

Cannabinoides y control del dolor: estudios en modelos animales

F. BERRENDERO Y R. MALDONADO

RESUMEN

Previos datos experimentales sugieren que el sistema cannabinoide endógeno participa en el control fisiológico del dolor. Además, los compuestos de naturaleza cannabinoide poseen claros efectos antinociceptivos en el animal de experimentación. Los receptores cannabinoides CB₁ parecen mediar estos efectos a través de mecanismos de tipo supraspinal, espinal y periférico. Aunque serán necesarias futuras investigaciones tanto básicas como clínicas para confirmar una aplicación terapéutica real de estos compuestos, su potencial terapéutico parece especialmente interesante para el tratamiento del dolor neuropático, inflamatorio y para facilitar la analgesia inducida por fármacos opioides.

Palabras clave: Cannabinoide. Dolor. Modelos animales.

ABSTRACT

Previous experimental data suggest that the endogenous cannabinoid system participates in the physiological control of pain. In addition, cannabinoid compounds induce clear antinociceptive responses in laboratory animals. CB₁ cannabinoid receptors seem to mediate these effects through supraspinal, spinal and peripheral mechanisms. Future basic and clinical research will be necessary to confirm a real therapeutic application of these compounds. However, they seem to be specially interesting in the treatment of neuropathic and inflammatory pain as well as to facilitate the analgesia induce by opiates.

Key words: Cannabinoid. Pain. Animal models.

Laboratori de Neurofarmacologia
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universitat Pompeu Fabra
Barcelona

Dirección para correspondencia:

Fernando Berrendero, Rafael Maldonado
Laboratori de Neurofarmacologia
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universitat Pompeu Fabra
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

INTRODUCCIÓN

Una de las principales funciones fisiológicas atribuida al sistema endocannabinoide es la del control de la nocicepción. La presencia de receptores cannabinoides en diferentes vías de transmisión del dolor, así como la liberación de endocannabinoides en ciertas áreas cerebrales tras la inducción de estímulos nociceptivos apoyan esta hipótesis. Por otra parte, las propiedades antinociceptivas de compuestos de naturaleza cannabinoide se han puesto de manifiesto en numerosos estudios mediante el uso de modelos animales de nocicepción y dolor. En este artículo se resumirá el conjunto de estudios de investigación básica que confirman la capacidad analgésica de los ligandos que actúan como agonistas de los receptores cannabinoides y los datos que nos hacen pensar que estos compuestos puedan tener una utilidad futura como agentes terapéuticos para el tratamiento del dolor.

RESPUESTAS ANTINOCICEPTIVAS INDUCIDAS POR COMPUESTOS DE NATURALEZA CANNABINOIDE EN EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Los cannabinoides son capaces de producir efectos antinociceptivos en diversas especies animales tal y como se ha demostrado mediante la aplicación de diversos modelos comportamentales de nocicepción y dolor. Así, entre los modelos nociceptivos agudos en los que se han puesto de manifiesto estos efectos destacan aquellos que utilizan estímulos térmicos como el test de la retirada de la cola¹ y el de la placa caliente¹⁻³, modelos mecánicos que miden respuestas motoras⁴ o reflejas⁵, tests químicos como los de las constricciones abdominales inducidas por fenilbenzoquinona⁶, ácido acético o ácido fórmico⁷, y los modelos de estimulación eléctrica de la pata⁸, del nervio ciático⁷ o de la pulpa dentaria⁹. Los estudios electrofisiológicos también confirman estas propiedades antinociceptivas de los cannabinoides¹⁰. Los agonistas cannabinoides inducen igualmente antinocicepción en modelos de dolor inflamatorio tales como la hiperalgesia producida por la administración de carragenina¹¹, capsaicina¹², formalina¹³⁻¹⁵ y adyuvante de Freund¹⁶. Finalmente, los cannabinoides han mostrado una gran eficacia en modelos de dolor neuropático inducido mediante la ligadura unilateral del nervio ciático¹⁷. Algunas respuestas farmacológicas tales

como la hipotermia, la hipolocomoción y la catalepsia podrían influir en las respuestas antinociceptivas inducidas por los cannabinoides. Sin embargo, diferentes estudios demuestran que los efectos antinociceptivos son independientes de otras respuestas comportamentales de estos compuestos. Así, ciertas sustancias son capaces de bloquear de forma independiente los efectos antinociceptivos de los cannabinoides sin afectar sus efectos motores e hipotérmicos¹⁸⁻²⁰.

