

Premi Gemma Rosell i Romero 2011

## Noves estratègies en el tractament del dolor

Mecanisme d'acció d'un agonista cannabinoide durant el dolor inflamatori crònic

Escrit per

Roger Negrete,<sup>1</sup> Arnau Hervera,<sup>1</sup> Sergi Leáñez,<sup>1</sup> Jesús M. Martín-Campos<sup>2</sup> i Olga Pol<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grup de Neurofarmacologia Molecular, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona

<sup>2</sup> Grup de Bioquímica, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

L'activació dels receptors cannabinoïdes, tant de tipus 1 (CB1) com de tipus 2 (CB2), exerceix potents efectes analgèsics en diferents models animals de dolor. L'analgèsia derivada d'agonistes dels receptors CB1 s'associa a diversos efectes secundaris, mentre que els agonistes selectius dels receptors CB2 alleugen el dolor sense causar tants efectes adversos. D'altra banda, sabem que els efectes analgèsics locals dels opioïdes durant la inflamació perifèrica es produeixen quan s'activa la via de senyalització de l'òxid nítric. En aquest estudi, mostrem que l'activació d'aquesta via per opioïdes també participa en els efectes analgèsics produïts per un agonista CB2 durant un procés de dolor inflamatori crònic.

L'òxid nítric és una molècula endògena generada a partir de l'oxidació de l'aminoàcid L-arginina que porta a terme l'enzim òxid nítric-sintasa (NOS), del qual s'han identificat tres isoformes: neuronal, induïble i endotelial. L'òxid nítric actua com a neurotransmissor del sistema nerviós central i perifèric, i participa en la regulació de la inflamació i la nocicepció en mamífers. La seva acció es produeix per activació de l'enzim guanilat-

ciclasa soluble (GC), que desencadena un augment en la síntesi de GMP cíclic (GMPc), el qual, per l'activació d'una proteïna-cinasa dependent de GMPc (PKG), produeix l'obertura dels canals de potassi dependents d'ATP (KATP). Aquests darrers són els responsables principals del potencial analgèsic de l'òxid nítric durant la inflamació perifèrica.

Al principi dels anys noranta es va descriure la primera evidència que l'acció antinociceptiva local produïda pels opioïdes durant la inflamació perifèrica es produïa per estimulació de la via de senyalització de l'òxid nítric/GC/PKG

amb l'obertura posterior dels canals KATP. En conseqüència, els efectes analgèsics dels opioïdes eren significativament reduïts en animals tractats amb diferents inhibidors específics de l'enzim NOS o de la GC. Per contra, augmentaven en animals tractats amb substàncies capaces d'inhibir la degradació del GMPc o amb donadors d'òxid nítric.

