



Programa de Doctorado en Neurociencias

## **Título de la Tesis Doctoral**

# **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO PRODUCIDO POR UN INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DE LA ANANDAMIDA Y LA MORFINA ADMINISTRADOS POR VÍA INTRADURAL EN UN MODELO DE DOLOR POSTINCISIONAL EN RATAS**

**Antonio José Carrascosa Fernández**

Director de la tesis

**Dr. D. Jorge Manzanares Robles**

Codirectora de la tesis

**Dra. Dña. María Salud García Gutiérrez**

Universidad Miguel Hernández de Elche





La presente Tesis Doctoral, titulada “*Evaluación del efecto antinociceptivo producido por un inhibidor de la recaptación de la anandamida y la morfina administrados por vía intradural en un modelo de dolor postincisional en ratas*” se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

- **Carrascosa AJ, Navarrete F, Saldaña R, García-Gutiérrez MS, Montalbán B, Navarro D, Gómez-Guijarro FM, Gasparyan A, Murcia-Sánchez E, Torregrosa AB, Pérez-Doblado P, Gutiérrez L, Manzanares J. Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality. Int J Mol Sci. 2024 Jun 6;25(11):6268. doi: 10.3390/ijms25116268. PMID: 38892456; PMCID: PMC11172912.**
- **Carrascosa AJ, García-Gutiérrez MS, Saldaña R, Manzanares J. Additive antinociceptive action of intrathecal anandamide reuptake inhibitor and morphine in the management of post-incisional pain in rats. Biomed Pharmacother. 2024 Aug; 177:117054. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117054. Epub 2024 Jun 28. PMID: 38943991.**





El *Dr. D. Jorge Manzanares Robles*, director, y la *Dra. Dña. María Salud García Gutiérrez*, codirectora de la tesis doctoral titulada “*Evaluación del efecto antinociceptivo producido por un inhibidor de la recaptación de la anandamida y la morfina administrados por vía intradural en un modelo de dolor postincisional en ratas*”.

**INFORMAN:**

Que *D. Antonio José Carrascosa Fernández* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “*Evaluación del efecto antinociceptivo producido por un inhibidor de la recaptación de la anandamida y la morfina administrados por vía intradural en un modelo de dolor postincisional en ratas*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Alicante a 10 de diciembre de 2024

*Dr. D. Jorge Manzanares  
Robles*

Director de la tesis

*Dra. Dña. María Salud García  
Gutiérrez*

Codirectora de la tesis





La *Dra. Dña. María Cruz Morenilla Palao*, Coordinadora del Programa de Doctorado en **Neurociencias**

**INFORMA:**

Que *D. Antonio José Carrascosa Fernández* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado *“Evaluación del efecto antinociceptivo producido por un inhibidor de la recaptación de la anandamida y la morfina administrados por vía intradural en un modelo de dolor postincisional en ratas”* conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Alicante a 15 de enero de 2025.

*Prof. Dra. Dña. María Cruz  
Morenilla Palao*

Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias





La presente tesis doctoral ha sido financiada por 2 Proyectos de Investigación otorgados por la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña titulados:

- **“Mecanismos implicados en la acción sinérgica de compuestos opioides y estimulantes del sistema cannabinoide endógeno administrados por vía intradural en modelos de dolor agudo en roedores”**. Fecha de inicio-fin: 14/07/2006 - 15/07/2009.
- **“La potenciación del sistema cannabinoide espinal en modelos de dolor neuropático: ¿aumenta la eficacia de los analgésicos convencionales administrados intraduralmente?”**. Fecha de inicio-fin: 01/07/2010 - 30/06/2013.



Con el amor nada es imposible.



## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Jorge Manzanares, director de esta tesis, por su confianza y apoyo constante. Gracias por ayudarme a descubrir y desarrollar cualidades que nunca imaginé tener. Por permitirme transitar de ser un estudiante eterno a un amigo para toda la vida. Sin su estímulo y paciencia infinita este trabajo no habría sido posible.

A Salu, codirectora de esta tesis, por ser la voz de la templanza y el equilibrio que permitió que todo saliera adelante. Su comprensión y experiencia han sido esenciales para culminar este proyecto e iluminarme en el complejo y gratificante camino de la investigación.

A todos mis compañeros del Hospital Universitario 12 de Octubre quienes, a pesar del desasosiego que sentimos los clínicos al adentrarnos en un ámbito desconocido como la investigación básica, me brindaron su apoyo en la preparación de los modelos de dolor y la recopilación de datos. Gracias por ser mi punto de apoyo, mi equipo de aliento y, lo más importante, la familia que elegí. Cada uno de ellos ha contribuido a mi fortaleza y ánimo de alguna manera. Un especial agradecimiento a Raquel por ser la compañera incondicional a lo largo de todo este proceso. Su apoyo y confianza han sido pilares fundamentales para finalizar esta tesis y para enseñarme a mirar siempre más allá.

Al equipo de Jorge Manzanares, cuya disposición y trabajo han sido esenciales para la culminación de esta tesis. Saber que estaban ahí daba confianza de que todo se estaba haciendo bien. Personas como Fran, que da todo sin reservas, son el motor que impulsa a completar el camino y una muestra de que hacer las cosas bien es la verdadera clave del éxito.

A mi padre por educarme en valores de esfuerzo y honor. Por ser el referente en el que mirarme cada día. Soy mejor persona por ser hijo tuyo.

A mi madre por enseñarme que el amor incondicional y sin medida puede ser eterno, sigues y seguirás estando presente todos los días en mi vida.

A Elena, mi compañera de viaje, mi mejor amiga, la persona con la que construyo mi presente y mi futuro y que da sentido todo lo que hago. Gracias por cuidarme, soportarme a veces sin merecerlo.

Y a mis hijos Sara, Tania y Jorge por llenar de luz mis días. Espero que poder cuidarlos y amarlos, al menos en la misma medida que hicieron conmigo.

# ÍNDICE

I. LISTADO DE ABREVIATURAS	3
II. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	9
II.1. En apartado Introducción	11
II.1. En apartado Justificación	11
II.2. En apartado Material y Métodos	11
III.3. En apartado Resultados	12
III.-RESUMEN	13
IV.-ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	21
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo principal	45
3.2. Objetivos específicos	45
4. HIPÓTESIS	47
5. MATERIAL Y MÉTODOS	51
5.1. Animales de estudio	53
5.2. Preparaciones quirúrgicas	54
5.2.1. Implantación del Catéter IT	54
5.2.2. Incisión de la pata posterior	56
5.3. Pruebas de comportamiento	57
5.3.1. Nocicepción térmica	57
5.3.2. Nocicepción mecánica: Prueba de comportamiento para la alodinia táctil	59
5.3.3. Locomoción	60
5.4. Tratamiento con fármacos	61
5.5. Procedimientos histológicos	62
5.5.1. Autorradiografía de unión de [ <sup>35</sup> S]GTPγS estimulada por WIN-55,940 y DAMGO	63
5.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR)	66
5.6. Diseño experimental	68
5.6.1. Primera fase: Búsqueda de una dosis subefectiva de morfina y UCM707 IT usando la prueba de placa caliente (Figura 20)	68

5.6.2. Segunda fase: Evaluación de la antinocicepción de dosis subefectivas de morfina más UCM707 IT en la modulación de la alodinia y los mecanismos subyacentes a estos efectos (Figura 19)_	69
5.7. Análisis de los datos _____	70
<b>6. RESULTADOS _____</b>	<b>71</b>
6.1. Fase 1. Efectos antinociceptivos de la administración IT de la morfina y UCM707 en el test de la placa caliente. _____	75
6.1.1. Pruebas de comportamiento: respuesta a la estimulación nociceptiva térmica. _____	75
6.1.2. Procedimientos histológicos. _____	76
6.2. Fase 2. Efectos antinociceptivos de la administración IT de dosis subefectivas de morfina y UCM707 en un modelo de dolor postincisional. _____	79
6.2.1. Respuesta a la nocicepción mecánica. _____	79
6.2.2. Procedimientos histológicos: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR). _____	80
6.2.3. Efectos de los antagonistas naloxona, SR141716A, AM630 y AMG9810 sobre los efectos antinociceptivos obtenidos tras la administración IT de morfina (1 µg) + UCM707 (75 µg) en el modelo de dolor por incisión en ratas. _____	81
<b>7. DISCUSIÓN _____</b>	<b>83</b>
<b>8. LIMITACIONES _____</b>	<b>95</b>
<b>9. CONCLUSIONES _____</b>	<b>101</b>
<b>10. CONCLUSIONS _____</b>	<b>105</b>
<b>11. FIGURAS Y TABLAS _____</b>	<b>109</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____</b>	<b>153</b>
<b>13. ANEXOS _____</b>	<b>201</b>
13.1. Artículo 1 _____	203
13.2. Artículo 2 _____	259

## **I. LISTADO DE ABREVIATURAS**

---



- **AA:** Ácido araquidónico.
- **AEA:** Anandamida.
- **AMP-cíclico:** Adenosín monofosfato cíclico
- **ATP:** adenosín trifosfato.
- **2-AG:** 2-araquidonilglicerol.
- **AINEs:** Antiinflamatorios no esteroides.
- **AMPA:** Receptor glutamatérgico ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.
- **$\beta$  arr2:**  $\beta$ -arrestina 2.
- **BDNF:** factor neurotrófico del cerebro.
- **BK:** Bradiquinina.
- **Canales GIRK:** Canales de potasio rectificadores internos acoplados a proteína G.
- **Canales VGCC:** Canales de calcio dependientes de voltaje.
- **CB1r:** Receptor cannabinoide tipo 1.
- **CB2r:** Receptor cannabinoide tipo 2.
- **CBr:** Receptor cannabinoide.
- **CGRP:** péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- **COX:** Ciclooxigenasa.
- **Cnr1:** Gen del receptor cannabinoide tipo 1.
- **Cnr2:** Gen del receptor cannabinoide tipo 2.
- **CREB:** "cAMP response element-binding". Factor de transcripción crítico que controla la expresión de genes pronociceptivos.
- **CSE:** Combinada espinal-epidural.
- **DAGL:** Diacilglicerol lipasa.
- **DPO:** Dolor postoperatorio.
- **DRG:** Ganglio de la raíz dorsal.
- **$\delta$ -OR:** Receptor opioide  $\delta$ .
- **E-CBRIs:** Inhibidor de la recaptación de los endocannabinoides.
- **Eje HPA:** Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal.
- **EMT:** Transportador de membrana de endocannabinoides.
- **eCBs:** Endocannabinoides.
- **eOpioides:** Péptidos Opioides Endógenos.
- **ERAS:** Programa de Recuperación Después de la Cirugía.
- **ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares.

- **FAAH:** Hidrolasa amida de ácidos grasos.
- **GABA:** Ácido gamma-aminobutírico.
- **GLT-1:** Transportador de Glutamato Tipo 1.
- **GLAST:** Transportador de Glutamato-Aspartato.
- **Gly:** Glicina.
- **Glu:** L-glutamato
- **GPT:** Guanosina trifosfato.
- **GPT:** Guanosina trifosfato.
- **GRD:** ganglio de la raíz dorsal.
- **IL-1:** interleuquina-1
- **IL-6:** interleuquina-6
- **IT:** Intratecal.
- **KCC2:** cotransportador de potasio-cloruro.
- **$\kappa$ -OR:** Receptor opioide  $\kappa$ .
- **LCR:** Líquido cefalorraquídeo.
- **LS:** médula lumbosacra.
- **MAGL:** Monoacilglicerol lipasa.
- **MAPKs:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos.
- **MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos 1
- **MMP:** Metaloproteinasas.
- **$\mu$ -OR:** Receptor opioide mu.
- **NAT:** N-aciltransacilasa.
- **NAPE:** N-araquidonilfosfatidiletanolamina.
- **NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- **NGF:** Factor de crecimiento nervioso.
- **NK1:** Receptor de la neuroquinina-1.
- **NMDA:** Receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato.
- **NO:** Óxido nítrico.
- **NRG-1:** Neurorregulina-1.
- **OIH:** Hiperalgia asociada al tratamiento con opioides.
- **Oprm1:** Gen del receptor Opioides Mu 1.
- **PAG:** Sustancia gris periacueductal.
- **PKA:** Proteinquinasa A.
- **PKC:** Proteinquinasa C.

- **PG:** Prostaglandinas.
- **PGE:** Prostaglandina E.
- **PLD:** Fosfolipasa D.
- **PPARs:** Receptores activados por proliferadores peroxisomales.
- **Receptor AMPAr:** Receptor glutamatérgico ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.
- **Receptor CCR2:** Receptores CCR con especificidad para las quimioquinas CCL2.
- **Receptor CX3CR1:** Receptor celular que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G y se une específicamente a la quimiocina fractalquina (CX3CL1).
- **Receptor GPR119:** Receptor acoplado a proteína G 119.
- **Receptor GPR55:** Receptor acoplado a proteína G 55.
- **Receptor Nav1.7:** Canal de sodio dependiente de voltaje subtipo 1.7.
- **Receptor Nav1.8:** Canal de sodio dependiente de voltaje subtipo 1.8.
- **Receptor NMDAr:** Receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato.
- **Receptor ORL-1:** Receptor tipo 1 relacionado con opioides, también conocido como NOP o receptor de nociceptina. Es un receptor acoplado a proteínas G que pertenece a la familia de los receptores opioides y responde a la nociceptina.
- **Receptor purinérgico P2X<sub>4</sub>:** Receptor de la familia de los receptores P2X, que son canales iónicos activados por el ATP
- **Receptor purinérgico P2X<sub>7</sub>:** Receptor de la familia de los receptores P2X, que son canales iónicos activados por el ATP
- **Receptores TLR:** Receptores tipo Toll o *Toll-like receptors*. Son una familia de proteínas que desempeñan un papel crucial en el sistema inmunitario innato al reconocer y responder a moléculas asociadas con patógenos o con daños celulares.
- **RVM:** Médula rostral ventromedial.
- **SGCs:** Células gliales satélite.
- **SEC:** Sistema endocannabinoide.
- **SNC:** Sistema Nervioso Central.
- **SNP:** Sistema Nervioso Periférico.
- **SP:** Sustancia P.
- **THC:** Tetrahidrocannabinol.
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral.

- **TTX-R:** Canales de sodio resistentes a la tetrodotoxina.
- **TRPV1:** Receptor de potencial transitorio vaniloide 1.
- **VGCC:** Canales de calcio activados por voltaje.
- **% EMP:** Porcentaje del efecto máximo posible.

## **II. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS**

---



## II.1. En apartado Introducción

<b>Figura 1 .</b> <i>Mecanismos fisiopatológicos de DPO</i> _____	111
<b>Figura 2 .</b> <i>Conectividad entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico</i> _____	113
<b>Figura 3 .</b> <i>Consecuencias de la lesión tisular en pacientes con DPO.</i> _	114
<b>Figura 4 .</b> <i>Analgesia combinada.</i> _____	115
<b>Figura 5.</b> <i>Dianas terapéuticas espinales frente al dolor.</i> _____	116

## II.1. En apartado Justificación

<b>Figura 6</b> <i>Morfina intratecal.</i> _____	119
<b>Figura 7.</b> <i>Mecanismo de acción de la morfina IT. A.- Mecanismo espinal. B.-Mecanismo supraespinal. C.- Mecanismo sobre el GRD.</i> _____	122
<b>Figura 8.</b> <i>Mecanismos de transducción de la señal opioide</i> _____	128
<b>Figura 9.</b> <i>Efectos adversos tras la administración de morfina IT.</i> ____	129
<b>Figura 10.</b> <i>Médula espinal.</i> _____	130
<b>Figura 11.</b> <i>Transmisión del estímulo nociceptivo en la asta posterior de la médula espinal en un estado de sensibilización central (1).</i> _____	132
<b>Figura 12.</b> <i>Transmisión del estímulo nociceptivo en la asta posterior de la médula espinal en un estado de sensibilización central (2)</i> _____	134
<b>Figura 13.</b> <i>Transmisión del estímulo nociceptivo en la asta posterior de la médula espinal en un estado de sensibilización central (3)</i> _____	136
<b>Figura 14.</b> <i>Componentes del SEC.</i> _____	137
<b>Figura 15.</b> <i>Diagrama que ilustra las principales vías de señalización desencadenadas por la activación de los receptores cannabinoides.</i> _	139
<b>Figura 16.</b> <i>Representación esquemática de acción antinociceptiva del SEC en la asta posterior de la médula espinal.</i> _____	141
<b>Figura 17.</b> <i>Transporte y tráfico intracelular de los eCBs</i> _____	143

## II.2. En apartado Material y Métodos

<b>Figura 18.</b> <i>Cateterización IT en ratas.</i> _____	145
<b>Figura 19.</b> <i>Modelo de dolor postincisional.</i> _____	146
<b>Figura 20.</b> <i>Test de la placa caliente.</i> _____	147
<b>Figura 21.</b> <i>Autorradiografía de unión de [35S]GTPγS.</i> _____	148
<b>Figura 22.</b> <i>RT-PCR.</i> _____	149

**Figura 23.** Esquema de representación del curso temporal de los experimentos de la primera fase. Evaluación de la antinocicepción de la morfina más UCM707 por vía IT en un modelo de placa caliente. \_\_\_\_ 150

**Figura 24.** Esquema de representación del curso temporal de los experimentos de la segunda fase: modelo de dolor postincisional. \_\_\_\_ 150

### III.3. En apartado Resultados

**Figura 25.** Efectos de la administración IT de morfina (1, 5 y 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) o la combinación de UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g) en el test de la placa caliente \_\_\_\_\_ 150

**Figura 26.** Función del receptor  $\mu$ -opioide en el área gris periacueductal (PAG) y la médula espinal lumbar sacra (LS) de ratas tras la administración IT de morfina, UCM707 o su combinación en ratas sometidas al test de la placa caliente, utilizando autorradiografía. \_\_\_\_ 150

**Figura 27.** Función del receptor CB1 en el área gris periacueductal (PAG) y la médula espinal lumbar sacra (LS) de ratas tratadas con morfina (1, 5 o 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) o la combinación de UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g) y expuestas al test de la placa caliente \_\_\_\_\_ 150

**Figura 28.** Expresión génica relativa de *Cnr1*, *Cnr2*, *TRPV1* y *Oprm1* en la médula espinal lumbosacra de ratas tratadas con UCM707 (75  $\mu$ g) o UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g) tras realización del test la placa caliente. \_\_\_\_\_ 151

**Figura 29.** Efectos de la coadministración IT de morfina (1  $\mu$ g) y UCM707(75  $\mu$ g) sobre la alodinia táctil inducida por incisión en la pata posterior de rata. \_\_\_\_\_ 151

**Figura 30.** Expresión génica relativa de *Cnr1*, *Cnr2*, *TRPV1* y *Oprm1* en la médula espinal lumbosacra de ratas tratadas con UCM707 (75  $\mu$ g) o la combinación de UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g) en un modelo de dolor postincisional. \_\_\_\_\_ 151

**Figura 31.** Efectos del antagonista  $\mu$  naloxona (12  $\mu$ g), del antagonista CB1r SR141716A (30  $\mu$ g), del antagonista CB2r AM630 (10  $\mu$ g) y del antagonista TRPV1 AMG9810 (30  $\mu$ g) sobre la reversión de los efectos antinociceptivos de la combinación UCM707 + morfina en un modelo de dolor postincisional en ratas. \_\_\_\_\_ 151

### **III.-RESUMEN**

---



Esta tesis evalúa el efecto antinociceptivo producido por la combinación de UCM707, un inhibidor de la recaptación de la AEA, y la morfina administrados por vía intradural (IT) en un modelo experimental de dolor postoperatorio (DPO). Para ello emplea un modelo de dolor postincisional en ratas administrando dosis subefectivas de los 2 compuestos previamente determinadas mediante un test de placa caliente. La evaluación de la nocicepción se realizó mediante pruebas conductuales tras administración de la solución a estudio y antagonistas específicos encaminados a investigar los mecanismos moleculares subyacentes. Se emplearon técnicas de autorradiografía de unión de [<sup>35</sup>S]GTPγS estimulada por WIN-55,940 y DAMGO en diferentes regiones del SNC y se analizó la expresión génica de diferentes receptores involucrados en la modulación del dolor (receptor Opiode Mu 1-Oprm1-, receptor cannabinoide tipo 1- Cnr1-, receptor cannabinoide tipo 2- Cnr2- y receptor de potencial transitorio vaniloide 1 -TRPV1-).

La coadministración IT de dosis subefectivas de morfina (1 µg) y UCM707 (75 µg) induce un efecto antinociceptivo robusto y prolongado para el alivio del dolor postincisional en ratas. Este efecto es comparable al producido por una dosis efectiva de morfina (5 µg), con un pico máximo de analgesia a los 30 minutos y una reducción progresiva de la antinocicepción que desaparece a las 4 horas.

La combinación de la solución IT incrementa la expresión de los receptores Cnr1, Cnr2 y TRPV1 en la médula espinal sin cambios en la expresión del receptor Oprm1. El uso de antagonistas específicos demuestra que la antinocicepción inducida por la combinación depende del receptor µ-opioide (µ-OR) y del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1r) en las fases iniciales del DPO, mientras que el receptor cannabinoide tipo 1 (CB2r) y el receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) son más relevantes en etapas tardías. Esto subraya la importancia de la temporalidad en la activación de diferentes receptores y su impacto en la eficacia antinociceptiva. Observaciones adicionales son: 1) CB1r ejerce una acción nociceptiva el cuarto día postoperatorio. 2) El receptor TRPV1 está implicado tanto el primer como el cuarto día postoperatorio.

En conclusión, esta tesis proporciona evidencia que la modulación del SEC mediante UCM707 potencia la analgesia de la morfina IT. Ello permite reducir su dosis y minimizar los efectos secundarios asociados al uso de opioides. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas para el manejo multimodal del DPO y destacan la necesidad de estudios clínicos para validar esta estrategia en humanos, así como su posible aplicación en otros tipos de dolor.



## **IV.-ABSTRACT**

---



This thesis evaluates the antinociceptive effect produced by the combination of UCM707, an EAA reuptake inhibitor, and morphine administered intrathecally (IT) in an experimental model of postoperative pain (POP). For this purpose, a postincisional pain model is used in rats by administering sub-effective doses of the 2 compounds previously determined by means of a hot plate test. The evaluation of nociception was performed by means of behavioral tests after administration of the solution under study and specific antagonists aimed at investigating the underlying molecular mechanisms. WIN-55,940- and DAMGO-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding autoradiography techniques were used in different CNS regions and the gene expression of different receptors involved in pain modulation (Opioid Mu 1-Oprm1-, cannabinoid receptor type 1- Cnr1-, cannabinoid receptor type 2- Cnr2- and transient receptor potential vanilloid 1 - TRPV1-) was analyzed.

IT coadministration of sub-effective doses of morphine (1 μg) and UCM707 (75 μg) induced a robust and prolonged antinociceptive effect for postincisional pain relief in rats. This effect is comparable to that produced by an effective dose of morphine (5 μg), with a maximum peak of analgesia at 30 minutes and a progressive reduction of antinociception that disappears at 4 hours.

The combination of IT solution increases the expression of Cnr1, Cnr2 and TRPV1 receptors in the spinal cord without changes in the expression of the Oprm1 receptor. The use of specific antagonists demonstrates that the combination-induced antinociception depends on the μ-opioid receptor (μ-OR) and the cannabinoid receptor type 1 (CB1r) in the early stages of OPD, whereas the cannabinoid receptor type 1 (CB2r) and the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) are more relevant in late stages. This underlines the importance of temporality in the activation of different receptors and its impact on antinociceptive efficacy. Additional observations are: 1) CB1r exerts a nociceptive action on postoperative day 4. 2) The TRPV1 receptor is involved on both the first and fourth postoperative day.

In conclusion, this thesis provides evidence that modulation of SEC by UCM707 potentiates IT morphine analgesia. This allows reducing its dose and minimizing the side effects associated with opioid use. These findings open new perspectives for the multimodal management of OPD and highlight the need for clinical studies to validate this strategy in humans, as well as its possible application in other types of pain.



## **1. INTRODUCCIÓN**

---



**El dolor postoperatorio (DPO)** es un dolor agudo, predecible y autolimitado en el tiempo, que aparece como consecuencia del acto quirúrgico<sup>1</sup>. Se caracteriza por su componente nociceptivo inflamatorio al que se suman mecanismos neurogénicos que amplifican la señal dolorosa<sup>2,3</sup> (**Figura 1**). En algunos casos, puede desarrollar un componente de dolor neuropático, especialmente en pacientes con lesiones nerviosas durante la cirugía<sup>4,5</sup>. Desde una perspectiva fisiopatológica, se asocia a cambios en los sistemas metabólico, inmunológico y neuroendocrino<sup>6</sup> (**Figura 2**), además de alteraciones en la función de diferentes órganos (sobre todo pulmón y corazón)<sup>7,8</sup> (**Figura 3**).

**Su control es esencial** pues su alivio no es sólo un acto de compasión humana sino necesario para reducir el sufrimiento del paciente<sup>9</sup>, promover la rehabilitación<sup>10</sup>, prevenir complicaciones médicas<sup>11</sup> y evitar el desarrollo de dolor crónico<sup>12</sup>. Asimismo, se ha descrito que determinadas técnicas analgésicas - como los bloqueos nerviosos perimedulares- se asocian a una menor morbilidad<sup>13,14</sup>. El resultado global es una mejor calidad asistencial y un menor coste hospitalario<sup>9</sup>.

**En base a los nuevos conocimientos**, las estrategias terapéuticas han experimentado importantes modificaciones. Así, ya no se recomienda la instauración de pautas fijas de tratamiento. Hoy la tendencia es instaurar pautas móviles y progresivas cuyo objetivo sea conseguir una analgesia adecuada gracias a un seguimiento individualizado de cada paciente y la realización de las modificaciones oportunas en función de la eficacia y de los efectos indeseables del tratamiento aplicado<sup>15,16</sup>. Todo ello ha sido posible a la incorporación de nuevas técnicas - sobre todo relacionadas con los **bloqueos nerviosos**<sup>17</sup>, la utilización de **nuevos fármacos con mecanismo de acción sobre los componentes nociceptivo y neuropático del DPO**<sup>18,19</sup>- y la **variación en la forma de administración** - pre, intra y postoperatoriamente<sup>20,21,22</sup>-. Asimismo, se ha generalizado el uso de la **analgesia combinada**<sup>23</sup> (**Figura 4**) y se han adaptado las necesidades analgésicas en función del tiempo<sup>24</sup>.

No obstante, **el DPO sigue siendo un problema de salud pública** que afecta a millones de personas cada año<sup>25</sup>. A pesar de los avances en la anestesia y el manejo del dolor, muchos pacientes experimentan un dolor intenso y persistente después de una cirugía aun habiendo optimizado los tratamientos convencionales<sup>26</sup>. Además, faltan analgésicos y técnicas con efectos adversos limitados o con beneficios dirigidos a aspectos específicos del

DPO (por ejemplo, el dolor provocado por el movimiento). Por otra parte, el uso de opioides es, en la actualidad, un tema de debate debido a su estrecho margen terapéutico<sup>27</sup> y a la amplia gama de efectos indeseables en un contexto que, dada la actual epidemia de opioides y sus graves consecuencias, preconiza controlar el DPO minimizando el uso de opioides peroperatorios<sup>28,29</sup>. De entre los efectos indeseables mencionar a corto plazo las náuseas y/o vómitos postoperatorios<sup>30</sup>, el estreñimiento<sup>31</sup>, la depresión respiratoria<sup>32</sup>, retención urinaria<sup>33</sup>, la confusión mental y la somnolencia<sup>34</sup>. A largo plazo, el uso de opioides conlleva el desarrollo de tolerancia<sup>35</sup>, hiperalgesia<sup>36</sup>, dependencia física y, en algunos casos, adicción<sup>37,38</sup>.

Dado que la complejidad del DPO requiere un enfoque terapéutico que vaya más allá del uso exclusivo de opioides **es imperativo explorar nuevas alternativas terapéuticas que sean más efectivas y seguras**. Para ello es fundamental comprender los mecanismos subyacentes del dolor y reconocer que el DPO representa la fase inicial de un proceso nociceptivo persistente y progresivo<sup>2,3</sup>. Asimismo, se ha de considerar que la limitada transferencia de los hallazgos científicos básicos a la práctica clínica ha obstaculizado el avance en este campo<sup>39</sup>.

El DPO es una entidad clínica muy particular. No se trata únicamente del resultado de un proceso inflamatorio ni de una lesión aislada de los nervios. Aunque en su desarrollo intervienen tanto la inflamación como el daño al tejido neural, su fisiopatología es única y conlleva consecuencias específicas<sup>1,12</sup>. Ello explica por qué los tratamientos analgésicos responden de manera diferente en comparación con otros tipos de dolor. Por ejemplo, aunque los antagonistas de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) espinales atenúan la hipersensibilidad en la mayoría de los modelos de dolor persistente, no son efectivos después de una incisión quirúrgica<sup>40</sup>. Por el contrario, la administración intratecal de antagonistas de receptores de la neuroquinina-1 (NK-1)<sup>41</sup> e inhibidores de la ciclooxigenasa-1 (COX-1)<sup>42</sup> reduce eficazmente la hipersensibilidad incisional, pero tiene poco efecto en el dolor inducido por lesión nerviosa. Además, aunque la facilitación descendente desde la médula rostral ventromedial contribuye a la hipersensibilidad conductual en diversos modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático<sup>43</sup>, este mecanismo

no está involucrado en la hipersensibilidad postincisional<sup>44</sup>. Por otro lado, la activación glial contribuye al desarrollo y mantenimiento de la hipersensibilidad<sup>45</sup>, lo que conlleva que la glía y las interacciones neurona-glía sean un objetivo atractivo para su tratamiento<sup>46,47</sup>.

**Esta tesis propone una nueva estrategia terapéutica para el alivio del DPO basada en el potencial terapéutico de combinar la morfina intradural (IT), un analgésico de uso común en la práctica clínica asistencial<sup>48,49</sup>, con sustancias que modulan el sistema endocannabinoide (SEC) mediante la inhibición de la recaptación de endocannabinoides (E-CBRIs)<sup>50</sup>.** Esta asociación se basa en la evidencia que el SEC desempeña un papel fundamental en la regulación del dolor<sup>51</sup>. Además, se ha identificado una interacción sinérgica entre el SEC y el sistema opioide, lo que sugiere que esta combinación podría potenciar la analgesia postoperatoria<sup>52,53,54</sup>. *Se plantea la hipótesis que al inhibir la recaptación de eCBs como la anandamida (AEA), los E-CBRIs potenciarían los efectos analgésicos de la morfina IT permitiendo reducir la dosis de este opioide y, en consecuencia, disminuir los efectos adversos asociados.* Se ha seleccionado el UCM707 por su capacidad de aumentar el tono endógeno de la AEA y fortalecer la interacción entre los sistemas endocannabinoide-opioide con un riesgo potencial muy bajo de dependencia física, dado que la AEA es un agonista parcial del receptor CB1<sup>55</sup>. El hecho que los eCBs se sintetizan y liberan en circuitos neuronales activos que median una respuesta adaptativa para reducir el dolor y la inflamación en respuesta a lesiones o estrés<sup>56</sup> ofrece un enfoque terapéutico más completo y eficaz que el uso de agonistas exógenos. Esta estrategia permite estimular específicamente receptores en vías activas, aprovechando la síntesis localizada y bajo demanda, evitando los efectos secundarios asociados con la activación sistémica generalizada de receptores cannabinoides<sup>57</sup>. Por otra parte, *la elección de la vía IT se justifica por la ventaja de administrar fármacos directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR)*<sup>58</sup>. Ello permite una interacción más efectiva con los receptores del SEC y del sistema opioide ubicados principalmente en la asta dorsal de la médula espinal<sup>59,60</sup> (**Figura 5**). Además, la vía IT ofrece beneficios adicionales como son la interrupción de la transmisión del dolor a nivel espinal, minimizando y/o eliminando la llegada del estímulo nociceptivo a áreas supraspinales. Utilizando dosis menores de fármacos en comparación con otras vías de administración se logra una reducción significativa de los efectos

secundarios<sup>91</sup>. En este sentido, la administración IT de opioides se justifica por una alta eficacia con dosis mínimas y una larga duración de acción<sup>49</sup>.

**La presentación de esta tesis se ha estructurado como un compendio de publicaciones científicas.** Los artículos seleccionados, publicados en revistas indexadas de alto impacto, abordan la problemática del uso de los agonistas cannabinoides en el contexto de la analgesia postoperatoria. Esta modalidad ha sido elegida por facilitar la comprensión del tema tratado y permitir una presentación más completa y coherente de los resultados obtenidos. Los artículos que constituyen la tesis son los siguientes:

- **Carrascosa AJ, Navarrete F, Saldaña R, García-Gutiérrez MS, Montalbán B, Navarro D, Gómez-Guijarro FM, Gasparyan A, Murcia-Sánchez E, Torregrosa AB, Pérez-Doblado P, Gutiérrez L, Manzanares J. Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality. Int J Mol Sci. 2024 Jun 6;25(11):6268. doi: 10.3390/ijms25116268. PMID: 38892456; PMCID: PMC11172912.**
  - Este artículo revisa el uso de cannabinoides como una opción terapéutica en el manejo del DPO. Comienza con una explicación sobre qué son los cannabinoides y describe su mecanismo de acción antinociceptivo. A lo largo del texto se argumenta la relevancia de considerar los cannabinoides como una alternativa o complemento en el alivio del DPO, destacando sus potenciales beneficios en comparación con los analgésicos tradicionales.
  - Además, el artículo profundiza en la selección del producto más adecuado para su uso para el control del DPO teniendo en cuenta las diferentes formulaciones disponibles en el mercado. También aborda aspectos farmacocinéticos clave para comprender su eficacia y seguridad en el contexto clínico.
  - Finalmente, analiza la evidencia disponible sobre la analgesia en el DPO. Aunque algunos estudios muestran resultados prometedores, otros revelan una eficacia limitada. La variabilidad en dosis, composición de productos y la falta de protocolos estandarizados dificultan la comparación de resultados y limitan su aplicación clínica.

- **Carrascosa AJ, García-Gutiérrez MS, Saldaña R, Manzanares J. Additive antinociceptive action of intrathecal anandamide reuptake inhibitor and morphine in the management of post-incisional pain in rats.** Biomed Pharmacother. 2024 Aug; 177:117054. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117054. Epub 2024 Jun 28. PMID: 38943991.
  - Este artículo evalúa la eficacia analgésica de la combinación del UCM707, un inhibidor de la recaptación de AEA, y la morfina administrados por vía IT en un modelo de dolor postincisional en ratas. El objetivo principal fue determinar si esta combinación podría generar un efecto antinociceptivo superior al de cada fármaco por separado, así como investigar los mecanismos subyacentes a esta interacción.
  - Los experimentos iniciales utilizaron un modelo de placa caliente para evaluar la antinocicepción de diferentes dosis de morfina (1, 5 y 10 µg) y UCM707 (75 µg). Los resultados mostraron que la coadministración de dosis subefectivas de morfina espinal (1 µg) y UCM707 (75 µg) es antinociceptiva. El efecto obtenido es más potente que la morfina (5 µg) IT. Al estudiar la neuroquímica no se evidenció un aumento en la actividad de los mediadores intracelulares de los receptores µ-opioides. Posteriormente, se evaluó la eficacia de esta combinación en un modelo de dolor postincisional, donde se observó una reducción significativa del dolor en los días 1 y 4 postcirugía. Para explorar los mecanismos de acción se administraron antagonistas de los receptores µ-opioides, CB1r, CB2r y TRPV1 antes de la combinación de UCM707 y morfina. Los resultados indicaron que la activación de los receptores µ-opioides y CB1r, así como la expresión de los genes Cnr1, Cnr2, Oprm1 y TRPV1, estaban involucrados en la modulación del dolor. La administración de antagonistas disminuyó los efectos antinociceptivos de la combinación, sugiriendo que estos receptores desempeñan un papel crucial en la mediación del dolor postincisional.
  - En conclusión, el estudio aporta evidencia de un efecto antinociceptivo aditivo de UCM707 y morfina, lo que sugiere que esta combinación podría ser una estrategia prometedora para el

manejo del DPO al minimizar el uso de opioides. Estos hallazgos abren nuevas vías para la investigación en el tratamiento del dolor y la mejora de la analgesia en entornos clínicos.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

---



**La morfina intratecal (IT) es una opción terapéutica eficaz para el manejo del DPO** desde su introducción en la práctica clínica en la década de los 70 <sup>49,61</sup> (**Figura 6**). A diferencia de los opioides administrados por vía intravenosa, oral o transdérmica, la morfina se introduce directamente en el espacio subaracnoideo, lo que le permite alcanzar de manera más precisa los receptores opioides en el sistema nervioso central<sup>62</sup>. *Esta forma de administración ofrece ventajas significativas en términos de potencia y duración del efecto analgésico, debido a su acceso directo a los receptores y canales iónicos implicados en la percepción del dolor*<sup>49</sup>. Así, se ha demostrado que la morfina IT proporciona un alivio superior al de la ketamina intravenosa intraoperatoria a bajas dosis<sup>63</sup> o al de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) postoperatorios<sup>64</sup>. Además, en comparación con los analgésicos intravenosos, asegura un control del dolor más prolongado, que puede ser de hasta 24 horas tras una cirugía mayor, y con menos fluctuaciones en la intensidad del dolor<sup>65</sup>. Adicionalmente, *la administración de morfina IT se ha asociado a beneficios postoperatorios significativos* como la mejora de la calidad de la anestesia espinal, la reducción de los requerimientos de analgesia postoperatoria y la facilitación de la movilización temprana tras la cirugía<sup>66,67,68</sup>.

La administración directa de morfina en el líquido cefalorraquídeo es el método más eficiente para que actúen los opioides sobre los receptores de la médula espinal.

**La analgesia inducida por la morfina IT es el resultado de la suma de efectos sobre las neuronas de la asta dorsal, la inhibición de la transmisión nociceptiva ascendente, la modulación de las vías descendentes inhibitorias y excitatorias y la actuación sobre el ganglio de la raíz dorsal (GRD) (Figura 7).** *Este efecto se logra a través de su interacción con los receptores opioides mu ( $\mu$ -OR), delta ( $\delta$ -OR) y kappa ( $\kappa$ -OR)<sup>69</sup>.* Estos receptores comparten una amplia homología estructural y se acoplan a proteínas G sensibles a la toxina pertussis (Gi/o), lo que les permite inhibir la adenililciclase, activar la conductancia de potasio, suprimir la conductancia de calcio e inhibir la liberación de neurotransmisores tras estimular el intercambio de guanosina trifosfato (GPT) del complejo de la proteína G y liberarse una subunidad de dicho complejo (**Figura 8**). Además, los receptores  $\mu$ -OR pueden modular directamente los receptores NMDA y AMPA - receptores clave en la transmisión

del dolor y la potenciación a largo plazo en el dolor neuropático<sup>70</sup>. El mecanismo exacto por el cual regulan estos receptores ionotrópicos del glutamato no ha sido completamente elucidado, aunque sí se ha demostrado que están involucrados en la respuesta espinal, especialmente a altas dosis<sup>71</sup>. Adicionalmente, la activación de los  $\mu$ -OR puede inhibir los canales de sodio resistentes a la tetrodotoxina (TTX-R) y los canales TRPV1 presentes en estructuras como el GRD (**Figura 7**). En definitiva, *la modulación de la transmisión del dolor es multifactorial y simultánea en diversos niveles del sistema nervioso gracias a la amplia distribución de los receptores opioides en dicho sistema*<sup>72</sup>.

La morfina IT inhibe la transmisión sináptica al actuar sobre las terminales aferentes primarias, las neuronas de la asta posterior y las interneuronas. Asimismo, al activar los receptores  $\mu$ -OR en el sistema inhibitorio descendente, que se origina en la sustancia gris periacueductal (PAG) del mesencéfalo, ejerce un control inhibitorio sobre la transmisión nociceptiva a través de una acción supraespinal. Además, la morfina puede inhibir la actividad neuronal en el ganglio de la raíz dorsal (GRD).

En todos los casos, **los  $\mu$ -OR son los principales mediadores de la acción antinociceptiva** a través de dos mecanismos principales: 1) *La inhibición de canales de calcio ( $Ca^{2+}$ )*: la activación de los  $\mu$ -OR en las terminales nerviosas presinápticas inhibe la apertura de los canales de calcio tipo N, lo que reduce la entrada de calcio intracelular y, en consecuencia, la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato. Esta disminución en la transmisión sináptica a nivel de la médula espinal contribuye directamente a la analgesia<sup>73</sup> (**Figura 7**). Además, la activación de los  $\mu$ -OR en la sustancia gris periacueductal (PAG) provoca una "desinhibición" de esta región. Al reducir la liberación de GABA -neurotransmisor que actúa como un "freno" sobre la actividad de la PAG-, facilita la activación de la vía descendente inhibitoria del dolor<sup>74</sup> (**Figura 7**); 2) *La activación de canales de potasio rectificadores internos acoplados a proteína G (canales GIRK)*: La activación de los canales GIRK promueve la salida de iones de potasio desde el interior de la célula hacia el exterior, lo que hiperpolariza la membrana celular. Esta hiperpolarización reduce la capacidad de la neurona para generar potenciales de acción<sup>75</sup> (**Figura 7** y **Figura 8**). Es importante destacar que la morfina IT se une con mayor afinidad a receptores específicos en la asta dorsal de la médula espinal en comparación con opioides lipofílicos como el fentanilo y el sufentanilo. Simulaciones en

modelos experimentales han revelado que la exposición de la médula espinal es máxima con morfina en comparación con los opioides lipofílicos. Esto se refleja en las potencias relativas de las dosis IT y en su duración de acción. Por ejemplo, una dosis de morfina IT puede producir analgesia de 13 a 33 horas, mientras que una dosis comparable de sufentanilo o fentanilo IT produce analgesia de solo 2 a 6 horas<sup>76</sup>.

En la práctica clínica, **la morfina IT es una opción terapéutica de elección en el entorno peroperatorio debido a su potente efecto analgésico, su mayor duración de acción en comparación con otras vías de administración y su capacidad de reducir el consumo de opioides sistémicos**<sup>49</sup>. Su administración, generalmente en una única inyección durante cirugías torácicas, abdominales, espinales, urológicas y ortopédicas<sup>77</sup>, se combina frecuentemente con anestésicos locales al realizar anestesia espinal o mediante la técnica combinada espinal-epidural (CSE) durante la cirugía. Dosis pequeñas de morfina IT (100-150µg) pueden proporcionar una analgesia postoperatoria efectiva con una duración de 12 a 48 horas<sup>65</sup>. Ello ha contribuido a su *creciente aceptación en los programas de Recuperación Después de la Cirugía (ERAS) en detrimento de la analgesia epidural*<sup>78</sup>. Esta preferencia se ve reforzada por el hecho que la anestesia IT, además de ser más simple y rápida, presenta una menor tasa de fallos técnicos y no requiere el manejo de catéteres o bombas, lo que también reduce los costos<sup>79</sup>. En este contexto, se ha propuesto que *la morfina IT podría reemplazar a los opioides sistémicos como el estándar de oro en la analgesia postoperatoria dentro de un programa ERAS*. También se ha postulado como una alternativa prometedora en cirugías donde la analgesia epidural no es la opción ideal, como la cirugía hepática abierta, siempre que se combine con una estrategia de analgesia multimodal<sup>80</sup>.

Sin embargo, **a pesar de la reducción de dosis obtenida tras su administración IT, la relación dosis-respuesta de la morfina IT sigue siendo impredecible y los efectos adversos limitan su uso en ciertos pacientes y contextos clínicos**<sup>81</sup> (Figura 9). En este sentido, *los opioides hidrofílicos muestran un perfil de efectos adversos similar independientemente de la vía de administración (IT o sistémica), lo que sugiere que la vía IT no es una solución definitiva para evitar estos problemas*<sup>65</sup>. Entre los efectos adversos más comunes se encuentran las náuseas y vómitos, el prurito, la retención urinaria, la sedación y la depresión respiratoria, todos relacionados con la activación de receptores opioides y sus subtipos<sup>82</sup>. Además, se han documentado otros

efectos adversos asociados con la liberación de histamina, como la hipotensión y la bradicardia, que pueden ser fatales a pesar de las medidas de reanimación adecuadas. También puede observarse un efecto vasodilatador que contribuye al edema periférico en las extremidades inferiores y en las áreas dependientes en pacientes que reciben terapia con opioides IT<sup>83</sup>. Entre estas complicaciones, la depresión respiratoria es la complicación más temida, ya que puede ocurrir hasta 24 horas después de la administración de la morfina IT<sup>84</sup>. De hecho, la morfina IT es el opioide más involucrado en los casos de depresión respiratoria tardía<sup>85</sup>. Este efecto adverso está directamente relacionado con la dosis administrada y se produce a través de mecanismos específicos mediados por receptores opioides<sup>86</sup>. Estudios a gran escala reportan una incidencia de DR después de la administración de morfina IT que varía entre 0.03%<sup>87</sup> y 7%<sup>85</sup>. Sin embargo, la verdadera incidencia de la depresión respiratoria tras su administración es desconocida, en parte debido a la falta de una definición estándar de lo que constituye la depresión respiratoria<sup>88</sup>.

Debido a ello, **es prioritario explorar alternativas terapéuticas que optimicen la analgesia, reduzcan la dosis y garanticen un control eficaz del DPO**. Estas estrategias deben adaptarse a las necesidades analgésicas específicas del paciente y abordar tanto los componentes nociceptivos como neuropáticos del dolor<sup>2</sup>. En este contexto, **la analgesia multimodal**, que combina múltiples analgésicos con diferentes mecanismos de acción, es una opción a considerar (**Figura 4**). *La combinación de varios fármacos puede producir un efecto aditivo o incluso sinérgico, lo que permite disminuir la dosis de opioides y, en consecuencia, la incidencia de efectos secundarios*<sup>89</sup>. Por otro lado, **la administración directa de medicamentos al LCR mediante la vía IT** posibilita una acción más precisa sobre dianas ubicadas en la médula espinal (**Figura 10**). De esta manera *se facilita la modulación del impulso nervioso y la actuación sobre los mecanismos de sensibilización central del dolor* (

**Figura 11, Figura 12, Figura 13**). Además, la vía IT *interrumpe la transmisión del estímulo nociceptivo a las zonas supraspinales* minimizando o eliminando la percepción del dolor. Asimismo, *permite usar dosis menores de fármacos en comparación con otras vías de administración*, lo que se traduce en una reducción de efectos secundarios<sup>90</sup>. En este sentido, la administración de morfina IT se justifica por una alta eficacia con dosis mínimas y una larga duración de acción<sup>91</sup>.

La médula espinal juega un papel fundamental en el control del DPO, actuando como un centro de procesamiento clave entre el sitio de la lesión quirúrgica y los centros superiores del sistema nervioso. Además de transmitir las señales de dolor hacia el cerebro, la médula espinal también puede modular la intensidad de estas señales a través de mecanismos inhibitorios locales, lo que influye en la percepción final del dolor.

**Entre las distintas opciones farmacológicas que pueden combinarse con la morfina IT destacan especialmente los agonistas cannabinoides.** Estos compuestos, ampliamente utilizados en el siglo XIX para el manejo del dolor, ejercen su acción al interactuar con **el sistema endocannabinoide (SEC)**, un sistema de señalización lipídica neuroactiva que se compone clásicamente de *dos receptores acoplados a proteínas Gi/o* - el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1r) y el receptor cannabinoide tipo 2 (CB2r)-, unos *ligandos endógenos (eCBs)* que se unen y activan estos receptores - los dos más estudiados son la anandamida (AEA) y 2-araquidonoglicerol (2-AG)-, un *sistema de transporte de membrana y enzimas involucradas en su síntesis y degradación* - dos enzimas principales pueden metabolizar los eCBs: la hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH), que degrada predominantemente la AEA, y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), que degrada predominantemente el 2-AG<sup>-92,93</sup> (**Figura 14**). En el caso que nos pertoca, *el SEC regula el dolor mediante un tono fisiológico basal*<sup>51</sup> *y otro activado en situaciones fisiopatológicas como la inflamación*<sup>94</sup>. Este sistema actúa a nivel periférico<sup>95,96</sup>, espinal<sup>97,98</sup> y supraespinal<sup>99,100</sup> modulando tanto la neurotransmisión como la respuesta inmunitaria a través de diversos mecanismos (**Figura 15**). Como resultado, es capaz de atenuar el dolor al regular la respuesta del sistema nervioso - los eCBs se pueden considerar neurotransmisores en las sinapsis al activar los receptores cannabinoides expresados en el sistema nervioso<sup>92,101</sup>-, el sistema endocrino - existe evidencia de la regulación de la actividad basal del eje HPA (hipotálamo-pituitaria-adrenal) y su actividad en respuesta al estrés<sup>102</sup>-, y el sistema inmunitario - el SEC puede modular la función de los principales tipos de células y tejidos inmunitarios, incluyendo las células gliales del sistema nervioso central. Estas células liberan una variedad de quimioquinas y citoquinas que permiten la comunicación bidireccional entre el cerebro y el sistema inmunitario<sup>103</sup> -. De esta manera, *e/*

*SEC facilita la adaptación o habituación al estrés, protege contra el desarrollo de enfermedades y disfunciones relacionadas con el estrés, y, en última instancia, promueve la supervivencia<sup>104</sup>, tras interactuar con multitud de sistemas moduladores endógenos y, en consecuencia, generar cambios endocrinos, metabólicos, inmunológicos y, sobre todo, en el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP)<sup>105</sup>.*

El SEC desempeña un papel fundamental en la modulación del dolor al actuar como un regulador homeostático clave de la transmisión sináptica en el Sistema Nervioso. Al activarse, el SEC promueve una retroalimentación negativa, reduciendo el impulso nervioso y, por tanto, atenuando el estímulo nociceptivo<sup>101</sup>. Esto se logra a través de diferentes mecanismos como la inhibición de la liberación de neurotransmisores, la alteración de la permeabilidad de los canales iónicos y la modulación de la expresión génica. Las consecuencias celulares incluyen una modificación a corto plazo de la permeabilidad de los canales iónicos de la membrana (principalmente para K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>), lo que disminuye la excitabilidad neuronal, y cambios a largo plazo en la expresión génica que resultan en fenómenos como la plasticidad cerebral, la dependencia y la transformación de una respuesta aguda en una adaptación o memoria a largo plazo<sup>106</sup>. El resultado global es una disminución de la percepción del dolor mediante la modulación del impulso nociceptivo a diferentes niveles y la activación de un sistema inhibitorio descendente que actúa sobre la médula espinal<sup>100</sup>. Múltiples factores, como la diversidad de la señalización mediada por cannabinoides<sup>101</sup> la concentración del ligando<sup>107</sup>, la presencia de otras moléculas ligando de cannabinoides<sup>108</sup>, la localización exacta de los receptores cannabinoides<sup>106</sup> y la distribución diferencial de las enzimas metabólicas<sup>94</sup>, influyen en la respuesta a un cannabinoide específico.

**Con el fin de evaluar el potencial terapéutico de los cannabinoides en el tratamiento del DPO y comprender los mecanismos moleculares subyacentes**, hemos realizado una revisión sistemática titulada "Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality". La información obtenida nos ha proporcionado argumentos

tanto a favor como en contra de su uso en la analgesia postoperatoria, basados en: **1.-La modulación del SEC por el proceso quirúrgico; 2.-Las propiedades analgésicas intrínsecas de los cannabinoides; y 3.-La capacidad de los agonistas cannabinoides para aumentar la eficacia de otros analgésicos.**

### **1.-Modulación del SEC por el proceso quirúrgico**

Los estudios preclínicos evidencian que *el SEC es clave para aliviar el DPO y prevenir su cronificación al modular la actividad neuronal<sup>109</sup> y suprimir las respuestas inflamatorias gliales en la médula espinal<sup>110,111</sup>*. Sin embargo, aunque se reconoce que la AEA genera antinocicepción<sup>112,113</sup> y que los fármacos que perpetúan los efectos de los eCBs reducen el dolor en modelos de dolor<sup>114,115</sup>, la complejidad del SEC y su interacción con otros sistemas biológicos dificultan la predicción de la respuesta a los tratamientos basados en cannabinoides. Esta variabilidad en la respuesta puede atribuirse a la diversidad de la señalización cannabinoide y los cambios en los niveles de eCBs y la distribución de las enzimas metabólicas<sup>116</sup>. Tanto es así que hay evidencia que los antagonistas de los CB1r y CB2r pueden ejercer acciones analgésicas y antiinflamatorias<sup>117</sup>, posiblemente debido al hecho de que los eCBs pueden comportarse tanto como mediadores proinflamatorios como antiinflamatorios<sup>118,119</sup>.

En la actualidad se acepta que *el SEC restaura la homeostasis en respuesta a estímulos agudos o estresantes, actuando de forma temporal y localizada<sup>120,121</sup>*. Sin embargo, en condiciones patológicas crónicas, esta regulación se altera. Los eCBs pueden prolongar su acción, activar los mismos receptores de manera persistente o incluso reclutar nuevos tipos de receptores en poblaciones celulares no habituales, lo que complica la predicción de los efectos terapéuticos de modular este sistema<sup>56</sup>.

A nivel clínico, sólo hay publicado un estudio evaluando las concentraciones de varios eCBs en suero, LCR y líquido sinovial en relación con el nivel de dolor y el consumo de opioides tras una cirugía<sup>122</sup>. Los resultados mostraron que los niveles de 2-AG en el líquido sinovial y cefalorraquídeo estaban significativamente correlacionados con las puntuaciones de DPO y el consumo de opioides. Sin embargo, una limitación del estudio es la posible influencia de confusión debido a la osteoartritis de los participantes y el estado de dolor crónico asociado antes de la cirugía. Por lo tanto, no está claro si estos hallazgos podrían replicarse en una población de pacientes sin dolor crónico previo.

Hoy en día, predecir la eficacia terapéutica de los agonistas o antagonistas indirectos del SEC para el alivio del DPO sigue siendo una tarea compleja.

## **2.-Propiedades analgésicas intrínsecas de los cannabinoides**

La sólida base bioquímica que vincula los receptores cannabinoides con las vías del dolor ha impulsado la realización de estudios en animales para evaluar la antinocicepción inducida por cannabinoides<sup>123</sup>. Los agonistas de los receptores CB1r y CB2r, así como los inhibidores de la FAAH han sido los más frecuentemente evaluados. Los datos preclínicos tras su administración por vías sistémicas<sup>124</sup> y/o perimedulares<sup>125</sup> en modelos de dolor por exceso de nocicepción, modelos de dolor visceral y neuropático<sup>126</sup> concluyen que *la potencia antinociceptiva es similar a la de los opioides*<sup>127,128</sup>. Esta potencia varía según la sustancia elegida, la dosis administrada -existe una relación dosis-dependiente entre la cantidad de cannabinoide administrado y el grado de antinocicepción<sup>129,130</sup>- y la vía de administración - las vías perimedulares permiten alcanzar los objetivos terapéuticos con dosis considerablemente más bajas y un efecto de mayor duración en comparación con las vías sistémicas<sup>131,132</sup>.

Asimismo, la bibliografía destaca el *mayor poder antinociceptivo de los agonistas cannabinoides en modelos de dolor inflamatorio y neuropático*<sup>123,126,133</sup>. En el primer caso, puede deberse a: 1) que los cannabinoides actúan principalmente inhibiendo o liberando una serie de moduladores desde las neuronas y/o tejidos no neuronales, por lo que la antinocicepción es más rápida e intensa si los tejidos están lesionados o inflamados, donde estos mediadores se encuentran en cantidades relativamente<sup>134,135</sup>; y 2) los cannabinoides pueden actuar sobre una mayor variedad de mecanismos antinociceptivos, como las enzimas que catalizan la producción y liberación de agentes inflamatorios, o sobre un mayor número/variedad de receptores cannabinoides<sup>136</sup>. En cuanto a la eficacia en el dolor neuropático, destacan: 1) la evidencia de que los CB2r centrales son necesarios para el efecto antialodínico<sup>137</sup>; 2) el papel que ejercen los cannabinoides en la activación y desensibilización del dolor neuropático – ej. sobre el canal proteico del receptor transitorio de tipo 1 vaniloide (TRPV1)<sup>96,138</sup> y 3) la reducción de la activación de la microglía y los astrocitos como mecanismo relacionado en la disminución de la hipersensibilidad en el dolor neuropático<sup>110</sup>.

No obstante, *los resultados clínicos han sido, hasta ahora, inconsistentes y a menudo contradictorios*<sup>139,140</sup>. Así, si bien históricamente se ha recomendado el cannabis para el dolor<sup>141</sup>, la bibliografía indica que la eficacia en el alivio del dolor agudo es limitada y, en ciertas circunstancias, incluso podría exacerbarlo<sup>142,143</sup>. Esta discrepancia también se observa en dolores crónicos como artritis, dolor lumbar, dolor de cuello, migraña, esclerosis múltiple, dolor oncológico, fibromialgia y varias formas de dolor neuropático<sup>144,145</sup>, donde los cambios neuroplásticos a lo largo del tiempo como (1) una regulación al alza de los receptores cannabinoide, CB1 y CB2<sup>146</sup>; (2) una alteración de la función del receptor de cannabinoide<sup>147</sup>; y (3) la liberación de diversos eCBs<sup>148</sup> podrían explicar los resultados variables.

En el caso del DPO se han publicado ocho ensayos clínicos, involucrando un total de 924 pacientes y utilizando seis compuestos cannabinoide diferentes, principalmente THC o sus análogos (por ejemplo, dronabinol)<sup>149,150,151,152,153,154,155,156</sup>. La mayoría de los ensayos clínicos no han encontrado evidencia significativa de que los cannabinoide sean efectivos para aliviar el DPO, y sólo dos han reportado beneficios modestos y limitados, como una leve reducción en las puntuaciones de dolor<sup>151,153</sup>. Cabe destacar que seis de los ocho estudios administraron una sola dosis de cannabinoide, mientras que en los otros dos estudios la administración se extendió durante un período de 24 y 36 horas, respectivamente.

En base a la bibliografía resulta complicado recomendar el uso de cannabinoide como una alternativa efectiva en el manejo del dolor frente a los tratamientos analgésicos convencionales que están comercialmente disponibles y aceptados.

### ***3.-La capacidad de los agonistas cannabinoide para aumentar la eficacia de otros analgésicos.***

*Los agonistas cannabinoide, al modular múltiples neurotransmisores y neuromoduladores -incluyendo glutamato, GABA, serotonina, acetilcolina, dopamina, opioides, noradrenalina y colecistoquinina<sup>157,158</sup>-, se convierten en candidatos idóneos para potenciar la eficacia de otros analgésicos<sup>123,159</sup>.*

En el caso de los *opioide*, hay numerosas investigaciones que exploran su coadministración con el objetivo de mejorar la eficacia y seguridad de los

tratamientos para el dolor. Ello se debe a que esta asociación es particularmente atractiva si se considera la *distribución compartida en la vía inhibitoria descendente del dolor*<sup>54</sup> y la *existencia de mecanismos celulares complementarios de acción*<sup>160</sup>, lo que sugiere una interacción sinérgica en el control del dolor<sup>52</sup>. Además, la formación de heterodímeros entre los CB1r y los  $\mu$ -OR<sup>161</sup> así como la modulación de la liberación de opioides tras activación del SEC<sup>162,163</sup>, refuerzan esta interacción. No obstante, la situación es más compleja debido a las particularidades de la farmacología de los cannabinoides. Por ejemplo, el grado de activación de los receptores cannabinoides por diferentes agonistas influye significativamente en los efectos observados<sup>164</sup>. Además, los agonistas parciales, como la AEA, pueden actuar de forma antagonista cuando se encuentran en presencia de agonistas más potentes<sup>165</sup>.

En la actualidad, los estudios preclínicos han demostrado de manera consistente una sinergia entre estos compuestos cuando se administran de forma conjunta, ya sea por vía sistémica<sup>166,167</sup>, IT o intracerebroventricularmente<sup>168,169</sup> o en una combinación de vías<sup>170</sup>. Esta sinergia se atribuye a la interacción entre los receptores cannabinoides y los opioides ya que el bloqueo de los primeros puede revertir los efectos analgésicos de los segundos<sup>171,172</sup>.

Sin embargo, *los resultados de ensayos clínicos en humanos han sido inconsistentes y no han proporcionado pruebas concluyentes de un beneficio clínico claro en el manejo del DPO*<sup>173,174</sup>.

Los estudios sugieren que los agonistas cannabinoides, al modular múltiples neurotransmisores y neuromoduladores, podrían desempeñar un papel fundamental en la analgesia combinada para el manejo del DPO, potenciando la eficacia de otros analgésicos y reduciendo la necesidad de opioides. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos en humanos han sido, hasta la fecha, inconsistentes y no han logrado demostrar de manera concluyente un beneficio clínico claro en el manejo del DPO.

En este contexto, dado que la complejidad del DPO demanda enfoques terapéuticos más eficaces y mejor tolerados, **la administración IT de agonistas cannabinoides en combinación con morfina IT emerge como una opción prometedora**. Esta combinación aprovecha *la amplia distribución de los receptores cannabinoides en la médula espinal* - ej.: en las terminales centrales

de las fibras aferentes primarias, las interneuronas glutamatérgicas, glicinérgicas y GABAérgicas, así como en neuronas de proyección y glía<sup>175,176,177</sup> y su papel en la *modulación de la transmisión nociceptiva* (**Figura 16**). Además, los cannabinoides pueden actuar sobre los *receptores cannabinoides presentes en los GRD*<sup>178</sup>, estructura donde se encuentran los somas neuronales de las fibras aferentes primarias de todo el sistema sensorial, incluidos los nociceptores. En este caso, ***una alternativa atractiva a la activación de receptores cannabinoides con agonistas exógenos es potenciar la señalización de los eCBs***. Las ventajas potenciales de considerar a los eCBs como analgésicos incluyen: 1) Síntesis localizada y bajo demanda: los eCBs se sintetizan y liberan en circuitos neuronales activos que median una respuesta adaptativa para reducir el dolor y la inflamación en respuesta a lesiones o estrés<sup>179,180</sup>. Esta respuesta localizada minimiza los efectos secundarios asociados con la activación generalizada de los receptores cannabinoides<sup>56</sup>; 2) Producción endógena: el hecho que los eCBs y las enzimas responsables de su metabolismo se sintetizan de una manera natural implica una vida media más corta y una menor toxicidad en comparación con los fármacos sintéticos; y 3) Sinergia con la morfina IT: La interacción entre el sistema opioide y el SEC es fundamental para la respuesta al estrés y el dolor<sup>181</sup>. Estudios han demostrado una sinergia entre ambos sistemas<sup>52,53</sup> lo que sugiere que esta combinación podría mejorar la analgesia postoperatoria. Esta combinación permite una respuesta adaptativa más eficaz ante lesiones o situaciones estresantes<sup>182</sup>.

**Para poder amplificar de manera específica la señalización de los eCBs hemos empleado el UCM707, un inhibidor selectivo y potente de la recaptación de eCBs**<sup>183</sup> (**Figura 17**). Este compuesto presenta una mínima capacidad de interacción con los CB1r, CB2r y los canales TRPV1, pero es capaz de potenciar la acción de dosis subefectivas de AEA<sup>183</sup>. Las ventajas potenciales asociadas al uso de inhibidores de la recaptación de AEA son:

- 1) ***Restringir la captación celular a través del transportador de membrana de la AEA puede evitar la activación de los receptores TRPV1***. Esta estrategia podría prevenir la facilitación mediada por los canales TRPV1 de la transmisión de las neuronas excitatorias glutamatérgicas en la asta dorsal de la médula espinal<sup>184</sup>. En línea con esto, hay estudios conductuales que han demostrado la atenuación de la hipersensibilidad al dolor mediante el tratamiento con AEA IT cuando se administra un antagonista de los canales TRPV1 en diversos modelos de

dolor<sup>185,186</sup>. Asimismo, limitaría la facilitación mediada por los canales TRPV1 de la transmisión hacia las neuronas excitatorias GABAérgicas en la asta dorsal, lo que contribuiría a reducir la inflamación neurogénica cutánea<sup>187</sup>. Asimismo, concentraciones elevadas de AEA en la médula espinal podrían disminuir la liberación de neurotransmisores a través de la activación de los receptores CB1r y CB2r<sup>188,189</sup>.

- 2) **Evitar el metabolismo de la AEA.** Es importante destacar que el ácido araquidónico liberado por la hidrólisis de AEA o 2-AG puede servir como sustrato para las ciclooxigenasas para producir prostaglandinas y moléculas relacionadas<sup>190</sup>. Como resultado, disminuirían las respuestas de las neuronas nociceptivas de la médula espinal a la estimulación mecánica, ya que las prostaglandinas sintetizadas a nivel central han jugado un papel clave en la amplificación del procesamiento del dolor en la médula espinal. La síntesis de prostaglandinas espinales está involucrada en el mantenimiento de la hipersensibilidad tras una lesión nerviosa<sup>191</sup>.
- 3) **Si se protege de la degradación y se permite su acumulación, la AEA puede interactuar con las vías del dolor mediadas por los opioides y mejorar la antinocicepción producida por la morfina.** De esta manera se trabaja de forma sinérgica con el sistema opioide para controlar el dolor<sup>192</sup>.
- 4) La acumulación de AEA por fuera de la neurona puede proporcionar **analgesia a través de otros mecanismos no opioides** como la interacción con la adenosina IT<sup>193</sup>. También podría ayudar a alcanzar las concentraciones necesarias para la activación de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)<sup>194</sup>.
- 5) Dado que la activación de la microglía también está asociada al dolor y los receptores CB2 pueden deprimir la activación de células inmunitarias a nivel espinal, no se puede descartar que la AEA también posea propiedades antiinflamatorias, lo que podría contribuir a sus efectos antinociceptivos<sup>195</sup>.