Por otra parte, diferentes estudios realizados con antagonistas de los receptores cannabinoides sugieren la existencia de un tono cannabinoide endógeno en el control de la nocicepción. De esta forma, la administración intratecal del antagonista específico de los receptores CB₁ SR 141716A (rimonabant) induce efectos hiperalgésicos en ratones²¹. Los efectos hiperalgésicos del rimonabant se han puesto igualmente de manifiesto en modelos de dolor neuropático¹⁷ y en estudios electrofisiológicos de respuestas de neuronas nociceptivas dorsales a nivel de la médula espinal¹⁰. No obstante, el rimonabant no ha sido capaz de modificar la respuesta nociceptiva en otros modelos de dolor^{22,23}. Los experimentos realizados con antagonistas del receptor cannabinoide CB₂ han proporcionado datos contradictorios sobre el posible papel del sistema endocannabinoide en el control de la nocicepción. Así, mientras que alguno de estos compuestos induce hiperalgesia en el test de la formalina¹⁴ otros carecen de este efecto en este mismo test²³.

ESTUDIOS DE ANTINOCICEPCIÓN REALIZADOS EN RATONES *KNOCKOUT* CARENTES DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES Y DE LA ENZIMA DE DEGRADACIÓN FAAH (AMIDOHIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS)

El uso de ratones modificados genéticamente en los cuales se han eliminado diferentes componentes clave del sistema endocannabinoide constituye una importante estrategia para el estudio del papel del sistema cannabinoide endógeno en el control fisiológico del dolor.

Los estudios con ratones *knockout* deficientes en receptores CB₁ no muestran modificaciones de las respuestas nociceptivas en diferentes modelos experimentales²⁴ o incluso manifiestan una hipoalgesia en la prueba de la formalina²⁵. Estos resultados son inesperados, ya que parecería lógico que la supresión del receptor cannabinoide CB₁ produjera un aumento de la sensibilidad dolorosa. Sin embargo,

la supresión transitoria de este receptor de forma específica en la médula espinal induce hiperalgesia en el test de la placa caliente²⁶. Por otra parte, la enzima FAAH es la encargada de metabolizar el endocannabinoide anandamida y transformarlo en sus dos componentes fundamentales: ácido araquidónico y etanolamina. Por tanto, los ratones *knockout* carentes de esta enzima presentan un tono cannabinoide endógeno elevado demostrado por un aumento en los niveles de anandamida en diversas regiones cerebrales²⁷. Los estudios realizados hasta el momento en estos animales confirman la hipótesis de la existencia de un papel para el sistema endocannabinoide en la modulación de la sensibilidad dolorosa. De esta forma, los ratones que carecen de FAAH poseen respuestas reducidas al dolor en diferentes modelos como el de la inmersión de la cola, la placa caliente o el test de la formalina^{22,23,28}.

LUGAR DE ACCIÓN DE LAS RESPUESTAS ANTINOCICEPTIVAS DE LOS CANNABINOIDES

Los receptores nociceptivos están constituidos por terminaciones nerviosas libres y se encuentran localizados en la piel, tejido subcutáneo y en diferentes tejidos internos. Las señales dolorosas son transmitidas por los nervios periféricos hasta el asta dorsal de la médula espinal a través de fibras de tipo A δ (dolor rápido-punzante) y C (dolor lento-difuso). A partir de la médula espinal, las fibras que transmiten las señales dolorosas se dirigen hacia el tálamo y de ahí a otras áreas basales del encéfalo y a la corteza cerebral sensitiva somática. La intensidad con la que cada persona reacciona ante el dolor varía de manera considerable debido en parte a la capacidad del sistema nervioso central para controlar la entrada de señales dolorosas. Este control se lleva a cabo gracias a un sistema inhibitorio descendente que se origina en el tronco del encéfalo, es activado por proyecciones colaterales de la propia vía ascendente y frena la entrada de estímulos dolorosos en el asta dorsal de la médula espinal. En este sistema inhibitorio descendente participan diversos núcleos como la sustancia gris periacueductal y el bulbo rostroventromedial.

