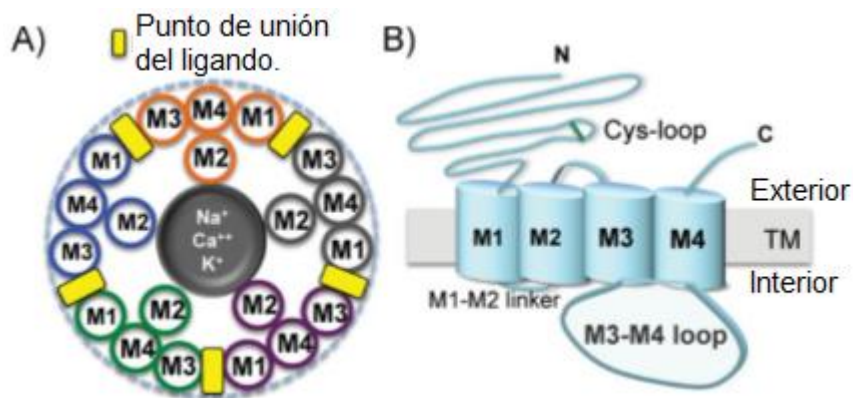


Figura 21. Estructura de un receptor nicotínico II. a) Visto desde “arriba” b) Visto desde un lateral.⁴⁴

2.2.1.1 Clásicos.

La clasificación de los nAChR en organismos vertebrados se divide en dos grandes grupos según su sitio de acción: musculares o neuronales (siendo este último el más numeroso).

En los receptores nicotínicos de tipo muscular la estequiometría es la definida en el apartado anterior, 2:1:1:1, empleando subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y subunidades “ δ ” y “ γ ” o “ δ ” y “ ϵ ”.

Sin embargo la composición de los receptores de tipo neuronal es mucho más compleja pudiendo ser de tipo homomérico o heteromérico y pueden contener subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$.⁴⁵

·Homoméricos: Un solo tipo de subunidad, como por ejemplo el receptor $\alpha 7$ (estudiado por el grupo de investigación de neurofármacos del Instituto de Química Médica del CSIC).

El sitio de unión principal se encuentra entre unidades α vecinas.

·Heteroméricos: Al menos contienen una subunidad α y una β . Algunos ejemplos son: $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ o $\alpha 4\beta 2$ (estudiado también por el mismo grupo del CSIC, representa cerca del 90% de los nAChR en el cerebro humano).⁴⁵

En este tipo de ligandos el sitio de unión ortostérico^{3*} se sitúa entre las subunidades α y β .

Tabla 2. División de las subunidades de los nAChR por familias basadas en las similitudes de la secuencia proteica.

| Tipo Neuronal | | | | | Tipo Muscular |
|-----------------------|----------------------|------------------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------------------------|
| I | II | III | | | IV |
| $\alpha 9, \alpha 10$ | $\alpha 7, \alpha 8$ | Tipo 1 | Tipo 2 | Tipo 3 | $\alpha 1, \beta 1, \delta, \gamma, \epsilon$ |
| | | $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 6$ | $\beta 2, \beta 4$ | $\beta 3, \alpha 5$ | |

^{3*} **Ortostérico**: Sitio de unión primario de un ligando en un receptor, sin modulación.

2.1.1.2 Nuevas Rutas.

La aparición de interacciones entre dominios del tipo proteína-proteína en varias moléculas sugiere que pueda tratarse de un mecanismo evolutivo para acomodar la señalización molecular.

Para varias interacciones nAChR con proteínas G se ha encontrado lo que parece ser un componente metabotrópico^{4*} funcional de la respuesta de canal iónico, junto con su función ionotrópica, que lleva a ciertos grupos de investigación a plantearse si las nAChR pueden ser descritas como un subtipo de GPCR.

Existen evidencias que presentan un nuevo marco comprobable para explorar la interacción de las proteínas G con nAChR. Los futuros experimentos basados en la construcción de nAChR con mutaciones específicas dirigidas al sitio de unión con proteínas G y su análisis en ensayos electrofisiológicos y bioquímicos proporcionarán información sobre el papel de las proteínas G en las funciones nAChR.

La capacidad de señalización de las nAChR está influenciada por el subtipo dependiente de la desensibilización de ACh, la regulación con proteínas G puede modificar la actividad del receptor y amplificar de manera muy significativa la señalización de nAChR en el espacio celular.⁴⁴

2.2.2 Principales ligandos del sistema nicotínico.

2.2.2.1 Agonistas.

Un fármaco agonista nicotínico imita la acción de la ACh sobre los nAChR, junto a la ACh el principal agonista de estos receptores será la nicotina.

De cara a la opinión pública los efectos tóxicos de la nicotina, aislada por primera vez a comienzos del siglo XIX, son ampliamente conocidos y los estudios sobre la adicción que genera en los seres humanos ha sido largamente estudiada. Sin embargo desde que a mediados de los años 80 diversos estudios genéticos revelaron las posibilidades que ofrecía este receptor,⁴⁶ se comenzaron a estudiar los efectos positivos sobre funciones

^{4*} **Receptores metabotrópicos:** Están acoplados a proteínas G, y modifican la respuesta de los canales de membrana y las concentraciones de segundos mensajeros como el diacilglicerol o el AMP cíclico. Por tanto la acción metabotrópica hace referencia a la regulación de segundos mensajeros para modular la acción de los canales iónicos.

cerebrales tales como la memoria o la atención pero también en la patogénesis de diversas enfermedades neuropsiquiátricas como el AD o el PD.

La principal ruta seguida a la hora del diseño racional de agonistas nicotínicos es la búsqueda de reducir los efectos adversos producidos por ligandos análogos a la nicotina.

La búsqueda de grupos farmacóforos nicotínicos se ha venido desarrollando ampliamente desde que en 1970 Beers y Reich propusieron que la unión específica del ligando con los receptores nAChR esta mediada por una interacción coulombica entre la carga positiva de un átomo de nitrógeno con el receptor y la interacción provocada por un enlace de hidrógeno formado a partir de un oxígeno carbonílico.⁴⁷ Con el paso del tiempo, y de las sucesivas investigaciones, los estudios se han ido encaminando a los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$.

El grupo de investigación de neurofármacos del CSIC⁴⁵, por ejemplo, basó el diseño de una serie de homólogos de *carbamoilcolina* (comúnmente conocido como *Carbachol*, es usado habitualmente para tratar patologías ópticas como los glaucomas, sin embargo es considerada una sustancia con riesgo extremo, Figura 22) para obtener agonistas selectivos del receptor nAChR $\alpha 4\beta 2$.

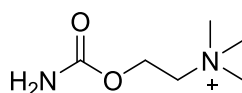


Figura 22. Estructura de Carbamoilcolina.

Estos estudios parten del *DMABC* (3-(dimetilamino)butildimetilcarbamato, Figura 23) y mediante modificaciones del extremo “N-carbamoil” buscan obtener selectividad para el receptor mientras que emplean el enlace de hidrógeno intramolecular para restringir las conformaciones posibles de la unión con el receptor, modificando de este modo los dos centros de unión fundamentales marcados por Beers y Reich.