### **3. OBJETIVOS**

---



### **3.1. Objetivo principal**

Evaluar la eficacia analgésica de la coadministración IT de dosis subefectivas de UCM707 -un inhibidor de la recaptación de la anandamida (AEA)<sup>183</sup> - con la morfina en un modelo experimental de DPO en ratas.

### **3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar si la combinación de dosis subefectivas de UCM707 y morfina administradas por vía IT produce un efecto antinociceptivo que permita reducir la dosis de morfina necesaria para aliviar el dolor postincisional.
2. Investigar los mecanismos moleculares subyacentes al efecto antinociceptivo mediante el análisis de la expresión génica de los receptores involucrados y la administración de antagonistas específicos.
3. Identificar las regiones en el SNC donde se producen estos cambios.



## **4. HIPÓTESIS**

---



La potenciación del tono endógeno de la AEA mediante un inhibidor de su recaptación -el UCM707- amplifica la analgesia de la morfina IT, permitiendo así una reducción significativa de su dosis para aliviar el DPO.

Esta afirmación se somete a prueba en un modelo de dolor postincisional en ratas para simular el DPO en humanos con el objetivo de determinar si existe una relación significativa que respalde la propuesta de este estudio. La sinergia propuesta se basa en la evidencia que el SEC desempeña un papel crucial en la modulación del dolor y la inflamación<sup>111,196</sup> así como en la capacidad de síntesis y liberación local de los eCBs en respuesta a una lesión, mediando así una respuesta adaptativa dirigida a reducir el dolor y la inflamación<sup>56,197</sup>. Argumentos a favor de esta estrategia terapéutica son : 1) la existencia de estudios que han demostrado que niveles bajos de AEA en la médula espinal contribuyen a la hipersensibilidad al dolor en el DPO, mientras que su normalización favorece la resolución espontánea<sup>111</sup>; 2) la evidencia que la mejora de la señalización endocannabinoide contribuye a la prevención de estados de dolor persistente tras DPO al inhibir procesos inflamatorios clave como la fosforilación de la p38 en astrocitos espinales<sup>111</sup>. Cabe destacar que al dirigir la intervención hacia la AEA se estimulan los receptores activos en las vías del dolor beneficiándose de: 1) la especificidad: la síntesis localizada y según sea necesario de la AEA evita los efectos secundarios vinculados a la activación sistémica generalizada de los receptores cannabinoides<sup>115</sup>; 2) la biocompatibilidad: Las enzimas responsables de la síntesis y degradación de la AEA son endógenas, lo que confiere a esta molécula una vida media corta y baja toxicidad<sup>286</sup>.



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

---



Con el objetivo de determinar si el UCM707 potencia la analgesia de la morfina IT se diseñó un estudio experimental estructurado en dos fases. **En la primera fase** se utilizó el *modelo de la placa caliente en ratas* para determinar una dosis subefectiva de morfina IT y evaluar el potencial efecto antinociceptivo del UCM707 cuando se coadministra con esta dosis. **En una segunda fase** se evaluó el potencial efecto antinociceptivo de la administración IT de una solución de morfina y UCM707 a dosis subefectivas obtenida en la primera fase en un *modelo de dolor postincisional en ratas*.

Previo a cada experimento fue necesario cateterizar IT cada animal (**Figura 18**) y minimizar los efectos del estrés secundarios a la manipulación con un descanso mínimo de unos 7 días. Ese período de tiempo se empleó para observar las posibles alteraciones neurológicas y administrar una dosis test IT que confirmara la correcta colocación del catéter.

Como en otros estudios de dolor agudo: 1) *los grupos de estudio se homogeneizaron* para asegurar que los animales fueran susceptibles al dolor de una manera similar mediante obtención de respuestas clínicas previas al estudio en cuestión. Los animales que difirieron significativamente no se incluyeron en el estudio; 2) *no se repitió la prueba sobre el mismo animal* para evitar el sesgo que supone el aprendizaje.

Este apartado describe el material y los métodos empleados incluyendo los animales de estudio, las técnicas empleadas, las sustancias utilizadas (con especificación de dosis y vehículos), los modelos de dolor utilizados y los criterios de evaluación, tanto clínicos como neuroquímicos. Asimismo, presenta el diseño experimental empleado en esta investigación, con el cronograma de cada fase y la justificación de cada etapa.

## 5.1. Animales de estudio

Se utilizaron **ratas macho de la cepa Wistar** (Harlan, Barcelona, España) para todos los experimentos conductuales. Al inicio de los experimentos, las ratas tenían entre 2 y 3 meses de edad y un peso de 200 a 225 g. Se mantuvieron a una temperatura constante de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (luz desde las 8:00 hasta las 20:00 h), con libre acceso a comida y agua.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los más altos estándares de cuidado animal, monitorizando la salud y minimizando el dolor y el sufrimiento, de acuerdo con el Convenio Europeo para la protección de los Animales Vertebrados utilizados para fines Experimentales y otros fines científicos del Consejo de Europa (n.º 123, 15 de junio de 2006) y la Directiva 2010/63/ECC del Consejo de las Comunidades Europeas. Cada animal fue utilizado una sola vez.

Los criterios de exclusión incluyeron la muerte durante los experimentos y aquellos animales que presentaron déficits motores después de la implantación del catéter IT.

## 5.2. Preparaciones quirúrgicas

### 5.2.1. Implantación del Catéter IT

A las ratas utilizadas en el estudio se **les implantó un catéter IT 5-7 días antes de los experimentos**. Se utilizó un catéter estéril y apirógeno de 0,85 x 0,45 mm, calibre 20 G, fabricado de poliamida pura, con extremo distal cerrado y 3 orificios laterales, insertado en la columna lumbar (catéter de anestesia epidural Perifix® - B. Braun Medical Inc.). Este catéter fue insertado en el espacio subaracnoideo a través del espacio intervertebral L5-L6 utilizando una aguja Tuohy de 18 G (**Figura 18**).

Para el procedimiento los animales fueron anestesiados con halotano al 2% en oxígeno y colocados en decúbito prono flexionando la columna con una jeringa de 50 ml colocada transversalmente bajo el abdomen. Se realizó una adecuada preparación de la zona lumbar mediante asepsia y antisepsia con povidona yodada 10%. A continuación, se practicó una incisión longitudinal de la línea media dorsal a nivel de las vértebras lumbares L5 y L6. Se disecaron los tejidos subcutáneos y musculares para exponer las apófisis espinosas. Para visualizar el espacio intervertebral L5-L6, se procedió a la sección de la fascia de los músculos paravertebrales y a su separación de la columna vertebral con un instrumento romo. Posteriormente se procedió a cortar los ligamentos interespinosos y a realizar una laminectomía parcial utilizando una pinza de disco. Una vez expuesto el canal vertebral, se introdujo la aguja de Tuohy en el espacio epidural, orientada en dirección

craneocaudal, hasta alcanzar el espacio subaracnoideo, lo cual se percibe como un cambio en la resistencia.

Seguidamente, se introdujo el catéter, previamente purgado con solución salina fisiológica, avanzando unos 2 cm en el espacio IT en dirección craneal.

La correcta colocación de la aguja se confirmó mediante un típico movimiento de la cola o de la pata trasera, el fácil avance del catéter a través de la aguja y, en ocasiones, la presencia de líquido cefalorraquídeo en el catéter. Finalmente, se realizó la hemostasia y se cerró la incisión utilizando material de sutura absorbible. El catéter fue tunelizado subcutáneamente desde la zona lumbar hasta la región cervical posterior donde se externalizó y se selló con plastilina hasta el día del experimento.

Tras la implantación del catéter IT, las ratas fueron monitorizadas individualmente para evaluar la recuperación motora y comprobar un correcto comportamiento alimentario y de bebida. Aquellas que presentaron cojera fueron sacrificadas. Las ratas restantes se les permitió recuperarse durante una semana antes de iniciar los experimentos. Para verificar la correcta colocación del catéter, se administró una dosis de prueba de lidocaína al 2% dos días después de la cirugía.

La recuperación locomotora (gravedad de la lesión) y la capacidad del animal para realizar las pruebas de comportamiento se evaluaron utilizando una escala locomotora de 6 puntos<sup>198</sup>: 0 = sin movimiento en la extremidad, sin soporte de peso; 1 = movimiento apenas perceptible de la extremidad, sin soporte de peso; 2 = movimiento frecuente y/o vigoroso de la extremidad, sin soporte de peso; 3 = puede soportar peso en la extremidad, puede dar uno o dos pasos; 4 = camina con déficit, problemas de equilibrio y posicionamiento del pie; 5 = camina con solo un leve déficit; 6 = caminata normal.

La posición final del catéter IT fue corroborada en todos los animales a través de una inspección directa postmortem una vez finalizado los experimentos.

### 5.2.2. Incisión de la pata posterior

Para identificar los mecanismos inherentes al DPO inducido por una incisión se ha utilizado **un modelo animal específico relacionado con la cirugía en ratas** en el que se realizó una incisión de 1 cm de longitud en la superficie plantar de la pata posterior penetrando las capas musculares (**Figura 19**)<sup>199</sup>. Este procedimiento se aplicó en los experimentos realizados para evaluar la eficacia de la combinación de morfina y UCM707 a dosis subefectivas, previamente determinada en un modelo de placa caliente.

Para su realización los animales fueron anestesiados con halotano al 2% en oxígeno y colocados en decúbito prono. La pata posterior fue esterilizada. Tras la incisión de la piel y la fascia plantar subyacente se identificó el músculo flexor corto de los dedos, responsable de la contracción de los cuatro dedos laterales de la pata posterior. Este músculo flexor subyacente se elevó y seccionó de forma longitudinal dejando el origen y la inserción intactos y retraídos. Posteriormente, se cerró la herida cutánea con suturas de colchón de nylon 5-0.

En este modelo las ratas desarrollan un comportamiento protector no evocado de corta duración (de aproximadamente 2 días tras la incisión) y un comportamiento relacionado con el dolor evocado a estímulos mecánicos puntuales (medidos con filamentos de von Frey) de mayor duración<sup>200,201</sup>.

La elección de este modelo de dolor se justifica por su alta relevancia clínica. Permite investigar de manera directa la eficacia de las intervenciones analgésicas en un contexto que simula las condiciones reales del paciente postquirúrgico en el que interesa controlar su aparición en condiciones de reposo y movimiento<sup>202</sup>. Además, este modelo facilita el estudio de los mecanismos de sensibilización mecánica, que son fundamentales para comprender y tratar el dolor crónico<sup>203</sup>. Es importante señalar que muchos modelos preclínicos de dolor, como la inflamación inducida por antígenos o los estímulos químicos que activan receptores específicos (como la formalina o la capsaicina), no siempre se traducen de manera efectiva en los mecanismos del dolor inducido por incisión<sup>40,204</sup>. Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que este modelo presenta una alta compatibilidad con el dolor por incisión en humanos, reflejando cambios conductuales, farmacológicos y moleculares que son relevantes y observables en ambos contextos<sup>205</sup>.

### 5.3. Pruebas de comportamiento

Cada rata se colocó en una *jaula individual de plástico (25 cm de largo x 10 cm de ancho x 14 cm de alto)* con un suelo de malla de alambre y se dejó que se aclimatara durante 15 minutos antes de cada sesión de prueba. El comportamiento general de cada rata fue observado y evaluado cuidadosamente.

#### 5.3.1. Nocicepción térmica

Con el fin de determinar la respuesta nociceptiva aguda y establecer una curva dosis-respuesta de los fármacos administrados para el control del dolor se empleó el test de la placa caliente (**Figura 20**). Este método, ampliamente utilizado en la investigación preclínica, permite evaluar de manera objetiva y cuantificable la sensibilidad al dolor térmico<sup>206</sup>. Además, al evocar respuestas a nivel supraespinal, proporciona información valiosa sobre los mecanismos centrales del dolor<sup>206</sup>.

Para la realización de la prueba se colocaron los animales sobre una placa calentada a  $55 \pm 0.5$  °C por su capacidad de evocar una respuesta nociceptiva reproducible en ratas<sup>207</sup>. Se utilizó un cilindro de vidrio para mantener al animal sobre la superficie caliente de la placa. Se registró el tiempo de latencia hasta que el animal se lamía una de sus patas traseras o intentaba salir del recinto. El tiempo de reacción se determinó a los 30 y 120 minutos después de cada tratamiento. El tiempo máximo de latencia se estableció en 25 segundos debido a ser más o menos 3 veces el tiempo de reacción habitual de estos animales cuando se realiza la prueba sin solución analgésica. Se excluyeron del análisis aquellas ratas que no respondieron o presentaron comportamientos atípicos.

Para cuantificar la respuesta antinociceptiva de cada dosis se calculó y comparó con la obtenida antes del tratamiento. Los resultados se expresaron en forma de porcentaje del efecto máximo posible (% EMP):

$$\%EMP = \frac{\text{Latencia tras el tratamiento} - \text{Latencia basal}}{\text{Límite máximo de latencia} - \text{Latencia basal}} \times 100$$

donde:

- a. **Latencia tras el tratamiento:** Es el tiempo que tarda el animal en mostrar una respuesta (como lamer la pata o saltar) después de haber recibido el tratamiento.
- b. **Latencia basal:** Es el tiempo que tarda el animal en responder antes de recibir cualquier tratamiento.
- c. **Límite máximo de latencia:** Es el tiempo máximo permitido en la prueba antes de que el experimento sea detenido para evitar daño al animal (usualmente 25 segundos en la prueba de la placa caliente).

El %EMP se calculó para cada rata, utilizando al menos 6 ratas por dosis. Un resultado del 100% indica que el tratamiento ha alcanzado el efecto máximo posible, elevando el umbral de respuesta al dolor hasta el nivel máximo

El test de la placa caliente fue seleccionado por su reconocida validez para evaluar respuestas nociceptivas supraespinales y su relevancia clínica en la demostración de efectos sinérgicos entre diferentes tratamientos<sup>206</sup>. De hecho, es un procedimiento utilizado habitualmente en el estudio de asociaciones sinérgicas a nivel perimedular<sup>208,209</sup>. Sin embargo, es crucial tener en cuenta la variabilidad individual y controlar factores externos que puedan influir en los resultados, como la edad, el sexo y el manejo de los animales. Además, la elección de la temperatura de la placa influye en la fiabilidad de los datos obtenidos<sup>210</sup>. Asimismo, hay estudios que han demostrado que la latencia de la placa caliente tiene a disminuir con la repetición de las pruebas<sup>211</sup>, lo que podría deberse a varios factores como el aprendizaje, la reducción del estrés, la habituación a los estímulos asociados con la prueba u otros factores desconocidos<sup>212</sup>. Esto implica que, aunque este test es una herramienta poderosa en la evaluación del dolor, deben de reconocerse sus limitaciones y sea necesario complementarlo con otros métodos para obtener una valoración más completa de la nocicepción.

### 5.3.2. Nocicepción mecánica: Prueba de comportamiento para la alodinia táctil

La técnica de los filamentos de von Frey es un método de referencia para evaluar la alodinia mecánica en modelos de dolor postincisional (**Figura 19**)<sup>199</sup>. Al aplicar una presión controlada en el área circundante a una incisión quirúrgica se puede evaluar con precisión los cambios en el umbral del dolor y determinar la eficacia de diferentes intervenciones terapéuticas en el contexto del DPO<sup>1, 2</sup>.

Para su realización se utilizó un anesthesiómetro plantar dinámico de von Frey (Ugo Basile 37400 Dynamic Plantar Anesthesiometer®)<sup>213</sup>. Siguiendo el protocolo de Kyoto, se aplicaron estímulos táctiles no nocivos de forma progresiva, incrementando la fuerza del filamento metálico de punta roma (0.5 mm de diámetro) desde 1 hasta 40 gramos en 5 segundos, tanto en la zona proximal como distal de la lesión<sup>214</sup> (**Figura 19**). El reflejo de retirada de la pata se registró automáticamente utilizando dos métricas: la latencia hasta la retirada, en segundos, y la fuerza con la que se retiró la pata, en gramos, promediando 2 mediciones con un minuto de intervalo. El umbral máximo de latencia se estableció en 20 segundos debido a ser más o menos 3 veces el tiempo de reacción habitual de estos animales cuando se realiza la prueba sin solución analgésica.

La respuesta antinociceptiva se calculó comparando los umbrales de respuesta antes y después de la administración del tratamiento. Los resultados se expresaron en forma de porcentaje del efecto máximo posible (% EMP):

$$\%EMP = \frac{\text{Umbral postratamiento} - \text{Umbral Pretratamiento}}{\text{Umbral máximo} - \text{Umbral pretratamiento}} \times 100$$

donde:

- a. **Umbral Pre-Tratamiento (UPT):** Es el umbral de respuesta al dolor antes de la administración del tratamiento.

- b. **Umbral Post-Tratamiento (UPT):** Es el umbral de respuesta al dolor después de la administración del tratamiento.
- c. **Umbral Máximo (UM):** Es el umbral máximo que se puede alcanzar sin provocar daño o molestia severa

El %EMP se calculó para cada rata, utilizando al menos 6 ratas por dosis. Las evaluaciones se realizaron a las 24 horas de la incisión (antes del tratamiento), a los 0, 5, 1 y 2 horas postratamiento. Durante el período de observación, se monitorizaron los cambios conductuales, incluyendo la vocalización, los movimientos repetitivos y el nivel de actividad. Un resultado del 100% indica que el tratamiento ha alcanzado el efecto máximo posible, elevando el umbral de respuesta al dolor hasta el nivel máximo.

La elección de este método de evaluación se basa en su sólida validación para estudiar la sensibilización periférica y central asociada al DPO. Estudios previos han confirmado la activación y sensibilización de nociceptores periféricos<sup>215,216</sup> y neuronas de la médula espinal<sup>217</sup> tras su aplicación de esta técnica. Estos hallazgos consolidan el uso de los filamentos de von Frey como una herramienta esencial para evaluar el efecto de los fármacos tras una incisión plantar, particularmente en lo que respecta a la reducción del dolor espontáneo y la hiperalgesia mecánica.

### 5.3.3. Locomoción

El efecto sobre la actividad locomotora se evaluó durante los 10 minutos previos y posteriores a la administración de las soluciones. Para valorarla se utilizó una escala de locomoción de 6 puntos: 0 = sin movimiento en la extremidad, sin soporte de peso; 1 = movimiento apenas perceptible de la extremidad, sin soporte de peso; 2 = movimiento frecuente y/o vigoroso de la extremidad, sin soporte de peso; 3 = puede soportar peso en la extremidad, puede dar uno o dos pasos; 4 = camina con déficit, con problemas de equilibrio y posicionamiento del pie; 5 = camina con un déficit leve; 6 = marcha normal<sup>198</sup>. Los animales que obtuvieron una puntuación de 0 a 4 fueron excluidos del estudio.

## 5.4. Tratamiento con fármacos

Los fármacos administrados por vía IT fueron administrados en un volumen total de 20 µl seguidos de 10 µl de solución salina para limpiar el catéter. Los agentes utilizados en esta tesis fueron:

1. **Morfina** ((5α,6α)-7,8-didehidro-4,5-epoxi-17-metilmorfinano-3,6-diol) disuelta en solución salina a las concentraciones de 1, 5 ó 10 µg /10 µl.
2. **Inhibidor de la recaptación de cannabinoides UCM707** (N-(3-furanilmetil)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida) (Tocris, Madrid, España)<sup>218</sup>, disuelto en una mezcla de etanol: cremofor: salino (1:1:18) a una concentración de 75 µg / 10 µl. La dosis empleada fue de 75 µg. Esta dosis se justifica por un estudio que ha demostrado que dosis de 2 mg / kg intraperitoneal produjo un efecto antinociceptivo significativo cuando se coadministra con la AEA para responder a un estímulo nocivo en el test de placa caliente<sup>183</sup>. En este caso hemos considerado disminuir la dosis a administrar a 0,250 mg / kg (unos 75 µg) a nivel IT. Esta decisión se basa en un enfoque empírico y en la consideración de que una sustancia liposoluble como el fentanilo es aproximadamente 10 veces más potente cuando se administra por vía IT en comparación con la vía intravenosa<sup>91</sup>.
3. **Antagonista de los receptores opioides naloxona**, disuelta en solución salina a 5 µg /10 µl. La dosis empleada fue de 12 µg. Esta dosis se justifica por estudios previos que han demostrado que la naloxona antagoniza el efecto antinociceptivo de la morfina a esta cantidad<sup>219,220,221</sup>.
4. **Antagonista de los receptores cannabinoides tipo 1 SR14176A** ((N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida-hidrocloruro), disuelto en etanol: cremofor: salino (1:1:18) a una concentración de 15 µg / 10 µl<sup>222</sup>. La dosis empleada fue de 30 µg. Esta dosis se justifica por estudios previos que han demostrado que el SR14176A antagoniza el efecto de los CB1r a esta cantidad<sup>125</sup>.
5. **Antagonista de los receptores cannabinoides tipo 2 AM630** (6-yodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) etil]-1H-indol-3-il) (4-metoxifenil) metanona), disuelto en una mezcla de dimetilsulfóxido y solución salina en una proporción de 1:1 a 5 µg / 10 µl<sup>223</sup>. La dosis empleada fue de 10 µg. Esta dosis se justifica por estudios previos que han demostrado que el AM630 antagoniza el efecto antinociceptivo de los CB2r a esta cantidad<sup>110</sup>.

6. **Antagonista de los receptores TRPV1 AMG9810** ((E)-3-(4-terc-butilfenil)-N-(2,3-dihidrobenc[b][1,4]dioxin-6-il) acrilamida), disuelto en etanol: cremofor: salino (1:1:18) a 25 µg / 10 µl<sup>224</sup>. La dosis empleada fue de 50 µg. Esta dosis se justifica por estudios previos que han demostrado que el AMG981 antagoniza el efecto antinociceptivo de los CB2r a esta cantidad<sup>225</sup>.

Las soluciones base fueron diluidas según las concentraciones mencionadas para lograr los volúmenes de inyección apropiados.

## 5.5. Procedimientos histológicos

Tras sacrificio de los animales por decapitación, se tomaron muestras de tejido nervioso en el encéfalo y la médula espinal. Más específicamente, las muestras analizadas fueron secciones coronales del cerebro a nivel de la sustancia gris periacueductal (PAG) y secciones de la médula espinal lumbosacra (LS)<sup>226,227</sup>. La elección de la PAG se debe a su contribución en la antinocicepción cuando se administran conjuntamente opioides y cannabinoides. En este contexto, se ha demostrado que la microinyección de cannabinoides y opioides en la PAG produce antinocicepción<sup>228</sup>. Además, la microinyección de un agonista CB1 en la PAG ventrolateral potencia la antinocicepción inducida por la morfina<sup>229</sup>. Estos efectos parecen estar relacionados con la colocalización de CB1r y de µ-OR en las mismas neuronas dentro de la PAG<sup>230</sup>. En el caso de la médula espinal la decisión se justifica por ser la primera estación de relevo en la transmisión de la información nociceptiva desde la periferia a zonas supraespinales<sup>231</sup>. Además, se reconoce el papel que ejerce el sistema opioide y cannabinoide en la modulación de la transmisión nociceptiva a este nivel en numerosos estudios<sup>232,233</sup>.

Para la realización de los procedimientos histológicos las muestras fueron rápidamente extraídas y congeladas sobre hielo seco. En caso de las muestras obtenidas de la médula espinal los tejidos fueron embebidos en gel criogénico (Tissue-Teck, Sakura, CA, USA) previa a la congelación. Posteriormente, fueron seccionadas, obteniendo cortes coronales de 20 µm de grosor, y montadas sobre portaobjetos gelatinizados libres de ARNasas. Los cortes cerebrales y espinales (seis portas/ núcleo; dos secciones/porta) se obtuvieron

de forma seriada con el fin de obtener secciones rostrales y caudales en un mismo portaobjetos.

Los cortes obtenidos se almacenaron a -80°C hasta el día del estudio.

### 5.5.1. Autorradiografía de unión de [<sup>35</sup>S]GTPγS estimulada por WIN-55,940 y DAMGO

**La autorradiografía** es una técnica que permite visualizar la distribución de moléculas marcadas radiactivamente en un tejido biológico. El principio básico es el uso de un isótopo radiactivo que se une a una molécula de interés como puede ser un receptor. Al introducir esta molécula en la muestra, se localiza específicamente en áreas donde su receptor está presente.

En nuestro caso se empleó para *evaluar la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) en las secciones de tejido nervioso*<sup>234</sup> (**Figura 21**). El [<sup>35</sup>S]GTPγS es un análogo del GTP que se une al centro activo GTPásico de las proteínas G al igual que lo hace el GTP; sin embargo, el enlace γ-tiofosfato es resistente a la hidrólisis por lo que se previene la recomposición de heterotrímero y se produce una acumulación de subunidades Gα marcadas de forma radiactiva. De esta manera, la cantidad de radiactividad unida será directamente proporcional al grado de activación de las proteínas G.

Las características principales de esta técnica son: 1) **Sensibilidad a la activación del receptor**: La técnica detecta específicamente los GPCR que han sido activados por un agonista, lo que permite evaluar su función en condiciones fisiológicas o patológicas; 2) **Información anatómica y funcional**: Proporciona una imagen visual de la distribución de los GPCR activos en el tejido, lo que permite correlacionar la actividad del receptor con la estructura neuronal; 3) **Especificidad para GPCR**: Sólo visualiza los GPCR acoplados a proteínas G que están involucrados en la transducción de señales, excluyendo otros tipos de receptores.

Los ensayos de actividad del receptor por [<sup>35</sup>S]GTPγS son una medida de la estimulación por los ligandos de las proteínas G que interaccionan con los receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

Para llevarla a cabo se requiere la inactivación previa de las proteínas G, desplazándolas hacia su estado basal mediante la presencia de un exceso de nucleótido GDP. Esto garantiza que las proteínas G estén en su forma inactiva antes de iniciar la activación inducida por el agonista. Además, para asegurar que la señal medida sea específica del receptor se emplean varias concentraciones de agonistas, lo que provoca la activación del receptor y, como consecuencia, el intercambio en las proteínas G y su posterior activación. La actividad obtenida se determina como el porcentaje de activación específica respecto a la activación basal, la cual se define como la cantidad de radiactividad unida en ausencia de agonista. Al igual que en los experimentos de saturación y competencia se calcula la unión no específica, en este caso se establece como unión no específica a la radiactividad unida en presencia de una concentración saturante de GTP $\gamma$ S sin marcar (10  $\mu$ M). Los parámetros que podemos obtener en esta técnica son la dosis efectiva media o EC50, definida como la concentración de ligando necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima. Este valor nos da una idea de la potencia del ligando. El otro parámetro es la activación máxima y éste nos da una idea de la eficacia del ligando.

Para su realización se siguió el protocolo descrito por Sim y cols<sup>235</sup> usando el agonista del receptor CB1, WIN-55,212-2, y el agonista  $\mu$ -opioide, DAMGO, respectivamente (**Figura 21**). Las fases para su consecución son las siguientes:

- A) Preparación del tejido:** las muestras seccionadas se montaron sobre portaobjetos gelatinizados libres de ARNasas.
- B) Lavado e incubación:** Los portaobjetos fueron enjuagados en un tampón de ensayo (50 mM Tris, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, pH 7.4) a 25°C durante 10 minutos. A continuación, las secciones fueron incubadas con 2 mM de GDP en tampón de ensayo durante 30 minutos a 25°C. Inmediatamente después, las secciones se incubaron durante dos horas a 25°C en tampón de ensayo con 0.04 nM de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, 2 mM de GDP y el agonista  $\mu$ -opioide DAMGO 3  $\mu$ M o el agonista del receptor CB1, WIN-55,212-2 3  $\mu$ M. La actividad basal se evaluó sin agonista, mientras que la unión no específica se midió con 10  $\mu$ M de GTP $\gamma$ S no marcado.
- C) Autorradiografía y análisis:** Después de la incubación, las láminas fueron enjuagadas dos veces con tampón de Tris 50 mM (pH 7.4) y una vez con agua desionizada fría, secadas al aire y expuestas a una película (Kodak BioMax MR-1, Amersham, Madrid, España) durante 24-48 horas. Los

autoradiogramas se analizaron con una PC utilizando el programa NIH Image de dominio público (desarrollado en los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. y disponible en línea en <https://imagej.net/>). Las densidades ópticas fueron calculadas restando en cada medida "estimulada" su valor basal correspondiente.

La elección de la autorradiografía de unión de [35S]GTPγS se justifica por su capacidad de:

1. **Medición de la activación de receptores específicos:** WIN-55,940 es un *agonista selectivo de los CB1r*, mientras que DAMGO es un *agonista selectivo de los μ-OR*. Ambos receptores desempeñan roles clave en la regulación del dolor. La técnica de autorradiografía con [35S]GTPγS permite detectar la activación de estas proteínas G acopladas a los receptores cuando son estimulados por agonistas como WIN-55,940 y DAMGO, proporcionando una medida funcional de la eficacia de la activación del receptor.
2. **Evaluación cuantitativa de la señalización intracelular:** En presencia de agonistas, el intercambio de GTP por GDP en la subunidad α de la proteína G es un paso esencial en la transmisión de señales intracelulares. El uso de [35S]GTPγS como marcador permite visualizar y cuantificar la activación de las proteínas G, dado que este compuesto no es hidrolizado, y su unión se acumula, permitiendo una medición precisa de la señalización receptor-proteína G.
3. **Estudio de mecanismos moleculares de analgesia:** Tanto los CB1r como los μ-OR están implicados en la modulación de la nocicepción. El uso de esta técnica ayuda a entender cómo la activación de estos receptores puede inhibir la transmisión del dolor, proporcionando una base molecular para la acción antinociceptiva de los cannabinoides y opioides.
4. **Localización y cuantificación:** La autorradiografía permite, no sólo cuantificar la activación de los receptores, sino también localizar anatómicamente en el cerebro y la médula espinal las áreas donde ocurre dicha activación. Esto es especialmente relevante en el estudio del dolor, ya que permite identificar las regiones cerebrales y medulares clave en la regulación de la antinocicepción.
5. **Evaluación de la eficacia farmacológica:** Al usar agonistas específicos como WIN-55,940 y DAMGO, se puede comparar la eficacia de diferentes compuestos en la activación de los receptores cannabinoides y opioides, lo

que es crucial para desarrollar nuevos fármacos analgésicos o mejorar las terapias existentes.

### 5.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real) es una técnica de elección para estudiar los mecanismos moleculares del dolor a nivel de expresión génica<sup>236</sup> (**Figura 22**). Al permitir cuantificar de manera precisa y sensible los niveles de ARNm permite identificar nuevos biomarcadores y evaluar la eficacia de tratamientos analgésicos en diversos modelos de dolor, desde el dolor agudo hasta el crónico<sup>237,238</sup>.

Este procedimiento se diferencia de la PCR convencional en que utiliza una *técnica de detección en tiempo real* que permite medir la cantidad de ADN amplificado durante el ensayo<sup>239</sup>. Así, se utiliza una *sonda fluorescente* que se hibrida con la secuencia amplificada y emite una señal fluorescente cuando se excita con luz a una longitud de onda específica. A medida que se amplifica el ADN, aumenta la cantidad de sonda fluorescente unida al ADN amplificado, lo que se traduce en un aumento en la señal fluorescente detectada.

La técnica de RT-PCR se utiliza para la detección y amplificación de ARN. Permite estudiar la expresión de determinados genes.

Las fases para su consecución son las siguientes (**Figura 22**):

1. **Transcripción inversa:** En primer lugar, se extrae el ARN de las células en estudio, el cual es posteriormente transcrito a ADN mediante una transcriptasa inversa para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc). Esto se hace porque el ADN es más estable y fácil de amplificar que el ARN. Por cada molécula de ARN, se sintetiza una molécula de ADN complementario (cADN).
2. **Amplificación: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Una vez que se ha obtenido el ADNc, se utiliza la técnica de PCR para hacer muchas copias de este ADN. La PCR implica ciclos repetidos de calentamiento y

enfriamiento para desnaturalizar el ADN, unir cebadores específicos y extender la cadena de ADN.

3. **Detección: cuantificación en tiempo real:** Esto se logra mediante la detección de una señal fluorescente que aumenta a medida que avanza la reacción de amplificación.

En nuestro caso se utilizó para evaluar los cambios en la expresión génica de los CB1r (Cnr1), CB2r (Cnr2),  $\mu$ -OR (Oprm1) y TRPV1 en respuesta a la aplicación de estímulos térmicos o mecánicos en la médula espinal lumbar y en diferentes regiones cerebrales. Las muestras se obtuvieron aproximadamente 2,5 horas después de la exposición a los estímulos nocivos (placa caliente o filamentos de von Frey) tras el sacrificio de los animales, la obtención del tejido y su preparación. Para ello, se cortaron a 500  $\mu$ m, se montaron en portaobjetos y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se disecaron siguiendo el método descrito por Palkovits<sup>240</sup>. El ARN total fue extraído de los punzones cerebrales y de la región lumbar utilizando el reactivo de extracción de ARN total Biozol® (Bioflux, Inilab, Madrid, España). Tras la digestión con ADNasa, la transcripción inversa se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Kit de Transcripción Inversa de Alta Capacidad con Inhibidor de RNasa, Applied Biosystems, Madrid, España). La expresión de los genes Cnr1, Cnr2, Oprm1 y TRPV1 se midió utilizando ensayos de expresión génica Taqman® (Rn00562880\_m1, Rn01637602\_gh, Rn01430371\_m1 y Rn01460299\_m1, respectivamente) (Applied Biosystems, Madrid, España), empleando un colorante fluorescente específico para ADN bicatenario, y se realizaron en el sistema de detección de secuencias StepOne (Applied Biosystems, Madrid, España). El gen de referencia utilizado fue el ARN ribosómico 18S, detectado usando los reactivos de control de ARN ribosómico Taqman®. Todas las combinaciones de cebadores y sondas fueron optimizadas y validadas para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los datos de cada gen diana fueron normalizados con respecto al gen endógeno de referencia, y el cambio en la abundancia del gen objetivo se midió usando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ <sup>241</sup>.

La RT-PCR se empleó por ser una herramienta poderosa y versátil en la investigación de los mecanismos moleculares del dolor a nivel de expresión génica.

## 5.6. Diseño experimental

### 5.6.1. Primera fase: Búsqueda de una dosis subefectiva de morfina y UCM707 IT usando la prueba de placa caliente (Figura 20)

**Experimento 1: Evaluación de la antinocicepción de la morfina y el UCM707 IT (Figura 23).** Una semana antes del experimento (día -7), se implantó un catéter IT en cada rata. Posteriormente, el día 0 los animales se distribuyeron en 5 grupos en los que se utilizaron al menos 6 ratas por grupo para recibir: 1) solución salina, 2) morfina (1 µg), 3) morfina (5 µg), 4) morfina (10 µg); 5) UCM707 (75 µg) . Se evaluó el efecto antinociceptivo mediante el test de la placa caliente en forma de porcentaje del efecto máximo posible (% EMP). Para ello se obtuvo el umbral de dolor en tres momentos: antes de la administración del fármaco y a los 30 y 120 minutos después. A continuación, se sacrificaron las ratas y se recolectaron los cerebros y las médulas espinales para realizar estudios de autorradiografía de unión de [<sup>35</sup>S] GTP γS con DAMGO o WIN-55,212-2 y estudios de RT-PCR.

**Experimento 2: Evaluación de la antinocicepción ejercida por la coadministración IT de una dosis subefectiva de morfina y UCM707 (Figura 23).** Tras confirmar la ausencia de un efecto antinociceptivo del UCM707 75 mg, se evaluó la acción antinociceptiva de una dosis subefectiva de morfina IT y UCM707 utilizando una prueba de la placa caliente. Aunque este experimento se realizó y analizó por separado, el diseño del estudio y el método de recolección de datos fueron idénticos al anterior.

### **5.6.2. Segunda fase: Evaluación de la antinocicepción de dosis subefectivas de morfina más UCM707 IT en la modulación de la alodinia y los mecanismos subyacentes a estos efectos (Figura 19)**

Con el objetivo de evaluar la eficacia antinociceptiva de una combinación subefectiva de morfina más UCM707 administrada por vía IT en un modelo que simule de manera realista el DPO experimentado en la clínica se realizaron diversos experimentos dirigidos a la obtención de datos durante los 4 días posteriores a la incisión quirúrgica en un modelo de dolor postincisional en ratas (Figura 19).

**Experimento 1: Curso temporal de los experimentos de la 2ª fase. Evaluación de la antinocicepción de la morfina más UCM707 por vía IT en un modelo de dolor postincisional (Figura 24).** Una semana antes del experimento (día -7), se implantó un catéter IT en cada rata. Previamente a su implantación y antes de la realización de la incisión quirúrgica (día 0) se obtuvo un valor de referencia de la nocicepción mecánica para evaluar la alodinia mecánica. Posteriormente, los días 1 y 4 posteriores a la cirugía, se midió la alodinia táctil 15 minutos antes y 30, 60 y 120 minutos después de administrar una solución salina o la coadministración de UCM707 + morfina. Al finalizar el día 4, las ratas fueron sacrificadas, se extrajo la médula espinal y se almacenó a -80 °C para estudios de RT-PCR.

**Experimento 2: Esclarecimiento de los mecanismos subyacentes a los efectos de la morfina + UCM707 por vía IT (Figura 24).** En los días 1 y 4 posteriores al dolor por incisión se preadministró naloxona (12 µg), SR141716A (30 µg), AM630 (10 µg) o AMG9810 (30 µg) 30 minutos antes de la administración de morfina (1 µg) + UCM707 (75 µg) para evaluar los efectos sobre la alodinia táctil mediante filamentos de von Frey a los 30, 60 y 120 minutos de su administración. Aunque este experimento se realizó y analizó por separado, el diseño del estudio y el método de recolección de datos fueron idénticos al anterior.

## 5.7. Análisis de los datos

De acuerdo con los requisitos de los datos experimentales, se realizaron un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, un ANOVA de dos vías con medidas repetidas y una prueba t de Student. Las pruebas post hoc se aplicaron únicamente cuando el ANOVA (valor F) indicó significancia. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Sigma Plot v11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Se consideraron significativas las diferencias con una probabilidad de error inferior al 5%. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.

## **6. RESULTADOS**

---



## **1. Efecto antinociceptivo.**

### **Fase 1: Efectos en el test de la placa caliente.**

- La administración IT de morfina (5 y 10 µg) produjo un efecto antinociceptivo significativo a los 30 y 120 minutos post-administración.
- Dosis de morfina IT 1 µg y UCM707 75 µg por separado no mostraron efecto antinociceptivo.
- La combinación de dosis subefectivas IT de morfina 1 µg y UCM707 75 µg produjo un efecto antinociceptivo significativo en ambos intervalos de tiempo.

### **Fase 2: Efectos en el modelo de dolor postincisional.**

- La combinación IT de morfina 1µg y UCM707 75µg fue antinociceptiva a los 30, 60 y 120 minutos post-administración, tanto en la zona proximal como distal de la incisión quirúrgica.
- El efecto máximo se observó a los 30 minutos, disminuyendo progresivamente hasta desaparecer a las 4 horas.
- Se observó una reversión significativa de la hiperalgesia en el primer y cuarto día postoperatorio, con mayor eficacia el primer día.

## **2. Expresión génica.**

- La combinación IT de UCM707 y morfina aumentó significativamente la expresión de los receptores Cnr1, Cnr2 y TRPV1.
- No se observó cambio en la expresión del receptor Oprm1.
- Estos cambios sugieren una modulación de la señalización del SEC y la respuesta a opioides, aunque la falta de cambio en Oprm1 no descarta su implicación funcional en los efectos analgésicos.

## **3. Receptores y temporalidad**

- La modulación del efecto antinociceptivo por antagonistas específicos sugiere que la analgesia inducida por la combinación IT de UCM707 y morfina es mediada por diferentes receptores según el tiempo postoperatorio: A) *Primer día postoperatorio*: CB1r y µ. B) *Cuarto día postoperatorio*: CB2r y µ.
- Observaciones adicionales: 1) CB1r ejerce una acción nociceptiva el cuarto día postoperatorio. 2) El receptor TRPV1 está implicado tanto el primer como el cuarto día postoperatorio.



Los resultados están englobados en el artículo 2 (ANEXO): *Carrascosa AJ, García-Gutiérrez MS, Saldaña R, Manzanares J. Additive antinociceptive action of intrathecal anandamide reuptake inhibitor and morphine in the management of post-incisional pain in rats.* Biomed Pharmacother. 2024 Aug; 177:117054. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117054. Epub 2024 Jun 28. PMID: 38943991.

## 6.1. Fase 1. Efectos antinociceptivos de la administración IT de la morfina y UCM707 en el test de la placa caliente.

### 6.1.1. Pruebas de comportamiento: respuesta a la estimulación nociceptiva térmica.

La administración de morfina IT a dosis de 5 µg y 10 µg indujo una respuesta antinociceptiva significativa evidenciada por un aumento significativo del EMP (%) a los 30 (**Figura 25A**) y 120 minutos (**Figura 25B**). En contraste, dosis menores de morfina IT (1 µg) y el compuesto UCM707 (75 µg) sólo mostraron un efecto antinociceptivo poco relevante a los 30 minutos (**Figura 25A**), sin evidenciar cambios significativos respecto al control (salino) a los 120 minutos (**Figura 25B**). Sorprendentemente, la combinación de las 2 sustancias a dosis bajas (morfina 1 µg y UCM707 75 µg) por vía IT produjo un efecto antinociceptivo sostenido en los tiempos evaluados (30 minutos: ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F_{(5, 47)}: 25.878, p < 0.001$ ; **Figura 25A**) (120 minutos: ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F_{(5, 44)}: 9.322, p < 0.001$ ; **Figura 25B**) (n= 7-9).

La administración IT de morfina a dosis altas (5 y 10 µg) produjo un efecto antinociceptivo prolongado. Sin embargo, dosis bajas de morfina (1 µg) y UCM707 (75 µg) sólo mostraron un efecto a corto plazo. Por otra parte, la combinación de las dos sustancias a dosis subefectivas indujo un efecto antinociceptivo significativamente mayor y más duradero en comparación con el obtenido con cada sustancia por separado, lo que sugiere un posible efecto sinérgico entre ambos compuestos.

## 6.1.2. Procedimientos histológicos.

### 6.1.2.1 Autorradiografía de unión de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO.

La administración de dosis bajas de morfina (1  $\mu$ g) no provocó alteraciones en la activación del receptor  $\mu$ -opioide en el PAG ( **Figura 26A** y **Figura 26B** ), pero redujeron la estimulación en el LS (**Figura 26AC** y **Figura 26D**). Por el contrario, dosis intermedias y altas de morfina (5 y 10  $\mu$ g) disminuyeron la activación del receptor  $\mu$ -opioide tanto en el PAG como el LS en comparación con el grupo de vehículo. De manera interesante, el UCM707 (75  $\mu$ g) y su combinación con morfina a baja dosis (1  $\mu$ g) no produjeron cambios en la en el PAG y LS en la activación del receptor  $\mu$ -opioide en ninguna de las regiones estudiadas, sugiriendo un mecanismo de acción diferente (PAG: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F_{(5, 45)} = 6.987$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 26A** y **Figura 26B** ) (LS: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student Newman-Keuls;  $F_{(5, 44)} = 8.353$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 26C** y **Figura 26D** ) (n = 7-9).

La administración de morfina indujo una disminución dosis-dependiente en la activación del receptor  $\mu$ -opioide en el PAG y el LS. Dosis bajas de morfina sólo afectaron al LS, mientras que dosis más altas produjeron una inhibición en ambas regiones. El UCM707 y su combinación con morfina a baja dosis no modificaron la activación de este receptor en ninguna de las regiones estudiadas.

### 6.1.2.2 Autorradiografía de unión de [<sup>35</sup>S]GTPγS estimulada por WIN55,212.

No se observaron modificaciones en la función del receptor CB1 en el área gris periacueductal (PAG) con ninguno de los fármacos administrados (**Figura 27A**). Sólo las dosis altas de morfina (10 µg) aumentaron significativamente la función del receptor CB1 en la médula espinal lumbar sacra (LS) administrados (**Figura 27B y Figura 27C**) (PAG: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F(6, 49) = 0.846$ ,  $p = 0.542$ ; **Figura 27A**) (LS: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F(5, 36) = 4.363$ ,  $p = 0.004$ ; **Figura 27B y Figura 27C**) ( $n = 7-9$ ).

Ninguno de los tratamientos modificó significativamente la actividad del receptor CB1 en el PAG. Sin embargo, las dosis altas de morfina aumentaron significativamente la función de este receptor en la médula espinal. Estos resultados sugieren que la modulación del receptor CB1 en la médula espinal podría estar involucrada en los efectos analgésicos de las dosis altas de morfina, mientras que otros tratamientos no parecen afectar este mecanismo.

### 6.1.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR).

Los resultados revelaron que UCM707 (75 µg) aumentó significativamente la expresión de Cnr2 (**Figura 28B**) y Oprm1 (**Figura 28D**) en el LS en comparación con el grupo de vehículo. Sin embargo, UCM707 (75 µg) no modificó la expresión de Cnr1 (**Figura 28A**) ni de TRPV1 (**Figura 28C**) cuando se administró solo. Curiosamente, la combinación de UCM707 (75 µg) + morfina (1 µg) aumentó significativamente la expresión de Cnr1, Cnr2, TRPV1 y Oprm1 en el LS en comparación con el grupo de vehículo. (Cnr1: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F_{(2, 27)} = 5,425$ ,  $p = 0,011$ ; Fig. 4A (n = 8-14), Cnr2: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F_{(2, 18)} = 23,334$ ,  $p < 0,001$ ; Fig. 4B (n = 6-8); TRPV1: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F_{(2, 21)} = 3,403$ ,  $p = 0,05$ ; Fig. 4C (n = 6-9); Oprm1: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls;  $F_{(2, 31)} = 13,853$ ,  $p < 0,001$ ; **Figura 28D** (n = 11-15).

El UCM707 por sí solo aumentó significativamente la expresión de los receptores cannabinoides tipo 2 (Cnr2) y opioides  $\mu$  (Oprm1) en la LS. Sin embargo, al combinarlo con morfina, se observó un aumento sinérgico en la expresión de todos los receptores estudiados (Cnr1, Cnr2, TRPV1 y Oprm1) en esta región. Estos resultados sugieren que la combinación de UCM707 y morfina podría potenciar los efectos analgésicos a través de la modulación de múltiples vías receptoras en la médula espinal.

## 6.2. Fase 2. Efectos antinociceptivos de la administración IT de dosis subefectivas de morfina y UCM707 en un modelo de dolor postincisional.

### 6.2.1. Respuesta a la nocicepción mecánica.

La coadministración por vía IT de morfina y UCM707 a dosis subefectivas indujo un efecto antinociceptivo significativamente mayor en comparación con el grupo control a los 30, 60 y 120 minutos del día 1, tanto a nivel proximal (**Figura 29A**) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: Grupo  $F_{(1,53)} = 32.235$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2, 53)} = 0.459$ ,  $p = 0.635$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(2,53)} = 0.309$ ,  $p = 0.735$ ) como a nivel distal (**Figura 29B**) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: Grupo  $F_{(1,54)} = 30.525$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2, 54)} = 6.136$ ,  $p = 0.004$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(2,53)} = 6.873$ ,  $p = 0.002$ ), en comparación con el grupo control. De manera similar, se observaron resultados parecidos en el día 4, con un aumento del EMP% en cada punto de tiempo evaluado tanto a nivel proximal (**Figura 29C**) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: Grupo  $F_{(1,56)} = 36.720$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2, 56)} = 1.150$ ,  $p = 0.324$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(2,56)} = 1.220$ ,  $p = 0.303$ ) como a nivel distal (**Figura 29D**) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: Grupo  $F_{(1,55)} = 14.840$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2, 55)} = 0.393$ ,  $p = 0.677$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(2,55)} = 2.003$ ,  $p = 0.145$ ).

Los resultados demostraron que la combinación de morfina y UCM707 a dosis subefectivas produjo un efecto analgésico significativamente mayor y más duradero en comparación con el uso individual de cada fármaco, tanto a nivel proximal como distal. Este efecto sinérgico se mantuvo durante los cuatro días de evaluación .

### 6.2.2. Procedimientos histológicos: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR).

La coadministración por vía IT de morfina y UCM707 a dosis subefectivas indujo un aumento significativo en la expresión de los genes **Cnr1** (prueba t de Student,  $t = -11.570$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 30A** ), **Cnr2** (prueba t de Student,  $t = -15.940$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 30B** ) y **TRPV1** (prueba t de Student,  $t = -7.516$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 30C** ) (n = 6-8) en la médula espinal lumbar (LS). En contraste, no se observó ningún efecto en la expresión génica de **Oprm1** (prueba t de Student,  $t = -0.646$ ,  $p = 0.531$ ; **Figura 30D**) (n = 6-8) en la LS.

La coadministración por vía IT de morfina y UCM707 a dosis subefectivas aumentó significativamente la expresión de genes relacionados con los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) y el receptor vaniloide (TRPV1) en la médula espinal. Este hallazgo sugiere que la combinación de estos fármacos podría producir un efecto analgésico al activar estos sistemas. Sin embargo, no se observó ningún cambio en la expresión de los receptores opioides  $\mu$ , lo que indica que el mecanismo de acción principal de esta combinación no se debe a una mayor activación de estos receptores

### 6.2.3. Efectos de los antagonistas naloxona, SR141716A, AM630 y AMG9810 sobre los efectos antinociceptivos obtenidos tras la administración IT de morfina (1 µg) + UCM707 (75 µg) en el modelo de dolor por incisión en ratas.

En el día 1, la coadministración por vía IT de morfina y UCM707 a dosis subefectivas indujo un efecto antinociceptivo, evidenciado por un aumento del % EMP a los 30, 60 y 120 minutos a nivel proximal en comparación con el grupo vehículo. La naloxona y el SR141716A revirtieron los efectos de UCM707 + morfina, ya que redujeron el % EMP en cada punto temporal evaluado. El antagonismo del receptor CB2 por el AM630 y el antagonismo del receptor TRPV1 por el AMG9810 no modificaron los efectos de UCM707 + morfina (**Figura 31A**) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: grupo  $F_{(5,84)} = 12.283$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2,84)} = 5.157$ ,  $p = 0.008$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(10,84)} = 2.656$ ,  $p = 0.007$ ).

A nivel distal, la combinación de UCM707 + morfina mostró un aumento del % EMP a los 30 y 60 minutos en comparación con las ratas tratadas con vehículo. La naloxona revirtió los efectos de la combinación solo a los 30 minutos. No se observó ningún efecto sobre la antinocicepción inducida por UCM707 + morfina con SR141716A o AM630. Curiosamente, el AMG9810 incrementó significativamente el % EMP inducido por UCM707 + morfina a los 60 minutos (**Figura 31B**) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: grupo  $F_{(5,82)} = 9.496$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2,82)} = 16.129$ ,  $p < 0.001$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(10,82)} = 2.676$ ,  $p = 0.007$ ).

El día 4, la coadministración por vía IT de morfina y UCM707 a dosis subefectivas indujo un efecto antinociceptivo, aumentando el % EMP a los 30 y 60 minutos, pero no a los 120 minutos a nivel proximal (**Figura 31C**). La naloxona y el AM630 revirtieron los efectos de UCM707 + morfina en ambos momentos, 30 y 60 minutos. De manera interesante, el SR141716A incrementó significativamente los efectos antinociceptivos de UCM707 + morfina a los 30, 60 y 120 minutos. El antagonista AMG9810 también mejoró los efectos de UCM707 + morfina a los 30 y 120 minutos (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: grupo  $F_{(5,80)} = 4.964$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2,80)} = 0.562$ ,  $p = 0.572$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(10,80)} = 0.0982$ ,  $p = 1.000$ ). A nivel distal, sólo la combinación

de SR141716A y AMG9810 con UCM707 + morfina aumentó el % EMP a los 30, 60 y 120 minutos (**Figura 31D**) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas: grupo  $F_{(5,84)} = 13.647$ ,  $p < 0.001$ ; tiempo  $F_{(2,84)} = 6.802$ ,  $p = 0.002$ ; interacción grupo x tiempo  $F_{(10,84)} = 2.534$ ,  $p = 0.010$ ).

Los resultados resaltan la importancia de la modulación temporal de diferentes receptores en el tratamiento del DPO. Así:

1. La combinación de UCM707 y morfina a dosis subefectivas tiene un efecto antinociceptivo claro en el día 1, mediado principalmente por los receptores  $\mu$ -opioides y CB1, mientras que los receptores CB2 y TRPV1 parecen no estar involucrados en las primeras fases del dolor.
2. En el día 4, el receptor CB2 comienza a desempeñar un papel más importante, ya que su bloqueo con AM630 revierte la antinocicepción. Además, el bloqueo del receptor CB1 con SR141716A mejora inesperadamente los efectos analgésicos, lo que sugiere una interacción compleja en la fase tardía del dolor.
3. El receptor TRPV1 está implicado tanto en las fases tempranas como tardías del dolor, y su antagonismo con AMG9810 mejora los efectos antinociceptivos de la combinación, especialmente a nivel distal.

## **7. DISCUSIÓN**

---



Esta tesis demuestra que **la coadministración IT de dosis subefectivas de morfina y UCM707 induce un efecto antinociceptivo robusto y prolongado para el alivio del dolor postincisional en ratas**. Los principales hallazgos que respaldan esta conclusión son: 1) *La respuesta antinociceptiva al estímulo mecánico fue significativamente mayor y más duradera en comparación con el uso individual de cada fármaco*, tanto a nivel proximal como distal a la incisión de la pata posterior de la rata. Este efecto se mantuvo durante los cuatro días de evaluación. 2) *Se detectó un aumento de la expresión génica de Cnr1, Cnr2, y TRPV1 en la médula espinal lumbar (LS) de las ratas tratadas con la combinación de UCM707 y morfina*. Sin embargo, no se apreciaron cambios en la expresión de Oprm1, lo que sugiere que el mecanismo de acción principal de esta combinación no depende de una mayor activación de los receptores  $\mu$ -OR. Además, los resultados obtenidos enfatizan la importancia de la *modulación temporal de diferentes receptores en el tratamiento del DPO*. Así: 1) En el día 1, *el efecto antinociceptivo se atribuye principalmente a la activación de los receptores CB1r y  $\mu$ -OR*, mientras que los receptores CB2 y TRPV1 no parecen desempeñar un papel relevante en esta fase inicial. 2) En el día 4, *el receptor CB2r cobra mayor relevancia*, como lo demuestra el hecho de que su bloqueo con AM630 revierte el efecto antinociceptivo. Curiosamente, el antagonismo de CB1 con SR141716A incrementa la antinocicepción, lo cual sugiere una interacción compleja de este receptor en etapas tardías del dolor. 3) *El receptor TRPV1 contribuye tanto en las fases tempranas como tardías del dolor*. Su antagonismo con AMG9810 potencia el efecto antinociceptivo de la combinación, especialmente en áreas distales al sitio de incisión.

De acuerdo con la bibliografía disponible, **es la primera vez que se evalúa la eficacia de los E-CBRs** como coadyuvantes de la morfina IT para el alivio del dolor. A pesar de las numerosas investigaciones que han relevado propiedades neurobiológicas similares y significativas interacciones funcionales entre los sistemas opioide y SEC<sup>242</sup> -entre las que se incluye la formación de heterodímeros entre los CBr y los  $\mu$ -OR cuando se coexpresan en la misma neurona<sup>161</sup> y la capacidad de los cannabinoides de estimular la síntesis y liberación de péptidos opioides endógenos tanto a nivel central como periférico<sup>53,160</sup> -, los estudios se han centrado en analizar la interacción entre los 2 sistemas coadministrando cannabinoides y opioides exógenos por vía sistémica<sup>131,243</sup>, IT<sup>129,168</sup>, e intracerebroventricular<sup>169</sup>, o valorando la analgesia cannabinoide mediante la inhibición del metabolismo de los eCBs<sup>244</sup>. Hasta la

fecha, la evidencia sugiere que *los cannabinoides podrían desempeñar un papel relevante en la reducción del uso de opioides*<sup>245</sup>. Así, los estudios sugieren la existencia de un efecto sinérgico en dos escenarios específicos: cuando un opioide se coadministra junto a un cannabinoide a una dosis ineficaz<sup>246</sup> o cuando ambos, opioide y cannabinoide, se administran a dosis subefectivas<sup>247</sup>. Sin embargo, *la magnitud y naturaleza de este efecto no es uniforme pues varía dependiendo del tipo de cannabinoide, su perfil farmacológico y su combinación con opioides específicos*<sup>245</sup>. Además, estudios adicionales han reportado *interacciones complejas entre antagonistas de CB1r y  $\mu$ -OR*. Por ejemplo, el antagonismo de CB1 con AM251 revierte la antinocicepción periférica inducida por morfina, pero no la inducida por agonistas del  $\delta$ -OR en modelos de dolor inflamatorio<sup>248</sup>, o la antinocicepción central en un modelo de dolor térmico agudo<sup>249</sup>. Por otra parte, varios grupos han informado que los efectos antihiperálgicos de los inhibidores FAAH, la enzima que degrada la AEA, pueden ser bloqueados por la naloxona o la norbinaltorfimina (nor-BNI), el antagonista del receptor opioide kappa (KOR)<sup>244,250</sup>. Estos hallazgos respaldan la hipótesis que el aumento de los niveles de eCBs mediante el uso de inhibidores de la degradación de eCB induce antinocicepción por un mecanismo similar a la activación directa de CB1r con THC o CP 55,490 a través de la liberación de péptidos opioides endógenos. Asimismo, este efecto podría extenderse más allá de los CB1r. La activación directa de los CB2r, típicamente ubicados en la periferia, también induce antinocicepción al desencadenar la liberación de péptidos opioides endógenos, como la betaendorfina<sup>251</sup>. Aun así, a pesar de la evidencia que respalda el papel de los eCBs en el alivio del dolor<sup>51,252</sup> y la efectividad de inhibir las enzimas FAAH y MAGL (responsables de la degradación de los eCBs) para reducir el dolor<sup>253</sup>, la investigación también revela complejidades que plantean interrogantes sobre el potencial terapéutico de la combinación de los cannabinoides y opioides. En este sentido, los estudios han mostrado tanto aumento como disminución en los niveles de eCBs, dependiendo de los tejidos implicados en la transmisión del dolor<sup>254,255</sup>, por lo que la respuesta puede ser dispar. Además, diversas investigaciones sugieren que bloquear los receptores CB1r y CB2r puede generar efectos analgésicos y antiinflamatorios<sup>117,256</sup>. Esto indica que los eCBs pueden actuar tanto como mediadores proinflamatorios como antiinflamatorios<sup>118,119</sup>, lo que implica que la activación del SEC podría ser perjudicial en ciertas situaciones.

Cabe reseñar que **los E-CBRIs emergen como una estrategia terapéutica prometedora para el alivio del DPO** en base a dos observaciones clave: 1) *Un déficit en la señalización espinal de AEA parece contribuir a la hiperalgesia post incisional*<sup>111</sup>. Los E-CBRIs podrían contrarrestar este efecto al normalizar los niveles de AEA y posiblemente actuar en sinergia con otros eCBs como el 2-AG para favorecer la resolución de la hipersensibilidad<sup>111</sup>; 2) *La activación del SEC mediante E-CBRIs podría ejercer efectos antinociceptivos al inhibir la fosforilación de la p38*, una proteína quinasa involucrada en procesos inflamatorios a nivel de los astrocitos espinales<sup>111</sup>. Adicionalmente, se deben de considerar otras ventajas potenciales como son: 1) *La restricción de la captación celular a través del transportador de membrana de la AEA puede evitar la activación de los TRPV1*, receptores que facilitan la transmisión de señales nociceptivas en la médula espinal<sup>184</sup>. En línea con esto, hay estudios conductuales que indican que la administración de antagonistas TRPV1 junto con AEA IT reduce la hipersensibilidad al dolor en diversos modelos de dolor<sup>185</sup>. Asimismo, limitaría la facilitación mediada por los canales TRPV1 de la transmisión hacia las neuronas excitatorias GABAérgicas en la asta dorsal, lo que contribuiría a reducir la inflamación neurogénica cutánea<sup>187</sup>. A ello hay que añadir que concentraciones elevadas de AEA en la médula espinal podrían disminuir la liberación de neurotransmisores a través de la activación de los receptores CB1r y CB2r<sup>189</sup>. 2) *Evitar el metabolismo de la AEA*. Inhibir la hidrólisis de AEA disminuye la formación del AA liberado por la hidrólisis de AEA. Al reducir su disponibilidad se evita que esta última sustancia sea sustrato para las ciclooxygenasas para producir prostaglandinas y moléculas relacionadas<sup>190</sup>. Como resultado, disminuirían las respuestas de las neuronas nociceptivas de la médula espinal a la estimulación mecánica, ya que las prostaglandinas sintetizadas a nivel central han jugado un papel clave en la amplificación del procesamiento del dolor en la médula espinal. La síntesis de prostaglandinas espinales está involucrada en el mantenimiento de la hipersensibilidad tras una lesión nerviosa<sup>191</sup>. 3) *La sinergia con los opioides*. La acumulación de la AEA permite una mayor interacción con las vías del dolor mediadas por los opioides y mejorar la antinocicepción producida por la morfina<sup>192</sup>. De esta manera se trabaja de forma sinérgica con el sistema opioide para controlar el dolor<sup>52,53</sup>. 4) *La activación de PPARs y adenosina*. La acumulación de AEA por fuera de la membrana celular puede proporcionar analgesia a través de otros mecanismos no opioides como la interacción con la adenosina IT. También podría ayudar a alcanzar las concentraciones necesarias para la activación de los receptores

activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)<sup>194</sup>. 5) *La modulación de la microglía*. Dado que la activación de la microglía también está asociada al dolor y los receptores CB2 pueden deprimir la activación de células inmunitarias a nivel espinal, no se puede descartar que la AEA pueda ejercer propiedades antiinflamatorias, lo que podría contribuir a sus efectos antinociceptivos<sup>110</sup>.

En esta tesis, **la administración de UCM707**, un potente y selectivo inhibidor de la captación de eCBs con una afinidad mínima por los receptores CB1r y CBR2r y los canales TRPV1<sup>183</sup>, **potencia los efectos antinociceptivos de la morfina IT, permitiendo reducir la dosis de opioide necesaria para el control del DPO**. Esta combinación ofrece varias ventajas asociadas al comportamiento de la AEA: 1) *Síntesis localizada y bajo demanda de los eCBs*: Este mecanismo evita los efectos secundarios asociados con la activación generalizada de los receptores cannabinoides en todo el sistema<sup>115</sup>; 2) *Vida media corta y menor toxicidad*: La existencia de enzimas encargadas de su degradación presentes en el organismo conlleva una vida media más corta y una toxicidad reducida<sup>94</sup>; 3) *Bajo riesgo de dependencia física* dado que la AEA es un agonista parcial del CB1<sup>55,257</sup>. En este contexto, la administración IT facilita la liberación dirigida a las áreas donde los componentes del SEC están expresados, como en la asta dorsal de la médula espinal. Esto facilita la interacción directa con los objetivos terapéuticos y una modulación eficaz de la señalización nociceptiva<sup>60,258</sup>. De esta manera se obtiene como ventaja adicional la interrupción de la transmisión del dolor a un nivel en el que los eCBs se sintetizan y liberan en circuitos neuronales activos mediando una respuesta adaptativa destinada a reducir el dolor y la inflamación como reacción a la lesión o al estrés<sup>121,179</sup>, lo que minimiza el estímulo nociceptivo que llega al cerebro con una menor dosis total de los fármacos administrados y, en consecuencia, la reducción de efectos secundarios<sup>233,259</sup>. Además, el incremento del tono endocannabinoide endógeno facilita la adaptación o habituación al estrés quirúrgico, proporcionando protección frente al desarrollo de disfunciones relacionadas con el estrés y, potencialmente, previniendo la perpetuación del DPO<sup>56</sup>.

