

LOS ENDOCANNABINOIDES COMO UNA FUTURA HERRAMIENTA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

FABIO MAYORGA NIÑO, GIOVANNY TORRES VIDALES

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA, ANTIGUO HOSPITAL SAN RAFAEL, TUNJA, COLOMBIA

RESUMEN

El tratamiento antineoplásico farmacológico se centra en la inhibición de proliferación celular, de células que presentan alto índice mitótico. Estos fármacos no son capaces de diferenciar entre células sanas y enfermas. Esto es responsable de una gran cantidad de efectos adversos: alopecia, alteraciones del sistema gastrointestinal, depresión de médula ósea, alteraciones del comportamiento, potencial carcinogénico, entre otros. Hay muchos grupos de investigación que trabajan en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad potencial antineoplásica. Entre los compuestos líderes están el tetrahidrocannabinol y endocannabinoides, como la anandamida. Estudios recientes permiten concluir que esos compuestos ofrecen una alta selectividad sobre células enfermas; esto puede ser considerado como una posibilidad de bajo riesgo de toxicidad. Los tratamientos antineoplásicos, como los de cualquier patología, deberían tener en cuenta los ritmos biológicos con el fin de obtener mejores efectos terapéuticos y un perfil menor de reacciones adversas. El objetivo de este trabajo es dar a conocer los mecanismos de acción de cannabinoides y endocannabinoides en cáncer, los beneficios del futuro tratamiento antineoplásico basado en la acción de estos compuestos sobre el crecimiento de las células cancerosas.

PALABRAS CLAVE: Cannabinoides, endocannabinoides, cáncer, tratamiento, mecanismo, acción.

SUMMARY

The antineoplastic drug treatment focuses on the inhibition of cell proliferation, those cells which have high mitotic index. However, these drugs are not able to differentiate between healthy cells and the sick. This feature is responsible for a large number of adverse effects, including the alopecia, disorders of the gastrointestinal system, bone marrow depression, changes in behavior and one carcinogenic potential, among others. There are many research groups working in the search for new molecules with potential antineoplastic activity. The composite leaders include tetrahidrocannabinol and endocannabinoids, as anandamide. Recent studies suggest that these compounds offer a high selectivity on diseased cells; this can be considered as a possibility for low risk of toxicity. Finally, all antineoplastic treatments such as of any pathology, should take into account biological rhythms in order to obtain the best therapeutic effects and one less adverse reaction profile. The objective of this work is to understand the mechanisms of action of cannabinoids, the endocannabinoids in cancer and the benefits of future antineoplastic therapy based on the action of these compounds on the growth of cancer cells.

KEY WORDS: Cannabinoids, endocannabinoids, cancer, treatment, mechanism, action.

INTRODUCCIÓN

La terapia del cáncer es un proceso complejo. Este puede ser quirúrgico, físico (radioterapia) o químico (quimioterapia), así como psicológico. La quimioterapia ha sido exitosa parcialmente debido a su naturaleza altamente tóxica,

Recibido: 17/07/2013 Revisado: 12/11/2013

Acceptado para publicación: 28/12/2013

Correspondencia: Dr. Fabio Mayorga Niño, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Avenida Central del Norte, Tunja, Colombia. E-mail: fabio.mayorga@uptc.edu.co.

aunque se han podido salvar muchas vidas usando estos medicamentos, sin presentar efectos secundarios graves.

Durante varios años, científicos han desarrollado un sinnúmero de estudios con el fin de entender el papel biológico del sistema cannabinoide endógeno (SCE) y su participación en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos ^(1,2). Por otra parte, hay muchos grupos de investigación a nivel mundial dedicados a trabajar en el desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas para el tratamiento del cáncer. Los cannabinoides y endocannabinoides constituyen uno de los temas de más reciente interés sobre este tópico, porque el delta 9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) ha demostrado presentar una interesante acción antineoplásica ⁽³⁾, actividad que también se ha observado en los endocannabinoides ⁽⁴⁻⁶⁾. Uno de los hechos más atractivos de los cannabinoides y endocannabinoides en el tratamiento del cáncer es su acción selectiva sobre las células neoplásicas. Sin embargo, estos compuestos no han sido aceptados para el tratamiento clínico del cáncer debido a sus efectos psicotrópicos. Posteriormente se hablará acerca de algunos aspectos cronobiológicos del sistema cannabinoide endógeno ⁽⁷⁾. Tal vez, estas preocupaciones nos ayuden a entender posibles consideraciones crono-farmacológicas para nuevos tratamientos a futuro, basados en estos compuestos.

Se han hecho grandes esfuerzos alrededor del mundo para obtener nuevas moléculas que actúen de manera clara y selectiva sobre células neoplásicas. Los endocannabinoides han demostrado su alta selectividad sobre las células patológicas. Por lo tanto, existen importantes avances en cuanto al diseño, síntesis y evaluación farmacológica de algunos derivados o análogos de los cannabinoides y los endocannabinoides, buscando obtener nuevos compuestos con la misma actividad antineoplásica de aquellas sustancias naturales, pero sin sus efectos psicotrópicos ⁽⁸⁾.

ASPECTOS GENERALES DE ANTINEOPLÁSICOS USADOS EN LA ACTUALIDAD

El cáncer es una causa significativa de muerte en el mundo. Hoy en día, se cuenta con un importante arsenal terapéutico en el tratamiento de esta patología. Sin embargo, existen algunos problemas relacionados con el uso de estos fármacos, como la falta de selectividad sobre las células neoplásicas, un estrecho margen terapéutico y la resistencia a múltiples fármacos (MDR) ⁽⁹⁾. La mayoría de agentes citotóxicos interrumpen procesos relacionados con la síntesis de ADN o de sus precursores. Así, los agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas y nitrosoureas, atacan de forma inespecífica el ciclo celular, produciendo, por ejemplo, depresión de la médula ósea; antimetabolitos, como metotrexato y fluorouracilo, interfieren específicamente en la fase S del ciclo celular; estos también producen depresión de la médula ósea y otros efectos tóxicos. Los antibióticos antitumorales como bleomicina o daunorrubicina actúan sobre la fase G-2 o de manera no específica, produciendo depresión de la médula ósea y otros problemas. La vincristina y la vinblastina, ambos inhibidores mitóticos, atacan específicamente la fase-M y producen depresión de la médula ósea y neuropatía periférica, respectivamente. Hoy en día, se dispone de nuevos fármacos para tratar algunos tipos de cáncer, los cuales muestran un perfil más amplio de seguridad; este es el caso del bevacizumab, el cual puede producir efectos tóxicos como sangrado e hipertensión arterial; sin embargo, al administrarse en forma concomitante con otros antineoplásicos suele llevar a neutropenia febril, infecciones, mucositis y síndrome mano-pie ⁽¹⁰⁾.

Otro problema a tener en cuenta, es el no uso de criterios crono-farmacológicos con miras a mejorar la acción terapéutica de los fármacos antineoplásicos y reducir sus efectos tóxicos, los cuales se basan en los ritmos circadianos ^(11,12).