Mecanismos de tipo supraespinal, espinal y periférico participan en los efectos antinociceptivos inducidos por los cannabinoides. De esta manera, la administración intracerebroventricular, intratecal y local a nivel de la periferia de diferentes agonistas cannabinoides es capaz de inducir importantes respuestas antinociceptivas²⁹.

Respuestas antinociceptivas a nivel periférico

La administración periférica de anandamida, el endocannabinoide mejor caracterizado hasta el momento, es capaz de reducir la hiperalgesia inducida por la inyección periférica de carragenina, sustancia con propiedades inflamatorias, a través de un mecanismo mediado por receptores CB₁²¹. También se ha demostrado una liberación de anandamida y palmitoiletanolamida en el caso del dolor de origen inflamatorio inducido por la formalina. Estos endocannabinoides parecen jugar un papel sinérgico de inhibición de los estímulos nociceptivos a este nivel periférico. Además, la administración local en los tejidos inflamados de antagonistas selectivos de los receptores CB₁ (rimonabant) y CB₂ (SR 144528) induce efectos hiperalgésicos en este modelo de dolor inflamatorio¹⁴. Por otro lado, la administración local a nivel de los tejidos periféricos de rimonabant bloquea los efectos antinociceptivos del Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) en la inflamación inducida por la capsaicina³⁰. De acuerdo con estos resultados, un agonista selectivo de los receptores CB₂, el HU-308, induce efectos antinociceptivos en la prueba de la formalina que son bloqueados por el antagonista selectivo CB₂, SR 144528³¹. Este agonista cannabinoide CB₂ carece de efectos antinociceptivos en modelos de dolor que ponen en juego mecanismos centrales³¹. La presencia de receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (GRD) ha confirmado el papel de estos receptores en los efectos antinociceptivos que inducen los cannabinoides³². No obstante, algunos autores han puesto en duda el papel de estos receptores en el control del dolor periférico al no observar modificaciones del umbral nociceptivo en la prueba de la formalina tras la administración local de antagonistas selectivos de los receptores CB₁ o CB₂³³.

Respuestas antinociceptivas a nivel espinal

La administración intratecal de diferentes agonistas cannabinoides tales como el THC, CP 55940, WIN 55,212-2 o la anandamida induce respuestas antinociceptivas en diferentes modelos animales de nocicepción aguda y dolor²⁹. Además, aunque reducida, la actividad antinociceptiva de los cannabinoides está conservada en ratas espinalizadas, lo que demuestra la participación de los mecanismos espinales en esta respuesta³⁴. Una actividad antinociceptiva de los agonistas cannabinoides ha sido igualmente demostrada en conejos espinalizados³⁵. Asimismo, la administración intratecal de agonistas cannabinoides bloquea la

expresión de c-fos a nivel de la médula espinal inducida mediante un estímulo nociceptivo³⁶. Los receptores CB₁ están presentes en las regiones del asta dorsal de la médula espinal a nivel de las neuronas espinales intrínsecas y terminales nerviosos de neuronas sensitivas aferentes primarias. Sin embargo, sólo una minoría de los receptores CB₁ está situado en las fibras aferentes de diámetro pequeño responsables de la transmisión del dolor (fibras C), mientras que una densidad más importante de los mismos se localiza en fibras de gran diámetro responsables de la transmisión sensorial no nociceptiva³⁷. De acuerdo con esta idea, los receptores CB₁ colocalizan en un pequeño porcentaje con neuropéptidos implicados en la transmisión del dolor como la sustancia P o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, mientras que esta coexpresión es prácticamente despreciable en el caso de la somatostatina³⁷. Esta localización de los receptores CB₁ es marcadamente diferente a la de los receptores opioides mu, que mayoritariamente se encuentran en las neuronas que también expresan sustancia P³⁷. No obstante, a pesar de esta localización peculiar de los receptores CB₁, los cannabinoides producen antinocicepción espinal inhibiendo la liberación de neurotransmisores responsables de la transmisión del dolor a nivel de las fibras nociceptivas de diámetro pequeño³⁸.