**Para poder determinar si el UCM707 podía modificar el efecto antinociceptivo de la morfina IT se estableció una dosis subefectiva de morfina y UCM707 IT usando el test de la placa caliente (Figura 20)**. Esta prueba se seleccionó por su objetividad y capacidad para evaluar respuestas a nivel supraespinal ante estímulos nocivos sin inducir inflamación<sup>211</sup>. Además, existe una buena correlación entre los fármacos que producen antinocicepción

en esta prueba y los analgésicos utilizados en la práctica clínica para el tratamiento del dolor<sup>260</sup>. Nuestros resultados mostraron que *la administración de 5-10 µg de morfina IT incrementa las latencias de las respuestas nociceptivas y el porcentaje del efecto máximo posible (% MPE) de manera dosis-dependiente*. El efecto máximo se alcanzó a los 30 minutos, logrando una 76% de MPE con la dosis de 10 µg. La administración única de morfina IT (1µg) y UCM707 (75 µg) no indujo efectos antinociceptivos. Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran que la morfina IT induce un efecto antinociceptivo en modelos de dolor agudo a dosis superiores a 3 µg<sup>261</sup>. Además, se confirmó que, mientras que la morfina IT tiene una duración de acción de hasta 21 horas en primates<sup>262</sup> y 24 horas en perros y gatos<sup>263</sup>, su duración de acción es significativamente más corta en ratas - la mayoría de los estudios realizados en ratas reportan una duración de acción de aproximadamente 120 minutos<sup>264,265</sup>. De manera similar, se observó que *el UCM707 a una dosis de 75 µg produjo efectos antinociceptivos sólo a los 30 minutos*. Sorprendentemente, *la combinación de las dos sustancias a dosis subefectivas produjo un efecto antinociceptivo significativamente superior al obtenido por cada fármaco por separado*. Este resultado sugiere un efecto sinérgico o aditivo entre la morfina y UCM707.

Esta primera fase del estudio amplió los resultados conductuales con la evaluación de la activación funcional de los receptores µ-OR y CB1r mediante autoradiografía de unión de [<sup>35</sup>S]-GTPγs, con DAMGO y WIN-55,212-2 respectivamente, en la sustancia gris periacueductal (PAG) y la médula lumbosacra (LS). Estas regiones fueron seleccionadas por su relevancia en la nocicepción y por la conocida participación de los eCBs y péptidos opioides endógenos en la modulación del dolor a estos niveles<sup>228,230,266</sup>. Curiosamente, la administración de morfina en dosis intermedias (5 µg) y altas (10 µg) redujo la estimulación de los receptores µ-OR en las dos regiones (PAG y LS). Esta inhibición no respalda la disminución en la sensibilidad al dolor observada en el test de la placa caliente, ya que una disminución en la señalización transmembrana mediada por el receptor µ-OR se asociaría con hiperalgesia y no con antinocicepción<sup>267</sup>. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la antinocicepción observada en los animales no puede atribuirse a un aumento en la señalización del receptor µ-OR. Curiosamente, ni el tratamiento con UCM707 solo ni su combinación con morfina produjo cambios en la señalización del receptor µ-OR. En cuanto al receptor CB1r, los resultados de su activación

funcional, evaluada con WIN-55,212-2, mostraron un incremento significativo únicamente en el grupo de ratas tratadas con la dosis alta de morfina (10 µg) en el LS. Al igual que con el receptor µ-OR, no se observó ningún efecto en la activación del CB1r en las ratas tratadas con UCM707 o con la combinación de UCM707 y morfina. Estos hallazgos sugieren que *la combinación de UCM707 y morfina no produce una activación adicional de los sistemas de señalización µ-opioide y CB1 en las áreas evaluadas*, lo cual podría tener implicaciones en la búsqueda de estrategias analgésicas sinérgicas basadas en la modulación de estos sistemas.

Sin embargo, *la combinación de UCM707 y morfina aumentó la expresión génica de Cnr1, Cnr2, TRPV1 y Oprm1 en el área LS*. Las discrepancias entre los resultados de la unión estimulada de [35S]-GTPγS por agonistas de los receptores CB1r y µ-OR y los estudios de qPCR podrían estar relacionadas con el momento de recolección de las muestras (120 minutos). Es razonable especular que el cambio en la función de los receptores CB1r y µ-OR podría ser menos pronunciado en este punto temporal, dificultando su detección, especialmente considerando que los efectos analgésicos máximos se observaron a los 30 minutos. En contraste, el curso temporal necesario para observar cambios en la expresión génica coincide con el momento de recolección de las muestras, lo que podría explicar por qué se observan modificaciones a nivel de expresión génica y no en la activación funcional.

Sorprendentemente, la administración de UCM707 por sí solo aumentó la expresión génica de Cnr2 y Oprm1. Dado que la combinación de UCM707 y morfina mostró efectos antinociceptivos a los 120 minutos, mientras que UCM707 en solitario no produjo efectos en este punto temporal, es posible plantear la hipótesis de que el receptor TRPV1 y el receptor CB1r podrían desempeñar un papel relevante en los efectos antinociceptivos de la combinación, ya que UCM707 en solitario no modificó su expresión.

Estos hallazgos sugieren que *la combinación de UCM707 y morfina podría estar modulando mecanismos analgésicos adicionales a través de la regulación de genes específicos en el SEC y el sistema opioide, particularmente en el contexto de los receptores involucrados en la percepción del dolor como TRPV1, CB1r y µ-OR*.

**En la segunda fase del estudio, y basándonos en los resultados obtenidos en la prueba de la placa caliente, se evaluó la coadministración de dosis subefectivas de UCM707 y morfina en un modelo de dolor incisional en ratas.** En este modelo, una incisión quirúrgica provoca una hiperalgesia mecánica reproducible y cuantificable que simula el DPO de pacientes humanos<sup>199</sup>. A diferencia de otros modelos de dolor, la hipersensibilidad observada no se vincula principalmente a mecanismos de facilitación descendente desde la médula rostral ventromedial<sup>44</sup>. En su lugar, la evidencia sugiere una mayor implicación de la activación glial<sup>45,203</sup>. Estos hallazgos permiten considerar las interacciones neurona-glía como un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento del dolor postincisional<sup>46,47</sup>. En este caso, *la coadministración IT de dosis subefectivas de UCM707 y morfina indujo una reducción significativa de los comportamientos de dolor en los días 1 y 4 postincisión quirúrgica, con una máxima eficacia analgésica observada a los 30 minutos.* Estos hallazgos sugieren un efecto sinérgico o aditivo entre ambos compuestos, lo cual es particularmente relevante considerando que estudios previos han demostrado que la morfina puede reducir la nocicepción postincisional en ratas, pero requiriendo dosis más elevadas y diferentes vías de administración<sup>209,268</sup>. La importancia de estos resultados radica tanto en la utilización de la vía IT como en la demostración de efectos sinérgicos potenciales entre UCM707 y morfina, lo que podría permitir una reducción significativa en la dosis de opioides necesaria para mantener una analgesia efectiva.

Para esclarecer los mecanismos subyacentes a la antinocicepción espinal de esta combinación farmacológica se evaluó la expresión génica de elementos clave del sistema endocannabinoide (SEC) y del sistema opioide en la médula espinal LS cuatro días postcirugía. Los resultados mostraron que *la combinación de UCM707 y morfina incrementó significativamente la expresión génica de Cnr1, Cnr2 y TRPV1 en comparación con los controles tratados con vehículo, sin cambios en la expresión de Oprm1.* La falta de efecto sobre Oprm1 podría estar relacionada con el momento de recolección de las muestras (día 4 y 120 minutos después de la administración de UCM707 y morfina). No obstante, la ausencia de cambios en la expresión génica no descarta que el receptor  $\mu$ -OR esté involucrado funcionalmente en los efectos antinociceptivos de la combinación.

Para explorar más a fondo el papel de estos receptores en la antinocicepción espinal inducida por la combinación IT de UCM707 y morfina, se preadministraron antagonistas específicos por vía IT antes de la

coadministración de la combinación: el antagonista opioide naloxona<sup>219</sup>, el antagonista del receptor CB1r SR141716A<sup>125</sup>, el antagonista del receptor CB2 AM360<sup>110</sup> y el antagonista de TRPV1 AMG9810<sup>225</sup>. *El pretratamiento con naloxona (12 µg) suprimió la respuesta de retirada de la pata tanto en el día 1 como en el día 4 después del dolor incisional.* Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que *la inhibición de la recaptación de eCBs puede ejercer un efecto antinociceptivo al activar receptores µ-OR en la zona LS*, independientemente de mecanismos supraespinales. En consonancia con estos resultados, estudios previos han demostrado la interacción entre opioides y cannabinoides, ambos sintetizados y liberados en circuitos neuronales activos, para mediar una respuesta adaptativa al dolor y la inflamación<sup>56,179</sup>. Además, el bloqueo del CB1r ha demostrado revertir los efectos analgésicos de los opioides<sup>166,172, 249,269</sup>.

Además, *otros receptores, como los CB1r, CB2r y TRPV1, parecen desempeñar un papel en los efectos antinociceptivos de la combinación, el cual varían según el tiempo transcurrido.* El antagonista del receptor CB1r, SR141716A (30 µg), bloqueó parcialmente la actividad antinociceptiva de las dosis subefectivas de morfina y UCM707 el día 1, pero no el día 4, en el cual el efecto antinociceptivo mejora. Por otra parte, el antagonismo del receptor CB2r produce el efecto contrario, ya que AM630 (12 µg) bloqueó la actividad antinociceptiva de la combinación el día 4. En cuanto al antagonismo de TRPV1, el AMG9810 (50 µg) sorprendentemente aumentó el efecto antinociceptivo de la combinación UCM707 + morfina, especialmente el día 4. La interpretación de estos resultados requiere considerar la plasticidad del sistema nervioso como mecanismo fundamental de adaptación en respuesta a estímulos ambientales<sup>110</sup>. En este contexto, los procesos de plasticidad adaptativa pueden alterar la funcionalidad del SEC<sup>180</sup>, lo que destaca la importancia de evaluar los efectos de diversos compuestos tras de una incisión plantar considerando el patrón temporal para optimizar el tratamiento analgésico postoperatorio.

Basándose en los resultados, *los efectos antinociceptivos de UCM707 y morfina en el primer día postoperatorio parecen estar mediados, al menos en parte, por la activación de los receptores CB1r en la médula espinal LS.* Estos resultados son consistentes con estudios previos que demuestran que el agonismo de los CB1r induce acciones antinociceptivas en diversos modelos de dolor, tanto a nivel de las terminales centrales de las fibras aferentes primarias como de las neuronas de proyección de la asta posterior de la médula espinal.<sup>270</sup><sup>169,271</sup>. Sin embargo, la regulación al alza de los receptores CB1r en etapas

posteriores puede provocar una hiperalgesia mecánica al suprimir las sinapsis inhibitorias<sup>272</sup>. Esto podría explicar por qué el antagonismo del CB1r en el día 4 mejora los efectos antinociceptivos de la combinación.

Este último efecto posiblemente se deba a las adaptaciones pronociceptivas en las sinapsis inhibitorias provocadas por la glía activada<sup>273</sup>. El BDNF liberado por la microglía activada colapsa el gradiente de cloruro en algunas neuronas de transmisión del dolor en la médula LS, provocando un cambio hacia la excitación en las sinapsis inhibitorias<sup>274,275</sup>. Por otro lado, la inflamación y la lesión nerviosa aumentan drásticamente la expresión del receptor CB2r en la neuroglía<sup>121,276</sup>. La evidencia acumulada ha demostrado que la activación del CB2r en la glía actúa como un mecanismo de retroalimentación negativa para regular la actividad glial. En consecuencia, los receptores CB2r pueden ser más relevantes a medida que las respuestas neuroinflamatorias establecen mecanismos de sensibilización central. Esto podría explicar por qué el bloqueo de los receptores CB2r sólo reduce la eficacia antinociceptiva de la combinación de UCM707 y morfina en el día 4 después de la incisión quirúrgica. En línea con nuestros hallazgos, se ha descrito un efecto antinociceptivo espinal mediado por los receptores CB2r en el modelo de dolor postincisional<sup>110</sup>. Tanto la microglía como los astrocitos se activan en la médula LS, con un pico de regulación al alza de la glía 3 días después de la cirugía. Los astrocitos se activan dentro de las 24 horas posteriores a la incisión de la pata trasera, mientras que la microglía no muestra una regulación significativa hasta los días 3-4 posteriores a la incisión<sup>45,110</sup>. La activación del CB2r podría inducir efectos antiinflamatorios al reducir la liberación de citoquinas, así como acciones proinflamatorias en ciertos contextos<sup>277,278</sup>.

Con respecto a los efectos observados tras la administración del antagonista de TRPV1, AMG9810, es tentador especular que UCM707 previene la activación de los receptores TRPV1 en primera instancia al obstaculizar la entrada de AEA (anandamida) en la célula y su interacción intracelular. En contraste, a medida que se establecen los mecanismos de sensibilización central en el período postoperatorio, la AEA en concentraciones más altas aumenta la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura registradas en neuronas de la sustancia gelatinosa actuando sobre TRPV1. En esta situación, el TRPV1 espinal, expresado en los terminales centrales de las fibras nerviosas aferentes primarias, contribuye a la hiperalgesia secundaria<sup>279</sup>. Datos emergentes han llevado a reconocer el canal iónico TRPV1 espinal como diana terapéutica para suprimir la facilitación del dolor central, como lo indica la reducción de la

hipersensibilidad mecánica tras la administración de un antagonista de TRPV1<sup>280</sup>. Esto podría explicar por qué, en nuestro estudio, el antagonismo de TRPV1 en el día 4 mejora la eficacia antinociceptiva de la combinación de UCM707 y morfina.

## **8. LIMITACIONES**

---



Este trabajo, a pesar de sus hallazgos significativos, está sujeto a ciertas limitaciones inherentes a su diseño y metodología:

### **1.-Sesgo de género:**

La elección de utilizar exclusivamente ratas macho en los experimentos fue una decisión metodológica basada en varios factores, siendo uno de los más importantes la menor variabilidad biológica comparada con las hembras<sup>281</sup>. Esta decisión tiene implicaciones directas en la claridad y precisión de los resultados obtenidos. A continuación, se detallan los motivos específicos:

1. Menor variabilidad hormonal: Las ratas hembra experimentan ciclos estrales (equivalente al ciclo menstrual en humanos), lo cual introduce variaciones hormonales significativas que pueden influir en la respuesta a los tratamientos farmacológicos. Estas fluctuaciones hormonales pueden complicar la interpretación de los datos, ya que añaden una capa adicional de variabilidad.
2. Detección más clara de efectos sinérgicos: Al reducir la variabilidad biológica, se facilita la identificación de efectos específicos del tratamiento, como los efectos sinérgicos entre opioides y cannabinoides. Una variabilidad menor permite que los cambios inducidos por los tratamientos sean más evidentes y estadísticamente significativos.
3. Consistencia en los resultados: Al utilizar un solo sexo, se estandarizan las condiciones experimentales, lo que puede llevar a resultados más consistentes y reproducibles. Esto es crucial en la fase preclínica, donde la precisión y la repetibilidad de los resultados son fundamentales para el desarrollo posterior de ensayos clínicos.
4. Precedentes en la investigación: Históricamente, muchos estudios preclínicos se han realizado predominantemente en machos debido a las razones mencionadas. Esto crea un cuerpo de datos comparable y coherente, lo que facilita la interpretación y la comparación con estudios previos.

Sin embargo, esta decisión limita la generalización de los resultados a hembras pues el uso exclusivo de ratas macho plantea preocupaciones sobre la posible existencia de diferencias específicas de género en los efectos antinociceptivos de los E-CBRIs y las combinaciones con morfina. La percepción

y respuesta al dolor varían entre sexos debido a factores biológicos y hormonales<sup>282</sup>.

Para garantizar la generalización de los hallazgos, futuros estudios deberían incluir tanto animales machos como hembras para proporcionar una comprensión completa de las respuestas específicas de cada sexo.

## **2.-Rápida degradación de los eCBs:**

La naturaleza transitoria de las acciones de los eCBs, atribuida a su rápida degradación<sup>283</sup>, plantea un desafío para el alivio duradero del dolor. En consecuencia, si bien los E-CBRIs han demostrado efectos antinociceptivos prometedores, la corta vida media de los eCBs limita su eficacia terapéutica.

Se requiere investigación centrada en el desarrollo de estrategias que prolonguen la acción de los E-CBRIs, como utilizar prodrogas<sup>284</sup>, la implantación de catéteres perineurales con el fin de realizar infusiones<sup>58</sup>, el uso de nanotecnología para la administración de las soluciones analgésicas mediante liberaciones prolongadas<sup>285</sup>, o administrar conjuntamente agentes que inhiban las enzimas que metabolizan los eCBs<sup>286</sup>.

## **3.-Especificidad y afinidad de los ligandos endógenos:**

Los eCBs exhiben un espectro más amplio de interacciones con los receptores en comparación con los fármacos cannabinoides exógenos. Esta característica, similar a la observada con los eOpioides<sup>287</sup>, puede conducir tanto a efectos fuera de nuestra diana terapéutica como a posibles interacciones con otras vías de señalización, pudiendo complicar la interpretación de los resultados, tal y como pasa con los eOpioides<sup>288,289</sup>.

Para evaluar de manera exhaustiva su potencial terapéutico, futuros estudios deberían investigar la interacción de los E-CBRIs con el SEC junto con otras vías de señalización relevantes.

## **4.-Elucidación del papel de los receptores $\mu$ -OR:**

La falta de activación observada del receptor opioide  $\mu$  en el estudio requiere una investigación más profunda. Si bien los efectos antinociceptivos sinérgicos de los E-CBRIs y la morfina sugieren una posible participación de los receptores  $\mu$ , la ausencia de activación directa requiere aclaración.

Un posible mecanismo es la promoción de cascadas de señalización específicas de heterómeros, que permiten la diversificación de los efectos

mediados por receptores de manera dependiente del contexto. Actualmente se reconoce que los GPCR pueden formar complejos oligoméricos, así como actuar como receptores de superficie celular monoméricos. Por ejemplo, se ha demostrado que los receptores  $\alpha$ 2A-adrenérgicos ( $\alpha$ 2AR) y los receptores opioides  $\mu$  (MOR) pueden formar complejos heterodímeros funcionales en la membrana plasmática de células transfectadas en cultivo, así como en neuronas nativas<sup>290</sup>. Estos complejos no solo se forman, sino que también pueden mediar cambios conformacionales a través de una comunicación cruzada que se propaga de un receptor a otro, lo que lleva a cambios en la función<sup>291</sup>. Este fenómeno es particularmente interesante para la sinergia DOR/ $\alpha$ 2, ya que la dimerización de GPCR puede facilitar el transporte de receptores a la superficie celular, así como facilitar el acoplamiento y la activación de la proteína G<sup>292</sup>. Por lo tanto, la generación de nuevas propiedades tras la dimerización puede desempeñar un papel clave en la explicación de las interacciones sinérgicas entre pares de receptores que se encuentran colocalizados.

Futuros estudios deberían emplear técnicas más sensibles para detectar la activación del receptor  $\mu$  y explorar los mecanismos subyacentes de la sinergia entre los E-CBRIs y la morfina.

#### **5.-Posible papel de los agonistas de los receptores $\kappa$ -OR:**

No se puede descartar el posible papel de los agonistas de los receptores  $\kappa$ -OR en los efectos antinociceptivos observados en el estudio.

La evidencia sugiere que la AEA puede interactuar con los receptores  $\kappa$ -OR para producir antinocicepción<sup>293</sup>. En nuestro caso, si protegemos la AEA de su degradación al evitar su transporte al interior de la célula, ésta podría interactuar eficazmente con los receptores  $\kappa$ -OR, generando un efecto antinociceptivo y potenciando los efectos analgésicos de la morfina<sup>192,294</sup>. En este sentido, se ha demostrado que la administración IT del agonista cannabinoide delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) produce antinocicepción que es antagonizada por el antagonista los receptores  $\kappa$ -OR, nor-binaltorfimina (nor-BNI), y que la administración de oligonucleótidos antisentido dirigidos al receptor  $\kappa$ -OR bloquea la antinocicepción inducida por THC administrada por vía IT<sup>295,296,297</sup>.

Estas limitaciones resaltan la necesidad de más investigación para abordar estas brechas y proporcionar una comprensión más completa de las posibles aplicaciones terapéuticas de los E-CBRIs para el manejo del dolor.

## **9. CONCLUSIONES**

---



Los resultados de esta tesis indican que la modulación del SEC mediante el inhibidor del transporte de AEA UCM707, en combinación con dosis subefectivas de morfina IT, es una estrategia prometedora para el manejo del DPO. **Esta combinación respalda el potencial terapéutico de los E-CBRIs como fármacos coadyuvantes en pacientes que requieren tratamiento con opioides para aliviar el DPO** al permitir reducir la dosis de morfina necesaria para obtener un efecto antinociceptivo significativo y prolongado y contribuir así a un enfoque analgésico más seguro y eficaz.

Las conclusiones clave obtenidas son:

- 1. Modulación específica de receptores cannabinoides y opioides:** Los resultados indican que los receptores CB1r y  $\mu$ -OR desempeñan un papel relevante en las fases tempranas del dolor, mientras que el receptor CB2r cobra mayor importancia en fases tardías. Esta variación temporal en la relevancia de cada receptor subraya la importancia de la administración ajustada a lo largo del tiempo para optimizar el control del DPO.
- 2. Implicaciones del receptor TRPV1 en la analgesia:** El antagonismo del receptor TRPV1 potencia la eficacia de la combinación de UCM707 y morfina, particularmente en etapas avanzadas del DPO. Esto sugiere que TRPV1 podría ser un objetivo terapéutico clave para el manejo de la hiperalgesia secundaria, especialmente cuando se ha establecido la sensibilización central.
- 3. Contribución de la microglía y el SEC en la modulación del dolor:** La activación del receptor CB2r parece actuar como un mecanismo de retroalimentación negativa que modula la actividad glial, lo cual es relevante para la sensibilización central y el control del dolor. Estos hallazgos apuntan a la importancia de la interacción glial en la respuesta al dolor y sugieren que la modulación del SEC a nivel espinal puede ser efectiva en el tratamiento del DPO.
- 4. Importancia de la plasticidad del sistema nervioso en el control del dolor:** La adaptación del sistema endocannabinoide y opioide en respuesta a la lesión y a la administración de fármacos resalta la relevancia de considerar la plasticidad neuronal en el diseño de estrategias analgésicas postoperatorias. Esta plasticidad permite ajustar los tratamientos a medida que progresa el dolor, lo que podría optimizar la eficacia analgésica y mejorar la experiencia de recuperación postoperatoria en pacientes.

**5. El desarrollo experimental de esta tesis permite proponer nuevas alternativas para el desarrollo de terapias analgésicas más seguras y eficaces para el DPO.** La modulación del SEC, en combinación con dosis reducidas de opioides, puede ofrecer un enfoque más optimizado para el manejo del dolor, minimizando los efectos adversos asociados con altas dosis de opioides.

## **10. CONCLUSIONS**

---



The findings of this thesis suggest that the modulation of the ECS via inhibition of AEA transport with UCM707 when combined with sub-effective doses of intrathecally (IT) administered morphine, offers a promising strategy for managing postoperative pain (POP). **This combination supports the therapeutic potential of E-CBRIs as adjuvant drugs in patients requiring opioid treatment for POP relief** by enabling a reduction in the morphine dose necessary to obtain a significant and prolonged antinociceptive effect, thus contributing to a safer and more effective analgesic approach.

The key conclusions obtained are:

- 1. Specific modulation of cannabinoid and opioid receptors:** Results indicate that CB1r and  $\mu$ -OR receptors play a relevant role in the early phases of pain. In contrast, the CB2r becomes more critical in later stages. This temporal variation in the relevance of each receptor underscores the importance of time-adjusted administration to optimize POP control.
- 2. Implications of TRPV1 receptor in analgesia:** TRPV1 receptor antagonism enhances the efficacy of the UCM707 and morphine combination, particularly in advanced stages of POP. This suggests that TRPV1 could be a key therapeutic target for managing secondary hyperalgesia, especially when central sensitization has been established.
- 3. Contribution of microglia and ECS in pain modulation:** CB2r activation appears to act as a negative feedback mechanism that modulates glial activity, which is relevant for central sensitization and pain control. These findings highlight the importance of glial interaction in pain response and suggest that ECS modulation at the spinal level may effectively treat POP.
- 4. Importance of nervous system plasticity in pain control:** The adaptation of the endocannabinoid and opioid system in response to injury and drug administration highlights the relevance of considering neuronal plasticity in the design of postoperative analgesic strategies. This plasticity allows for treatment adjustments as pain progresses, which could optimize analgesic efficacy and improve the postoperative recovery experience in patients.
- 5. The experimental development of this thesis enables the proposal of new alternatives for developing safer and more effective analgesic therapies for POP.** ECS modulation, in combination with reduced opioid doses, may offer a more optimized approach to pain management, minimizing adverse effects associated with high opioid doses.

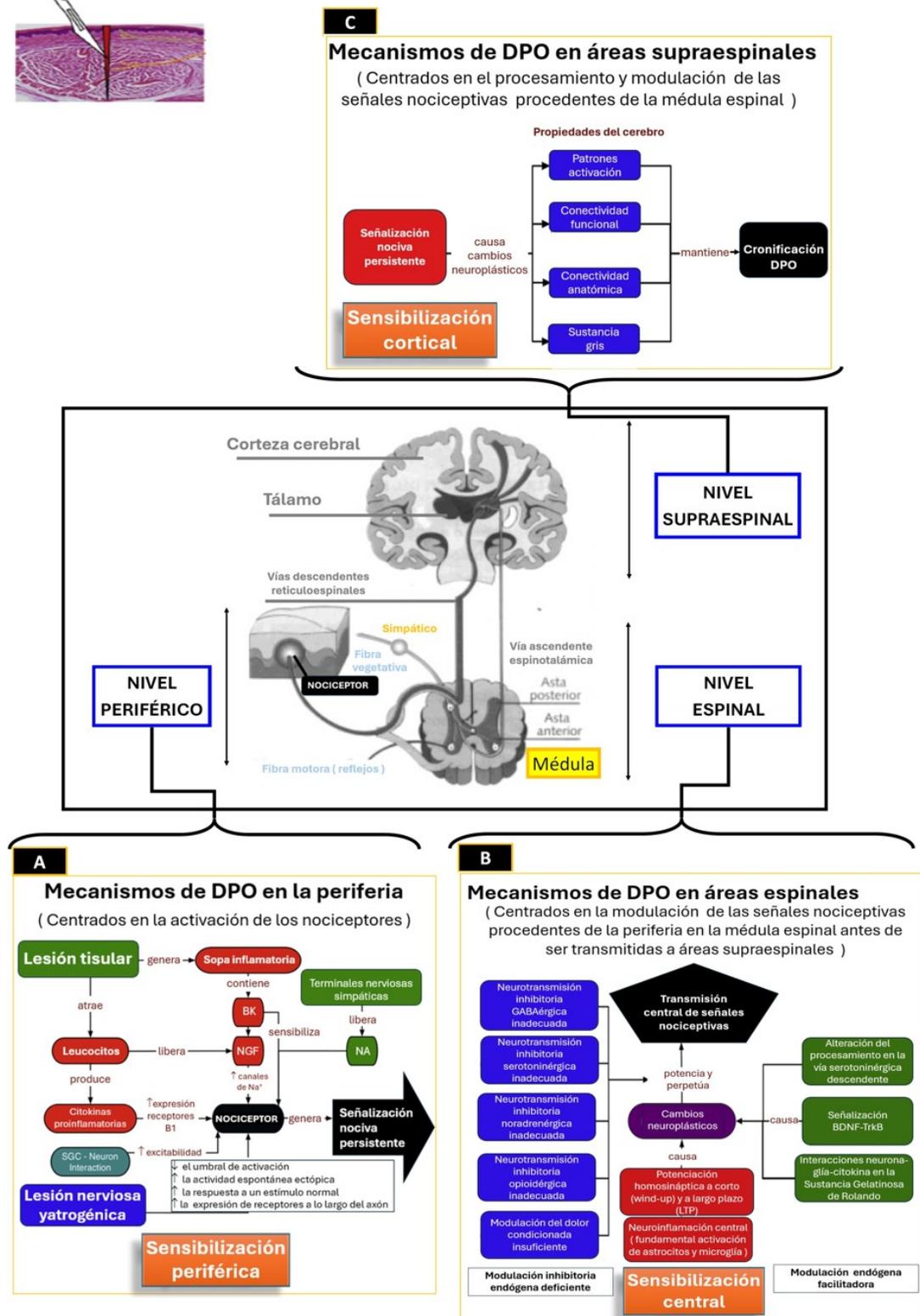
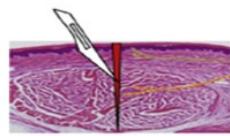


## **11. FIGURAS Y TABLAS**

---

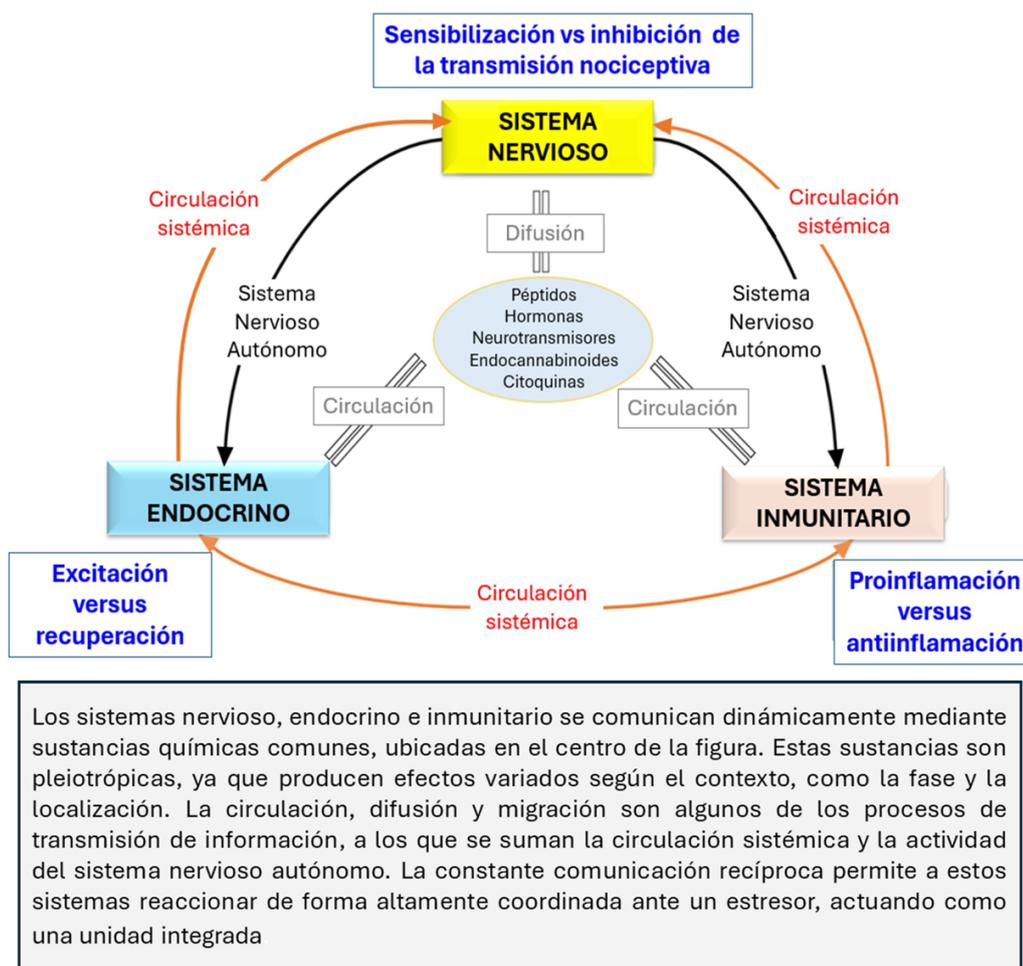


Figura 1 . Mecanismos fisiopatológicos de DPO



*Nota: Elaboración propia basada en* <sup>298</sup>. El DPO se inicia tras una lesión tisular quirúrgica que provoca una cascada de eventos inflamatorios y neuroplásticos. Una variedad de sustancias se libera en la zona lesionada. De entre ellas destacan el factor de crecimiento nervioso (NGF), citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y interleuquina-1 (IL-1), prostaglandinas (PG) y bradiquinina (BK) así como péptidos como la sustancia P (SP) y purinas como la adenosina. Estas sustancias activan los nociceptores de manera estímulo dependiente. A su vez, esta liberación produce una “sopa inflamatoria” que desencadena una serie de respuestas locales como la vasodilatación, un reclutamiento de células inmunitarias y cambios en la actividad del Sistema Nervioso Autónomo. Como consecuencia del fenómeno neuroinflamatorio, y sobre todo ante estímulos intensos y/o repetitivos, se produce una respuesta aumentada de los nociceptores (*sensibilización periférica*)<sup>299,300</sup> **(A)**, un incremento de la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal (*sensibilización central*)<sup>301,302</sup> **(B)** y de la zona cortical (*sensibilización cortical*)<sup>303,304</sup> **(C)**. Fisiopatológicamente implica: 1) *cambios celulares* mayores que se traducen en descargas nerviosas ectópicas y/o espontáneas, hiperexcitabilidad periférica y central, cambios fenotípicos en las vías de conducción, neurodegeneración y reorganización de la morfología celular; 2) *cambios moleculares* como la acumulación y mayor expresión de canales de sodio en la periferia, el incremento de la actividad de los receptores de glutamato -en particular el receptor NMDA- y de la señalización BDNF-TrkB, la reducción de la actividad gabaérgica, los cambios en la penetración de calcio en las neuronas y el incremento de las citoquinas, factores quimiotácticos, factores de crecimiento y ATP; y 3) *cambios estructurales y funcionales neuronales*, tanto a nivel central y periférico, con una marcada interacción neuroinmune<sup>2,298,305</sup>.

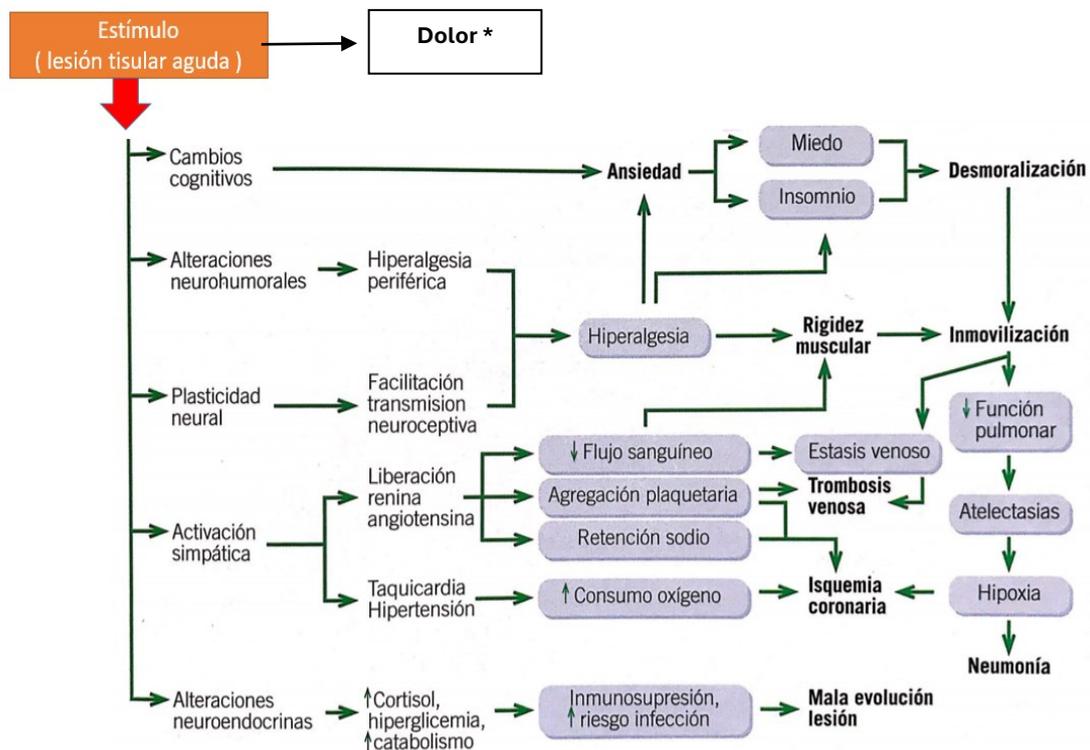
**Figura 2 . Conectividad entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico**



*Nota: Adaptada de <sup>6</sup>. Publicada en “Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality. Int J Mol Sci. 2024 Jun 6;25(11):6268”. Todo estímulo asociado a una lesión o amenaza de lesión tisular induce una respuesta coordinada de defensa en la que están involucrados el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmunitario<sup>6,306</sup>. De esta manera, aunque estos sistemas operan y responden a los factores estresantes de manera independiente, hay un proceso dinámico de intercambio constante de mensajes a través del sistema nervioso autónomo y/o a través de la circulación sistémica que permite su conectividad. Los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico se comunican dinámicamente utilizando el lenguaje de sustancias químicas comunes, como se indica en el centro de la figura. Los elementos principales del lenguaje son péptidos, hormonas, neurotransmisores, citoquinas y endocannabinoides (eCBs). Estas sustancias son pleiotrópicas porque ejercen diferentes efectos según el contexto (p. Ej., fase y ubicación). La circulación, difusión y migración son algunos de los procesos de*

transmisión de información. La circulación sistémica y el sistema nervioso autónomo son otros vehículos de transmisión de información. Debido a que los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico tienen una comunicación recíproca constante, tienden a reaccionar ante un factor estresante de una manera orquestada, como una sola unidad.

**Figura 3 . Consecuencias de la lesión tisular en pacientes con DPO.**

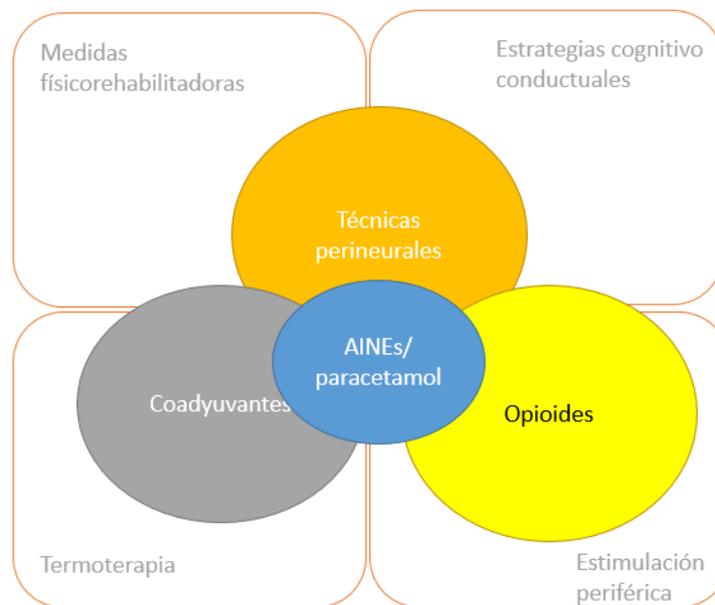


- \* “Signos “de dolor agudo**
- Cardiovasculares: ↑ FC, ↑TA, ↑ VM
  - Midriasis
  - Sudoración palmar
  - Hiperventilación
  - Hipermotilidad
  - Comportamiento de la huida
  - Estado de ansiedad

*Nota: Elaboración propia basada en <sup>307</sup>. Las manifestaciones fisiológicas inmediatas del DPO son las mismas que las de la reacción de alarma o del «reflejo de lucha o huida» debidas a la respuesta simpático-adrenérgica del*

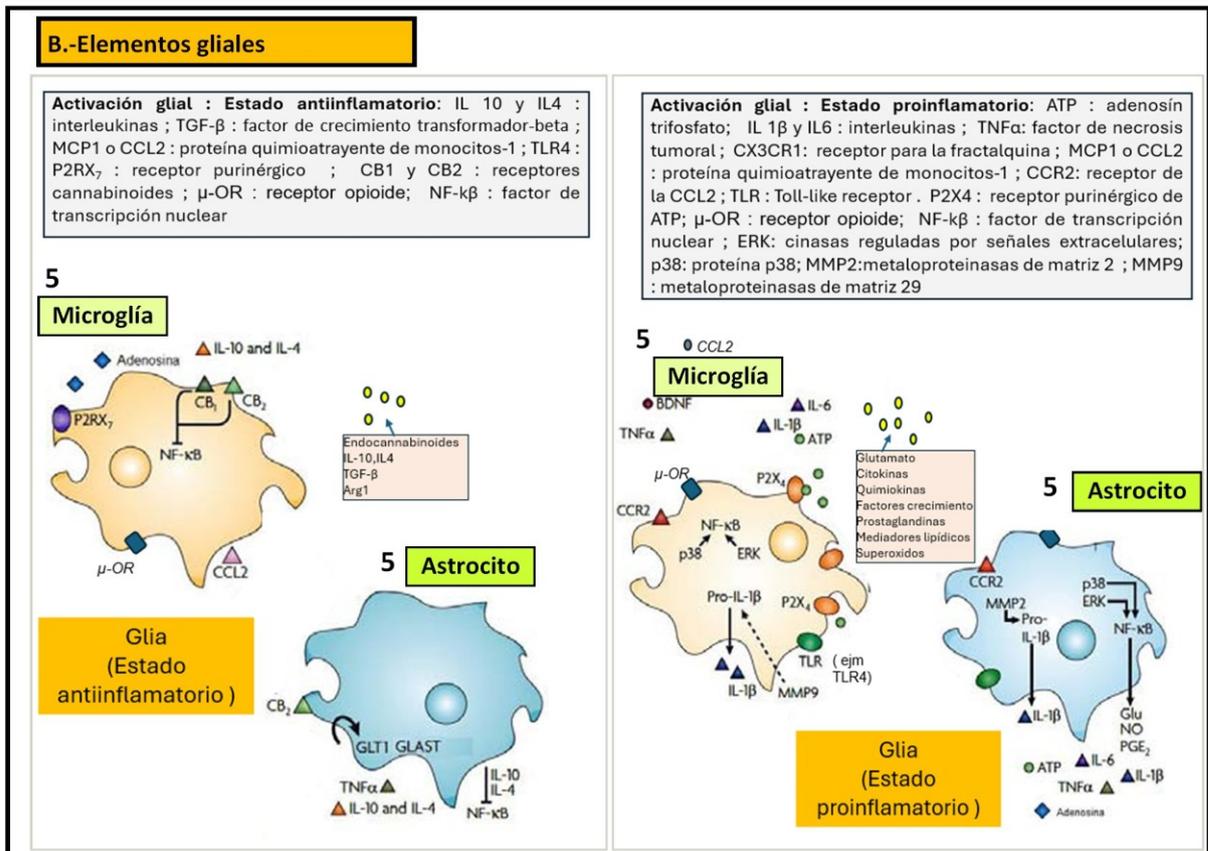
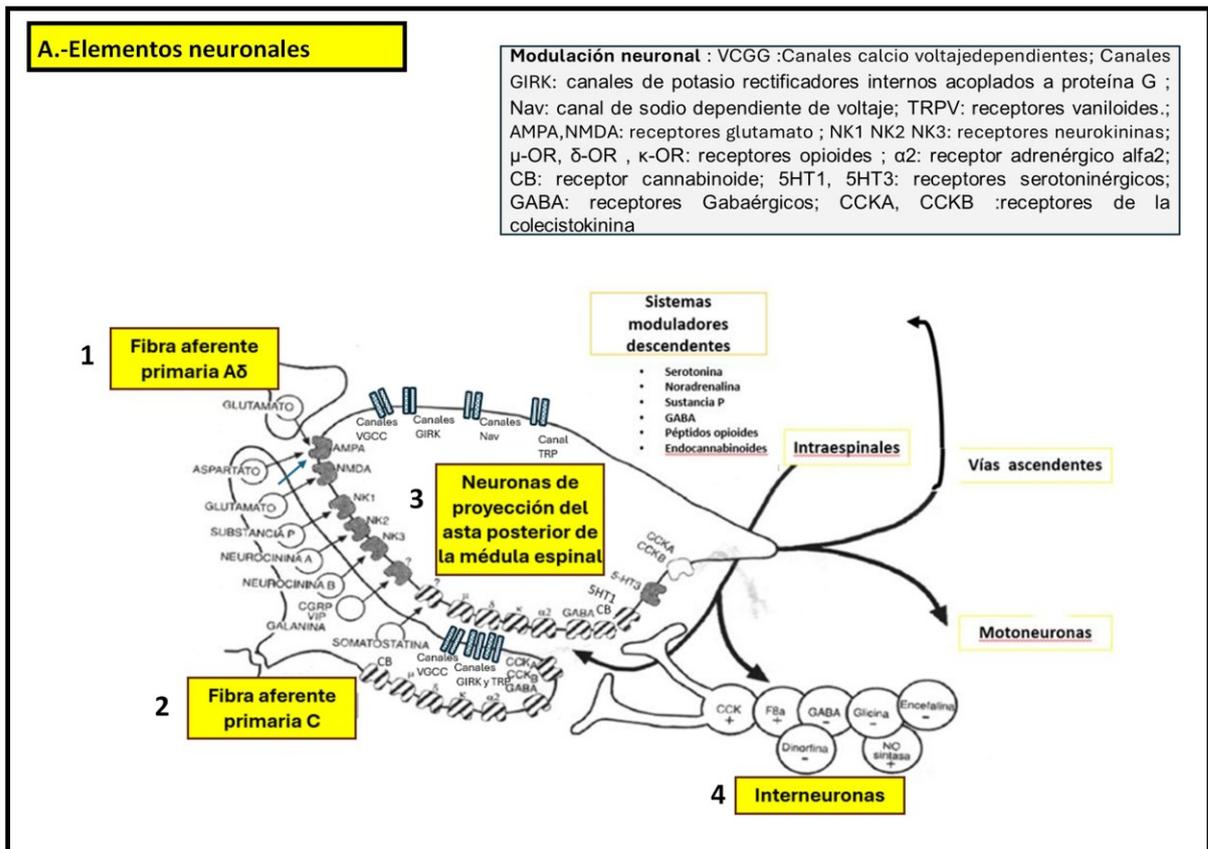
organismo. Las más reconocidas son la dilatación pupilar, la sudoración palmar, conducta de escape y las vocalizaciones variadas (grito, gimoteo, sollozos). Por otro lado, el DPO provoca alteraciones fisiopatológicas en diferentes órganos y sistemas que son capaces de alterar el curso de cualquier padecimiento, incluso se puede convertir en una enfermedad en sí misma si no recibe un adecuado tratamiento<sup>7,308,309</sup>. Estas alteraciones se relacionan con alteraciones neurohumorales e incremento de la actividad simpática<sup>310,311</sup>.

**Figura 4 . Analgesia combinada.**



*Nota: Elaboración propia.* La realización simultánea de diversas terapias analgésicas en un mismo paciente, con el objetivo de lograr un efecto sinérgico en la antinocicepción y reducir los efectos adversos, es una estrategia recomendada en el DPO<sup>89,312</sup>. En el ámbito de la farmacología, la combinación de múltiples sustancias con diferentes mecanismos de acción puede ofrecer una analgesia más efectiva debido a un efecto aditivo o incluso sinérgico entre los fármacos, lo que permite disminuir la dosis de opioides y, por lo tanto, la incidencia de efectos secundarios<sup>23</sup>. Ejemplos de combinaciones efectivas para el alivio del DPO son el uso de analgésicos con diferentes mecanismos de acción- la adición de AINEs y paracetamol es particularmente frecuente para reducir el consumo de opioides<sup>313</sup>-, el empleo concomitante de diferentes vías de administración -bloqueos nerviosos y vías parenterales<sup>314</sup>, o el uso de terapias de rehabilitación <sup>315</sup> u otras de carácter no farmacológico junto a otras que sí lo sean<sup>316</sup>.

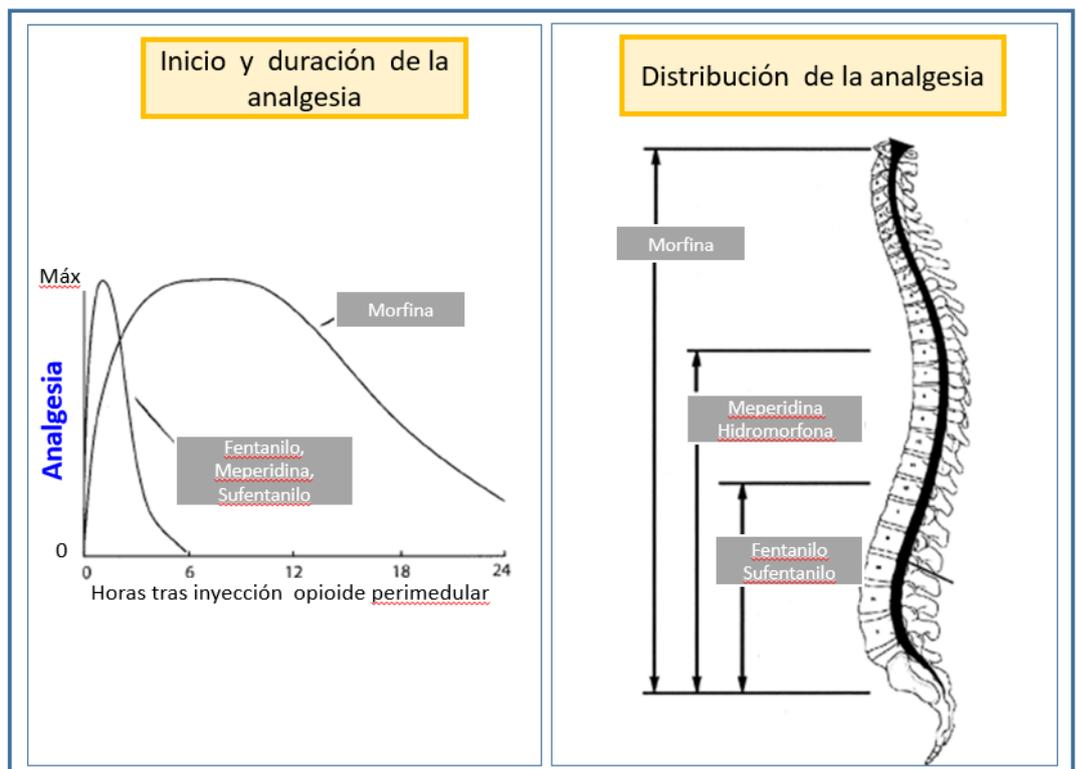
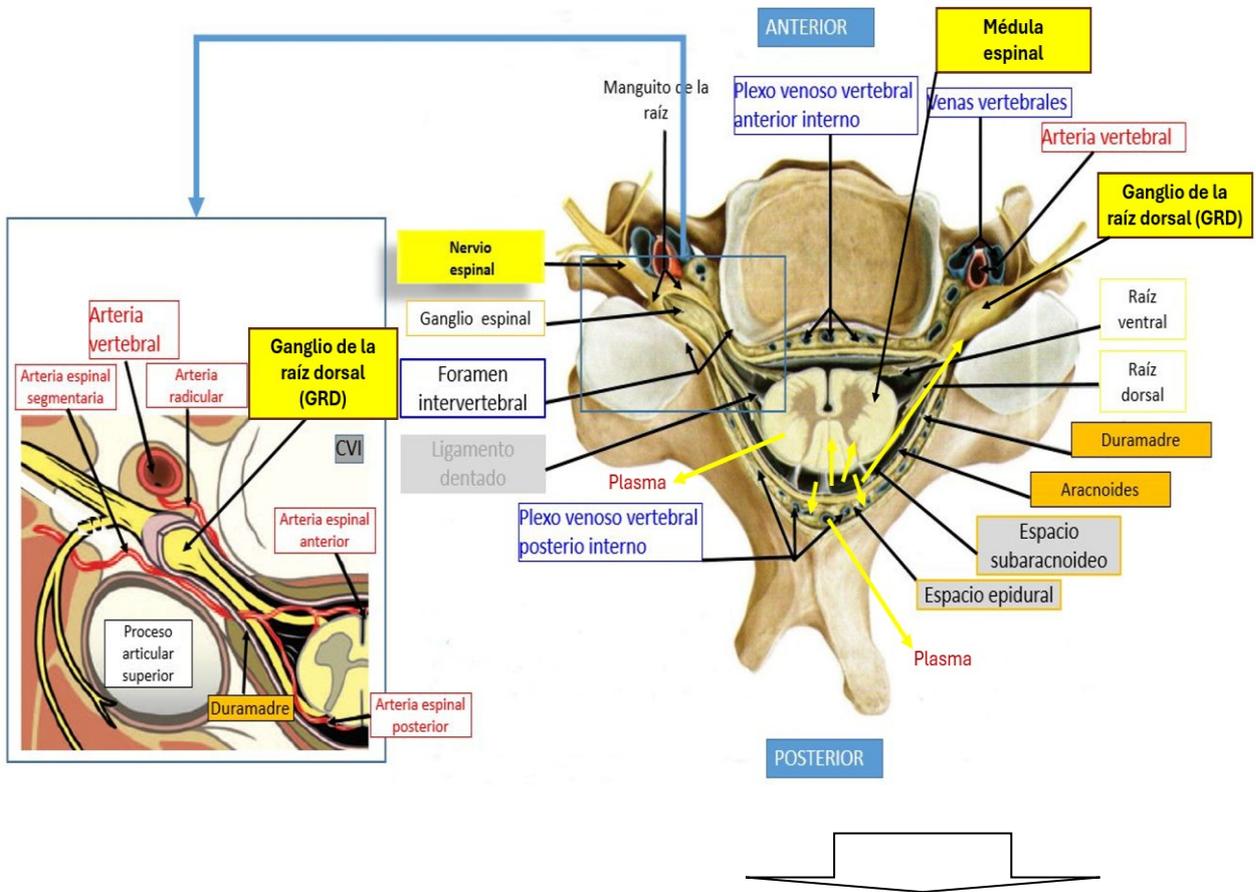
Figura 5. Dianas terapéuticas espinales frente al dolor.



*Nota: Elaboración propia basada en* <sup>317</sup>. La médula espinal, particularmente la asta dorsal, es una región clave en la transmisión y modulación del dolor<sup>231,302</sup>. En esta área, una *compleja red de neuronas sensitivas (1 y 2), neuronas de proyección (3), interneuronas (4) y células gliales (5) participa en el procesamiento y transmisión de las señales nociceptivas*. Así, las *neuronas sensitivas*, tras recibir estímulos dolorosos de la periferia, establecen sinapsis con *interneuronas y neuronas de proyección*, las cuales envían las señales a centros supraespinales, donde se genera la percepción consciente del dolor. La comunicación sináptica entre estas neuronas, mediada por neurotransmisores y modulada por factores locales a través de la interacción con diversos receptores y canales iónicos, ofrece un amplio abanico de posibilidades terapéuticas para el desarrollo de estrategias terapéuticas<sup>19</sup>. En este sentido, dependiendo de su acción, se puede facilitar la propagación del impulso nociceptivo hacia centros supraespinales (área punteada) o inhibirlo (superficie rayada). Asimismo, las células gliales, específicamente los astrocitos y la microglía, influyen en la transmisión del dolor -especialmente en condiciones patológicas-<sup>45,46,47</sup>. En este caso, la activación de la glía por el efecto de los transmisores/mediadores excitatorios neuronales como el CCL2<sup>318</sup> induce la entrada de Ca<sup>2+</sup> y la activación de segundos mensajeros, activando cascadas de señalización intracelular (en la glía), en las que participan proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) como las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), la proteína p38 o JNK<sup>319</sup>. Todo ello en última instancia activará el factor de transcripción nuclear NF-κB induciendo la transcripción y liberación de factores proinflamatorios, entre los que se incluyen PGE, óxido nítrico (NO), glutamato, ATP y diversas citoquinas<sup>47,320</sup>. Entre los receptores que juegan un papel relevante en la activación de la microglía citar el receptor CX3CR1<sup>321</sup>, la familia de los receptores TLR -Toll-like-<sup>322,323,324</sup> y el receptor purinérgico P2X<sub>4</sub><sup>325</sup>. Entre las citoquinas liberadas por la glía se encuentran la IL-1β<sup>326</sup>, la IL-6<sup>327</sup> y el TNF-α<sup>328</sup>, que actúan sobre receptores específicos presentes tanto en la superficie de las neuronas como en las propias células gliales. La unión de estos mediadores (citoquinas) a sus receptores (neuronales y gliales) inicia cascadas de señalización que induce la síntesis de sustancias excitatorias. Estas citoquinas aumentan también la expresión y la conductividad de los receptores AMPA y NMDA en la membrana neuronal, incrementando también de esta forma la excitabilidad neuronal y favoreciendo la transmisión sináptica<sup>302</sup>. A este estado proinflamatorio también contribuye la entrada de Ca<sup>2+</sup> y la activación del p38 después de la unión del ATP (origen neuronal o glial) a

receptores purinérgicos P2X<sub>4</sub> situados en la superficie de la microglía. La activación de este receptor induce liberación de más ATP y del factor neurotrófico del cerebro (BDNF)<sup>329</sup>; en las neuronas espinales, estas sustancias cambian las corrientes activas de despolarización activadas por el GABA (neurotransmisor inhibitorio), que pasa a ser excitatorio, favoreciendo la excitación de las neuronas espinales<sup>275</sup>. En este contexto diversas metaloproteinasas (MMP) participan en la generación de un estado de activación glial proinflamatorio<sup>330</sup>. Entre ellas citar la MMP2 -contribuye degradando componentes de la barrera hematoencefálica facilitando la entrada de células inmunitarias y moléculas inflamatorias al SNC o liberando factores de crecimiento y citoquinas almacenadas en la matriz extracelular o en la superficie celular-<sup>331</sup> y la MMP9 - actúa degradando la matriz extracelular, liberando citoquinas proinflamatorias y activando vías de señalización como NF-κB, lo que perpetúa un estado inflamatorio y aumenta la sensibilización al dolor-<sup>332</sup>. Por otra parte, la glía activada puede presentar un estado antiinflamatorio y acciones neuroprotectoras sustentadas por: 1) la liberación de sustancias antinociceptivas -ejemplo: los eCBs<sup>333</sup> y diversas citoquinas antiinflamatorias como la IL-4<sup>334</sup>, IL-10<sup>335</sup> y el TGF-β<sup>336</sup>-, la disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias<sup>337</sup> y de neurotransmisores excitatorios como el glutamato y el aspartato -el GLT-1 (Transportador de Glutamato Tipo 1) y GLAST (Transportador de Glutamato-Aspartato) son dos transportadores de glutamato expresados principalmente en las células gliales que regulan su concentración en el espacio extracelular evitando su acumulación excesiva<sup>338,339</sup>-; 2) la activación de receptores de membrana como los opioides<sup>340</sup>; y 3) sus funciones de scavenger (eliminación de neuronas muertas y restos celulares)<sup>337</sup>. En este estado juega un rol importante: a) la inhibición de los receptores TLR4 -al favorecer un cambio hacia un fenotipo microglial antiinflamatorio-; y b) la activación de receptores cannabinoides (CB1r y CB2r) expresados en la microglía y astrocitos<sup>177,333</sup>.

Figura 6 *Morfina intratecal.*



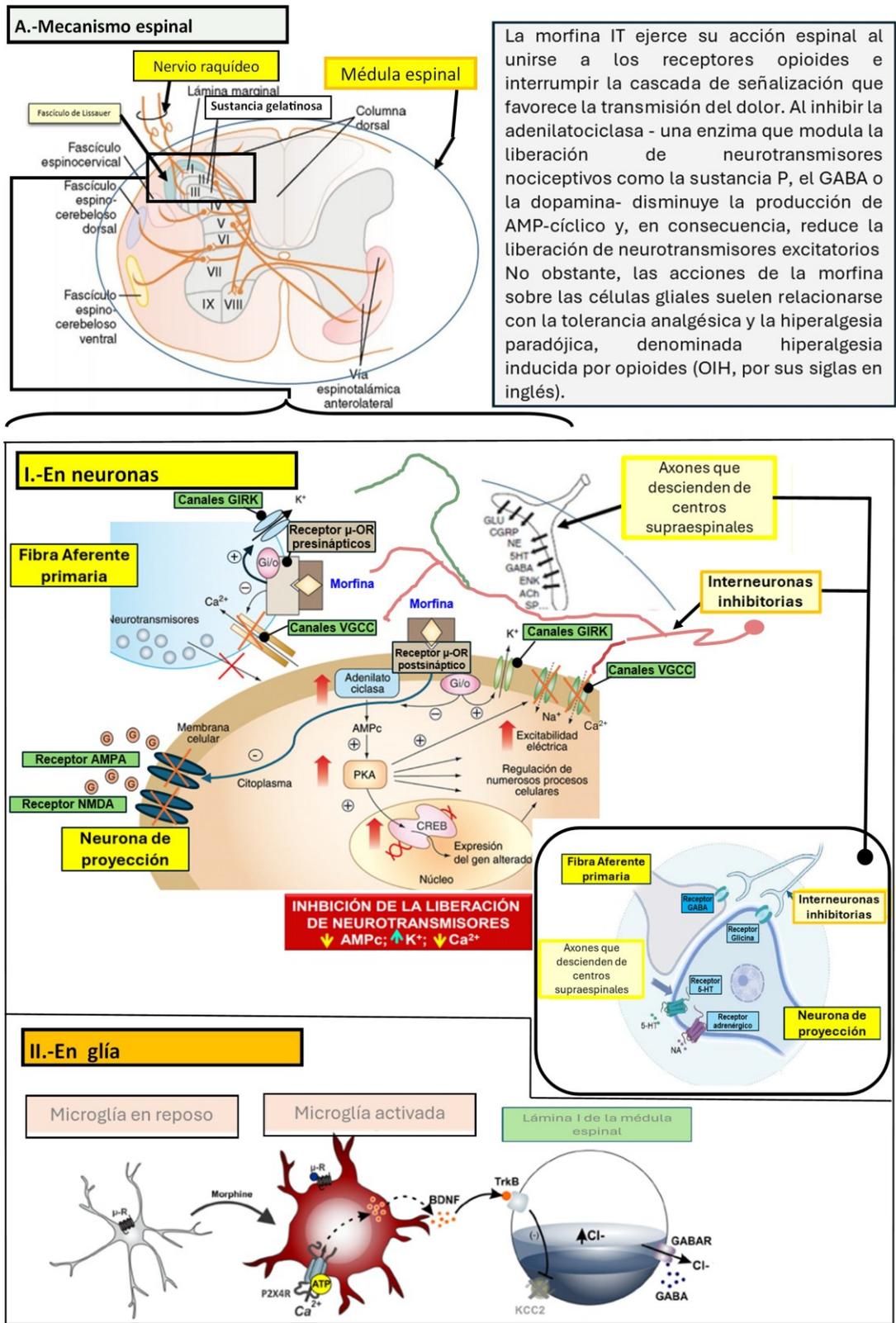
*Nota: Elaboración propia basada en*<sup>91</sup>. La morfina es el opioide hidrofílico más utilizado y estudiado para administración IT. Su distribución tras la administración IT es compleja y sigue un patrón multicompartmental: tras depositarse en el espacio subaracnoideo se desplaza hacia áreas supraespinales a través del LCR, difunde a la médula espinal y zonas anejas como el ganglio de la raíz dorsal (GRD) uniéndose a diversos receptores y se elimina hacia el espacio epidural donde es secuestrada por tejidos lipofílicos antes de su eventual reabsorción sistémica<sup>76,341</sup>. La clínica de la morfina IT es consecuencia de su distribución y de sus propiedades fisicoquímicas, las cuales determinan su tiempo de inicio, duración de acción y potencia<sup>58</sup>. En este sentido, su elevada hidrofilia y baja capacidad de atravesar las membranas lipídicas hacen que tenga una lenta difusión hacia el espacio epidural y se concentre principalmente en el LCR<sup>342,343</sup>. Asimismo, a diferencia de opioides lipofílicos como el fentanilo, la morfina IT muestra una menor afinidad por componentes lipídicos del sistema nervioso, lo que limita su capacidad de unirse a sitios no receptores en la mielina y la sustancia blanca de la médula espinal<sup>91,344</sup>. Esta distribución selectiva se traduce en un volumen de distribución IT relativamente pequeño y una concentración elevada y sostenida en el LCR<sup>49</sup>. Como consecuencia la morfina IT presenta : 1) un inicio de acción más gradual en comparación con los opioides lipofílicos : la lenta difusión desde el sitio de inyección y la alta afinidad por los receptores opioides retrasan el inicio del efecto analgésico<sup>76</sup>; 2) una duración de acción prolongada : la concentración sostenida en el LCR y la lenta disociación de los receptores prolongan el efecto analgésico<sup>49</sup>; 3) un amplio espectro analgésico: La distribución en el LCR permite una amplia cobertura de la médula espinal<sup>345</sup>; 4) Capacidad de generar efectos secundarios: La migración cefálica de la morfina puede causar depresión respiratoria de aparición tardía<sup>84,346</sup>.

Es interesante reseñar que la cinética de la morfina en el LCR se describe como bifásica: una fase inicial de distribución rápida seguida de una fase de eliminación lenta<sup>347</sup>. Ello se debe a que la alta solubilidad en agua dificulta la penetración en la sustancia blanca y contribuye a su mantenimiento en el LCR, tanto a nivel espinal como supraespinal, debido al pobre aclaramiento<sup>341,348</sup>. Como consecuencia, la expansión cefálica del fármaco permite que las

concentraciones sean detectables a partir de los 30 minutos en el LCR cisternal y las concentraciones de morfina en el LCR se mantengan durante un largo período, con una disminución gradual después de 12 horas<sup>91</sup>. La difusión hacia el espacio epidural es lenta, lo que provoca un aumento progresivo de las concentraciones plasmáticas. Sin embargo, la propagación circunferencial del LCR alrededor de la médula desde el punto de inyección es limitada, y el metabolismo a metabolitos solubles en agua en el LCR y la médula espinal es mínimo<sup>349</sup>.

