

## TRABAJO DE FIN DE GRADO DE FARMACIA

Facultad de Farmacia  
Universidad del País Vasco (UPV/EHU)  
Curso académico 2015-2016

Título:

# EFICACIA DE LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE CEREBRAL EN LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN HUMANA

Presentado por:

**NATALIA CORDERO**

**Vitoria-Gasteiz, junio de 2016**



## ÍNDICE:

Resumen.....	1
1. Introducción: Transcendencia social y sanitaria de los trastornos de ansiedad y depresión.....	1
2. Objetivos y caso a desarrollar .....	2
3. Desarrollo.....	3
3.1. Sistema endocannabinoide cerebral .....	3
3.2. Alteraciones en el sistema endocannabinoide cerebral en modelos animales de estrés y depresión y en pacientes con diagnóstico de depresión .....	5
3.2.1. Endocannabinoides y emociones: Perspectiva neuroanatómica.....	5
3.2.1.1. Poblaciones neuronales que median los efectos de los endocannabinoides en estrés y emociones.....	7
3.2.2. El ratón “knock-out” del receptor cannabinoide CB1 como modelo animal de depresión .....	8
3.2.3. Evidencias genéticas y bioquímicas de los efectos de la señal endocannabinoide en los trastornos psiquiátricos en el ser humano .....	10
3.3. Estado actual del desarrollo de fármacos inhibidores selectivos de los enzimas metabolizadores de endocannabinoides .....	10
3.3.1. La Anandamida y la FAAH.....	12
3.3.2. El 2-Araquidonilglicerol y la MAGL.....	15
3.4. Ensayos clínicos realizados hasta la fecha con fármacos inhibidores selectivos de la FAAH .....	16
3.4.1. El caso BIA 10-2474.....	18
4. Conclusiones.....	21
5. Bibliografía .....	22
Anexo 1. Estructuras representativas de los inhibidores selectivos de la FAAH y MAGL discutidos en la memoria.....	25

## **Resumen:**

Se presenta una memoria basada en una revisión exhaustiva a partir de la búsqueda en bancos de datos internacionales, especialmente PubMed, de las publicaciones biomédicas que hacen referencia a los ensayos clínicos en fase I y fase II que se han realizado hasta la fecha para evaluar la eficacia y seguridad en el ser humano de los inhibidores farmacológicos de los enzimas implicados en el metabolismo de los principales endocannabinoides cerebrales, especialmente de la enzima hidroxilasa de la amida de ácidos grasos FAAH que se encarga de la degradación de anandamida, y con especial atención al ensayo clínico suspendido al inicio de este año 2016 debido a la muerte de uno de los participantes. Para ello, en primer lugar se han revisado los estudios realizados en modelos animales que justifican el papel del sistema endocannabinoide cerebral como fuente de nuevas dianas farmacológicas para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de trastornos mentales con una elevada prevalencia en nuestra sociedad, como la ansiedad y la depresión humana. En segundo lugar, se han analizado los ensayos clínicos en fase I y en fase II realizados con inhibidores de la FAAH, con especial atención a las características del diseño del ensayo clínico en fase I realizado con la molécula BIA 10-2474 responsable de la muerte de uno de los participantes. En tercer lugar, se han analizado las posibles causas a partir de las conclusiones publicadas recientemente por el Comité Temporal de Expertos creado por la Agencia Francesa del Medicamento.

## **1. Introducción: Transcendencia social y sanitaria de los trastornos de depresión y ansiedad**

La depresión constituye un problema mayor de salud pública, estando asociada a gran discapacidad funcional y elevada mortalidad. Es un trastorno altamente prevalente en todo el mundo (en EEUU y Europa el 18% de la población lo padece), lo que parece ir en aumento. El trastorno depresivo presenta el doble de prevalencia en mujeres que en hombres<sup>1</sup>. De la misma manera, los trastornos ansiosos, caracterizados por excesiva ansiedad, preocupación y dificultad para controlarlas aparecen cada vez más habitualmente en nuestra sociedad, con una prevalencia en Europa del 4.3 al 5.9%. Al igual que la depresión, es el doble de prevalente en mujeres que en hombres. Además, cabe destacar que en la mayoría de casos de ansiedad generalizada, existe una co-morbilidad con trastornos de depresión mayor<sup>2</sup>.

## 2. Objetivos y Caso a desarrollar

El conocimiento actual sobre el sistema endocannabinoide cerebral y su papel fisiológico en la regulación del estado de ánimo así como de sus alteraciones en trastornos mentales que presentan una alta prevalencia en nuestra sociedad, está centrando los esfuerzos de la industria farmacéutica y de los grupos de investigación presentes en la universidad en el desarrollo de fármacos que interactúen de forma selectiva especialmente con aquellos elementos del sistema endocannabinoide que impactan sobre los niveles cerebrales de los endocannabinoides más relevantes en el cerebro de mamíferos, la anandamida y el 2-araquidonilglicerol. Entre las dianas que han suscitado mayor interés farmacológico, se sitúan los enzimas implicados en la degradación de la anandamida, como la hidrolasa de la amida de ácidos grasos (FAAH, acrónimo de la denominación inglesa “fatty-acid amido hydrolase”). Por ello se ha realizado una memoria basada en una revisión exhaustiva de las publicaciones biomédicas dedicadas al estudio del sistema endocannabinoide cerebral en la regulación del estado emocional especialmente en modelos animales de estrés y depresión humana, y de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha con fármacos inhibidores de la FAAH, incluyendo un análisis del ensayo clínico fallido con resultado de muerte para un voluntario participante a inicios de este año 2016 tras la administración de BIA 10-2474, con los siguientes objetivos:

- 1) La descripción del sistema endocannabinoide cerebral así como las posibilidades de actuación farmacológica sobre los distintos elementos que lo constituyen.
- 2) La descripción de los estudios realizados en modelos animales de estrés y depresión humana que validan el papel fisiopatológico del sistema endocannabinoide cerebral en los trastornos afectivos del ser humano.
- 3) La descripción de las alteraciones del sistema endocannabinoide en el ser humano con diagnóstico de trastornos depresivos
- 4) El desarrollo de inhibidores farmacológicos de enzimas metabolizadores de endocannabinoides y su eficacia y seguridad en modelos animales
- 5) Revisión y análisis de los resultados obtenidos en ensayos clínicos realizados en humanos con fármacos inhibidores de la degradación de anandamida: Estudios de seguridad en fase I y de eficacia en fase II.
- 6) Analizar el ensayo clínico realizado con la molécula BIA 10-2474 y las posibles causas del fallecimiento de uno de los participantes a partir de las conclusiones publicadas por el Comité de Expertos creado por la Agencia Francesa del Medicamento.

### 3. Desarrollo

#### 3.1. Sistema endocannabinoide cerebral

A pesar de que el ser humano lleva haciendo uso de la marihuana (*Cannabis sativa*) desde hace al menos 12000 años, la existencia de un sistema cannabinoide endógeno, o lo que es lo mismo, un sistema endocannabinoide, ha sido recientemente descrita, al observarse sitios de unión cerebrales para el principal componente activo del *Cannabis sativa*, el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC)<sup>3</sup>.

Los elementos constitutivos de este recién descubierto sistema endocannabinoide han ido en aumento desde que en 1988, Howett caracterizó bioquímicamente el receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1), y en 1990 el laboratorio liderado por Matsuda determinó su código genético<sup>4</sup>, de modo que hoy en día se conocen diferentes receptores, ligandos endógenos y enzimas de síntesis y degradación. El descubrimiento del receptor cannabinoide CB1 fue seguido de cerca por el descubrimiento de un segundo receptor cannabinoide en células inmunes periféricas, el CB2. Por otro lado, los principales ligandos endógenos son la N-araquidonil etanolamina (anandamida, AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG), aunque otros como el 2-araquidonil-gliceril-éter (éter de noladina), O-araquidonil-etanolamina (virodhamina) y N-araquidonil-dopamina (NADA) también han sido descritos. Estos endocannabinoides, a diferencia de otros neurotransmisores, son liberados desde la región post-sináptica a la hendidura sináptica, desde donde se unen de manera retrógrada a los receptores CB1 localizados en la región pre-sináptica. La activación de este receptor desencadena el principal efecto del sistema endocannabinoide: la acción inhibitoria sobre la liberación de neurotransmisores y hormonas. La señal endocannabinoide está limitada por el proceso de recaptación de neurotransmisores (todavía pobremente descrito) y por la hidrólisis intracelular que la hidrolasa de la amida de ácidos grasos (FAAH) ejerce sobre AEA, y que la monoacil glicerol lipasa (MAGL) y la  $\alpha,\beta$ -hidrolasa dominio 6 (ABHD6) ejercen sobre 2-AG<sup>5</sup>.