Respuestas antinociceptivas a nivel supraespinal

La administración intracerebroventricular de agonistas cannabinoides tanto de origen natural como sintético induce respuestas antinociceptivas importantes en diferentes modelos experimentales^{29,39}. La administración local de agonistas cannabinoides a nivel de diferentes estructuras cerebrales ha permitido identificar las regiones responsables de estas respuestas. Así, se han observado respuestas antinociceptivas tras la administración de cannabinoides a nivel de la sustancia gris periacueductal⁴⁰, en la zona rostroventromedial del bulbo raquídeo⁴¹, en los núcleos submedio y posteromedial del tálamo⁴², el *colliculus* superior, los núcleos central y basolateral de la amígdala y la región noradrenérgica A5^{40,41}. Todas estas regiones cerebrales contienen receptores cannabinoides CB₁⁴³. La antinocicepción supraespinal inducida por los cannabinoides parece deberse, al menos en parte, a la modulación de la actividad del sistema inhibitorio descendente. Esta modulación ha sido demostrada en primer lugar en la zona rostroventromedial del bulbo raquídeo, que contiene el núcleo del rafe magno y que actúa por un mecanismo independiente al de los opioides. Así, una liberación tónica

de cannabinoides endógenos parece participar en la activación del sistema inhibitorio descendente a nivel de esta estructura cerebral¹⁹. A nivel de la sustancia gris periacueductal existe igualmente una liberación de anandamida en el momento de la estimulación nociceptiva periférica que parece participar en la inhibición de la entrada de los estímulos nociceptivos⁴⁴. La porción dorsolateral de la sustancia gris periacueductal está implicada en esta acción fisiológica de los cannabinoides endógenos, una región diferente de la implicada en las acciones de los opioides sobre esta estructura cerebral. Los cannabinoides podrían bloquear las influencias inhibitorias que ejerce el GABA sobre este sistema inhibitorio descendente mediante un mecanismo similar al descrito para los opioides^{45,46}. Por otra parte, los cannabinoides también inducen efectos antinociceptivos supraespinales mediante la inhibición de la neurotransmisión nociceptiva a nivel del núcleo posterolateralventral del tálamo⁴² y por su acción sobre la amígdala⁴⁷, núcleo relacionado con el componente emocional asociado a la percepción del dolor.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS RESPUESTAS ANTINOCICEPTIVAS DE LOS CANNABINOIDES

Los receptores CB₁ están implicados de una forma selectiva en los mecanismos periféricos, espinales y supraespinales responsables de las respuestas antinociceptivas de los cannabinoides. Así, el antagonista cannabinoide rimonabant bloquea los efectos de los cannabinoides en diferentes modelos de nocicepción térmica, mecánica o química²⁹. La administración central de oligonucleótidos contra el receptor cannabinoide CB₁⁴⁸ y la administración central de toxina pertussis⁴⁹ son igualmente capaces de bloquear las respuestas antinociceptivas de los cannabinoides. El desarrollo de ratones *knockout* para los receptores cannabinoides CB₁ ha confirmado el papel de los mismos en la antinocicepción inducida por estos compuestos. Así, los efectos antinociceptivos del THC en los modelos térmicos son suprimidos en estos animales deficientes en receptores CB₁^{24,25}. Recientemente se ha indicado que la activación de los receptores CB₂ también produce antinocicepción a través de la liberación periférica de opioides endógenos⁵⁰. No obstante, otros receptores diferentes de los receptores CB₁ y CB₂ podrían participar en los efectos antinociceptivos de los cannabinoides. La eficacia del rimonabant para bloquear la antinocicepción inducida por la administración intratecal de