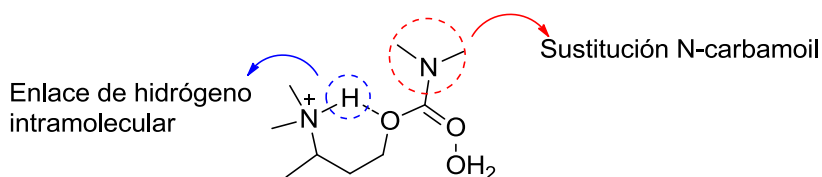


Figura 23. Estructura de DMABC.

La conclusión general a la que llegaron es que el tamaño del ciclo introducido en los compuestos en cuestión influía inversamente en la afinidad por el receptor nAChR y por otro lado confirmaron que la conformación plegada del compuesto de partida (DMABC) es responsable de su afinidad con el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, de este modo se plantea crucial el tamaño del agonista y su capacidad para adaptar su estructura a la del receptor, junto a la ya sabida sustitución del N-carbamoil, para obtener una mayor selectividad.

Mediante estudios de “*docking*” buscaron análogos estructurales, consiguiendo compuestos que llegaban al mismo rango de potencia del DMABC, como con el **3-(dimetilamino)-N,N-dimetilpirrolidina-1-carboxamida oxalato** (compuesto 4, Figura 24).

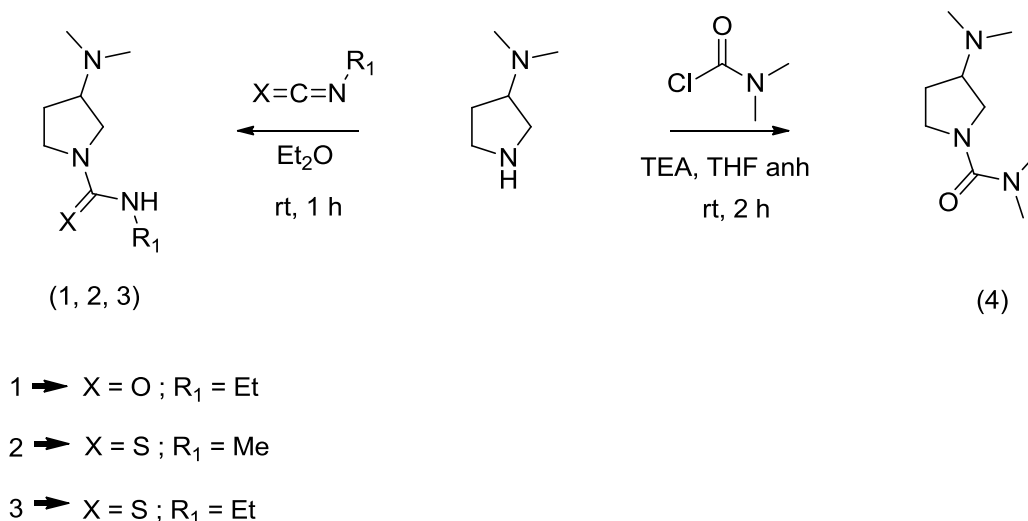
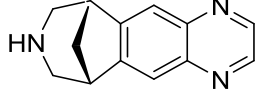

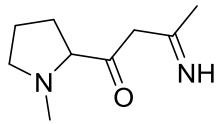
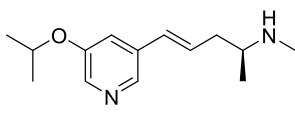
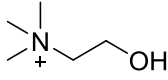

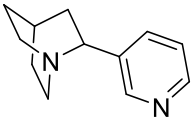

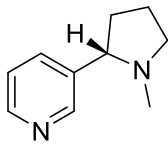








Figura 24. Síntesis para la obtención de 3-(dimetilamino)-N,N-dimetilpirrolidina-1-carboxamida oxalato y otros derivados.

(IQM-CSIC)⁴⁵

En el campo del desarrollo de agonistas para el nAChR es importante tener en cuenta que el margen de acción es muy estrecho porque los agonistas puros, que alteran el flujo de información del sistema nervioso, pueden fácilmente tener efectos secundarios adversos. En la *tabla 3* se muestran algunos ejemplos cuyos efectos se ampliarán en el apartado de acción terapéutica.

Tabla 3. Agonistas nAChR (Verde → Efectos beneficiosos Rojo → Efectos negativos).⁴⁸

| | Compuesto | Subunidad | Sitio de acción | Efectos |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Cerebro |  Vareniclina |  $\alpha_4\beta_2$ | Cortex Cerebral Tálamo Hipocampo | Memoria Cognitivo Analgésico |
| |  ABT-418 | | | |
| |  TC-1734 | | | |
| |  Colina |  α_7 | Cortex cerebral Hipocampo | Aprendizaje Memoria Vida celular |
| |  RJR-2429 |  $\alpha_3\beta_4$ | Nucleus Interpeduncularis Habénula | Analgésico Sistema de recompensa (adiciones) |
|  Nicotina |  $\alpha_6/\alpha_3/\beta_2$  $\alpha_4\beta_4$ | ----- Nucleus accumbens** Hipocampo* CTZ*** | Agarrotamiento* Sistema de recompensa** Vómitos*** | |
| Ganglio | Nicotina |  $\alpha_3\beta_2$  $\alpha_3\beta_4$  $\alpha_3\beta_4\alpha_5$ | | Vaso constricción Dolores gastro- intestinales |
| Musculo | RJR-2429 |  $\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$ | | Parálisis respiratoria |

2.2.2.2 Antagonistas.

En la naturaleza existen un gran número de sustancias que pueden ser catalogadas como antagonistas competitivos de los receptores nAChR, como ejemplos se podrían citar el alcaloide *d-tubocurarina* (Figura 25) obtenido del arbusto *Chondrodendron tomentosum* (antagonista para los receptores nicotínicos musculares, estudiado profundamente a lo largo de los años), la neosurugatoxina *Babylonia japonica* (aislada de la cáscara del marfil japonés que inhibe la transmisión neurológica mediada por AChR ganglionares) o *metilcaconitina* (toxina obtenida de las semillas de *Delphinium brownii* que es específica para los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 8$, Figura 25).⁴⁹

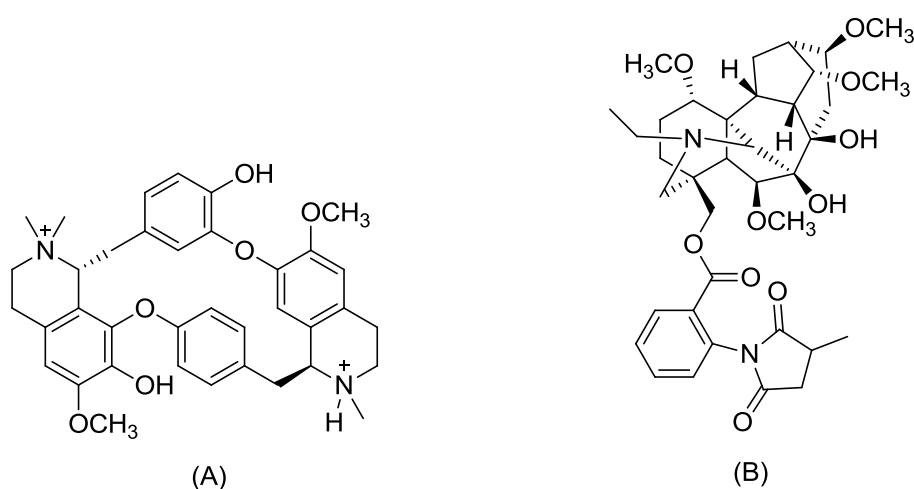


Figura 25. Estructuras de (A) *d-tubocurarina* y (B) *metilcaconitina*.