Los endocannabinoides median principalmente su acción inhibitoria a través del receptor CB1, que está acoplado a proteínas  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_o$ , y que al activarse inhibe la adenil ciclasa (lo que impide la conversión de ATP en AMPc), activa canales de  $K^+$ , inhibe canales de  $Ca^{2+}$ , y activa unas quinasas denominadas MAPK. Por otro lado, los CB2 únicamente se encuentran acoplados a proteínas  $G\alpha_i$ , para así inhibir la enzima adenil ciclasa y activar a las MAPK. Además del CB1 y el CB2, numerosos estudios sugieren que el sistema endocannabinoide puede tener receptores adicionales<sup>3</sup>.

Los efectos farmacológicos del sistema endocannabinoide son similares a los inducidos por el *Cannabis*. Concentraciones bajas-moderadas inducen respuestas comportamentales

que combinan efectos estimulantes y depresores, mientras que a dosis altas son siempre depresores. Los más observados en animales de experimentación son el efecto antinociceptivo, la hipotermia y la hipolocomoción. Por otro lado, la memoria se ve afectada y la acción sobre la ansiedad es bifásica: ansiolítico a dosis bajas y ansiogénico a dosis altas. En definitiva, el sistema endocannabinoide es una red de señalización que modula numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el dolor, comportamiento, funciones cognitivas, apetito, metabolismo, control motor, formación de memoria e inflamación<sup>6</sup>.

Los CB1 están amplia pero heterogéneamente distribuidos a lo largo del sistema nervioso central (SNC), con una alta presencia en el giro cingulado, corteza frontal, amígdala, hipocampo, cerebelo, ganglios basales, prosencéfalo, núcleo accumbens, sustancia gris e hipotálamo. En mesencéfalo, puente troncoencefálico, médula, corteza motora primaria y tálamo se pueden observar menores densidades<sup>3,7</sup>. A nivel celular del SNC, los CB1 se encuentran en axones y en terminales presinápticos. También aparecen expresados en neuronas periféricas. Además, poblaciones celulares cerebrales no neuronales expresan receptores CB1, apareciendo por ejemplo en células gliales como astrocitos y oligodendrocitos. Por último, los receptores CB1 están expresados en células del sistema inmune, adipocitos, islotes pancreáticos, células musculares esqueléticas y células de la glándula adrenal.

Nos centraremos en la relevante presencia de los elementos del sistema endocannabinoide en zonas cerebrales clave en el control de las emociones, estrés y ansiedad. Este hecho revela una probable modulación de estas estructuras cerebrales por parte del sistema endocannabinoide, y en consecuencia, una modulación del comportamiento emocional e implicación en trastornos afectivos. Dicho de otro modo, en esta revisión, se destaca la participación del sistema endocannabinoide en la regulación del comportamiento emocional y el estado de ánimo por medio de la activación de los receptores CB1, debido a su abundante expresión en estructuras cerebrales implicadas en la regulación emocional y en el control del estrés, como son el hipotálamo, la amígdala, el sistema límbico, la habénula, corteza e hipocampo. También es de gran importancia su papel en la regulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (eje HPA), lo cual indica su papel en la modulación de la respuesta endocrina al estrés<sup>8</sup>.

### **3.2. Alteraciones en el sistema endocannabinoide cerebral en modelos animales de estrés y depresión y en pacientes con diagnóstico de depresión**

En los últimos años, se han realizado exhaustivas investigaciones acerca de la implicación del sistema endocannabinoide en la regulación del estrés y comportamiento emocional. Concretamente, entre 2002 y 2005, salieron a la luz cuatro importantes conceptos que conformarían las bases de toda una línea de investigación:

- 1) La señal endocannabinoide regula la ansiedad y las emociones, y deficiencias en este sistema alteran la respuesta emocional ante un estímulo ambiental aversivo.
- 2) El estrés y los glucocorticoides (respuesta hormonal al mismo) son capaces de movilizar endocannabinoides, y por otro lado, los endocannabinoides median ciertos efectos de los glucocorticoides.
- 3) La señal endocannabinoide inhibe la activación mediada por estrés del eje HPA y regula la respuesta neuroendocrina al estrés.
- 4) Mientras que el sistema endocannabinoide es muy activo en respuesta al estrés agudo, el estrés crónico frena su señal<sup>4</sup>.

Tomando como punto de partida estos importantes descubrimientos, expondremos la relación entre el sistema endocannabinoide y el comportamiento emocional. Para ello, se ha prestado especial atención a cuatro revisiones presentes en la revista especializada *Neuroscience*. En primer lugar, se detallarán los circuitos anatómicos mediante los cuales los endocannabinoides regulan el comportamiento emocional. En segundo lugar, se describirán las poblaciones neuronales a través de las cuales los endocannabinoides modulan específicamente el estrés y el comportamiento emocional. A continuación, se argumentará cómo la ausencia de señalización endocannabinoide conforma un excelente modelo animal de depresión. Y por último, se estudiarán las evidencias genéticas y bioquímicas que establecen una relación entre el sistema endocannabinoide y los trastornos psiquiátricos humanos.

#### **3.2.1. Endocannabinoides y emociones: Perspectiva neuroanatómica**

La disfunción de la señalización endocannabinoide en las estructuras anatómicas claves en el circuito neuronal que controla el comportamiento emocional podría contribuir al desarrollo de trastornos afectivos. Este circuito neuronal es altamente complejo, y comprende zonas límbicas subcorticales (amígdala, hipocampo, estriado ventral y tálamo) y zonas corticales (corteza anterior cingulada, regiones medial y orbital de la corteza prefrontal). El descrito circuito corticolímbico interacciona con el hipotálamo y tronco encefálico para regular la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), encargado

de la respuesta hormonal al estrés. La amígdala, hipocampo y corteza prefrontal (PFC) son las estructuras cerebrales más perjudicadas en los sujetos con trastornos del estado de ánimo, por lo que nuestro interés se centrará en ellas. La amígdala es una estructura límbica directamente relacionada con la génesis del miedo y ansiedad, y promueve la activación del eje HPA, mientras que la PFC y el hipocampo actúan conjuntamente en la inhibición del eje HPA y colaboran en la vuelta a la homeostasis tras un episodio de estrés. Desde el punto de vista neuroanatómico, existe una extensa presencia de receptores CB1 en estas tres zonas corticolímbicas, apareciendo en densidades desde moderadas a altas. A este nivel, los receptores CB1 están presentes en las proyecciones neuronales excitatorias glutamatérgicas y en las neuronas GABAérgicas encargadas de liberar el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-amino-butírico), lo cual coloca a los CB1 en una privilegiada posición para modular el nivel o tono de actividad neuronal. Según datos recopilados en numerosos estudios, se especula que una disfunción en la señalización endocannabinoide en estos tres puntos clave del sistema nervioso central, conlleva al desarrollo trastornos afectivos.

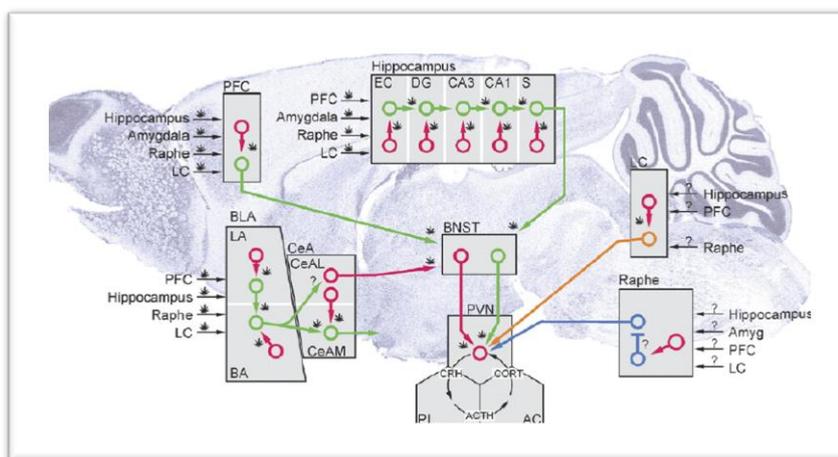
En primer lugar, centrándonos en la corteza prefrontal, debemos destacar su importante papel en los trastornos del estado de ánimo: todos ellos cursan con una disminución en la actividad de la PFC o "hipofrontalidad", y estudios *post-mortem* y de imagen en sujetos deprimidos han evidenciado una reducción de su volumen y alteración de su metabolismo. La estimulación cerebral profunda de la PFC en roedores (cuya PFC es estructural y funcionalmente homóloga a la humana) ha demostrado tener efecto antidepresivo y ansiolítico. Además, se ha evidenciado la existencia de comunicación cruzada entre la PFC y la señalización serotoninérgica a nivel mesencefálico. Por consiguiente, si se facilita la señalización del CB1 en éste área, se generan respuestas ansiolíticas y antidepresivas mediadas por 5-HT. Dada la presencia de receptores CB1 en neuronas GABAérgicas de la PFC y la desinhibición que ejercen sobre ellas, una señalización endocannabinoide defectuosa a este nivel podría contribuir a la hipofrontalidad presente en los sujetos con trastornos afectivos: según esta hipótesis, un aumento de la señal endocannabinoide vía CB1 provocaría una inhibición de la liberación del neurotransmisor inhibitorio (GABA), viéndose así libre de freno la actividad de la PFC, y ejerciéndose el deseado efecto ansiolítico y antidepresivo. Por último, se ha demostrado que la señalización endocannabinoide en la amígdala basolateral juega un papel clave a la hora de regular la adquisición y el procesamiento de la memoria aversiva vía interacciones con la PFC.