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SCE)

HISTORIA

Para entender la historia del SCE, se debe hacer referencia a la marihuana, *Cannabis sativa* Linnaeus. Existen al menos 400 compuestos químicos en la planta *Cannabis sativa*; aproximadamente, 60 de ellos están clasificados como cannabinoides. La marihuana se utilizó ampliamente durante miles de años en la medicina tradicional del lejano oriente; sin embargo, años más tarde, William B. O'Shaughnessy fue el primer científico en hablar acerca del valor terapéutico del Cannabis. El Δ^9 -THC es el más importante de ellos, debido a sus propiedades psicotrópicas y medicinales. Esta sustancia se aisló y caracterizó a mediados del siglo pasado ⁽¹³⁾. Desde entonces, se han llevado a cabo varios estudios que tratan de explicar el comportamiento farmacológico de los cannabinoides. A partir de estos estudios, se encontró que el Δ^9 -THC es el mayor responsable de tal comportamiento, aunque hay otros cannabinoides que muestran efectos similares. Hasta 1990, se pensaba que el Δ^9 -THC actuaba de manera no específica para producir sus efectos. Ese mismo año, Matsuda y col., reportaron la estructura del receptor cannabinoide, llamado receptor CB1 ⁽¹⁴⁾, mientras que en 1993, Munro y col., informaron acerca de la existencia de otro receptor cannabinoide, llamado receptor CB2 ⁽¹⁵⁾. Estos son receptores acoplados a la proteína G, cuyos ligandos naturales son llamados endocannabinoides. El descubrimiento de tales receptores llevó a la conclusión de la existencia de ligandos naturales para estas macromoléculas. A partir de lo anterior, Devane y col., reportaron la existencia de un derivado del ácido araquidónico, el cual fue denominado anandamida. Inicialmente esta sustancia se identificó en el cerebro de cerdos ⁽¹⁶⁾, aunque actualmente, se sabe que la anandamida está presente en las diferentes especies animales, incluido el hombre. Posteriormente, se descubrió

que la anandamida es liberada por una fosfolipasa D a partir de N-araquidonoil fosfatidiletanolamina e hidrolizada por amidohidrolasa de ácidos grasos (más conocida por sus siglas en inglés FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).

En 1995, Mechoulam anunció el descubrimiento de otro endocannabinoide importante: 2-araquidonilglicerol (2-AG) ⁽¹⁷⁾. Además de la anandamida y 2-AG, se encontraron otros endocannabinoides como el noladín éter, virodamina y N-araquidonoildopamina, en tejidos animales.

Se han realizado estudios posteriores para comprender las funciones fisiológicas de los endocannabinoides y analizar sus posibles implicaciones en algunas enfermedades. No obstante, en la actualidad se sabe que la anandamida y 2-AG están relacionadas con varias condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Por consiguiente, hoy en día existen muchos grupos de investigación en el mundo que intentan modular el SCE para el tratamiento de muchas condiciones patológicas.

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

De acuerdo con lo dicho anteriormente, el comportamiento del SCE se asemeja al del Δ^9 -THC. Estas acciones son el resultado de la interacción entre los receptores cannabinoides (CB1 and CB2), endocannabinoides (los ligandos naturales) y el conjunto de enzimas que liberan y degradan aquellos compuestos. Esta triada es la que se conoce como Sistema Endocannabinoide. Este sistema está comprometido con una amplia gama de funciones fisiológicas en el sistema nervioso central (SNC), el sistema cardiovascular, sistema reproductivo y el metabolismo; de manera similar, el SCE está implicado en un número creciente de condiciones fisiopatológicas ^(2,18), tales como la regulación de la ingesta de alimentos, inmunomodulación, inflamación, analgesia, epilepsia, cáncer, comportamiento adictivo entre otros ^(2,19).

RECEPTORES CANNABINOIDES

CB1 y CB2 pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas Gi/o. A través de estos receptores se consigue modular la actividad de la adenilato ciclasa, proteín kinasa y los canales de calcio (Ca^{++}) activados por voltaje, para los receptores CB1⁽²⁰⁾. Ambos receptores CB presentan una selectividad relativa de distribución en el cuerpo. Así, los receptores CB1 se encuentran en su mayoría localizados en el SNC. Una distribución detallada de este tipo de receptor se ha propuesto en el cerebro humano y también en el cerebro de los animales. Esto explica, por ejemplo, por qué los cannabinoides producen efectos sobre la cognición y la memoria^(21,22): en la corteza cerebral y el hipocampo abundan especialmente los sitios de unión de cannabinoides CB1; estas regiones también pueden mediar los efectos de los cannabinoides en la percepción del tiempo, sonido, color y sabor. Los efectos del cannabis sobre la actividad motora y el control postural, posiblemente puedan ser explicados por la presencia de receptores CB1 en los ganglios basales y el cerebelo⁽²¹⁾, porque estas áreas están densamente pobladas por dichos receptores. Por otra parte, existen algunas áreas del SNC que poseen menor población de receptores CB1. Por ejemplo, algunas de estas regiones incluyen aquellas en las cuales los cannabinoides pueden producir hipotermia (hipotálamo) o antinocicepción (médula espinal). Los endocannabinoides pueden actuar sobre el tronco cerebral para suprimir las náuseas y el vómito, aunque esta región contiene relativamente pocos sitios de unión de los cannabinoides⁽²¹⁾. Sin embargo, hay algunas áreas periféricas que contienen receptores CB1, tales como el corazón, la próstata, los ovarios, el útero, el bazo y las terminaciones nerviosas pre-sinápticas. El principal mecanismo intracelular en el cual los receptores CB1 están implicados, incluye la inhibición de adenilato ciclasa, la regulación de los canales iónicos y la activación de la

MAP quinasa (proteína quinasa activada por mitógeno)⁽²³⁾. La estimulación de los receptores cannabinoides induce la inhibición de los canales de calcio y el incremento de la conductancia de potasio. Los efectos combinados de ambos tipos de canales, posiblemente pueden ser la base de la inhibición de la liberación de neurotransmisores.

Los receptores CB2 están localizados principalmente en la periferia. Por lo tanto, el bazo, amígdala y otros órganos del sistema inmunológico son ricos en esos sitios de unión de cannabinoides. Los efectos inmunosupresores de la marihuana pueden ser explicados debido a la presencia de estos receptores en el sistema inmune^(4,6). A pesar de que no pertenecen a los receptores cannabinoides, el receptor vanilloide, también conocido como TRPV1 (por sus siglas en inglés: *transient receptor potential cation channel*), muestra parcialmente acciones medicinales superpuestas.

En resumen, ambos tipos de receptores, CB1 y CB2, intervienen en las diferentes acciones fisiológicas del SCE y, en consecuencia, en varias condiciones patológicas, tales como neurológicas, psiquiátricas, desórdenes alimentarios, desórdenes cardiovasculares, gastrointestinales y reproductivos, entre otros. El cáncer es una enfermedad grave que puede ser convenientemente controlada por los cannabinoides o endocannabinoides o sus derivados o análogos a través de estos receptores.

ENDOCANNABINOIDES

El descubrimiento de los receptores de cannabinoides, llevó a suponer la existencia de ligandos endógenos para estos receptores, conocidos como endocannabinoides. Así, en 1992 se informó sobre el aislamiento y la caracterización de una nueva sustancia endógena, inicialmente encontrada en el cerebro de los cerdos, a la cual se denominó anandamida⁽¹⁶⁾ también conocida como araquidonoiletanolamida. Este compuesto se ha encontrado, además,

en casi todos los tejidos del cuerpo humano, así como en tejidos animales, y en algunas plantas como el cacao. Otro endocannabinoide importante es el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), el cual presenta una mayor afinidad hacia los receptores CB1 que la anandamida. Hay otros cannabinoide endógenos menos estudiados hasta el momento, dentro de los cuales se incluyen virodamina, noladin éter, N-araquidonoildopamina y N-araquidonoiltaurina^(24,25). Todos estos compuestos endógenos son derivados del ácido araquidónico; sin embargo, existen otros endocannabinoide “atípicos” como la oleoiletanolamida (OEA) y la palmitoiletanolamida (PAE), que muestran baja afinidad sobre los receptores CB1 y CB2, y provocan su actividad cannabinoide ya sea por inhibición del catabolismo endocannabinoide⁽²⁴⁾, o la reducción de la captación celular de la anandamida, lo que aumenta su concentración⁽²⁶⁾.