cannabinoides es variable en función del agonista utilizado³⁹. De acuerdo con esta idea, el mecanismo implicado en los efectos antinociceptivos de la anandamida parece ser diferente en parte del mecanismo de acción antinociceptivo de agonistas cannabinoides exógenos. Así, el rimonabant no bloquea los efectos antinociceptivos de la anandamida en ciertos modelos de dolor térmico⁵¹ o mecánico⁴. La anandamida es incluso capaz de disminuir la potencia antinociceptiva del THC⁶. Además, los efectos antinociceptivos de la anandamida no se suprimen de manera total en los ratones *knockout* deficientes en los receptores CB₁. En estos ratones, la anandamida es capaz de estimular la unión de GTPγS a través de un mecanismo independiente de receptores CB₁ y CB₂⁵². Los receptores vaniloides han sido recientemente implicados en ciertas respuestas farmacológicas de la anandamida, como los efectos vasodilatadores, y podrían igualmente participar en sus acciones antinociceptivas⁵².

PAPEL DEL SISTEMA OPIOIDE EN LA ANTINOCICEPCIÓN INDUCIDA POR LOS CANNABINOIDES

Diversos estudios indican la existencia de interacciones entre los sistemas cannabinoide y opioide a nivel de las respuestas antinociceptivas. En este sentido, los antagonistas opioides son capaces de bloquear las respuestas antinociceptivas inducidas por los cannabinoides en ciertas condiciones experimentales. La utilización de antagonistas selectivos para los receptores opioides μ , δ y κ ha permitido evaluar la participación de cada uno de estos receptores en el efecto antinociceptivo de los cannabinoides. La administración de antagonistas de receptores opioides κ , de oligonucleótidos contra estos mismos receptores o anticuerpos contra las dinorfinas disminuye las respuestas antinociceptivas de los cannabinoides²⁹. Los receptores opioides κ parecen participar en los efectos antinociceptivos de los cannabinoides a nivel espinal, pero no están implicados en las respuestas supraespinales⁵³. La administración de antagonistas selectivos para los receptores opioides μ sugiere que éstos pueden participar en los efectos antinociceptivos de los cannabinoides a nivel supraespinal⁵³. Sin embargo, las respuestas antinociceptivas del THC en modelos de dolor térmico no son modificadas en ratones *knockout* deficientes en receptores μ , δ o κ ⁵⁴. A pesar de la ausencia de modificaciones de las respuestas del THC en estos ratones deficientes en receptores

opioides, se ha observado una disminución de los efectos antinociceptivos del THC en la prueba de la retirada de la cola en ratones *knockout* deficientes en preproencefalina⁵⁵. No obstante, las dosis utilizadas de los antagonistas opioides para los estudios farmacológicos son en general bastante elevadas y pueden originar en ciertos casos una reactividad cruzada con diferentes receptores, lo que podría explicar la contradicción aparente entre los resultados obtenidos utilizando ratones *knockout* o antagonistas opioides selectivos.

La liberación de péptidos opioides inducida tras la activación de receptores CB₁ por cannabinoides podría explicar la interacción de estos dos sistemas endógenos en el control de la nocicepción⁵⁶. Así, la administración intratecal aguda de THC y de otros agonistas cannabinoides aumenta la liberación de dinorfinas *in vivo* a nivel de la médula espinal²⁹. Estas dinorfinas parecen jugar un papel importante en la iniciación de los efectos antinociceptivos de los cannabinoides a nivel espinal. Sin embargo, la anandamida no es capaz de inducir una liberación de dinorfinas a nivel del sistema nervioso central⁵⁷. También se ha observado un aumento en la expresión de ARNm responsable de la síntesis de pro-dinorfina y proencefalina a nivel de la médula espinal y de ciertas estructuras cerebrales como el hipotálamo tras la administración repetida de THC⁵⁸. Por otro lado, la administración sistémica aguda de THC es capaz de aumentar la liberación de encefalinas endógenas *in vivo* a nivel del núcleo *accumbens*⁵⁹. La interacción entre los sistemas cannabinoide y opioide en el control de la nocicepción también podría producirse a nivel de los mecanismos de transducción de señales, ya que la activación de ambos sistemas induce mecanismos intracelulares comunes: disminución de la actividad de la adenilato ciclasa, aumento de la actividad de las MAP quinasas, apertura de canales de K⁺ y cierre de canales de Ca²⁺ a través de proteínas G_{i/o}⁵⁶.