Al igual que en la PFC, investigaciones recientes indican que un aumento de la señalización endocannabinoide a nivel del hipocampo provoca efectos ansiolíticos y antidepresivos. Estos efectos, sin embargo, quedan limitados únicamente al hipocampo

ventral y a situaciones en las que los animales de experimentación han sido previamente expuestos a situaciones de estrés. Asimismo, el estrés crónico produce una *downregulation* o regulación a la baja de los CB1 hipocampales, impidiendo la comentada inhibición de la liberación de GABA, y consiguientemente el tono desinhibidor, lo que finalmente termina en una hiperactividad del eje HPA y en una vulnerabilidad a la aparición de trastornos afectivos<sup>9</sup>.

### 3.2.1.1. Poblaciones neuronales que median los efectos de los endocannabinoides en estrés y emociones

A continuación, se presta especial atención a las conexiones neuronales existentes entre la PFC, hipocampo y amígdala, y a las presentes entre estas estructuras y el eje HPA. Analizaremos las poblaciones neuronales que median los efectos de los endocannabinoides en estrés y emociones.



**Figura 1:** Distribución del receptor CB1 en las distintas regiones cerebrales implicadas en los circuitos cerebrales de estrés. La distribución del receptor CB1 se representa como una hoja de *Cannabis sativa*. Abreviaciones: AC, córtex adrenal; ACTH, corticotropina; BSNT, núcleo del lecho de la estria terminal; BA, núcleo basolateral de BLA; BLA, amígdala basolateral; CA, cornu ammonis; CeA, amígdala central; CeAL, parte lateral de CeA; CeAM, parte medial de CeA; CORT, corticoesterona; CRH, hormona liberadora de corticotropina; DG, giro dentado; EC, cortex entorrinal; LA, núcleo lateral de BLA; LC, locus coeruleus; PFC, córtex prefrontal; PI, glándula pituitaria; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; S, subículo.

Es necesario remarcar la importancia del eje HPA en el estrés, dado que es principal circuito implicado en la respuesta hormonal al mismo. La exposición a un estímulo estresante provoca la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), desde donde alcanza la glándula pituitaria, que a continuación libera la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La ACTH estimula la síntesis

y liberación de cortisol en la corteza renal, desde donde alcanza el torrente sanguíneo y produce la respuesta fisiológica al estrés.

Como ya se ha mencionado, este sistema se regula por ciertas estructuras límbicas y corticales, que interaccionan con el PVN hipotalámico. Como se observa en la figura 1, el receptor CB1 (indicado como una hoja de *Cannabis sativa*), se encuentra presente a lo largo de todo el circuito. CB1 se encuentra principalmente distribuido en interneuronas GABAérgicas y en menor medida en terminales glutamatérgicos de la PFC, amígdala e hipocampo. Además, los CB1 también aparecen en terminales serotoninérgicos y noradrenérgicos. No obstante, la presencia del sistema endocannabinoide en estas tres zonas del sistema límbico no se reduce únicamente al receptor CB1: la enzima FAAH se expresa en alta densidad en neuronas glutamatérgicas (mientras que se encuentra ausente en interneuronas GABAérgicas), MAGL se expresa en ambas poblaciones neuronales, y por último, el receptor CB2 aparece en neuronas glutamatérgicas de hipocampo y PFC. Además, los elementos del sistema endocannabinoide aparecen dentro del propio eje HPA<sup>5</sup>.

Por lo tanto, se concluye que el sistema endocannabinoide tiene un papel crítico en la organización neuronal de los circuitos del estrés, pues CB1 está situado a lo largo de todo el mismo. Para proseguir con el estudio de la señal endocannabinoide, son necesarias herramientas farmacológicas y genéticas como las que se describen en el siguiente punto.

### **3.2.2. El ratón knock-out del receptor cannabinoide CB1 como modelo animal de depresión**

Considerando la importancia de la activación del receptor CB1 en el control del estrés y el estado de ánimo, se proponen ratones *knock-out* para CB1 (que carecen de receptor CB1) como modelo animal de depresión. Estos animales modificados genéticamente, se comportan con normalidad en situaciones basales, pero se alteran cuando se someten a situaciones adversas. Esto se deduce gracias a los datos recogidos de pruebas de comportamiento y a la medida de distintos biomarcadores asociados a los trastornos depresivos: alteraciones en el eje HPA y en la plasticidad neuronal, en factores neurotróficos, en el sistema serotoninérgico, y en factores inflamatorios. Se parte de la base de que es extremadamente difícil generar un modelo animal capaz de reflejar los síntomas depresivos en humanos. En el caso de los ratones CB1 KO, las semejanzas entre el fenotipo alterado de estos animales y los síntomas clínicos del trastorno depresivo, se expresan en la siguiente tabla:

FENOTIPO ALTERADO EN RATÓN CB1 KO	CLÍNICA DEPRESIVA
<b>COMPORTAMIENTO</b>	
Incremento de respuestas ansiosas	Incremento de ansiedad
Mayor sensibilidad para desarrollar síntomas depresivos	Incapacidad de conllevar el estrés
Alteraciones cognitivas (déficit de memoria y aprendizaje e imposibilidad de extinguir memorias aversivas)	Disfunción cognitiva e imposibilidad de extinción de experiencias adversas
Disminución del efecto de recompensa natural	Anhedonia, co-morbilidad entre depresión mayor y trastorno de abuso de sustancias
Alteración de las respuestas de refuerzo ante el abuso de sustancias	
<b>NEUROENDOCRINO</b>	
Cambios en los niveles basales de corticosterona	Cortisol circulante elevado e hiperactividad del eje HPA
<b>NEUROVEGETATIVO</b>	
Disminución de actividad locomotora	Baja energía y retardo psicomotor
<b>NEUROQUÍMICO</b>	
Déficit en factor neurotrófico BDNF	Plasticidad neuronal alterada
Bajo aumento de 5-HT en PFC tras la administración de ISRS	Déficit del sistema serotoninérgico asociado a comportamiento depresivo y suicida
Descenso de sitios de unión para 5-HTT	Descenso de la expresión de 5-HTT
Desensibilización funcional de receptores 5HT1A en los núcleos del rafe dorsal	Reducción de la expresión del receptor 5HT1A en núcleos del rafe y prosencéfalo
Atenuación de la hipotermia producida por agonistas de receptores 5-HT1A	Reducción de la hipotermia con agonistas de receptores 5-HT1A
Reducción de la expresión de receptores 5-HT2C en áreas cerebrales discretas	Alteraciones en la neurotransmisión 5-HT implicando receptores 5-HT postsinápticos

**Tabla 1. Similitudes entre el fenotipo alterado del ratón knock-out para CB1 y la clínica depresiva. Adaptada de cita nº 8.**

Los resultados obtenidos con estos ratones CB1 KO, demuestran que la ausencia del receptor CB1 altera la actividad del eje HPA y la plasticidad neuronal, lo cual podría contribuir en la génesis de trastornos emocionales. Al analizar el comportamiento de los ratones CB1 KO, los datos obtenidos revelan la aparición de respuestas ansiosas en varios test (campo abierto, caja oscura...), así como incapacidad para extinguir memorias aversivas. Por otro lado, se observa que estos animales de experimentación presentan niveles elevados de glucocorticoides, lo que incapacita la liberación del factor neurotrófico BDNF a nivel hipocampal. El BDNF es un factor neurotrófico conocido por fomentar la supervivencia y la plasticidad neuronal, y que modifica directamente la actividad del eje HPA a nivel hipotalámico. La exposición al estrés reduce la expresión de BDNF, mientras que los tratamientos antidepresivos la aumentan. Además, algunos sujetos con depresión presentan niveles reducidos de este factor neurotrófico. En concordancia con todos estos datos, los ratones CB1 KO presentan una incapacidad de liberación de BDNF en el hipocampo y, además, la administración local de BDNF en el hipocampo revierte el comportamiento desesperado que los ratones presentaban durante el test de suspensión de cola.

Asimismo, teniendo en cuenta la estrecha relación que existe entre la transmisión serotoninérgica y los trastornos de estado de ánimo como la depresión, se ha observado que el sistema endocannabinoide, a través de los receptores CB1, es capaz de regular la

transmisión serotoninérgica, y que el bloqueo de estos receptores influye negativamente sobre la misma. Se cree que las alteraciones en la liberación de glucocorticoides y el déficit de factores neurotróficos conllevan a alteraciones en la transmisión serotoninérgica, y finalmente al fenotipo depresivo observado en los ratones CB1 KO. En definitiva, a la vista de los datos recogidos, los ratones knock-out para el receptor CB1 conforman un prometedor modelo animal para el estudio de la depresión humana<sup>8</sup>.