2.3 El sistema muscarínico.

2.3.1 Receptores del sistema muscarínico.

La *muscarina* es un producto natural (en concreto un alcaloide) que se encuentra en diferentes tipos de hongos, particularmente en los del tipo *Inocybe* y *Clitocybe* (donde se encuentra en concentraciones superiores al 1.6%), como en la especie mortal *Clitocybe Dealbat*.^{5*} (Figura 26).

^{5*} **Clitocybe Dealbat:** También conocido como el embudo de marfil, es un pequeño hongo con forma de embudo blanco que se encuentra ampliamente en céspedes y prados de Europa y América del Norte. También se le conoce como “el hongo sudoroso” en referencia a los síntomas que provoca un envenenamiento por este hongo. Es mortal por ingestión debido a los altos niveles de muscarina que contiene.

La muscarina fue aislada por primer vez en 1869, por los químicos alemanes Oswald Schmiedeberg y Richard Koppe⁵⁰, de la variedad *Amanita Muscaria*. Fue el primer compuesto parasimpaticomimético estudiado.

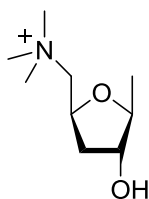


Figura 26. Estructura de Muscarina.

La muscarina es una sal de amonio cuaternaria, no puede ser absorbida completamente por el sistema gastrointestinal (a diferencia de lo que pasa con las aminas terciarias) y no cruza la barrera hematoencefálica.

Los receptores muscarínicos de acetilcolina (**mAChR**) se encuentran en los órganos diana parasimpáticos y en ciertos objetivos simpáticos: en las glándulas sudoríparas ecrinas^{6*} (que producen abundante secreción en la termorregulación para liberar calor) y en los vasos sanguíneos de los músculos esqueléticos (dilatados). Los mAChR en el sistema nervioso periférico se encuentran principalmente en las células efectoras autonómicas inervadas^{7*} por los nervios parasimpáticos posganglionares.

Los mAChR también están presentes en los ganglios y en algunas células, como las células endoteliales de los vasos sanguíneos (que reciben poca o ninguna inervación colinérgica). Dentro del SNC, el hipocampo, la corteza y el tálamo tienen altas densidades de mAChR. Se caracterizaron inicialmente por el análisis de las respuestas de células y tejidos en la periferia y en el SNC.⁴⁰

Los mAChR son receptores colinérgicos que forman complejos con proteínas G en la membrana celular. Al igual que los receptores cannabinoides entran en la clasificación de GPCR.

La activación del receptor muscarínico da lugar a una variedad de respuestas hiperpolarizantes y despolarizantes, dependiendo del tipo de célula o del tejido bajo investigación. La diversidad de respuesta se debe a la multiplicidad de intercambios

^{6*} **Glándulas sudoríparas ecrinas:** Tipo de glándula sudorípara de la piel que se encuentra mayoritariamente en la cara, en el cuello, en las manos y en los pies.

^{7*} **Inervación:** Acción que produce el sistema nervioso en las funciones de los demás órganos del cuerpo.

iónicos modulados por los receptores muscarínicos. En 1951 *Riskier* y *Wescoe* encontraron los primeros indicios de la existencia de subtipos en estos receptores.⁵¹

Estos incluyen muchos tipos de canales de potasio, calcio o cloruro. Los mAChR se pueden dividir en una familia de cinco subtipos de receptores (**m1-m5**), identificados por enfoques genéticos moleculares.⁵² Sin embargo, la clasificación habitual de los mAChR parte de la acción farmacológica y cambia la nomenclatura en minúsculas con números normales por mayúsculas con los números en subíndice: **M₁-M₅**.⁵³

Los efectos diferenciales de dos agonistas muscarínicos, el *betanecol* y el *McN-A-343* (Figura 27), sobre el tono del esfínter esofágico inferior, condujeron a la clasificación inicial de los receptores muscarínicos en M₁ (ganglionares) y M₂ (células efectoras). La base de la selectividad de estos agonistas no está clara, ya que hay pocas pruebas de que los agonistas discriminen sensiblemente entre los subtipos de mAChR. Sin embargo, los estudios de *binding* empleando radioligandos revelaron distintas poblaciones de sitios de unión de antagonistas y, en particular, una región en el extremo carboxilo terminal del tercer *loop* intracelular del receptor se ve implicada en la especificidad del acoplamiento con la proteína G y muestra una homología extensa dentro de los receptores M₁, M₃ y M₅ y entre los receptores M₂ y M₄ (Figura 30).

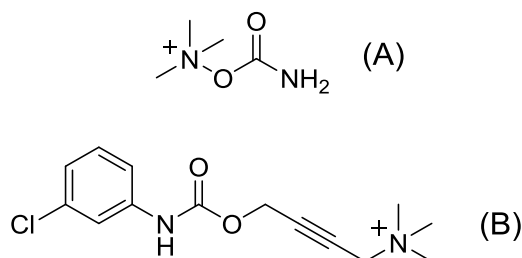


Figura 27. Estructuras de (A) *Betanecol* y (B) *McN-A-343*.

Las regiones conservadas en el segundo *loop* intracelular también confieren especificidad para el reconocimiento adecuado de la proteína G. Aunque la selectividad no es absoluta, la estimulación de los receptores M₁ o M₃ provoca la hidrólisis de polifosfoinosítidos a inositol^{8*} (Figura 28) y la movilización de Ca²⁺ intracelular como consecuencia de la

^{8*} Un **fosfoinosítido**, inositol fosfato o simplemente inosítido es un fosfolípido que contiene en su estructura uno o más inositoles modificados por adición de uno o más grupos fosfato. Poseen especial relevancia en biología celular puesto que actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales de las células.

activación de la vía G_q -PLC^{9*}. Este efecto a su vez da lugar a una variedad de eventos regulados por Ca^{2+} , ya sea directamente o como consecuencia de la fosforilación de las proteínas diana.

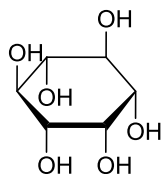


Figura 28. Estructura de Inositol (ciclohexan-1,2,3,4,5,6-hexol).

Por el contrario, los mAChR M_2 y M_4 inhiben la adenilil ciclasa y regulan canales iónicos específicos, (por ejemplo, aumento de la conductancia de K^+ en el tejido auricular cardíaco) a través de subunidades liberadas de proteínas G sensibles a la toxina *pertussis* (G_i^{10*} y G_o), utilizados por los receptores M_1 y M_3 . En particular, se demostró que el antagonista muscarínico *pirenzepina* se unía con alta afinidad a sitios en la corteza cerebral y ganglios simpáticos (M_1), pero que tenía una menor afinidad por sitios en músculo cardíaco, músculo liso y diversas glándulas. Estos datos explican la capacidad de la *pirenzepina* (Figura 29) para bloquear respuestas inducidas por agonistas que son mediadas por el mAChR M_1 .⁴⁰

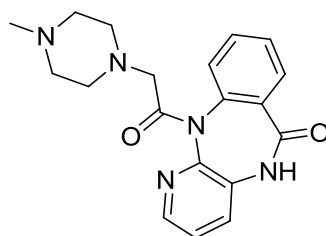


Figura 29. Estructura de pirenzepina.