Hechos relevantes a considerar en referencia a la morfina IT: 1) Se elimina lentamente hacia el plasma, lo que aumenta la probabilidad que mantenga una mejor difusión para penetrar a través de la piamadre y llegar a las láminas superficiales de la asta dorsal de la médula espinal (sustancia gelatinosa), aunque su tasa de difusión y, por lo tanto, el tiempo de inicio de acción, pueda ser más prolongado<sup>350</sup>; 2) Su penetración en los tejidos neuronales es peor que la obtenida con los opioides lipofílicos pero es más difícil su paso a la vasculatura parenquimatosa. Ello permite que alcance sitios parenquimatosos profundos por su menor eliminación durante la difusión lo que explica un efecto antinociceptivo más duradero<sup>351</sup>; 3) Sus concentraciones en el LCR disminuyen más lentamente que con dosis similares de fármacos lipofílicos, lo que explica el mayor grado de expansión cefálica y la depresión respiratoria retardada<sup>76</sup>; 4) Aunque clásicamente se describe que los opioides perimedulares alivian el dolor de manera dosisdependiente<sup>265,352</sup>, la curva dosis-respuesta es sigmoideal por lo que existirá un techo analgésico, es decir, un punto máximo de eficacia más allá del cual el aumento de la dosis no produce un beneficio adicional significativo<sup>347</sup>; 4) Las dosis necesarias para producir analgesia y su duración de efecto variarán considerablemente de un paciente a otro dependiendo de la dinámica de fluidos del LCR<sup>353</sup>.

**Figura 7. Mecanismo de acción de la morfina IT.** A.- Mecanismo espinal. B.- Mecanismo supraespinal. C.- Mecanismo sobre el GRD.



*Nota: Elaboración propia basada en* <sup>70</sup>. En la asta dorsal de la médula espinal, especialmente en la lámina II (sustancia gelatinosa), las señales nociceptivas desencadenan la liberación de neurotransmisores como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el L-glutamato (Glu) <sup>354</sup>. Las neuronas de proyección de segundo orden transmiten esta información al cerebro, donde se procesa y se generan las experiencias sensoriales y emocionales del dolor. A este nivel, los receptores opioides se expresan principalmente en las láminas I y II de la médula espinal, con una distribución aproximada de 70% para los  $\mu$ -OR, 20% para los  $\delta$ -OR y 10% para los  $\kappa$ -OR<sup>355,356</sup>. Estos receptores se localizan en fibras aferentes presinápticas<sup>357</sup>, interneuronas<sup>358</sup> y neuronas de proyección postsinápticas<sup>359</sup>. Además: 1) se han identificado receptores similares a los opioides como el receptor ORL-1<sup>360</sup>, que, a diferencia de los receptores opioides clásicos, son insensibles a la naloxona; 2) hay evidencias que los opioides pueden unirse y activar el receptor Toll-like 4 (TLR4), un receptor de reconocimiento de patrones del sistema inmune innato<sup>361</sup>. En este contexto, la morfina IT ejerce su acción al unirse a los receptores opioides e interrumpir la cascada de señalización que favorece la transmisión del dolor. Al inhibir la adenilatociclasa - una enzima que modula la liberación de neurotransmisores nociceptivos como la sustancia P, el GABA o la dopamina- disminuye la producción de AMP-cíclico y, en consecuencia, reduce la liberación de neurotransmisores excitatorios<sup>362,363</sup>. *Esta acción se ejerce en diversas dianas espinales:*

### **1.-Sobre las neuronas (ver figura 7.A.I):**

*A.-Activando los receptores  $\mu$ -OR presinápticos* en la terminación central de la fibra aferente primaria. Como consecuencia se activa una cascada de señalización mediada por proteínas G que conduce a la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N (VGCC). Esta inhibición reduce la entrada de calcio a la terminal presináptica, lo que es crucial para la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato<sup>364</sup> y la sustancia P<sup>365</sup>. Como resultado, se disminuye la liberación de estos neurotransmisores en la sinapsis, lo que limita la transmisión de señales dolorosas desde las neuronas aferentes primarias hacia las neuronas del sistema nervioso central.

*B.-Activando los receptores  $\mu$ -OR postsinápticos.* Se produce una disociación de las subunidades de la proteína G que regulan los canales iónicos y la adeniliciclasa. Como resultado, se activan los canales de potasio GIRK,

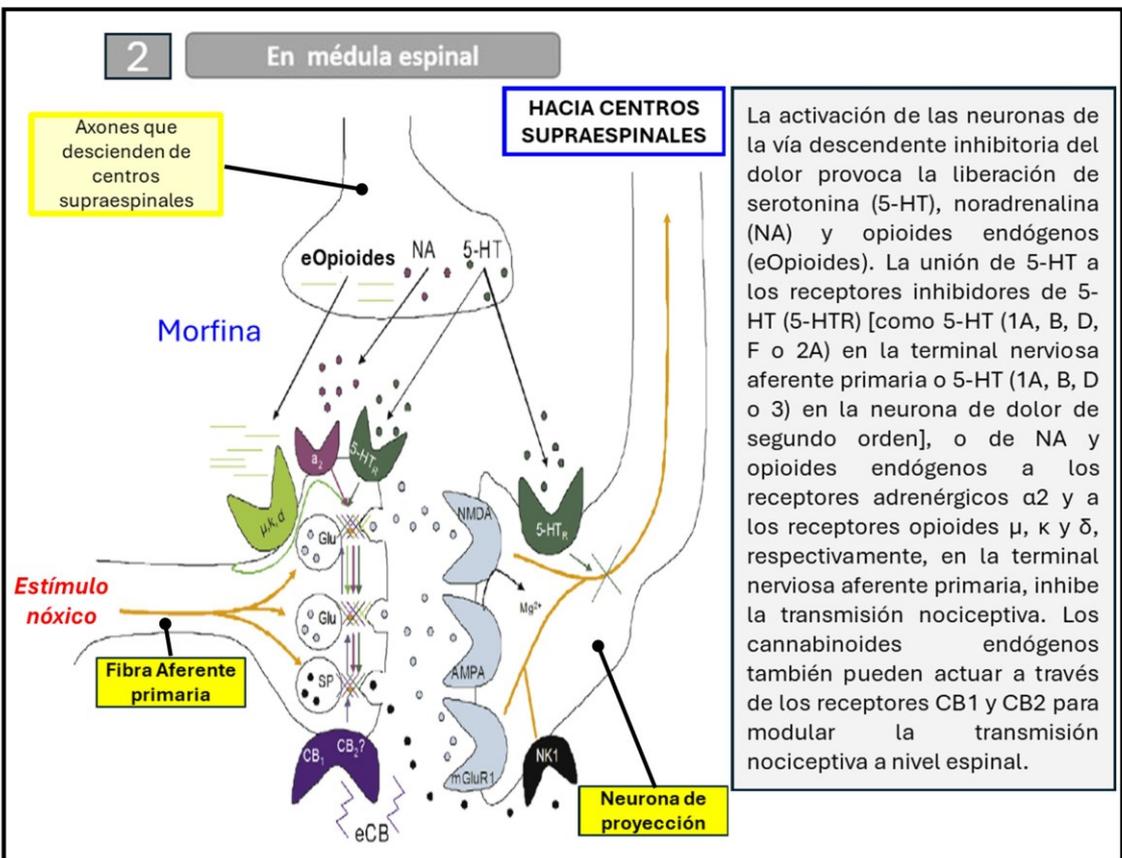
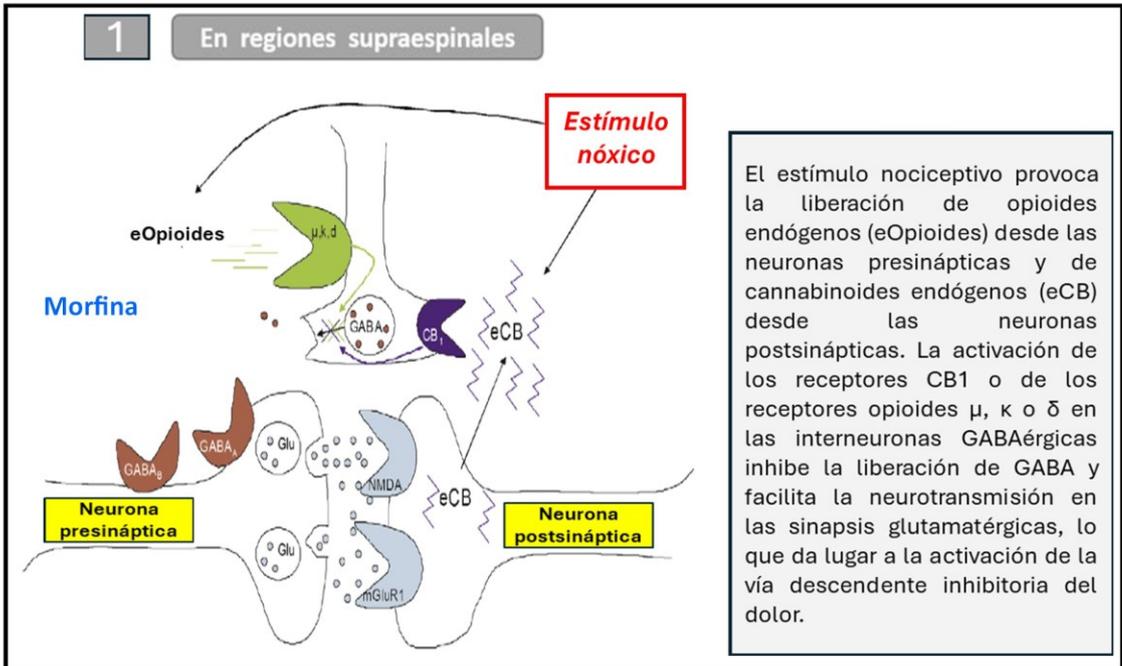
causando la hiperpolarización de la neurona y reduciendo su excitabilidad. Al mismo tiempo, se inhiben los canales de calcio tipo N (VGCC), lo que disminuye la entrada de calcio y la liberación de neurotransmisores excitatorios. Además, la inhibición de la adenilciclase reduce los niveles de cAMP, un segundo mensajero clave en la excitabilidad celular. Otras consecuencias moleculares son: 1) la modulación de los receptores NMDA y AMPA limitando la propagación de señales nociceptivas.; 2) Acciones diferidas sobre la expresión génica que, en condiciones de administración crónica de opioides, podrían ser causa de los fenómenos de tolerancia y dependencia. En esta acción nuclear están implicadas preferentemente las subunidades p/7 de las proteínas y promueven la activación de las vías de señalización relacionadas con MAPK y ERK, con fosforilaciones de dianas tanto citoplásmicas como nucleares (p. ej., el factor CREB y otros factores de transcripción). Estos efectos transcripcionales también dependen de la activación de la vía de la PKA, particularmente durante el tratamiento crónico con opioides.

C.- Por otra parte, se produce analgesia al interactuar *con las interneuronas activadas por las entradas descendentes desde la sustancia gris periacueductal (PAG) y la médula ventromedial rostral (RVM) -componentes de las vías descendentes inhibitorias del dolor-*. En estas estructuras supraespinales, la desinhibición de las interneuronas GABAérgicas mediada por opioides conduce a la activación de las neuronas descendentes que contienen monoaminas, las cuales suprimen la transmisión nociceptiva en la asta dorsal espinal (*ver figura 7.B*)<sup>366</sup>.

**2.-Sobre la glía** (*ver figura 7.A.II*). Hay evidencia que los *receptores  $\mu$ -OR* se expresan en la microglía y astrocitos<sup>367</sup>. No obstante, las acciones de la morfina sobre las células gliales suelen relacionarse con la tolerancia analgésica y la hiperalgesia paradójica, denominada hiperalgesia inducida por opioides (OIH, por sus siglas en inglés). Así, se reconoce que el tratamiento crónico con morfina provoca la disrupción de la homeostasis del cloruro mediada por microglía en las neuronas de la lámina I de la médula espinal, lo cual desencadena la OIH<sup>368</sup>. En estos casos, la microglía residente en la médula espinal adopta un estado reactivo caracterizado por la regulación al alza dependiente del  $\mu$ -OR del receptor P2X<sub>4</sub>R. La activación de P2X<sub>4</sub>R provoca la liberación del BDNF, el cual induce la disminución del cotransportador de potasio-cloruro KCC2, lo que resulta en una alteración de la homeostasis del cloruro en las neuronas de la lámina I de la médula espinal implicadas en la señalización del dolor. Esta vía

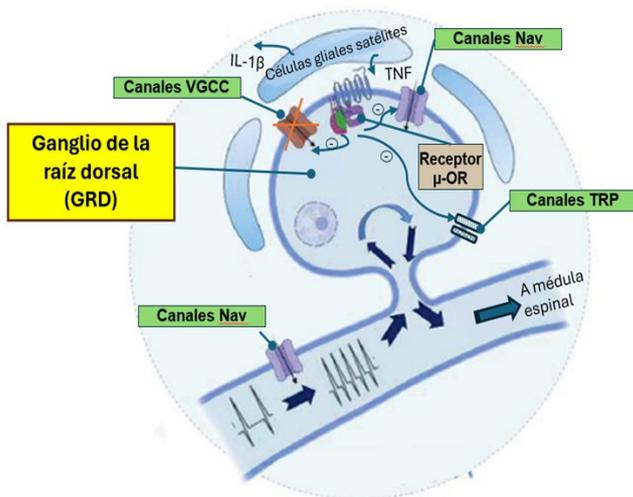
P2X4R–BDNF–KCC2, no sólo es crucial para el efecto hiperalgésico paradójico de la morfina, sino también para la hipersensibilidad al dolor tras una lesión nerviosa periférica.

**B.-Mecanismo supraespal**



*Nota: Adaptada de* <sup>182</sup>. La difusión de la morfina a través del LCR permite su interacción con receptores opioides localizados en los **sistemas moduladores descendentes**<sup>369</sup>. Estos sistemas neuroquímicos tienen su origen en neuronas en *regiones cerebrales superiores como la corteza, el hipotálamo y la amígdala*- la amígdala es una región que se activa particularmente por el estrés /miedo-. Las neuronas de estas regiones se proyectan hacia el *sistema gris periacueductal (SGPA o PAG -periaqueductal gray-)* y la *médula rostral ventromedial (RVM)* y finalmente a la *asta dorsal de la médula espinal*. La activación de los sistemas moduladores descendentes puede provocar dos efectos principales: A) analgesia a nivel de la asta posterior de la médula espinal al inhibir la transmisión ascendente de información nociceptiva (ver figura 7.A.1); 2) sensibilización, al facilitar la transmisión dolorosa. En este contexto, la morfina IT, al *interactuar con los receptores  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR y  $\kappa$ -OR en las interneuronas GABAérgicas*, potencia la vía descendente inhibitoria, promoviendo *la liberación de neurotransmisores como la serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y opioides endógenos (eopioides)* (ver figura 7.B.1). Estos neurotransmisores, al unirse a sus respectivos receptores en la médula espinal, inhiben sinápticamente la transmisión del dolor (ver figura 7.B.2). Sin embargo, los efectos antinociceptivos supraespinales son más complejos y varían según el tipo de dolor y los circuitos neuronales involucrados en respuesta a estímulos de dolor agudo y crónico<sup>74</sup>.

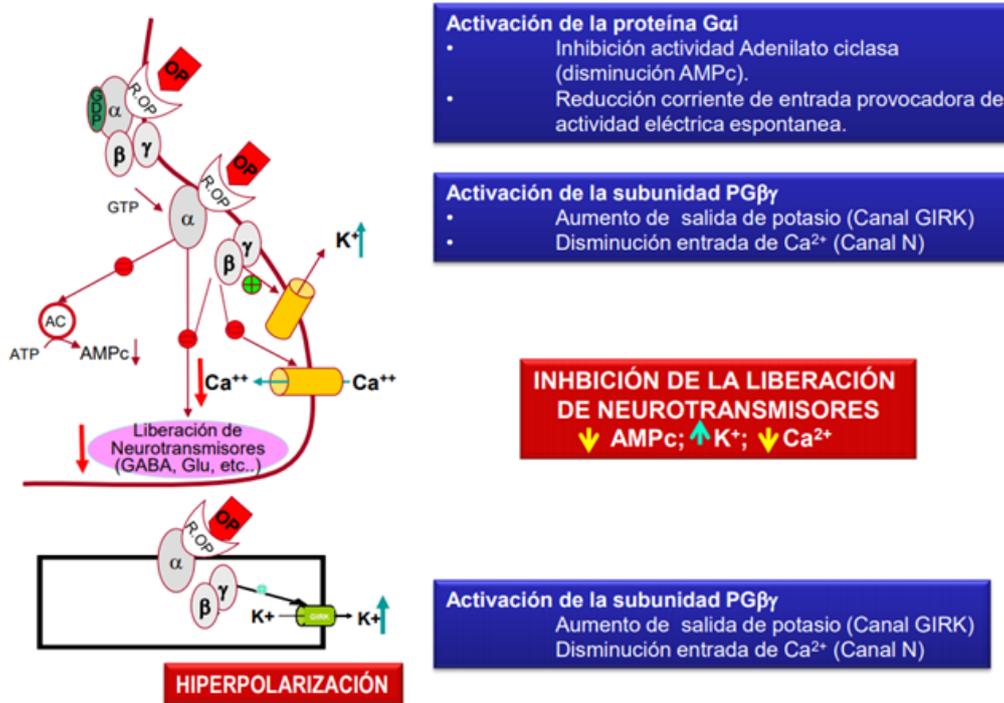
**C.-Mecanismo sobre el GRD**



La morfina IT puede inhibir la actividad neuronal al bloquear los canales de calcio activados por voltaje (VGCC) en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD). No obstante, la activación de la glía periférica (es decir, las células gliales satélite, SGCs) por la cirugía y/o el tratamiento con opioides puede dar lugar a la secreción de mediadores gliales, como TNF e IL-1β, lo que conduce a la sensibilización periférica y a la hiperalgesia inducida por opioides y la tolerancia

*Nota: Adaptada de* <sup>70</sup>. En respuesta a una lesión o inflamación, se desencadena una cascada de eventos complejos dentro y alrededor de los cuerpos celulares de los GRD. Estos eventos incluyen cambios en la producción de citoquinas y quimioquinas, un aumento en los factores inmunológicos, modificaciones en las células gliales y células de Schwann, alteraciones genéticas tempranas y tardías, y cambios en los canales iónicos de sodio, potasio y calcio<sup>370</sup>. La expresión de receptores opioides a este nivel permite modular el estímulo nociceptivo a través de diversos mecanismos como la modulación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales de calcio activados por voltaje (VGCC) o la del Na<sup>+</sup> a través de los canales de sodio voltaje dependientes (canales Nav) <sup>70,371</sup>. En este contexto, la particular anatomía de las meninges, que envuelven al ganglio de la raíz dorsal (GRD), permite a la morfina IT alcanzar esta estructura de manera directa y eficaz e interactuar con los receptores opioides ubicados a este nivel. Sin embargo, La activación de la glía periférica (es decir, las células gliales satélite, SGCs) por la cirugía y/o el tratamiento con opioides puede dar lugar a la secreción de mediadores gliales, como TNF e IL-1 $\beta$ , lo que conduce a la sensibilización periférica y a la hiperalgesia inducida por opioides y la tolerancia. Ello implica que la respuesta a la morfina IT pueda variar.

**Figura 8. Mecanismos de transducción de la señal opioide**



*Nota: Elaboración propia basada en* <sup>372</sup>. Los receptores opioides pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y actúan como moduladores, tanto positivos como negativos de la transmisión sináptica que tiene lugar a través de estas proteínas<sup>373</sup>. En este caso los GPCR activados por opioides son fundamentalmente de tipo inhibidor Gi/o. Las acciones intracelulares mejor conocidas son las siguientes: a) inhibición de la adenilato ciclasa por activación de subunidades G $\alpha_{i/o}$  y G $\alpha_2$  que originará, entre otros efectos, la reducción de la amplitud de una corriente de entrada que es capaz de provocar actividad eléctrica espontánea; b) activación de la conductancia de K<sup>+</sup>, en especial la mediada por el canal GIRK, probablemente por la activación de las subunidades (β/γ); c) inhibición de la conductancia del Ca<sup>2+</sup> tras activación de las subunidades β/γ, debido al cierre de canales en parte tipo N; d) inhibición de la liberación del neurotransmisor debida a las tres acciones anteriores; e) activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>/C y, consiguientemente, de la proteinquinasa (PKC), acción en la que intervienen tanto las subunidades β/γ como la G α<sub>i</sub>; f) movilización intracelular del Ca<sup>2+</sup> a partir de los depósitos del retículo endoplásmico, acción que puede estar relacionada con la activación de la fosfolipasa C, y g) los opioides pueden originar también activación de la proteína

G<sub>s</sub> y favorecer la activación de la adenililciclasa y de la proteinquinasa A (PKA), dando origen a acciones de carácter estimulador; en general, esta se verá enmascarada por la acción inhibitora, pero en situaciones de tolerancia a la acción inhibitora puede prevalecer la acción estimuladora<sup>363</sup>.

**Figura 9. Efectos adversos tras la administración de morfina IT.**

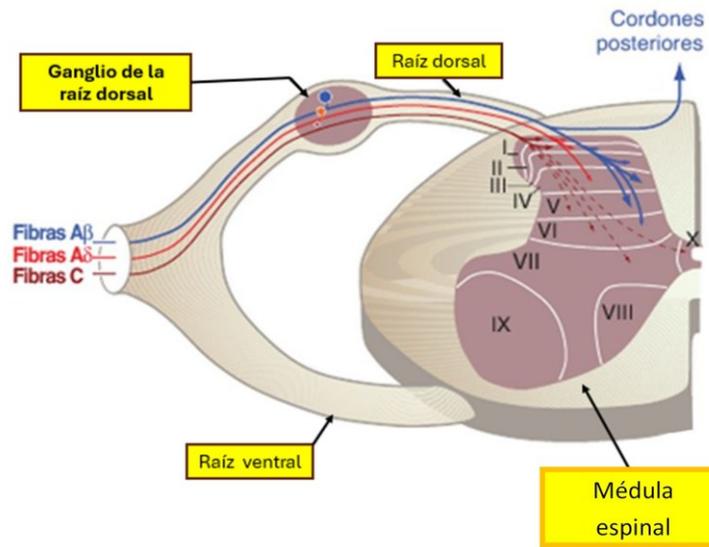


*Nota: Adaptada de* <sup>82</sup>. Todos los opioides hidrofílicos comparten el mismo perfil de efectos adversos tras la administración IT y presentan un perfil similar al de la administración sistémica. Los efectos adversos más comunes incluyen náuseas y vómitos, prurito, retención urinaria, sedación y depresión respiratoria. La aparición de efectos indeseables se correlaciona con la migración rostral del opioide en el LCR (con la morfina este efecto es dosis dependiente y de curso predecible) -en caso de los opioides lipofílicos hay que añadir el de la absorción por vasos y afectación supraespinal-. De ellas destaca la depresión respiratoria -principal limitante de la utilización de opioides -. Otros son el prurito -la causa del prurito no se comprende claramente, pero puede reflejar alteraciones en el procesamiento de los nervios espinal y trigémino-, las náuseas y/o vómitos -relacionada con la activación de los quimiorreceptores en el tronco del encéfalo-,

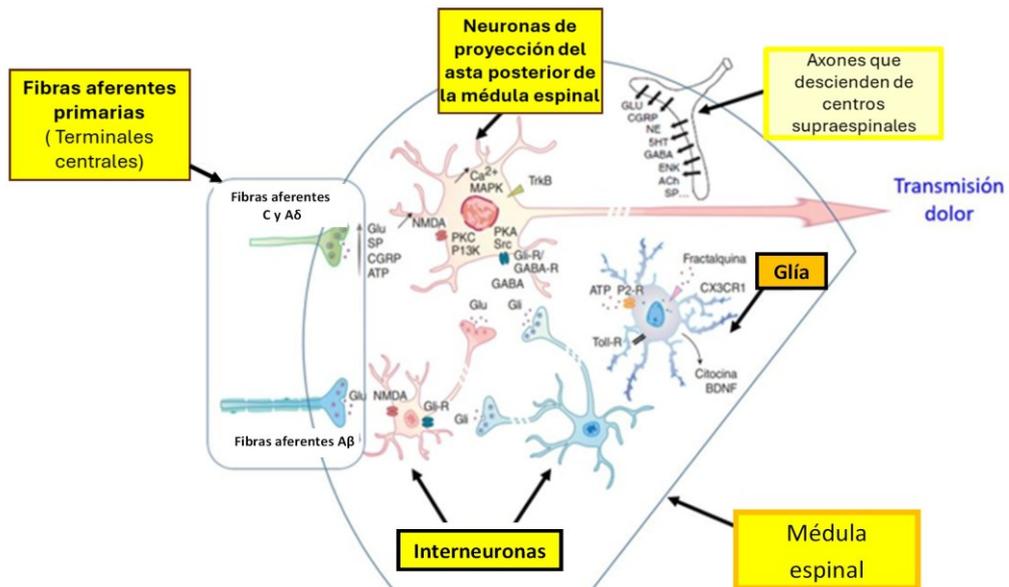
el estreñimiento - con una duración similar a la producida por los opioides sistémicos- y la retención urinaria -más frecuente que se produzca tras administración neuroaxial del opioide que por vía parenteral-.

Figura 10. Médula espinal.

**A.-Aferencias espinales y sinapsis en el asta posterior de la médula espinal**

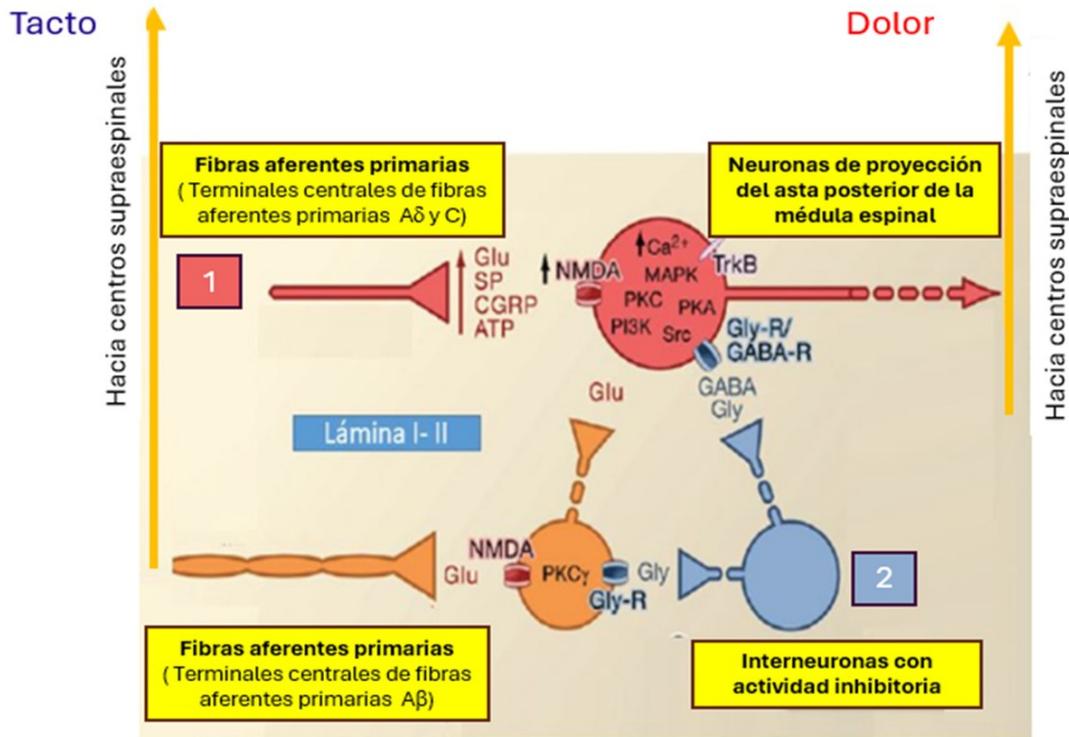


**B.- Elementos celulares en el asta posterior de la médula espinal**



*Nota: Elaboración propia basada en* <sup>374</sup>. La médula espinal es el primer sitio de relevo en la transmisión de la información nociceptiva desde la periferia a centros supraespinales<sup>231</sup>. Una vez el estímulo nociceptivo alcanza a cualquiera de las fibras aferentes primarias éste viaja en sentido ortodrómico (de la periferia al neuroeje) hasta el soma de la neurona origen (la neurona bipolar que forma el ganglio de la raíz dorsal (GRD) del nervio espinal o craneal) y de allí va hasta la asta dorsal de la médula espinal por medio de las prolongaciones dendríticas centrales de dicha neurona. **A) Aferencias espinales y sinapsis en la asta dorsal de la médula espinal.** Los terminales centrales de las fibras aferentes primarias terminan en la asta dorsal de la médula espinal, que está organizada en diferentes láminas de Rexed que se extienden desde la asta dorsal superficial al profundo. La mayoría de las fibras aferentes primarias tipo A delta y fibras aferentes primarias tipo C nociceptivas terminan superficialmente en las láminas I-II, aunque existe una proporción menor que alcanza las láminas más profundas, mientras que las fibras aferentes primarias tipo A beta inervan predominantemente la lámina III. La lámina X (alrededor del canal del epéndimo) también se relaciona con la transmisión nociceptiva constituyendo la porción medular de los sistemas polisinápticos reticulares estando relacionada con la transmisión del dolor visceral. Es interesante reseñar: 1) en la lámina I los aferentes musculares y cutáneos convergen sobre los cuerpos celulares de las células nociceptoras específicas de la lámina I lo que explicaría el fenómeno del dolor referido; 2) Existen dentro de las láminas células que funcionan aisladamente capaces de modular la intensidad del impulso aferente, aumentando o disminuyendo el umbral de las demás células; 3) Las señales son proyectadas por medio de tractos a los centros superiores o a otros segmentos espinales. **B) Elementos celulares en la médula espinal.** En la asta posterior de la médula espinal participan en la nocicepción diferentes tipos celulares: *I.- Elementos neuronales de la asta dorsal de la médula espinal:* dentro de ellos distinguir entre: 1) Las terminales centrales de las fibras aferentes primarias conectando con neuronas secundarias o interneuronas ; 2) Las neuronas nociceptivas de la asta posterior de la médula espinal; 3) Las interneuronas de la asta dorsal de la médula espinal; 4) Los axones que descienden desde centros supraespinales modulando la nocicepción. *II.-Elementos gliales de la asta dorsal de la médula espinal:* dentro de ellos reseñar el papel que juega: 1) La microglía; 2) Los astrocitos. Estos elementos configuran una estructura muy compleja en la que se dan lugar sinapsis axodendríticas, axoaxónicas y dendroaxónicas.

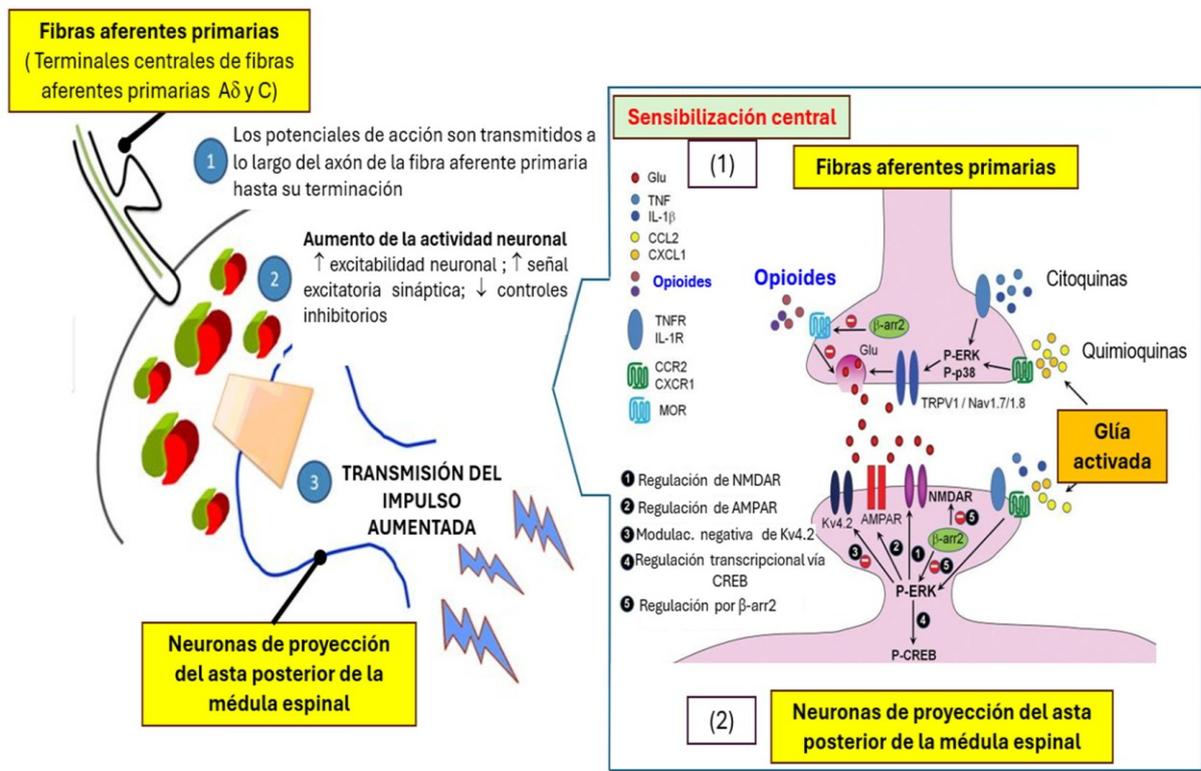
**Figura 11.** Transmisión del estímulo nociceptivo en la asta posterior de la médula espinal en un estado de sensibilización central (1).



La actividad presináptica de las terminales centrales de las fibras aferentes primarias (Aδ y C) ocasiona la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Glu) actuando sobre los receptores NMDA o la SP, los cuales, tras atravesar la hendidura sináptica, se unen a receptores específicos de la membrana postsináptica, permitiendo la transmisión de las señales hacia los centros supraespinales, donde la información nociceptiva es procesada y percibida como dolor. No obstante, en circunstancias normales, hay interneuronas (azul) que liberan continuamente GABA y/o glicina (Gly) para disminuir la excitabilidad de las neuronas de salida de la lámina I y modular la transmisión del dolor (tono inhibitorio). Estas interneuronas son activadas por terminales centrales de las fibras aferentes primarias Aβ

*Nota: Adaptada de* <sup>375</sup>. 1. **Sensibilización mediada por los receptores NMDA/glutamato.** Ante un estímulo intenso o una lesión persistente las fibras nociceptivas de tipo C y A $\delta$  activadas liberan una variedad de neurotransmisores, incluidos el glutamato (Glu), la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el ATP, en las sinapsis con las neuronas de proyección ubicadas en la lámina I-III de la asta posterior de la médula espinal (color rojo). Como resultado, los receptores NMDA de glutamato, que normalmente están inactivos, se activan en las neuronas postsinápticas. Esto permite que haya un aumento de calcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>) y la activación de varias vías de señalización dependientes de calcio y segundos mensajeros, como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa A (PKA), el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína Src. Este fenómeno incrementa la excitabilidad de la neurona de salida, facilitando la transmisión de señales de dolor a centros supraespinales. 2.- **Desinhibición.** En condiciones normales, las interneuronas inhibitorias (color azul) liberan de manera continua GABA y/o glicina (Gly) para reducir la excitabilidad de las neuronas de salida de la lámina I, modulando así la transmisión del dolor (tono inhibitorio). Sin embargo, tras una lesión, esta inhibición puede perderse, lo que genera hiperalgesia. Además, la desinhibición permite que las fibras aferentes primarias no nociceptivas, como las fibras mielinizadas A $\beta$ , participen en los circuitos de transmisión del dolor, haciendo que estímulos que normalmente no son dolorosos se perciban como tales (alodinia). Esto ocurre, en parte, a través de la desinhibición de las interneuronas excitatorias que expresan PKC $\gamma$  en la lámina II interna.

**Figura 12.** Transmisión del estímulo nociceptivo en la asta posterior de la médula espinal en un estado de sensibilización central (2)

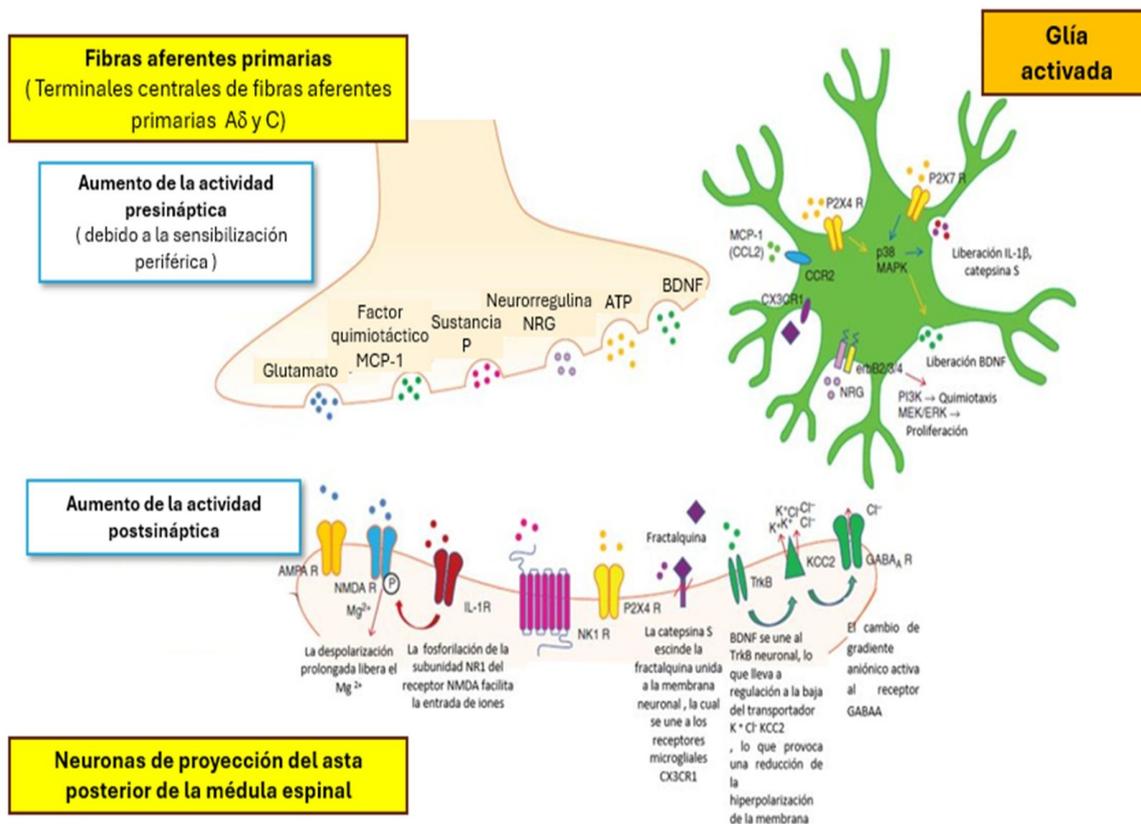


La sensibilización central en sinapsis excitatorias de la asta dorsal es inducida por citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (TNF, IL-1β, CCL2, CXCL1) producidas por células gliales. La activación de sus receptores presinápticos fosforila ERK y p38, promoviendo la liberación de glutamato (Glu). En el lado postsináptico, P-ERK modula positivamente los receptores NMDA y AMPA, y negativamente el canal de potasio Kv4.2, manteniendo la sensibilización central al fosforilar CREB. Los opioides como la morfina inhiben la liberación de neurotransmisores vía MOR. β-arrestina-2 regula MOR y NMDAR, afectando la transición del dolor agudo al crónico.

*Nota: Elaboración propia basada en* <sup>302</sup>. Existen diferentes mecanismos moleculares responsables de la sensibilización central en las sinapsis entre las fibras aferentes primarias y las neuronas de proyección de la asta posterior de la médula espinal. Así : **(1) A nivel presináptico** , es decir , en las terminales centrales de las aferencias primarias nociceptivas, la activación de receptores de citoquinas y receptores de quimioquinas (CCR2, CX3CR1, TNFR) dan como resultado la fosforilación y activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (P-ERK) y p38 (P-p38), lo que facilita la liberación de glutamato (Glu) desde la vesículas sinápticas a través de la activación de canales iónicos como el receptor transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1), el canal de sodio dependiente de voltaje subtipo 1.7 (Nav1.7) y el canal de sodio dependiente de voltaje subtipo 1.8 (Nav1.8). En este proceso juegan un papel relevante las citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (por ejemplo, factor de necrosis

tumoral [TNF], interleucina [IL]-1 $\beta$  y quimioquinas) liberadas desde células gliales. **(2) A nivel postsináptico**, es decir, en las neuronas de proyección de la asta posterior de la médula espinal, el aumento en la liberación de neurotransmisores excitatorios (por ejemplo, Glu) induce la fosforilación y activación de la P-ERK, lo que puede generar la sensibilización central a través de la modulación positiva del receptor NMDA (NMDAr) (paso 1), el receptor del glutamato AMPA (AMPAr) (paso 2) y la modulación negativa de la subunidad del canal de potasio Kv4.2 (paso 3). P-ERK también mantiene la sensibilización central al inducir la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta CREB (P-CREB, Paso-4). CREB es un factor de transcripción crítico que controla la expresión de genes pronociceptivos. Todos estos cambios conducen a un incremento en el calcio extracelular, activación de proteínquinasa C (PKC), lo cual modifica el potencial de membrana en reposo. Por último, mencionar la acción paradójica de la  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$  arr2) tras administración de la morfina. Esta proteína juega un papel importante en la regulación de la señalización de los receptores opioides  $\mu$  (MOR). Al desensibilizar y degradar estos receptores,  $\beta$ arr2 puede inhibir la señalización de los receptores opioides  $\mu$ . Además,  $\beta$ arr2 también puede inhibir la señalización de los receptores NMDAR y la P-ERK. Esto puede contribuir a la transición del dolor agudo al dolor crónico.

**Figura 13.** Transmisión del estímulo nociceptivo en la asta posterior de la médula espinal en un estado de sensibilización central (3).

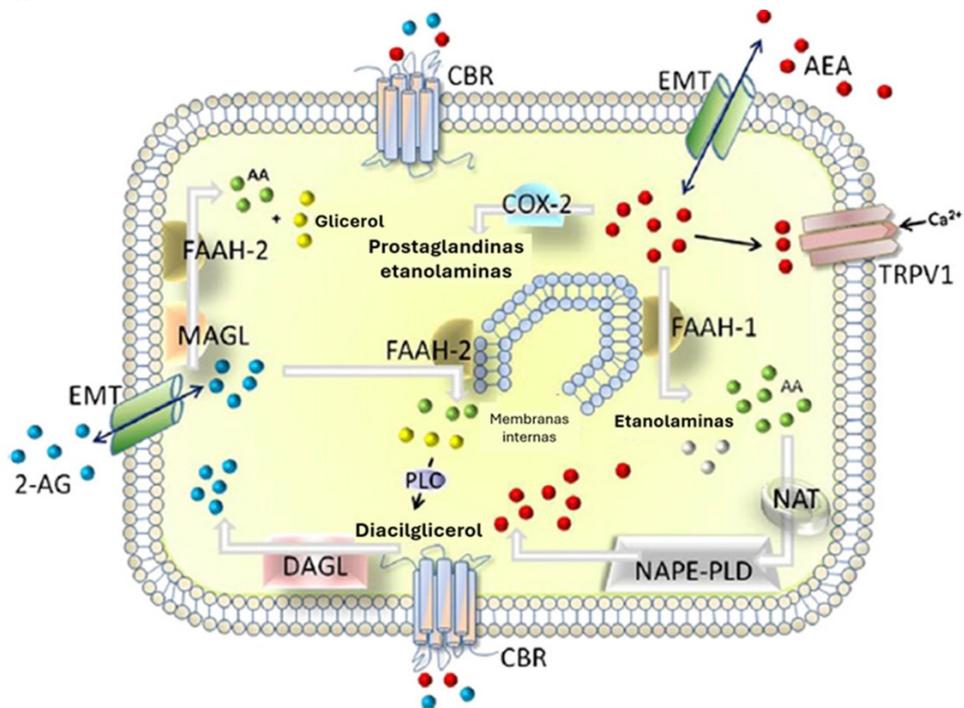


El aumento en la actividad presináptica, causado por un mayor tráfico de canales de calcio, genera una despolarización prolongada postsináptica a través de la acción del glutamato en receptores AMPA y de la sustancia P (SP) y CGRP en receptores metabotrópicos. Esta despolarización prolongada activa los receptores NMDA al eliminar el bloqueo de Mg<sup>2+</sup>, incrementando la actividad postsináptica y promoviendo cambios mediados por segundos mensajeros. La microglía es activada por quimioquinas como MCP-1 y factores de crecimiento como la Neuregulina-1. El ATP activa receptores P2X4 y P2X7, lo que induce la liberación de IL-1β, cathepsina S y BDNF. IL-1β se une a receptores IL-1R, y la fractalquina clivada por la cathepsina S activa CX3CR1 en la microglía. BDNF reduce el transportador KCC2, lo que altera el gradiente aniónico y provoca desinhibición mediante la activación del receptor GABA-A

*Nota: Adaptada de* <sup>300</sup>. El aumento de la actividad presináptica, causado por un mayor tráfico de canales de calcio, genera una despolarización postsináptica prolongada mediada por: 1) la acción del glutamato en los receptores AMPA y 2) la acción de la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) sobre los receptores metabotrópicos (es decir, a una potenciación homosináptica a largo plazo -long term potentiation o LTP en inglés-). Esta despolarización prolongada elimina el bloqueo fisiológico de Mg<sup>2+</sup> de los receptores NMDA, cuya activación posterior incrementa aún más la actividad postsináptica, lo que lleva a cambios mediados por segundos mensajeros. Por otra parte, se observa una sobreexpresión neuronal de MCP-1 - una sustancia que atrae la microglía- y la neuregulina-1 (NRG-1) - un factor de crecimiento que promueve la proliferación de la microglía, la quimiotaxis y la liberación de

citoquinas. Otro hecho reseñable es la liberación de ATP de las terminales presinápticas y su actuación sobre los receptores P2X4 postsinápticos y los receptores P2X7 y P2X4 microgliales. Esta interacción conduce a la activación de p38 MAPK y, en consecuencia, a la liberación de IL-1 $\beta$ , catepsina S y BDNF. La IL-1 $\beta$  se une a receptores de IL-1R presentes en las neuronas y la glía. La catepsina S escinde la fractalquina unida a la membrana de la neurona, liberando fractalquina soluble, que a su vez se une a los receptores CX3CR1 en la microglía, activándola aún más. El BDNF se une a los receptores TrkB neuronales, lo que lleva a disminución del transportador K + Cl- KCC2, que da como resultado un cambio del gradiente aniónico, lo que provoca una reducción de la hiperpolarización de la membrana. Como resultado del cambio del gradiente aniónico, la activación del receptor GABA<sub>A</sub> da como resultado la salida de Cl<sup>-</sup> y la consiguiente desinhibición.

**Figura 14. Componentes del SEC.**



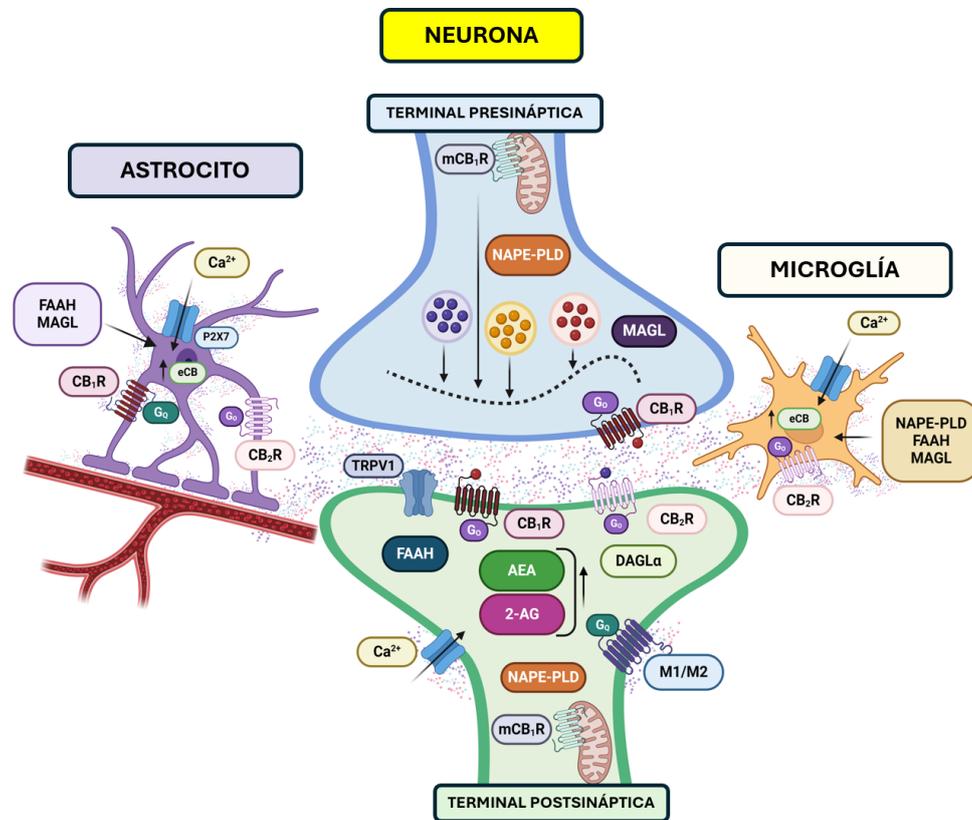
**El sistema endocannabinoide (SEC)** es un sistema de señalización lipídica neuroactiva, compuesto principalmente por **dos receptores acoplados a proteínas Gi/o**: el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1R) y el receptor cannabinoide tipo 2 (CB2R). Este sistema incluye **ligandos endógenos (eCBs)** - como la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG)- que se unen y activan dichos receptores, un **transportador de membrana (EMT)**, y varias **enzimas encargadas de la síntesis y degradación de los eCBs**. Las principales enzimas involucradas en la síntesis de los eCBs son :1) *N-aciltransferasa (NAT)*: participa en el primer paso de la síntesis de la AEA al convertir fosfolípidos en N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE), precursor directo de la AEA; 2) *Fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD)*: cataliza la conversión de NAPE en AEA; 3) *Fosfolipasa C (PLC)*: en la síntesis de 2-AG, la PLC genera diacilglicerol (DAG) a partir de fosfolípidos de membrana-; 4) *Diacilglicerol lipasa (DAGL)*: convierte el diacilglicerol (DAG) en 2-AG, completando su síntesis. Las principales enzimas responsables de la degradación de los eCBs son: 1) *Amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH)*: es la enzima principal encargada de la degradación de la AEA. 2) *FAAH*: hidroliza la AEA en ácido araquidónico (AA) y etanolamina. 3) *Lipasa de monoacilglicerol (MAGL)*: esta enzima degrada predominantemente el 2-AG, convirtiéndolo en ácido araquidónico (AA) y glicerol. 4) *Ciclooxigenasa-2 (COX-2)*: en ciertos contextos, puede metabolizar la AEA transformándola en prostaglandinas etanolaminas.

*Nota: Adaptada de* <sup>92</sup>. Se han descrito cinco **ligandos endógenos de los receptores cannabinoides (eCBs)**, entre los cuales la AEA (N-araquidonilfosfatidil-etanolamina, AEA)<sup>376</sup> -representado como esferas rojas- y el 2-araquidonilglicerol (2-AG)<sup>377</sup> -representado como esferas azules- son los principales-. Otros son el éter de noladina<sup>378</sup>, la virodhamina<sup>379</sup> y la N-arachidonoil dopamina (NADA)<sup>380</sup>. Las N-aciletanolaminas (NAEs), estructuralmente relacionadas, como la N-oleoil etanolamina (OEA) y la N-palmitoil etanolamina (PEA), también están ampliamente distribuidas en el SNC y la periferia. Sin embargo, su clasificación como eCBs es discutible a pesar de ser ligandos de los receptores PPAR, dado su escasa afinidad por los receptores CB1r y CB2r<sup>381</sup>. Su existencia se debe a la acción de un conjunto de **enzimas responsables de la síntesis**<sup>382</sup>. En el caso de la AEA la síntesis se realiza a través de los siguientes pasos y enzimas principales: 1) Enzimas iniciales: *N-aciltransferasa (NAT)*: Cataliza la transferencia del ácido araquidónico desde la fosfatidilcolina a la fosfatidiletanolamina, formando N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE). 2) Enzimas de síntesis final: *NAPE-PLD* (N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasa D): Esta es la enzima principal que convierte NAPE en anandamida. En el caso del 2-AG la síntesis involucra principalmente las siguientes enzimas: 1) *Fosfolipasa C (PLC)*: Esta enzima cataliza el primer paso en la síntesis del 2-AG. La PLC actúa sobre los fosfolípidos de membrana, especialmente el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), para generar diacilglicerol (DAG), un precursor clave del 2-AG. 2) *Diacilglicerol lipasa (DAGL)*: Posteriormente, la DAGL actúa sobre el diacilglicerol (DAG) producido por la PLC y lo convierte en 2-AG. Esta síntesis ocurre "a demanda", es decir, no se almacena, sino que se produce cuando es necesaria a partir de lípidos de membrana y se libera inmediatamente<sup>179</sup>. No obstante, este hecho ha sido cuestionado<sup>383</sup>, lo que indica que nuestra comprensión sobre su funcionamiento continúa en evolución. Los eCBs sintetizados interactúan con diferentes **receptores cannabinoides** exhibiendo una selectividad variable. Los dos subtipos principales de receptores cannabinoides (CBR) descritos clásicamente son el CB1r y el CB2r<sup>384</sup>. Estos receptores son moléculas endógenas que pertenecen al grupo de receptores celulares de la membrana asociados a la proteína G (receptores metabotrópicos)<sup>385</sup>. Sus vías de señalización se detallan en la figura 15. No obstante, también interactúan con otros receptores, como el receptor acoplado a proteína G GPR55<sup>386</sup>, y con el dominio citoplasmático del canal proteico del receptor transitorio de tipo 1 vaniloide (TRPV1)<sup>387</sup>. Además, hay evidencias que sugieren que los eCBs activan receptores nucleares como



*Nota: Elaboración propia. Publicada en "Carrascosa et al .Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality. Int J Mol Sci. 2024 Jun 6;25(11):6268.* **La activación del CB1r** provoca el acoplamiento a la proteína Gi/o, lo que lleva a la inhibición del adenilato ciclasa que media la conversión de la adenosina trifosfato (ATP) a AMP cíclico (cAMP), la modulación de los canales iónicos de la membrana (bloquea los canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes - VSCC-<sup>395</sup> y abre los canales de K<sup>+</sup><sup>396</sup>) y la activación de las vías de señalización de la proteinquinasa activada por mitógenos MAPK/ERK y de factores de transcripción<sup>397,398</sup>. El resultado global es la hiperpolarización de la membrana. **La activación del CB2r** se asocia a mecanismos de transducción de señales similares a los CB1r en términos de sus acciones sobre el adenilato ciclasa y las quinasas MAP, pero no comparten las mismas interacciones con los canales iónicos que los CB1r<sup>399</sup>. **La activación del receptor GPR119** provoca el acoplamiento a Gs, estimulando la adenilil ciclasa, aumentando los niveles de AMPc y activando PKA<sup>400</sup>. **La activación del receptor GPR55** induce su acoplamiento a la proteína G13, lo que desencadena la activación de la fosfolipasa C y la vía de señalización RhoA. Este proceso provoca un aumento de los niveles de calcio intracelular, la activación de la señalización MAPK/ERK y la translocación de factores de transcripción<sup>401</sup>. **La activación del receptor TRPV1** permite la entrada de cationes y la despolarización de la membrana<sup>402</sup>. Finalmente, **la activación de los CB1r y CB2r** conduce a la activación de KROX-24 a través de la cascada de señalización MAPK/ERK<sup>385,403</sup>. KROX-24 es un factor de transcripción nuclear regulador estrechamente asociado con funciones biológicas críticas, como la estabilización de la potenciación a largo plazo duradera, la diferenciación celular, la señal de supervivencia o muerte en células neuronales, o la regulación de neurotransmisores y receptores específicos.

**Figura 16.** Representación esquemática de acción antinociceptiva del SEC en la asta posterior de la médula espinal.

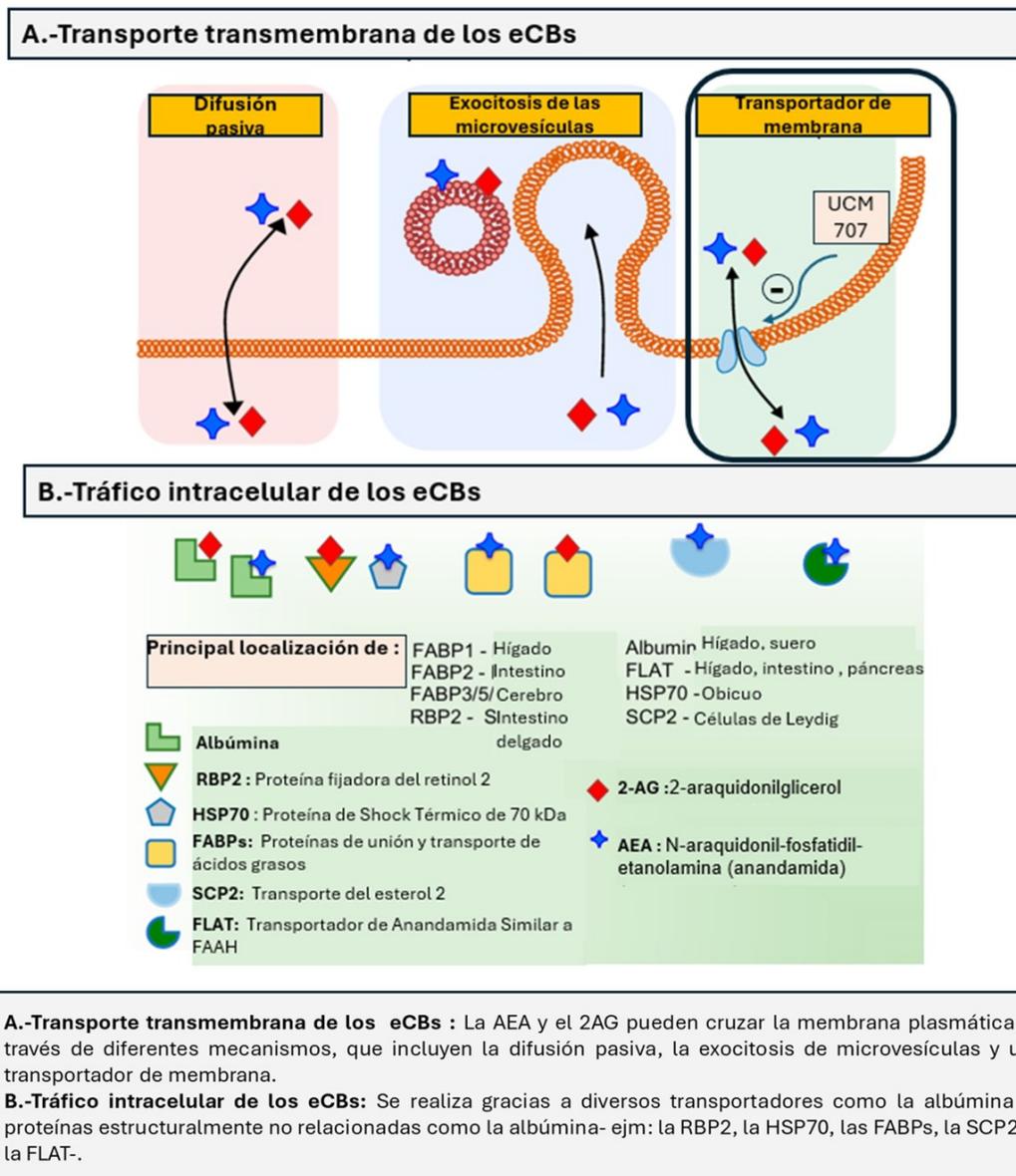


*Nota: Elaboración propia. Publicada en “Carrascosa et al. Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality. Int J Mol Sci. 2024 Jun 6;25(11):6268. Los componentes del SEC están presentes en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía. 1) En las neuronas: El principal mecanismo de regulación sináptica por eCBs es la señalización retrógrada<sup>93,157,404</sup>. En este proceso la actividad neuronal postsináptica induce la síntesis de eCBs. Como se muestra en el esquema, los dos principales eCBs, 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y AEA (AEA), son biosintetizados a partir de diacilglicerol (DAG) por el diacilglicerol lipasa-α (DAGLα) y de N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD), respectivamente<sup>392</sup>. Siendo lípidos, los eCBs, principalmente el 2-AG, cruzan fácilmente la membrana y viajan en sentido retrógrado para activar los CB1rs localizados en las terminales presinápticas. Estos receptores, a través de su acoplamiento a proteínas G heterotriméricas,*

principalmente  $G_i/o$ , regula distintas rutas de señalización, entre otras: *i) la inhibición de la vía de la adenilil ciclasa (AC)–adenosina 3',5'monofosfato cíclico (cAMP)–proteína quinasa A (PKA)*, lo que da lugar a un descenso en los niveles de AMPc. De esta forma se ve afectada la capacidad de fosforilación de proteinquinasas dependientes de este nucleótido cíclico (incluidas las que se encuentran en el núcleo para regular procesos de transcripción a partir de genes de acción inmediata y tardía ) lo que dadas las funciones que estas cinasas ejercen sobre el metabolismo celular o la expresión génica conducirá a determinados efectos biológicos; *(ii) el control de la concentración citoplasmática de  $Ca^{2+}$  libre*, tanto por inhibición de canales iónicos de membrana plasmática (ej. canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a potencial, VSCC) como por salida de  $Ca^{2+}$  de reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico (probablemente vía proteínas Gq)<sup>405</sup>; *(iii) la apertura de canales de  $K^{+406,407}$* , lo que conlleva un aumento del  $K^{+}$  con la consecuente hiperpolarización de la membrana, la reducción del potencial de acción y la inhibición de la actividad de descarga de potenciales de acción por parte de la neurona; *(iv) la activación de cascadas de proteinquinasas activadas por mitógenos (MAP )* como ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), JNK (quinasa del extremo N-terminal de c-Jun) y p38<sup>408</sup>. El efecto combinado de estos mecanismos de transducción celular es la base de la inhibición que los cannabinoides ejercen en la liberación de neurotransmisores<sup>409</sup>. *Por otra parte, una vez liberados los eCBs en la hendidura sináptica, existen otros mecanismos de regulación sináptica no retrógrados* como la interacción con los receptores CB1r postsinápticos ubicados tanto en la membrana celular<sup>410</sup> como en las mitocondrias<sup>411</sup>, la interacción con el receptor TRPV1 y los GPCRs los cuales contienen un sitio de unión intracelular para lípidos<sup>101</sup>. **II) En la glía:** En condiciones neuroinflamatorias, la microglía se convierte en la principal productora de eCBs, superando en veinte veces a otras células gliales y neuronas<sup>177</sup>. Estas sustancias liposolubles se difunden rápidamente a través de las membranas celulares para interactuar con dianas neurales y glía. En estos casos, la interacción de los eCB con los CB2r gliales ejerce un control fino sobre la transmisión sináptica, modulando la liberación de neurotransmisores y la respuesta inflamatoria<sup>177,333</sup>. Sin embargo, la activación de los CB2r también puede tener efectos secundarios, como la atracción de más células inmunes a estructuras nerviosas cuando la barrera hematoencefálica está dañada, lo que podría exacerbar la inflamación<sup>278</sup>. Este efecto dual de los CB2r gliales revela la complejidad de la respuesta del SEC en el contexto de la neuroinflamación. Por otro lado, se ha reportado que los receptores CB1r se

expresan de manera funcional en la microglía<sup>333</sup>. En la actualidad aún no se ha esclarecido si el CB1r regula la función de la microglía y, en caso afirmativo, cómo lo hace. Además, el CB1r también se encuentra presente en los astrocitos, donde desempeña un papel en la modulación de la transmisión sináptica y la memoria<sup>412</sup>. Abreviaturas: CB1r/CB2r: receptor cannabinoide tipo 1/tipo 2; eCB: endocannabinoide; mCB1R: receptor CB1 mitocondrial; TRPV1: canal de cationes del potencial receptor transitorio subfamilia V, miembro 1; FAAH: amida hidrolasa de ácidos grasos; MAGL: monoacilglicerol lipasa; P2X7: receptores purinérgicos P2X7; NAPE-PLD: N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D; AEA: AEA; 2-AG: 2-araquidonilglicerol.