Todos los endocannabinoide identificados son derivados de ácidos poliinsaturados de

cadena larga la mayoría del ácido araquidónico y exhiben una selectividad diferente sobre los receptores cannabinoide, así como sobre otros sitios de unión⁽²⁷⁾. En la actualidad, existen análogos estables de endocannabinoide, como la Met-flúor-anandamida y (R)-Met-anandamida. Del mismo modo, existen otros agonistas sintéticos de los receptores cannabinoide, cuyo único propósito es ayudar a comprender el funcionamiento del sistema cannabinoide endógeno. Las estructuras de algunos endocannabinoide se ilustran en la Figura 1.

ENZIMAS QUE REGULAN EL SCE

El sistema endocannabinoide cuenta con un conjunto de enzimas capaces de regular su función. Dichas enzimas pueden ser blanco de acción farmacológica, con el propósito de regular los niveles de endocannabinoide, de acuerdo con determinados estados patológicos. Hasta la

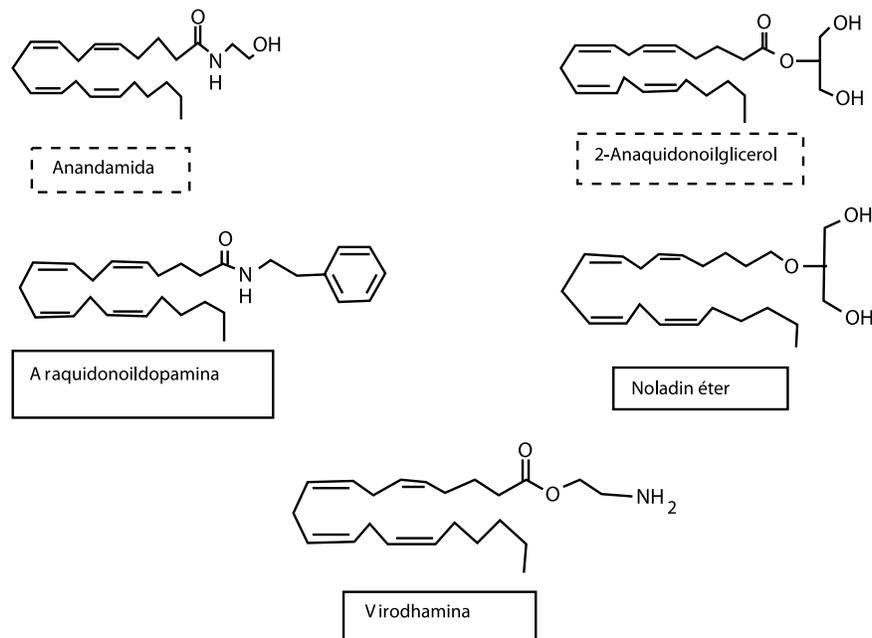


Figura 1. Estructura de algunos de los endocannabinoide más representativos.

fecha, unas pocas enzimas han sido identificadas como parte del sistema cannabinoide endógeno.

Fosfolipasa D, la cual ayuda a liberar anandamida a partir de N-araquidonoil fosfatidiletanolamina, es una de ellas por lo tanto, un fármaco que se dirige hacia ella, posiblemente será capaz de alterar los niveles de anandamida.

Otra enzima muy importante involucrada en la síntesis de anandamida es N-aciltransferasa (NAT) ⁽²⁰⁾, la cual está localizada sobre membranas intracelulares, así como la N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D (NAPE-PLD).

La amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) es una enzima que cataliza la hidrólisis de anandamida y la inactivación de los receptores cannabinoide ⁽²⁰⁾, por lo tanto, es un objetivo interesante para futuros tratamientos farmacológicos; también se localiza en membranas intracelulares, aunque parece ser que la mayoría está en receptores CB1 de neuronas pos-sinápticas ⁽²⁸⁾.

El diacilglicerol sn-1-lipasa selectiva merece un comentario especial; tiene dos isoenzimas: DAGL- α y DAGL- β , que catalizan la hidrólisis de diacilgliceroles a 2-acilgliceroles ⁽²⁹⁾. Estas dos isoformas parecen ser miembros de la familia de serina lipasa. Se ha demostrado que estas enzimas contienen residuos de aminoácidos Ser 443 y Asp 495, que son necesarios para la actividad catalítica de DAGLs. Aunque la α isoforma es preferiblemente expresada en el cerebro adulto y el β , en el cerebro en desarrollo, ambas enzimas experimentan un cambio en la localización durante el desarrollo del cerebro. Estas exhiben co-localización axonal con los receptores CB1 en el sistema nervioso prenatal y posnatal ⁽²⁰⁾. Sin embargo, se localizan especialmente en las neuronas pos-sinápticas en el cerebro adulto ⁽²⁹⁾. De acuerdo con las consideraciones anteriores, Williams y col., y Fernández-Ruiz y col., plantearon que el 2-AG tiene un rol como mensajero autocrino en la guía

axonal ^(30,31), mientras que Wilson y col. y Freund y col., plantearon que el 2-AG juega un papel de mensajero retrógrado en el cerebro adulto ^(32,33).

Otro tipo importante de enzimas son las fosfolipasas C (PLC), las cuales trabajan en la biosíntesis de 2-AG. Ambas, DAGLs y PLC parecen estar en la membrana plasmática, pero los DAGLs, están localizados especialmente en las neuronas pos-sinápticas ⁽²⁹⁾. Es posible que en el futuro los científicos puedan diseñar fármacos para actuar en cada una de ellas. Se sabe que DAGLs y NAPE-PLD son especialmente dependientes de la concentración de Ca⁺⁺. Así, la biosíntesis de la anandamida y del 2-AG depende de la concentración de Ca⁺⁺. Esto permite pensar que la producción de endocannabinoides ocurre a demanda. En consecuencia, en patologías en donde la alta concentración de Ca⁺⁺ es característica, se explica el papel modulador de los endocannabinoides ⁽²⁰⁾.

Finalmente, otra enzima crítica en la regulación de los endocannabinoides es la mono-acilglicerol lipasa (MAGL), la cual cataliza la hidrólisis de 2-AG para el ácido araquidónico y glicerol ⁽³⁴⁾; esta enzima se encuentra en las neuronas pre-sinápticas.

Cuando los endocannabinoides son liberados desde las células y han actuado sobre sus moléculas diana, las enzimas hidrolíticas procederán a su degradación. Es aquí donde actúa el FAAH.

Por otra parte, existe el dominio α, β -hidrolasa 4 (ABHD-4), el cual es una lisofosfolipasa selectiva para N-acilfosfatidiletanolamina e hidroliza sustratos con cadenas de acilo saturadas, mono-insaturadas y poliinsaturadas. Asimismo, el dominio α, β -hidrolasa 6 (ABHD-6) y el dominio α, β -hidrolasa 12 (ABHD-12) hidrolizan el 2-AG ⁽³⁵⁾.

Como podemos ver, es posible imaginar el diseño de nuevos fármacos que actúan sobre estos sistemas enzimáticos para tratar un diverso grupo de patologías.