^{9*} Una **proteína G_q** es una subunidad de proteína G heterotrimérica que activa la fosfolipasa C (PLC).

^{10*} Una **proteína G_i** es una subunidad de proteína G heterotrimérica que inhibe la producción de cAMP desde ATP.

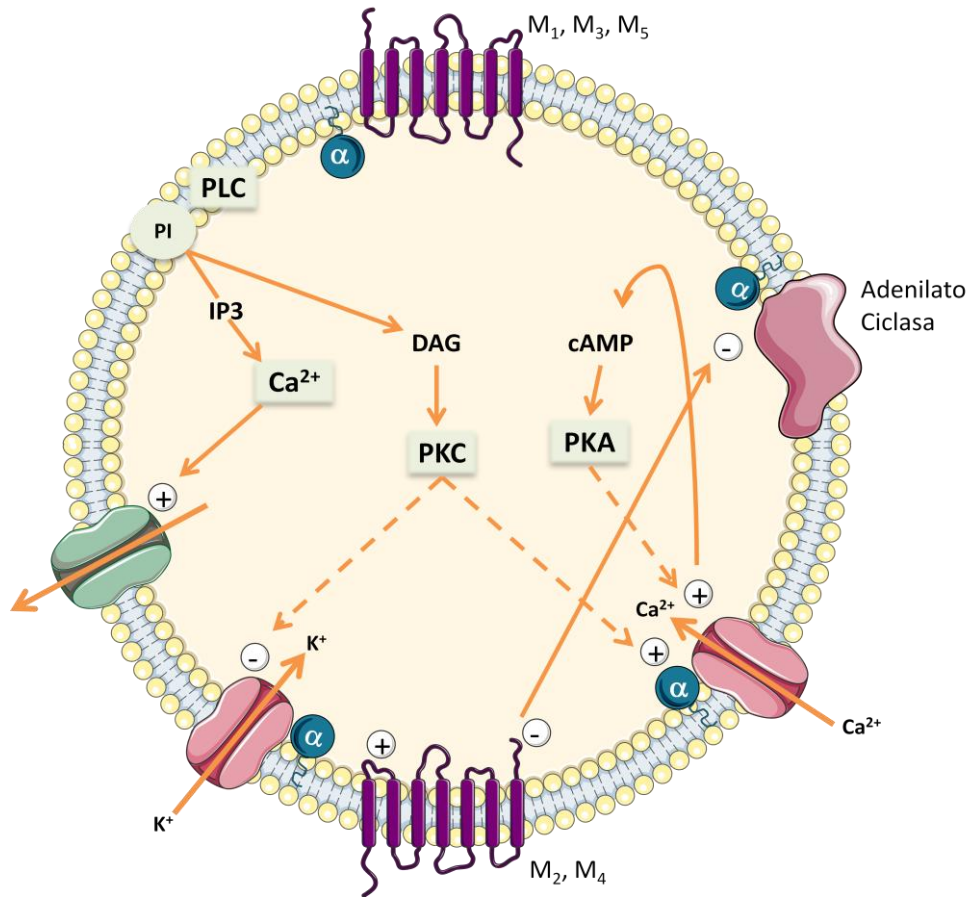


Figura 30. Resumen de la acción de los 5 receptores muscarínicos.⁵²

Tabla 4. Clasificación de los receptores muscarínicos.

| | M ₁ | M ₂ | M ₃ | M ₄ | M ₅ |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>Distribución</i> | Córtex cerebral, hipocampo | Corazón | Glándulas exocrinas, tracto gastrointestinal | Neostriatum | Sustancia negra ^{11*} |
| <i>Codificación</i> | CHRM1 | CHRM2 | CHRM3 | CHRM4 | CHRM5 |
| <i>Proteína G</i> | G _q / G ₁₁ | G _i / G ₀ | G _q / G ₁₁ | G _i / G ₀ | G _q / G ₁₁ |
| <i>Respuesta intracelular</i> | PLC | Inhibición de adenilil ciclasa | PLC | Inhibición de adenilil ciclasa | PLC |

^{11*} La **sustancia negra** es una porción heterogénea del mesencéfalo, y un elemento importante del sistema de ganglios basales.

2.3.2 Principales ligandos del sistema muscarínico.

2.3.2.1 Agonistas.

El diseño de fármacos para la obtención de agonistas muscarínicos se ha estudiado a lo largo de los años, llegando a comercializarse algunos como el *Carbachol* (comentado anteriormente como agonista nicotínico, Figura 22) o el Evoxac® (*cevimelina*, Figura 31)⁵⁴. Ambos son agonistas del receptor M₁ aunque ambos muestran también efectos agonistas sobre otros receptores: el *carbachol* lo hace sobre los receptores M₄ y M₅ y la *cevimelina* ejerce su acción principal sobre el receptor M₃.

Un agonista que también muestra efectos agonistas sobre el receptor M₁ es la *vedaclidina* (Figura 31) además de mostrar efecto antagonista sobre M₂, M₃ y M₅.

Cabe destacar que la acción agonista de la muscarina se ejerce principalmente sobre el receptor M₁ y sobre el receptor M₂.

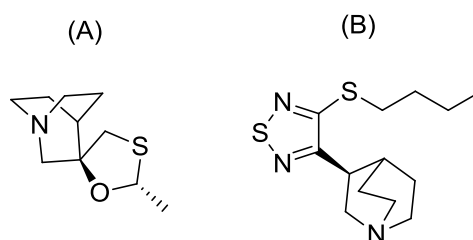


Figura 31. Estructuras de (A) Cevimelina y (B) Vedaclidina.

Para el receptor M₂ existen un amplio número de ligandos pero, sin embargo, es difícil encontrar agonistas que muestren una amplia selectividad por el receptor M₂ con respecto a M₁.

Para encontrar un agonista que muestre una alta preferencia por el receptor M₂ hay que acudir al veneno de la variedad de serpiente “Mamba verde”, que posee una variedad de toxinas que muestran diferentes comportamientos frente a los mAChR. La toxina MT2 (muscarinic toxin 2) presenta un tipo de unión alostérico también frente al receptor M₁ pero en cuestiones de competitividad la toxina MT1 (cuya unión con M₁ también es alostérica) impide la unión de MT2 con este receptor y convierte en selectiva su unión con M₂.⁵⁵

Dos fármacos diferentes se comercializan con acción agonista sobre el receptor M₃ para tratar patologías relacionadas con la boca seca: la ya citada *cevimelina*⁵⁴ (Figura 31) y la *pilocarpina* (Figura 32).⁵⁶

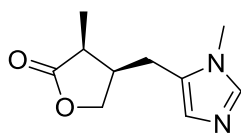


Figura 32. Estructura de la Pilocarpina.