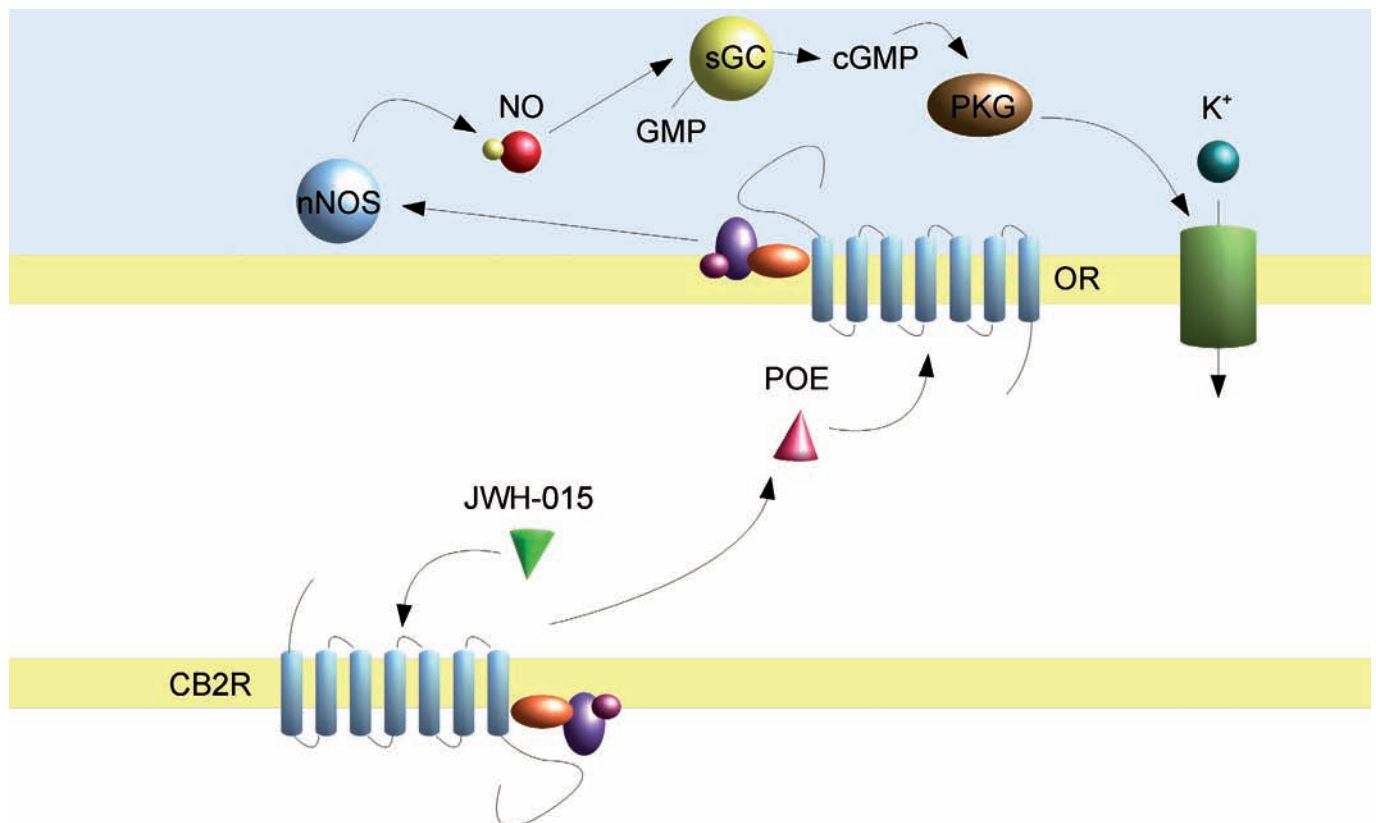
El paper de l'òxid nítric sobre l'acció antinociceptiva dels agonistes dels receptors CB2 durant el dolor inflamatori encara és desconegut. El nostre objectiu va ser avaluar si l'acció analgèsica del JWH-015, agonista selectiu dels receptors CB2, es produïa per activació mitjançada per opioïdes de la via de senyalització de l'òxid nítric.