FARMACOLOGÍA DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Como se dijo anteriormente, el SCE está compuesto por tres tipos de entidades: receptores cannabinoides (CB1 and CB2), cannabinoides endógenos o endocannabinoides (anandamide and 2-AG, etc.) y las enzimas sintéticas e hidrolíticas de los endocannabinoides. Este sistema está implicado en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Por lo tanto, una amplia gama de indicaciones terapéuticas podría beneficiarse de este sistema, debido a que puede ser objetivo de nuevos fármacos diseñados como análogos o derivados de las amidas de ácidos grasos u otros compuestos endógenos de ese sistema. Estos podrían actuar como agonistas o antagonistas de los receptores de cannabinoides; inhibiendo las enzimas de degradación de los endocannabinoides y modulando los transportadores de los ligandos endógenos. En este sentido, se puede pensar acerca de varias enfermedades como condiciones potenciales para ser tratadas en el futuro apuntando al SCE⁽³⁶⁻³⁹⁾. Estas patologías incluyen enfermedad cardiovascular, cáncer, inflamación, desórdenes psiquiátricos, enfermedades sexuales, dolor, adicción a las drogas, desórdenes alimentarios, por solo nombrar algunas.

Se discutirá de manera breve la participación del SCE en algunas condiciones patológicas y farmacológicas:

Enfermedades cardiovasculares

Los cannabinoides, endocannabinoides y análogos sintéticos, ejercen efectos importantes sobre el sistema cardiovascular. Estos pueden actuar directamente sobre la vasculatura⁽⁴⁰⁾ y el miocardio⁽⁴¹⁻⁴³⁾, porque los receptores CB1 y CB2 se encuentran en el miocardio y en los tejidos vasculares, respectivamente. Sin embargo, ellos pueden actuar de manera indirecta a través del sistema nervioso central y periférico^(2,44-46). Los estudios indican que los receptores CB1

son más importantes que los receptores CB2 en la regulación cardiovascular. Además, estos últimos están implicados en eventos isquémicos del corazón, mientras que la activación de los receptores CB1 media el inotropismo negativo cardíaco⁽⁴⁷⁾ y produce vasodilatación en los tejidos vasculares. Se cree que estos dos efectos de los receptores CB1 pueden explicar la actividad hipotensora de la anandamida^(48,49) en roedores anestesiados. Esta observación permite sospechar que la anandamida puede estar involucrada en estados de hipotensión. La estimulación de los receptores CB1 presentes en las terminaciones nerviosas simpáticas inhibe la liberación de norepinefrina⁽⁵⁰⁾, lo cual contribuye a los efectos de bradicardia y, posiblemente, a efectos hipotensores de la anandamida. Por otra parte, experimentos en modelos animales han demostrado que los endocannabinoides están implicados en el control de la aterosclerosis, a través de los receptores CB2, lo que induce a pensar que los agonistas de estos receptores pueden ser útiles para el tratamiento de esta patología^(2,51,52).

Dolor e inflamación

Como Δ^9 -THC y otros cannabinoides, la anandamida es efectiva contra el dolor mecánico agudo y el dolor térmico^(53,54). Se ha postulado que la anandamida presenta una actividad analgésica interesante, debido a su acción inhibitoria sobre los receptores CB2⁽⁵⁵⁾. Williams y col., propusieron que los endocannabinoides pueden estimular la liberación de opioides endógenos, y una interacción funcional entre los sistemas de endocannabinoides y los opioides ejercen un mayor efecto analgésico⁽⁵⁶⁾. El SCE ha sido útil en el dolor crónico de origen neuropático e inflamatorio^(53,54,57). Este sistema está implicado en la actividad analgésica del ibuprofeno^(53,54) y paracetamol o acetaminofén⁽⁵⁸⁾.

Desórdenes del sistema nervioso central

Debido a que existe una alta densidad de

receptores CB1 en el cerebro, es obvio que el SCE esté involucrado de manera importante en una gran variedad de desórdenes del SNC. Esta alta población de receptores CB1 en la corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y en el ganglio basal justifica que el sistema cannabinoide endógeno está implicado en muchas enfermedades que afectan el estado del ánimo, el movimiento, trastornos de ansiedad, memoria y aprendizaje. De tal modo que el SCE juega un papel destacado en varios desórdenes del SNC, tales como:

- a. Neurotoxicidad y neurotrauma. El SCE ofrece una acción neuro-protectora significativa en la lesión neuronal aguda (lesión cerebral traumática) y en desórdenes neurodegenerativos crónicos, tales como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica ⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾.
- b. Ataque fulminante. Muchos estudios establecen que los endocannabinoides y algunos cannabinoides sintéticos protegen neuronas corticales contra la hipoxia y la privación de glucosa. Se muestra que los cannabinoides y endocannabinoides pueden ser neuroprotectores en isquemia cerebral.
- c. Esclerosis múltiple. En la antigua Grecia, Roma, China y la India se utilizaba cannabis para aliviar calambres musculares, espasmos y dolor ⁽⁶³⁾. El tetrahidrocannabinol (THC) y el dexamabinol, cannabinoide no psicotrópico, suprimen la inflamación del SNC y mejoran los resultados neurológicos; además, mejora la supervivencia en comparación con el placebo ⁽⁶⁴⁾. En un modelo de esclerosis múltiple, la administración de algunos agonistas de cannabinoides tales como $\Delta 9$ -THC, metanandamida, y otros, reducen la espasticidad y el temblor, mientras que los mismos síntomas se incrementan con antagonistas CB1 o CB2 ⁽⁶⁵⁾.
- d. Trastornos del movimiento. La eficacia de

los cannabinoides y los endocannabinoides en el control de los trastornos del movimiento se entiende, si tenemos en cuenta que los receptores CB1 están altamente expresados en los ganglios basales, principalmente en la sustancia nigra y el cerebelo, áreas involucradas en el control de movimiento ^(66,67). En los mismos lugares, los endocannabinoides se encuentran en gran concentración. En los diferentes niveles de los ganglios basales, los endocannabinoides interactúan con varios neurotransmisores ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. De acuerdo con el postulado que los endocannabinoides interactúan con diversos neurotransmisores, es evidente que muchas de las condiciones del movimiento tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Gilles de la Tourette, discinesia tardía, distonía, enfermedad de Huntington, se pueden controlar con estos compuestos.

CRONOBIOLOGÍA DE LOS ENDOCANNABINOIDES

Se sabe desde hace muchos años que todas las funciones de los organismos vivos se rigen por los ritmos biológicos. El cuerpo cuenta con reguladores circadianos, como el núcleo supraquiasmático, ubicado en el SNC, que regula la interacción entre el ambiente externo y los procesos fisiológicos. Los factores ambientales que están involucrados en la cronobiología, llamados sincronizadores, son la luz solar, el ruido, la temperatura corporal y otros. La luz solar es el más importante de ellos. Algunas flores abren sus pétalos en el día debido a la luz solar, mientras se cierran durante la noche debido a la oscuridad. La respiración es un proceso permanente que ocurre en períodos de menos de 22 h (ritmos ultradianos); el nadir de cortisol o la adrenalina, por ejemplo, se producen alrededor de las 10 pm hasta las 4 am (los ritmos circadianos), y el ciclo menstrual se produce aproximadamente cada 28 días (ritmos infradianos). Estos son solo

unos pocos ejemplos de patrones rítmicos en los organismos vivos.