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS CANNABINOIDES COMO AGENTES ANALGÉSICOS

El potencial terapéutico de los cannabinoides en procesos dolorosos es de gran interés clínico. En primer lugar, los cannabinoides han mostrado ser de gran utilidad en el alivio de la hiperalgesia (hipersensibilidad al dolor debido a una mayor excitabilidad de las fibras que transmiten estas señales) y la alodinia

(dolor resultante de estímulos que normalmente son inocuos) asociadas al dolor neuropático. Así, diversos estudios muestran que la administración tanto sistémica como espinal de cannabinoides reduce la alodinia producida por estímulos mecánicos, así como por la aplicación de frío, en modelos de dolor neuropático en rata^{17,60-62}. Además, parece existir un tono cannabinoide endógeno para el control de esta enfermedad, puesto que se ha observado un incremento en la expresión del receptor cannabinoide CB₁ tanto en el tálamo⁶³ como en la médula espinal⁶⁴ en modelos de dolor neuropático en roedores. La presencia de un elevado número de receptores CB₁ en fibras sensitivas de largo diámetro (Aβ y Aδ) proporciona una explicación neuroanatómica sobre la eficacia de los agonistas cannabinoides en el tratamiento del dolor neuropático, ya que este tipo de dolor se relaciona con la existencia de descargas espontáneas anormales en estas fibras mielinizadas. Además, el potencial de los cannabinoides como analgésicos para el tratamiento del dolor neuropático es de gran interés debido a la escasa eficacia que en el control del mismo poseen otros analgésicos convencionales como los opiáceos. De hecho, los receptores opioides μ se localizan fundamentalmente a nivel de las fibras de pequeño diámetro (fibras C), lo que explicaría la menor eficacia de los opioides con respecto a los cannabinoides en el alivio del dolor neuropático.

Un segundo punto de potencial interés clínico radica en la eficacia que los cannabinoides muestran en el tratamiento del dolor asociado a procesos inflamatorios, como se ha observado mediante la utilización de modelos animales de este tipo de enfermedades. Así, la administración del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 revierte la alodinia mecánica producida por la inyección de adyuvante de Freund a través de un mecanismo mediado por receptores CB₁¹⁶. No obstante, la capacidad antinociceptiva de los cannabinoides en modelos de dolor inflamatorio parece ser mediada tanto por los receptores CB₁ como por los CB₂^{14,65}. De hecho, el tratamiento con agonistas CB₂ tendría la ventaja de carecer de los efectos psicotrópicos producidos por la activación de los receptores CB₁⁶⁵. La inhibición en la producción de eicosanoides, así como la modulación de otros mediadores anti y/o proinflamatorios por compuestos de naturaleza cannabinoide, parece constituir la base de estos efectos²⁹.

Por otra parte, se ha descrito una sinergia entre la antinocicepción inducida por diferentes opioides, incluida la morfina, y los cannabinoides que podría ser también de interés terapéutico en un futuro. De

esta manera, se podrían obtener importantes efectos analgésicos reduciendo las dosis de los opiáceos mediante la coadministración de cannabinoides. Esta sinergia ha sido observada tras la utilización de la vía intratecal, intracerebroventricular, parenteral y oral en animales de experimentación²⁹. Aunque la morfina induce sus efectos antinociceptivos mediante la activación de receptores opioides μ , la facilitación por el THC de estos efectos de la morfina pone en juego la participación de otros receptores opioides: los receptores delta y kappa⁶⁶. Un estudio más reciente ha demostrado igualmente que los receptores opioides delta están implicados en la facilitación inducida por el THC sobre las respuestas antinociceptivas de los opioides, pero no han observado una participación de los receptores opioides kappa en esta interacción⁶⁷.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en diferentes modelos animales indican que el sistema cannabinoide endógeno participa en el control fisiológico del dolor. Por otra parte, estos datos también confirman la capacidad antinociceptiva de los cannabinoides tanto de origen natural como sintético. A pesar de estas evidencias, serán necesarias futuras investigaciones básicas y clínicas para confirmar una aplicación terapéutica real de estos compuestos como nuevos agentes analgésicos. Su potencial terapéutico parece particularmente interesante para el abordaje del dolor neuropático, inflamatorio y para facilitar la analgesia inducida por fármacos opiáceos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buxbaum DM. Analgesic activity of delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat and mouse. *Psychopharmacologia* 1972;25:275-80.
2. Martin BR. Structural requirements for cannabinoid-induced antinociceptive activity in mice. *Life Sci* 1985;36:1523-30.
3. Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, et al. Behavioural and biochemical evidences for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol* 1998; 125:1567-77.
4. Smith FL, Fujimori K, Lowe J, Welch SP. Characterization of delta-9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in nonarthritic and arthritic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:183-91.
5. Gilbert PE. A comparison of THC, nantradol, nabilone, and morphine in the chronic spinal dog. *J Clin Pharmacol* 1981; 21(Suppl):311S-9S.
6. Welch SP, Dunlow LD, Patrick GS, Razdan RK. Characterization of anandamide- and fluoroanandamide-induced antinociception and cross-tolerance to delta 9-THC after intrathecal administration to mice: blockade of delta 9-THC-induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:1235-44.
7. Bicher HI, Mechoulam R. Pharmacological effects of two active constituents of marijuana. *Arch Int pharmacodyn* 1968;172:24-31.