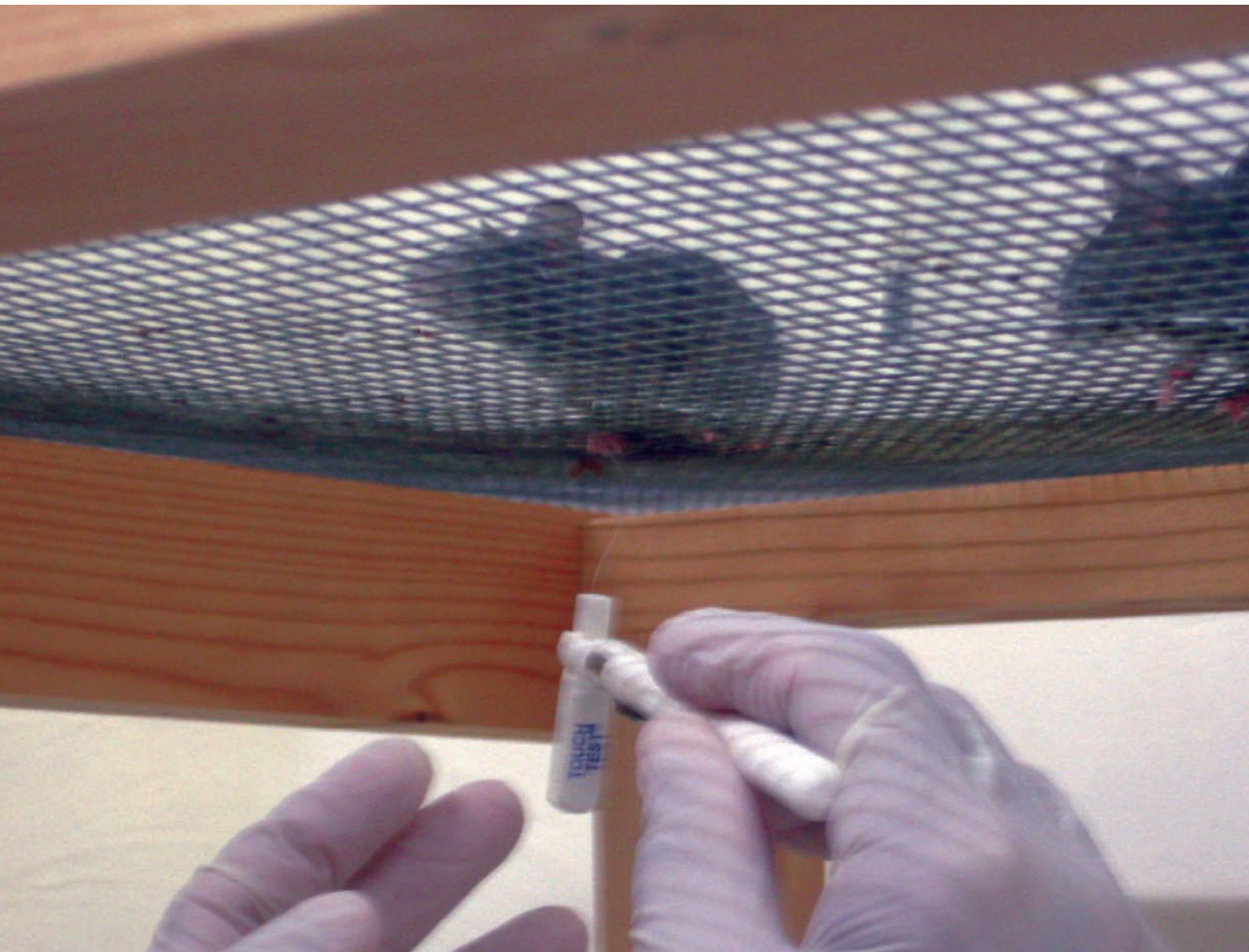
Per analitzar-ho, es van utilitzar dues soques diferents de ratolins. D'una banda, els animals de tipus salvatge (*wild type* [WT]) per avaluar el mecanisme habitual d'acció d'aquest agonista i, de l'altra, una soca de ratolins deficientes per al gen que sintetitza l'enzim NOS1. En aquest darrer cas, l'objectiu era valorar el paper de l'òxid nítric sintetitzat per aquest enzim sobre l'acció del JWH-015. En ambdós genotips es va induir una inflamació perifèrica mitjançant l'administració subplantar, a la pota dreta posterior dels animals, d'un agent inflamatori anomenat *complete Freund's adjuvant* (CFA). El CFA és una

solució que s'utilitza com a adjuvant, de manera que estimula els macròfags i altres cèl·lules mediadores de la immunitat al lloc de la injecció, fet que provoca l'increment de la resposta inflamatòria. Totes les dades analitzades en aquest estudi es van obtenir al cap de deu dies de l'administració de l'agent inflamatori.