**Figura 17. Transporte y tráfico intracelular de los eCBs**



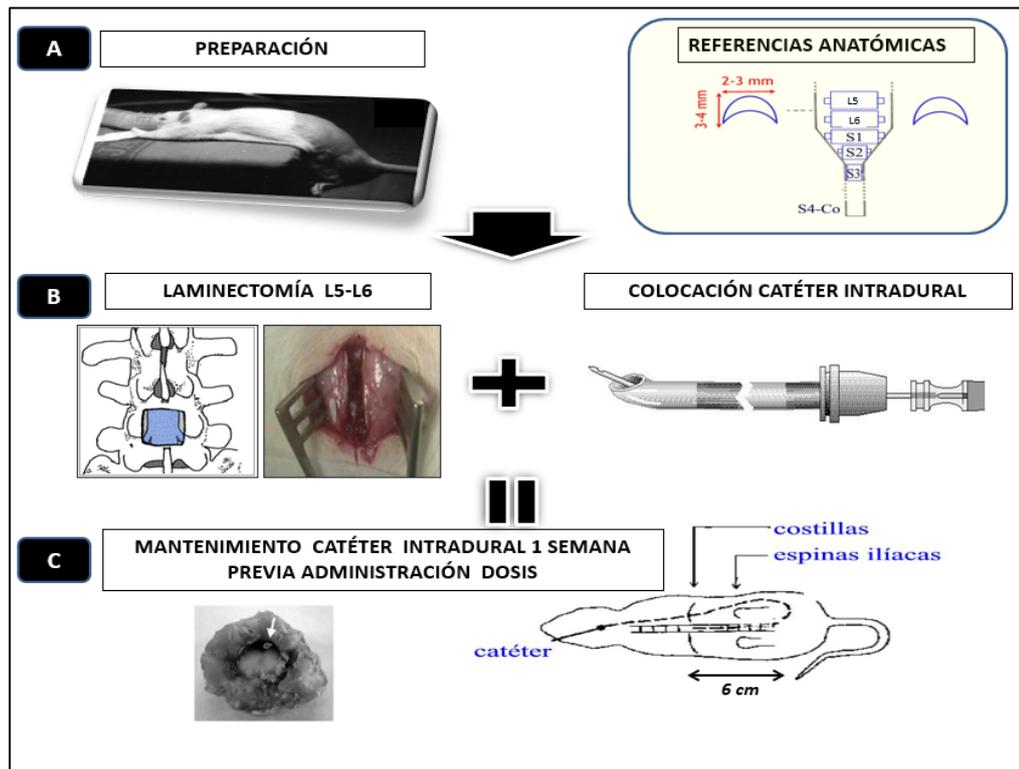
*Nota: Adaptada de* <sup>286</sup>. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los eCBs no suelen almacenarse en vesículas. Se sintetizan a demanda y luego son liberados de las células postsinápticas para actuar sobre los receptores presinápticos<sup>93,106,404</sup>. Posteriormente, una vez que los eCBs cumplen su función, deben ser eliminados del espacio sináptico para evitar la estimulación prolongada de los receptores<sup>93,179,404</sup>. En este proceso de recaptación es clave el transporte transmembrana y tráfico intracelular de los eCB para su posterior hidrólisis intracelular en neuronas y glía<sup>388</sup>.*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*

**A.-Transporte transmembrana de los eCBs.** *Difusión Pasiva:* Es el movimiento neto de moléculas a través de una membrana semipermeable desde una región de mayor concentración a una de menor concentración. Debido a su naturaleza lipofílica, los eCBs pueden difundirse directamente a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática<sup>413</sup>. Este proceso es pasivo y no requiere energía. *Exocitosis de Microvesículas.* Es un proceso de liberación de vesículas que contienen moléculas desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. Aunque clásicamente se considera que los eCBs no se almacenan, existe bibliografía que considera que estas moléculas pueden ser empaquetadas en microvesículas y liberadas al exterior celular<sup>383</sup>. Esta vía permite una liberación rápida y dirigida de los eCBs. *Transportador de membrana.* La evidencia sugiere que el transporte de eCBs hacia el interior celular podría estar mediado por proteínas transportadoras similares a las involucradas en el transporte de otros lípidos.*Error! No se encuentra el origen de la referencia.* Sin embargo, la identificación y caracterización de estos transportadores específicos para los eCBs aún no se ha logrado<sup>414</sup>.

**B. Tráfico Intracelular de los eCBs.** El tráfico intracelular de los eCBs es fundamental para regular sus niveles en las células y tejidos y para determinar sus efectos biológicos. De entre los transportadores destacan: 1º) La Albúmina<sup>415</sup>: Es una proteína plasmática que se une a una amplia variedad de moléculas, incluyendo ácidos grasos libres como el AEA y el 2-AG. 2º) Proteínas estructuralmente no relacionadas con la albúmina: 1) RBP2 (Retinol Binding Protein)<sup>416</sup>: Se une a retinoides, pero también puede interactuar con ácidos grasos. 2) HSP70 (Heat Shock Protein 70)<sup>415</sup>: Es una chaperona molecular que ayuda al plegamiento de proteínas, pero también puede transportar moléculas hidrofóbicas. 3) FABPs (Fatty Acid Binding Proteins)<sup>417</sup>: Son una familia de proteínas que se unen a ácidos grasos y desempeñan un papel importante en el metabolismo de los lípidos. 4) SCP2 (Sterol Carrier Protein 2)<sup>418</sup>: Transporta

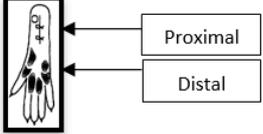
colesterol y otros lípidos. 5) FLAT (Fatty Acid-binding protein)<sup>419</sup>: Se une a ácidos grasos de cadena larga y está involucrada en el metabolismo de los lípidos.

**Figura 18.** Cateterización IT en ratas.



*Nota: Elaboración propia. Adaptada de la publicación “ Carrascosa et al . Additive antinociceptive action of intrathecal anandamide reuptake inhibitor and morphine in the management of post-incisional pain in rats. Biomed Pharmacother. 2024 Aug;177:117054”.* **A.-Preparación.** Inducción anestésica y colocación del animal en decúbito prone. Flexión de la columna vertebral gracias a la colocación bajo el abdomen del animal de una jeringa de 50 ml de forma transversal. Exposición de la columna a nivel L5-L6; **B.- Laminectomía más colocación del catéter IT.** Exéresis de la apófisis espinosa inferior al espacio a cateterizar. Abordaje del espacio interespinoso con una aguja de Tuohy 18G hasta localización del espacio subaracnoideo e introducción del catéter previamente purgado 2 cm cranealmente; **C.-Mantenimiento del catéter IT 1 semana previa a la administración de dosis.** La correcta colocación del catéter IT se verificó postmortem en todos los animales.

**Figura 19.** Modelo de dolor postincisional.

PROCEDIMIENTOS	
<p style="text-align: center;"><u>CIRUGÍA</u></p> 	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Limpieza de la pata con povidona yodada 10 %.</li> <li>2. Incisión longitudinal de 1 cm, empezando desde el talón y subiendo hacia los dedos.</li> <li>3. Exposición de la fascia plantar.</li> <li>4. Elevación del músculo plantar y sección longitudinal dejando el origen y la inserción intactos.</li> <li>5. Hemostasia con presión ligera y sutura de la piel con suturas de nylon de 5-0.</li> </ol>
<p style="text-align: center;"><u>VALORACIÓN DE LA NOCICEPCIÓN</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La evaluación de la nocicepción se lleva a cabo observando la retirada de la pata operada tras la estimulación con filamentos de von Frey electrónicos en las áreas adyacentes a la incisión quirúrgica. Esta respuesta se evalúa tanto en la región proximal como distal de la herida.</li> </ul> <div style="text-align: center;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El modelo de los filamentos de von Frey (Ugo Basile 37400 Plantar Von Frey™ Aesthesiometer) que empleamos para medir el dolor mecánico del animal es un analgesiómetro que consta de un estimulador táctil con un filamento de 0,5 mm controlado por un microprocesador capaz de aplicar una fuerza progresiva hasta el umbral de sensibilidad predefinido por el investigador y en el que se registra automáticamente la latencia de retirada (segundos) y la fuerza ejercida para la retirada de la pata (gramos), considerándose como parámetros una fuerza máxima de 40 gramos en un intervalo de 5 segundos.</li> <li>• Los resultados se expresan en forma de porcentaje del efecto máximo posible (% EMP) aplicando la siguiente fórmula .</li> </ul> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> <math display="block">(t' - t) / t'' - t \times 100 = \% \text{ EMP}</math> </div> <p>Siendo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>t' : el tiempo de latencia de la respuesta tras el tratamiento .</li> <li>t : el tiempo de latencia de la respuesta antes del tratamiento.</li> <li>t'' : el tiempo máximo de aplicación del estímulo doloroso (20 s) para evitar quemaduras .</li> </ul>

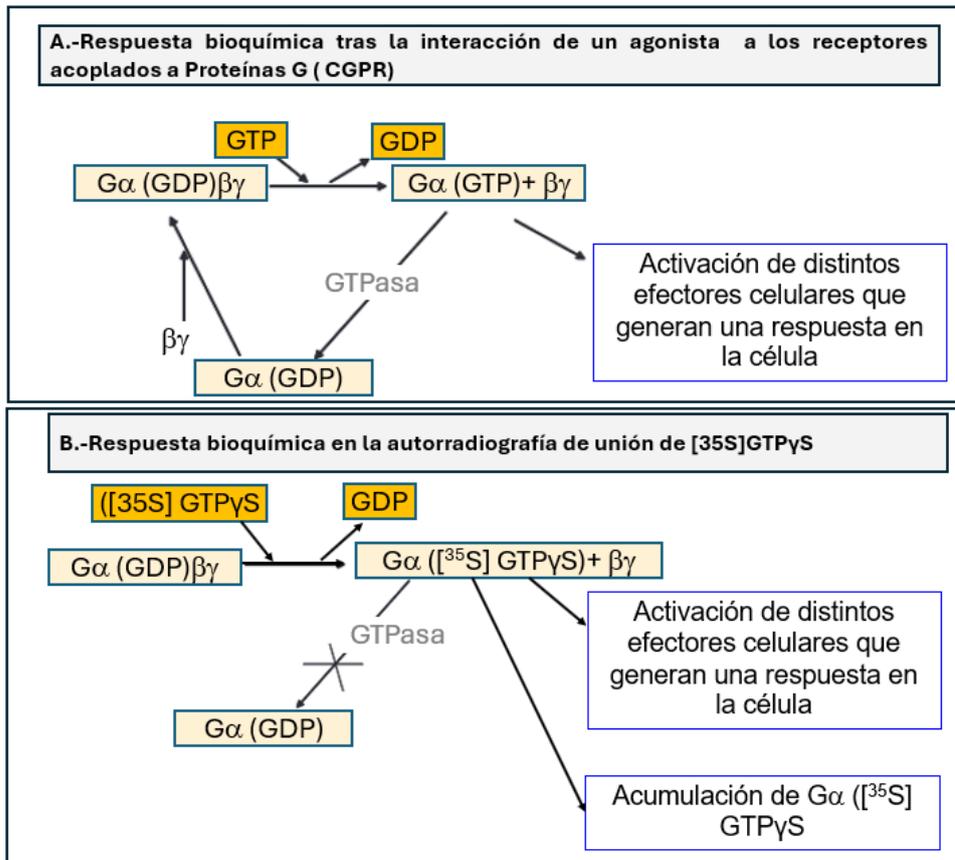
*Nota. Elaboración propia.* Modelo de dolor que consiste en realizar una incisión en la piel y músculo de la planta de una pata del animal y valorar el dolor observando la retirada de la pata cuando se estimula con filamentos de von Frey zonas cercanas a la zona operada.

**Figura 20.** *Test de la placa caliente.*

<b>PROCEDIMIENTOS</b>	
<p><b>TEST DE LA PLACA CALIENTE</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se deja libre al animal sobre una placa que se calienta progresivamente o se mantiene fija a una temperatura determinada (55°C).</li> <li>• Encima de la placa se coloca un cilindro de vidrio para mantener al animal sobre la superficie caliente sin que pueda escapar.</li> </ul>
<p><b>VALORACIÓN DE LA NOCICEPCIÓN</b></p> 	<p><b>Valoración:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La evaluación de la actividad nociceptiva se realiza valorando dos formas de comportamiento: el lamido de las patas, reflejo considerado como elemental, y el salto, respuesta considerada como integrada a un nivel supraespinal.</li> <li>• Para la evaluación se mide el tiempo que tarda en mostrar una respuesta al dolor como son la retirada de las patas o lamidos. Los resultados se expresan en forma de porcentaje del efecto máximo posible (% EMP).</li> <li>• Se establece un tiempo máximo de corte (normalmente alrededor de 20-25 segundos) para evitar daños en el animal. Si el animal no muestra una respuesta en ese lapso, se retira para prevenir lesiones graves, como quemaduras.</li> </ul>

*Nota.Elaboración propia* . Modelo de dolor que evalúa la nocicepción térmica tras exposición al animal a una superficie caliente. Se mide el tiempo que tarda en responder al estímulo térmico, ya sea lamiendo la pata afectada o saltando para alejarse.

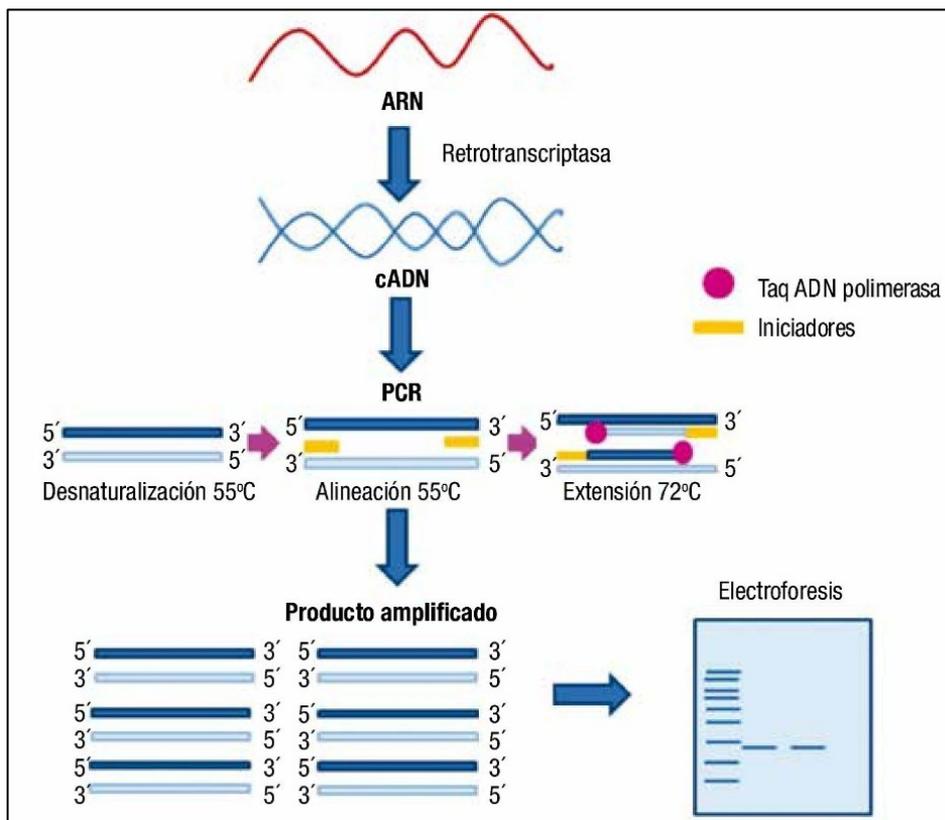
**Figura 21. Autorradiografía de unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ .**



*Nota: Adaptada de <sup>420</sup>.* La autorradiografía de unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  es una técnica utilizada para evaluar la activación de receptores acoplados a proteínas G al medir la unión del nucleótido radiactivo  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a las proteínas G activadas en tejidos o células. **A.-Respuesta bioquímica tras la interacción de un agonista a los receptores acoplados a Proteínas G (CGPR).** Cuando un agonista se une a un receptor acoplado a una proteína G se desencadenan una serie de eventos en la proteína G asociada al receptor. En primer lugar, esta unión provoca que la subunidad  $\alpha$  de la proteína G intercambie una molécula de GDP (difosfato de guanosina) por una de GTP (trifosfato de guanosina). Este cambio activa a la proteína G, separando la subunidad  $\alpha$ -GTP de las subunidades  $\beta\gamma$ . Ambas partes ( $\alpha$ -GTP y  $\beta\gamma$ ) pueden ahora activar distintas moléculas o "efectores" celulares que generan una respuesta en la célula. La activación dura hasta que la subunidad  $\alpha$  realiza su función de "apagado": gracias a su actividad GTPasa,  $\alpha$  convierte el GTP de nuevo en GDP. Una vez que esto sucede, la subunidad  $\alpha$  regresa a su forma original con GDP y se vuelve a asociar con  $\beta\gamma$ , lo que restaura la proteína G a su estado inactivo y detiene la señalización. **B.-En la Autorradiografía de unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ .** Cuando se usa  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  en un experimento, esta molécula se intercambia por

GDP en la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G, activándola. Sin embargo, a diferencia del GTP normal, el  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  no puede ser hidrolizado por la actividad GTPasa de la subunidad  $G\alpha$ . Esto significa que, una vez que  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  se une a  $G\alpha$ , permanece allí sin ser descompuesto, manteniendo la subunidad en su estado activo. Como resultado, el  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  se acumula durante el experimento, lo cual permite medir la activación de las proteínas G de manera prolongada y cuantificable.

**Figura 22.** RT-PCR.



*Nota: Adaptada de <sup>421</sup>.* La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction) es una variante de la PCR, una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado amplificación (reacción en cadena de la polimerasa). En la RT-PCR, se retrotranscribe una hebra o cadena o banda de ARN en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa o transcriptasa reversa, y el resultado se amplifica mediante una PCR tradicional.

**Figura 23.** Esquema de representación del curso temporal de los experimentos de la primera fase. Evaluación de la antinocicepción de la morfina más UCM707 por vía IT en un modelo de placa caliente. Ver **Artículo 2 (Anexo) : Figure 2.** *Time course of experiments of the first phase: hot plate.*

**Figura 24.** Esquema de representación del curso temporal de los experimentos de la segunda fase: modelo de dolor postincisional. Ver **Artículo 2 (Anexo): 1. : Figure 3.** *Schematic representation of time course experiments of the second phase: post-incisional pain model. 2.- Figure 4.* *Schematic representation of the experiments to evaluate the effects of intrathecal  $\mu$ , CB1r, CB2r and TRPV1 receptor antagonists on reversal antinociceptive effects of UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) on day 1 and day 4 after surgical paw incision.*

**Figura 25.** Efectos de la administración IT de morfina (1, 5 y 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) o la combinación de UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g) en el test de la placa caliente. Ver **Artículo 2 (Anexo): Figure 5.** *Effects of intrathecal morphine (1, 5 and 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) or UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) on the hot plate test.*

**Figura 26.** Función del receptor  $\mu$ -opioide en el área gris periacueductal (PAG) y la médula espinal lumbar sacra (LS) de ratas tras la administración IT de morfina, UCM707 o su combinación en ratas sometidas al test de la placa caliente, utilizando autorradiografía. Ver **Artículo 2 (Anexo): Figure 6.**  *$\mu$ -receptor function in the periaqueductal gray and lumbar sacra spine of rats treated with morphine (1, 5 or 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) or UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) and exposed to the hot plate using DAMGO [ $^{35}$ S]-GTP  $\gamma$ S binding autoradiography.*

**Figura 27.** Función del receptor CB1 en el área gris periacueductal (PAG) y la médula espinal lumbar sacra (LS) de ratas tratadas con morfina (1, 5 o 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) o la combinación de UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g) y expuestas al test de la placa caliente. Ver **Artículo 2 (Anexo) : Figure 7.** *CB1-receptor function in the periaqueductal gray and lumbar sacra spine of rats treated with morphine (1, 5 or 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) or UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) and exposed to the hot plate using WIN55,1212-2 [ $^{35}$ S]-GTP  $\gamma$ S binding autoradiography.*

**Figura 28.** *Expresión génica relativa de Cnr1, Cnr2, TRPV1 y Oprm1 en la médula espinal lumbosacra de ratas tratadas con UCM707 (75 µg) o UCM707 (75 µg) + morfina (1 µg) tras realización del test la placa caliente. Ver Artículo 2 (Anexo): Figure 8. Relative Cnr1, Cnr2, TRPV1 and Oprm1 gene expression in lumbar sacra spine of rats treated with UCM707 (75 µg) or UCM707 (75 µg) + morphine (1 µg) exposed to the hot plate.*

**Figura 29.** *Efectos de la coadministración IT de morfina (1 µg) y UCM707(75 µg) sobre la alodinia táctil inducida por incisión en la pata posterior de rata. Ver Artículo 2 (Anexo): Figure 9. Effects of UCM707 (75 µg) + morphine (1 µg) on tactile allodynia, measured by electronic von Frey, following incision plantar surface of the rat hind paw.*

**Figura 30.** *Expresión génica relativa de Cnr1, Cnr2, TRPV1 y Oprm1 en la médula espinal lumbosacra de ratas tratadas con UCM707 (75 µg) o la combinación de UCM707 (75 µg) + morfina (1 µg) en un modelo de dolor postincisional. Ver Artículo 2 (Anexo): Figure 10. Relative Cnr1, Cnr2, TRPV1 and Oprm1 gene expression in lumbar sacra spine of rats treated with UCM707 (75 µg) or UCM707 (75 µg) + morphine (1 µg) exposed to the incisional pain model.*

**Figura 31.** *Efectos del antagonista µ naloxona (12 µg), del antagonista CB1r SR141716A (30 µg), del antagonista CB2r AM630 (10 µg) y del antagonista TRPV1 AMG9810 (30 µg) sobre la reversión de los efectos antinociceptivos de la combinación UCM707 + morfina en un modelo de dolor postincisional en ratas. Ver Artículo 2 (Anexo): Figure 11. Effects of µ-antagonist naloxone (12µg), CB1r-antagonist SR141716A (30µg), CB2r-antagonist AM630 (10µg) and TRPV1-antagonist AMG9810 (30µg) on reversal the antinociceptive effects of UCM707 + morphine in the post incisional rat model.*



## **12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



- 
- <sup>1</sup> Brennan TJ. Pathophysiology of postoperative pain. *Pain*. 2011 Mar;152(3 Suppl): S33-S40. doi: 10.1016/j.pain.2010.11.005. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21232860; PMCID: PMC3073562.
- <sup>2</sup> Pogatzki-Zahn EM, Segelcke D, Schug SA. Postoperative pain-from mechanisms to treatment. *Pain Rep*. 2017 Mar 15;2(2): e588. doi: 10.1097/PR9.0000000000000588. PMID: 29392204; PMCID: PMC5770176
- <sup>3</sup> Margraf A, Ludwig N, Zarbock A, Rossaint J. Systemic Inflammatory Response Syndrome After Surgery: Mechanisms and Protection. *Anesth Analg*. 2020 Dec;131(6):1693-1707. doi: 10.1213/ANE.00000000000005175. PMID: 33186158.
- <sup>4</sup> Fuller AM, Bharde S, Sikandar S. The mechanisms and management of persistent postsurgical pain. *Front Pain Res (Lausanne)*. 2023 Jul 6; 4:1154597. doi: 10.3389/fpain.2023.1154597. PMID: 37484030; PMCID: PMC10357043.
- <sup>5</sup> Martinez V, Üçeyler N, Ben Ammar S, Alvarez JC, Gaudot F, Sommer C, Bouhassira D, Fletcher D. Clinical, histological, and biochemical predictors of postsurgical neuropathic pain. *Pain*. 2015 Nov;156(11):2390-2398. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000286. PMID: 26164589.
- <sup>6</sup>Chapman CR, Tuckett RP, Song CW. Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. *J Pain*. 2008 Feb;9(2):122-45. doi: 10.1016/j.jpain.2007.09.006. Epub 2007 Dec 21. PMID: 18088561; PMCID: PMC2278005.
- <sup>7</sup> Sinatra R. Causes and consequences of inadequate management of acute pain. *Pain Med*. 2010 Dec;11(12):1859-71. doi: 10.1111/j.1526-4637.2010.00983.x. Epub 2010 Oct 28. PMID: 21040438.
- <sup>8</sup> Baral P, Udit S, Chiu IM. Pain and immunity: implications for host defence. *Nat Rev Immunol*. 2019 Jul; 19(7): 433–447.
- <sup>9</sup>Gan TJ, Habib AS, Miller TE, White W, Apfelbaum JL. Incidence, patient satisfaction, and perceptions of post-surgical pain: results from a US national survey. *Curr Med Res Opin*. 2014 Jan;30(1):149-60. doi: 10.1185/03007995.2013.860019. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24237004.
- <sup>10</sup> Wasilewski SA, Woods LC, Torgerson WR Jr, Healy WL. Value of continuous passive motion in total knee arthroplasty. *Orthopedics*. 1990 Mar;13(3):291-5. doi: 10.3928/0147-7447-19900301-07. PMID: 2179911.

- 
- <sup>11</sup> Joshi GP, Ogunnaike BO. Consequences of inadequate postoperative pain relief and chronic persistent postoperative pain. *Anesthesiol Clin North Am*. 2005 Mar;23(1):21-36. doi: 10.1016/j.atc.2004.11.013. PMID: 15763409..
- <sup>12</sup> Richebé P, Capdevila X, Rivat C. Persistent Postsurgical Pain: Pathophysiology and Preventative Pharmacologic Considerations. *Anesthesiology*. 2018 Sep;129(3):590-607. doi: 10.1097/ALN.0000000000002238. PMID: 29738328.
- <sup>13</sup> Rodgers A, Walker N, Schug S, McKee A, Kehlet H, van Zundert A, Sage D, Futter M, Saville G, Clark T, MacMahon S. Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials. *BMJ*. 2000 Dec 16;321(7275):1493. doi: 10.1136/bmj.321.7275.1493. PMID: 11118174; PMCID: PMC27550..
- <sup>14</sup> Hewson DW, Tedore TR, Hardman JG. Impact of spinal or epidural anaesthesia on perioperative outcomes in adult noncardiac surgery: a narrative review of recent evidence. *Br J Anaesth*. 2024 Aug;133(2):380-399. doi: 10.1016/j.bja.2024.04.044. Epub 2024 May 28. PMID: 38811298; PMCID: PMC11282476.
- <sup>15</sup> Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola OA, Rosenberg JM, Bickler S, Brennan T, Carter T, Cassidy CL, Chittenden EH, Degenhardt E, Griffith S, Manworren R, McCarberg B, Montgomery R, Murphy J, Perkal MF, Suresh S, Sluka K, Strassels S, Thirlby R, Viscusi E, Walco GA, Warner L, Weisman SJ, Wu CL. Management of Postoperative Pain: A Clinical Practice Guideline From the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *J Pain*. 2016 Feb;17(2):131-57. doi: 10.1016/j.jpain.2015.12.008.
- <sup>16</sup> Acute Pain Management: Scientific Evidence – Fifth Edition 2020. Australian and New Zealand College of Anaesthetists and Faculty of Pain Medicine. ISBN Print: 978-0-9945075-7-0 Online: 978-0-9945075-8-7.
- <sup>17</sup> Albrecht E, Chin KJ. Advances in regional anaesthesia and acute pain management: a narrative review. *Anaesthesia*. 2020 Jan;75 Suppl 1: e101-e110. doi: 10.1111/anae.14868. PMID: 31903582.
- <sup>18</sup> Kumar K, Kirksey MA, Duong S, Wu CL. A Review of Opioid-Sparing Modalities in Perioperative Pain Management: Methods to Decrease Opioid Use Postoperatively. *Anesth Analg*. 2017 Nov;125(5):1749-1760. doi: 10.1213/ANE.0000000000002497. PMID: 29049119.

- 
- <sup>19</sup> Knezevic NN, Yekkirala A, Yaksh TL. Basic/Translational Development of Forthcoming Opioid- and Nonopioid-Targeted Pain Therapeutics. *Anesth Analg.* 2017 Nov;125(5):1714-1732. doi: 10.1213/ANE.0000000000002442. PMID: 29049116; PMCID: PMC5679134.
- <sup>20</sup> Clarke H, Poon M, Weinrib A, Katznelson R, Wentlandt K, Katz J. Preventive analgesia and novel strategies for the prevention of chronic post-surgical pain. *Drugs.* 2015 Mar;75(4):339-51. doi: 10.1007/s40265-015-0365-2. PMID: 25752774.
- <sup>21</sup> Anwar S, O'Brien B. The role of intraoperative interventions to minimise chronic postsurgical pain. *Br J Pain.* 2017 Nov;11(4):186-191. doi: 10.1177/2049463717720640. Epub 2017 Jul 18. PMID: 29123663; PMCID: PMC5661690.
- <sup>22</sup> Kehlet H, Joshi GP. Enhanced Recovery After Surgery: Current Controversies and Concerns. *Anesth Analg.* 2017 Dec;125(6):2154-2155. doi: 10.1213/ANE.0000000000002231. PMID: 29190219.
- <sup>23</sup> O'Neill A, Lirk P. Multimodal Analgesia. *Anesthesiol Clin.* 2022 Sep;40(3):455-468. doi: 10.1016/j.anclin.2022.04.002. Epub 2022 Aug 2. PMID: 36049874.
- <sup>24</sup> Chapman CR, Donaldson GW, Davis JJ, Bradshaw DH. Improving individual measurement of postoperative pain: the pain trajectory. *J Pain.* 2011 Feb;12(2):257-62. doi: 10.1016/j.jpain.2010.08.005. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21237721; PMCID: PMC3052945.
- <sup>25</sup> Weiser TG, Regenbogen SE, Thompson KD, Haynes AB, Lipsitz SR, Berry WR, Gawande AA. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet.* 2008 Jul 12;372(9633):139-144. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60878-8. Epub 2008 Jun 24. PMID: 18582931.
- <sup>26</sup> Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesth Analg.* 2003 Aug;97(2):534-540. doi: 10.1213/01.ANE.0000068822.10113.9E. PMID: 12873949.
- <sup>27</sup> Inturrisi CE. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain.* 2002 Jul-Aug;18(4 Suppl): S3-13. doi: 10.1097/00002508-200207001-00002. PMID: 12479250.
- <sup>28</sup> Hah JM, Bateman BT, Ratliff J, Curtin C, Sun E. Chronic Opioid Use After Surgery: Implications for Perioperative Management in the Face of the Opioid Epidemic. *Anesth Analg.* 2017 Nov;125(5):1733-1740. doi: 10.1213/ANE.0000000000002458. PMID: 29049117; PMCID: PMC6119469.

- 
- <sup>29</sup> Chen Q, Chen E, Qian X. A Narrative Review on Perioperative Pain Management Strategies in Enhanced Recovery Pathways-The Past, Present and Future. *J Clin Med*. 2021 Jun 10;10(12):2568. doi: 10.3390/jcm10122568. PMID: 34200695; PMCID: PMC8229260.
- <sup>30</sup> Shaikh SI, Nagarekha D, Hegade G, Marutheesh M. Postoperative nausea and vomiting: A simple yet complex problem. *Anesth Essays Res*. 2016 Sep-Dec;10(3):388-396. doi: 10.4103/0259-1162.179310. PMID: 27746521; PMCID: PMC5062207.
- <sup>31</sup> Farmer AD, Holt CB, Downes TJ, Ruggeri E, Del Vecchio S, De Giorgio R. Pathophysiology, diagnosis, and management of opioid-induced constipation. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018 Mar;3(3):203-212. doi: 10.1016/S2468-1253(18)30008-6. PMID: 29870734.
- <sup>32</sup> Lee LA, Caplan RA, Stephens LS, Posner KL, Terman GW, Voepel-Lewis T, Domino KB. Postoperative opioid-induced respiratory depression: a closed claims analysis. *Anesthesiology*. 2015 Mar;122(3):659-65. doi: 10.1097/ALN.0000000000000564. PMID: 25536092.
- <sup>33</sup> de Boer HD, Detriche O, Forget P. Opioid-related side effects: Postoperative ileus, urinary retention, nausea and vomiting, and shivering. A review of the literature. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2017 Dec;31(4):499-504. doi: 10.1016/j.bpa.2017.07.002. Epub 2017 Jul 8. PMID: 29739538.
- <sup>34</sup> Wheeler M, Oderda GM, Ashburn MA, Lipman AG. Adverse events associated with postoperative opioid analgesia: a systematic review. *J Pain*. 2002 Jun;3(3):159-80. doi: 10.1054/jpai.2002.123652. PMID: 14622770
- <sup>35</sup> Vinik HR, Kissin I. Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanyl infusion in humans. *Anesth Analg*. 1998 Jun;86(6):1307-11. doi: 10.1097/00000539-199806000-00033. PMID: 9620525.
- <sup>36</sup> Fletcher D, Martinez V. Opioid-induced hyperalgesia in patients after surgery: a systematic review and a meta-analysis. *Br J Anaesth*. 2014 Jun;112(6):991-1004. doi: 10.1093/bja/aeu137. PMID: 24829420.
- <sup>37</sup> Alam A, Gomes T, Zheng H, Mamdani MM, Juurlink DN, Bell CM. Long-term analgesic use after low-risk surgery: a retrospective cohort study. *Arch Intern Med*. 2012 Mar 12;172(5):425-30. doi: 10.1001/archinternmed.2011.1827. PMID: 22412106.
- <sup>38</sup> Rodgers J, Cunningham K, Fitzgerald K, Finnerty E. Opioid consumption following outpatient upper extremity surgery. *J Hand Surg Am*. 2012

---

Apr;37(4):645-50. doi: 10.1016/j.jhsa.2012.01.035. Epub 2012 Mar 10. PMID: 22410178.

<sup>39</sup> Weber L, Yeomans DC, Tzabazis A. Opioid-induced hyperalgesia in clinical anesthesia practice: what has remained from theoretical concepts and experimental studies? *Curr Opin Anaesthesiol.* 2017 Aug;30(4):458-465. doi: 10.1097/ACO.0000000000000485. PMID: 28590258.

<sup>40</sup> Zahn PK, Brennan TJ. Lack of effect of intrathecally administered N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. *Anesthesiology.* 1998 Jan;88(1):143-56. doi: 10.1097/00000542-199801000-00022. PMID: 9447867.

<sup>41</sup> Yamamoto T, Sakashita Y. The role of the spinal opioid receptor like1 receptor, the NK-1 receptor, and cyclooxygenase-2 in maintaining postoperative pain in the rat. *Anesth Analg.* 1999 Nov;89(5):1203-8. PMID: 10553835.

<sup>42</sup> Zhu X, Conklin D, Eisenach JC. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord plays an important role in postoperative pain. *Pain.* 2003 Jul;104(1-2):15-23. doi: 10.1016/s0304-3959(02)00465-7. PMID: 12855310.

<sup>43</sup> Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* 2002 Jun;25(6):319-25. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02157-4. PMID: 12086751.

<sup>44</sup> Pogatzki EM, Urban MO, Brennan TJ, Gebhart GF. Role of the rostral medial medulla in the development of primary and secondary hyperalgesia after incision in the rat. *Anesthesiology.* 2002 May;96(5):1153-60. doi: 10.1097/00000542-200205000-00019. PMID: 11981156.

<sup>45</sup> Obata H, Eisenach JC, Hussain H, Bynum T, Vincler M. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain.* 2006 Nov;7(11):816-22. doi: 10.1016/j.jpain.2006.04.004. PMID: 17074623.

<sup>46</sup> Wen YR, Tan PH, Cheng JK, Liu YC, Ji RR. Microglia: a promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance. *J Formos Med Assoc.* 2011 Aug;110(8):487-94. doi: 10.1016/S0929-6646(11)60074-0. PMID: 21783017; PMCID: PMC3169792.

<sup>47</sup> Tang J, Bair M, Descalzi G. Reactive Astrocytes: Critical Players in the Development of Chronic Pain. *Front Psychiatry.* 2021 May 28; 12:682056. doi: 10.3389/fpsy.2021.682056. PMID: 34122194; PMCID: PMC8192827.

<sup>48</sup> Cummings A, Orgill BD, Fitzgerald BM. Intrathecal Morphine. [Updated 2023 Sep 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499880/>

- 
- <sup>49</sup> Rawal N. Intrathecal opioids for the management of post-operative pain. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2023 Jun;37(2):123-132. doi: 10.1016/j.bpa.2023.01.001. Epub 2023 Jan 21. PMID: 37321761.
- <sup>50</sup> Ciaramellano F, Fanti F, Scipioni L, Maccarrone M, Oddi S. Endocannabinoid Metabolism and Transport as Drug Targets. *Methods Mol Biol.* 2023;2576:201-211. doi: 10.1007/978-1-0716-2728-0\_16. PMID: 36152188.
- <sup>51</sup> Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 1998 Jul 16;394(6690):277-81. doi: 10.1038/28393. PMID: 9685157.
- <sup>52</sup> 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 Jul;20(7):287-94. doi: 10.1016/s0165-6147(99)01339-5. PMID: 10390647.
- <sup>53</sup> Bushlin I, Rozenfeld R, Devi LA. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Feb;10(1):80-6. doi: 10.1016/j.coph.2009.09.009. Epub 2009 Oct 25. PMID: 19857996; PMCID: PMC2818338.
- <sup>54</sup> Mao J, Price DD, Lu J, Keniston L, Mayer DJ. Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. *Neurosci Lett.* 2000 Feb 11;280(1):13-6. doi: 10.1016/s0304-3940(99)00998-2. PMID: 10696800.
- <sup>55</sup> Wise LE, Shelton CC, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH. Assessment of anandamide's pharmacological effects in mice deficient of both fatty acid amide hydrolase and cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol.* 2007 Feb 14;557(1):44-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.002. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17217945.
- <sup>56</sup> Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov.* 2008 May;7(5):438-55. doi: 10.1038/nrd2553. PMID: 18446159.
- <sup>57</sup> Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D, Vaughan CW. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol.* 2006 Feb;147(3):281-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0706510. PMID: 16331291; PMCID: PMC1751298.
- <sup>58</sup> Yaksh TL, Santos GGD, Borges Paes Lemes J, Malange K. Neuraxial drug delivery in pain management: An overview of past, present, and future. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2023 Jun;37(2):243-265. doi: 10.1016/j.bpa.2023.04.003. Epub 2023 Apr 14. PMID: 37321769.

- 
- <sup>59</sup> Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur J Pharmacol.* 1998 Mar 19;345(2):145-53. doi: 10.1016/s0014-2999(97)01621-x. PMID: 9600630.
- <sup>60</sup> Sagar DR, Jhaveri MD, Richardson D, Gray RA, de Lago E, Fernández-Ruiz J, Barrett DA, Kendall DA, Chapman V. Endocannabinoid regulation of spinal nociceptive processing in a model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci.* 2010 Apr;31(8):1414-22. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07162.x. Epub 2010 Apr 9. PMID: 20384778.
- <sup>61</sup> Wang JK, Nauss LA, Thomas JE. Pain relief by intrathecally applied morphine in man. *Anesthesiology.* 1979 Feb;50(2):149-51. doi: 10.1097/00000542-197902000-00013. PMID: 373503.
- <sup>62</sup> Bernardis CM. Understanding the physiology and pharmacology of epidural and intrathecal opioids. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2002 Dec;16(4):489-505. doi: 10.1053/bean.2002.0255. PMID: 12516887.
- <sup>63</sup> Elia N, Tramèr MR. Ketamine and postoperative pain--a quantitative systematic review of randomised trials. *Pain.* 2005 Jan;113(1-2):61-70. doi: 10.1016/j.pain.2004.09.036. PMID: 15621365.
- <sup>64</sup> Elia N, Lysakowski C, Tramèr MR. Does multimodal analgesia with acetaminophen, nonsteroidal antiinflammatory drugs, or selective cyclooxygenase-2 inhibitors and patient-controlled analgesia morphine offer advantages over morphine alone? Meta-analyses of randomized trials. *Anesthesiology.* 2005 Dec;103(6):1296-304. doi: 10.1097/00000542-200512000-00025. PMID: 16306743.
- <sup>65</sup> Meylan N, Elia N, Lysakowski C, Tramèr MR. Benefit and risk of intrathecal morphine without local anaesthetic in patients undergoing major surgery: meta-analysis of randomized trials. *Br J Anaesth.* 2009 Feb;102(2):156-67. doi: 10.1093/bja/aen368. PMID: 19151046.
- <sup>66</sup> Koning MV, Klimek M, Rijs K, Stolker RJ, Heesen MA. Intrathecal hydrophilic opioids for abdominal surgery: a meta-analysis, meta-regression, and trial sequential analysis. *Br J Anaesth.* 2020 Sep;125(3):358-372. doi: 10.1016/j.bja.2020.05.061. Epub 2020 Jul 11. PMID: 32660719; PMCID: PMC7497029.
- <sup>67</sup> Rathmell JP, Pino CA, Taylor R, Patrin T, Viani BA. Intrathecal morphine for postoperative analgesia: a randomized, controlled, dose-ranging study after hip and knee arthroplasty. *Anesth Analg.* 2003 Nov;97(5):1452-1457. doi: 10.1213/01.ANE.0000083374.44039.9E. PMID: 14570664.

- 
- <sup>68</sup> Wang J, Sun H, Sun WT, Sun HP, Tian T, Sun J. Efficacy and safety of intrathecal morphine for pain control after spinal surgery: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Mar;25(6):2674-2684. doi: 10.26355/eurrev\_202103\_25431. PMID: 33829454.
- <sup>69</sup>Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in-situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 1994 Dec 15;350(3):412-38. doi: 10.1002/cne.903500307. PMID: 7884049.
- <sup>70</sup> Zhu C, Lan X, Wei Z, Yu J, Zhang J. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors as a novel therapeutic strategy in neuropathic pain. *Acta Pharm Sin B*. 2024 Jan;14(1):67-86. doi: 10.1016/j.apsb.2023.07.020. Epub 2023 Jul 21. PMID: 38239234; PMCID: PMC10792987.
- <sup>71</sup> Sakurada T, Watanabe C, Okuda K, Sugiyama A, Moriyama T, Sakurada C, Tan-No K, Sakurada S. Intrathecal high-dose morphine induces spinally mediated behavioral responses through NMDA receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002 Jan 31;98(1-2):111-8. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00332-1. PMID: 11834301.
- <sup>72</sup>Stein C. Opioid Receptors. *Annu Rev Med*. 2016; 67:433-51. doi: 10.1146/annurev-med-062613-093100. Epub 2015 Aug 26. PMID: 26332001.
- <sup>73</sup> Dickenson AH, Sullivan AF, Knox R, Zajac JM, Roques BP. Opioid receptor subtypes in the rat spinal cord: electrophysiological studies with mu- and delta-opioid receptor agonists in the control of nociception. *Brain Res*. 1987 Jun 9;413(1):36-44. doi: 10.1016/0006-8993(87)90151-x. PMID: 3036317.
- <sup>74</sup> McPherson KB, Ingram SL. Cellular and circuit diversity determines the impact of endogenous opioids in the descending pain modulatory pathway. *Front Syst Neurosci*. 2022 Aug 15; 16:963812. doi: 10.3389/fnsys.2022.963812. PMID: 36045708; PMCID: PMC9421147.
- <sup>75</sup> Nockemann D, Rouault M, Labuz D, Hublitz P, McKnelly K, Reis FC, Stein C, Heppenstall PA. The K (+) channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia. *EMBO Mol Med*. 2013 Aug;5(8):1263-77. doi: 10.1002/emmm.201201980. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23818182; PMCID: PMC3944465.
- <sup>76</sup>Ummenhofer WC, Arends RH, Shen DD, Bernards CM. Comparative spinal distribution and clearance kinetics of intrathecally administered morphine, fentanyl, alfentanil, and sufentanil. *Anesthesiology*. 2000 Mar;92(3):739-53. doi: 10.1097/00000542-200003000-00018. PMID: 10719953.

- 
- <sup>77</sup> Hermanns H, Bos EME, van Zuylen ML, Hollmann MW, Stevens MF. The Options for Neuraxial Drug Administration. *CNS Drugs*. 2022 Aug;36(8):877-896. doi: 10.1007/s40263-022-00936-y. Epub 2022 Jul 15. PMID: 35836037; PMCID: PMC9345828.
- <sup>78</sup> Rawal N. Epidural analgesia for postoperative pain: Improving outcomes or adding risks? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2021 May;35(1):53-65. doi: 10.1016/j.bpa.2020.12.001. Epub 2020 Dec 5. PMID: 33742578.
- <sup>79</sup> Tang J, Churilov L, Tan CO, Hu R, Pearce B, Cosic L, Christophi C, Weinberg L. Intrathecal morphine is associated with reduction in postoperative opioid requirements and improvement in postoperative analgesia in patients undergoing open liver resection. *BMC Anesthesiol*. 2020 Aug 19;20(1):207. doi: 10.1186/s12871-020-01113-8. PMID: 32814546; PMCID: PMC7436971.
- <sup>80</sup> Melloul E, Hübner M, Scott M, Snowden C, Prentis J, Dejong CH, Garden OJ, Farges O, Kokudo N, Vauthey JN, Clavien PA, Demartines N. Guidelines for Perioperative Care for Liver Surgery: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) Society Recommendations. *World J Surg*. 2016 Oct;40(10):2425-40. doi: 10.1007/s00268-016-3700-1. PMID: 27549599.
- <sup>81</sup> Chaney MA. Side effects of intrathecal and epidural opioids. *Can J Anaesth*. 1995 Oct;42(10):891-903. doi: 10.1007/BF03011037. PMID: 8706199.
- <sup>82</sup> Grape S, El-Boghdadly K, Albrecht E. Management of adverse effects of intrathecal opioids in acute pain. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2023 Jun;37(2):199-207. doi: 10.1016/j.bpa.2023.02.002. Epub 2023 Feb 21. PMID: 37321767.
- <sup>83</sup> Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R. Opioid complications and side effects. *Pain Physician*. 2008 Mar;11(2 Suppl): S105-20. PMID: 18443635.
- <sup>84</sup> Sultan P, Gutierrez MC, Carvalho B. Neuraxial morphine and respiratory depression: finding the right balance. *Drugs*. 2011 Oct 1;71(14):1807-19. doi: 10.2165/11596250-000000000-00000. PMID: 21942973.
- <sup>85</sup> Gustafsson LL, Schildt B, Jacobsen K. Adverse effects of extradural and intrathecal opiates: report of a nationwide survey in Sweden. *Br J Anaesth*. 1982 May;54(5):479-86. doi: 10.1093/bja/54.5.479. PMID: 6896150.
- <sup>86</sup> Shook JE, Watkins WD, Camporesi EM. Differential roles of opioid receptors in respiration, respiratory disease, and opiate-induced respiratory depression. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Oct;142(4):895-909. doi: 10.1164/ajrccm/142.4.895. PMID: 2171388.

- 
- <sup>87</sup> Rawal N, Allvin R. Epidural and intrathecal opioids for postoperative pain management in Europe--a 17-nation questionnaire study of selected hospitals. Euro Pain Study Group on Acute Pain. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996 Oct;40(9):1119-26. doi: 10.1111/j.1399-6576.1996.tb05574.x. PMID: 8933853.
- <sup>88</sup> Ko S, Goldstein DH, VanDenKerkhof EG. Definitions of "respiratory depression" with intrathecal morphine postoperative analgesia: a review of the literature. *Can J Anaesth*. 2003 Aug-Sep;50(7):679-88. doi: 10.1007/BF03018710. PMID: 12944442.
- <sup>89</sup> Kehlet H, Werner M, Perkins F. Balanced analgesia: what is it and what are its advantages in postoperative pain? *Drugs*. 1999 Nov;58(5):793-7. doi: 10.2165/00003495-199958050-00002. PMID: 10595860.
- <sup>90</sup> Chen YK, Boden KA, Schreiber KL. The role of regional anaesthesia and multimodal analgesia in the prevention of chronic postoperative pain: a narrative review. *Anaesthesia*. 2021 Jan;76 Suppl 1(Suppl 1):8-17. doi: 10.1111/anae.15256. PMID: 33426669; PMCID: PMC8369227.
- <sup>91</sup> Rathmell JP, Lair TR, Nauman B. The role of intrathecal drugs in the treatment of acute pain. *Anesth Analg*. 2005 Nov;101(5 Suppl): S30-S43. doi: 10.1213/01.ANE.0000177101.99398.22. PMID: 16334491.
- <sup>92</sup> Rezende B, Alencar AKN, de Bem GF, Fontes-Dantas FL, Montes GC. Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Jan 19;16(2):148. doi: 10.3390/ph16020148. PMID: 37017445; PMCID: PMC9966761.
- <sup>93</sup> Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2021 Jun;6(6):607-615. doi: 10.1016/j.bpsc.2020.07.016. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32980261; PMCID: PMC7855189.
- <sup>94</sup> Sagar DR, Gaw AG, Okine BN, Woodhams SG, Wong A, Kendall DA, Chapman V. Dynamic regulation of the endocannabinoid system: implications for analgesia. *Mol Pain*. 2009 Oct 8; 5:59. doi: 10.1186/1744-8069-5-59. PMID: 19814807; PMCID: PMC2770047.
- <sup>95</sup> Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain*. 1998 Mar;75(1):111-119. doi: 10.1016/S0304-3959(97)00213-3. PMID: 9539680.
- <sup>96</sup> Anand U, Otto WR, Sanchez-Herrera D, Facer P, Yiangou Y, Korchev Y, Birch R, Benham C, Bountra C, Chessell IP, Anand P. Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human

---

sensory neurons. *Pain*. 2008 Sep 15;138(3):667-680. doi: 10.1016/j.pain.2008.06.007. Epub 2008 Aug 9. PMID: 18692962.

<sup>97</sup> Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. Cannabinoid CB (1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci*. 2000 Jun;15(6):510-21. doi: 10.1006/mcne.2000.0844. PMID: 10860578.

<sup>98</sup> Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D. Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci*. 2003 Jun;17(12):2750-4. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02704.x. PMID: 12823482.

<sup>99</sup> Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*. 2006 Mar 15;26(11):2991-3001. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4872-05.2006. PMID: 16540577; PMCID: PMC6673964.

<sup>100</sup> Finn DP, Jhaveri MD, Beckett SR, Roe CH, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology*. 2003 Oct;45(5):594-604. doi: 10.1016/s0028-3908(03)00235-1. PMID: 12941373.

<sup>101</sup> Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 2012 Oct 4;76(1):70-81. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.020. PMID: 23040807; PMCID: PMC3517813.

<sup>102</sup> Meah F, Lundholm M, Emanuele N, Amjed H, Poku C, Agrawal L, Emanuele MA. The effects of cannabis and cannabinoids on the endocrine system. *Rev Endocr Metab Disord*. 2022 Jun;23(3):401-420. doi: 10.1007/s11154-021-09682-w. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34460075.

<sup>103</sup> Jean-Gilles L, Gran B, Constantinescu CS. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system. *Immunobiology*. 2010 Aug;215(8):606-10. doi: 10.1016/j.imbio.2009.12.006. Epub 2010 Jan 4. PMID: 20153076.

<sup>104</sup> Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des*. 2008;14(23):2279-88. doi: 10.2174/138161208785740117. PMID: 18781978.

<sup>105</sup> Woodhams SG, Chapman V, Finn DP, Hohmann AG, Neugebauer V. The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology*. 2017 Sep 15; 124:105-120.

---

doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.015. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28625720; PMCID: PMC5785108.

<sup>106</sup> Lutz B. Neurobiology of cannabinoid receptor signaling. *Dialogues Clin Neurosci.* 2020 Sep;22(3):207-222. doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/blutz. PMID: 33162764; PMCID: PMC760502.

<sup>107</sup> Pertwee RG. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J.* 2005 Oct 24;7(3): E625-54. doi: 10.1208/aapsj070364. PMID: 16353941; PMCID: PMC2751266.

<sup>108</sup> Di Marzo V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2008; 160:1-24. doi: 10.1007/112\_0505. PMID: 18481028.

<sup>109</sup> Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 2006 Jan 2;78(6):549-63. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.055. Epub 2005 Aug 18. PMID: 16109430.

<sup>110</sup> Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology.* 2007 Apr;106(4):787-94. doi: 10.1097/01.anes.0000264765.33673.6c. PMID: 17413917.

<sup>111</sup> Alkaitis MS, Solorzano C, Landry RP, Piomelli D, DeLeo JA, Romero-Sandoval EA. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PLoS One.* 2010 May 28;5(5): e10891. doi: 10.1371/journal.pone.0010891. PMID: 20531936; PMCID: PMC2878341.

<sup>112</sup> Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sañudo-Peña MC. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 12;96(21):12198-203. doi: 10.1073/pnas.96.21.12198. PMID: 10518599; PMCID: PMC18435.

<sup>113</sup> Starowicz K, Makuch W, Osikowicz M, Piscitelli F, Petrosino S, Di Marzo V, Przewlocka B. Spinal anandamide produces analgesia in neuropathic rats: possible CB (1)- and TRPV1-mediated mechanisms. *Neuropharmacology.* 2012 Mar;62(4):1746-55. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.11.021. Epub 2011 Dec 8. PMID: 22178705.

<sup>114</sup> Ashton J. Pro-drugs for indirect cannabinoids as therapeutic agents. *Curr Drug Deliv.* 2008 Oct;5(4):243-7. doi: 10.2174/156720108785915050. PMID: 18855592.

- 
- <sup>115</sup> Kinsey SG, Long JZ, O'Neal ST, Abdullah RA, Poklis JL, Boger DL, Cravatt BF, Lichtman AH. Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Sep;330(3):902-10. doi: 10.1124/jpet.109.155465. Epub 2009 Jun 5. PMID: 19502530; PMCID: PMC2729802.
- <sup>116</sup> Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol*. 2010 Jul 1;80(1):1-12. doi: 10.1016/j.bcp.2010.02.013. Epub 2010 Mar 3. PMID: 20206137.
- <sup>117</sup> Costa B, Trovato AE, Colleoni M, Giagnoni G, Zarini E, Croci T. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR141716, on nociceptive response and nerve demyelination in rodents with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain*. 2005 Jul;116(1-2):52-61. doi: 10.1016/j.pain.2005.03.043. PMID: 15936882.
- <sup>118</sup> Oka S, Wakui J, Ikeda S, Yanagimoto S, Kishimoto S, Gokoh M, Nasui M, Sugiura T. Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. *J Immunol*. 2006 Dec 15;177(12):8796-805. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8796. PMID: 17142782.
- <sup>119</sup> Lunn CA, Fine JS, Rojas-Triana A, Jackson JV, Fan X, Kung TT, Gonsiorek W, Schwarz MA, Lavey B, Kozlowski JA, Narula SK, Lundell DJ, Hipkin RW, Bober LA. A novel cannabinoid peripheral cannabinoid receptor-selective inverse agonist blocks leukocyte recruitment in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Feb;316(2):780-8. doi: 10.1124/jpet.105.093500. Epub 2005 Oct 28. PMID: 16258021.
- <sup>120</sup> Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*. 2006 Jan 5;49(1):67-79. doi: 10.1016/j.neuron.2005.11.027. PMID: 16387640.
- <sup>121</sup> Stella N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1(Suppl 1):244-53. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.037. Epub 2008 Aug 3. PMID: 18722389; PMCID: PMC2654419.
- <sup>122</sup> Azim S, Nicholson J, Rebecchi MJ, Galbavy W, Feng T, Reinsel R, Volkow ND, Benveniste H, Kaczocha M. Endocannabinoids and acute pain after total knee arthroplasty. *Pain*. 2015 Feb;156(2):341-347. doi:

---

10.1097/01.j.pain.0000460315.80981.59. PMID: 25599456; PMCID: PMC4299927.

<sup>123</sup> Finn DP, Haroutounian S, Hohmann AG, Krane E, Soliman N, Rice ASC. Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. *Pain*. 2021 Jul 1;162(Suppl 1): S5-S25. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002268. PMID: 33729211; PMCID: PMC8819673.

<sup>124</sup> Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*. 2001 May;92(1-2):91-100. doi: 10.1016/s0304-3959(00)00474-7. PMID: 11323130.

<sup>125</sup> Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI. Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain*. 1999 Aug;82(2):199-205. doi: 10.1016/S0304-3959(99)00045-7. PMID: 10467924.

<sup>126</sup> Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*. 2001 Apr;63(5):569-611. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00031-9. PMID: 11164622.

<sup>127</sup> Bloom AS, Dewey WL, Harris LS, Brosius KK. 9-nor-9beta-hydroxyhexahydrocannabinol, a cannabinoid with potent antinociceptive activity: comparisons with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977 Feb;200(2):263-70. PMID: 839438.

<sup>128</sup> Walker JM, Hohmann AG, Martin WJ, Strangman NM, Huang SM, Tsou K. The neurobiology of cannabinoid analgesia. *Life Sci*. 1999;65(6-7):665-73. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00289-1. PMID: 10462067.

<sup>129</sup> Smith PB, Martin BR. Spinal mechanisms of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia. *Brain Res*. 1992 Apr 24;578(1-2):8-12. doi: 10.1016/0006-8993(92)90222-u. PMID: 1324767.

<sup>130</sup> Thorat SN, Bhargava HN. Evidence for a bidirectional cross-tolerance between morphine and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Eur J Pharmacol*. 1994 Jul 21;260(1):5-13. doi: 10.1016/0014-2999(94)90003-5. PMID: 7957626.

<sup>131</sup> Chen X, Cowan A, Inan S, Geller EB, Meissler JJ, Rawls SM, Tallarida RJ, Tallarida CS, Watson MN, Adler MW, Eisenstein TK. Opioid-sparing effects of cannabinoids on morphine analgesia: participation of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Br J Pharmacol*. 2019 Sep;176(17):3378-3389. doi: 10.1111/bph.14769. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31218677; PMCID: PMC6692585.

<sup>132</sup> Pugh G Jr, Smith PB, Dombrowski DS, Welch SP. The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-

---

tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Nov;279(2):608-16. PMID: 8930163.

<sup>133</sup> Goya P, Jagerovic N, Hernandez-Folgado L, Martin MI. Cannabinoids and neuropathic pain. *Mini Rev Med Chem*. 2003 Nov;3(7):765-72. doi: 10.2174/1389557033487818. PMID: 14529517.

<sup>134</sup> Kehl LJ, Hamamoto DT, Wacnik PW, Croft DL, Norsted BD, Wilcox GL, Simone DA. A cannabinoid agonist differentially attenuates deep tissue hyperalgesia in animal models of cancer and inflammatory muscle pain. *Pain*. 2003 May;103(1-2):175-86. doi: 10.1016/s0304-3959(02)00450-5. PMID: 12749972.

<sup>135</sup> Nackley AG, Makriyannis A, Hohmann AG. Selective activation of cannabinoid CB (2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience*. 2003;119(3):747-57. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00126-x. PMID: 12809695.

<sup>136</sup> Clayton N, Marshall FH, Bountra C, O'Shaughnessy CT. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain*. 2002 Apr;96(3):253-260. doi: 10.1016/S0304-3959(01)00454-7. PMID: 11972997.

<sup>137</sup> Guindon J, Hohmann AG. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol*. 2008 Jan;153(2):319-34. doi: 10.1038/sj.bjp.0707531. Epub 2007 Nov 12. PMID: 17994113; PMCID: PMC2219541.

<sup>138</sup> Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol*. 2002 Aug;12(4):372-9. doi: 10.1016/s0959-4388(02)00340-9. PMID: 12139983.

<sup>139</sup> Aviram J, Samuelly-Leichtag G. Efficacy of Cannabis-Based Medicines for Pain Management: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain Physician*. 2017 Sep;20(6): E755-E796. PMID: 28934780.

<sup>140</sup> Fisher E, Moore RA, Fogarty AE, Finn DP, Finnerup NB, Gilron I, Haroutounian S, Krane E, Rice ASC, Rowbotham M, Wallace M, Eccleston C. Cannabinoids, cannabis, and cannabis-based medicine for pain management: a systematic review of randomised controlled trials. *Pain*. 2021 Jul 1;162(Suppl 1): S45-S66. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001929. PMID: 32804836.

<sup>141</sup> Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*. 2007 Aug;4(8):1614-48. doi: 10.1002/cbdv.200790144. PMID: 17712811.

- 
- <sup>142</sup> Campbell FA, Tramèr MR, Carroll D, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ*. 2001 Jul 7;323(7303):13-6. doi: 10.1136/bmj.323.7303.13. PMID: 11440935; PMCID: PMC34324.
- <sup>143</sup> Kraft B, Frickey NA, Kaufmann RM, Reif M, Frey R, Gustorff B, Kress HG. Lack of analgesia by oral standardized cannabis extract on acute inflammatory pain and hyperalgesia in volunteers. *Anesthesiology*. 2008 Jul;109(1):101-10. doi: 10.1097/ALN.0b013e31817881e1. PMID: 18580179.
- <sup>144</sup> Stockings E, Campbell G, Hall WD, Nielsen S, Zagic D, Rahman R, Murnion B, Farrell M, Weier M, Degenhardt L. Cannabis and cannabinoids for the treatment of people with chronic noncancer pain conditions: a systematic review and meta-analysis of controlled and observational studies. *Pain*. 2018 Oct;159(10):1932-1954. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001293. PMID: 29847469.
- <sup>145</sup> Johal H, Devji T, Chang Y, Simone J, Vannabouathong C, Bhandari M. Cannabinoids in Chronic Non-Cancer Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2020 Feb 19;13:1179544120906461. doi: 10.1177/1179544120906461. PMID: 32127750; PMCID: PMC7031792.
- <sup>146</sup> Manzanares J, Julian M, Carrascosa A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol*. 2006 Jul;4(3):239-57. doi: 10.2174/157015906778019527. PMID: 18615144; PMCID: PMC2430692.
- <sup>147</sup> 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 Mar 9;415(1): R5-7. doi: 10.1016/s0014-2999(01)00798-1. PMID: 11245860.
- <sup>148</sup> Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, Tontini A, Sanchini S, Sciolino NR, Spradley JM, Hohmann AG, Calignano A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci*. 2010 Oct;13(10):1265-70. doi: 10.1038/nn.2632. Epub 2010 Sep 19. PMID: 20852626; PMCID: PMC3260554.
- <sup>149</sup> Buggy DJ, Toogood L, Maric S, Sharpe P, Lambert DG, Rowbotham DJ. Lack of analgesic efficacy of oral delta-9-tetrahydrocannabinol in postoperative pain.

---

Pain. 2003 Nov;106(1-2):169-72. doi: 10.1016/s0304-3959(03)00331-2. PMID: 14581124.

<sup>150</sup> Seeling W, Kneer L, Büchele B, Gschwend JE, Maier L, Nett C, Simmet T, Steffen P, Schneider M, Rockemann M. Keine synergistische Wirkung der Kombination von Delta (9)-Tetrahydrocannabinol und Piritramid bei postoperativen Schmerzen [Delta (9)-tetrahydrocannabinol and the opioid receptor agonist piritramide do not act synergistically in postoperative pain]. *Anaesthesist*. 2006 Apr;55(4):391-400. German. doi: 10.1007/s00101-005-0963-6. PMID: 16389542.

<sup>151</sup> Holdcroft A, Maze M, Doré C, Tebbs S, Thompson S. A multicenter dose-escalation study of the analgesic and adverse effects of an oral cannabis extract (Cannador) for postoperative pain management. *Anesthesiology*. 2006 May;104(5):1040-6. doi: 10.1097/0000542-200605000-00021. PMID: 16645457.

<sup>152</sup> Guillaud J, Legagneux F, Paulet C. Trial of levonantradol for postoperative analgesia. *Cahiers d'Anesthesiologie*. 1983;31(3):243-248.

<sup>153</sup> Jain AK, Ryan JR, McMahon FG, Smith G. Evaluation of intramuscular levonantradol and placebo in acute postoperative pain. *J Clin Pharmacol*. 1981 Aug-Sep;21(S1):320S-326S. doi: 10.1002/j.1552-4604.1981.tb02610.x. PMID: 7028791.

<sup>154</sup> Beaulieu P. Effects of nabilone, a synthetic cannabinoid, on postoperative pain. *Can J Anaesth*. 2006 Aug;53(8):769-75. doi: 10.1007/BF03022793. PMID: 16873343.

<sup>155</sup> Kalliomäki J, Segerdahl M, Webster L, Reimfelt A, Huizar K, Annas P, Karlsten R, Quiding H. Evaluation of the analgesic efficacy of AZD1940, a novel cannabinoid agonist, on post-operative pain after lower third molar surgical removal. *Scand J Pain*. 2013 Jan 1;4(1):17-22. doi: 10.1016/j.sjpain.2012.08.004. PMID: 29913883.

<sup>156</sup> Ostfeld T, Price J, Albanese M, Bullman J, Guillard F, Meyer I, Leeson R, Costantin C, Ziviani L, Nocini PF, Milleri S. A randomized, controlled study to investigate the analgesic efficacy of single doses of the cannabinoid receptor-2 agonist GW842166, ibuprofen or placebo in patients with acute pain following third molar tooth extraction. *Clin J Pain*. 2011 Oct;27(8):668-76. doi: 10.1097/AJP.0b013e318219799a. PMID: 21540741.

<sup>157</sup> Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol*. 2002 Nov;68(4):247-86. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00080-1. PMID: 12498988.