### **3.2.3. Evidencias genéticas y bioquímicas de los efectos de la señal endocannabinoide en los trastornos psiquiátricos en el ser humano**

Muchos estudios realizados hasta la fecha han tenido como objetivo explorar los polimorfismos genéticos en dos importantes proteínas en el sistema de señalización endocannabinoide, el receptor cannabinoide CB1, y la (FAAH), en diversas situaciones fisiológicas y patológicas. Se especula que esta heterogeneidad podría influir en los síntomas, etiología o tratamiento de varias enfermedades mentales, como son así el trastorno depresivo y la ansiedad. Efectivamente, los datos obtenidos en estas investigaciones revelan que los polimorfismos en el receptor CB1 y en la FAAH generan diferencias en la personalidad, que en combinación con factores ambientales, tienen un gran impacto en la probabilidad de desarrollo de un trastorno mental.

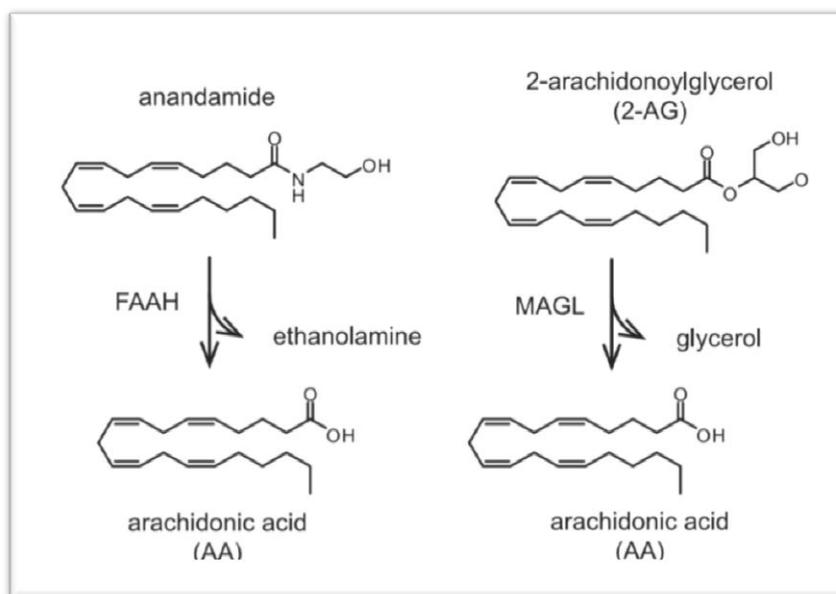
Numerosas investigaciones también han centrado su atención en medir la concentración de los elementos del sistema endocannabinoide en el torrente sanguíneo, en concreto, las concentraciones de AEA y 2-AG en plasma y suero. Se ha observado que las concentraciones sanguíneas de endocannabinoides experimentan cambios ante varias condiciones, y por tanto, resultaría interesante conocer más acerca de la relación entre estos niveles y trastornos mentales. Los datos recogidos indican la utilidad de los endocannabinoides circulantes como biomarcadores de vulnerabilidad a secuelas inducidas por estrés. Sin embargo, existen ciertos inconvenientes, y es que se parte de la hipótesis de que los niveles de endocannabinoides en sangre y en sistema nervioso central están en equilibrio, pero también hay que tener en cuenta que otros tejidos (como el sistema inmune) también donan endocannabinoides a la circulación<sup>7</sup>.

### **3.3. Estado actual del desarrollo de fármacos inhibidores selectivos de los enzimas metabolizadores de endocannabinoides**

El agonismo directo de los receptores CB1 produce diversos efectos psicotrópicos que incluyen síntomas psicóticos como pánico y reacciones paranoides. De este modo, pese a que existe evidencia de que la activación del sistema endocannabinoide por medio de THC u otros cannabinoides sintéticos ejerce mejora terapéutica en situaciones de dolor,

trastornos de sueño, apetito y náusea, los efectos psicoactivos de los agonistas CB1 limitan su uso. En modelos animales se ha observado que, en función de la dosificación y el ambiente, los cannabinoides pueden producir tanto efectos ansiogénicos como ansiolíticos. Para potenciar exclusivamente las respuestas ansiolíticas, el aumento de los niveles de endocannabinoides mediante la inhibición de su metabolismo se presenta como una prometedora alternativa terapéutica. Así pues, la ampliación de las acciones de anandamida y 2-AG gracias a la inhibición de su degradación enzimática, supone una potencial estrategia para el tratamiento de enfermedades que cursan con una reducción de las mismas, como ansiedad y depresión.

La inactivación de estos neurotransmisores tiene lugar gracias a procesos de hidrólisis y oxigenación enzimática, y la inhibición farmacológica de estas enzimas aumenta la señal endocannabinoide en roedores, y por lo tanto supone una prometedora alternativa para aprovechar el potencial terapéutico del sistema endocannabinoide. La anandamida se degrada principalmente por la hidrolasa de la amida de ácidos grasos (FAAH) y el 2-AG por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), ambas enzimas son serina hidrolasas y generan ácido araquidónico como producto (Figura 2). La inhibición farmacológica de estas enzimas ha revelado reducir el dolor, la inflamación, la ansiedad y la depresión en modelos roedores, sin los efectos adversos que aparecen con los agonistas directos de receptores CB1.



**Figura 2. La hidrólisis de endocannabinoides en sistema nervioso central de mamíferos. La anandamida y el 2-araquidonilglicerol son degradados específicamente por la FAAH y la MAGL, respectivamente.**

Hay que añadir que los endocannabinoides también se eliminan por enzimas oxidativas, como por ejemplo, la ciclooxigenasa 2, COX-2<sup>10</sup>.

A continuación, nos centraremos en los inhibidores selectivos de FAAH y MAGL que se han utilizado *in vivo* durante los últimos años para estudiar la transmisión endocannabinoide. Una de las técnicas más utilizadas para el descubrimiento y caracterización de inhibidores de FAAH y MAGL es la ABPP (competitive activity-based protein profiling).

### 3.3.1. La Anandamida y la FAAH

La anandamida o AEA es el endocannabinoide más exhaustivamente analizado. Es miembro de la familia de etanolamidas de ácidos grasos (FAE), un conjunto de neurotransmisores lipídicos que también incluye a la palmitoiletanolamida (PEA), relacionada con el dolor e inflamación, y a la oleoiletanolamida (OEA), que controla la alimentación y el peso corporal en mamíferos<sup>11</sup>. El creciente interés en los inhibidores de la degradación de los FAEs, en concreto de AEA, aparece tras haberse observado un notable descenso de este endocannabinoide en numerosas patologías. La inactivación farmacológica (fármacos inhibidores de FAAH) o genética (ratón FAAH<sup>-/-</sup>) de FAAH lleva a un aumento endógeno de AEA y a la aparición de fenotipos analgésicos, ansiolíticos, antidepressivos, y antiinflamatorios. La estructura catalítica de FAAH consta de dos residuos de serina (Ser217 y Ser241) y de un residuo de lisina (Lys142). FAAH cataliza la reacción de hidrólisis que transforma la anandamida en ácido araquidónico y etanolamina.

El primer compuesto creado con actividad inhibidora de FAAH fue el PMSF, un inhibidor no selectivo de la actividad serina hidrolasa. Después, aparecieron otros demasiado reactivos como para la investigación *in vivo*, entre ellos AM374. En la búsqueda de moléculas menos reactivas, aparecieron los inhibidores selectivos y reversibles OL-92 y OL-135, de la clase de los  $\alpha$ -cetoheterociclos, que resultaron ser potentes *in vitro*, pero solo activos a dosis altas y durante poco tiempo *in vivo*. Con los carbamatos, se consiguieron niveles de AEA en roedores sostenidos en el tiempo, destacando URB524 y URB597. URB597 es un potente inhibidor irreversible de FAAH que se ha convertido en un modelo de referencia para el estudio y que permitió grandes avances en la investigación de nuevas moléculas. Asimismo, URB597 ha demostrado ejercer efecto ansiolítico en varios modelos animales. Dentro de este grupo también se descubrió el BMS-1, que demostró tener actividad antinociceptiva en roedores. Estos avances llevaron al hallazgo de los inhibidores de tipo piperidina/piperazina urea, que también demostraron capacidad de producir una inhibición prolongada de la FAAH *in vivo*, apareciendo PF-750, cuya optimización dio lugar a PF-3854, un inhibidor potente y altamente selectivo con potencial analgésico. Finalmente, PF-3854 se optimizó para obtener a PF-04457845, del que se hablará más adelante.

Tras los alentadores datos obtenidos con los inhibidores de la FAAH pertenecientes a las clases de los carbamatos y piperidina/piperazina urea, la industria farmacéutica y los grupos de investigación de universidades de todo el mundo continúan investigando el desarrollo de nuevas moléculas. A continuación, se presentan los avances más recientes. Las moléculas más relevantes desde el punto de vista clínico aparecen recogidas en el Anexo1.