2.3.2.2 Antagonistas.

Del veneno de la mamba verde se obtienen las toxinas MT1 y MT2, además de la toxina MT7, todas con una cierta acción antagonista sobre los distintos MACHR.⁵⁷

Existe un amplio número de fármacos con acción antagonista sobre el receptor M₁, algunos ejemplos son la *atropina*, *hioscina* (también conocida como *escapolamina*), *dicicloverina*, *tolterodina* u *oxibutinina* (Figura 33).

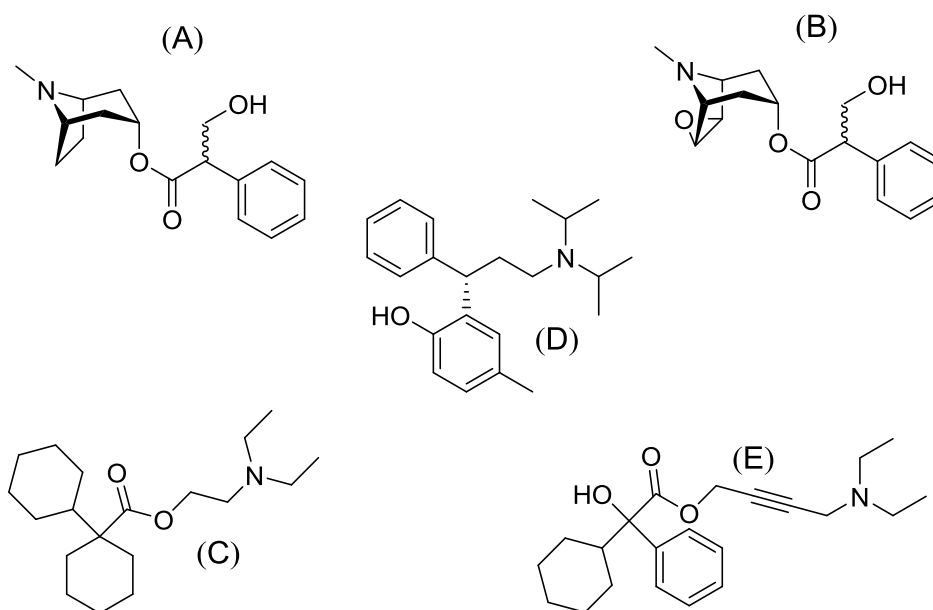


Figura 33. Antagonistas del receptor M₁: (A) Atropina; (B) Hioscina; (C) Dicicloverina; (D) Tolterodina y (E) Oxibutinina.

Sin embargo, estos ligandos no son selectivos y también tienen actividad antagonista frente a todos los otros receptores.

Ligandos antagonistas selectivos serían la *pirenzepina* (compuesto citado en la sección de receptores puesto que fue su actividad selectiva la que ayudó a diferenciar los diferentes subtipos, Figura 29) o la *telenzepina* (homólogo estructural del anterior, 25 veces más potente como antagonista, Figura 34), ambos selectivos sobre M₁:

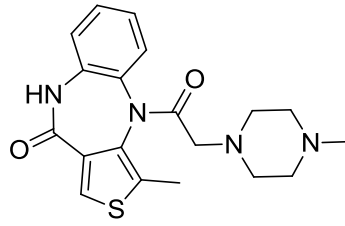


Figura 34 Estructura de Telenzepina, antagonista selectivo M_1 .

Otro fármaco con actividad antagonista selectiva sobre M_1 frente a los otros mAChR es el *haloperidol* (Figura 35).⁵⁸

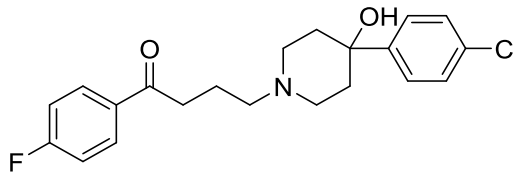


Figura 35. Estructura de Haloperidol.

Dos antagonistas que muestran una cierta selectividad sobre M_2 son la *galamina* (Figura 36) y el compuesto *AF-DX 116* (Figura 36), pero únicamente con una selectividad de 30:1 y 15:1 respectivamente con respecto al receptor M_1 .

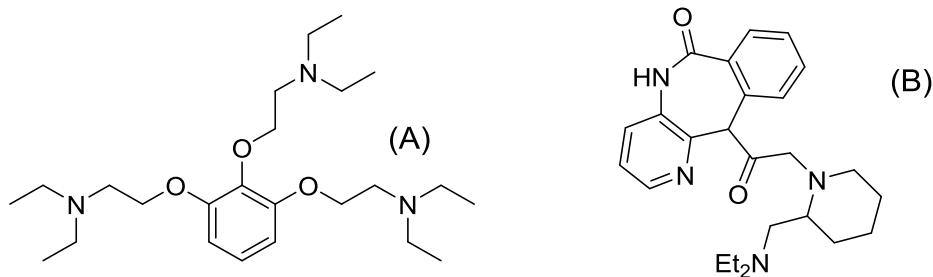


Figura 36. Estructuras de (A) Galamina; (B) AF-DX 116.

Los fármacos Enablex® (*darifenacina*, Figura 37)⁵⁹ y Vesicare® (*solifenacina*, Figura 37)⁶⁰ son antagonistas selectivos del receptor M_3 .

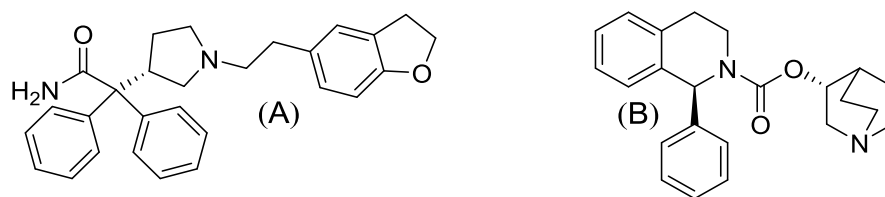


Figura 37. Estructuras de los antagonistas selectivos M₃. (A) darifenacina y (B) solifenacina.

Otro fármaco relativamente reciente (comercializado en 2004) y con acción antagonista selectiva sobre M₃ es el Spiriva[®] (*bromuro de tiotropio*, Figura 38). También muestra cierta selectividad sobre M₁.⁶¹

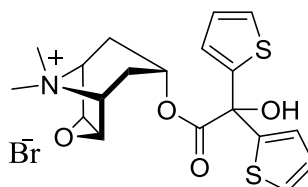


Figura 38. Estructura del Bromuro de tiotropio.

Es complicado encontrar compuestos con actividad antagonista sobre el receptor M₄ pero, nuevamente, en el veneno de la mamba verde encontramos una toxina, la MT3, que muestra este tipo de actividad con una muy ligera selectividad.⁵⁷

Ya se han citado algunas moléculas que muestran actividad no selectiva sobre este receptor. Un nuevo ejemplo sería el compuesto AF-DX 384 (Figura 39),⁶² análogo estructural del compuesto AF-DX 166 (Figura 36) que también tiene actividad sobre M₂.

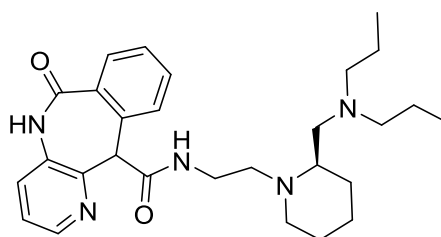


Figura 39. Estructura del AF-DX 384.