- 
- <sup>158</sup> Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 2009 Jan;89(1):309-80. doi: 10.1152/physrev.00019.2008. PMID: 19126760.
- <sup>159</sup> LaBuda CJ, Koblisch M, Little PJ. Cannabinoid CB2 receptor agonist activity in the hindpaw incision model of postoperative pain. *Eur J Pharmacol.* 2005 Dec 19;527(1-3):172-4. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.10.020. Epub 2005 Nov 28. PMID: 16316653.
- <sup>160</sup> Viganò D, Rubino T, Parolaro D. Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005 Jun;81(2):360-8. doi: 10.1016/j.pbb.2005.01.021. PMID: 15927245.
- <sup>161</sup> Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y. Mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci.* 2008 Nov;108(3):308-19. doi: 10.1254/jphs.08244fp. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19008645.
- <sup>162</sup> Corchero J, Avila MA, Fuentes JA, Manzanares J. delta-9-Tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci.* 1997;61(4):PL 39-43. doi: 10.1016/s0024-3205(97)00405-0. PMID: 9244374.
- <sup>163</sup> Welch SP, Eads M. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. *Brain Res.* 1999 nov 27;848(1-2):183-90. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01908-3. PMID: 10612710.
- <sup>164</sup> A D, Peigneur S, Hendrickx LA, Tytgat J. Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 17;21(14):5064. doi: 10.3390/ijms21145064. PMID: 32709050; PMCID: PMC7404216.
- <sup>165</sup> Lu HC, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry.* 2016 Apr 1;79(7):516-25. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.028. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26698193; PMCID: PMC4789136.
- <sup>166</sup> Cichewicz Delta9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 May;289(2):859-67. PMID: 10215664.
- <sup>167</sup> Finn DP, Beckett SR, Roe CH, Madjd A, Fone KC, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V. Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur J Neurosci.* 2004 Feb;19(3):678-86. doi: 10.1111/j.0953-816x.2004.03177. x. PMID: 14984418

---

<sup>168</sup> Welch SP, Stevens DL. Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Jul;262(1):10-8. PMID: 1320680.

<sup>169</sup> Welch SP, Thomas C, Patrick GS. Modulation of cannabinoid-induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Jan;272(1):310-21. PMID: 7815346.

<sup>170</sup> Yesilyurt O, Dogrul A, Gul H, Seyrek M, Kusmez O, Ozkan Y, Yildiz O. Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain.* 2003 Sep;105(1-2):303-8. doi: 10.1016/s0304-3959(03)00245-8. PMID: 14499448.

<sup>171</sup> Pacheco Dda F, Klein A, Perez AC, Pacheco CM, de Francischi JN, Reis GM, et al. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2009;158(1):225–31. Epub 2009/07/15. doi: BPH310.23.1111/j.1476–5381.2009.00310.x. PubMed PMID: 19594755; PubMed Central PMCID: PMC2795241.

<sup>172</sup> Maguire DR, Yang W, France CP. Interactions between  $\mu$ -opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists in rhesus monkeys: antinociception, drug discrimination, and drug self-administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013 Jun;345(3):354-62. doi: 10.1124/jpet.113.204099. Epub 2013 Mar 27. Erratum in: *J Pharmacol Exp Ther.* 2014 Mar;348(3):490-1. Dosage error in article text. PMID: 23536317; PMCID: PMC3657106.

<sup>173</sup> Levin DN, Dulberg Z, Chan AW, Hare GM, Mazer CD, Hong A. A randomized-controlled trial of nabilone for the prevention of acute postoperative nausea and vomiting in elective surgery. *Can J Anaesth.* 2017 Apr;64(4):385-395. English. doi: 10.1007/s12630-017-0814-3. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28160217.

<sup>174</sup> Seeling, W.; Kneer, L.; Buchele, B.; Gschwend, J. E.; Maier, L.; Nett, C.; Simmet, T.; Steffen, P.; Schneider, M.; Rockemann, M., [Delta (9)-tetrahydrocannabinol and the opioid receptor agonist piritramide do not act synergistically in postoperative pain]. *Anaesthetist* **2006**, 55, (4), 391-400.

<sup>175</sup> Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. *Neurosci Lett.* 1998 Dec 4;257(3):119-22. doi: 10.1016/s0304-3940(98)00802-7. PMID: 9870334.

<sup>176</sup> Morisset V, Urban L. Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J*

---

Neurophysiol. 2001 Jul;86(1):40-8. doi: 10.1152/jn.2001.86.1.40. PMID: 11431486.

<sup>177</sup> Xu K, Wu Y, Tian Z, Xu Y, Wu C, Wang Z. Microglial Cannabinoid CB<sub>2</sub> Receptors in Pain Modulation. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 25;24(3):2348. doi: 10.3390/ijms24032348. PMID: 36768668; PMCID: PMC9917135

<sup>178</sup> 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 Mar;90(3):923-31. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00524-7. PMID: 10218792.

<sup>179</sup> Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 1994 Dec 15;372(6507):686-91. doi: 10.1038/372686a0. PMID: 7990962.

<sup>180</sup> Costa B, Siniscalco D, Trovato AE, Comelli F, Sotgiu ML, Colleoni M, Maione S, Rossi F, Giagnoni G. AM404, an inhibitor of anandamide uptake, prevents pain behaviour and modulates cytokine and apoptotic pathways in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 2006 Aug;148(7):1022-32. doi: 10.1038/sj.bjp.0706798. Epub 2006 Jun 12. PMID: 16770320; PMCID: PMC1751928.

<sup>181</sup> Valverde O, Ledent C, Beslot F, Parmentier M, Roques BP. Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. *Eur J Neurosci.* 2000 Feb;12(2):533-9. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00929.x. PMID: 10712632.

<sup>182</sup> Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol.* 2009 Jul;88(3):184-202. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.04.003. Epub 2009 Apr 22. PMID: 19393288.

<sup>183</sup> de Lago E, Fernández-Ruiz J, Ortega-Gutiérrez S, Viso A, López-Rodríguez ML, Ramos JA. UCM707, a potent and selective inhibitor of endocannabinoid uptake, potentiates hypokinetic and antinociceptive effects of anandamide. *Eur J Pharmacol.* 2002 Aug 2;449(1-2):99-103. doi: 10.1016/s0014-2999(02)01996-9. PMID: 12163112.

<sup>184</sup> Alawi K, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. *Pharmacol Ther.* 2010 Feb;125(2):181-95. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.10.005. Epub 2009 Nov 5. PMID: 19896501.

<sup>185</sup> da Costa DSM, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPV1) in the maintenance of

---

mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*. 2010 Mar;148(3):431-437. doi: 10.1016/j.pain.2009.12.002. Epub 2009 Dec 28. PMID: 20056530.

<sup>186</sup> Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front Mol Neurosci*. 2019 Jan 15; 11:487. doi: 10.3389/fnmol.2018.00487. PMID: 30697147; PMCID: PMC6340993.

<sup>187</sup> Wei H, Koivisto A, Pertovaara A. Spinal TRPV1 ion channels contribute to cutaneous neurogenic inflammation in the rat. *Neurosci Lett*. 2010 Aug 2;479(3):253-6. doi: 10.1016/j.neulet.2010.05.073. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20566388.

<sup>188</sup> Jennings EA, Vaughan CW, Roberts LA, Christie MJ. The actions of anandamide on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. *J Physiol*. 2003 Apr 1;548(Pt 1):121-9. doi: 10.1113/jphysiol.2002.035063. Epub 2003 Jan 31. PMID: 12562891; PMCID: PMC2342784.

<sup>189</sup> Garcia-Ovejero D, Arevalo-Martin A, Petrosino S, Docagne F, Hagen C, Bisogno T, Watanabe M, Guaza C, Di Marzo V, Molina-Holgado E. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis*. 2009 Jan;33(1):57-71. doi: 10.1016/j.nbd.2008.09.015. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18930143.

<sup>190</sup> Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MC, Ward AM, Hahn YK, Lichtman AH, Conti B, Cravatt BF. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science*. 2011 Nov 11;334(6057):809-13. doi: 10.1126/science.1209200. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22021672; PMCID: PMC3249428.

<sup>191</sup> Ma W, Du W, Eisenach JC. Role for both spinal COX-1 and COX-2 in maintenance of mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Brain Res*. 2002 May 24;937(1-2):94-9. doi: 10.1016/s0006-8993(02)02593-3. PMID: 12020867.

<sup>192</sup> Haller VL, Stevens DL, Welch SP. Modulation of opioids via protection of anandamide degradation by fatty acid amide hydrolase. *Eur J Pharmacol*. 2008 Dec 14;600(1-3):50-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.08.005. Epub 2008 Aug 20. PMID: 18762181.

<sup>193</sup> Tuboly G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G, Horvath G. The antinociceptive interaction of anandamide and adenosine at the spinal level. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Jan;91(3):374-9. doi: 10.1016/j.pbb.2008.08.010. Epub 2008 Aug 9. PMID: 18760296.

- 
- <sup>194</sup> O'Sullivan SE, Kendall DA. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology*. 2010 Aug;215(8):611-6. doi: 10.1016/j.imbio.2009.09.007. Epub 2009 Oct 14. PMID: 19833407.
- <sup>195</sup> Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):1-51. doi: 10.1007/3-540-26573-2\_1. PMID: 16596770.
- <sup>196</sup> Finn DP. Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: physiological and pathophysiological significance. *Immunobiology*. 2010 Aug;215(8):629-46. doi: 10.1016/j.imbio.2009.05.011. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19616342.
- <sup>197</sup> Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*. 1996 Jun 15;16(12):3934-42. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-12-03934.1996. PMID: 8656287; PMCID: PMC6578613.
- <sup>198</sup> Siddall P, Xu CL, Cousins M. Allodynia following traumatic spinal cord injury in the rat. *Neuroreport*. 1995 Jun 19;6(9):1241-4. doi: 10.1097/00001756-199506090-00003. PMID: 7669978.
- <sup>199</sup> Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996 Mar;64(3):493-502. doi: 10.1016/0304-3959(95)01441-1. PMID: 8783314.
- <sup>200</sup> Cooper SA, Desjardins PJ, Turk DC, Dworkin RH, Katz NP, Kehlet H, Ballantyne JC, Burke LB, Carragee E, Cowan P, Croll S, Dionne RA, Farrar JT, Gilron I, Gordon DB, Iyengar S, Jay GW, Kalso EA, Kerns RD, McDermott MP, Raja SN, Rappaport BA, Rauschkolb C, Royal MA, Segerdahl M, Stauffer JW, Todd KH, Vanhove GF, Wallace MS, West C, White RE, Wu C. Research design considerations for single-dose analgesic clinical trials in acute pain: IMMPACT recommendations. *Pain*. 2016 Feb;157(2):288-301. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000375. PMID: 26683233.
- <sup>201</sup> Parker, P. Systematic review of movement-evoked pain versus pain at rest in postsurgical clinical trials and meta-analyses: a fundamental distinction requiring standardized measurement. *Pain* **2012**, *153*, 250, doi: 10.1016/j.pain.2011.10.034.
- <sup>202</sup> Kehlet H. Postoperative pain relief--what is the issue? *Br J Anaesth*. 1994 Apr;72(4):375-8. doi: 10.1093/bja/72.4.375. PMID: 8155433.

- 
- <sup>203</sup> Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol Clin North Am*. 2005 Mar;23(1):1-20. doi: 10.1016/j.atc.2004.11.009. PMID: 15763408.
- <sup>204</sup> Honore P, Wade CL, Zhong C, Harris RR, Wu C, Ghayur T, Iwakura Y, Decker MW, Faltynek C, Sullivan J, Jarvis MF. Interleukin-1 $\alpha$  gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res*. 2006 Feb 28;167(2):355-64. doi: 10.1016/j.bbr.2005.09.024. Epub 2005 Oct 26. PMID: 16256210.
- <sup>205</sup> Whiteside GT, Harrison J, Boulet J, Mark L, Pearson M, Gottshall S, Walker K. Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. *Br J Pharmacol*. 2004 Jan;141(1):85-91. doi: 10.1038/sj.bjp.0705568. Epub 2003 Nov 3. PMID: 14597606; PMCID: PMC1574164.
- <sup>206</sup> Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 2001 Dec;53(4):597-652. PMID: 11734620.
- <sup>207</sup> Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther*. 1953 Mar;107(3):385-93. PMID: 13035677.
- <sup>208</sup> Ossipov MH, Harris S, Lloyd P, Messineo E. An isobolographic analysis of the antinociceptive effect of systemically and intrathecally administered combinations of clonidine and opiates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 Dec;255(3):1107-16. PMID: 2262895
- <sup>209</sup> Penning JP, Yaksh TL. Interaction of intrathecal morphine with bupivacaine and lidocaine in the rat. *Anesthesiology*. 1992 Dec;77(6):1186-2000. doi: 10.1097/00000542-199212000-00021. PMID: 1466469
- <sup>210</sup> Morgan MM, Fossum EN, Stalding BM, King MM. Morphine antinociceptive potency on chemical, mechanical, and thermal nociceptive tests in the rat. *J Pain*. 2006 May;7(5):358-66. doi: 10.1016/j.jpain.2005.12.009. PMID: 16632325.
- <sup>211</sup> Gunn A, Bobeck EN, Weber C, Morgan MM. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J Pain*. 2011 Feb;12(2):222-7. doi: 10.1016/j.jpain.2010.06.011. Epub 2010 Aug 25. PMID: 20797920; PMCID: PMC3312470.
- <sup>212</sup> Plone MA, Emerich DF, Lindner MD. Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. *Pain*. 1996 Aug;66(2-3):265-70. doi: 10.1016/0304-3959(96)03048-5. PMID: 8880849.
- <sup>213</sup><https://ugobasile.com/products/categories/pain-and-inflammation/dynamic-plantar-aesthesiometer-for-mechanical-stimulation>

- 
- <sup>214</sup> Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008 Jul 31;137(3):473-477. doi: 10.1016/j.pain.2008.04.025. Epub 2008 Jun 25. PMID: 18583048.
- <sup>215</sup> Hämäläinen MM, Gebhart GF, Brennan TJ. Acute effect of an incision on mechanosensitive afferents in the plantar rat hindpaw. *J Neurophysiol*. 2002 Feb;87(2):712-20. doi: 10.1152/jn.00207.2001. PMID: 11826040.
- <sup>216</sup> Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol*. 2002 Feb;87(2):721-31. doi: 10.1152/jn.00208.2001. PMID: 11826041.
- <sup>217</sup> Zahn PK, Brennan TJ. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. *Anesthesiology*. 1999 Mar;90(3):863-72. doi: 10.1097/0000542-199903000-00030. PMID: 10078689.
- <sup>218</sup> López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Fowler CJ, Tiger G, de Lago E, Fernández-Ruiz J, Ramos JA. Design, synthesis and biological evaluation of new endocannabinoid transporter inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2003 Apr;38(4):403-12. doi: 10.1016/s0223-5234(03)00045-x. PMID: 12750028.
- <sup>219</sup> Yang CP, Cherg CH, Wu CT, Huang HY, Tao PL, Wong CS. Intrathecal ultra-low dose naloxone enhances the antinociceptive effect of morphine by enhancing the reuptake of excitatory amino acids from the synaptic cleft in the spinal cord of partial sciatic nerve-transected rats. *Anesth Analg*. 2011 Dec;113(6):1490-500. doi: 10.1213/ANE.0b013e31822d39c1. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21865493.
- <sup>220</sup> Wang Q, Mao LM, Shi YS, Han JS. Lumbar intrathecal administration of naloxone antagonizes analgesia produced by electrical stimulation of the hypothalamic arcuate nucleus in pentobarbital-anesthetized rats. *Neuropharmacology*. 1990 Dec;29(12):1123-9. doi: 10.1016/0028-3908(90)90036-q. PMID: 2293056.
- <sup>221</sup> Jai Hyun Hwang, Jeong Hye Lee, Young Kook Kim, Jong Yeon Park, Dong Myung Lee. The Mechanism of Action of Intrathecal Morphine in Neuropathic Pain Induced by Nerve Ligation: The Effect of Naloxone. *Korean J Anesthesiol*. 2000;38(4):689-6.
- <sup>222</sup> Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*. 1994 Aug 22;350(2-3):240-4. doi: 10.1016/0014-5793(94)00773-x. PMID: 8070571.

- 
- <sup>223</sup>Bolognini D, Cascio MG, Parolaro D, Pertwee RG. AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. *Br J Pharmacol*. 2012 Apr;165(8):2561-74. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01503.x. PMID: 21615724; PMCID: PMC3423246.
- <sup>224</sup>Doherty EM, Fotsch C, Bo Y, Chakrabarti PP, Chen N, Gavva N, Han N, Kelly MG, Kincaid J, Klionsky L, Liu Q, Ognyanov VI, Tamir R, Wang X, Zhu J, Norman MH, Treanor JJ. Discovery of potent, orally available vanilloid receptor-1 antagonists. Structure-activity relationship of N-aryl cinnamides. *J Med Chem*. 2005 Jan 13;48(1):71-90. doi: 10.1021/jm049485i. PMID: 15634002.
- <sup>225</sup>Patwardhan AM, Scotland PE, Akopian AN, Hargreaves KM. Activation of TRPV1 in the spinal cord by oxidized linoleic acid metabolites contributes to inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18820-4. doi: 10.1073/pnas.0905415106. Epub 2009 Oct 20. PMID: 19843694; PMCID: PMC2764734.
- <sup>226</sup>Maps and guide to microdissection of the rat brain Palkovits, M.; Brownstein, Michael J. c1988.
- <sup>227</sup>New brain and spinal cord atlases in the BrainGlobe Atlas API
- <sup>228</sup>Lichtman AH, Cook SA, Martin BR. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Feb;276(2):585-93. PMID: 8632325.
- <sup>229</sup>Wilson AR, Maher L, Morgan MM. Repeated cannabinoid injections into the rat periaqueductal gray enhance subsequent morphine antinociception. *Neuropharmacology*. 2008 Dec;55(7):1219-25. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.038. Epub 2008 Aug 5. PMID: 18723035; PMCID: PMC2743428.
- <sup>230</sup>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 Mar;83(2):393-411. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00436-3. PMID: 9460749.
- <sup>231</sup>D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*. 2008 Jul;101(1):8-16. doi: 10.1093/bja/aen088. Epub 2008 Apr 15. PMID: 18417503.
- <sup>232</sup>Sabbe MB, Yaksh TL. Pharmacology of spinal opioids. *J Pain Symptom Manage*. 1990 Jun;5(3):191-203. doi: 10.1016/0885-3924(90)90009-9. PMID: 2164071.

- 
- <sup>233</sup> Hohmann AG. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids*. 2002 Dec 31;121(1-2):173-90. doi: 10.1016/s0009-3084(02)00154-8. PMID: 12505699.
- <sup>234</sup> Sóvágó J, Dupuis DS, Gulyás B, Hall H. An overview on functional receptor autoradiography using [35S] GTPgammaS. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Dec;38(1-2):149-64. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00106-0. PMID: 11750931.
- <sup>235</sup> Sim LJ, Selley DE, Childers SR. In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S] thio]-triphosphate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 1;92(16):7242-6. doi: 10.1073/pnas.92.16.7242. PMID: 7638174; PMCID: PMC41315.
- <sup>236</sup> Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol*. 2013; 530:67-74. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6. PMID: 24034314.
- <sup>237</sup> Meller ST, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology*. 1994 Nov;33(11):1471-8. doi: 10.1016/0028-3908(94)90051-5. PMID: 7532831.
- <sup>238</sup> Dou W, Jiao Y, Goorha S, Raghov R, Ballou LR. Nociception and the differential expression of cyclooxygenase-1 (COX-1), the COX-1 variant retaining intron-1 (COX-1v), and COX-2 in mouse dorsal root ganglia (DRG). *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2004 Oct;74(1-4):29-43. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2004.06.001. PMID: 15560114.
- <sup>239</sup> Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002 Mar 15;30(6):1292-305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292. PMID: 11884626; PMCID: PMC101343.
- <sup>240</sup> Maps and guide to microdissection of the rat brain / Miklós Palkovits, Michael J. Brownstein. Palkovits, M.; Brownstein, Michael J. c1988.
- <sup>241</sup> Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- <sup>242</sup> Desroches J, Beaulieu P. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. *Curr Drug Targets*. 2010 Apr;11(4):462-73. doi: 10.2174/138945010790980303. PMID: 20017728.
- <sup>243</sup> Roberts JD, Gennings C, Shih M. Synergistic affective analgesic interaction between delta-9-tetrahydrocannabinol and morphine. *Eur J Pharmacol*. 2006 Jan

---

13;530(1-2):54-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.11.036. Epub 2005 Dec 22. PMID: 16375890.

<sup>244</sup>Schlosburg JE, Kinsey SG, Lichtman AH. Targeting fatty acid amide hydrolase (FAAH) to treat pain and inflammation. *AAPS J.* 2009 Mar;11(1):39-44. doi: 10.1208/s12248-008-9075-y. Epub 2009 Jan 29. PMID: 19184452; PMCID: PMC2664876.

<sup>245</sup>Nielsen S, Picco L, Murnion B, Winters B, Matheson J, Graham M, Campbell G, Parvaresh L, Khor KE, Betz-Stablein B, Farrell M, Lintzeris N, Le Foll B. Opioid-sparing effect of cannabinoids for analgesia: an updated systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies. *Neuropsychopharmacology.* 2022 Jun;47(7):1315-1330. doi: 10.1038/s41386-022-01322-4. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35459926; PMCID: PMC9117273.

<sup>246</sup>Alsalem M, Altarifi A, Haddad M, Aldossary SA, Kalbouneh H, Aldaoud N, Saleh T, El-Salem K. Antinociceptive and Abuse Potential Effects of Cannabinoid/Opioid Combinations in a Chronic Pain Model in Rats. *Brain Sci.* 2019 Nov 17;9(11):328. doi: 10.3390/brainsci9110328. PMID: 31744226; PMCID: PMC6896179.

<sup>247</sup>Smith PA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Welch SP. Low dose combination of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol circumvents antinociceptive tolerance and apparent desensitization of receptors. *Eur J Pharmacol.* 2007 Oct 1;571(2-3):129-37. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.06.001. Epub 2007 Jun 12. PMID: 17603035; PMCID: PMC2040345.

<sup>248</sup>da Fonseca Pacheco D, Klein A, de Castro Perez A, da Fonseca Pacheco CM, de Francischi JN, Duarte ID. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2008 Jul;154(5):1143-9. doi: 10.1038/bjp.2008.175. Epub 2008 May 12. PMID: 18469844; PMCID: PMC2465574.

<sup>249</sup>Pacheco Dda F, Klein A, Perez AC, Pacheco CM, de Francischi JN, Reis GM, Duarte ID. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2009 Sep;158(1):225-31. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00310.x. Epub 2009 Jul 7. PMID: 19594755; PMCID: PMC2795241.

<sup>250</sup>Jhaveri MD, Richardson D, Kendall DA, Barrett DA, Chapman V. Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain.

---

J Neurosci. 2006 Dec 20;26(51):13318-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3326-06.2006. PMID: 17182782; PMCID: PMC6674985.

<sup>251</sup> Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 22;102(8):3093-8. doi: 10.1073/pnas.0409888102. Epub 2005 Feb 10. PMID: 15705714; PMCID: PMC549497.

<sup>252</sup> Wolf J, Urits I, Orhurhu V, Peck J, Orhurhu MS, Giacomazzi S, Smoots D, Piermarini C, Manchikanti L, Kaye AD, Kaye RJ, Viswanath O. The Role of the Cannabinoid System in Pain Control: Basic and Clinical Implications. Curr Pain Headache Rep. 2020 Jun 6;24(7):35. doi: 10.1007/s11916-020-00873-9. PMID: 32506272.

<sup>253</sup> Haller VL, Cichewicz DL, Welch SP. Non-cannabinoid CB1, non-cannabinoid CB2 antinociceptive effects of several novel compounds in the PPQ stretch test in mice. Eur J Pharmacol. 2006 Sep 28;546(1-3):60-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.07.024. Epub 2006 Jul 25. PMID: 16919265.

<sup>254</sup> Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ, Kuner R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. Nat Neurosci. 2007 Jul;10(7):870-9. doi: 10.1038/nn1916. Epub 2007 Jun 10. PMID: 17558404; PMCID: PMC2234438.

<sup>255</sup> Maione S, De Petrocellis L, de Novellis V, Moriello AS, Petrosino S, Palazzo E, Rossi FS, Woodward DF, Di Marzo V. Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. Br J Pharmacol. 2007 Mar;150(6):766-81. doi: 10.1038/sj.bjp.0707145. Epub 2007 Feb 5. PMID: 17279090; PMCID: PMC2013858.

<sup>256</sup> Sáez-Cassanelli JL, Fontanella GH, Delgado-García JM, Carrión AM. Functional blockage of the cannabinoid receptor type 1 evokes a kappa-opiate-dependent analgesia. J Neurochem. 2007 Dec;103(6):2629-39. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05000.x. PMID: 17953671.

<sup>257</sup> Pertwee RG. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. Curr Med Chem. 2010;17(14):1360-81. doi: 10.2174/092986710790980050. PMID: 20166927; PMCID: PMC3013229.

- 
- <sup>258</sup> Woodhams SG, Wong A, Barrett DA, Bennett AJ, Chapman V, Alexander SP. Spinal administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 produces robust inhibitory effects on nociceptive processing and the development of central sensitization in the rat. *Br J Pharmacol*. 2012 Dec;167(8):1609-19. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02179.x. PMID: 22924700; PMCID: PMC3525864.
- <sup>259</sup> Suplita RL 2nd, Gutierrez T, Fegley D, Piomelli D, Hohmann AG. Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia. *Neuropharmacology*. 2006 Mar;50(3):372-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.10.007. Epub 2005 Nov 28. PMID: 16316669.
- <sup>260</sup> Taber RI. Predictive value of analgesic assays in mice and rats. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1973;8(0):191-211. PMID: 4604927.
- <sup>261</sup> Nemirovsky A, Chen L, Zelman V, Jurna I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. *Anesth Analg*. 2001 Jul;93(1):197-203. doi: 10.1097/00000539-200107000-00039. PMID: 11429365.
- <sup>262</sup> Yaksh TL. Spinal opiate analgesia: characteristics and principles of action. *Pain*. 1981 Dec;11(3):293-346. doi: 10.1016/0304-3959(81)90633-3. PMID: 6276842.
- <sup>263</sup> Jones RS. Epidural analgesia in the dog and cat. *Vet J*. 2001 Mar;161(2):123-31. doi: 10.1053/tvj.2000.0528. PMID: 11243684.
- <sup>264</sup> Zahn PK, Gysbers D, Brennan TJ. Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*. 1997 May;86(5):1066-77. doi: 10.1097/00000542-199705000-00010. PMID: 9158356.
- <sup>265</sup> Buerkle H, Yaksh TL. Comparison of the spinal actions of the mu-opioid remifentanyl with alfentanil and morphine in the rat. *Anesthesiology*. 1996 Jan;84(1):94-102. doi: 10.1097/00000542-199601000-00012. PMID: 8572360.
- <sup>266</sup> Kalyuzhny AE, Arvidsson U, Wu W, Wessendorf MW. mu-Opioid and delta-opioid receptors are expressed in brainstem antinociceptive circuits: studies using immunocytochemistry and retrograde tract-tracing. *J Neurosci*. 1996 Oct 15;16(20):6490-503. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-20-06490.1996. PMID: 8815927; PMCID: PMC6578904.
- <sup>267</sup> Senese NB, Kandasamy R, Kochan KE, Traynor JR. Regulator of G-Protein Signaling (RGS) Protein Modulation of Opioid Receptor Signaling as a Potential Target for Pain Management. *Front Mol Neurosci*. 2020 Jan 24; 13:5. doi: 10.3389/fnmol.2020.00005. PMID: 32038168; PMCID: PMC6992652.

- 
- <sup>268</sup> Reimann, W.; Schlutz, H.; Selve, N. The antinociceptive effects of morphine, desipramine, and serotonin and their combinations after intrathecal injection in the rat. *Anesth Analg* 1999, 88, 141-145, doi:10.1097/00000539-199901000-00026.
- <sup>269</sup> Maguire DR, France CP. Impact of efficacy at the  $\mu$ -opioid receptor on antinociceptive effects of combinations of  $\mu$ -opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Nov;351(2):383-9. doi: 10.1124/jpet.114.216648. Epub 2014 Sep 5. PMID: 25194020; PMCID: PMC4201274.
- <sup>270</sup> Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci*. 2000 Jun;15(6):510-21. doi: 10.1006/mcne.2000.0844. PMID: 10860578.
- <sup>271</sup> Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*. 2000;100(4):685-8. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00389-4. PMID: 11036202.
- <sup>272</sup> Pernía-Andrade AJ, Kato A, Witschi R, Nyilas R, Katona I, Freund TF, Watanabe M, Filitz J, Koppert W, Schüttler J, Ji G, Neugebauer V, Marsicano G, Lutz B, Vanegas H, Zeilhofer HU. Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-fiber-induced heterosynaptic pain sensitization. *Science*. 2009 Aug 7;325(5941):760-4. doi: 10.1126/science.1171870. PMID: 19661434; PMCID: PMC2835775.
- <sup>273</sup> Christie MJ, Mallet C. Endocannabinoids can open the pain gate. *Sci Signal*. 2009 Sep 15;2(88):pe57. doi: 10.1126/scisignal.288pe57. PMID: 19755708.
- <sup>274</sup> Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sík A, De Koninck P, De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*. 2003 Aug 21;424(6951):938-42. doi: 10.1038/nature01868. PMID: 12931188.
- <sup>275</sup> Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):1017-21. doi: 10.1038/nature04223. PMID: 16355225.
- <sup>276</sup> Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem*. 2005 Oct;95(2):437-45. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16086683.

- 
- <sup>277</sup>Lunn CA, Reich EP, Fine JS, Lavey B, Kozlowski JA, Hipkin RW, Lundell DJ, Bober L. Biology and therapeutic potential of cannabinoid CB2 receptor inverse agonists. *Br J Pharmacol*. 2008 Jan;153(2):226-39. doi: 10.1038/sj.bjp.0707480. Epub 2007 Oct 1. PMID: 17906679; PMCID: PMC2219522.
- <sup>278</sup>Miller AM, Stella N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol*. 2008 Jan;153(2):299-308. doi: 10.1038/sj.bjp.0707523. Epub 2007 Nov 5. PMID: 17982478; PMCID: PMC2219538.
- <sup>279</sup> Wei H, Koivisto A, Saarnilehto M, Chapman H, Kuokkanen K, Hao B, Huang JL, Wang YX, Pertovaara A. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat. *Pain*. 2011 Mar;152(3):582-591. doi: 10.1016/j.pain.2010.11.031. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21211906.
- <sup>280</sup> Uchytlova E, Spicarova D, Palecek J. TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms. *Mol Pain*. 2014 Nov 17; 10:67. doi: 10.1186/1744-8069-10-67. PMID: 25403542; PMCID: PMC4242597.
- <sup>281</sup> Berge OG. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(4):1195-206. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01300.x. PMID: 21371010; PMCID: PMC3229757.
- <sup>282</sup> Arnold AP, Klein SL, McCarthy MM, Mogil JS. Male-female comparisons are powerful in biomedical research - don't abandon them. *Nature*. 2024 May;629(8010):37-40. doi: 10.1038/d41586-024-01205-2. PMID: 38693409.
- <sup>283</sup>Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jul;270(1):219-27. PMID: 8035318.
- <sup>284</sup> Markovic M, Ben-Shabat S, Dahan A. Prodrugs for Improved Drug Delivery: Lessons Learned from Recently Developed and Marketed Products. *Pharmaceutics*. 2020 Oct 29;12(11):1031. doi: 10.3390/pharmaceutics12111031. PMID: 33137942; PMCID: PMC7692606.
- <sup>285</sup> Mazaleuskaya LL, Muzykantov VR, FitzGerald GA. Nanotherapeutic-directed approaches to analgesia. *Trends Pharmacol Sci*. 2021 Jul;42(7):527-550. doi: 10.1016/j.tips.2021.03.007. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33883067; PMCID: PMC8195851.
- <sup>286</sup> Maccarrone M, Di Marzo V, Gertsch J, Grether U, Howlett AC, Hua T, Makriyannis A, Piomelli D, Ueda N, van der Stelt M. Goods and Bads of the

---

Endocannabinoid System as a Therapeutic Target: Lessons Learned after 30 Years. *Pharmacol Rev.* 2023 Sep;75(5):885-958. doi: 10.1124/pharmrev.122.000600. Epub 2023 May 10. Erratum in: *Pharmacol Rev.* 2023 Dec 15;76(1):194. doi: 10.1124/pharmrev.122.000600err. PMID: 37164640; PMCID: PMC10441647.

<sup>287</sup> Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci.* 1991; 14:219-45. doi: 10.1146/annurev.ne.14.030191.001251. PMID: 1674413.

<sup>288</sup> Csullog E, Joo G, Toth G, Dobos I, Benedek G, Horvath G. Antinociceptive effect of continuous intrathecal administration of endomorphin-1. *Pain.* 2001 Oct;94(1):31-38. doi: 10.1016/S0304-3959(01)00338-4. PMID: 11576742.

<sup>289</sup> Kekesi G, Dobos I, Benedek G, Horvath G. The antinociceptive potencies and interactions of endogenous ligands during continuous intrathecal administration: adenosine, agmatine, and endomorphin-1. *Anesth Analg.* 2004 Feb;98(2):420-426. doi: 10.1213/01.ANE.0000096066.26157.2A. PMID: 14742381.

<sup>290</sup> Jordan BA, Gomes I, Rios C, Filipovska J, Devi LA. Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol.* 2003 Dec;64(6):1317-24. doi: 10.1124/mol.64.6.1317. PMID: 14645661.

<sup>291</sup> Vilardaga JP, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ. Conformational crosstalk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol.* 2008 Feb;4(2):126-31. doi: 10.1038/nchembio.64. Epub 2008 Jan 13. PMID: 18193048.

<sup>292</sup> Milligan G. G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1768(4):825-35. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.09.021. Epub 2006 Sep 30. PMID: 17069751.

<sup>293</sup> Welch SP. Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimine, but not N, N-diallyl-tyrosine-Aib-phenylalanine-leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 May;265(2):633-40. PMID: 8388455.

<sup>294</sup> Schepers RJ, Mahoney JL, Gehrke BJ, Shippenberg TS. Endogenous kappa-opioid receptor systems inhibit hyperalgesia associated with localized peripheral inflammation. *Pain.* 2008 Aug 31;138(2):423-439. doi: 10.1016/j.pain.2008.01.023. Epub 2008 Mar 19. PMID: 18355964; PMCID: PMC2553515.

- 
- <sup>295</sup> Mason DJ Jr, Lowe J, Welch SP. Cannabinoid modulation of dynorphin A: correlation to cannabinoid-induced antinociception. *Eur J Pharmacol.* 1999 Aug 13;378(3):237-48. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00479-3. PMID: 10493099.
- <sup>296</sup> Pugh G Jr, Abood ME, Welch SP. Antisense oligodeoxynucleotides to the kappa-1 receptor block the antinociceptive effects of delta 9-THC in the spinal cord. *Brain Res.* 1995 Aug 14;689(1):157-8. doi: 10.1016/0006-8993(95)00560-d. PMID: 8528701.
- <sup>297</sup> Pugh G Jr, Mason DJ Jr, Combs V, Welch SP. Involvement of dynorphin B in the antinociceptive effects of the cannabinoid CP55,940 in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 May;281(2):730-7. PMID: 9152379.
- <sup>298</sup> Chapman CR, Vierck CJ. The Transition of Acute Postoperative Pain to Chronic Pain: An Integrative Overview of Research on Mechanisms. *J Pain.* 2017 Apr;18(4): 359.e1-359.e38. doi: 10.1016/j.jpain.2016.11.004. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27908839.
- <sup>299</sup> Stein C, Clark JD, Oh U, Vasko MR, Wilcox GL, Overland AC, Vanderah TW, Spencer RH. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Res Rev.* 2009 Apr;60(1):90-113. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.017. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19150465; PMCID: PMC2730351.
- <sup>300</sup> Ellis A, Bennett DL. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br J Anaesth.* 2013 Jul;111(1):26-37. doi: 10.1093/bja/aet128. PMID: 23794642.
- <sup>301</sup> Yang JX, Wang HF, Chen JZ, Li HY, Hu JC, Yu AA, Wen JJ, Chen SJ, Lai WD, Wang S, Jin Y, Yu J. Potential Neuroimmune Interaction in Chronic Pain: A Review on Immune Cells in Peripheral and Central Sensitization. *Front Pain Res (Lausanne).* 2022 Jul 4; 3:946846. doi: 10.3389/fpain.2022.946846. PMID: 35859655; PMCID: PMC9289261.
- <sup>302</sup> Ji RR, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology.* 2018 Aug;129(2):343-366. doi: 10.1097/ALN.0000000000002130. PMID: 29462012; PMCID: PMC6051899.
- <sup>303</sup> Torta DME, Van Den Broeke EN, Filbrich L, Jacob B, Lambert J, Mouraux A. Intense pain influences the cortical processing of visual stimuli projected onto the sensitized skin. *Pain.* 2017 Apr;158(4):691-697. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000816. PMID: 28030473; PMCID: PMC5357432..

- 
- <sup>304</sup> De Ridder D, Adhia D, Vanneste S. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021 Nov; 130:125-146. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.08.013. Epub 2021 Aug 16. PMID: 34411559.
- <sup>305</sup> Matsuda M, Huh Y, Ji RR. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *J Anesth*. 2019 Feb;33(1):131-139. doi: 10.1007/s00540-018-2579-4. Epub 2018 Nov 17. PMID: 30448975; PMCID: PMC6813778.
- <sup>306</sup> Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 2010 Nov;16(11):1267-76. doi: 10.1038/nm.2234. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20948535; PMCID: PMC3077564.
- <sup>307</sup> Ghori MK, Zhang Y, Sinatra RS. Pathophysiology of acute pain. In: Sinatra RS, de Leon Cassasola OA, editors. *Acute Pain Management*. 1<sup>st</sup> edn. New York: Cambridge University Press; 2009. pp. 21-32
- <sup>308</sup> Wu CL, Caldwell MD. Effect of post-operative analgesia on patient morbidity. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2002 Dec;16(4):549-63. doi: 10.1053/bean.2002.0249. PMID: 12516891.
- <sup>309</sup> Liu SS, Wu CL. Effect of postoperative analgesia on major postoperative complications: a systematic update of the evidence. *Anesth Analg*. 2007 Mar;104(3):689-702. doi: 10.1213/01.ane.0000255040.71600.41. PMID: 17312231.
- <sup>310</sup> Ledowski T, Reimer M, Chavez V, Kapoor V, Wenk M. Effects of acute postoperative pain on catecholamine plasma levels, hemodynamic parameters, and cardiac autonomic control. *Pain*. 2012 Apr;153(4):759-764. doi: 10.1016/j.pain.2011.11.002. Epub 2012 Feb 4. PMID: 22305628.
- <sup>311</sup> Kelliher LJS, Scott M. Modifying the Stress Response - Perioperative Considerations and Controversies. *Anesthesiol Clin*. 2022 Mar;40(1):23-33. doi: 10.1016/j.anclin.2021.11.012. Epub 2022 Feb 11. PMID: 35236581.
- <sup>312</sup> Kehlet H, Dahl JB. The value of "multimodal" or "balanced analgesia" in postoperative pain treatment. *Anesth Analg*. 1993 Nov;77(5):1048-56. doi: 10.1213/00000539-199311000-00030. PMID: 8105724.
- <sup>313</sup> Marret E, Kurdi O, Zufferey P, Bonnet F. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on patient-controlled analgesia morphine side effects: meta-analysis of randomized controlled trials. *Anesthesiology*. 2005 Jun;102(6):1249-60. doi: 10.1097/00000542-200506000-00027. PMID: 15915040.

- 
- <sup>314</sup> Jin F, Chung F. Multimodal analgesia for postoperative pain control. *J Clin Anesth.* 2001 Nov;13(7):524-39. doi: 10.1016/s0952-8180(01)00320-8. PMID: 11704453.
- <sup>315</sup> Kehlet H. Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation. *Br J Anaesth.* 1997 May;78(5):606-17. doi: 10.1093/bja/78.5.606. PMID: 9175983.
- <sup>316</sup> Kaye AD, Granier AL, Garcia AJ, Carlson SF, Fuller MC, Haroldson AR, White SW, Krueger OL, Novitch MB, Cornett EM. Non-Opioid Perioperative Pain Strategies for the Clinician: A Narrative Review. *Pain Ther.* 2020 Jun;9(1):25-39. doi: 10.1007/s40122-019-00146-3. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31933147; PMCID: PMC7203361.
- <sup>317</sup> Donnelly CR, Andriessen AS, Chen G, Wang K, Jiang C, Maixner W, Ji RR. Central Nervous System Targets: Glial Cell Mechanisms in Chronic Pain. *Neurotherapeutics.* 2020 Jul;17(3):846-860. doi: 10.1007/s13311-020-00905-7. PMID: 32820378; PMCID: PMC7609632.
- <sup>318</sup> Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem.* 2006 May;97(3):772-83. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03746.x. Epub 2006 Mar 8. PMID: 16524371.
- <sup>319</sup> Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jan;10(1):23-36. doi: 10.1038/nrn2533. PMID: 19096368; PMCID: PMC2752436.
- <sup>320</sup> Schomberg D, Olson JK. Immune responses of microglia in the spinal cord: contribution to pain states. *Exp Neurol.* 2012 Apr;234(2):262-70. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.12.021. Epub 2011 Dec 27. PMID: 22226600.
- <sup>321</sup> Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain Behav Immun.* 2007 Jul;21(5):642-51. doi: 10.1016/j.bbi.2006.11.003. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17174525; PMCID: PMC2084372.
- <sup>322</sup> He L, Li H, Chen L, Miao J, Jiang Y, Zhang Y, Xiao Z, Hanley G, Li Y, Zhang X, LeSage G, Peng Y, Yin D. Toll-like receptor 9 is required for opioid-induced microglia apoptosis. *PLoS One.* 2011 Apr 29;6(4): e18190. doi: 10.1371/journal.pone.0018190. PMID: 21559519; PMCID: PMC3084705.
- <sup>323</sup> Zhang Y, Li H, Li Y, Sun X, Zhu M, Hanley G, Lesage G, Yin D. Essential role of toll-like receptor 2 in morphine-induced microglia activation in mice. *Neurosci*

---

Lett. 2011 Feb 1;489(1):43-7. doi: 10.1016/j.neulet.2010.11.063. Epub 2010 Dec 2. PMID: 21130144; PMCID: PMC3018547.

<sup>324</sup> Saito O, Svensson CI, Buczynski MW, Wegner K, Hua XY, Codeluppi S, Schaloske RH, Deems RA, Dennis EA, Yaksh TL. Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E (2) and TNF. *Br J Pharmacol*. 2010 Aug;160(7):1754-64. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00811.x. PMID: 20649577; PMCID: PMC2936846.

<sup>325</sup> Inoue K. ATP receptors of microglia involved in pain. *Novartis Found Symp*. 2006; 276:263-72; discussion 273-81. PMID: 16805436.

<sup>326</sup> Han Q, Lin Q, Huang P, Chen M, Hu X, Fu H, He S, Shen F, Zeng H, Deng Y. Microglia-derived IL-1 $\beta$  contributes to axon development disorders and synaptic deficit through p38-MAPK signal pathway in septic neonatal rats. *J Neuroinflammation*. 2017 Mar 14;14(1):52. doi: 10.1186/s12974-017-0805-x. PMID: 28288671; PMCID: PMC5348817.

<sup>327</sup> Klein MA, Möller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*. 1997 Mar;19(3):227-33. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199703)19:3<227:aid-glia5>3.0.co;2-w. PMID: 9063729.

<sup>328</sup> Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ. Microglial activation and TNF $\alpha$  production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 4;105(44):17151-6. doi: 10.1073/pnas.0806682105. Epub 2008 Oct 27. PMID: 18955701; PMCID: PMC2579393.

<sup>329</sup> Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, Buell GN, Reeve AJ, Chessell IP, Rassendren F. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2008 Oct 29;28(44):11263-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008. PMID: 18971468; PMCID: PMC6671487.

<sup>330</sup> Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):331-6. doi: 10.1038/nm1723. Epub 2008 Feb 10. PMID: 18264108; PMCID: PMC2279180.

<sup>331</sup> Ruan Z, Zhang D, Huang R, Sun W, Hou L, Zhao J, Wang Q. Microglial Activation Damages Dopaminergic Neurons through MMP-2/-9-Mediated Increase of Blood-Brain Barrier Permeability in a Parkinson's Disease Mouse

---

Model. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 3;23(5):2793. doi: 10.3390/ijms23052793. PMID: 35269933; PMCID: PMC8910886.

<sup>332</sup> Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, Shubayev V. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun.* 2007 Jul;21(5):561-8. doi: 10.1016/j.bbi.2006.10.015. Epub 2006 Dec 26. PMID: 17189680; PMCID: PMC2865892.

<sup>333</sup> Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia.* 2010 Jul;58(9):1017-30. doi: 10.1002/glia.20983. PMID: 20468046; PMCID: PMC2919281.

<sup>334</sup> He Y, Gao Y, Zhang Q, Zhou G, Cao F, Yao S. IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. *Neuroscience.* 2020 Jun 15; 437:161-171. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.008. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32224230.

<sup>335</sup> Shemer A, Scheyltjens I, Frumer GR, Kim JS, Grozovski J, Ayanaw S, Dassa B, Van Hove H, Chappell-Maor L, Boura-Halfon S, Leshkowitz D, Mueller W, Maggio N, Movahedi K, Jung S. Interleukin-10 Prevents Pathological Microglia Hyperactivation following Peripheral Endotoxin Challenge. *Immunity.* 2020 Nov 17;53(5):1033-1049.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2020.09.018. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33049219.

<sup>336</sup> Mitchell K, Shah JP, Tsytsikova LV, Campbell AM, Affram K, Symes AJ. LPS antagonism of TGF- $\beta$  signaling results in prolonged survival and activation of rat primary microglia. *J Neurochem.* 2014 Apr;129(1):155-68. doi: 10.1111/jnc.12612. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24251648

<sup>337</sup> Chan A, Magnus T, Gold R. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia.* 2001 Jan;33(1):87-95. doi: 10.1002/1098-1136(20010101)33:1<87: aid-glia1008>3.0.co;2-s. PMID: 11169794.

<sup>338</sup> Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology.* 2019 Dec 15; 161:107559. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.002. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30851309; PMCID: PMC6731169.

- 
- <sup>339</sup> Persson M, Rönnbäck L. Microglial self-defence mediated through GLT-1 and glutathione. *Amino Acids*. 2012 Jan;42(1):207-19. doi: 10.1007/s00726-011-0865-7. Epub 2011 Mar 5. PMID: 21373770.
- <sup>340</sup> Maderspach K, Solomon R. Glial and neuronal opioid receptors: apparent positive cooperativity observed in intact cultured cells. *Brain Res*. 1988 Feb 16;441(1-2):41-7. doi: 10.1016/0006-8993(88)91381-9. PMID: 2834005.
- <sup>341</sup> Nordberg G, Hedner T, Mellstrand T, Dahlström B. Pharmacokinetic aspects of intrathecal morphine analgesia. *Anesthesiology*. 1984 May;60(5):448-54. doi: 10.1097/0000542-198405000-00010. PMID: 654683
- <sup>342</sup> McQuay HJ, Sullivan AF, Smallman K, Dickenson AH. Intrathecal opioids, potency and lipophilicity. *Pain*. 1989 Jan;36(1):111-115. doi: 10.1016/0304-3959(89)90118-8. PMID: 2537486.
- <sup>343</sup> Moore A, Bullingham R, McQuay H, Allen M, Baldwin D, Cole A. Spinal fluid kinetics of morphine and heroin. *Clin Pharmacol Ther*. 1984 Jan;35(1):40-5. doi: 10.1038/clpt.1984.6. PMID: 6546305.
- <sup>344</sup> Gustafsson LL, Wiesenfeld-Hallin Z. Spinal opioid analgesia. A critical update. *Drugs*. 1988 Jun;35(6):597-603. doi: 10.2165/00003495-198835060-00001. PMID: 3048973.
- <sup>345</sup> Tangen K, Nestorov I, Verma A, Sullivan J, Holt RW, Linninger AA. In Vivo Intrathecal Tracer Dispersion in Cynomolgus Monkey Validates Wide Biodistribution Along Neuraxis. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2020 Apr;67(4):1122-1132. doi: 10.1109/TBME.2019.2930451. Epub 2019 Jul 23. PMID: 31352328.
- <sup>346</sup> Gourlay GK, Cherry DA, Plummer JL, Armstrong PJ, Cousins MJ. The influence of drug polarity on the absorption of opioid drugs into CSF and subsequent cephalad migration following lumbar epidural administration: application to morphine and pethidine. *Pain*. 1987 Dec;31(3):297-305. doi: 10.1016/0304-3959(87)90159-X. PMID: 3696748.
- <sup>347</sup> Slappendel R, Weber EW, Dirksen R, Gielen MJ, van Limbeek J. Optimization of the dose of intrathecal morphine in total hip surgery: a dose-finding study. *Anesth Analg*. 1999 Apr;88(4):822-6. doi: 10.1097/0000539-199904000-00026. PMID: 10195531.
- <sup>348</sup> Sjöström S, Tamsen A, Persson MP, Hartvig P. Pharmacokinetics of intrathecal morphine and meperidine in humans. *Anesthesiology*. 1987 Dec;67(6):889-95. doi: 10.1097/0000542-198712000-00003. PMID: 2891329.

- 
- <sup>349</sup> Bernards CM. Recent insights into the pharmacokinetics of spinal opioids and the relevance to opioid selection. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2004 Oct;17(5):441-7. doi: 10.1097/00001503-200410000-00015. PMID: 17023903.
- <sup>350</sup> De Andres J, Hayek S, Perruchoud C, Lawrence MM, Reina MA, De Andres-Serrano C, Rubio-Haro R, Hunt M, Yaksh TL. Intrathecal Drug Delivery: Advances and Applications in the Management of Chronic Pain Patient. *Front Pain Res (Lausanne)*. 2022 Jun 16; 3:900566. doi: 10.3389/fpain.2022.900566. Erratum in: *Front Pain Res (Lausanne)*. 2023 Apr 11; 4:1190014. doi: 10.3389/fpain.2023.1190014. PMID: 35782225; PMCID: PMC9246706.
- <sup>351</sup> Herz A, Teschemacher H. Activities and sites of antinociceptive action of morphine – like analgesics and kinetics of distribution following intravenous, intracerebral and intraventricular application. In Simmonds A (ed). *Advances in Drug Research*, pp 79 – 117. London: Academic Press, 1971
- <sup>352</sup> Palmer CM, Cork RC, Hays R, Van Maren G, Alves D. The dose-response relation of intrathecal fentanyl for labor analgesia. *Anesthesiology*. 1998 Feb;88(2):355-61. doi: 10.1097/00000542-199802000-00014. PMID: 9477056.
- <sup>354</sup> Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Jul;5(7):565-75. doi: 10.1038/nrn1431. PMID: 15208698.
- <sup>355</sup> Gouardères C, Cros J, Quirion R. Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. *Neuropeptides*. 1985 Jul;6(4):331-42. doi: 10.1016/0143-4179(85)90006-x. PMID: 2995864.
- <sup>356</sup> Morris BJ, Herz A. Distinct distribution of opioid receptor types in rat lumbar spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1987 Aug;336(2):240-3. doi: 10.1007/BF00165811. PMID: 2825045.
- <sup>357</sup> Lamotte C, Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor binding in primate spinal cord: distribution and changes after dorsal root section. *Brain Res*. 1976 Aug 13;112(2):407-12. doi: 10.1016/0006-8993(76)90296-1. PMID: 821584.
- <sup>358</sup> Kemp T, Spike RC, Watt C, Todd AJ. The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*. 1996 Dec;75(4):1231-8. doi: 10.1016/0306-4522(96)00333-8. PMID: 8938756.
- <sup>359</sup> Zieglgänsberger W, Bayerl H. The mechanism of inhibition of neuronal activity by opiates in the spinal cord of cat. *Brain Res*. 1976 Oct 8;115(1):111-28. doi: 10.1016/0006-8993(76)90826-x. PMID: 974735.

- 
- <sup>360</sup> Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. 1995 Oct 12;377(6549):532-5. doi: 10.1038/377532a0. PMID: 7566152.
- <sup>361</sup> Jacobsen JH, Watkins LR, Hutchinson MR. Discovery of a novel site of opioid action at the innate immune pattern-recognition receptor TLR4 and its role in addiction. *Int Rev Neurobiol*. 2014; 118:129-63. doi: 10.1016/B978-0-12-801284-0.00006-3. PMID: 25175864.
- <sup>362</sup> Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM. Pre- and postsynaptic location of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord. *Prog Clin Biol Res*. 1990; 328:183-6. PMID: 2154777.
- <sup>363</sup> Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40:389-430. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.389. PMID: 10836142.
- <sup>364</sup> Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol*. 1999 Aug 1;518 (Pt 3) (Pt 3):803-13. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0803p.x. PMID: 10420016; PMCID: PMC2269468.
- <sup>365</sup> Kondo I, Marvizon JC, Song B, Salgado F, Codeluppi S, Hua XY, Yaksh TL. Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *J Neurosci*. 2005 Apr 6;25(14):3651-60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0252-05.2005. PMID: 15814796; PMCID: PMC6725388.
- <sup>366</sup> Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 1984; 7:309-38. doi: 10.1146/annurev.ne.07.030184.001521. PMID: 6143527.
- <sup>367</sup> Machelska H, Celik MÖ. Opioid Receptors in Immune and Glial Cells- Implications for Pain Control. *Front Immunol*. 2020 Mar 4; 11:300. doi: 10.3389/fimmu.2020.00300. PMID: 32194554; PMCID: PMC7064637.
- <sup>368</sup> Trang T, Al-Hasani R, Salvemini D, Salter MW, Gutstein H, Cahill CM. Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *J Neurosci*. 2015 Oct 14;35(41):13879-88. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2711-15.2015. PMID: 26468188; PMCID: PMC4604226.
- <sup>369</sup> Bannister K, Dickenson AH. Central Nervous System Targets: Supraspinal Mechanisms of Analgesia. *Neurotherapeutics*. 2020 Jul;17(3):839-845. doi: 10.1007/s13311-020-00887-6. PMID: 32700132; PMCID: PMC7609795

- 
- <sup>370</sup> Liem L, van Dongen E, Huygen FJ, Staats P, Kramer J. The Dorsal Root Ganglion as a Therapeutic Target for Chronic Pain. *Reg Anesth Pain Med*. 2016 Jul-Aug;41(4):511-9. doi: 10.1097/AAP.0000000000000408. PMID: 27224659.
- <sup>371</sup> Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL. Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J Neurosci*. 1994 Oct;14(10):5903-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-10-05903.1994. PMID: 7931552; PMCID: PMC6577010.
- <sup>372</sup> E.E. Johnson, D.G. Lambert, Molecular pharmacology of the opioid/nociceptin system, *Current Anaesthesia & Critical Care*, Volume 13, Issue 6, 2002, Pages 305-312, ISSN 0953-7112,
- <sup>373</sup> Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*. 2008 Jan;117(1):141-61. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.09.003. Epub 2007 Sep 22. PMID: 17959251; PMCID: PMC2965406.
- <sup>374</sup> Vergne-Salle P, Beaulieu P, Coutaux S, Sichère A, Perrot S, Bertin P. Traitements de la douleur en rhumatologie. *Appareil locomoteur*, 2014-10-01, Volume 28, Numéro 4, Pages 1-18,
- <sup>375</sup> Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028. PMID: 19837031; PMCID: PMC2852643.
- <sup>376</sup> Malan TP Jr, Ibrahim MM, Lai J, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Feb;3(1):62-7. doi: 10.1016/s1471-4892(02)00004-8. PMID: 12550743.
- <sup>377</sup> Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, which binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun 29;50(1):83-90. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-d. PMID: 7605349.
- <sup>378</sup> Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):3662-5. doi: 10.1073/pnas.061029898. Epub 2001 Mar 20. PMID: 11259648; PMCID: PMC31108.

- 
- <sup>379</sup> Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Jun;301(3):1020-4. doi: 10.1124/jpet.301.3.1020. PMID: 12023533.
- <sup>380</sup> Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):8400-5. doi: 10.1073/pnas.122196999. PMID: 12060783; PMCID: PMC123079.
- <sup>381</sup> LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Dec;319(3):1051-61. doi: 10.1124/jpet.106.111385. Epub 2006 Sep 22. PMID: 16997973.
- <sup>382</sup> Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today.* 2010 Jun;15(11-12):474-83. doi: 10.1016/j.drudis.2010.03.007. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20304091.
- <sup>383</sup> Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, De Simone C, Rapino C, Dainese E, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Mar;65(5):840-50. doi: 10.1007/s00018-008-7494-7. PMID: 18213445; PMCID: PMC11131627.
- <sup>384</sup> Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002 Feb-Mar;66(2-3):101-21. doi: 10.1054/plaf.2001.0341. PMID: 12052030.
- <sup>385</sup> Ibsen MS, Connor M, Glass M. Cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> Receptor Signaling and Bias. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017 Mar 1;2(1):48-60. doi: 10.1089/can.2016.0037. PMID: 28861504; PMCID: PMC5436336.
- <sup>386</sup> Hiley CR, Kaup SS. GPR55 and the vascular receptors for cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(5):559-61. doi: 10.1038/sj.bjp.0707421. Epub 2007 Aug 20. PMID: 17704825; PMCID: PMC2190021.
- <sup>387</sup> Holzer P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *Br J Pharmacol.* 2008 Dec;155(8):1145-62. doi: 10.1038/bjp.2008.351. Epub 2008 Sep 22. PMID: 18806809; PMCID: PMC2607216.

- 
- <sup>388</sup> Fowler CJ, Jacobsson SO. Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide--targets for drug development? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002 Feb-Mar;66(2-3):193-200. doi: 10.1054/plf.2001.0357. PMID: 12052035.
- <sup>389</sup> Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 1997 Aug 22;277(5329):1094-7. doi: 10.1126/science.277.5329.1094. PMID: 9262477.
- <sup>390</sup> Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 14;106(15):6375-80. doi: 10.1073/pnas.0901515106. Epub 2009 Mar 23. PMID: 19307565; PMCID: PMC2669397.
- <sup>391</sup> Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996 Nov 7;384(6604):83-7. doi: 10.1038/384083a0. PMID: 8900284.
- <sup>392</sup> Schmid PC, Reddy PV, Natarajan V, Schmid HH. Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J Biol Chem*. 1983 Aug 10;258(15):9302-6. PMID: 6308001.
- <sup>393</sup> Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*. 2007 Dec;14(12):1347-56. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.006. PMID: 18096503; PMCID: PMC2692834.
- <sup>394</sup> Hermanson DJ, Gamble-George JC, Marnett LJ, Patel S. Substrate-selective COX-2 inhibition as a novel strategy for therapeutic endocannabinoid augmentation. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Jul;35(7):358-67. doi: 10.1016/j.tips.2014.04.006. Epub 2014 May 18. PMID: 24845457; PMCID: PMC4074568.
- <sup>395</sup> Twitchell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 1997 Jul;78(1):43-50. doi: 10.1152/jn.1997.78.1.43. PMID: 9242259.
- <sup>396</sup> Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*. 1995

---

Oct;15(10):6552-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-10-06552.1995. PMID: 7472417; PMCID: PMC6578016.

<sup>397</sup> Glass M, Northup JK. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB (1) and CB (2) receptors. *Mol Pharmacol*. 1999 Dec;56(6):1362-9. doi: 10.1124/mol.56.6.1362. PMID: 10570066.

<sup>398</sup> Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):53-79. doi: 10.1007/3-540-26573-2\_2. PMID: 16596771.

<sup>399</sup> Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):161-202. doi: 10.1124/pr.54.2.161. PMID: 12037135.

<sup>400</sup> Qian Y, Wang J, Yang L, Liu Y, Wang L, Liu W, Lin Y, Yang H, Ma L, Ye S, Wu S, Qiao A. Activation and signaling mechanism revealed by GPR119-G<sub>s</sub> complex structures. *Nat Commun*. 2022 Nov 17;13(1):7033. doi: 10.1038/s41467-022-34696-6. PMID: 36396650; PMCID: PMC9671963.

<sup>401</sup> Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007 Dec;152(7):1092-101. doi: 10.1038/sj.bjp.0707460. Epub 2007 Sep 17. PMID: 17876302; PMCID: PMC2095107.

<sup>402</sup> Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM. Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Res Rev*. 2009 Apr;60(1):2-23. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.018. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19203589; PMCID: PMC2683630.

<sup>403</sup> Graham ES, Ball N, Scotter EL, Narayan P, Dragunow M, Glass M. Induction of Krox-24 by endogenous cannabinoid type 1 receptors in Neuro2A cells is mediated by the MEK-ERK MAPK pathway and is suppressed by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):29085-95. doi: 10.1074/jbc.M602516200. Epub 2006 Jul 24. PMID: 16864584.

<sup>404</sup> Sideris A, Lauzadis J, Kaczocha M. The Basic Science of Cannabinoids. *Anesth Analg*. 2024 Jan 1;138(1):42-53. doi: 10.1213/ANE.0000000000006472. Epub 2023 Dec 15. PMID: 38100799; PMCID: PMC10788142.

- 
- <sup>405</sup> Mackie K, Devane WA, Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol*. 1993 Sep;44(3):498-503. PMID: 8371711.
- <sup>406</sup> Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 May;273(2):734-43. PMID: 7538581.
- <sup>407</sup> Poling JS, Rogawski MA, Salem N Jr, Vicini S. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Neuropharmacology*. 1996;35(7):983-91. doi: 10.1016/0028-3908(96)00130-x. PMID: 8938728.
- <sup>408</sup> Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Nov;4(11):873-84. doi: 10.1038/nrn1247. PMID: 14595399.
- <sup>409</sup> Huang CC, Lo SW, Hsu KS. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol*. 2001 May 1;532(Pt 3):731-48. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0731e.x. PMID: 11313442; PMCID: PMC2278571.
- <sup>410</sup> Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M. Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*. 2002;110(4):755-64. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00584-x. PMID: 11934482.
- <sup>411</sup> Ma L, Jia J, Niu W, Jiang T, Zhai Q, Yang L, Bai F, Wang Q, Xiong L. Mitochondrial CB1 receptor is involved in ACEA-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Sci Rep*. 2015 Jul 28; 5:12440. doi: 10.1038/srep12440. PMID: 26215450; PMCID: PMC4516969.
- <sup>412</sup> Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*. 2018 Jan 1;98(1):239-389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016. PMID: 29351512; PMCID: PMC6050349.
- <sup>413</sup> Fasia L, Karava V, Siafaka-Kapadai A. Uptake and metabolism of [3H] anandamide by rabbit platelets. Lack of transporter? *Eur J Biochem*. 2003 Sep;270(17):3498-506. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03724.x. PMID: 12919314.
- <sup>414</sup> Kaczocha M, Haj-Dahmane S. Mechanisms of endocannabinoid transport in the brain. *Br J Pharmacol*. 2022 Sep;179(17):4300-4310. doi: 10.1111/bph.15469. Epub 2021 May 27. PMID: 33786823; PMCID: PMC8481389.

- 
- <sup>415</sup> Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, Rapino C, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem Biol*. 2009 Jun 26;16(6):624-32. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.05.004. Epub 2009 May 29. PMID: 19481477.
- <sup>416</sup> Plau J, Golczak M, Paik J, Calderon RM, Blaner WS. Retinol-binding protein 2 (RBP2): More than just dietary retinoid uptake. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022 Aug;1867(8):159179. doi: 10.1016/j.bbalip.2022.159179. Epub 2022 May 6. PMID: 35533980; PMCID: PMC9191623.
- <sup>417</sup> Elmes MW, Kaczocha M, Berger WT, Leung K, Ralph BP, Wang L, Sweeney JM, Miyauchi JT, Tsirka SE, Ojima I, Deutsch DG. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *J Biol Chem*. 2015 Apr 3;290(14):8711-21. doi: 10.1074/jbc.M114.618447. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25666611; PMCID: PMC4423662.
- <sup>418</sup> Liedhegner ES, Vogt CD, Sem DS, Cunningham CW, Hillard CJ. Sterol carrier protein-2: binding protein for endocannabinoids. *Mol Neurobiol*. 2014 Aug;50(1):149-58. doi: 10.1007/s12035-014-8651-7. Epub 2014 Feb 9. PMID: 24510313; PMCID: PMC4450258.
- <sup>419</sup> Fowler CJ. Has FLAT fallen flat? *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Feb;35(2):51-2. doi: 10.1016/j.tips.2013.12.003. Epub 2014 Jan 4. PMID: 24398120.
- <sup>420</sup> Harrison C, Traynor JR. The [35S] GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci*. 2003 Dec 12;74(4):489-508. doi: 10.1016/j.lfs.2003.07.005. PMID: 14609727.
- <sup>421</sup> Ramírez-Pacheco A, Moreno-Guerrero SS, Medina-Sanson A. Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2013 My;12 (3):162-173.

## **13. ANEXOS**

---



## 13.1. Artículo 1

- Carrascosa AJ, Navarrete F, Saldaña R, García-Gutiérrez MS, Montalbán B, Navarro D, Gómez-Guijarro FM, Gasparyan A, Murcia-Sánchez E, Torregrosa AB, Pérez-Doblado P, Gutiérrez L, Manzanares J. **Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality.** *Int J Mol Sci.* 2024 Jun 6;25(11):6268. doi: 10.3390/ijms25116268. PMID: 38892456; PMCID: PMC11172912.