**α-cetoheterociclos:** Partiendo del compuesto OL-135, se halló el enantiómero (S) de su derivado tetrahidronaftaleno, cuya administración en ratas causó un aumento cerebral de AEA, PEA y OEA durante horas, de manera similar a la administración de URB597. Además, este compuesto demostró tener efecto analgésico *in vivo*.

**Carbamatos:** Como se ha mencionado anteriormente, el carbamato URB597 (ver Anexo 1) descubierto entre la Universidad de California, la de Urbino y la de Parma, se ha convertido en un compuesto de referencia en el estudio farmacológico de los inhibidores de FAAH, aunque cuenta con dos desventajas: inhibe carboxilesterasas plasmáticas y hepáticas y posee corta vida media *in vivo*. Esto llevó al desarrollo de una segunda generación de carbamatos: URB694, con menor actividad hacia las carboxilesterasas y mayor vida media, y URB937, con actividad periférica pero incapaz de acceder al SNC.

Por otro lado, el Instituto Italiano de Tecnología, la Universidad de California y la de Bolonia, aprovechando la similitud estructural entre ciertos carbamatos y los ácidos 2 arilpropiónicos del grupo terapéutico de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), diseñaron compuestos con capacidad de inhibir a FAAH, COX-1 y COX-2 simultáneamente. Destaca entre estas moléculas ARN2508, carbamato que incorpora la estructura del flurbiprofeno, con capacidad antiinflamatoria y protectora tisular en un modelo animal de inflamación intestinal.

Recientemente, la farmacéutica Sigma-Tau desarrolló la molécula ST-4070, perteneciente al grupo de los enol carbamatos, que demostró actividad en modelos roedores de dolor neuropático. También desarrolló los compuestos ST-4020 y ST-4068, inhibidores reversibles de FAAH.

Sanofi-Aventis también investiga exhaustivamente los inhibidores de la FAAH, desarrollando varios compuestos que han sido descritos como potentes inhibidores de la FAAH en ratones, y que presentan actividad analgésica. Destaca SSR411298, que ha completado ensayos clínicos de fase II, y de quien se hablará posteriormente.

**Aril ureas:** Estos compuestos han sido principalmente investigados por Pfizer, y entre ellos se encuentra el PF-04457845 (ver Anexo 1), el primer inhibidor de la FAAH que alcanzó un ensayo clínico de fase II. Pfizer ha continuado su búsqueda a partir de este compuesto,

hasta obtener PF-04862853, un eficaz inhibidor oral para el tratamiento del dolor, con resultados prometedores en modelos animales.

Vernalis también analiza compuestos derivados de la urea, con el hallazgo de un primer compuesto denominado V156084, que poseía baja potencia en estudios *in vitro*. De este modo, las líneas de investigación optan por la búsqueda de fenotipos alternativos, destacando V158866, del que se hablará más adelante.

Janssen Pharmaceutica desarrolló JNJ-42119779, y después la piperazin urea JNJ-42165279 (ver Anexo 1), que ha sido llevada a ensayos clínicos.

Por último, la portuguesa Bial-Portela también ha investigado el uso de los derivados de la urea como inhibidores de la enzima FAAH, hasta llegar a la molécula BIA 10-2474 (ver Anexo 1), a la que se prestará especial atención a continuación.

**Ácidos borónicos:** Infinity Pharmaceuticals fue la primera en patentar un ácido borónico capaz de actuar como inhibidor FAAH, seguida de la Universidad de Kuopio, que desarrolló una serie de ácidos aril borónicos capaces de inhibir FAAH mediante un complejo covalente y reversible.

**Derivados azólicos:** Merk diseñó el compuesto azólico MK-3168, que presenta buena captación cerebral y se acumula en la corteza frontal, estriado e hipocampo (zonas cerebrales ricas en FAAH) en estudios realizados con PET (tomografía de emisión de positrones) en monos rhesus. Merk presenta a este compuesto como candidato para conocer la distribución cerebral de la FAAH mediante PET, así como para ser utilizado en clínica. Más recientemente, esta farmacéutica ha descrito un oxazol, MK-4409 (ver Anexo 1), como posible candidato clínico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. MK-4409 es un potente inhibidor reversible de la FAAH, capaz de crear enlaces covalentes con sus sitios catalíticos, y que ha resultado efectivo en modelos animales de inflamación y dolor neuropático.

**Etilaminopiridinas:** Dentro de las etilaminopiridinas, destaca el compuesto JNJ-40413269, creado por Janssen Pharmaceutica, que inhibe con gran potencia la FAAH humana y que ha demostrado tener excelentes propiedades farmacocinéticas y ser eficaz en modelos animales de dolor neuropático.

**Tetrahidronaftilpiridinas:** Renovis consiguió el compuesto RN-450, inhibidor competitivo y reversible de la FAAH humana y de ratón<sup>12</sup>.

En resumen, el hallazgo de fármacos inhibidores de la FAAH con gran selectividad y potencia ha posibilitado conocer mucho más acerca del funcionamiento y de las posibilidades terapéuticas de esta enzima. La inactivación de FAAH produce aumentos significativos de AEA, PEA y OEA en el SNC sin los efectos adversos asociados al agonismo directo de CB1<sup>11</sup>. Sin embargo, existen muchos aspectos que todavía deben mejorarse antes de conseguir superar los ensayos clínicos. Hasta ahora, inhibidores de la FAAH con resultados prometedores en fases preclínicas han fallado en los estudios de fase I y II. De este modo, parece necesario optimizar ciertos puntos:

- Lo primero es conseguir una mayor selectividad sobre FAAH frente a otras dianas.
- También se especula que la técnica de ABPP puede no ser suficientemente sensible, de modo que otras hidrolasas diana de los inhibidores de FAAH podrían no ser detectadas por este método.
- Por último, las diferencias existentes entre la FAAH humana y la de ratón (con la que se realizan la mayoría de los estudios) no deben pasar desapercibidas cuando el objetivo de estas investigaciones es crear fármacos para tratar enfermedades del ser humano<sup>13</sup>.

### 3.3.2. El 2-araquidonilglicerol y la MAGL

2-AG se sintetiza por la diacilglicerol lipasa  $\alpha$  y  $\beta$  (DAGL $\alpha$  y  $\beta$ ) y se elimina por la monoacilglicerol lipasa (MAGL). MAGL cataliza la reacción que transforma 2-AG en ácido araquidónico y glicerol<sup>14</sup>. Los inhibidores de MAGL han sido utilizados para conocer el papel de esta enzima en la señal de 2-AG, así como para investigar la posibilidad de bloquear MAGL para el tratamiento de trastornos de sistema nervioso como la ansiedad<sup>10</sup>.

La primera generación de inhibidores de MAGL incluye a los compuestos semi-selectivos URB602, N-araquidonil maleimida (NAM), y OMDM169, que aumentaban modestamente las concentraciones de 2-AG y resultaron eficaces en modelos animales de dolor. El primer inhibidor selectivo de MAGL fue el carbamato JZL184 (ver Anexo1), pero que utilizado a dosis altas presentaba reactividad cruzada parcial con FAAH.

La siguiente generación de inhibidores de MAGL, con selectividad optimizada respecto a JZL184, incluye carbamatos como los NHS, dentro de los cuales destaca el compuesto MNJ110 por ser altamente selectivo, potente y activo *in vivo*. También se han desarrollado otros carbamatos como KML29 y su análogo JW651, que inhiben selectivamente a MAGL *in vitro* e *in vivo*. Más adelante, se ha desarrollado JW912.

Centrándonos en los efectos beneficiosos de los inhibidores de MAGL en trastornos afectivos, destaca el efecto de JZL184 en el estado de ánimo. JZL184 previene el comportamiento ansioso tras la exposición a estrés crónico y previene la depresión de la transmisión GABAérgica, lo que indica que la inhibición de MAGL impide la adaptación

psicológica y sináptica al estrés crónico. Esto posiciona a los inhibidores de MAGL como una prometedora generación futura de fármacos ansiolíticos. El próximo paso será probar las propiedades toxicológicas y farmacocinéticas, así como su eficacia en modelos preclínicos<sup>10</sup>.

### **3.4. Ensayos clínicos realizados hasta la fecha con fármacos inhibidores selectivos de la FAAH**

Tras conocer las patentes existentes, lo siguiente es revisar los ensayos clínicos de seguridad de fase I y los de eficacia de fase II realizados con las mismas. Mientras que, por ahora, de los inhibidores de la MAGL no existen datos, muchas compañías farmacéuticas han llevado moléculas inhibitoras de la FAAH a ensayos clínicos. Merk a MK-4409, Pfizer a PF-04457845, Janssen Pharmaceutica a JNJ-42165279, Sanofi a SSR411298, Vernalis a V158866 y por último Bial Portela a BIA 10-2474. Por otro lado, grupos de investigación también llevan a cabo estudios con URB597. Hasta la actualidad, ninguna de estas moléculas ha salido al mercado, habitualmente por falta de eficacia. En general, estos ensayos cursan sin que suceda ningún incidente grave a sus participantes, sin embargo, como se explicará próximamente, un ensayo clínico en fase I con un inhibidor de la FAAH ha tenido fatídicas consecuencias recientemente.