Del mismo modo, los eventos patológicos a menudo aparecen en determinados momentos del día. Los ataques de asma aparecen con mayor frecuencia en la noche, debido a la elevación de los niveles de histamina y de otros mediadores producidos entre la medianoche y las 4 de la mañana. Igualmente, los ataques cardíacos pueden presentarse con mayor probabilidad en horas de la mañana, debido a que las plaquetas y otros factores de coagulación presentan niveles más altos en este período.

Hoy en día, se sabe que hay una serie de enfermedades cuyos ritmos biológicos están establecidos. Algunos médicos han ensayado tratar el cáncer de acuerdo con los ritmos biológicos celulares, y han encontrado una mejor respuesta cuando la quimioterapia se aplica al comienzo del período de reposo que en otro momento del día, porque en este espacio de tiempo se establece una mayor diferenciación entre la proliferación de las células sanas y enfermas. Esta diferenciación resulta útil por cuanto el fármaco es capaz de distinguir y atacar células de alta proliferación, más no diferencia entre células sanas y enfermas.

Se ha observado una fuerte evidencia de que el SCE ejerce sus acciones con base a los ritmos biológicos. Hillard y col., propusieron que el SCE actúa como un enlace entre los reguladores circadianos y los procesos fisiológicos que estos afectan ⁽⁷¹⁾. Otros autores han informado que existen variaciones en el contenido tisular de endocannabinoide ^(72,73), los receptores CB ⁽⁷⁴⁾ y sus enzimas ^(71,72) con respecto a los ritmos biológicos.

Los experimentos realizados en ratas Sprague-Dawley mostraron variaciones diurnas significativas en el contenido de anandamida y 2-AG en el LCR, hipocampo, hipotálamo, protuberancia, la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el núcleo accumbens ^(71,72,75). Se encontró que la concentración de anandamida

es más alta durante la fase activa de las ratas (oscuridad) que en la fase inactiva, en el núcleo accumbens, la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado. Sin embargo, en la fase inactiva, encontraron el patrón opuesto en el LCR y el hipotálamo, donde se encontró la anandamida en concentraciones más altas durante la fase inactiva que en la fase activa. Valenti y col., encontraron que la actividad de FAAH podría subyacer a los cambios en el contenido de la anandamida en el hipocampo y el cuerpo estriado ⁽⁷²⁾. Un hallazgo interesante fue que el contenido de 2-AG fue mayor cuando las concentraciones de anandamida fueron menores. Por lo tanto, las actividades tanto de MAGL y DGL son más altas durante la fase inactiva que activa ⁽⁷²⁾.

Hay evidencia de que la población de receptores CB1 varía de manera circadiana. Tanto en la protuberancia ⁽⁷⁶⁾ como en el hipocampo ⁽⁷⁴⁾ la densidad de los receptores CB1 es ligeramente mayor en la inactividad que en la fase activa. Si se considera la relación entre la concentración de anandamida y la densidad del receptor CB1 en el hipocampo, se encuentra que la población de CB1 es alta, mientras el contenido de anandamida es bajo en la fase inactiva. En seres humanos sanos, Hillard y col., demostraron que el aumento de la concentración de anandamida durante el sueño, determina su contenido en plasma a las 22:00 h del día 1 y a las 7:30 h y 17:30 h del día 2, en un estudio piloto en el cual los sujetos permanecieron en cama con luz externa desde las 22:30 h del día 1 hasta las 07:00 h del día 2. Además, las concentraciones de anandamida a las 22:00 h y a las 17:30 h fueron similares, pero las concentraciones a las 22:00 h y 07:30 h revelaron diferencias significativas. El 2-AG, sin embargo, no mostró diferencias relevantes en el experimento ⁽⁷¹⁾. Estos resultados sobre la cronobiología de la anandamida permiten concluir que este endocannabinoide tiene un ritmo circadiano claro y, por supuesto, que su acción fisiológica probablemente es más alta durante el tiempo de descanso, a pesar de que se produce sobre todo “bajo demanda”. Por otra parte,

estudios recientes han explorado la participación de SCE en el control del ciclo de sueño/vigilia, manteniéndolo y/o estimulándolo⁽⁷⁷⁾.

Como se puede observar, la cronobiología del SCE es una herramienta importante para diseñar tratamientos futuros para diversas patologías, tales como el cáncer. Consideraciones cronofarmacológicas y crono-terapéuticas en los tratamientos de las enfermedades, ayudarán a obtener mejores resultados con menores efectos secundarios.

CANNABINOIDES Y ENDOCANNABINOIDES EN CÁNCER

Como se dijo anteriormente, desde 1975 se sabe que el cannabis presenta un perfil interesante de las actividades antineoplásicas⁽³⁾ en varios tipos de células cancerosas. Estas propiedades se deben en su mayoría a Δ^9 -THC y al cannabidiol. La acción sinérgica de ambos compuestos ya mencionados ha sido estudiada principalmente en glioblastoma^(78,79). De otra manera, se ha demostrado que la señalización endocannabinoide está incrementada en algunas enfermedades malignas en humanos, en comparación con los correspondientes tejidos sanos^(80,81), y en células neoplásicas con alta invasividad^(20,82).

El SCE tiene una actividad moduladora emergente en proteínas y factores nucleares que regulan la proliferación celular, diferenciación y supervivencia⁽⁸³⁾. Por lo tanto, es posible pensar que este sistema puede estar involucrado en el control de procesos homeostáticos fundamentales y en la transformación neoplásica^(8,84). Cannabinoides y endocannabinoides naturales tanto como agonistas sintéticos CB1 y otras moléculas que presentan actividad de cannabinoides agonistas indirecta, tales como transporte de endocannabinoides y los inhibidores de la degradación de cannabinoides han demostrado limitar el crecimiento del tumor y la progresión de varios tipos de cáncer. Estos incluyen, entre

otros, tumores linfoides, tiroideos, de mama, de próstata, de piel, glioma, glioblastoma y leucemias.

A continuación, se discutirán algunos aspectos de la acción de los endocannabinoides en el cáncer: mecanismos de acción, efectos secundarios, posibles criterios de cronofarmacología y el riesgo de desarrollar cáncer por cannabinoides.

Mecanismos de acción

Los cannabinoides pueden elegir como blanco las células tumorales a través de los receptores CB que inducen la detención del crecimiento, la muerte celular y el bloqueo de migración⁽⁴⁾. También pueden actuar a través de la inhibición de la angiogénesis o la interferencia con el sistema inmune. La inhibición de la proliferación de varios tipos de células tumorales posiblemente ocurre a través de rutas como adenil ciclasa y cAMP/proteína quinasa A⁽⁸³⁾, bloqueo del ciclo celular con la inducción del inhibidor de quinasa p27kip^(83,85), disminución de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), la disminución de la expresión de la actividad tirosina quinasa de EGF-R^(86,87), disminución en la actividad o expresión del factor de crecimiento nervioso (FCN), disminución en la prolactina o receptores de factor de crecimiento endotelial vascular tirosina quinasa⁽⁸³⁾.

La anandamida inhibe la proliferación de células de cáncer de mama a través de la baja regulación de los receptores de la prolactina, inhibiendo genes BRCA 1 y la alta afinidad del receptor de neurotrofinas trk^(83,88,89). El efecto anti-proliferativo fue proporcional al grado de dependencia hormonal. Este mecanismo se basa en la inhibición de fosfo-quinasa A (PKA)⁽⁸³⁾. Se demostró que una concentración micromolar de anandamida inhibe la proliferación de células de cáncer de próstata⁽⁸⁷⁾, a través de la detención en la fase G1 del ciclo celular. Lo mismo ocurre con las células LNCaP estimuladas con andrógenos. Se ha observado que estas inhibiciones también

se producen por los niveles sub-regulados de EGF-R, mediado por los receptores CB1⁽⁸⁷⁾.