Review

### Cannabinoid Analgesia in Postoperative Pain Management: From Molecular Mechanisms to Clinical Reality

Antonio J. Carrascosa <sup>1</sup>, Francisco Navarrete <sup>2,3,4</sup>, Raquel Saldaña <sup>1</sup>, María S. García-Gutiérrez <sup>2,3,4</sup>, Belinda Montalbán <sup>1</sup>, Daniela Navarro <sup>2,3,4</sup>, Fernando M. Gómez-Guijarro <sup>1</sup>, Ani Gasparyan <sup>2,3,4</sup>, Elena Murcia-Sánchez <sup>1</sup>, Abraham B. Torregrosa <sup>2,3,4</sup>, Paloma Pérez-Doblado <sup>1</sup>, Luisa Gutiérrez <sup>2,3,4</sup> and Jorge Manzanares <sup>2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Anestesiología y Reanimación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda. Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain; acarras3@hotmail.com (A.J.C.); rasalca@gmail.com (R.S.); belinda.montalban@gmail.com (B.M.); fernando\_guijarro@yahoo.es (F.M.G.-G.); emurcias@gmail.com (E.M.-S.); pdoblado1@hotmail.com (P.P.-D.)

<sup>2</sup> Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain; fnavarrete@umh.es (F.N.); maria.ggutierrez@umh.es (M.S.G.-G.); dnavarro@umh.es (D.N.); agasparyan@umh.es (A.G.); a.bailen@umh.es (A.B.T.); luisa.gutierrez@umh.es (L.G.)

<sup>3</sup> Redes de Investigación Cooperativa Orientada a Resultados en Salud (RICORS), Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones (RIAPAd), Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, 28029 Madrid, Spain

<sup>4</sup> Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), 03010 Alicante, Spain

\* Correspondence: jmanzanares@umh.es



## ABSTRACT

Postoperative pain (POP) is a challenging clinical phenomenon that affects the majority of surgical patients and demands effective management to mitigate adverse outcomes such as persistent pain. The primary goal of POP management is to alleviate suffering and facilitate a seamless return to normal function for the patient. Despite compelling evidence of its drawbacks, opioid analgesia remains the basis of POP treatment. Novel therapeutic approaches rely on multimodal analgesia, integrating different pharmacological strategies to optimize efficacy while minimizing adverse effects. The recognition of the imperative role of the endocannabinoid system in pain regulation has prompted the investigation of cannabinoid compounds as a new therapeutic avenue. Cannabinoids may serve as adjuvants, enhancing the analgesic effects of other drugs and potentially replacing or at least reducing the dependence on other long-term analgesics in pain management. This narrative review succinctly summarizes pertinent information on the molecular mechanisms, clinical therapeutic benefits, and considerations associated with the plausible use of various cannabinoid compounds in treating POP. According to the available evidence, cannabinoid compounds modulate specific molecular mechanisms intimately involved in POP. However, only two of the eleven clinical trials that evaluated the efficacy of different cannabinoid interventions showed positive results.

**Keywords:** cannabinoid; analgesia; postoperative pain

## CONTENTS

1. Introduction
2. Cannabinoids and Therapeutic Potential in Pain Relief
  - 2.1. Phytocannabinoids
  - 2.2. Endocannabinoids
  - 2.3. Synthetic Cannabinoids
3. Molecular Mechanisms Underlying Analgesic Effects of Cannabinoids
4. Why Consider the Therapeutic Potential of Cannabinoids in Postoperative Pain Relief?
  - 4.1. Activation of the ECS after Surgery
  - 4.2. Cannabinoids Themselves Possess Analgesic Properties
  - 4.3. Opioids—Cannabinoids
  - 4.4. NSAIDs—Cannabinoids
  - 4.5. Paracetamol—Cannabinoids
  - 4.6. Local Anesthetics—Cannabinoids
  - 4.7.  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptors—Cannabinoids
5. Cautions and Limitations of Using Cannabinoids for Postoperative Pain Relief
  - 5.1. Which Product Is Suitable for Postoperative Pain Control?
  - 5.2. Pharmacokinetic Considerations and Routes of Administration of Cannabinoids in Postoperative Pain Relief
  - 5.3. Potential Interactions of Cannabinoids in Postoperative Pain Relief
  - 5.4. Acute Adverse Effects of Cannabinoids
  - 5.5. Patients with a History of Cannabinoid Use
  - 5.6. Contraindications
6. Clinical Trials Evaluating Cannabinoids for Postoperative Pain
7. Possible Explanations for the Lack of Analgesic Efficacy in Postoperative Pain Relief
8. Future Perspectives and Conclusions
9. Figures and tables
10. References



## 1. Introduction

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with, or similar to, actual or potential tissue damage [1]. It can be classified into two main categories based on the neurophysiological mechanisms underlying its origin: nociceptive pain, which arises from the activation of nociceptors in response to tissue damage caused by physical or chemical agents like trauma, chemical burns, or surgical procedures [2], and neuropathic pain, which results from direct damage or dysfunction of the sensory nerves [3]. Postoperative pain (POP) is a unique entity that necessitates prompt and effective alleviation to minimize suffering, facilitate the healing process and rehabilitation, and prevent complications. It is not solely attributable to inflammation or isolated nerve injury; its pathophysiology is unique, with specific consequences [4,5]. As a result, the response to analgesic treatment differs from other pain models.

To date, opioids remain a mainstay of perioperative pain management, employed for sedation during general anesthesia, supplementation during regional anesthesia, and the treatment of acute postoperative pain [6–8]. However, despite their numerous benefits, opioids are associated with a well-documented adverse effect profile that can impede recovery and the resumption of daily activities. Moreover, the escalating rates of opioid consumption and misuse in the United States have reached epidemic proportions over the past decade [9,10]. Additionally, balancing adequate postoperative pain relief while mitigating the risk of overdose or relapse is challenging, particularly as a growing number of surgical patients exhibit opioid tolerance, such as those with chronic pain conditions [11]. Therefore, the effectiveness of opioids for pain management during the perioperative period is undergoing reevaluation [12].

The search for drugs that offer advantages over existing prescriptions is a fundamental goal of pharmacological research in managing POP. Thus, it is interesting to study families of analgesics with new mechanisms of action, high potency, and minimal undesirable effects. The incorporation of non-opioid adjuvant medications into a perioperative pain management plan can not only potentially enhance patient outcomes but also serve as a critical component in minimizing opioid utilization and potentially mitigating the downstream risk of opioid misuse and dependence.

In this context, there has been a renewed interest in cannabinoids, a class of compounds with a historical precedent for pain management dating back to the 19th century [13]. This resurgence can be attributed to the discovery of cannabinoid receptors [8,14] and endogenous substances that modulate these receptors [15,16], despite the inherent challenges in studying substances prone to abuse which are thus subject to stringent legislative control [17]. Arguments supporting their use include the following: (1) there is evidence of activation of the ECS after surgery [18,19]; (2) cannabinoids are analgesics per se; and (3) they are substances that can act as adjuvants to facilitate the analgesic action of other drugs. Nevertheless, despite experimental evidence demonstrating their antinociceptive efficacy, clinical outcomes have been constrained by the short duration of studies, small sample sizes, absence of control groups, and biases prevalent in most conducted studies.

This review examines the current scientific evidence regarding the use of cannabis for the treatment of acute POP. Its interest lies in the fact that the etiology and treatment of pain produced by surgery are different from those of other painful conditions. Effective and rapid pain management is crucial to minimizing patient suffering and mitigating the complex physiological stress response triggered by surgery.

## 2. Cannabinoids and Therapeutic Potential in Pain Relief

Cannabinoids are a group of chemical substances derived from the cannabis plant, the endogenous cannabinoid system, or synthetic production that bind to varying degrees to cannabinoid receptors, including cannabinoid receptor type 1 (CB1r) [15,20–23] and type 2 (CB2r) [15,24–32]. This group of substances is extensive and diverse and can be classified in several ways. According to their origin, we distinguish three types of cannabinoids (**Figure 1**): (1) phytocannabinoids (naturally derived from plants); (2) endocannabinoids (endogenous cannabinoids); and (3) synthetic cannabinoids (artificially produced phytocannabinoids).

### 2.1. Phytocannabinoids

Phytocannabinoids are compounds characterized by a carbocyclic structure whose central ring is usually tetrahydropyran and by two chiral centers [33]. These compounds are produced naturally in the trichomes of the hemp plant (*Cannabis sativa*) to protect it against pests and the effects of the environment [34,35]. This plant is a tall annual shrub that grows naturally in temperate and tropical regions. It has been extensively utilized for medicinal purposes for millennia in various parts of Asia, particularly in India and China [36–38]. The resin extracted from the plant is known as hashish, while the name “marijuana” is attributed to the preparation of dried leaves and flowers of the plant.

More than 100 phytocannabinoids have been described, including their acid and neutral forms, analogs, and other transformation products [33,39]. The primary cannabinoids are D9-tetrahydrocannabinol (delta-9-THC or THC), 8-tetrahydrocannabinol (8THC), cannabidiol (CBD), and cannabinol (CBN). Additionally, the plant contains other cannabinoids such as cannabichromene (CBC), cannabicyclol (CBL), cannabigerol (CBG), cannabigerol monomethyl ether (CBGM), cannabielsoin (CBE), cannabinodiol (CBND), cannabitriol (CBT), dehydrocannabifuran, and cannabicitran. The presence and quantities of these cannabinoids vary depending on the specific variety of *Cannabis sativa* being assessed [40]. It is interesting to note that *Cannabis sativa* synthesizes phytocannabinoids exclusively in their non-psychoactive acidic forms. Notably, the carboxyl group attached to these precursors is unstable and readily decarboxylates, releasing CO<sub>2</sub> under heat or light exposure. This decarboxylation process transforms acidic cannabinoids into active neutral forms [41,42]. Furthermore, the relative abundance of each phytocannabinoid within the plant is significantly influenced by several factors, including growing conditions and extraction methods [19]. Additionally, cannabis has a complex botanical composition that encompasses over 200 terpenes and terpenoids. These terpenoids possess diverse pharmacological properties and have been linked to various therapeutic effects [43].

#### Phytocannabinoids and Pain Relief

THC remains the most extensively researched phytocannabinoid due to its potent psychoactive properties [44] and well-documented antinociceptive effects [45]. However, at higher doses, THC can induce intoxication. Despite this limitation, clinical trials generally support the efficacy of THC in managing chronic pain [46–48].

There are conflicting opinions in the literature regarding the use of phytocannabinoids for pain relief: (1) cannabis has been employed for medicinal purposes for millennia and the combination of its phytocannabinoids is more effective than currently available cannabinoid drugs. In this regard, emerging evidence suggests that herbal cannabis exhibits analgesic effects in both nociceptive and neuropathic pain. Notably, at least five high-quality randomized controlled clinical trials (RCTs) have demonstrated the efficacy of smoked cannabis in achieving pain relief [49–54]. (2) There is accumulating evidence and ongoing research for addressing common symptoms and conditions linked to pain, such as spasticity associated with multiple sclerosis or stroke [55,56], anxiety and

posttraumatic stress disorder [57], migraine [58], nausea and vomiting [59], cachexia, inflammatory bowel diseases [60], and sleep disturbance [61,62]. (3) Cannabis has little capacity to cause overdose and is associated with lower rates of addiction compared to opioid analgesics. (4) Cannabis cultivation and production are relatively cost-effective. In contrast, there are detractors to the use of phytocannabinoids based on the following: (a) Herbal cannabis presents a complex chemical composition with significant variability and incomplete characterization, posing challenges for standardized dosing and consistent prediction of effects. Notably, cannabinoids can exhibit a spectrum of actions, sometimes even opposing effects, depending on several factors. These factors include the specific compound under investigation, its enantiomeric form, the plant species utilized in the study, and the patient's overall health status [63–65]. As a result, it fails to meet the FDA criteria for drug approval. (b) Widespread recreational cannabis use raises concerns for potential individual and public health risks [66,67].

Consequently, there is an inherent risk that the availability of cannabis as a medicinal product will lead to increased accessibility and associated damage. (c) Only a small number of patients can achieve satisfactory clinical management; the advocacy for medical cannabis forms part of a well-structured and funded strategy to legalize cannabis for general use. (d) Inhaled cannabis via combustion methods, such as smoking, may present health risks due to the generation of harmful by-products. Thus, although inhaled cannabinoids produce bronchodilation, it is essential to note that the combustion of cannabis generates harmful by-products, including carbon monoxide, bronchial irritants, and potential carcinogens—the tar in a cannabis cigarette contains even higher concentrations of benzenanthracenes and benzopyrenes [68]. Furthermore, some studies indicate that smoking cannabis, due to its consumption through deep and prolonged inhalations without a filter and higher combustion temperature than tobacco, may result in a fivefold elevation in carboxyhemoglobin levels and a threefold increase in tar intake compared to tobacco cigarettes [69].

## 2.2. Endocannabinoids

Endocannabinoids (eCBs) are endogenous signaling molecules naturally produced by all vertebrate animals, including humans. These lipid mediators are predominantly within the central nervous system (CNS) [70–72]. Additionally, eCBs are found in cells of the immune and reproductive systems, highlighting their diverse physiological roles [73,74]. These substances, consisting essentially of fatty acids derived from arachidonic acid (AA) metabolism, are critical regulators of various physiological processes, particularly within the CNS. They act as vital stress response regulators, aiding in adaptation or habituation to stress, guarding against the onset of stress-related illnesses and dysfunctions, and ultimately, promoting survival. They achieve this by interacting with autonomic, endocrine, and immune processes and sensory signaling mechanisms [75,76] (**Figure 2**). In addition, eCBs have been implicated in many behavioral processes, including memory [77,78], emotional state [79,80], feeding [81], inflammation [82,83], hemodynamic response [84,85], energy metabolism [86,87], pregnancy [88,89], and nociception [90–92]. Moreover, they also modulate the proliferation, motility, adhesion, and apoptosis of cells [93,94].

Our understanding of the endocannabinoid system (ECS) has grown significantly since the discovery of the first eCBs, anandamide (N-arachidonylethanolamine, AEA) [15] followed by 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) [16], both considered the primary players. These lipid mediators derived from arachidonic acid (AA) have cannabis-like effects. Further exploration has revealed additional eCBs within the brain, including the ether-linked 2-arachidonoyl-glycerol ether (noladin ether), the AA ethanolamine derivative virodhamine, and N-arachidonoyldopamine (NADA). Notably, NADA acts primarily as a transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) agonist but also exhibits some activity at the CB1r. Additionally, structurally related compounds such as N-acylethanolamines (e.g., N-oleoyl ethanolamine (OEA) and N-palmitoyl ethanolamine (PEA)) and 2-oleoylglycerols (e.g., 2-oleoyl-glycerol and 2-linoleoyl-glycerol) are widely distributed in both the CNS and periphery, forming part of the expanded ECS. Nevertheless, their endocannabinoid classification remains contentious due

to their lack of affinity for CB1r and CB2r [95–97]. eCBs are synthesized on demand, meaning they are not stored pre-formed within cells for later release. Following their release, their biological effects are rapidly terminated by cellular uptake and/or subsequent enzymatic degradation [98]. However, accumulated evidence mainly from pharmacological studies strongly suggests that there must be a maintained cannabinoid tone with a continuous release of endogenous ligands [99]. It is worth mentioning that eCBs are synthesized from membrane precursors, and the degradation products of eCBs serve as precursors for eicosanoids. Consequently, eCB signaling is integrated into a lipid metabolism and signaling network. Therefore, altering the activity of enzymes involved in eCB synthesis and degradation may also affect other lipid signaling systems [100].

Similarly, the distinct distribution patterns of enzymes responsible for eCBs synthesis and degradation throughout the cell and its compartments suggest diverse functional roles for these molecules [101]. Moreover, AEA and 2-AG exhibit distinct pharmacological profiles, interacting with CB1r and CB2r and other receptors like TRPV1 and GABAA [102,103]. Additionally, endogenous peptides known as pepicans or hemopressins can influence biological processes by acting on CB1r and CB2 [104–106].

### Involvement of eCBs in the Regulation of Pain

Endocannabinoids (eCBs) modulate pain perception through a dual mechanism. The first involves the activity-dependent phasic release of eCBs triggered by neuronal activity. The second involves a sustained endogenous eCB tone, elevated in pathophysiological conditions like inflammation [99,107].

The diversity of cannabinoid-mediated signaling, the ligand concentration, the presence of other cannabinoid ligand molecules, and the different distributions of metabolic enzymes influence the response to specific eCBs. In this regard, the pathological state and tissue type significantly affect the levels of eCBs and related compounds [108]. These variations likely arise from the disease-specific alterations in enzymes responsible for eCB metabolism. These enzymes exhibit distinct functions, leading to variable effects on the metabolism of different eCBs and related lipids within the same family. Consequently, the levels of fatty acid amide hydrolase (FAAH), cyclooxygenase (COX), and lipoxygenase (LOX) may vary depending on the pathological condition [100]. Molecular studies have demonstrated modulation of the endocannabinoid system (ECS) following spinal cord injury (SCI), with changes observed during both the acute and chronic phases [108,109]. Specifically, AEA is upregulated during the first week after injury. Similarly, alterations in eCBs have been observed in neuropathic pain across various regions of the pain pathways of ascending and descending pain pathways [110,111].

Notably, CB1r is abundantly expressed in neurons and oligodendrocytes, being the AEA/CB1r system critical for neuronal survival [108,109]. Shifting to the chronic injury phase, two to three weeks after injury, there is an increase in 2-AG, a molecule that can activate both CB1r and CB2r. Furthermore, alongside these endocannabinoid changes, the chronic injury phase also witnesses increased CB2 receptor levels in macrophages and astrocyte-like cells [108,112]. CB2r was first considered a peripheral restricted cannabinoid receptor that could be present in the CNS only under certain pathological conditions [113]. However, since the publication of a study identifying the expression of CB2r in neurons of the brainstem of mice, rats, and ferrets under normal physiological conditions [114], much attention has been paid to the functional role it might play, particularly concerning neuroinflammatory processes [22,115].

At present, the diversity of ECS signaling molecules and their interactions with various receptors, together with the signaling complexity of receptor systems, makes the pharmacological intervention of the ECS a challenging task, containing a considerable degree of unpredictability in the outcome of the biological effects in a whole organism.

### 2.3. Synthetic Cannabinoids

Synthetic cannabinoids are molecules developed in laboratories that interact with cannabinoid receptors, thereby achieving a therapeutic effect [116]. Among these, the phytocannabinoids THC and CBD are available as synthetic compounds for a range of indications, as outlined below. Various pharmaceutical products are available in tablets, capsules, and sprays, which can only be obtained via prescription [117].

Some examples of synthetic cannabinoids are the following: (1) nabilone (Cesamet<sup>®</sup> or Canemes<sup>®</sup>) is a synthetic analog of delta-9-THC with a different molecular structure than THC, which gives it a slightly different interaction with cannabinoid receptors. It is marketed in capsules for oral administration. Cesamet is manufactured by Meda Pharmaceuticals Inc. (Somerset, NJ, USA) and Canemes by AOP Orphan Pharmaceuticals AG (Canonsburg, PA, USA). Its use is approved for the treatment of nausea and vomiting caused by chemotherapy as well as for pain control [118–122]. (2) Dronabinol (Marinol<sup>®</sup>, Adversa<sup>®</sup>, Syndros<sup>®</sup>, and Reduvo<sup>®</sup>) is an oral capsule or oral solution containing a synthetic analog of delta-9-THC prepared in 2.5 mg, 5 mg, or 10 mg. Marinol is produced by AbbVie Inc. (North Chicago, IL, USA) and Syndros by Insys Therapeutics Inc. (Chandler, AZ, USA). Its use has been approved for treating nausea, vomiting, loss of appetite, and weight loss [123,124]. (3) CBD (Epidiolex<sup>®</sup>) is a drug marketed as a viscous oral solution containing CBD as the main active ingredient (100 mg per mL). This medication is indicated for the treatment of seizures in patients with Lennox–Gastaut syndrome, Dravet syndrome, or tuberous sclerosis complex [125,126]. (4) Nabiximol (Sativex<sup>®</sup>) is an oromucosal spray containing approximately a 1:1 combination of THC and CBD extracted from the *Cannabis* plant, delivering 2.7 milligrams of THC and 2.5 milligrams of CBD per dose, manufactured by GW Pharmaceuticals Plc. This oromucosal spray is primarily indicated for managing spasticity associated with multiple sclerosis, particularly in patients who have not responded adequately to other therapies [127,128]. However, there is literature on treating neuropathic pain of different origins [129]. (5) Rimonabant (Acomplia<sup>™</sup> and Zimulti<sup>™</sup>) is a synthetic cannabinoid compound characterized by a CB1r inverse agonism/antagonism mechanism of action and was designed to decrease appetite and promote weight loss in obese patients [130,131]. Despite its effectiveness in achieving the purposes for which it was intended, rimonabant was discontinued, and its sale is currently banned due to its association with depression and suicide attempts.

### 3. Molecular Mechanisms Underlying Analgesic Effects of Cannabinoids

Pain arises from a complex, multi-layered pathway within the nervous system. Sensory information travels from the site of injury through the dorsal horn of the spinal cord and relays to structures of the brainstem and diencephalon, including the thalamus, periaqueductal gray, parabrachial nucleus, reticular formation, amygdala, and hypothalamus, among others [132,133]. This intricate network integrates signals from both tissue damage (nociceptive pain) and dysfunctional brain processing (neuropathic pain) to create the final sensation of pain [134–136]. Likewise, the body activates the endocrine and immune systems to counter aversive stimuli and promote healing [137–139]. These integrated physiological processes culminate in a defensive biological response to injury [140,141].

Consequently, exposure to a repeated noxious stimulus, such as during tissue damage or exposure to too intense stimuli [142], triggers a neuroinflammatory phenomenon associated with an increased response of nociceptors (peripheral sensitization) [143] and increased excitability of the neurons in the spinal cord (central sensitization) [144–146] and in the cortical area (cortical sensitization) [147,148]. This response is mediated by several substances acting through cellular and molecular mechanisms. These mechanisms include the following: (1) significant cellular changes that result in ectopic and/or spontaneous nerve discharges, peripheral, and central hyperexcitability and phenotypic changes in conduction pathways, neurodegeneration, and reorganization of cell morphology; (2) molecular changes, highlighting the accumulation and increased expression of sodium

channels in the periphery, increased activity of glutamate receptors, particularly the NMDA receptor, reduced GABAergic activity, changes in calcium penetration into neurons, and increased cytokines, chemotactic factors, growth factors, and ATP; and (3) changes in the structural and functional activity of neurons at the central and peripheral levels as well as neuroimmune interactions, which become more prominent during inflammatory reactions [135,149–152].

In the case of POP, current research on persistent pain management suggests that it may represent a distinct and common subtype of acute pain, differing from pain arising from antigens, chemical nociception, or neuropathic origin. This distinction in pathophysiology underscores the potential need for tailored treatment approaches for POP compared to other pain conditions. For instance, while spinal N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists effectively alleviate hypersensitivity in various pain models, they often lack efficacy in managing POP [153]. This evidence shows distinct molecular mechanisms at play in different types of pain. Conversely, intrathecal administration of non-NMDA receptor antagonists [154], NK-1 receptor antagonists [155], and cyclooxygenase-1 inhibitors [156] demonstrates promise for treating POP with minimal effects on nerve injury models.

Similarly, the descending facilitatory pathway originating from the rostral ventromedial medulla, known to contribute to behavioral hypersensitivity in inflammatory and neuropathic pain models, appears irrelevant in postincisional pain [157,158]. Interestingly, glial cell activation emerges as a potential factor in the development and persistence of pain after peripheral nerve injury [159]. This highlights the potential of targeting glial and neuronal–glial interactions for novel pain management strategies [160,161].

In this context, cannabinoids exert their antinociceptive effect through interaction with the ECS, a network of lipid-based signaling molecules that includes two G protein-coupled receptors (CB1r and CB2r), eCBs (AEA and 2-AG) which interact with these receptors [99,162], and two significant enzymes regulating the metabolism of eCBs (FAAH, which predominantly degrades AEA, and monoacylglycerol lipase (MAGL), which predominately degrades 2-AG) [110]. As represented in **Figure 3**, ECS components are present in neurons, astrocytes, oligodendrocytes, and microglia. CB1 receptors are predominantly localized to the plasma membrane of neurons, with a smaller population residing in the mitochondria (mCB1r). Presynaptic CB1 receptors regulate neurotransmitter release via a retrograde signaling mechanism. An increase in postsynaptic  $Ca^{2+}$  levels prompts the synthesis of eCBs within the postsynaptic neuron. Subsequently, these eCBs travel back (retrogradely) to the presynaptic terminal, activating CB1 receptors and inhibiting neurotransmitter release.

Therefore, the ECS is crucial in pain management as a critical modulator of synaptic function within the central nervous system (CNS) [99]. This extends their influence beyond pain perception, regulating various neural functions and behaviors within the immune and endocrine systems [75,76]. In this sense, glial cells influenced by the ECS release a spectrum of signaling molecules (chemokines and cytokines) within the CNS. This bidirectional communication between the nervous and immune systems facilitates adaptation or habituation to stress, protects against stress-induced pathologies, and ultimately promotes survival [163–166]. Additionally, the ECS exhibits potent antinociceptive and anti-inflammatory activities through interactions with diverse molecular targets, as demonstrated in *in vivo* studies (see [167,168] for reviews). Moreover, eCBs also significantly regulate hormone production, influencing hypothalamic-releasing factors, pituitary hormones, and peripheral steroidogenesis (see [169] for a review).

Extensive research is ongoing to elucidate the mechanisms and sites of action responsible for cannabinoid analgesia. CB1r and CB2r are prime candidates, with evidence pointing toward their involvement at the peripheral, spinal, and supraspinal levels [115,170]. Like many G protein-coupled receptors (GPCRs), these receptors exhibit remarkable versatility and adaptability. This is evident in their flexible ligand binding, diverse intracellular signaling pathways, ability to form homodimers and heterodimers, and varied subcellular localization throughout the body [171]. Similarly, evidence

suggests that other receptors contribute to ECS signaling [171]. These include orphan G protein-coupled receptors GPR119 [172] and GPR55 [173–176], as well as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) [8,175,177–181]. Moreover, cannabinoids can additionally activate ion channels, particularly TRPV1 receptors. The expression of TRPV1 on sensory nerves is known to mediate inflammatory pain, and TRPV1/CB1 receptor co-expression is enhanced in inflamed tissue [182,183].

Consequently, activating different cannabinoid receptor types and locations leads to varied responses to noxious stimuli [184]. Thus, metabotropic receptors, e.g., CB1r, CB2r, GPR55, and GPR119, are associated with a slower reaction but with a longer-lasting and more far-reaching action by allowing the opening of different channels for a longer time since second messengers can act in cascade (generating the activation of other proteins and substances). Typical intracellular events mediated by Gi/o proteins coupled with CB1r activation include inhibiting most voltage-dependent calcium channels and increasing potassium conductance [185–190]. They also stimulate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway to regulate proliferative and differentiative phenomena [72]. Both phenomena contribute to reducing neuronal excitability and suppressing neurotransmitter release. In this sense, activation of the CB1r inhibits the release of GABA or glutamate and neuropeptide by nerve terminals [191–194]. In the case of the CB2r, the transduction mechanisms coupled to the stimulus of this receptor are similar to those of the CB1r. Therefore, activation of the CB2r leads to inhibitory effects on the adenylate cyclase/AMPC system, as well as stimulation of the mitogen-activated kinase pathway (ERK, JNK, and p38) and the PI3KAkt pathway [195], pathways that are closely related to the processes of cell proliferation and survival and are therefore associated with their modification (**Figure 4**).

In contrast, interaction with ionotropic receptors such as TRPV1 generates rapid, shortlived responses. This suggests that cannabinoid modulation of inward currents through these receptors (ICRs) could activate sensory neurons, potentially leading to nociception (pain perception) [196–198]. However, behavioral studies contradict the potential nociceptive effects suggested by ionotropic receptor activation [196,199,200]. These studies report cannabinoid-induced antihyperalgesia and antinociception, signifying pain reduction at the periphery [168,201,202]. One possible explanation lies in the type of cannabinoid action on these receptors. Unlike full agonists, cannabinoids may only partially activate ICRs,

which is insufficient to trigger nociceptor excitation [199,203,204]. Several studies show that cannabinoids evoke slow, small, inward currents and calcium accumulation, potentially falling below the threshold for pain activation [199,203,204]. Moreover, slow depolarization of nociceptor membrane potentials might lead to the inactivation of voltage-gated channels, which inhibits the generation of action potentials [205].

Notably, cannabinoids also can modulate the release of mediators involved in pain and inflammation. For instance, activation of CB1 receptors on neuronal presynapses reduces cellular activity and consequently diminishes the release of neurotransmitters like dopamine, noradrenaline, serotonin, GABA, and glutamate retrogradely [206–210]. Additionally, cannabinoids influence other biological systems through the control that second messengers may undergo and even through allosteric changes secondary to the insertion of cannabinoids in the cell membrane [211]. Thus, although classic descriptions of eCBs focus on interactions between the nervous and immune systems, recent research emphasizes their regulatory influence on endocrine function. This extends to various hormonal axes, including those controlling gonadal steroid, growth hormone, prolactin, thyroid hormone, and HPA axis activity [212,213].

Furthermore, although eCBs are known for localized action due to their rapid breakdown [164], the ability of cannabinoids to affect pain perception has supraspinal, spinal, and peripheral components within its general strategy of action of a local modulatory system [214]. Direct evidence for supraspinal cannabinoid antinociception has been substantiated by administration of cannabinoid agonists intracerebroventricularly and/or into encephalic structures at minimal doses [215–218],

administration of supraspinally administered cannabinoid antagonists inducing pain [219,220], and electrical stimulation of the rat periaqueductal gray (PAG), as well as formalin injection into the hind paw and increased AEA release in the PAG as determined by microdialysis coupled to liquid chromatography/mass spectrometry [221], respectively. On the other hand, evidence of spinal cannabinoid antinociceptive effects has been obtained through behavioral, neurochemical, and electrophysiological studies using spinal cannabinoid agonists [222,223]. In this case, cannabinoids can act on spinal CB1rs to inhibit capsaicin-sensitive fibers in the dorsal horn and reduce the firing of wide dynamic range (WDR) neurons in response to noxious stimuli [222,224]. Additionally, activation of the spinal CB1r can decrease NMDA receptor activation by potentially inhibiting glutamate release into the spinal cord [225], and activation of CB2r suppresses activity in spinal nociceptive neurons, particularly under conditions of sensitization, and regulates the immune response, favoring the neuroprotective actions of neuroglia [226,227].

Furthermore, cannabinoids may modulate spinal noradrenergic and opioid systems [228,229]. Concerning the peripheral component, the antinociceptive action of CBr has been demonstrated in different pain models by peripherally administering CB1r [230] and CB2r [231–233] agonists. Likewise, it has been confirmed that endocannabinoid substances such as AEA also activate TRPV1 receptors [234]. For a more detailed review of the mechanisms involved in the analgesic effects of cannabinoids, please see [235,236].

In summary, the interaction of CBr agonists (either endogenous or exogenous) leads to a reduction in neuronal activity secondary to inhibition of bioelectrical activity by lowering the intracellular level of second messengers and loss of the ability to release their specific neurotransmitters (whatever they activate or inhibit). The cellular consequences are short-term modification of the permeability of membrane ion channels (mainly for  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  [237,238]), decreasing neuronal excitability and long-term changes in gene expression that result in phenomena such as brain plasticity, dependence, and transformation of an acute response into a long-term adaptation or memory [189,239–242]. The overall result is decreased pain perception by modulating the nociceptive impulse at different levels and activating a descending inhibitory system acting on the spinal cord [92,243–245]. Multiple factors, such as the diversity of cannabinoid-mediated signaling [246–250], the ligand concentration [247,251,252], the presence of other cannabinoid ligand molecules [252], the exact localization of the cannabinoid receptors [184], and the different distributions of metabolic enzymes influence [110,253] the response to a specific cannabinoid.

## **4. Why Consider the Therapeutic Potential of Cannabinoids in Postoperative Pain Relief?**

### **4.1. Activation of the ECS after Surgery**

Surgical procedures invariably induce peripheral tissue trauma, initiating a well-orchestrated nociceptive response. The specific tissues implicated vary based on the surgical approach, encompassing skin, fascia, muscle, vasculature, viscera, and potentially neural structures. This damage directly activates nociceptive nerve fibers, particularly unmyelinated C-fibers, contributing to postsurgical pain's dull, aching quality. Furthermore, tissue injury triggers a robust inflammatory response, a coordinated endeavor involving diverse cell types and releasing many mediators. These mediators are essential to clearing cellular debris, combating potential pathogens, and facilitating wound healing through scar tissue formation. However, the inflammatory process can also contribute to pain by sensitizing nearby nociceptors [254].

A significant challenge in POP arises from iatrogenic nerve injury. Specific surgical interventions, such as limb amputation or inguinal hernia repair, carry a higher risk of peripheral nerve damage [255]. This nerve injury can lead to the development of neuropathic pain [256], a chronic pain state characterized by burning, electrical, or dysesthetic sensations. Neuropathic pain is a prevalent condition, affecting at least 8% of individuals with chronic pain and significantly contributing to chronic

postoperative pain (CPOP) [257,258]. It is noteworthy, however, that not all nerve injuries culminate in chronic pain; for instance, only approximately 80% of amputees develop CPOP [149,259].

In this context, preclinical POP studies have shown evidence of a crucial role for the ECS in resolving pain after surgery and preventing its transition into a chronic state by limiting pro-inflammatory responses within spinal cord glial cells [18,19]. Targeting eCBs offers several advantages: (1) localized and on-demand synthesis whereby eCBs are produced at the site of action, minimizing side effects associated with widespread cannabinoid receptor activation [247]; (2) endogenous production whereby the body naturally produces eCBs and the enzymes responsible for its breakdown, resulting in a shorter half-life and potentially lower toxicity compared to synthetic drug; and (3) synergy with existing treatments whereby the ECS can enhance the pain-relieving effects of common nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), potentially improving pain management strategies [260].

However, despite evidence supporting eCBs' role in pain relief [19,261–264] and the effectiveness of inhibiting FAAH and MAGL (enzymes degrading eCBs) in reducing pain [265], research also reveals complexities. Studies have shown increases and decreases in eCB levels depending on the pain-transmitting tissues analyzed [266,267]. Additionally, diverse studies suggest that blocking cannabinoids CB1r and CB2r can produce painrelieving and anti-inflammatory effects [268–271]. This indicates that endocannabinoids can act as pro- and anti-inflammatory mediators [270,272], potentially making ECS activation detrimental in certain situations.

The current understanding suggests that the initial eCBs response to acute pain helps restore balance within the body, with precise timing and location being crucial. However, chronic pain states can dysregulate this system, leading to prolonged or inappropriate endocannabinoid activity. This complexity makes predicting the effectiveness of ECStargeting drugs challenging for specific conditions.

At the clinical level, limited research exists. One study measured various endocannabinoid mediators in plasma, cerebrospinal fluid, and synovial fluid, correlating them with pain levels and opioid use after surgery [273]. The study found a significant correlation between synovial and cerebrospinal fluid 2-AG levels and both pain scores and opioid consumption. However, the potential confounding factor of pre-existing osteoarthritis and chronic pain in some participants needs to be addressed in future studies.

#### **4.2. Cannabinoids Themselves Possess Analgesic Properties**

The link between cannabinoid receptors and pain pathways has involved animal studies assessing cannabinoid antinociception [92,274]. Small-molecule CB1r and CB2r agonists and FAAH inhibitors were the most frequently evaluated. Preclinical data obtained with cannabinoid agonists after systemic [230,275] and/or perimedullary [225,230,276] administration in pain models of excess nociceptive, visceral, and neuropathic pain models [214,274,277] concluded that the antinociceptive effect is similar to opioids [278–281] and that it varies according to the substance chosen, the dose administered (a significant dose-dependent correlation exists between the administered cannabinoid dosage and the degree of antinociception observed) [282,283], and the route of administration (the doses required after administration by the perimedullary route are much lower and the duration of the effects longer than those used to achieve the same result by non-perimedullary routes) [229,284]. They also highlighted the greater antinociceptive power in inflammatory and neuropathic pain models [285–288]. In all cases, cannabinoids primarily act by inhibiting or releasing a series of modulators from neurons and/or non-neuronal tissues. This targeted action in inflamed tissues, where these modulators are present in relatively high amounts, is hypothesized to lead to a faster and more intense antinociceptive effect [83,277].

Furthermore, cannabinoids can act on various antinociceptive mechanisms, including the modulation of enzymes responsible for generating and releasing inflammatory agents and enhancing the abundance and diversity of cannabinoid receptors [274]. Regarding efficacy in neuropathic pain [289,290], it is relevant to highlight that the central cannabinoid CB2r is required for an anti-allodynic

effect [22]. Cannabinoids also activate and desensitize another significant player in neuropathic pain (i.e., TRPV1) [291–293]. They reduce microglia and astrocyte activation as a mechanism related to the onset and maintenance of hypersensitivity in neuropathic pain [18,19].

However, human studies have yielded partially supportive findings from animal research regarding the use of cannabinoids for pain management [294,295]. Despite a long history of cannabis use for pain management [296], clinical trials have revealed limited efficacy for acute pain and even potential enhancement of specific pain responses [74,274,297–302]. Conversely, moderate-quality evidence suggests a small effect for chronic, non-cancer-related pain management with cannabinoids up to 6 months, potentially due to their influence on neuroplastic changes [303–307]. Therefore, based on the available literature, it is challenging to recommend cannabinoids as a general alternative to the currently marketed analgesic for pain management [302,308].

In this scenario, the complex nature of POP demands the development of more effective and better-tolerated therapeutic approaches. These options should target nociceptive and neuropathic pain pathways to relieve pain sensitization [140,309]. Ultimately, this could mitigate the reliance on opioid medications during POP and minimize the risk of long-term pain complications [11,310–314]. It is worth noting that the activation of the  $\mu$ -opioid receptor is linked to numerous adverse effects, including respiratory depression [315,316], postoperative nausea and/or vomiting [317,318], constipation [319–321], urinary retention [318,322], mental clouding and somnolence [323,324], tolerance [325–330], hyperalgesia [313,331–334], dependence, and addiction [335–339]. Among these, a pivotal strategy is multimodal analgesia [340,341]. This involves combining various medications with different mechanisms of action to address pain from multiple angles. The aim is to minimize side effects from individual drugs and target different pain receptors for optimal pain control and improved recovery. Prioritizing non-opioid medications as the initial treatment for POP offers a safer and potentially more effective approach. These medications often have a wider therapeutic window, implying the dosage range for effective pain relief with minimal side effects.

To date, cannabinoids are emerging as promising candidates to replace or reduce reliance on other long-term pain medications. This potential stems from their ability to modulate the ECS, which in turn regulates the release of various neurotransmitters critical for pain perception, such as glutamate, GABA, serotonin, acetylcholine, dopamine, and norepinephrine [342–344]. However, research on the synergistic effects between existing analgesics and cannabinoid receptor agonists is limited. Nevertheless, several combinations promise enhanced pain management with reduced side effects. These include combinations with opioids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), paracetamols, local anesthetics, and  $\alpha$ 2-adrenergic receptor agonists.

#### **4.3. Opioids—Cannabinoids**

The potential of cannabinoids to decrease opioid dosages and prolong the duration of adequate analgesia justifies further research. This is particularly intriguing considering their shared distribution within the descending pain inhibitory pathway and potential complementary cellular mechanisms of action compared to opioids [345] interacting synergistically in attenuating pain [346]. Thus, eCBs are produced and released within active neural circuits, where they play a critical role in mediating an adaptive response to mitigate pain and inflammation following injury and stress [247,347]. Pieces of evidence to date indicate that an ECS physiological tone mediates this regulation. In addition, ECS tone changes under pathophysiological situations such as inflammation, acting synergistically with the opioid system through different mechanisms [348,349]. A key consideration is the direct interaction between CB1r and  $\mu$ -opioid receptors as functional heterodimers within the same neuron, as demonstrated when co-expressed [350]. Furthermore, cannabinoid administration can stimulate the synthesis and release of endogenous opioid peptides in the central nervous system and periphery [351].

While these properties imply a potential synergistic interaction between opioids and cannabinoids, the situation is not entirely straightforward due to the complexities of cannabinoid pharmacology. For example, the activation level of cannabinoid receptors (both basal and stimulated) by different agonists significantly influences the observed effects [352,353]. Moreover, partial agonists such as anandamide can act antagonistically in the presence of more efficacious agonists [354].

At present, preclinical studies support opioid sparing when co-administered systemically [355–359], intradurally, and/or intracerebroventricularly [229,360], or in a combination of routes [361,362].

However, clinical trials investigating nabilone and dronabinol in acute POP revealed no discernible benefits regarding opioid dose requirements or analgesic outcomes [363,364].

#### **4.4. NSAIDs—Cannabinoids**

NSAIDs primarily exert their antinociceptive effect by inhibiting the production of prostaglandins through COX enzyme blockade. COX-1 is constitutively expressed, while COX-2 is induced explicitly during inflammation. Notably, evidence suggests that NSAIDs may have additional pain-relieving mechanisms [365–369]. This has sparked research into potential interactions between cannabinoid agonists and NSAIDs for managing pain and inflammation. This interest stems from the convergence of pathways between endogenous cannabinoid receptor ligands and prostaglandins (molecules derived from arachidonic acid) [370]. Furthermore, evidence from cannabis signaling and the accumulation of arachidonic acid in brain slices exposed to cannabis derivatives supports this exploration [371].

Preclinical research suggests that eCBs and synthetic cannabinoids exhibit synergistic antinociceptive effects when combined with common NSAIDs [372–376]. This finding holds promise for the development of novel pain management strategies. However, further investigation is necessary to determine optimal dosing, safety profiles, and administration protocols for these combinations.

To our knowledge, there have been no clinical studies evaluating the analgesic efficacy of the combination of cannabinoids with NSAIDs.

#### **4.5. Paracetamol—Cannabinoids**

Several studies have revealed a surprising link between acetaminophen, the most commonly used pain medication, and the endocannabinoid system [377,378]. Research shows that blocking CB1r reduces the antinociceptive effects of paracetamol [379–381]. This effect is also observed in CB1 receptor-deficient (CB1<sup>-/-</sup>) mice [377,378] and those lacking FAAH (FAAH<sup>-/-</sup> mice) [382]. The link to the ECS becomes more evident when considering that acetaminophen can transform into N-arachidonoyl-phenolamine (AM404). This bioactive compound activates cannabinoid receptors and prevents the breakdown of natural pain-relieving endocannabinoids [383].

To our knowledge, there have been no clinical studies evaluating the analgesic efficacy of the combination of cannabinoids with paracetamol.

#### **4.6. Local Anesthetics—Cannabinoids**

Because endocannabinoid receptors are present in peripheral sensory afferents and spinal cord neurons [384–387], another strategy could be to develop synergistic interactions between cannabinoids and local anesthetics. Although the mechanisms for cannabinoid-induced antinociception are still unclear, there is literature that confirms a synergistic effect in experimental models [388].

To our knowledge, no clinical studies have evaluated the analgesic efficacy of combining cannabinoids with local anesthetics.

#### **4.7. $\alpha$ 2-Adrenergic Receptors—Cannabinoids**

Alpha-2 agonists offer significant pain relief with the potential to decrease opioid consumption by attenuating nociceptive signaling throughout the nervous system, from peripheral sites to the brain [389–391]. Interestingly, they share similarities with CB1r agonists. Both belong to the G protein-

coupled receptor family and can work together through various signaling pathways or by inhibiting adenylyl cyclase, resulting in decreased levels of cAMP and reduced activity of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels [392]. Synergistic analgesia can be achieved when a CB1r agonist is combined with an alpha-2 receptor agonist (such as clonidine, tizanidine, or guanfacine). Additionally, modulating the noradrenergic system, which regulates the activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA), can be significant in treating anxiety and opioid withdrawal [393].

To our knowledge, no clinical studies have evaluated the analgesic efficacy of combining cannabinoids with alpha-2 agonists.

## 5. Cautions and Limitations of Using Cannabinoids for Postoperative Pain Relief

### 5.1. Which Product Is Suitable for Postoperative Pain Control?

The substantial heterogeneity among studies examining cannabinoids for POP pain management poses a significant challenge. These studies often utilize different cannabinoid medications with diverse mechanisms of action and varying activity levels of CB1r and CB2r, making it challenging to identify the most effective option. For example, THC [297,364,394], levonantradol [395,396], nabilone [363,397], and dronabinol [398] were used in POP. Additionally, CBD products have been employed in POP studies [399–401]. Two research articles used investigational compounds under development [402,403]. In this regard, it is not clear whether CBD is a better or worse analgesic than THC [404]. Nonetheless, patients typically perceive marijuana as potentially at least somewhat effective for pain management and are often open to using cannabinoid compounds for this purpose if recommended by a physician [405]. It is also known that nausea responds to THC, while anxiety responds better to CBD [406].

To date, unlike recreational users who prioritize psychoactive effects, medical cannabis patients often seek CBD-rich chemovars (strains) with minimal THC. These chemovars offer the potential for greater symptom control, improved functionality, and enhanced quality of life while minimizing unwanted side effects [407].

In the absence of evidence or clinical guidelines based on rigorous studies, it is advisable to use a cannabinoid product by assessing the effects obtained. A recommended strategy for cannabis initiation is “start low, go slow, and stay low”.

### 5.2. Pharmacokinetic Considerations and Routes of Administration of Cannabinoids in Postoperative Pain Relief

Pharmacokinetics, which involves a drug’s absorption, distribution, metabolism, and elimination, significantly influences its onset and duration of action. These are especially important for cannabinoids. Factors such as the route of administration—currently, cannabinoids have been marketed for systemic and topical use (Table 1)—and pharmacokinetic profile jointly dictate the clinical effects [408–411].

**Absorption.** Due to their limited aqueous solubility and lipophilic character, cannabinoids display significant variability in their effects depending on the chosen route of administration.

**Pulmonary route:** Inhaling cannabinoids brings on effects quickly, within 15 min, then levels off for 2–4 h before slowly wearing off. Their bioavailability varies considerably (between 10% and 85%), owing to various factors such as individual differences in inhalation techniques (number of puffs, duration and interval of puffs, breath hold time, and depth of inhalation), the device used, the size of inhaled particles, the temperature of the vaporizer, and the site of deposition within the respiratory system [410–412].

**Oral route:** THC and CBD formulations have a low bioavailability of around 6% due to their lipophilic structures, variable gut absorption, and extensive hepatic first-pass metabolism. Plasma concentrations for therapeutic effects remain within range for 2 to 6 h [409,411,413]. However, blood

concentrations only reach 25–30% of those achieved through smoking the same dose. This is because first-pass metabolism by the liver reduces THC reaching circulation, although the resulting metabolite 11-hydroxy delta-9THC retains some psychoactive effects. The onset of the effect is delayed (0.5–2 h) and may be prolonged by continued slow absorption from the gut [414]. Notably, cannabinoids are best absorbed with fat, oils, or polar solvents like ethanol. Newer technologies, such as using nanoor ionized particles or incorporating omega fats into carrier oils, suggest a potential for increased absorption [415]. Additionally, the design of new water-soluble cannabinoid agonists opens up new possibilities for improved bioavailability [416].

**Mucosal-related pathways:** The sublingual and buccal regions of the oral cavity are lined with a non-keratinized, stratified, squamous epithelium. This specialized tissue is a selective barrier, allowing certain substances to pass through [417]. In this case, the formulation of THC and CBD (Sativex®) facilitates rapid absorptions and bypasses hepatic first-pass metabolism, resulting in higher plasma levels achieved through oral administration but lower than through inhalation administration [418]. However, sublingual and buccal routes have some drawbacks compared to oral administration. These include the following: (1) a shorter duration of action whereby the pain relief effects wear off quicker; (2) frequent dosing whereby maintaining stable pain control requires repeated administrations and this can increase the risk of side effects; and (3) potential for adverse reactions whereby rapid administration can lead to high drug concentrations in the bloodstream, raising the chance of severe reactions. Advances in nanoparticulate drug delivery represent a line of research aimed at enhancing the retention and absorption of drugs in the buccal and sublingual regions [419].

**Skin-related pathways:** By bypassing first-pass metabolism, transdermal cannabinoids can potentially offer a more consistent and controlled release of cannabinoids into the body compared to edibles [420]. However, their water-insoluble nature requires permeation enhancers to ensure they reach the bloodstream effectively [421,422]. Studies indicate that CBD exhibits ten times greater permeability in transcutaneous administration compared to THC. This finding suggests that CBD possesses a more polar structure than THC [410,423,424].

**Intravenous route:** Intravenous administration of cannabinoids presents a unique challenge due to their poor water solubility. Nonetheless, it remains the most reliable method for the administration of synthetic cannabinoids. This route bypasses first-pass metabolism, ensuring minimal variability in plasma concentrations and consistent results across patients. The resulting plasma profile following an intravenous dose closely mirrors that observed after inhalation. However, rapid redistribution within the body leads to a swift decline in plasma levels. Subsequently, drug metabolism contributes to a slower, sustained decrease in concentration [425]. It is important to note that the existing literature regarding the use of intravenous cannabinoids for postoperative pain management remains limited. Additionally, the research conducted thus far has primarily focused on the effects of tetrahydrocannabinol (THC) [426].

**Distribution.** Upon absorption, THC and other cannabinoids rapidly distribute to various tissues at rates influenced by blood flow [214,409,427]. Because they are extremely lipid-soluble, cannabinoids tend to accumulate in adipose tissues, reaching peak concentrations within 4–5 days. Subsequently, they undergo slow release into other body compartments, including the brain. Due to sequestration in fat, THC has a tissue elimination half-life of approximately 7 days, with complete elimination of a single dose potentially taking up to 30 days [428]. This accumulation phenomenon suggests that with repeated dosage, cannabinoids can persist in the body and continue to reach the brain. In the brain, THC and other cannabinoids exhibit differential distribution, with high concentrations observed in the neocortical, limbic, sensory, and motor areas. Notably, the volumes of distribution (Vd) for CBD and THC are notably high. Specifically, the volume of distribution at beta phase (Vd<sub>β</sub>) is approximately 32 L/kg following intravenous administration for CBD [429], and the volume of distribution at steady state (Vd<sub>ss</sub>) is approximately 3.4 L/kg following inhaled administration for THC [411].

**Metabolism.** The metabolism of THC primarily occurs in the liver, predominantly through cytochrome P450 (CYP450) isozymes such as CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4. THC is primarily metabolized into 11-hydroxy-THC (11-OH-THC) and 11-carboxy-THC (11-COOH-THC), which undergo glucuronidation and are subsequently excreted in the feces and urine [410]. Additionally, metabolism occurs in extrahepatic tissues expressing CYP450, such as the small intestine and brain [411]. It is worth noting that the metabolite 11-OH-THC is found in higher quantities in the brain compared to the unmetabolized THC compound, suggesting a potential role for 11-OH-THC in the effects experienced with THC [424,430,431]. The increased uptake of 11-OH-THC in the brain may be attributed to its lower plasma protein binding or the hydroxylated metabolite's ability to pass through the blood–brain barrier [411]. In the case of CBD, it undergoes extensive hepatic metabolism, primarily by the cytochrome P450 (CYP) isozymes CYP2C19 and CYP3A4. Additional contribution comes from CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, and CYP2D6 [432]. Following hydroxylation to 7-OH-CBD, further hepatic metabolism primarily leads to fecal excretion, with a minor contribution to the urinary excretion of these metabolites. However, the pharmacological activity of CBD metabolites in humans remains largely unknown [433].

**Elimination.** The elimination half-life of THC demonstrates biphasic characteristics. A population pharmacokinetic model estimates a rapid initial half-life of approximately 6 min, followed by a slower terminal half-life of around 22 h [434]. This extended terminal phase is attributed to equilibration between THC stored in lipid compartments and its release back into the bloodstream [435]. Heavy cannabis users display an even longer terminal half-life due to the slow redistribution of THC from deep fatty tissues [436].

Consequently, blood THC concentrations exceeding 1 µg/L may persist for more than 24 h after their last use in heavy users [436,437]. Conversely, CBD also exhibits a prolonged terminal elimination half-life. Following intravenous administration, the average half-life is  $24 \pm 6$  h, while inhalation results in a slightly longer value of  $31 \pm 4$  h [429]. Notably, repeated daily oral administration of CBD leads to a significantly extended half-life, ranging from 2 to 5 days.

### 5.3. Potential Interactions of Cannabinoids in Postoperative Pain Relief

The metabolism of cannabinoids, particularly THC breakdown by cytochrome P450 (CYP) enzymes [438], suggests potential interactions with various drug classes [439–441]. While clinically significant interactions are rare [442], caution is advised, especially when combining cannabinoids with other central nervous system depressants (increased sedation), serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)/antidepressants, sympathomimetics (potential for elevated heart rate and blood pressure), or pain medications [443–445].

Existing evidence has not demonstrated toxicity or loss of effect of concomitant medications, although such outcomes are theoretically possible. One exception is the interaction between high-dose CBD and clobazam, where elevated levels of a sedative metabolite, N-desmethyl clobazam, necessitate a dose reduction for that drug. Furthermore, the accumulating literature highlights the interaction of CBD with various catalytic activities of cytochrome P450 isoenzymes, demonstrating its potency as an inhibitor of CYP2C19 [446], CYP2D6 [447], or CYP3A4 [448], among others. Thus, it is crucial to consider potential interactions with other concomitant drugs metabolized by these isoenzymes [449].

### 5.4. Acute Adverse Effects of Cannabinoids

Our understanding of the effects of cannabinoid agonists in humans is predominantly derived from two sources: clinical observations and anecdotal reports from individuals consuming marijuana, as evidenced in **Table 2**. The pharmacokinetic profile, particularly the time course of action, exhibits significant variability depending on the administered dose and route. For instance, oral administration leads to a slower onset (30 min to 1 h) with longer-lasting effects (approximately 6 h) than inhalation

or oral transmucosal routes. These latter routes offer a rapid onset with potent effects, but the duration is shorter. However, once established, the qualitative nature of the effects often displays a similar pattern across individuals [450].

Within the context of POP, the most commonly encountered acute adverse effects of cannabinoids are primarily attributed to their interactions with the central nervous system (CNS). Typically, the consumption of cannabinoids induces in humans an initial feeling of euphoria, well-being, and happiness, followed by a state of drowsiness. During this initial phase, one experiences excitation, dissociation of ideas, increased and distortion of extrasensory perception (increased visual and auditory perception), spatiotemporal errors of appreciation, alterations of emotions, and in some cases, fixed ideas, illusions, irresistible impulses, and hallucinations [428,451]. Other mental and behavioral effects observed in this phase are alterations in memory for recent events [20,452,453], alterations in motor coordination (e.g., driving vehicles), and other psychomotor abilities, difficulties in concentration, especially in complex tasks requiring divided attention, stuporous states (“hanging”), slowing of reactions, decreases in mental activity, and impairments in peripheral vision [454,455]. It is worth mentioning that the effects vary from one individual to another depending on the dose (they increase at higher doses), route of administration, individual vulnerability (personality, expectation, experience of the consumer), as well as the circumstances of consumption. In all cases, they are easily quantifiable, measurable over a few hours (generally no more than 4–6 h) [455,456], and difficult to correlate with plasma levels [457,458]. Dysphoric reactions such as panic and acute anxiety attacks, unpleasant somatic sensations, and paranoid feelings are dose-dependent and occur mostly during initial contact with cannabinoids or individuals with a history of psychosis [459].

Furthermore, their hemodynamic and digestive effects are other undesirable effects to consider during POP. Cannabinoids generally exhibit vasodilatory reflex properties when acting through CB1r [460,461]. This response is multifaceted and may involve three phases: vagal-mediated hypotension (Phase I), followed by a compensatory increase in blood pressure (Phase II), leading to prolonged hypotensive effects (Phase III) [462]. The most consistent cardiovascular effects of both marijuana smoking and i.v. administration of delta9-THC are peripheral vasodilation and tachycardia (compared with bradycardia in animals), occurring within minutes to a quarter of an hour and lasting up to 3 h [451,463–465]. This increase in heart rate may elevate cardiac output and oxygen demand [466]. Blocking drugs can be used to mitigate this effect [467]. Additionally, inhibiting acetylcholine release from the autonomic nervous system fibers after interaction with intestinal CB1r should be considered a cause of intestinal ileus [468].

Nevertheless, cannabinoid receptor agonists offer a promising alternative for pain management compared to current medications. Opioids, while effective, can lead to lifethreatening complications and contribute to the opioid crisis [10,469]. NSAIDs, such as ibuprofen and diclofenac, although widely used, can induce cardiovascular toxicity through mechanisms like prostaglandin inhibition. In contrast, the acute toxicity of cannabinoids is very low [67]. The dose of THC required to produce 50% mortality in rodents is extremely high compared with other commonly used drugs [470].

### **5.5. Patients with a History of Cannabinoid Use**

One of the premises of treating POP is the individualization of the guidelines to achieving a satisfactory result and acceptable side effects. In this sense, taking a series of precautions in special risk groups is necessary to reduce undesirable effects.

Studies indicate that 10–20% of individuals aged 18–25 years may use cannabis weekly or more frequently. Due to its slow elimination from the body, these cannabinoids may persist in the tissues for weeks, potentially interacting with various anesthetic agents and affecting their efficacy [471,472]. Additionally, cannabis use may be associated with higher pain scores and poorer quality of sleep in the early postoperative period [410,412]. Therefore, a systematic preoperative inquiry regarding cannabis

use is highly recommended. In cases of recent cannabis use, postponing elective surgery is advisable to minimize potential complications [471,472].

It is noteworthy that cannabinoids significantly enhance the hypnotic and sedative effects of CNS depressants commonly used in general anesthesia (barbiturates, opiates, benzodiazepines)—see above. This can lead to excessive sedation and potential respiratory depression. Additionally, cannabis use can also increase the risk of respiratory complications during general anesthesia. Smoking cannabis irritates the upper airway, causing inflammation (oropharyngitis) and swelling of the uvula (uvular edema) [473]. This swelling can obstruct the airway, especially during breathing tube insertion. In rare cases, cannabis use may contribute to isolated uvulitis, presenting with upper airway pain, fever, hypersalivation, dyspnea, and respiratory distress [474,475]. Furthermore, cannabis use has been linked to laryngospasm [476].

On the other hand, hemodynamic effects are also a concern. Low or moderate doses may cause an increase in sympathetic activity, leading to a faster heart rate (tachycardia) and increased cardiac output. Conversely, high doses can suppress sympathetic activity and stimulate parasympathetic activity, resulting in a slower heart rate (bradycardia) and low blood pressure (hypotension). Cannabis-induced hypotension usually responds well to intravenous fluids [477].

In cases of acute cannabis consumption, it is advisable to avoid medications likely to increase heart rate, such as ketamine, atropine, or epinephrine [478]. This is because cannabis can cause pronounced catecholamine release, potentially leading to tachycardia. Conversely, chronic use may cause catecholamine depletion, requiring lower anesthetic doses [471,472].

## 5.6. Contraindications

Due to potential risks for fetal and neonatal health, including long-term neurodevelopmental effects, cannabis use is contraindicated during pregnancy and lactation [479–481]. Similarly, it is contraindicated in psychosis (except for CBD-predominant preparations) [482]. Cannabis should be used with caution in patients with conditions like unstable angina due to tachycardia and possible hypotension from THC, but it does not produce QTc issues [483]. The use of cannabis in children and teens requires further investigation due to potential impacts on cognitive development and academic performance [484]. Similarly, more research is needed to understand its role in addiction and dependency. Smoking cannabis should be avoided for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma.

## 6. Clinical Trials Evaluating Cannabinoids for Postoperative Pain

Eight clinical trials investigating cannabinoids for POP have been conducted, involving a total of 924 patients and utilizing six different cannabinoid compounds, primarily THC or its analogs (e.g., dronabinol) [297,364,394–397,402,403] (Table 3). Overall, the trials predominantly reported negative findings, with only two studies demonstrating modest (e.g., slight reduction in pain scores) benefits [394,396]. Notably, six out of eight studies administered a single dose of cannabinoids, while in two other studies, administration was extended for 24 and 36 h, respectively.

These findings contradict some systematic reviews suggesting a potential role for cannabinoids in managing pain beyond acute scenarios [46,485]. Meta-analyses evaluating the analgesic efficacy of cannabinoids for acute POP [486,487] concluded that cannabinoids are not ideal for POP due to the following: (1) limited efficacy in that studies show limited pain reduction [394,396] or no effect [297] and (2) potential for hyperalgesia whereby high doses may even worsen pain [397]. To evaluate these findings, the best available qualitative evidence indicates no disparities in cumulative opioid consumption and no variances in the severity of rest pain at 24 h postoperatively.

Cannabinoids are generally well tolerated, with most adverse effects being mild to moderate [486,487]. Common side effects include blurred vision, hypotension, dizziness, drowsiness, dry mouth, hallucination, headache, and nausea. In fact, in five of eight studies [297,364,396,397,402],

cannabinoids showed more frequent or severe adverse effects than the placebo for specific events or periods. Nevertheless, analyzing the adverse effect profile of cannabinoids is challenging due to variations in reporting and defining adverse effects among studies. Moreover, some studies failed to assess or report the statistical significance of group differences. For instance, one study noted that patients receiving a placebo were more likely to report postoperative nausea and vomiting compared to those receiving dronabinol, but the statistical significance of this finding was not provided [364]. Additionally, there is an observed increase in hypotension during the postoperative period, posing a risk factor for cerebrovascular disease [488]. A recent randomized controlled trial evaluating the efficacy of intravenous THC in preventing postoperative nausea and vomiting did not recommend its use due to an unacceptable side effect profile and limited efficacy [489].

It is worth noting that despite promising results in animal models, CBD appears ineffective for POP management. Three recent studies explored its therapeutic potential. In the first study, topical CBD administered to patients who had undergone total knee arthroplasty as a supplement to a standardized multimodal analgesic protocol did not reduce pain or opioid consumption [400]. In the second study, buccally absorbed CBD in arthroscopic rotator cuff repair patients showed a suitable safety profile and held promise in reducing pain in the immediate perioperative period [490]. However, a follow-up study indicated that CBD was not able to improve pain scores, patient satisfaction with pain control, or postoperative opioid consumption [399]. Finally, CBD was ineffective in reducing discomfort or opioid usage in patients undergoing ureteroscopy with stent placement for urinary stone disease [401].

The Clinical Trial as Proof of Principle of Analgesic Efficacy of Cannabinoids on Postoperative Pain (CANPOP) clinical trial, funded by the Medical Research Council, evaluated the analgesic efficacy of standardized cannabis plant extract (Cannador) administered by p.o. one hour before the intervention in patients with POP (tonsillectomized and patients undergoing abdominal surgery). This clinical study reported significant dose-related improvements in rescue analgesia requirements [394].

In conclusion, the use of cannabinoids for POP presents a mixed picture. While some studies show promise, the evidence suggests limited efficacy and potential side effects.

## **7. Possible Explanations for the Lack of Analgesic Efficacy in Postoperative Pain Relief**

Unlike chronic pain, which is often dynamic and neuropathic, POP is acute, localized, and primarily driven by nociceptive mechanisms [491,492]. This difference in pain type might explain the limited effectiveness of cannabinoids for POP compared to chronic pain. Chronic pain is associated with complex changes in the ECS, including upregulation of cannabinoid receptors, altered receptor function, changes in eCB formation or release, and interactions with other pain mediators [393,493]. Supporting this hypothesis, are studies on healthy volunteers, suggesting limited effectiveness of cannabinoids for acute nociceptive pain [298].

Additional factors contributing to the lack of desired results are outlined in **Table 4**. Notably, the clinical dosage is constrained by the onset of THC-related side effects, being mainly psychotropic [464,494]. Furthermore, an analysis of studies revealed significant disparities in dosing regimens and administration patterns. Timing of administration varied across studies, with some administering cannabinoids preoperatively [363,396,402,403], postoperatively [297,394,395,398], and a few in both settings [412,495]. Moreover, a diverse range of analgesic protocols was employed, with some studies using unimodal opioidbased analgesia, others employing multimodal analgesia, and some using unspecified multimodal regimens [297,363,364,394,397,398,402,403,412,495]. Routes of administration also varied, with most studies investigating the oral route (PO). The heterogeneity of patient populations included in the studies, ranging from healthy individuals to those with various etiologies of diseases [86,495], further complicated the interpretation of the results.

Another factor contributing to the limited evidence for cannabinoids in POP relief might be the way surveys are worded. The phrasing of questions posed to patients could unintentionally influence their responses, hindering researchers' ability to obtain accurate data relevant to their specific research goals. This is particularly noteworthy considering the findings of Khelemsky et al. [405]. Despite systematic reviews highlighting a lack of robust clinical evidence for cannabinoids in acute pain management, their study showed that patients generally perceive marijuana as at least somewhat effective for pain control. Additionally, patients expressed a willingness to use cannabinoid medications if prescribed by a healthcare provider. This discrepancy highlights the potential influence of question formulation on research outcomes. Moreover, the selectivity of cannabinoid analogs at CB1 and CB2 receptors is crucial, which may be one of the leading causes of the therapeutic failure found in some studies, considering the opposite effects that may occur between CB1r and CB2r activation in some experimental contexts. These receptors have distinct locations and functions [97,184,496,497]. CB1 receptors are primarily located in the central nervous system, and their activation can produce psychotropic side effects [498–500]. CB2 receptors are abundant in peripheral tissues [25,501,502]. Their activation is associated with anti-inflammatory effects and does not show psychotropic actions [25,115,503]. These effects emphasize the importance of developing cannabinoid medications with targeted selectivity for CB2 receptors. By focusing on CB2 activation, researchers might achieve better pain relief with fewer side effects than medications that activate CB1 and CB2 receptors [18,22,227].