Un ensayo clínico de fase I representa la primera administración del fármaco en humanos, con el fin de detectar posibles signos incipientes de toxicidad, lo que permitiría determinar luego el rango seguro de dosificación. Los aspectos farmacocinéticos se suelen medir también, aunque su estudio no es el objetivo principal de esta fase. Si la comprobación preliminar de seguridad en la fase I ha sido satisfactoria, se pasa a la fase II, que consiste en la administración del fármaco a individuos que presentan la enfermedad para la que se ha concebido su empleo. La finalidad de la fase II es la de establecer la relación eficacia terapéutica/toxicidad (rango terapéutico o margen de seguridad) y definir la dosis óptima<sup>15</sup>. A continuación, se recogen los ensayos clínicos más importantes realizados con inhibidores de la FAAH hasta la fecha.

#### **1. MK-4409**

Hasta la actualidad, Merk no ha hecho públicos los ensayos clínicos llevados a cabo con esta molécula.

#### **2. PF-04457845**

PF-04457845, creada por Pfizer, es la primera molécula inhibitora de la FAAH que ha alcanzado un ensayo clínico en fase II. Previamente, se llevó a cabo un ensayo clínico de fase I en sujetos sanos con el objetivo de evaluar su perfil de seguridad, su tolerancia, su

farmacocinética y su farmacodinamia. Fue un estudio controlado por placebo, aleatorizado, paralelo y de doble ciego<sup>16</sup>. Al completarse éste con resultados satisfactorios, se continuó investigando con esta molécula en estudios de fase II. Sin embargo, los resultados no son tan positivos como se esperaba: se realizó un estudio para determinar si PF-04457845 era capaz de inactivar la FAAH en pacientes con osteoartritis de rodilla, y como consecuencia reducir su sintomatología dolorosa. Fue un estudio controlado por placebo en el que se comparó el potencial analgésico de dos fármacos (PF-04457845 y naproxeno), aleatorizado, cruzado y de doble ciego<sup>17</sup>. En este estudio, pacientes diagnosticados de osteoartritis de rodilla durante el último año con confirmación por rayos X, recibieron uno de los principios activos, o recibieron placebo. PF-04457845 debía producir una reducción en el dolor de más de 1.8 unidades según la escala WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*), con una certeza igual o mayor del 80%. Se observó que PF-04457845 inhibía casi completamente a FAAH, aumentando notablemente los niveles de AEA, OEA y PEA, y además el fármaco fue bien tolerado. Sin embargo, PF-04457845 no solo fue incapaz de alcanzar la puntuación requerida según la escala WOMAC, si no que un alto porcentaje de los pacientes que lo recibieron tuvieron que hacer uso de medicación de rescate para tolerar el dolor. Por lo tanto, de acuerdo con los criterios previamente establecidos, se decidió que PF-04457845, al contrario que el naproxeno, es incapaz de demostrar actividad analgésica alguna<sup>11</sup>. Además, se han realizado otros ensayos clínicos de fase II con PF-04457845. Uno de ellos pretendía probar su seguridad, tolerancia y viabilidad en el tratamiento de adultos con síndrome de Tourette, y fue suspendido<sup>18</sup>. También fue cancelado otro ensayo que medía la eficacia y seguridad de PF-04457845 en el tratamiento de la abstinencia al cannabis<sup>19</sup>. Y por último, actualmente otro estudio con PF-04457845 está en curso, con el objetivo de establecer una relación entre el estímulo de los receptores cannabinoideos y la respuesta de miedo en el ser humano<sup>20</sup>.

### **3. JNJ-42165279**

Janssen Pharmaceutica también ha llevado a cabo varios ensayos clínicos con su molécula JNJ-42165279. En primer lugar, realizó estudios de fase I para estudiar la seguridad, tolerancia, farmacocinética y farmacodinamia del compuesto en voluntarios sanos, así como para evaluar su potencial eficacia en el tratamiento de trastornos de ansiedad<sup>21-25</sup>. Tras completarse éstos, se procedió a evaluar JNJ-42165279 en dos ensayos clínicos de fase II, uno de ellos para determinar su seguridad y eficacia en pacientes con depresión mayor asociada a ansiedad, y otro en pacientes con trastorno de ansiedad social. Sin embargo, ambos han sido suspendidos sin que la industria farmacéutica haya hecho públicos los resultados<sup>26,27</sup>.

#### **4. SSR411298**

Por otro lado, Sanofi ha completado dos estudios de fase II con SSR411298. En uno se evaluó su eficacia en el tratamiento de la depresión mayor en población joven, y en otro su uso como tratamiento adyuvante en dolor oncológico<sup>28,29</sup>. Sanofi guarda la patente y no ha revelado la estructura química ni los resultados de los estudios con SSR411298.

#### **5. V158866**

La farmacéutica Vernalis llevó a cabo un estudio de fase I con objetivo de comprobar la seguridad de V158866 al administrarse a voluntarios sanos en dosis únicas y múltiples<sup>30</sup>. Tras completarlo, procedió a realizar uno de fase II para comprobar la seguridad y eficacia de este compuesto en el tratamiento del dolor secundario a una lesión de la médula espinal<sup>31</sup>. Vernalis no ha revelado la estructura química de V158866 ni los resultados de los ensayos con la misma.

#### **6. URB597**

Además de lo ya mencionado a cerca de URB597, actualmente se está llevando a cabo con él un ensayo clínico en fase I, cuyo objetivo es evaluar varios compuestos que modifican la regulación de los niveles de glucosa en el sistema nervioso central, y así investigar su potencial uso para el tratamiento de la esquizofrenia. Los compuestos analizados son URB597, insulina intranasal y cannabidiol<sup>32</sup>.

### **3.4.1. El caso BIA 10-2474**

Es de especial interés centrarse en la molécula BIA 10-2474, debido a la severidad de los efectos adversos que ha ocasionado al ser testada en ensayos clínicos de fase I. No existen muchos detalles sobre este estudio. La información expuesta en esta revisión ha sido recopilada del protocolo del ensayo clínico (obtenido por la revista francesa *Le Figaro*) y de un informe publicado recientemente por el Comité Temporal de Expertos (TSSC- *Temporary Specialist Scientific Committee*) creado especialmente por la Agencia Francesa del Medicamento (ANSM – *Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé*) para la ocasión. Según expresa su protocolo, BIA 10-2474 es un inhibidor experimental de la FAAH desarrollado por la farmacéutica portuguesa Bial-Portela & Ca. SA. con el objetivo de aliviar el dolor, tratar los trastornos del estado de ánimo y ansiedad, y mejorar los problemas motores asociados a enfermedades neurodegenerativas<sup>33</sup>. Sin embargo, BIA 10-2474 ha sido asociada a efectos adversos severos, afectando a 5 pacientes en un ensayo clínico de fase I llevado a cabo por la empresa BIOTRIAL en Rennes, Francia, y provocando un fallecimiento por muerte cerebral en enero del 2016. El

principal objetivo del ensayo clínico en Fase I realizado era determinar la seguridad y tolerancia del BIA 10-2474 tras dosis orales únicas y repetidas, así como investigar el efecto de la ingesta de alimentos en su farmacocinética y farmacodinamia. Los datos preclínicos revelaron que BIA 10-2474 inhibe la actividad de la FAAH en cerebro e hígado de ratón de modo dosis y tiempo-dependiente<sup>6</sup>.

Este estudio de fase I, monocéntrico y *first in human* (FIH) planeaba incluir 128 voluntarios sanos, pertenecientes a ambos sexos y con edades oscilando entre los 18 y 55 años. Fue un estudio controlado por placebo, aleatorizado y de doble ciego, en el que se ideó administrar cápsulas duras por vía oral a los participantes, tanto de BIA 10-2474 como de placebo y durante un máximo de 13 semanas. Constaba de cuatro partes: un estudio con dosis oral única ascendente (SAD), un estudio de dosis orales múltiples ascendentes (MAD), un estudio de interacción con alimentos y un estudio farmacocinético, que no llegó a completarse. La parte SAD contaba con 64 individuos en total, divididos en 8 cohortes de 8 voluntarios cada uno, mientras que la parte MAD constaba de 48 individuos, divididos en 6 cohortes de 8 voluntarios cada uno. Las dosis ensayadas en la parte SAD iban desde los 0.25 hasta los 100 mg, y las ensayadas en la parte MAD desde los 2.5 hasta los 100 mg<sup>33</sup>.

La fiscalía francesa y el IGAS (*Inspection Générale des Affaires Sociales*), que continúan investigando el suceso, declaraban el 4 de febrero de 2016, que el protocolo del ensayo clínico se encontraba en concordancia con la legislación pertinente y con las recomendaciones existentes, así como previamente aprobado por la ANSM<sup>34</sup>.