En una primera tanda d'experiments vam avaluar els efectes de l'administració subplantar de JWH-015, agonista dels receptors CB2, sobre l'alodínia mecànica i la hiperalgèsia tèrmica induïdes per la inflamació perifèrica. L'alodínia mecànica és el dolor produït per un estímul que normalment no causaria dolor, i es va avaluar mitjançant el test dels filaments de Von Frey. Aquesta anàlisi permet valorar el llindar de pressió suportat per l'animal en aplicar una sèrie de filaments de diferents forces sobre la zona afectada. D'altra banda, la hiperalgèsia tèrmica és el dolor provocat per un estímul tèrmic nociu i percebut de manera exagerada. Aquest fenomen es va mesurar amb el *plantar test*, que avalua el temps que triga l'animal a retirar la pota inflamada en resposta a un estímul tèrmic. En aquests experiments es va observar una clara acció antinociceptiva local del JWH-015, atès que inhibia l'alodínia mecànica i la hiperalgèsia tèrmica induïdes pel dolor inflamatori dependent de dosi.

▼ **Figura.** Esquema del mecanisme per mitjà del qual els efectes antinociceptius del JWH-015 durant el dolor inflamatori crònic són produïts per activació de la via de l'òxid nítric/GC/PKG/KATP i mediats per opioïdes. Llegenda: CB2R: Receptors cannabinoïdes de tipus 2. POE: Pèptids opioïdes endògens. OR: Receptor opioïde. nNOS: Sintetasa neuronal d'òxid nítric. NO: Òxid nítric. GMP: Monofosfat de guanosina. sGC: Guanilat-ciclasa soluble. PKG: Proteïna-cinasa dependent de GMPc. K<sup>+</sup>: Ió potassi.





Així mateix, i per assegurar que aquest efecte analgèsic del JWH-015 es produïa per l'activació específica dels receptors CB2 i no pas dels CB1, es van valorar els efectes produïts per aquest agonista combinat amb un antagonista específic dels receptors CB2 (AM630) i un dels receptors CB1 (AM251). D'altra banda, i a fi de comprovar el possible paper del sistema opioide endogen sobre l'acció analgèsica del JWH-015 durant el dolor inflamatori, es van valorar els efectes produïts per aquest agonista combinat amb un antagonista dels receptors opioïdes perifèrics (naloxona metiodada). La reversió completa dels efectes de l'agonista dels receptors CB2 amb AM630, però no amb AM251, va confirmar que el potencial analgèsic del JWH-015 durant la inflamació es produeix per activació dels receptors CB2 i no dels CB1. Van ser més interessants els resultats obtinguts amb naloxona metiodada, que també va bloquejar l'acció

analgèsica del JWH-015, fet que indica la participació del sistema opioide endogen en els seus efectes.

Posteriorment, vam avaluar si hi havia alguna relació entre els efectes produïts pel JWH-015 durant la inflamació perifèrica i possibles canvis en l'expressió dels receptors CB2 localitzats al sistema nerviós perifèric (ganglis de l'arrel dorsal). La valoració de l'expressió d'aquests receptors es va efectuar mitjançant tècniques de biologia molecular. Es van determinar els nivells de RNA missatger (mRNA) per PCR a temps real i els nivells de proteïna per transferència de proteïnes (*western blot*). Les dades obtingudes van demostrar que la inflamació perifèrica no va alterar ni la transcripció (mRNA) ni l'expressió (proteïna) dels receptors CB2 en els ganglis de l'arrel dorsal. Un cop arribats a aquest punt, ens vam plantejar si hi podria haver algun altre

mecanisme capaç d'explicar l'acció analgèsica augmentada de l'agonista dels receptors CB2 durant la inflamació.

Estudis recents publicats pel nostre grup mostren que els nivells d'òxid nítric sintetitzat per l'enzim NOS1 augmenten durant la inflamació perifèrica, així com el paper rellevant que té aquest neurotransmissor sobre l'acció antinociceptiva produïda pels opioïdes durant el dolor crònic. Aquests resultats ens van fer valorar la possibilitat que l'òxid nítric pogués tenir un paper important sobre els efectes antinociceptius del JWH-015 durant la inflamació. Així, en avaluar els efectes d'aquest agonista sobre l'alodínia mecànica i la hiperalgèsia tèrmica en animals genèticament deficientes per a l'enzim NOS1, no es va observar cap efecte analgèsic per part de l'agonista. Aquest fet confirmava la nostra hipòtesi, segons la qual l'òxid nítric sintetitzat per la isoforma NOS neuronal participava en els efectes antinociceptius del JWH-015 durant el dolor inflamatori crònic.