8. Weissman A, Milne GM, Melvin LS. Cannabimimetic activity from CP-47,497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;223:516-23.
9. Kaymakçalan S, Türker RK, Türker MN. Analgesic effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in the dog. *Psychopharmacologia* 1974; 35:123-8.
10. Chapman V. The cannabinoid CB₁ receptor antagonist, SR141716A, selectively facilitates nociceptive responses of dorsal horn neurones in the rat. *Br J Pharmacol* 1999;127:1765-6.
11. Mazzari S, Canella R, Petrelli R, Marcolongo G, Leon A. N-(2-hydroxyethyl) hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1996;300:227-36.
12. Li J, Daughters RS, Bullis C, et al. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain* 1999;81:25-33.
13. Moss DE, Johnson RL. Tonic analgesic effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol as measured with the formalin test. *Eur J Pharmacol* 1980; 61:313-5.
14. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998;394:277-81.
15. Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB₁ receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 1998;76:189-99.
16. Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI. Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain* 1999;82:199-205.
17. Hezberg U, Eliav E, Bennett GJ, Kopin IJ. The analgesic effect of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 1997;221:157-60.
18. Smith PB, Welch SP, Martin BR. Interactions between Δ^9 -tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268:1381-7.
19. Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 1998;395:381-3.
20. Thorat SN, Bhargava HN. Effects of NMDA receptor blockade and nitric oxide synthase inhibition on the acute and chronic actions of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in mice. *Brain Res* 1994;667:77-82.
21. Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J Neurosci* 1998;18:451-7.
22. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9371-6.
23. Lichtman AH, Shelton CC, Advani T, Cravatt BF. Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain* 2004;109:319-27.
24. Ledent C, Valverde O, Cossu G, et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science* 1999;283:401-4.
25. Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5780-5.
26. Dogrul A, Gardell LR, Ma S, Ossipov MH, Porreca F, Lai J. "Knock-down" of spinal CB₁ receptors produces abnormal pain and elevates spinal dynorphin content in mice. *Pain* 2002;100:203-9.
27. Clement AB, Hawkins EG, Lichtman AH, Cravatt BF. Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *J Neurosci* 2003; 23:3916-23.
28. Cravatt BF, Lichtman AH. The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* 2004;61:149-60.
29. Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 2001; 63:569-611.
30. Ko MC, Woods JH. Local administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol attenuates capsaicin-induced thermal nociception in rhesus monkeys: a peripheral cannabinoid action. *Psychopharmacology* 1999; 143:322-6.
31. Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, et al. HU-308: a specific agonist for CB₂, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14228-33.
32. Hohmann AG, Herkenham M. Localization of central cannabinoid CB₁ receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 1999;90:923-31.
33. Beaulieu P, Bisogno T, Punwar S, et al. Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 2000;396:85-92.
34. Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol* 1999;81:575-83.
35. Clarke RW, Harris J, Jenkins S, Witton SK. Cannabinoidergic and opioidergic inhibition of spinal reflexes in the decerebrated, spinalized rabbit. *Neuropharmacology* 2001;40:570-7.
36. Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. Intrathecal cannabinoid administration suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord: comparison with morphine. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1999;20:1132-6.
37. Hohmann AG, Briley EM, Herkenham M. Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res* 1999; 822:17-25.