Del receptor M₅, al ser del que menos se sabe, no se conocen aún compuestos con una actividad selectiva. Por ejemplo, el compuesto *xanomelina*⁶³ (Figura 40), que presenta actividad antagonista frente a este receptor, es más selectivo como agonista de M₁ y antagonista de M₄.

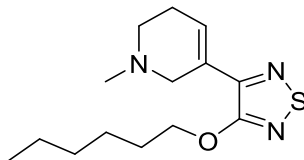


Figura 40. Estructura de la Xanomelina.

2.4 Aplicaciones terapéuticas.

Sistema Endocannabinoide.

Hay evidencias de estudios preclínicos que demuestran el potencial terapéutico frente a enfermedades inflamatorias y autoinmunes, sin embargo en el presente trabajo nos centraremos en las recogidas dentro del campo de las enfermedades neurodegenerativas. Para ello es importante recordar que las principales rutas de investigación buscan conseguir ligandos CB2 selectivos para evitar los efectos psicoactivos adversos que derivan de la unión con el receptor CB1.

Se ha observado como en tejidos cerebrales bajo neuroinflamación se encontraban presentes receptores CB2 y en tejidos cerebrales afectados por esclerosis lateral amiotrófica se ha observado una sobrerregulación de CB2 (lo cual confirma los estudios que sugerían que el receptor CB2 también se encuentra presente en estos tejidos y no únicamente el CB1, si bien este último está en una proporción mucho más alta).

Un radiomarcador específico de CB2 se emplea como biomarcador en las etapas tempranas de AD, y en PD se han observado efectos antiinflamatorios en tejido cerebral *post mortem* empleando una regulación positiva de CB2 en el tejido nervioso.

Agonistas CB2 mostraron, en ratas, una leve pero demostrable eficacia frente a una lesión cerebral traumática en la reducción de los déficits motrices, visuales y emocionales. La regulación positiva del receptor CB2 posee un efecto neuroprotector.^{22,64}

Pese a la controversia que genera el receptor GPR55 (el cual es difícil situar como cannabinoide con una comparación simple de los ligandos y/o mecanismos de acción de los otros receptores CB), representa una ruta prometedora hacia la que apuntar para el

tratamiento de diversas enfermedades. Su rol en inflamación y dolores neuropáticos está siendo investigado y varios ligandos se encuentran bajo investigación como candidatos en la lucha contra AD y PD.^{19,30}

Sistema Colinérgico.

La disfunción del sistema colinérgico en la AD se produce en varios niveles, incluyendo una disminución de la actividad de la Ch acetiltransferasa, una menor absorción de Ch, una disminución en la síntesis de ACh y niveles alterados de receptores de ACh.

Los cuatro inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEI) aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos para el tratamiento de AD son la *tacrina*, el *donepezilo*, la *rivastigmina* y la *galantamina* (Figura 41), sin embargo la *tacrina* se usa en raras ocasiones debido a su hepatotoxicidad. Los AChEI potencian la neurotransmisión colinérgica a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa, disminuyendo así la degradación de la ACh.⁶⁵

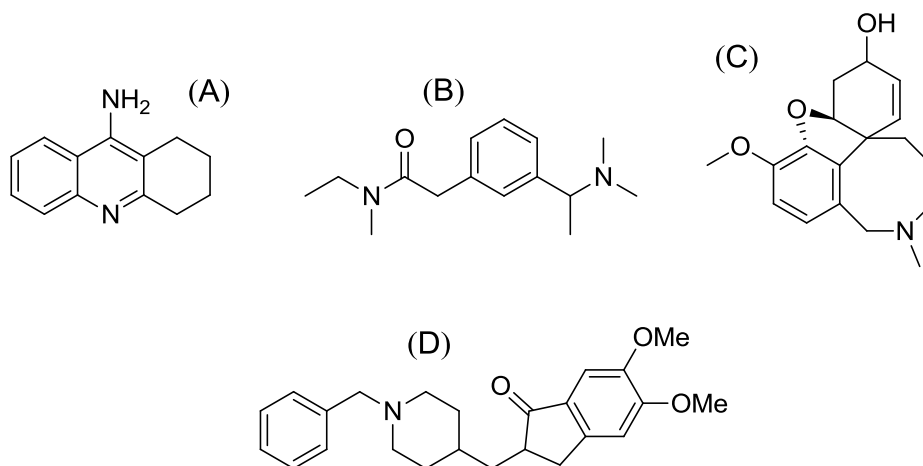


Figura 41. Estructuras de (A) Tacrina; (B) Rivastigmina, (C) Galantamina y (D) Donepezilo.

La acción sobre el SNC de los compuestos nicotínicomiméticos ha sido profundamente estudiada, por ello forman parte del tratamiento frente a AD, PD (pacientes con PD post.encefálica mostraron una clara mejoría de sus síntomas al ser tratados con cantidades progresivamente mayores de nicotina subcutánea)⁶⁶ y otras enfermedades neurodegenerativas, sin embargo es importante resaltar que se busca una mayor selectividad frente a los receptores nAChR que la mostrada por la nicotina con el fin de evitar los efectos secundarios nocivos de esta última.⁶⁷

Existen numerosas evidencias sustanciales de que la activación de los mAChR tiene el potencial para tratar tanto los síntomas cognitivos como los relacionados con la psicosis y asociados con numerosos trastornos del SNC. Sin embargo, el uso de moduladores no selectivos de mAChR se ve obstaculizado por los efectos secundarios periféricos limitantes de la dosis que suponen una traba en cuanto a su utilidad clínica. Con el fin de mantener la eficacia clínica sin la responsabilidad de efectos adversos, los esfuerzos se han centrado en el descubrimiento de compuestos que modulan selectivamente los subtipos mAChR M₁ y M₄.

En consecuencia se han desarrollado varios agonistas de mAChR y han entrado en pruebas clínicas con el objetivo de mejorar los déficits de comportamiento y cognitivos observados en numerosas enfermedades psiquiátricas. De éstos, la *xanomelina* fue la única que pasó a la fase III de los ensayos clínicos, en los que se evaluó su eficacia para mejorar los déficits cognitivos observados en pacientes con AD. Aunque la *xanomelina* mostró una tendencia a mejorar la función cognitiva en estos pacientes, este efecto no alcanzó significación estadística. Sin embargo, este agonista produjo reducciones sorprendentemente altas, y dependientes de la dosis, de patologías como alucinaciones, delirios, estallidos vocales y otros trastornos de la conducta en estos pacientes. La eficacia de la *xanomelina* (Figura 40) en el tratamiento de trastornos psicóticos y conductuales en pacientes con AD dio lugar a estudios doble ciego^{12*}, controlado con placebo para determinar si se pudo observar una eficacia similar en pacientes con esquizofrenia.⁶⁸

Aunque no se ampliará, por no ser el motivo central del trabajo, cabe destacar que tanto los receptores CB₂ y GPR55 como los receptores colinérgicos han demostrado, dentro de otras muchas ventajas, ser útiles en la lucha contra el cáncer (por ejemplo los receptores CB están implicados en procesos de división celular).