Nithipatikom y col., demostraron que el cáncer de próstata PC3, DU145 y células LNCaP producen 2-AG en altas concentraciones, y que el RHC-80267, un inhibidor de la lipasa diacilglicerol, disminuyó significativamente la producción de 2-AG en estas líneas celulares. Por otro lado, cuando se aplicó este inhibidor de la lipasa, la invasión de PC3, DU145 y células LNCaP aumentó⁽⁹⁰⁾. Otros estudios han mostrado que los agonistas de cannabinoides pueden producir disminución en la proliferación de las células LNCaP, la expresión del receptor de andrógenos, la expresión de VEGF-R y los niveles secretados de PSA, marcador aceptado de la progresión del cáncer de próstata⁽⁹¹⁾. Como los científicos han demostrado, los cannabinoides y los endocannabinoides pueden interferir con la regulación del ciclo celular, atacando varios puntos del mismo. Pueden actuar en la fase S del ciclo, como consecuencia de la regulación de p21 WAF, una formación reducida del complejo activo ciclina E/Cdk2 quinasa y la pérdida específica de la actividad de Cdk2⁽⁹²⁾. La activación de Chk1 y Cdc25A, así como la inhibición de la fosforilación en Thr 14/Tyr15, conducen a la detención de la fase S. Los cannabinoides también inhiben la proliferación celular de células de cáncer de mama mediante el bloqueo de la fase G2/M a través de la baja regulación de Cdc2. Otros tipos de células pueden ser bloqueados en la fase G0/G1 del ciclo celular, por la activación de ERK1/2, la inducción de P27/KIP1 y la inhibición de la ciclina D.

En resumen, la eficacia de los cannabinoides y los endocannabinoides en el control de la progresión del cáncer toma ventaja de su acción sobre la expresión de la ciclina D1, ciclina D2, ciclina E, CDK2, CDK4 y CDK6, Chk1 y Cdc25A. Por otro lado, los cannabinoides y los endocannabinoides ejercen su efecto pro apoptótico a través de diferentes mecanismos de acción: aumento de la síntesis de ceramida^(83,93),

los genes relacionados con el estrés expresados en el retículo endoplasmático, la activación prolongada de Raf1, la inhibición de Akt; inhibición de RAS-MAPK/ERK y PI3K-AKT⁽⁹⁴⁾; también puede dar lugar al efecto pro apoptótico p38MAPK vía de señalización, la baja regulación de Raf1/MAPK y translocación BAD a las mitocondrias^(83,95). Estos y otros son objetivos para controlar el avance del cáncer. Pero su activación/desactivación está mediada principalmente por los receptores CB1; sin embargo, a veces el efecto está mediado por receptores CB2 o TRPV1; FAAH, la COX-2, EGF-R.

Otro aspecto importante de la acción antitumoral de cannabinoides y endocannabinoides es su selectividad. Se ha demostrado que tanto los compuestos de la planta Δ^9 -THC y cannabidiol, y los endocannabinoides anandamida y 2-AG, deberían afectar selectivamente a las células tumorales, mientras que podrían inclusive proteger las células sanas equivalentes⁽⁹⁶⁾. Por ejemplo, los cannabinoides inducen la apoptosis de las células de glioma y se adaptan a su regresión. Sin embargo, los cannabinoides protegen a las células gliales normales de astrogliosis⁽⁹⁷⁾ y oligodendrogliosis^(98,99). La apoptosis de las células de glioma está mediada por la generación de ceramida⁽⁹³⁾. Esta acción protectora de los cannabinoides está influenciada por los receptores CB1 y PI3K-AKT⁽⁹⁶⁾. Los cannabinoides atenúan, sin embargo, la apoptosis inducida por ceramida de los astrocitos normales⁽⁹⁷⁾, lo que puede interpretarse como la capacidad de los cannabinoides para distinguir entre las células normales y enfermas.

A pesar de que se ha discutido brevemente solo algunos mecanismos a través de los cuales los cannabinoides y los endocannabinoides pueden producir sus efectos antineoplásicos, se puede confirmar que hay una gran cantidad de mecanismos de acción para controlar la progresión del cáncer.

Efectos secundarios

La reacción adversa más conocida de los cannabinoides son los efectos psicotrópicos. Estos son evidentes como los efectos depresores y estimulantes, y pueden ser expresados como reacciones afectivas (euforia), sensoriales (desorientación espacial y temporal), somáticas (somnolencia, mareos y descoordinación motora) y cognitivas (confusión, dificultades en la concentración). Los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides a veces se pronuncian en los consumidores asiduos, pero no son necesariamente evidentes en un entorno clínico controlado. Cuando dronabinol y nabilona se administran a los pacientes con cáncer como antieméticos, por lo general son inofensivos. La tolerancia desarrollada por los cannabinoides utilizados terapéuticamente no se ha justificado.

El perfil adictivo de los cannabinoides es muy pobre. Un síndrome de abstinencia que consiste en irritabilidad, insomnio, inquietud y una sensación repentina de calor temporal, se ha observado solo ocasionalmente en los usuarios crónicos. Del mismo modo, cuando los cannabinoides se han utilizado de una manera crónica en modelos animales, no aparecen signos de abstinencia, incluso en dosis altas ⁽¹⁰⁰⁾. Las personas que reciben el dronabinol a largo plazo no han mostrado signos de dependencia ^(101,102). La explicación de la baja potencia adictiva de $\Delta 9$ -THC podría ser que los cannabinoides se almacenan en el tejido adiposo y se excretan a una tasa baja ⁽¹⁰²⁾, lo cual mantiene los niveles de la droga durante un largo período. Sin embargo, los efectos secundarios de los cannabinoides no solo están en el SNC; debido a la distribución ubicua de los receptores de cannabinoides en el cuerpo, puede ser capaz de afectar casi todas las funciones. Por lo tanto, los cannabinoides pueden desarrollar taquicardia, broncodilatación, relajación muscular y disminución de la motilidad ^(102,103).

El Ministerio de Sanidad español aprobó un ensayo clínico de fase I/II el cual tuvo como objetivo investigar el efecto de la administración local de $\Delta 9$ -THC como agente único, en el crecimiento del glioblastoma multiforme recurrente. Este estudio se desarrolló sin ningún tipo de fármaco antineoplásico tradicional. El perfil de seguridad razonable de $\Delta 9$ -THC, junto con el gran potencial de este compuesto contra el cáncer, permitirá mejorar los ensayos futuros para emplear los cannabinoides en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer ⁽¹⁰⁴⁾.

A partir de estas consideraciones, podemos establecer algunas conclusiones: en primer lugar, los endocannabinoides han demostrado los mismos efectos de los cannabinoides de la planta, y muestran un perfil de seguridad razonable; por lo anterior, el SCE es un objetivo importante para el tratamiento de cáncer en un futuro próximo; en segundo lugar, los cannabinoides y los endocannabinoides presentan una acción más segura que los fármacos antineoplásicos tradicionales utilizados en la actualidad; tercero, aunque el problema más importante de los cannabinoides es su potencial psicoactivo, este es muy bajo y no conduce a dependencia.