38. Drew LJ, Harris J, Millns PJ, Kendall DA, Chapman V. Activation of spinal cannabinoid 1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases [35S]GTPgammaS binding in the dorsal horn of the spinal cord of noninflamed and inflamed rats. *Eur J Neurosci* 2000;12:2079-86.
39. Welch SP, Huffman JW, Lowe J. Differential blockade of the antinociceptive effects of centrally administered cannabinoids by SR 141716-A. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:1301-8.
40. Martin WJ, Coffin PO, Attias E, Balinsky M, Tsou K, Walker JM. Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. *Brain Res* 1999;822:237-42.
41. Martin WJ, Tsou K, Walker JM. Cannabinoid receptor mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neurosci Lett* 1998;242:33-6.
42. Martin WJ, Hohmann AG, Walker JM. Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *J Neurosci* 1996;16:6601-11.
43. Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998;83:393-411.
44. Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sañudo-Peña MC. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12198-203.
45. Vaughan CW, McGregor IS, Christie MJ. Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. *Br J Pharmacol* 1999;127:935-40.
46. Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 2000;57:288-95.
47. Manning BH, Merin NM, Meng ID, Amaral DG. Reduction in opioid- and cannabinoid-induced antinociception in rhesus monkeys after bilateral lesions of the amygdaloid complex. *J Neurosci* 2001;21:8238-46.
48. Edsall SA, Knapp RJ, Vanderah TW, Roeske WR, Consroe P, Yamamura HI. Antisense oligodeoxynucleotide treatment to the brain cannabinoid receptor inhibits antinociception. *Neuroreport* 1996;7:593-6.
49. Raffa RB, Stone DJ, Hipp SJ. Differential cholera-toxin sensitivity to supraspinal antinociception induced by the cannabinoid agonists Δ^9 -THC, WIN 55,212-2 and anandamide in mice. *Neurosci Lett* 1999; 263:29-32.
50. Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, et al. CB₂ cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3093-8.
51. Adams IB, Compton DR, Martin BR. Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:1209-17.
52. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 2000;129:227-30.
53. Reche I, Fuentes JA, Ruiz-Gayo M. Potentiation of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia by morphine in mice: involvement of mu- and kappa-opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 1996;318:11-6.
54. Ghosland S, Matthes HW, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R. Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J Neurosci* 2002;22:1146-54.
55. Valverde O, Maldonado R, Valjent E, Zimmer AM, Zimmer A. Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J Neurosci* 2000;20:9284-9.
56. Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:287-94.
57. Houser SJ, Eads M, Embrey JP, Welch SP. Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide. *Brain Res* 2000;857:337-42.
58. Corchero J, Ávila MA, Fuentes JA, Manzanares J. Δ^9 -tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci* 1997;61:39-43.
59. Valverde O, Noble F, Beslot F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syn-

- drome without change in rewarding effect. *Eur J Neurosci* 2001;13:1816-24.
60. Bridges D, Ahmad K, Rice AS. The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2001;133:586-94.
61. Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:243-56.
62. Mitchell VA, Aslan S, Safaei R, Vaughan CW. Effect of the cannabinoid ajulemic acid on rat models of neuropathic and inflammatory pain. *Neurosci Lett* 2005;382:231-5.
63. Siegling A, Hofmann HA, Denzer D, Mauler F, De Vry J. Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;415:R5-7.
64. Lim G, Sung B, Ji RR, Mao J. Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain* 2003;105:275-83.
65. Clayton N, Marshall FH, Bountra C, O'Shaughnessy CT. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain* 2002;96:253-60.
66. Pugh G, Smith PB, Dombrowski DS, Welch SP. The role of the endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:608-16.
67. Cichewick DL, Martin ZL, Smith FL, Welch SP. Enhancement of μ opioid antinociception by oral Δ^9 -tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:859-67.