^{12*} El método **doble ciego** es una herramienta del método científico que se emplea para prevenir la influencia en los resultados del efecto placebo y del sesgo del observador.

3. Conclusiones.

La modulación de la actividad de los receptores cannabinoides y colinérgicos es una de las principales vías de investigación que tiene la síntesis orgánica para contribuir en la lucha frente a las enfermedades neurodegenerativas. Las evidencias tanto en las mejoras sintomáticas como a nivel de señalización/marcaje (lo cual no deja de ser parte de la evolución sobre el conocimiento de estas enfermedades) hacen del estudio de esta clase de ligandos una ruta prometedora.

Aún así, nuestra comprensión relativamente pobre de la naturaleza de los efectos farmacodinámicos inducidos por la nicotina, muscarina, tetahidrocannabinol o, en definitiva, los compuestos relacionados con estos cuya acción va más allá que la mera presencia del fármaco en el organismo sigue siendo un desafío importante. Hasta que la biología de los receptores cerebrales se dilucide más, la predicción de acciones farmacológicas, mediante el modelado *in vitro* o *in silico*, puede resultar difícil. El uso de modelos animales en un enfoque sistémico para el descubrimiento de fármacos seguirá siendo necesario en el futuro cercano. Pero con el enorme potencial terapéutico de la clase de fármacos que actúan sobre los receptores descritos, los titánicos esfuerzos de la comunidad científica para estudiar este grupo de receptores importantes, desde una amplia variedad de perspectivas experimentales, están más que justificado.

4. Referencias bibliográficas.

1. Lemke, Thomas L, Williams, Da. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry Seventh Edition. Lippincott Raven* (2012).
2. Burger A. *The practice of medicinal chemistry Third Edition. Academic Press.* (2008).
3. Huang, Y., Todd, N. & Thathiah, A. The role of GPCRs in neurodegenerative diseases: avenues for therapeutic intervention. *Curr. Opin. Pharmacol.* **32**, 96–110 (2017).
4. Universidad Complutense de Madrid. Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social. *Neuroalianza Madrid* pp 14 (180) (2016).
5. Hanlon, C. D. & Andrew, D. J. Outside-in signaling - a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *J. Cell Sci.* **128**, 3533–3542 (2015).
6. Geppetti, P., Veldhuis, N. A., Lieu, T. M. & Bunnett, N. W. G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch. *Neuron* **88**, 635–649 (2015).
7. González-Maeso, J. & Sealfon, S. C. Functional selectivity in GPCR heterocomplexes. *Mini Rev. Med. Chem.* **12**, 851–855 (2012).
8. Jones, C. K., Byun, N. & Bubser, M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **37**, 16–42 (2012).
9. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Molecular Biology Of The Cell 4th Ed.* (Garland Science, 2002).
10. Mechoulam, R., Gaoni, Y. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646–1647 (1964)..
11. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564 (1990).
12. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65 (1993).
13. Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946–9

- (1992).
14. Cumella, J., Hernández-Folgado, L., Girón, R., Sánchez, E., Morales, P., Hurst, D. P., Gómez-Cañas, M., Gómez-Ruiz, M., Pinto, D., Goya, P., Reggio, P. H., Martin, M. I., Fernández-Ruiz, J., Silva, A. M. & Jagerovic, N. Chromenopyrazoles: Non-psychoactive and Selective CB1 Cannabinoid Agonists with Peripheral Antinociceptive Properties. *ChemMedChem* **7**, 452–463 (2012).
 15. Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D. & Sharkey, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **310**, 329–332 (2005).
 16. Zhao, P. & Abood, M. E. GPR55 and GPR35 and their relationship to cannabinoid and lysophospholipid receptors. *Life Sci.* **92**, 453–457 (2013).
 17. McHugh, D., Hu, S. J., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, Z. M. & Bradshaw, H. B. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci.* **11**, 44–58 (2010).
 18. Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. Q., George, S. R. & O'Dowd, B. F. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol. Brain Res.* **64**, 193–198 (1999).
 19. Morales, P. & Jagerovic, N. Advances towards the Discovery of GPR55 Ligands. *Curr. Med. Chem.* **23**, 2087–2100 (2016).
 20. Gantz, I., Muraoka, A., Yang, Y-K., Samuelson, L. C., Zimmerman, E. M., Cook, H. & Yamada, T. Cloning and Chromosomal Localization of a Gene (GPR18) Encoding a Novel Seven Transmembrane Receptor Highly Expressed in Spleen and Testis. *Genomics* **42**, 462–466 (1997).
 21. McHugh, D., Page, J., Dunn, E. & Bradshaw, H. B. Δ 9-tetrahydrocannabinol and N-arachidonoyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2414–2424 (2012).
 22. Aghazadeh Tabrizi, M., Baraldi, P. G., Borea, P. A. & Varani, K. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Potential Therapeutic Benefits of Cannabinoid CB 2 Receptor Agonists. *Chem. Rev.* **116**, 519–560 (2016).
 23. D'Ambra, T. E., Estep, K. G., Bell, M. R., Eissenstat, M. A., Josef, K. A., Ward, S. J., Ward, S. J., Haycock, D. A., Baizman, D. R. & Casiano, F. M. Conformationally restrained analogs of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* **35**, 124–

- 135 (1992).
24. Morales, P., Blasco-Benito, S., Andradás, C., Gómez-Cañas, M., Flores, J. M., Goya, P., Fernández-Ruiz, J., Sánchez, C. & Jagerovic, N. Selective, Nontoxic CB2 Cannabinoid o-Quinone with in Vivo Activity against Triple-Negative Breast Cancer. *J. Med. Chem.* **58**, 2256–2264 (2015).
 25. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., Pertwee, R. G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J. & Vogel, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 83–90 (1995).
 26. Mechoulam, R., Hanuš, L. O., Pertwee, R. & Howlett, A. C. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 757–764 (2014).
 27. Porter, A. C., Sauer, J.-M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., Nomikos, G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B. & Felder, C. Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the CB1 Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 1020–1024 (2002).
 28. Bisogno, T., Melck, D., Bobrov, M. Y., Gretskaya, N. M., Bezuglov, V. V., De Petrocellis, L. & Di Marzo, V. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem. J.* **351 Pt 3**, 817–824 (2000).
 29. 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.* **513**, 294–298 (2002).
 30. Ross, R. A. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 156–163 (2009).
 31. Rajaraman, G., Simcocks, A., Hryciw, D. H., Hutchinson, D. S. & McAinch, A. J. G protein coupled receptor 18: A potential role for endocannabinoid signaling in metabolic dysfunction. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 92-102 (2016).
 32. Chiang, N., Dalli, J., Colas, R. A. & Serhan, C. N. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J. Exp. Med.* **212**, 1203–1217 (2015).
 33. Pertwee, R. G. Cannabinoid receptor ligands. *Tocris Cookson Rev.* **44**, (1993).
 34. Pertwee, R. G. Cannabinoid Receptor Ligands. *Tocris Cookson Rev.* **84**, 1–8 (2001).