A día 25 de abril de 2016, el TSSC ha presentado un informe analizando las posibles causas del accidente en Rennes. Este informe comienza analizando a la molécula BIA 10-2474. Teóricamente, su estructura química, siendo muy similar a la de inhibidores de la FAAH previamente desarrollados, no parece estar asociada a la toxicidad ocurrida. Sin embargo, existe una diferencia entre BIA 10-2474 y el resto de inhibidores, y es la baja especificidad por FAAH que presenta la primera en comparación a los segundos (véanse PF-04457845 o JNJ-42165279). Asimismo, existen nueve metabolitos de BIA 10-2474, aunque ninguno parece estar ligado a efectos tóxicos. Por otro lado, analizando la farmacocinética de la sustancia, ésta parece tornarse no-lineal al ser utilizada en dosis elevadas.

Por otro lado, el TSSC estudia detenidamente los datos toxicológicos en animales. Lo primero que llama la atención es que se utilizaron cuatro especies animales (además de una especie adicional, conejos, para estudiar los efectos potenciales de BIA 10-2474 sobre la fertilidad y la reproducción), un número mayor de lo habitual. Bial achaca esto a un retraso en el comienzo del desarrollo clínico y el TSSC no ha sido capaz de encontrar nada que delate que este largo y costoso programa toxicológico fuera realizado porque existían dudas

acerca de la buena tolerancia de la molécula. Sin embargo, llama la atención que en el programa toxicológico no se definió ningún órgano diana. En ratas, ratones y primates se observó daño cerebral a dosis altas. También destaca la toxicidad pulmonar en perros, que Bial atribuye a la inhalación bronquial de BIA 10-2474, hipótesis que parece poco plausible para la mayoría de expertos de TSSC. Además, un primate murió en durante un tratamiento de 9 días con BIA 10-2474, lo cual Bial omite del dossier toxicológico. A pesar de todo, el TSSC concluye que, en general, los estudios toxicológicos realizados por Bial son de buena calidad, y que las muertes animales sucedidas no son significativas como para contraindicar el uso de la molécula en humanos.

El TSSC también analiza el diseño de este estudio de fase I. Lo que destaca en primer lugar, es que el rango de edad elegido para los voluntarios es demasiado amplio, incluyendo individuos muy jóvenes en comparación a otros ensayos en fase I. Además, algunos de los sujetos presentaban riesgo potencial (alteraciones en electrocardiogramas y presión sanguínea) para ciertos efectos adversos relacionados con el medicamento. Sin embargo, lo que más ha sorprendido al TSSC es que en el ensayo no se incluyó, siendo BIA 10-2474 una molécula que actúa vía SNC, ninguna evaluación neurofisiológica ni cognitiva de los voluntarios, a diferencia de en otros estudios con inhibidores de la FAAH. Por último, el TSSC tacha a la dosis máxima utilizada como excesiva: la inhibición de la enzima en humanos se consigue con 1.25 mg y se completa con 5 mg. De este modo, se utilizó una dosis máxima 20-50 veces superior, de 100 mg, dosis que además supera el NOAEL (*No observable Adverse Effect Level*), lo que no se recomienda en ensayos *first-in-human*.

El 10 de enero de 2016, día de la quinta administración del producto a investigar, el primer individuo fue hospitalizado, seguido de otros cinco. La clínica inicial consistía en dolor de cabeza, síndrome cerebelar, y disminución de la conciencia y memoria, lo cual empeoró en tres voluntarios y concluyó en muerte cerebral en uno de ellos. El escáner por MRI revela anomalías relacionadas con los síntomas neurológicos y sugiere que estuvieron causados por un mecanismo metabólico o tóxico de la molécula. De este modo, la implicación de BIA 10-2474 resulta evidente.

En conclusión, el TSSC maneja dos hipótesis para explicar lo acontecido en Rennes:

- La existencia de una característica común en los individuos afectados: contaminación infecciosa, interacción con otros productos, característica genética/metabólica en común que condicione la respuesta farmacológica de los voluntarios.
- Efecto umbral secundario a la dosis total de BIA 10-2474: inhibición de otra hidrolasa cerebral por BIA 10-2474, toxicidad de BIA 10-2474 por otro mecanismo, toxicidad ejercida por un metabolito de BIA 10-2474, efectos tóxicos mediados por anandamida.

Sin embargo, la hipótesis más plausible hasta la fecha es que BIA 10-2474 ejerció su toxicidad uniéndose a otras “dianas” cerebrales, debido a su ya mencionada baja especificidad por su enzima diana, el uso de dosis mucho mayores a las dosis necesarias para inhibir la FAAH en humanos, y a su probable acumulación cerebral.

El hecho de que la toxicidad experimentada en humanos no se observará en los estudios pre-clínicos continúa siendo inexplicable, aunque, debe hacerse notar que la actividad inhibitora de la FAAH de BIA 10-2474 es en torno a 100 veces mayor en humanos que en animales.

Por último, el TSSC remarca que:

- Teóricamente, BIA 10-2474 no puede considerarse como un producto de alto riesgo, según las normas estipuladas por CHMP, EMA (*Committe for Medicinal Product for Human Use, European Medicines Agency*)
- Los datos facilitados por el Manual del Investigador de este ensayo clínico, no contenían información sobre el riesgo de testar el compuesto en un ensayo de fase I. Sin embargo, este Manual contiene muchos errores e incongruencias, y resulta difícil de entender en muchos puntos. Esto es sorprendente debido a la gran importancia de este documento<sup>6</sup>.

#### **4. Conclusiones**

FAAH es una diana prometedora para el tratamiento de numerosos trastornos, incluyendo los del estado de ánimo. El fracaso de los ensayos clínicos en fase I con BIA 10-2474, y en fase II con PF-04457845, no hace perder el interés en los inhibidores de la FAAH. Sin embargo, es necesario continuar investigando con nuevas moléculas, nuevos estudios y nuevas estrategias para conseguir inhibidores altamente específicos y selectivos sobre su diana, y así explotar el potencial terapéutico de estos compuestos.

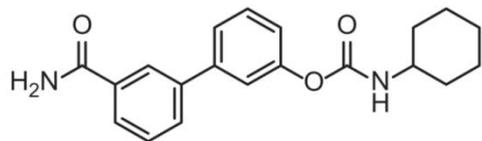
## 5. Bibliografía

- 1- Up to date [base de datos en Internet]. Wolters Kluwer Health; 5 de enero de 2016, [actualizada en abril 2016; acceso 3 de mayo 2016]. Disponible en: [http://www.uptodate.com/contents/unipolar-depression-in-adults-epidemiology-pathogenesis-and-neurobiology?source=see\\_link](http://www.uptodate.com/contents/unipolar-depression-in-adults-epidemiology-pathogenesis-and-neurobiology?source=see_link)
- 2- Up to date [base de datos en Internet]. Wolters Kluwer Health; 2016 [actualizada 12 de abril de 2016; acceso 3 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/generalized-anxiety-disorder-in-adults-epidemiology-pathogenesis-clinical-manifestations-course-assessment-and-diagnosis?source=machineLearning&search=anxiety+epidemiology&selectedTitle=1~150&sectionRank=1&anchor=H448541403#H448541403>
- 3- Breivogel C. S., Sim-Selley L. J. (2009). "Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids". *International Review of Psychiatry*, 21: 113-121.
- 4- Hill M. N. (2012). "Introduction to the special issue on stress, emotional behaviour, and the endocannabinoid system: a decade of research". *Neuroscience*, 204: 1-4.
- 5- Häring M., Guggenhuber S., Lutz B. (2012). "Neuronal populations mediating the effects of endocannabinoids on stress and emotionality". *Neuroscience*, 204: 145-158.
- 6- ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé: BIA 10-2474: Report by the Temporary Specialist Scientific Committee (TSSC), "faah (Fatty Acid Amide Hydrolase)", on the causes of the accident during a Phase 1 clinical trial in Rennes in January 2016 [consultado el 27 de abril de 2016] Disponible en: [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/744c7c6daf96b141bc9509e2f85c227e.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/744c7c6daf96b141bc9509e2f85c227e.pdf)
- 7- Hillard C. J., Weinlander K. M., Stuhr K. L. (2012). "Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence". *Neuroscience*, 204: 207-229.
- 8- Valverde O., Torrens M. (2012). "CB1 receptor-deficient mice as model for depression". *Neuroscience*, 204: 193-206.
- 9- McLaughlin R. J., Gobbi G. (2012). "Cannabinoids and emotionality: a neuroanatomical perspective". *Neuroscience*, 204: 134-144.
- 10- Blankman J. L., Cravatt B. F. (2013). "Chemical probes of endocannabinoid metabolism". *Pharmacological Reviews*, 849-871.
- 11- Fowler C. J. (2015). "The Potential of Inhibitors of Endocannabinoid Metabolism for Drug Development: A Critical Review". *Endocannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology*, 231: 95-128.
- 12- Lodola A., Castelli R., Mor M., Rivara S. (2015). "Fatty acid amide hydrolase inhibitors: a patent review (2009-2014)". *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25: 1247-1266.
- 13- Bisogno T., Maccarrone M. (2013). "Latest advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors". *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8: 509-522.
- 14- Kohnz R., Nomura D. K. (2014). "Chemical Approaches to Therapeutically Target the Metabolism and Signaling of the Endocannabinoid 2-AG and Eicosanoids". *Chemical Society Reviews*, 43: 6859-6869.
- 15- Bakke OM, Carné X, García F. Ensayos clínicos con medicamentos. Fundamentos básicos, metodología y práctica. Ediciones Doyma. Barcelona 1994.
- 16- Clinicaltrials. A Multiple Dose Trial Evaluating the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of PF-04457845 in Healthy Volunteers [base de datos en Internet]. 25 de mayo de 2016 [acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00836082?term=inhibitor+AND+FAAH&rank=3>
- 17- Clinicaltrials. A Study To Investigate Whether PF-04457845 Is Effective In Treating Pain, Is Safe And Tolerable In Patients With Osteoarthritis Of The Knee [base de datos en Internet]. 21 de septiembre de 2009 [actualizada 2 de junio de 2011; acceso el 20 de mayo de 2016].