Amb l'objectiu de valorar la possible implicació de la via de l'òxid nítric/GC/PKG/KATP —activada per NOS1— sobre els efectes del JWH-015, es van avaluar els efectes antialodínic i antihiperalgèsics d'aquest agonista CB2 en animals cotractats amb dosis creixents de diferents inhibidors selectius de la via de senyalització de l'òxid nítric. Vam fer servir, d'una banda, ODQ com a inhibidor de la guanilat-ciclasa (un dels punts inicials de la via) i, de l'altra, Rp-8-pCPT-cGMPs com a inhibidor de la PKG. Finalment, es van bloquejar els canals de potassi de-

pendents d'ATP (punt final de la via de senyalització) mitjançant l'administració de glibenclàmida. Els resultats van mostrar que la coadministració subplantar de JWH-015 amb diferents dosis d'ODQ, Rp-8-pCPT-cGMPs o glibenclàmida, va disminuir significativament els efectes analgèsics de l'agonista dels receptors CB2. Aquests resultats indicarien que l'acció analgèsica perifèrica induïda pel JWH-015 durant la inflamació perifèrica es produeix per activació de la via de senyalització perifèrica de l'òxid nítric/GC/PKG/KATP.

Si fem un recull de tots els resultats obtinguts en l'estudi, podem concloure, en primer lloc, que l'administració local d'un agonista selectiu dels receptors CB2, com és el JWH-015, inhibeix l'alodínia mecànica i la hiperalgèsia tèrmica induïdes per CFA de manera dependent de la dosi. En segon lloc, tot sembla indicar que aquest efecte es produeix per l'activació de la via perifèrica de l'òxid nítric iniciada per l'enzim NOS1 i mediada per opioïdes. L'estudi mostra, per tant, un nou mecanisme d'acció analgèsica d'un agonista dels receptors CB2 durant un procés de dolor inflamatori crònic i suggereix que l'activació de la via de l'òxid nítric/GC/PKG/KATP podria ser una diana terapèutica interessant per al tractament del dolor inflamatori crònic amb cannabinoides. |

## Referències bibliogràfiques

- CUNHA, T. M. [et al.] (2010). «Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/mNOS/NO/KATP signaling pathway». *PNAS*, vol. 107, núm. 9, p. 4442-4447.
- HERVERA, A. [et al.] (2011). «Peripheral effects of morphine and expression of  $\mu$ -opioid receptors in the dorsal root ganglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling». *Mol. Pain*, vol. 7, p. 25.
- HERVERA, A. (2009). «The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice». *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, núm. 380, p. 345-352.
- (2010). «The spinal cord expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases and their contribution in the maintenance of neuropathic pain in mice». *PLoS One*, vol. 5, núm. 12, p. e14321.
- (2010). «The role of nitric oxide in the local antia-

lodynic and antihyperalgesic effects and expression of  $\delta$ -opioid and cannabinoid-2 receptors during neuropathic pain in mice». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, núm. 334, p. 887-896.

LEÁNEZ, S. [et al.] (2009). «Peripheral antinociceptive effects of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain». *Eur. J. Pharmacol.*, núm. 602, p. 41-49.

NEGRETE, R. [et al.] (2011). «The antinociceptive effects of JWH-015 in chronic inflammatory pain are produced by nitric oxide-cGMP-PKG-KATP pathway activation mediated by opioïdes». *PLoS One*, vol. 6, núm. 10, p. 1945-1955.

POL, O. (2007). «The involvement of the nitric oxide in the effects and expression of opioid receptors during peripheral inflammation». *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, p. 1945-1955.

## Roger Negrete Buela

(Barcelona, 1984)



Llicenciat en biotecnologia per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Actualment cursa el màster en neurociències per la mateixa universitat. Aquests darrers anys ha estat treballant en el Grup de Neurofarmacologia Molecular de l'Institut de Neurociències de la UAB i de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, en diferents projectes de recerca sobre noves dianes per al tractament del dolor crònic de tipus inflamatori i/o neuropàtic.