35. Rempel, V., Atzler, K., Behrenswerth, A., Karcz, T., Schoeder, C., Hinz, S., Kaleta, M., Thimm, D., Kiec-Kononowicz, K. & Müller, C. E. Bicyclic imidazole-4-one derivatives: a new class of antagonists for the orphan G protein-coupled receptors GPR18 and GPR55. *Medchemcomm* **5**, 632–649 (2014).
36. Harms, H., Rempel, V., Kehraus, S., Kaiser, M., Hufendiek, P., Müller, C. E. & König, G. M. Indoloditerpenes from a marine-derived fungal strain of *Dichotomomyces cejpaii* with antagonistic activity at GPR18 and cannabinoid receptors. *J. Nat. Prod.* **77**, 673–677 (2014).
37. Nazir, M., Harms, S., Loef, I., Kehraus, S., El Maddah, F., Arslan, I., Rempel, V., Müller, C. E., König, G. M. GPR18 Inhibiting Amauromine and the Novel Triterpene Glycoside Auxarthonoside from the Sponge-Derived Fungus *Auxarthron reticulatum*. *Planta Med.* **81**, 1141–1145 (2015).
38. Abadji, V. , Lin, S., Taha, G., Griffin, G., Stevenson, L.A., Pertwee, R.G. & Makriyannis, A. (R)-Methanandamide: A Chiral Novel Anandamide Possessing Higher Potency and Metabolic Stability. *J. Med. Chem.* **37**, 1889–1893 (1994).
39. Changeux, J. P. The TiPS lecture the nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 485–492 (1990).
40. Tiwari, P., Dwivedi, S., Singh, M. P., Mishra, R. & Chandy, A. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **3**, 413–420 (2013).
41. Marcon, F., Leblanc, M., Vetter, I., Lewis, R. J., escoubas, P. & Nicholson. G., M. Pharmacological characterization of α -elapitoxin-A12a from the venom of the Australian pygmy copperhead (*Austrelaps labialis*): An atypical long-chain α -neurotoxin with only weak affinity for $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 851–863 (2012).
42. Itier, V. & Bertrand, D. Neuronal nicotinic receptors: From protein structure to function. *FEBS Lett.* **504**, 118–125 (2001).
43. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **346**, 967–989 (2005).
44. Kabbani, N., Nordman, J.C., Corgiat, B.A., Veltri, D.P., Shehu, A., Seymour, V.A. & Adams, D.J. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *BioEssays* **35**, 1025–1034 (2013).
45. De La Fuente Revenga, M., Balle, T., Jensen, A. A. & Frølund, B. Conformationally restrained carbamoylcholine homologues. Synthesis, pharmacology at neuronal nicotinic acetylcholine receptors and biostructural considerations. *Eur. J. Med. Chem.* **102**, 352–362 (2015).

46. Haroutunian, V., Barnes, E. & Davis, K. L. Psychopharmacology Cholinergic modulation of memory in rats. *Psychopharmacology*. 266–271 (1985).
47. Beers, WH; Reich, E. Structure and activity of acetylcholine. *Nature* **228**, 917 (1970).
48. Buccafusco, J. J. Neuronal nicotinic receptor subtypes: defining therapeutic targets. *Mol. Interv.* **4**, 285–295 (2004).
49. Arias, H. R. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res. Rev.* **25**, 133–191 (1997).
50. Schmiedeberg, O. & Koppe, R. *Muscarine, the poisonous alkaloid of the fly agaric (Agaricus muscarius L.), its preparation, chemical properties, physiological effects, toxicological importance, and its relation to mushroom poisoning in general.* (1869).
51. Riker, W. F. & Wescoe, W. C. The pharmacology of Flaxedil, with observations on certain analogs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **54**, 373–94 (1951).
52. Jones, S. V. P. Muscarinic receptor subtypes: Modulation of ion channels. *Life Sci.* **52**, 457–464 (1993).
53. Caulfield, M. P. & Birdsall, N. J. M. International union of pharmacology. XVII. classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**, 279–290 (1998).
54. Mitoh, Y., Ueda, H., Ichikawa, H., Fujita M., Kobashi, M. & Matsuo, R. Effects of cevimeline on excitability of parasympathetic preganglionic neurons in the superior salivatory nucleus of rats. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **206**, 1–7 (2017).
55. Carsi, J. M., Valentine, H. H. & Potter, L. T. m2-toxin: A selective ligand for M2 muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **56**, 933–937 (1999).
56. Figueroa, K. W., Griffin, M. T. & Ehlert, F. J. Selectivity of Agonists for the Active State of M1 to M4 Muscarinic Receptor Subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 331–342 (2009).
57. Bradley, K. N. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol. Ther.* **85**, 87–109 (2000).
58. Lathi, R., Evans, D., Stratman, N. & Figur, L. Dopamine D4 versus D2 receptor selectivity of dopamine receptor antagonists: possible therapeutic implications. *Eur. J. Pharmacol.* **236**, 483–486 (1993).
59. Michel, M. C. Fesoterodine: a novel muscarinic receptor antagonist for the treatment of overactive bladder syndrome. *Expert Opin. Pharmacother.* **9**, 1787–1796 (2008).
60. Ito, Y., Oyunzul, L., Yoshida, A., Fujino, T., Noguchi, Y., Yuyama, H., Ohtake, A.,

- Suzuki, M., Sasamata, M., Matsui, M. & Yamada, S. Comparison of muscarinic receptor selectivity of solifenacin and oxybutynin in the bladder and submandibular gland of muscarinic receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* **615**, 201–206 (2009).
61. Koumis, T. & Samuel, S. Drug Tiotropium Bromide: A New Long-Acting Bronchodilator for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Ther.* **27**, 377–392 (2005).
 62. Kitaichi, K. & Day, J. C. A novel muscarinic M4 receptor antagonist provides further evidence of an autoreceptor role for the muscarinic M2 receptor sub-type. *J. Pharmacol.* **383**, 53–56 (1999).
 63. Bymaster, F.P., Whitesitt, C.A., Shannon, H.E., Delapp, N., Ward, J.S., Calligaro, D.O., Shipley, L.A., Buelkesam, J.L., Bodick, N.C., Farde, L., Sheardown, M.J., Olesen, P.H., Hansen, K.T., Suzdak, P.D., Swedberg, M.D.B., Sauerberg, P. & Mitch, C H. Xanomeline - a Selective Muscarinic Agonist For the Treatment Of Alzheimers-Disease. *Drug Dev. Res.* **40**, 158–170 (1997).
 64. Navarro, G., Morales, P., Rodríguez-Cueto, C., Fernández-Ruiz, J., Jagerovic, N. & Franco, R. Targeting cannabinoid CB2 receptors in the central nervous system. Medicinal chemistry approaches with focus on neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci.* **10**, 1–11 (2016).
 65. Rang, H. P., Ritter, J. M., Flower, R. J. & Henderson, G. *Pharmacology. Rang and Dale's pharmacology.* Pag 490. *Churchill Livingstone* (2012).
 66. Mihailescu, S. & Drucker-Colín, R. Nicotine, brain nicotinic receptors, and neuropsychiatric disorders. *Arch. Med. Res.* **31**, 131–144 (2000).
 67. Anand, R., Gill, K. D. & Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **76**, 27–50 (2014).
 68. Foster, D. J., Choi, D. L., Jeffrey Conn, P. & Rook, J. M. Activation of M1 and M4 muscarinic receptors as potential treatments for Alzheimer's disease and schizophrenia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **10**, 183–191 (2014).