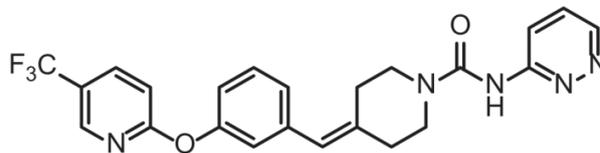
- Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00981357?term=inhibitor+AND+FAAH&rank=4>
- 18- Clinicaltrials. FAAH Inhibitor Trial for Adults With Tourette Syndrome [base de datos en Internet]. 6 de mayo de 2014 [actualizada 18 de mayo de 2016; acceso 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02134080?term=inhibitor+AND+FAAH&rank>
- 19- Clinicaltrials. Safety and Efficacy of a FAAH Inhibitor to Treat Cannabis Withdrawal [base de datos en Internet]. 5 de junio de 2012 [actualizada el 19 de mayo de 2016; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01618656?term=inhibitor+AND+FAAH&rank=2>
- 20- Clinicaltrials. Cannabinoid Augmentation of Fear Response in Humans [base de datos en Internet]. 11 de julio de 2011 [actualizada el 3 de mayo de 2016, acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01665573?term=inhibitor+AND+FAAH&rank=5>
- 21- Clinicaltrials. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of JNJ-42165279 in Healthy Young and Elderly Participants [base de datos en Internet]. 14 de octubre de 2013 [actualizada el 2 de diciembre de 2014; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01964651?term=JNJ42165279&rank=2>
- 22- Clinicaltrials. A Study to Investigate the Effects of Itraconazole on the Pharmacokinetics of JNJ-42165279 in Healthy Male Participants [base de datos en Internet]. 17 de febrero de 2014 [actualizada el 22 de abril de 2014; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02065739?term=JNJ42165279&rank=3>
- 23- Clinicaltrials. A Study to Investigate the Regional Brain Kinetics of the Positron Emission Tomography Ligand 11C-MK-3168 and the Blocking of the Retention of the Ligand in the Human Brain by JNJ-42165279 [base de datos en Internet]. 26 de febrero de 2014 [actualizada el 25 de septiembre de 2015, acceso el 20 de mayo de 2016] Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02169973?term=JNJ42165279&rank=4>
- 24- Clinicaltrials. A Single Ascending Dose Study to Investigate the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of JNJ-42165279 in Healthy Male Participants [base de datos en Internet]. 24 de julio de 2012 [actualizada el 6 de mayo de 2014; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01650597?term=JNJ42165279&rank=6>
- 25- Clinicaltrials. The Effects of JNJ-42165279 on the Neural Basis of Anxiety Disorders in Healthy Male Volunteers [base de datos en Internet]. 4 de abril de 2013 [actualizada el 14 de octubre de 2014; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01826786?term=JNJ42165279&rank=7>
- 26- Clinicaltrials. An Efficacy, Safety and Tolerability Study of JNJ-42165279 in Participants With Major Depressive Disorder With Anxious Distress [base de datos en Internet]. 13 de julio de 2015 [actualizada el 22 de enero de 2016; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02498392?term=JNJ42165279&rank=1>
- 27- Clinicaltrials. A Safety and Efficacy Study of JNJ-42165279 in Participants With Social Anxiety Disorder [base de datos en Internet]. 29 de abril de 2015 [actualizada el 22 de enero de 2016; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02432703?term=JNJ42165279&rank=5>

- 28- Clinicaltrials. An Eight-week Study of SSR411298 as Treatment for Major Depressive Disorder in Elderly Patients (FIDELIO) [base de datos en Internet]. 13 de enero de 2013 [actualizada el 14 de marzo de 2013; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00822744?term=ssr411298&rank=1>
- 29- Clinicaltrials. A Clinical Trial to Assess the Clinical Benefit of SSR411298 as Adjunctive Treatment for Persistent Cancer Pain (ACT11705) [base de datos en Internet]. 7 de septiembre de 2011 [actualizada el 14 de marzo de 2013; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01439919?term=ssr411298&rank=2>
- 30- Clinicaltrials. Single and Multiple Ascending Dose Study of V158866 in Healthy Volunteers [base de datos en Internet]. 21 de julio de 2011 [actualizada el 10 de julio de 2012; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01634529?term=V158866&rank=1>
- 31- Clinicaltrials. A Safety, Tolerability and Efficacy Study of V158866 in Central Neuropathic Pain Following Spinal Cord Injury [base de datos en Internet]. 11 de diciembre de 2012 [actualizada el 7 de octubre de 2015; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01748695?term=V158866&rank=2>
- 32- Clinicaltrials. Evaluation Study of New Compounds With Potential Use in Schizophrenia (EICAS) [base de datos en Internet]. 5 de mayo de 2009 [actualizada el 13 de agosto de 2015; acceso el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00916201?term=inhibitor+AND+FAAH&rank=6>
- 33- Clinical Study Protocol N° BIA-102474-101 (Version 2.0, 16 de octubre de 2015). Le Figaro. 21 de enero de 2016. Recuperado el 23 de enero de 2016.
- 34- Bial.com [sede web]. Portugal; 2016 [última actualización 23 de abril de 2016; acceso 25 de abril de 2016]. News release; [aproximadamente dos pantallas]. Disponible en: [https://www.bial.com/en/pressroom.138/news.140/phase\\_i\\_clinical\\_trial\\_rennes.a558.html](https://www.bial.com/en/pressroom.138/news.140/phase_i_clinical_trial_rennes.a558.html)

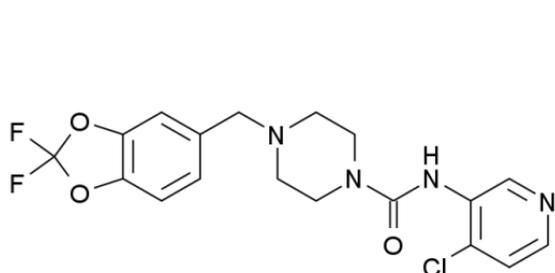
**Anexo 1. Estructuras representativas de los inhibidores selectivos de la FAAH y de la  
MAGL discutidos en la memoria**



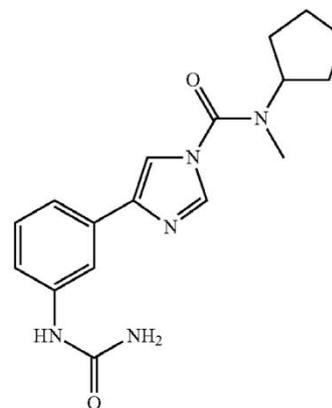
URB597



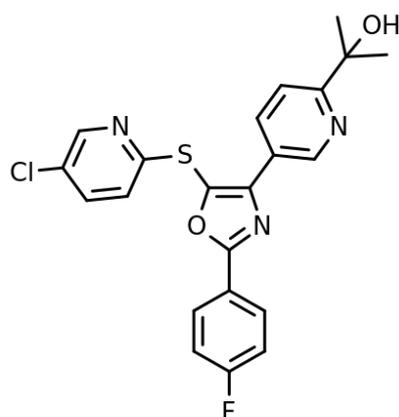
PF-04457845



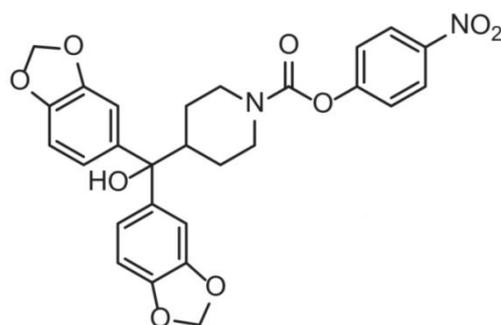
JNJ-42165279



BIA 10-2474



MK-4409



JZL184