Posibles criterios de crono-farmacología de los cannabinoides y de los endocannabinoides

Como ya se mencionó anteriormente, los endocannabinoides son producidos de acuerdo con los ritmos biológicos; la anandamida se produce sobre todo en la fase de reposo y 2-AG en la fase de actividad. Debido a que los cannabinoides y los endocannabinoides presentan una acción selectiva contra las células tumorales, podrían ser administrados en cualquier hora del día. Actualmente, sin embargo, se necesitan estudios para determinar la mejor hora del día para practicar el tratamiento antineoplásico. Sería importante, por ejemplo, estudiar si un tipo específico de cáncer altera la formación de los receptores cannabinoides, debido a que

la condición patológica puede modificar el comportamiento del organismo.

Los cannabinoides y los endocannabinoides como potenciales inductores de cáncer

Se han considerado los efectos antiproliferativos de los cannabinoides y los endocannabinoides a través de diferentes mecanismos. Sin embargo, algunos autores han informado que los cannabinoides pueden presentar efectos pro-proliferativos en diferentes líneas celulares de cáncer a dosis submicromolares ⁽¹⁰⁴⁾. Se llega a la acción antiproliferativa y proapoptótica de estos compuestos en el rango micromolar. Se ha informado que las dosis submicromolares de anandamida y ácido araquidónico libre, potenciaron el crecimiento de células hematopoyéticas y linfoides a través de la activación de MAPK independiente del receptor CB ⁽¹⁰⁴⁾. La acción inmunosupresora de los agonistas cannabinoides a través de la activación de los receptores CB2 en el sistema inmune tiene un riesgo cada vez mayor de crecimiento del tumor, debido a una disminución de la respuesta inmune antitumoral natural ⁽⁸³⁾.

Por lo tanto, los tumores cuyas células expresan bajos niveles de receptores CB2 son más propensos a la inmunosupresión y al crecimiento tumoral. Podemos concluir: el cáncer es una importante causa de muerte, investigadores en el mundo han encontrado que los cannabinoides o derivados o análogos de los endocannabinoides, poseen un potencial para el tratamiento del cáncer en un futuro, porque presentan una alta especificidad de acción sobre las células cancerosas. Sin embargo, el principal problema de los cannabinoides y los endocannabinoides es su potencial psicoactivo y su capacidad para activar algunas formas de cáncer; en cuanto a esta última consideración se ha establecido que puede ocurrir a dosis submicromolares.

Es importante estudiar más a fondo la sincronización entre la cronobiología de endo-

cannabinoides y los ritmos biológicos de la patología, para obtener un mejor esquema del tratamiento.

REFERENCIAS

1. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372(6507):686-691.
2. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):389-462.
3. Munson AE, Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA. Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Nat Cancer Inst*. 1975;55(3):597-602.
4. Flygare J, Sander B. The endocannabinoid system in cancer. Potential therapeutic target. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(3):176-189.
5. Burstein S, Salmonssen R. Acylamido analogs of endocannabinoids selectively inhibit cancer cell proliferation. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(22):9644-9651.
6. Mayorga F, Cardenas R. Endocannabinoides: Una opción terapéutica para el tratamiento del cáncer. *Vitae (Medellin)*. 2009;16(2):259-267.
7. Vaughn LK1, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN, Hillard CJ. Endocannabinoid signalling: Has it got rhythm? *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):530-543.
8. Bifulco M, Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: A call for further research. *Nat Med*. 2002;8(6):547-550.
9. Stravroskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65(1):95-106.
10. Von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2- negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(4):299-309.
11. Haus E. Chronobiology in oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;73(1):3-5.
12. Sukumaran S, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. Circadian rhythms in gene expression. Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(9-10):904-917.
13. Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure

- of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 1971;93(1):217-224.
14. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of cannabinoid receptor as functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-564.
 15. Munro S1, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor of Cannabinoids. *Nature.* 1993;365 (6441):61-65.
 16. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992;258 (5090):1946-1949.
 17. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to the cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(1):83-90.
 18. Ueda N, Wang J. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipids Mediat.* 2009;89(3-4):112-119.
 19. Di Marzo V, De Petrocellis L. Plant, synthetic and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med.* 2006;57:553-574.
 20. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):771-784.
 21. Pertwee R. *Cannabinoid Receptors.* Academic Press (Neuroscience Perspectives), London; 1995.
 22. Costanzi MI, Battaglia M, Populin R, Cestari V, Castellano C. Anandamide and memory in CD1 mice: Effects on immobilization stress and prior experience. *Neurobiol Learn Mem.* 2003;79(3):204-211.
 23. Howlett AC. Cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis.* 1998;5(6 Pt B):405-416.
 24. Saghatelian A, Trauger SA, Want EJ, Hawkins EG, Siuzdak G, Cravatt BF. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry.* 2004; 43(45):14332-14339.
 25. Taylor AH, Amoako AA, Bambang K, Karasu T, Gebeh A, Lam PM, et al. Endocannabinoids and pregnancy. *Clin Chim Acta.* 2010;411(13-14):921-930.
 26. Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, et al. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: Implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(4):1062-1067.
 27. McAllister SD, Glass M. CB(1) and CB(2) receptor-mediated signaling: A focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(2-3):161-171.
 28. Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: Evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience.* 2003;119(2):481-496.
 29. Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* 2003;163(3):463-468.
 30. Fernández-Ruiz J1, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.* 2000;23(1):14-20.
 31. Williams EJ, Walsh FS, Doherty P. The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol.* 2003;160(4):481-486.
 32. Wilson RI1, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* 2002;296(5568):678-682.
 33. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 2003;83(3):1017-1066.
 34. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(16):10819-10824.
 35. Di Marzo V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological Res.* 2009;60(2):77-84.
 36. Felder CC, Dickason-Chesterfield AK, Moore SA. Cannabinoids biology: The search for new therapeutic targets. *Mol Interv.* 2006;6(3):149-161.
 37. Labar G, Michaux C. Fatty acid amide hydrolase: From characterization to therapeutics. *Chem Biodivers.* 2007;4(8):1882-1902.
 38. Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: Novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):624-632.
 39. Farrell E, Merkleer D. Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of fatty acid amides. *Drug Discov Today.* 2008;13(13-14):558-568.

40. Wagner JA, Abesser M, Karcher J, Laser M, Kunos G. Coronary vasodilator effects of endogenous cannabinoids in vasopressin-precontracted un paced rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(3):348-355.
41. Bonz A, Laser M, Küllmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, et al. Cannabinoids acting on CB1 receptors decreases contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41(4):657-664.
42. Maslov LN, Lasukova OV, Krylatov AV, Uzhachenko RV, Pertwee R. Selective cannabinoid receptor agonist HU-210 decreases pump function of isolated perfused heart: Role of cAMP and cGMP. *Bull Exp Biol Med.* 2004;138(6):550-553.
43. Sterin-Borda L, Del Zar CF, Borda E. Differential CB1 and CB2 cannabinoid receptor-inotropic response of rat isolated atria: Endogenous signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(12):1705-1713.
44. Niederhoffer N, Szabo B. Cannabinoids cause central sympathy excitation and bradycardia in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(2):707-713.
45. Pfitzer T, Niederhoffer N, Szabo B. Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 2004;142:943-952.
46. Niederhoffer N, Schmid K, Szabo B. The peripheral sympathetic nervous system is the major target of cannabinoids in eliciting cardiovascular depression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003;367(5):434-443.
47. Wagner JA, Abesser M, Karcher J, Laser M, Kunos G. Coronary vasodilator effects of endogenous cannabinoids in vasopressin-precontracted un paced rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(3):348-355.
48. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. *Neuropharmacology.* 2005;48(8):1130-1138.
49. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;(168):599-625.
50. Wagner JA, Járkai Z, Bátkai 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.
51. Roth MD. Pharmacology: Marijuana and your heart. *Nature.* 2005;434(7034):708-709.
52. Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, et al. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature.* 2005;434(7034):782-786.
53. Guindon J, Beaulieu P. Anti-hyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 2006;50(7):814-823.
54. Guindon J, De Lean A, Beaulieu P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain.* 2006;121(1-2):85-93.
55. Ibrahim MM, Rude ML, Stagg NJ, Mata HP, Lai J, Vanderah TW, et al. CB(2) cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain.* 2006;122(1-2):36-42.
56. Williams IJ, Edwards S, Rubo A, Haller VL, Stevens DL, Welch SP. Time course of the enhancement and restoration of the analgesic efficacy of codeine and morphine by delta (9)-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol.* 2006;539(1-2):57-63.
57. Guindon J, Honman A. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009;8(6):403-421.
58. Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol.* 2006;531(1-3):280-281.
59. Glass M. The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001;25(4):743-765.
60. Drysdale AJ, Platt B. Cannabinoids: Mechanisms and therapeutic applications in the CNS. *Curr Med Chem.* 2003;10(24):2719-2732.
61. 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.
62. Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2000;278(3):157-160.
63. Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids.* 2000;108(1-2):1-13.
64. Achiron A, Miron S, Lavie V, Margalit R, Biegon A. Dexanabinol (HU-211) effect on experimental

- autoimmune encephalomyelitis: Implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000;102(1):26-31.
65. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, et al. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature.* 2000;404(6773):84-87.
 66. Moldrich G, Wenger T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain: An immunohistochemical study. *Peptides.* 2000;21(11):1735-1742.
 67. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):161-202.
 68. Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in the movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2000;14(10):1432-1438.
 69. Gonzalez S, Scorticati C, García-Arencibia M, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz J. Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2006;1073-1074:209-219.
 70. De Lago E, de Miguel R, Lastres-Becker I, Ramos JA, Fernández-Ruiz J. Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: In vivo and in vitro evidence. *Brain Res.* 2004;1007(1-2):152-159.
 71. Vaughn LK1, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN, Hillard CJ. Endocannabinoid signalling: Has it got rhythm? *Br J Pharmacol.* 2010;160(3):530-543.
 72. Valenti M, Vigano D, Casico MG, Rubino T, Steardo L, Parolaro D, et al. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(7-8):945-950.
 73. Murillo-Rodríguez E, Desarnaud F, Prospero-García O. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci.* 2006;79(1):30-37.
 74. Rueda-Orozco PE, Soria-Gomez E, Montes-Rodríguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospero-García O. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2008;198(4):565-576.
 75. Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, González-Rivera R, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospero-García O, et al. Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience.* 2003;117(1):197-201.
 76. Murillo-Rodríguez E, Millán-Aldaco D, Di Marzo V, Drucker-Colín R. The anandamide membrane transporter inhibitor, VDM-11 modulates sleep and c-Fos expression in the rat brain. *Neuroscience.* 2008;157(1):1-11.
 77. Guzmán M, Duarte MJ, Blázquez C, Ravina J, Rosa MC, Galve-Roperh I, et al. A pilot clinical study of Delta9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer.* 2006;95(2):197-203.
 78. Marcu JP1, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Horowitz MP, Lee J, et al. Cannabidiol enhances the inhibitory effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(1):180-189.
 79. Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, et al. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology.* 2003;125(3):677-687.
 80. Schmid PC, Wold LE, Krebsbach RJ, Berdyshev EV, Schmid HH. Anandamide and other N-acyl ethanolamines in human tumors. *Lipids.* 2002;37(9):907-912.
 81. Sánchez C, De Ceballos ML, Gómez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, et al. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB2 cannabinoid receptor. *Cancer Res.* 2001;61(15):5784-5789.
 82. Pisanti S, Bifulco M. Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacol Res.* 2009;60(2):107-116.
 83. Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazerro P. Cannabinoids and cancer: Pros and cons of antitumor strategy. *Br J Pharmacol.* 2006;148(2):123-135.
 84. Portella G, Laezza C, Laccetti P, De Petrocellis M, Di Marzo V, Bifulco M. Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: Actions of signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J.* 2003;17(12):1771-1773.
 85. Casanova ML, Blázquez C, Martínez-Palacio J, Villanueva C, Fernández-Acenero MJ, Huffman JW, et al. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest.* 2003;111(1):43-50.

86. Mimeault M, Pommery N, Watzet N, Bailly C, Hénichart JP. Antiproliferation and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: Implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production. *Prostate*. 2003;56(1):1-12.
87. Melck D, Rueda D, Galve-Roperth I, De Petrocellis L, Guzmán M, Di Marzo V. Involvement of the cAMP/protein kinase. A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett*. 1999;463(3):235-240.
88. Melck D, De Petrocellis L, Orlando P, Bisogno T, Bifulco M, Laezza C, et al. Suppression of nerve growth factor trk receptor and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology*. 2000;141(1):118-126.
89. Nithipatikom K1, Endsley MP, Isbell MA, Falck JR, Iwamoto Y, Hillard CJ, et al. 2-Arachidonoylglycerol: A novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer invasion. *Cancer Res*. 2004;64(24):8826-8830.
90. Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res*. 2005;65(5):1635-1641.
91. Laezza C, Pisanti S, Crescenzi E, Bifulco M. Anandamide inhibits Cdk2 and activates Chk1 leading to cell cycle arrest in human breast cancer cells. *FEBS Lett*. 2006;580(26): 6076-6082.
92. Gómez del Pulgar T, Velasco G, Sánchez C, Haro A, Guzmán M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J*. 2002;363(Pt 1):183-188.
93. Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Bonarska L. Cannabinoids down regulate PI3K/Akt and Erk signaling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal*. 2005;17(1):25-37.
94. Jia W, Hedge VL, Singh NP, Sisco D, Grant S, Nagarkatti M, et al. Delta9-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in Jukart leukemia T cells is regulated by translocation of Bad to mitochondria. *Mol Cancer Res*. 2006;4(8):549-562.
95. Guzmán M. Cannabinoids: Potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):745-755.
96. Gomez Del Pulgar T, De Ceballos ML, Guzman 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.
97. Molina-Holgado E1, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, et al. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci*. 2002;22(22):9742-9753.
98. Galve-Roperth I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M. Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Med*. 2000;6(3):313-319.
99. Maldonado R, Rodriguez de Fonseca F. Cannabinoid addiction: Behavioral models and neural correlates. *J Neurosci*. 2002;22(9):3326-3331.
100. Calhoun SR, Galloway GP, Smith DE. Abuse potential of dronabinol (Marinol). *J Psychoactive Drugs*. 1998;30(2):187-196.
101. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet*. 2003;42(4):327-360.
102. Adams IB, Martin BR. Cannabis: Pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. 1996;91(11):1585-1614.
103. Hart S, Fischer OM, Ullrich A. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor converting enzyme (TACE/ADAM17) mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*. 2004;64(6):1943-1950.
104. Derocq JM, Bouaboula M, Marchand J, Rinaldi-Carmona M, Ségui M, Casellas P. The endogenous cannabinoid anandamide is a lipid messenger activating cell growth via cannabinoid receptor-independent pathway in hematopoietic cell lines. *FEBS Lett*. 1998; 425(3):419-425.