Finally, Pernia-Andrade et al. [504] provide compelling evidence supporting a painexacerbating mechanism of cannabinoid signaling in animals exposed to intense noxious stimuli. Their findings suggest that cannabinoid drugs and endocannabinoids (eCBs) produced in the spinal cord can disrupt the inhibitory regulation of pain-perceiving neurons, thereby facilitating the transmission of painful and non-painful mechanical stimuli along pain pathways to higher brain centers, effectively opening a “pain gate”.

## 8. Future Perspectives and Conclusions

The exploration of cannabinoid neuromodulation systems and the synthesis of CB1r and CB2r agonists present promising avenues for therapeutic use in pain management. Despite the demonstrated antinociceptive activity of cannabinoid agonists, particularly in preclinical studies, their clinical efficacy in the treatment of POP remains inconclusive. While some evidence suggests potential benefits, such as the avoidance of known adverse effects associated with traditional analgesics like opioids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), the overall clinical data on cannabinoid effectiveness in perioperative and acute pain settings are limited and heterogeneous.

The current literature underscores the need for further well-designed clinical trials to elucidate the specific pathologies and conditions wherein cannabinoid agents might offer advantages over existing therapeutic options. Notably, such trials should adhere to rigorous methodological standards, as outlined by initiatives like the Initiative on Methods, Measurement, and Pain Assessment in Clinical Trials (IMMPACT), to ensure the validity and reliability of their findings [505]. Additionally, while new routes of cannabinoid administration, such as oral cannabis oil formulations, offer potential benefits in terms of safety and patient acceptability, their efficacy in the context of postoperative pain management requires robust investigation.

Furthermore, the potential long-term implications of cannabinoid therapy in reducing the incidence of chronic postsurgical pain and mitigating the need for prolonged opioid use remain largely unexplored. Large-scale, multicenter trials are warranted to comprehensively evaluate the role of cannabinoids in acute and postoperative pain relief, with careful consideration given to patient safety, optimal dosing regimens, and comparative effectiveness against established analgesic agents. Only through such concerted research efforts can we definitively determine the place of cannabinoids in the

armamentarium of pain management strategies, thereby providing clinicians with evidence-based guidance for optimizing patient care in this challenging clinical domain.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.J.C., F.N. and J.M.; methodology, A.J.C., F.N., R.S., M.S.G.-G., B.M., D.N., F.M.G.-G., A.G., E.M.-S., A.B.T., P.P.-D., L.G. and J.M.; figure design and creation, A.B.T. and L.G.; writing—original draft preparation, A.J.C., F.N. and J.M.; writing—review and editing, F.N. and J.M.; funding acquisition, J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Mutua Madrileña Foundation, grant number UGP-22-010 to J.M.

**Acknowledgments:** We thank BioRender for preparing the figures used in this manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.



## 9. Figures and tables

### Figures

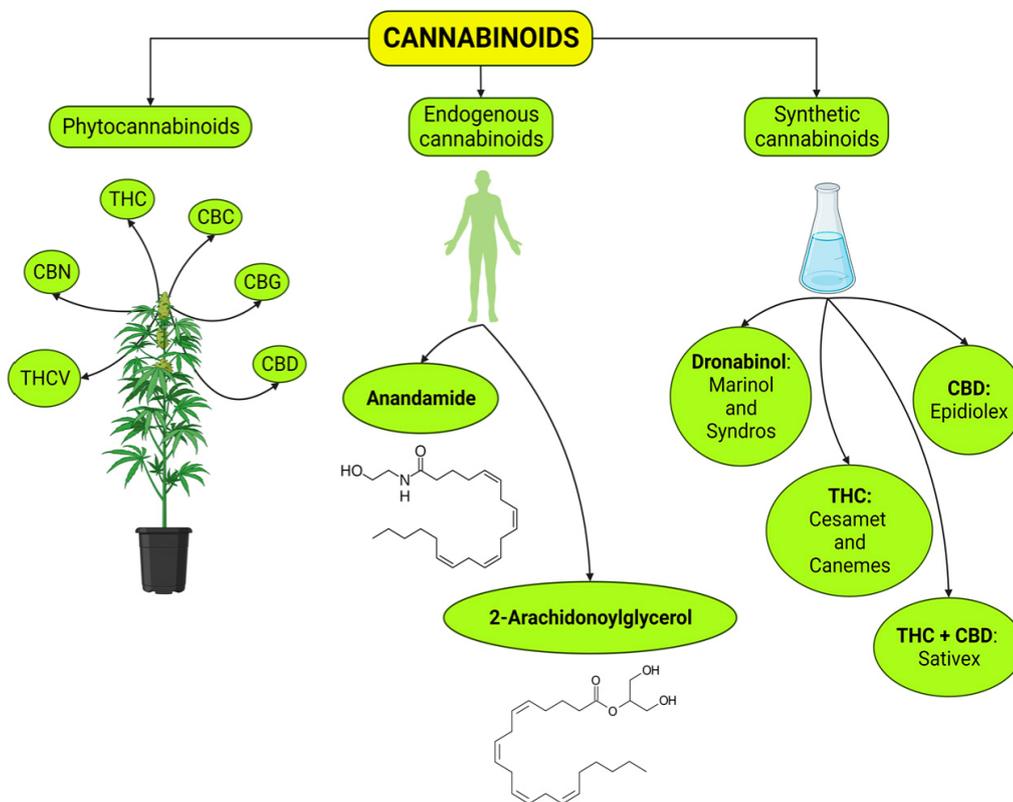
- Figure 1.** *Classification of cannabinoid compounds according to their origin.*..... 229
- Figure 2.** *Schematic representation of the connectivity between the nervous, endocrine, and immune systems through the autonomous nervous system and systemic circulation.*..... 230
- Figure 3.** *Schematic representation of the main endocannabinoid system components, including the expression of CB1r and CB2r in the CNS.*... 231
- Figure 4.** *Diagram illustrating the critical signaling pathways triggered by the activation of cannabinoid receptors.* ..... 232

### Tables

- Table 1.** *Characteristics, clinical effects, and advantages and disadvantages of different routes of administration of cannabinoids.* .... 233
- Table 2.** *Adverse events mainly associated with THC content in cannabis-based medicine* ..... 234
- Table 3.** *Summary of clinical trials evaluating cannabinoids in postoperative pain.*..... 234
- Table 4.** *Factors related to the lack of evidence regarding analgesia for postsurgical pain* ..... 236

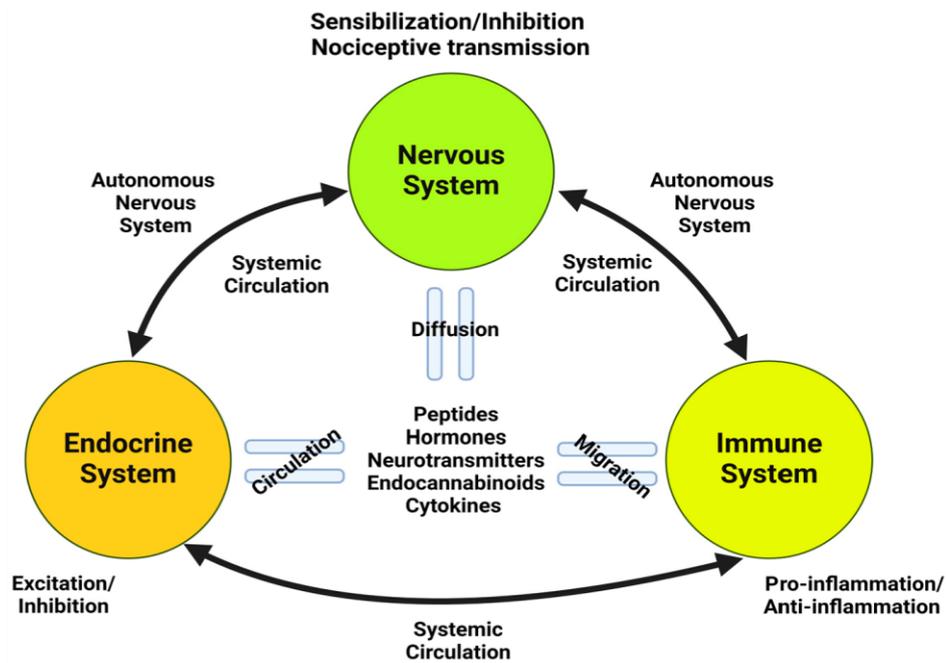


**Figure 1.** Classification of cannabinoid compounds according to their origin.

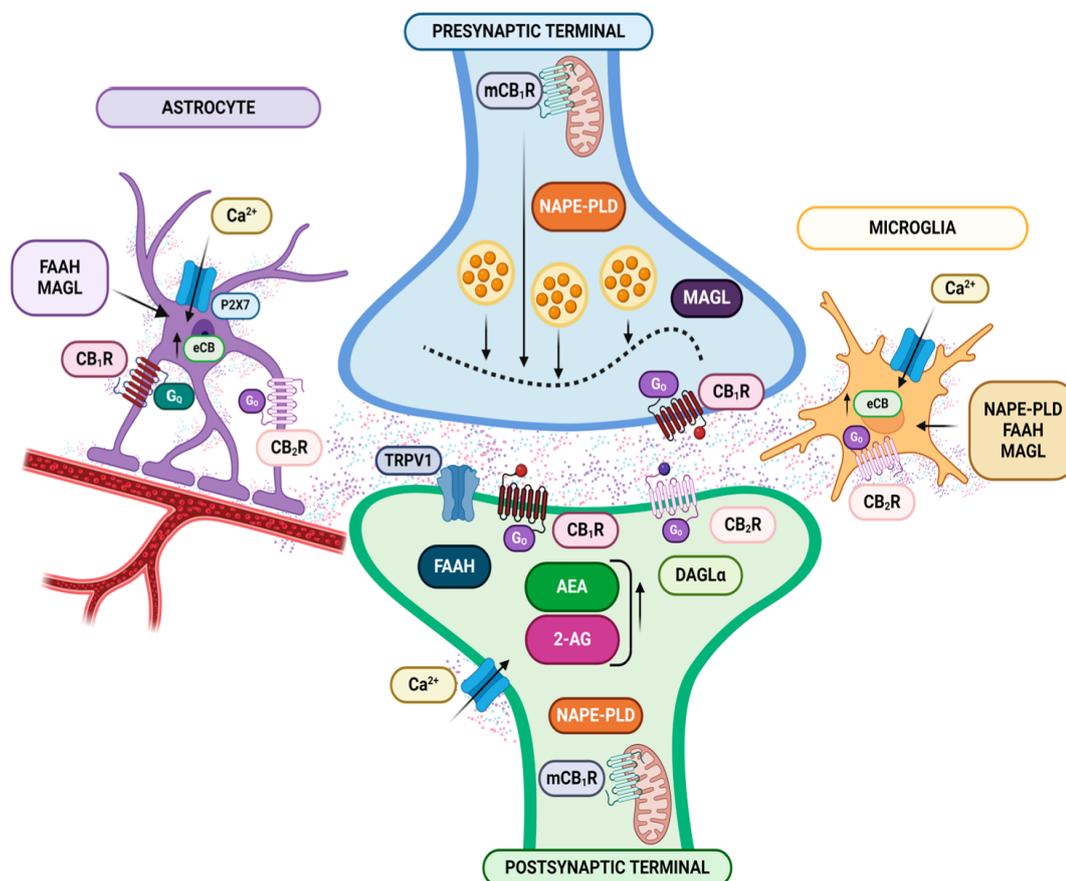


Note. THCV: D9-tetrahydrocannabinol; CBN: cannabichromene; THC: D9-tetrahydrocannabinol; CBC: cannabichromene; CBG: cannabigerol; CBD: cannabidiol.

**Figure 2.** Schematic representation of the connectivity between the nervous, endocrine, and immune systems through the autonomous nervous system and systemic circulation

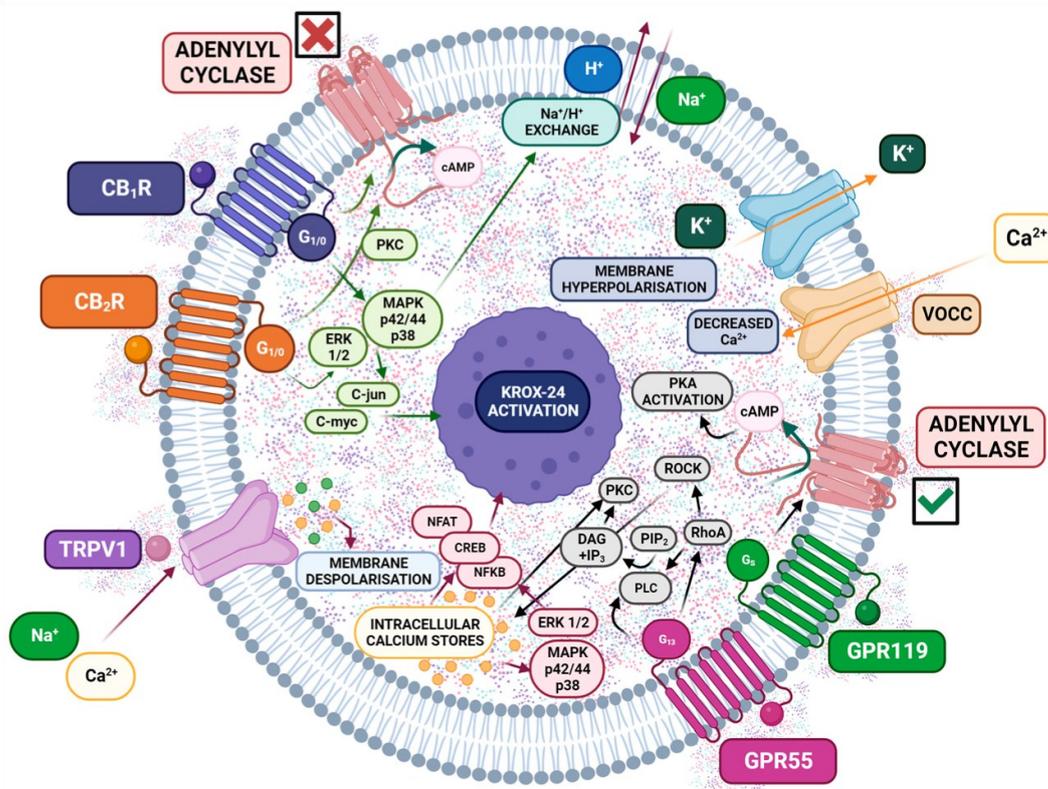


**Figure 3.** Schematic representation of the main endocannabinoid system components, including the expression of CB1r and CB2r in the CNS.



Note. One of the significant properties of G<sub>o</sub> protein-coupled CB1r/CB2r is that they inhibit the release of a series of transmitters (e.g., glutamate) from the presynaptic terminal. Abbreviations: AEA: anandamide; 2-AG: 2-arachidonylglycerol; CB<sub>1</sub>R/CB<sub>2</sub>R: cannabinoid receptor type 1/type 2; DAGL $\alpha$ : diacylglycerol lipase alpha; eCB: endocannabinoid; FAAH: fatty acid amide hydrolase; G<sub>o</sub> and G<sub>q</sub>: different sets of G proteins; MAGL: monoacylglycerol lipase; mCB<sub>1</sub>R: mitochondrial CB<sub>1</sub> receptor; NAPE-PLD: N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D; P<sub>2</sub>  $\rightarrow$  7: P<sub>2</sub>  $\rightarrow$  7 purinergic receptor; TRPV1: transient receptor potential cation channel subfamily V, member 1.

**Figure 4.** Diagram illustrating the critical signaling pathways triggered by the activation of cannabinoid receptors.



Note. CB1r activation triggers  $G_{i/o}$  coupling, leading to inhibition of adenylyl cyclase, modulation of membrane ion channels, and activation of MAPK/ERK and transcription factor signaling pathways. This ultimately results in membrane hyperpolarization. Activation of the CB2 receptor leads to  $G_{i/o}$  coupling, inhibiting adenylyl cyclase and activating MAPK/ERK signaling and transcription factors. Activation of the GPR119 receptor leads to  $G_s$  coupling, stimulating adenylyl cyclase, increasing cAMP levels, and activating PKA. Activation of the GPR55 receptor leads to  $G_{13}$  coupling, activating the phospholipase C and RhoA pathway, resulting in increased intracellular calcium levels, activation of MAPK/ERK signaling, and translocation of transcription factors. Activation of the TRPV1 receptor causes a non-selective influx of cations and membrane depolarization. Finally, CB1 and CB2 receptor activation leads to KROX-24 activation through the MAPK/ERK signaling cascade. KROX-24 is a regulatory nuclear transcription factor closely associated with critical biological functions such as stabilizing long-lasting, long-term potentiation, cell differentiation, survival, or death signaling in neuronal cells or regulation of specific neurotransmitters and receptors

**Table 1. Characteristics, clinical effects, and advantages and disadvantages of different routes of administration of cannabinoids.**

		Pulmonary Route		Oral	Other Routes	
		Smoking	Vaporization		Oral Transmucosal	Topical
Characteristics		<ul style="list-style-type: none"> <li>It is the most common route of administration but not recommended (joints, bong, pipes, etc.).</li> <li>Combustion at 600–900 °C produces toxic byproducts: tar, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), carbon monoxide (CO), and ammonia (NH<sub>3</sub>).</li> <li>Chronic use is associated with respiratory symptoms (bronchitis, cough, phlegm) but not with lung cancer or COPD (if cannabis only).</li> <li>Patients may mix with tobacco, increasing respiratory/cancer risk.</li> <li>30–50% of cannabis is lost in 'side-stream' smoke.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Heat cannabis at 160–230 °C reduces CO, but PAHs are not eliminated.</li> <li>Vaporization produces significantly fewer harmful byproducts than smoking.</li> <li>Reduced pulmonary symptoms were reported compared to smoking.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oils, capsules and other oral routes are becoming increasingly popular due to the convenience and accuracy of dosing.</li> <li>Edibles (brownies/cookies) can be more difficult to dose.</li> <li>Juicing and cannabis teas do not allow for adequate decarboxylation of the raw plant.</li> <li>Tinctures and lozenges with limited research.</li> <li>Intermediate onset</li> </ul>	<p>Nabiximols oral spray is currently the only cannabis-based prescription that delivers a standardized dosage of CBD/THC in a 1:1 ratio with extensive research.</p>	<p>Topical is ideal for localized symptoms (dermatological conditions, arthritis), with limited research evidence.</p>
	Clinical effects	Onset (min) Duration (h)	5–10 min 2–4 h		60–180 min 6–8 h	15–45 min 6–8 h
Advantages		Rapid action benefits acute or episodic symptoms (nausea/pain).		Less odor, convenient and discreet, prolonged effect. Advantage for chronic disease/symptoms.	Pharmaceutical form (nabiximols) available, with documented efficacy and safety.	Less systemic effect, suitable for localized symptoms.
Disadvantages		Dexterity is required, vaporizers may be expensive, and not all are portable.		Titration challenges due to delayed onset.	Expensive, spotty availability.	Only local effects.

**Table 2.** Adverse events mainly associated with THC content in cannabis-based medicin

Side Effect	Most Common	Common	Rare
Drowsiness/fatigue	×		
Dizziness	×		
Cough, phlegm, bronchitis (smoking only)	×		
Anxiety	×		
Nausea	×		
Cognitive effects	×		
Euphoria		×	
Blurred vision		×	
Headache		×	
Orthostatic hypotension			×
Toxic psychosis/paranoia			×
Depression			×
Ataxia/dyscoordination			×
Tachycardia (after titration)			×
Cannabis hyperemesis			×
Diarrhea			×

**Table 3.** Summary of clinical trials evaluating cannabinoids in postoperative pain

Type and Design of the Study	Subjects	Surgical Procedure	Primary Outcome	Postoperative Analgesia	Cannabinoid Intervention	Main Results	Reference
RCT (double blind, placebo-controlled, crossover design)	56 patients	Acute Fracture or trauma	N/S	N/S	Levonatradol I.M. Preoperative regimen. Single injection: 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 mg.	Pain relief with the four doses; analgesia persisted for more than 6 h with the 2.5 and 3 mg doses.	Jain et al., 1981 [349]
Placebo-controlled, single-dose	100 patients	Renal surgery with lumbar incision	N/S	Noramidopyrine (metamizol), Camylofine (anti-cholinergic drug)	Levonatradol I.M. Postoperative regimen. Single injection: 1 and 2 mg.	No significant difference compared with placebo.	Guillaud et al., 1983 [348]
RCT (double blind, placebo-controlled, single dose, parallel)	40 patients	Elective abdominal hysterectomy	Pain scores	Morphine PCA	THC P.O. Postoperative regimen. Single dose: 5 mg.	No significant difference compared with placebo. Increased awareness of surroundings is more frequently reported with THC	Buggy et al., 2003 [259]
RCT (double-blind, placebo-controlled)	41 patients	Orthopedic, gynecology, urology, and plastic or general surgery	Opioid consumption at 24 h	Morphine PCA	Nabilone P.O. Preoperative and postoperative regimen. 1 and 2 mg.	No significant difference compared with placebo.	Beaulieu et al., 2006 [350]

Table 3. Cont.

Type and Design of the Study	Subjects	Surgical Procedure	Primary Outcome	Postoperative Analgesia	Cannabinoid Intervention	Main Results	Reference
RCT (double-blind, placebo-controlled)	100 patients	Radical retropubic prostatectomy	Opioid consumption at 48 h	Piritramide PCA	Dronabinol P.O. Preoperative (evening before operation) and postoperative until the morning of the 2nd postoperative day) regimen. 8 doses of 5 mg.	No significant difference between dronabinol and placebo groups in the self-administration of post-operative piritramide.	Seeling et al., 2006 [322]
Dose escalating study	65 patients	Various major Surgeries (included orthopedic, gynecologic, urology, plastics, and general)	N/S	Morphine PCA	Cannador P.O. Postoperative regimen. Single dose: 5, 10, 15 and 24 mg.	Significant dose-related improvements in rescue analgesia requirements in the 10 and 15 mg groups. Study ended because of a serious vasovagal adverse event in a patient receiving 15 mg.	Holdcroft et al., 2006 [347]
CT (double-blind, placebo-controlled)	112 patients	Third molar tooth extraction	Pain scores up to 10 h postsurgery	500 mg acetaminophen, 15 mg codeine phosphate	GW842166 P.O. Preoperative regimen. Single dose: 100 and 800 mg.	In comparison to ibuprofen, single doses of GW842166 (100 and 800 mg) failed to demonstrate clinically meaningful analgesia in the setting of acute dental pain.	Ostenfeld et al., 2011 [353]
RCT (double-blind, placebo-controlled)	150 patients	Removal of impacted lower third molar tooth	Area under the curve pain scores	1000 mg acetaminophen	AZD1940 P.O. Preoperative regimen. Single dose: 800 µg.	No significant differences compared with placebo.	Kalliomaki et al., 2013 [352]
RCT (double-blind, placebo-controlled)	99 patients	Arthroscopic rotator cuff repair	Pain scores Patient satisfaction with pain control Opioid consumption at days 1, 2, 7, and 14	5 mg oxycodone 325 mg acetaminophen	CBD P.O. Postoperative regimen. Repeated dose (three times a day, 14 days): 25 and 50 mg	Days 1 and 2: Lower pain score in the CBD group. Higher patient satisfaction with pain control. No statistical difference between groups in opioid consumption Days 7 and 14: No significant differences compared with placebo.	Alaia et al., 2022 [422]
RCT (double-blind, placebo-controlled)	80 patients	Total knee arthroplasty	Pain and sleep scores Cumulative postoperative opioid use	1000 mg acetaminophen 300 mg gabapentin 15 mg meloxicam 5 mg oxycodone	CBD topical. Postoperative regimen. Repeated dose (three times a day, 14 days): 120 mg /ounce	No significant differences compared with placebo.	Haffar et al., 2022 [421]
RCT (double-blind, placebo-controlled)	94 patients	Ureterscopy with stent placement for urinary stone disease	Pain scores Postoperative opioid use	5 mg oxycodone	CBD P.O. Postoperative regimen. Repeated dose (3 days): 20 mg	No significant differences compared with placebo.	Narang et al., 2023 [424]
RCT (double-blind, placebo-controlled)	83 patients (follow-up)	Arthroscopic rotator cuff repair	Pain scores Patient satisfaction with pain control Opioid consumption at 7 and 14 days	5 mg oxycodone 325 mg acetaminophen	CBD P.O. Postoperative regimen. Repeated dose (three times a day, 14 days): 25 and 50 mg	No significant differences compared with placebo.	Alaia et al., 2024 [423]

Note . AZD1940, peripherally restricted CB1r/CB2r agonist; Cannador, mixture of cannabinoid plant extracts containing predominantly THC and CBD (ratio 1:0.3–0.5); CBD, cannabidiol; GW842166, selective CB2r agonist; I.M. Intramuscular; P.O. Oral; PCA, patient-controlled analgesia; RCT: randomized controlled trial; THC, tetrahydrocannabinol.

**Table 4.** *Factors related to the lack of evidence regarding analgesia for postsurgical pain*

<b>Related to the symptoms</b>	<p>Postoperative pain is usually localized. In this context, the activation of the endocannabinoid system is minor compared to that in chronic pain, and cannabinoids are mainly associated with the relief of neuropathic pain.</p> <p>Pain assessment is highly subjective, and the quantification and comparison between study groups are generally inconclusive.</p>
<b>Related to the product</b>	<p>On the one hand, the composition of phytocannabinoids is very heterogeneous. On the other hand, studies of its components separately do not provide the same results as when the whole plant is analyzed.</p> <p>Human clinical trials on postoperative pain used almost exclusively THC or an analog.</p> <p>Few studies are testing a mixture of THC/CBD or CBD without THC in humans for the treatment of postoperative pain.</p> <p>Lack of knowledge about cannabinoid interaction (synergic, antagonistic, entourage effect).</p>
<b>Related to the administration route</b>	<p>In the systemic routes, the clinical doses seem limited by the appearance of side effects, primarily psychotropic.</p> <p>There is no record of perimedullary administration at the clinical level of cannabinoid compounds, with robust and proven analgesic preclinical evidence for this route of administration.</p>
<b>Related to the studies</b>	<p>Short-term duration (mostly single-dose administration and a short follow-up period).</p> <p>There is considerable variation in the doses and therapeutic guidelines employed.</p> <p>There are no 100% effective standard treatments against which to compare the effect of cannabinoids.</p> <p>A small number of patients in multiple operative settings.</p> <p>No homogenous groups (healthy patients, patients with diseases of different etiologies).</p>

## 10. References

1. Raja, S.N.; Carr, D.B.; Cohen, M.; Finnerup, N.B.; Flor, H.; Gibson, S.; Keefe, F.J.; Mogil, J.S.; Ringkamp, M.; Sluka, K.A.; et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. *Pain* **2020**, *161*, 1976–1982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Armstrong, S.A.; Herr, M.J. Physiology, Nociception. In *StatPearls*; StatPearls Publishing LLC: Treasure Island, FL, USA, 2024.
3. Attal, N.; Bouhassira, D.; Colvin, L. Advances and challenges in neuropathic pain: A narrative review and future directions. *Br. J. Anaesth.* **2023**, *131*, 79–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Brennan, T.J.; Zahn, P.K.; Pogatzki-Zahn, E.M. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol. Clin. N. Am.* **2005**, *23*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Treede, R.D.; Meyer, R.A.; Raja, S.N.; Campbell, J.N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog. Neurobiol.* **1992**, *38*, 397–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hug, C.C., Jr. Opioids: Clinical use as anesthetic agents. *J. Pain Symptom Manag.* **1992**, *7*, 350–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Peponis, T.; Kaafarani, H.M.A. What Is the Proper Use of Opioids in the Postoperative Patient? *Adv. Surg.* **2017**, *51*, 77–87. [[CrossRef](#)]
8. Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **1990**, *346*, 561–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Manchikanti, L.; Kaye, A.M.; Knezevic, N.N.; McAnally, H.; Slavin, K.; Trescot, A.M.; Blank, S.; Pampati, V.; Abdi, S.; Grider, J.S.; et al. Responsible, Safe, and Effective Prescription of Opioids for Chronic Non-Cancer Pain: American Society of Interventional Pain Physicians (ASIPP) Guidelines. *Pain Physician* **2017**, *20*, S3–S92. [[CrossRef](#)]
10. Alexander, J.C.; Patel, B.; Joshi, G.P. Perioperative use of opioids: Current controversies and concerns. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2019**, *33*, 341–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hah, J.M.; Bateman, B.T.; Ratliff, J.; Curtin, C.; Sun, E. Chronic Opioid Use After Surgery: Implications for Perioperative Management in the Face of the Opioid Epidemic. *Anesth. Analg.* **2017**, *125*, 1733–1740. [[CrossRef](#)]
12. Quinlan, J.; Lobo, D.N.; Levy, N. Postoperative pain management: Time to get back on track. *Anaesthesia* **2020**, *75* (Suppl. S1), e10–e13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mechoulam, R.; Hanus, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 1–13. [[CrossRef](#)]
14. Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **1993**, *365*, 61–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **1992**, *258*, 1946–1949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R.; et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Di, M.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L. Endocannabinoids: New targets for drug development. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 1361–1380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Romero-Sandoval, A.; Eisenach, J.C. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology* **2007**, *106*, 787–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Alkaitis, M.S.; Solorzano, C.; Landry, R.P.; Piomelli, D.; DeLeo, J.A.; Romero-Sandoval, E.A. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Howlett, A.C.; Barth, F.; Bonner, T.I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.A.; Felder, C.C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B.R.; et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mukhopadhyay, S.; Shim, J.Y.; Assi, A.A.; Norford, D.; Howlett, A.C. CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor-G protein association: A possible mechanism for differential signaling. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *121*, 91–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Guindon, J.; Hohmann, A.G. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors: A therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 319–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Walker, J.M.; Huang, S.M. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *95*, 127–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 89–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Malan, P.T., Jr.; Ibrahim, M.M.; Deng, H.; Liu, Q.; Mata, H.P.; Vanderah, T.; Porreca, F.; Makriyannis, A. CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* **2001**, *93*, 239–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Clayton, N.; Marshall, F.H.; Bountra, C.; O'Shaughnessy, C.T. CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain* **2002**, *96*, 253–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ibrahim, M.M.; Deng, H.; Zvonok, A.; Cockayne, D.A.; Kwan, J.; Mata, H.P.; Vanderah, T.W.; Lai, J.; Porreca, F.; Makriyannis, A.; et al. Activation of CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10529–10533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ibrahim, M.M.; Porreca, F.; Lai, J.; Albrecht, P.J.; Rice, F.L.; Khodorova, A.; Davar, G.; Makriyannis, A.; Vanderah, T.W.; Mata, H.P.; et al. CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3093–3098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nackley, A.G.; Makriyannis, A.; Hohmann, A.G. Selective activation of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* **2003**, *119*, 747–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hohmann, A.G.; Farthing, J.N.; Zvonok, A.M.; Makriyannis, A. Selective activation of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors suppresses hyperalgesia evoked by intradermal capsaicin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 446–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Scott, D.A.; Wright, C.E.; Angus, J.A. Evidence that CB-1 and CB-2 cannabinoid receptors mediate antinociception in neuropathic pain in the rat. *Pain* **2004**, *109*, 124–131. [[CrossRef](#)]
32. Valenzano, K.J.; Tafesse, L.; Lee, G.; Harrison, J.E.; Boulet, J.M.; Gottshall, S.L.; Mark, L.; Pearson, M.S.; Miller, W.; Shan, S.; et al. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 658–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sampson, P.B. Phytocannabinoid Pharmacology: Medicinal Properties of Cannabis sativa Constituents Aside from the “Big Two”. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 142–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Taura, F.; Sirikantaramas, S.; Shoyama, Y.; Yoshikai, K.; Shoyama, Y.; Morimoto, S. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotypedetermining enzyme in the fiber-type Cannabis sativa. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2929–2934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Radwan, M.M.; Chandra, S.; Gul, S.; ElSohly, M.A. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules* **2021**, *26*, 2774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. McPartland, J.M. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2018**, *3*, 203–212. [[CrossRef](#)]
37. Mechoulam, R. *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, 1st ed.; Mechoulam, R., Ed.; Chapman and Hall/CRC: New York, NY, USA, 1986; p. 186. [[CrossRef](#)]
38. Abel, E.L. *Marihuana, the First Twelve Thousand Years*; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 1982; p. 304.
39. Mehmedic, Z.; Chandra, S.; Slade, D.; Denham, H.; Foster, S.; Patel, A.S.; Ross, S.A.; Khan, I.A.; ElSohly, M.A. Potency trends of Delta<sup>9</sup>-THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *J. Forensic Sci.* **2010**, *55*, 1209–1217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Al Ubeed, H.M.S.; Bhuyan, D.J.; Alsherbiny, M.A.; Basu, A.; Vuong, Q.V. A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Cannabis. *Molecules* **2022**, *27*, 604. [[CrossRef](#)]
41. Abood, M.E.; Martin, B.R. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 201–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Pertwee, R.G. The diverse CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 199–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hanus, L.O.; Hod, Y. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Med. Cannabis Cannabinoids* **2020**, *3*, 25–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mechoulam, R. Marihuana chemistry. *Science* **1970**, *168*, 1159–1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Martin, B.R. Structural requirements for cannabinoid-induced antinociceptive activity in mice. *Life Sci.* **1985**, *36*, 1523–1530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, L.; Hong, P.J.; May, C.; Rehman, Y.; Oparin, Y.; Hong, C.J.; Hong, B.Y.; AminiLari, M.; Gallo, L.; Kaushal, A.; et al. Medical cannabis or cannabinoids for chronic non-cancer and cancer related pain: A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ* **2021**, *374*, n1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lynch, M.E.; Campbell, F. Cannabinoids for treatment of chronic non-cancer pain; a systematic review of randomized trials. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72*, 735–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Strand, N.; D'Souza, R.S.; Karri, J.; Kalia, H.; Weisbein, J.; Kassa, B.J.; Hussain, N.; Chitneni, A.; Budwany, R.R.; Hagedorn, J.; et al. Medical Cannabis: A Review from the American Society of Pain and Neuroscience. *J. Pain Res.* **2023**, *16*, 4217–4228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Abrams, D.I.; Jay, C.A.; Shade, S.B.; Vizoso, H.; Reda, H.; Press, S.; Kelly, M.E.; Rowbotham, M.C.; Petersen, K.L. Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: A randomized placebo-controlled trial. *Neurology* **2007**, *68*, 515–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Andraea, M.H.; Carter, G.M.; Shaparin, N.; Suslov, K.; Ellis, R.J.; Ware, M.A.; Abrams, D.I.; Prasad, H.; Wilsey, B.; Indyk, D.; et al. Inhaled Cannabis for Chronic Neuropathic Pain: A Meta-analysis of Individual Patient Data. *J. Pain* **2015**, *16*, 1221–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Ellis, R.J.; Toperoff, W.; Vaida, F.; van den Brande, G.; Gonzales, J.; Gouaux, B.; Bentley, H.; Atkinson, J.H. Smoked medicinal cannabis for neuropathic pain in HIV: A randomized, crossover clinical trial. *Neuropsychopharmacology* **2009**, *34*, 672–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wallace, M.S.; Marcotte, T.D.; Umlauf, A.; Gouaux, B.; Atkinson, J.H. Efficacy of Inhaled Cannabis on Painful Diabetic Neuropathy. *J. Pain* **2015**, *16*, 616–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ware, M.A.; Wang, T.; Shapiro, S.; Robinson, A.; Ducruet, T.; Huynh, T.; Gamsa, A.; Bennett, G.J.; Collet, J.P. Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: A randomized controlled trial. *Can. Med. Assoc. J.* **2010**, *182*, E694–E701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wilsey, B.; Marcotte, T.; Tsodikov, A.; Millman, J.; Bentley, H.; Gouaux, B.; Fishman, S. A randomized, placebo-controlled, crossover trial of cannabis cigarettes in neuropathic pain. *J. Pain* **2008**, *9*, 506–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bakheit, A.M. The pharmacological management of post-stroke muscle spasticity. *Drugs Aging* **2012**, *29*, 941–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Koppel, B.S.; Brust, J.C.; Fife, T.; Bronstein, J.; Youssof, S.; Gronseth, G.; Gloss, D. Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2014**, *82*, 1556–1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Passie, T.; Emrich, H.M.; Karst, M.; Brandt, S.D.; Halpern, J.H. Mitigation of post-traumatic stress symptoms by Cannabis resin: A review of the clinical and neurobiological evidence. *Drug Test. Anal.* **2012**, *4*, 649–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. McGeeney, B.E. Cannabinoids and hallucinogens for headache. *Headache* **2013**, *53*, 447–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Chang, A.E.; Shiling, D.J.; Stillman, R.C.; Goldberg, N.H.; Seipp, C.A.; Barofsky, I.; Rosenberg, S.A. A prospective evaluation of delta-9-tetrahydrocannabinol as an antiemetic in patients receiving adriamycin and cytoxan chemotherapy. *Cancer* **1981**, *47*, 1746–1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Naftali, T.; Mechulam, R.; Lev, L.B.; Konikoff, F.M. Cannabis for inflammatory bowel disease. *Dig. Dis.* **2014**, *32*, 468–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Schierenbeck, T.; Riemann, D.; Berger, M.; Hornyak, M. Effect of illicit recreational drugs upon sleep: Cocaine, ecstasy and marijuana. *Sleep Med. Rev.* **2008**, *12*, 381–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ware, M.A.; Fitzcharles, M.A.; Joseph, L.; Shir, Y. The effects of nabilone on sleep in fibromyalgia: Results of a randomized controlled trial. *Anesth. Analg.* **2010**, *110*, 604–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Cohen, P.J. Medical marijuana: The conflict between scientific evidence and political ideology. Part two of two. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2009**, *23*, 120–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hall, W.; Stjepanovic, D.; Caulkins, J.; Lynskey, M.; Leung, J.; Campbell, G.; Degenhardt, L. Public health implications of legalising the production and sale of cannabis for medicinal and recreational use. *Lancet* **2019**, *394*, 1580–1590. [[CrossRef](#)]
65. Shover, C.L.; Humphreys, K. Six policy lessons relevant to cannabis legalization. *Am. J. Drug Alcohol Abus.* **2019**, *45*, 698–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Goodman, S.; Wadsworth, E.; Leos-Toro, C.; Hammond, D.; International Cannabis Policy Study Team. Prevalence and forms of cannabis use in legal vs. illegal recreational cannabis markets. *Int. J. Drug Policy* **2020**, *76*, 102658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Hall, W.; Lynskey, M. Assessing the public health impacts of legalizing recreational cannabis use: The US experience. *World Psychiatry* **2020**, *19*, 179–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Tashkin, D.P. Effects of marijuana smoking on the lung. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2013**, *10*, 239–247. [[CrossRef](#)]
69. Wu, T.C.; Tashkin, D.P.; Djahed, B.; Rose, J.E. Pulmonary hazards of smoking marijuana as compared with tobacco. *N. Engl. J. Med.* **1988**, *318*, 347–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 873–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Mechoulam, R.; Parker, L.A. The endocannabinoid system and the brain. *Annu. Rev. Psychol.* **2013**, *64*, 21–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Zou, S.; Kumar, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 833. [[CrossRef](#)]

73. Hillard, C.J. The Endocannabinoid Signaling System in the CNS: A Primer. *Int. Rev. Neurobiol.* **2015**, *125*, 1–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Pacher, P.; Kogan, N.M.; Mechoulam, R. Beyond THC and Endocannabinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2020**, *60*, 637–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Finn, D.P. Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: Physiological and pathophysiological significance. *Immunobiology* **2010**, *215*, 629–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. De Laurentiis, A.; Correa, F.; Fernandez Solari, J. Endocannabinoid System in the Neuroendocrine Response to Lipopolysaccharide-induced Immune Challenge. *J. Endocr. Soc.* **2022**, *6*, bvac120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Varvel, S.A.; Lichtman, A.H. Evaluation of CB<sub>1</sub> receptor knockout mice in the Morris water maze. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 915–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Marsicano, G.; Wotjak, C.T.; Azad, S.C.; Bisogno, T.; Rammes, G.; Cascio, M.G.; Hermann, H.; Tang, J.; Hofmann, C.; Zieglgansberger, W.; et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **2002**, *418*, 530–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Martin, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Maldonado, R.; Valverde, O. Involvement of CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology* **2002**, *159*, 379–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Tan, H.; Ahmad, T.; Loureiro, M.; Zunder, J.; Laviolette, S.R. The role of cannabinoid transmission in emotional memory formation: Implications for addiction and schizophrenia. *Front. Psychiatry* **2014**, *5*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Di Marzo, V.; Goparaju, S.K.; Wang, L.; Liu, J.; Batkai, S.; Jarai, Z.; Fezza, F.; Miura, G.I.; Palmiter, R.D.; Sugiura, T.; et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **2001**, *410*, 822–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Maccarrone, M.; Bari, M.; Battista, N.; Finazzi-Agro, A. Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2002**, *1*, 53–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Nagarkatti, P.; Pandey, R.; Rieder, S.A.; Hegde, V.L.; Nagarkatti, M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 1333–1349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hogestatt, E.D.; Zymunt, P.M. Cardiovascular pharmacology of anandamide. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2002**, *66*, 343–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. O'Sullivan, S.E. Endocannabinoids and the Cardiovascular System in Health and Disease. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; Volume 231, pp. 393–422. [[CrossRef](#)]
86. Li, C.; Jones, P.M.; Persaud, S.J. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *129*, 307–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Bellocchio, L.; Cervino, C.; Pasquali, R.; Pagotto, U. The endocannabinoid system and energy metabolism. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 850–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Taylor, A.H.; Amoako, A.A.; Bambang, K.; Karasu, T.; Gebeh, A.; Lam, P.M.; Marzcylo, T.H.; Konje, J.C. Endocannabinoids and pregnancy. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 921–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Correa, F.; Wolfson, M.L.; Valchi, P.; Aisemberg, J.; Franchi, A.M. Endocannabinoid system and pregnancy. *Reproduction* **2016**, *152*, R191–R200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Guindon, J.; Hohmann, A.G. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2009**, *8*, 403–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Zogopoulos, P.; Vasileiou, I.; Patsouris, E.; Theocharis, S.E. The role of endocannabinoids in pain modulation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2013**, *27*, 64–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Finn, D.P.; Haroutounian, S.; Hohmann, A.G.; Krane, E.; Soliman, N.; Rice, A.S.C. Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: A review of preclinical studies. *Pain* **2021**, *162*, S5–S25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Toth, B.I.; Dobrosi, N.; Dajnoki, A.; Czifra, G.; Olah, A.; Szollosi, A.G.; Juhasz, I.; Sugawara, K.; Paus, R.; Biro, T. Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J. Invest. Dermatol.* **2011**, *131*, 1095–1104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Costa, L.; Moreia-Pinto, B.; Felgueira, E.; Ribeiro, A.; Rebelo, I.; Fonseca, B.M. The major endocannabinoid anandamide (AEA) induces apoptosis of human granulosa cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2021**, *171*, 102311. [[CrossRef](#)]
95. De Petrocellis, L.; Cascio, M.G.; Di Marzo, V. The endocannabinoid system: A general view and latest additions. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 765–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Cristino, L.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **2020**, *16*, 9–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Rezende, B.; Alencar, A.K.N.; de Bem, G.F.; Fontes-Dantas, F.L.; Montes, G.C. Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Baker, D.; Pryce, G.; Giovannoni, G.; Thompson, A.J. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 291–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

99. Castillo, P.E.; Younts, T.J.; Chavez, A.E.; Hashimoto, Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* **2012**, *76*, 70–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Nomura, D.K.; Morrison, B.E.; Blankman, J.L.; Long, J.Z.; Kinsey, S.G.; Marcondes, M.C.; Ward, A.M.; Hahn, Y.K.; Lichtman, A.H.; Conti, B.; et al. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science* **2011**, *334*, 809–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Katona, I.; Freund, T.F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **2012**, *35*, 529–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Ligresti, A.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 1593–1659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Pertwee, R.G.; Howlett, A.C.; Abood, M.E.; Alexander, S.P.; Di Marzo, V.; Elphick, M.R.; Greasley, P.J.; Hansen, H.S.; Kunos, G.; Mackie, K.; et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 588–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Gomes, I.; Grushko, J.S.; Golebiewska, U.; Hoogendoorn, S.; Gupta, A.; Heimann, A.S.; Ferro, E.S.; Scarlata, S.; Fricker, L.D.; Devi, L.A. Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. *FASEB J.* **2009**, *23*, 3020–3029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Bauer, M.; Chicca, A.; Tamborini, M.; Eisen, D.; Lerner, R.; Lutz, B.; Poetz, O.; Pluschke, G.; Gertsch, J. Identification and quantification of a new family of peptide endocannabinoids (Pepcans) showing negative allosteric modulation at CB<sub>1</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36944–36967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wei, F.; Zhao, L.; Jing, Y. Signaling molecules targeting cannabinoid receptors: Hemopressin and related peptides. *Neuropeptides* **2020**, *79*, 101998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Fine, P.G.; Rosenfeld, M.J. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides Med. J.* **2013**, *4*, e0022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Garcia-Ovejero, D.; Arevalo-Martin, A.; Petrosino, S.; Docagne, F.; Hagen, C.; Bisogno, T.; Watanabe, M.; Guaza, C.; Di Marzo, V.; Molina-Holgado, E. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *33*, 57–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Ahmed, M.M.; Rajpal, S.; Sweeney, C.; Gerovac, T.A.; Allcock, B.; McChesney, S.; Patel, A.U.; Tilghman, J.I.; Miranpuri, G.S.; Resnick, D.K. Cannabinoid subtype-2 receptors modulate the antihyperalgesic effect of WIN 55,212-2 in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Spine J.* **2010**, *10*, 1049–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Sagar, D.R.; Gaw, A.G.; Okine, B.N.; Woodhams, S.G.; Wong, A.; Kendall, D.A.; Chapman, V. Dynamic regulation of the endocannabinoid system: Implications for analgesia. *Mol. Pain* **2009**, *5*, 59. [[CrossRef](#)]
111. Svizenska, I.; Dubovy, P.; Sulcova, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures—A short review. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2008**, *90*, 501–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Racz, I.; Nadal, X.; Alferink, J.; Banos, J.E.; Rehnelt, J.; Martin, M.; Pintado, B.; Gutierrez-Adan, A.; Sanguino, E.; Manzanares, J.; et al. Crucial role of CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 12125–12135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Benito, C.; Nunez, E.; Tolon, R.M.; Carrier, E.J.; Rabano, A.; Hillard, C.J.; Romero, J. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 11136–11141. [[CrossRef](#)]
114. Van Sickle, M.D.; Duncan, M.; Kingsley, P.J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J.S.; et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors. *Science* **2005**, *310*, 329–332. [[CrossRef](#)]
115. Kibret, B.G.; Ishiguro, H.; Horiuchi, Y.; Onaivi, E.S. New Insights and Potential Therapeutic Targeting of CB<sub>2</sub> Cannabinoid Receptors in CNS Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Abuhasira, R.; Shbiro, L.; Landschaft, Y. Medical use of cannabis and cannabinoids containing products—Regulations in Europe and North America. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, *49*, 2–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Arnold, J.C.; Nation, T.; McGregor, I.S. Prescribing medicinal cannabis. *Aust. Prescr.* **2020**, *43*, 152–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Ward, S.J.; Lichtman, A.H.; Piomelli, D.; Parker, L.A. Cannabinoids and Cancer Chemotherapy-Associated Adverse Effects. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2021**, *2021*, 78–85. [[CrossRef](#)]
119. Cunningham, D.; Bradley, C.J.; Forrest, G.J.; Hutcheon, A.W.; Adams, L.; Sneddon, M.; Harding, M.; Kerr, D.J.; Soukop, M.; Kaye, S.B. A randomized trial of oral nabilone and prochlorperazine compared to intravenous metoclopramide and dexamethasone in the treatment of nausea and vomiting induced by chemotherapy regimens containing cisplatin or cisplatin analogues. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1988**, *24*, 685–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

120. Tsang, C.C.; Giudice, M.G. Nabilone for the Management of Pain. *Pharmacotherapy* **2016**, *36*, 273–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Wissel, J.; Haydn, T.; Muller, J.; Brenneis, C.; Berger, T.; Poewe, W.; Schelosky, L.D. Low dose treatment with the synthetic cannabinoid Nabilone significantly reduces spasticity-related pain: A double-blind placebo-controlled cross-over trial. *J. Neurol.* **2006**, *253*, 1337–1341. [[CrossRef](#)]
122. Walitt, B.; Klose, P.; Fitzcharles, M.A.; Phillips, T.; Hauser, W. Cannabinoids for fibromyalgia. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, *7*, CD011694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Badowski, M.E.; Yanful, P.K. Dronabinol oral solution in the management of anorexia and weight loss in AIDS and cancer. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2018**, *14*, 643–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Bar-Sela, G.; Zalman, D.; Semenysty, V.; Ballan, E. The Effects of Dosage-Controlled Cannabis Capsules on Cancer-Related Cachexia and Anorexia Syndrome in Advanced Cancer Patients: Pilot Study. *Integr. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 1534735419881498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Abu-Sawwa, R.; Stehling, C. Epidiolex (Cannabidiol) Primer: Frequently Asked Questions for Patients and Caregivers. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* **2020**, *25*, 75–77. [[CrossRef](#)]
126. Sekar, K.; Pack, A. Epidiolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: A comprehensive review with a focus on adverse effects. *F1000Res* **2019**, *8*, F1000 Faculty Rev-234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Conte, A.; Vila Silvan, C. Review of Available Data for the Efficacy and Effectiveness of Nabiximols Oromucosal Spray (Sativex(R)) in Multiple Sclerosis Patients with Moderate to Severe Spasticity. *Neurodegener. Dis.* **2021**, *21*, 55–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Meuth, S.G.; Henze, T.; Essner, U.; Trompke, C.; Vila Silvan, C. Tetrahydrocannabinol and cannabidiol oromucosal spray in resistant multiple sclerosis spasticity: Consistency of response across subgroups from the SAVANT randomized clinical trial. *Int. J. Neurosci.* **2020**, *130*, 1199–1205. [[CrossRef](#)]
129. Perez, J.; Ribera, M.V. Managing neuropathic pain with Sativex: A review of its pros and cons. *Expert Opin. Pharmacother.* **2008**, *9*, 1189–1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Tonstad, S. Rimonabant: A cannabinoid receptor blocker for the treatment of metabolic and cardiovascular risk factors. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2006**, *16*, 156–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Wierzbicki, A.S. Rimonabant: Endocannabinoid inhibition for the metabolic syndrome. *Int. J. Clin. Pract.* **2006**, *60*, 1697–1706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Almeida, T.F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. *Brain Res.* **2004**, *1000*, 40–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. D’Mello, R.; Dickenson, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* **2008**, *101*, 8–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Basbaum, A.I.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **2009**, *139*, 267–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Ji, R.R.; Nackley, A.; Huh, Y.; Terrando, N.; Maixner, W. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology* **2018**, *129*, 343–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Millan, M.J. The induction of pain: An integrative review. *Prog. Neurobiol.* **1999**, *57*, 1–164. [[CrossRef](#)]
137. Chapman, C.R.; Tuckett, R.P.; Song, C.W. Pain and stress in a systems perspective: Reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. *J. Pain* **2008**, *9*, 122–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Rittner, H.L.; Brack, A.; Stein, C. Pain and the immune system. *Br. J. Anaesth.* **2008**, *101*, 40–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Ren, K.; Dubner, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1267–1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Pogatzki-Zahn, E.M.; Segelcke, D.; Schug, S.A. Postoperative pain-from mechanisms to treatment. *Pain Rep.* **2017**, *2*, e588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Hillard, C.J.; Beatka, M.; Sarvaideo, J. Endocannabinoid Signaling and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Compr. Physiol.* **2016**, *7*, 1–15. [[CrossRef](#)]
142. Imbe, H.; Iwai-Liao, Y.; Senba, E. Stress-induced hyperalgesia: Animal models and putative mechanisms. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 2179–2192. [[CrossRef](#)]
143. Gangadharan, V.; Kuner, R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Dis. Models Mech.* **2013**, *6*, 889–895. [[CrossRef](#)]
144. Latremoliere, A.; Woolf, C.J. Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain* **2009**, *10*, 895–926. [[CrossRef](#)]
145. Costigan, M.; Scholz, J.; Woolf, C.J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci.* **2009**, *32*, 1–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Besson, J.M. The neurobiology of pain. *Lancet* **1999**, *353*, 1610–1615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

147. Levy, D. Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: The role of immunovascular interactions and cortical spreading depression. *Curr. Pain Headache Rep.* **2012**, *16*, 270–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Torta, D.M.E.; Van Den Broeke, E.N.; Filbrich, L.; Jacob, B.; Lambert, J.; Mouraux, A. Intense pain influences the cortical processing of visual stimuli projected onto the sensitized skin. *Pain* **2017**, *158*, 691–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Chapman, C.R.; Vierck, C.J. The Transition of Acute Postoperative Pain to Chronic Pain: An Integrative Overview of Research on Mechanisms. *J. Pain* **2017**, *18*, 359.e1–359.e38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Ellis, A.; Bennett, D.L. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br. J. Anaesth.* **2013**, *111*, 26–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Matsuda, M.; Huh, Y.; Ji, R.R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *J. Anesth.* **2019**, *33*, 131–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Ho, I.H.T.; Chan, M.T.V.; Wu, W.K.K.; Liu, X. Spinal microglia-neuron interactions in chronic pain. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *108*, 1575–1592. [[CrossRef](#)]
153. Zahn, P.K.; Brennan, T.J. Lack of effect of intrathecally administered N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. *Anesthesiology* **1998**, *88*, 143–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Zahn, P.K.; Umali, E.; Brennan, T.J. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain* **1998**, *74*, 213–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Yamamoto, T.; Sakashita, Y. The role of the spinal opioid receptor like1 receptor, the NK-1 receptor, and cyclooxygenase-2 in maintaining postoperative pain in the rat. *Anesth. Analg.* **1999**, *89*, 1203–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Zhu, X.; Conklin, D.; Eisenach, J.C. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord plays an important role in postoperative pain. *Pain* **2003**, *104*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Porreca, F.; Ossipov, M.H.; Gebhart, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 319–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Pogatzki, E.M.; Urban, M.O.; Brennan, T.J.; Gebhart, G.F. Role of the rostral medial medulla in the development of primary and secondary hyperalgesia after incision in the rat. *Anesthesiology* **2002**, *96*, 1153–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Obata, H.; Eisenach, J.C.; Hussain, H.; Bynum, T.; Vincler, M. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J. Pain* **2006**, *7*, 816–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Wen, Y.R.; Tan, P.H.; Cheng, J.K.; Liu, Y.C.; Ji, R.R. Microglia: A promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance. *J. Formos. Med. Assoc.* **2011**, *110*, 487–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Tang, J.; Bair, M.; Descalzi, G. Reactive Astrocytes: Critical Players in the Development of Chronic Pain. *Front. Psychiatry* **2021**, *12*, 682056. [[CrossRef](#)]
162. Maldonado, R.; Banos, J.E.; Cabanero, D. The endocannabinoid system and neuropathic pain. *Pain* **2016**, *157* (Suppl. S1), S23–S32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Heifets, B.D.; Castillo, P.E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* **2009**, *71*, 283–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Di Marzo, V.; Petrosino, S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **2007**, *18*, 129–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Hill, M.N.; McEwen, B.S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2010**, *34*, 791–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Gorzalka, B.B.; Hill, M.N.; Hillard, C.J. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: Implications for stress-related affective disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2008**, *32*, 1152–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Bradshaw, H.B.; Walker, J.M. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 459–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Hohmann, A.G.; Suplita, R.L., 2nd. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* **2006**, *8*, E693–E708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Murphy, L.L.; Munoz, R.M.; Adrian, B.A.; Villanua, M.A. Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion. *Neurobiol. Dis.* **1998**, *5*, 432–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Pertwee, R.G. Cannabinoid receptor ligands: Clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2000**, *9*, 1553–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Wootten, D.; Christopoulos, A.; Marti-Solano, M.; Babu, M.M.; Sexton, P.M. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 638–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Nevalainen, T.; Irving, A.J. GPR55, a lysophosphatidylinositol receptor with cannabinoid sensitivity? *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 799–813. [[CrossRef](#)]
173. Ross, R.A. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 156–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

174. Lauckner, J.E.; Jensen, J.B.; Chen, H.Y.; Lu, H.C.; Hille, B.; Mackie, K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2699–2704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjogren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1092–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Irving, A.; Abdulrazzaq, G.; Chan, S.L.F.; Penman, J.; Harvey, J.; Alexander, S.P.H. Cannabinoid Receptor-Related Orphan G Protein-Coupled Receptors. *Adv. Pharmacol.* **2017**, *80*, 223–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. LoVerme, J.; Russo, R.; La Rana, G.; Fu, J.; Farthing, J.; Mattace-Raso, G.; Meli, R.; Hohmann, A.; Calignano, A.; Piomelli, D. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 1051–1061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Guzman, M.; Lo Verme, J.; Fu, J.; Oveisi, F.; Blazquez, C.; Piomelli, D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27849–27854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. O’Sullivan, S.E.; Kendall, D.A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* **2010**, *215*, 611–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Matsuda, L.A. Molecular aspects of cannabinoid receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* **1997**, *11*, 143–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Sun, Y.; Bennett, A. Cannabinoids: A new group of agonists of PPARs. *PPAR Res.* **2007**, *2007*, 23513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Singh Tahim, A.; Santha, P.; Nagy, I. Inflammatory mediators convert anandamide into a potent activator of the vanilloid type 1 transient receptor potential receptor in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* **2005**, *136*, 539–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Holzer, P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 1145–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Lutz, B. Neurobiology of cannabinoid receptor signaling. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2020**, *22*, 207–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Deadwyler, S.A.; Hampson, R.E.; Bennett, B.A.; Edwards, T.A.; Mu, J.; Pacheco, M.A.; Ward, S.J.; Childers, S.R. Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Recept. Channels* **1993**, *1*, 121–134. [[PubMed](#)]
186. Gomez del Pulgar, T.; Velasco, G.; Guzman, M. The CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* **2000**, *347*, 369–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Galve-Roperh, I.; Rueda, D.; Gomez del Pulgar, T.; Velasco, G.; Guzman, M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1385–1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Molina-Holgado, F.; Pinteaux, E.; Heenan, L.; Moore, J.D.; Rothwell, N.J.; Gibson, R.M. Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* **2005**, *28*, 189–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Karanian, D.A.; Brown, Q.B.; Makriyannis, A.; Kosten, T.A.; Bahr, B.A. Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 7813–7820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Karanian, D.A.; Karim, S.L.; Wood, J.T.; Williams, J.S.; Lin, S.; Makriyannis, A.; Bahr, B.A. Endocannabinoid enhancement protects against kainic acid-induced seizures and associated brain damage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 1059–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Hajos, N.; Katona, I.; Naiem, S.S.; MacKie, K.; Ledent, C.; Mody, I.; Freund, T.F. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 3239–3249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Kreitzer, A.C.; Regehr, W.G. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* **2001**, *29*, 717–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Ohno-Shosaku, T.; Maejima, T.; Kano, M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* **2001**, *29*, 729–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Wilson, R.I.; Kunos, G.; Nicoll, R.A. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* **2001**, *31*, 453–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Ozaita, A.; Puighermanal, E.; Maldonado, R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1105–1114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

196. Price, T.J.; Patwardhan, A.; Akopian, A.N.; Hargreaves, K.M.; Flores, C.M. Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonoyl-2-chloroethylamide. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 1118–1130. [[CrossRef](#)]
197. Fischbach, T.; Greffrath, W.; Nawrath, H.; Treede, R.D. Effects of anandamide and noxious heat on intracellular calcium concentration in nociceptive drg neurons of rats. *J. Neurophysiol.* **2007**, *98*, 929–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Lee, M.G.; Weinreich, D.; Udem, B.J. Effect of olvanil and anandamide on vagal C-fiber subtypes in guinea pig lung. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 596–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Patwardhan, A.M.; Jeske, N.A.; Price, T.J.; Gamper, N.; Akopian, A.N.; Hargreaves, K.M. The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11393–11398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Price, T.J.; Patwardhan, A.; Akopian, A.N.; Hargreaves, K.M.; Flores, C.M. Cannabinoid receptor-independent actions of the aminoalkylindole WIN 55,212-2 on trigeminal sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 257–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. McCarberg, B.H.; Barkin, R.L. The future of cannabinoids as analgesic agents: A pharmacologic, pharmacokinetic, and pharmacodynamic overview. *Am. J. Ther.* **2007**, *14*, 475–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Mbvundula, E.C.; Rainsford, K.D.; Bunning, R.A. Cannabinoids in pain and inflammation. *Inflammopharmacology* **2004**, *12*, 99–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Jeske, N.A.; Patwardhan, A.M.; Gamper, N.; Price, T.J.; Akopian, A.N.; Hargreaves, K.M. Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32879–32890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Jordt, S.E.; Bautista, D.M.; Chuang, H.H.; McKemy, D.D.; Zygmunt, P.M.; Hogestatt, E.D.; Meng, I.D.; Julius, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **2004**, *427*, 260–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Liu, L.; Lo, Y.; Chen, I.; Simon, S.A. The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceryl nonamide. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 4101–4111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Ishac, E.J.; Jiang, L.; Lake, K.D.; Varga, K.; Abood, M.E.; Kunos, G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118*, 2023–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Kathmann, M.; Bauer, U.; Schlicker, E.; Gothert, M. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1999**, *359*, 466–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Nakazi, M.; Bauer, U.; Nickel, T.; Kathmann, M.; Schlicker, E. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, *361*, 19–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Wilson, R.I.; Nicoll, R.A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **2001**, *410*, 588–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Shen, M.; Piser, T.M.; Seybold, V.S.; Thayer, S.A. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 4322–4334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Barann, M.; Molderings, G.; Bruss, M.; Bonisch, H.; Urban, B.W.; Gothert, M. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: Probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *137*, 589–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Weidenfeld, J.; Feldman, S.; Mechoulam, R. Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology* **1994**, *59*, 110–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Steiner, M.A.; Wotjak, C.T. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Brain Res.* **2008**, *170*, 397–432. [[CrossRef](#)]
214. Iversen, L.; Chapman, V. Cannabinoids: A real prospect for pain relief? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2*, 50–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Welch, S.P.; Thomas, C.; Patrick, G.S. Modulation of cannabinoid-induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: Possible mechanisms for interaction with morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *272*, 310–321. [[PubMed](#)]
216. Martin, W.J.; Lai, N.K.; Patrick, S.L.; Tsou, K.; Walker, J.M. Antinociceptive actions of cannabinoids following intraventricular administration in rats. *Brain Res.* **1993**, *629*, 300–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Hohmann, A.G.; Tsou, K.; Walker, J.M. Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J. Neurophysiol.* **1999**, *81*, 575–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

218. Raffa, R.B.; Stone, D.J., Jr.; Hipp, S.J. Differential cholera-toxin sensitivity of supraspinal antinociception induced by the cannabinoid agonists delta<sup>9</sup>-THC, WIN 55,212-2 and anandamide in mice. *Neurosci. Lett.* **1999**, *263*, 29–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Strangman, N.M.; Patrick, S.L.; Hohmann, A.G.; Tsou, K.; Walker, J.M. Evidence for a role of endogenous cannabinoids in the modulation of acute and tonic pain sensitivity. *Brain Res.* **1998**, *813*, 323–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Welch, S.P.; Huffman, J.W.; Lowe, J. Differential blockade of the antinociceptive effects of centrally administered cannabinoids by SR141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *286*, 1301–1308. [[PubMed](#)]
221. Walker, J.M.; Huang, S.M.; Strangman, N.M.; Tsou, K.; Sanudo-Pena, M.C. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12198–12203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Richardson, J.D.; Aanonsen, L.; Hargreaves, K.M. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *345*, 145–153. [[CrossRef](#)]
223. Morisset, V.; Ahluwalia, J.; Nagy, I.; Urban, L. Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *429*, 93–100. [[CrossRef](#)]
224. Hohmann, A.G.; Tsou, K.; Walker, J.M. Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. *Neurosci. Lett.* **1998**, *257*, 119–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Richardson, J.D.; Aanonsen, L.; Hargreaves, K.M. Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 451–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Romero-Sandoval, A.; Nutile-McMenemy, N.; DeLeo, J.A. Spinal microglial and perivascular cell cannabinoid receptor type 2 activation reduces behavioral hypersensitivity without tolerance after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* **2008**, *108*, 722–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Xu, K.; Wu, Y.; Tian, Z.; Xu, Y.; Wu, C.; Wang, Z. Microglial Cannabinoid CB<sub>2</sub> Receptors in Pain Modulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Lichtman, A.H.; Martin, B.R. Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal alpha 2-noradrenergic mechanism. *Brain Res.* **1991**, *559*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Pugh, G., Jr.; Smith, P.B.; Dombrowski, D.S.; Welch, S.P. The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 608–616. [[PubMed](#)]
230. Fox, A.; Kesingland, A.; Gentry, C.; McNair, K.; Patel, S.; Urban, L.; James, I. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* **2001**, *92*, 91–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
231. Malan, T.P., Jr.; Ibrahim, M.M.; Lai, J.; Vanderah, T.W.; Makriyannis, A.; Porreca, F. CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor agonists: Pain relief without psychoactive effects? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, *3*, 62–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. Hanus, L.; Breuer, A.; Tchilibon, S.; Shiloah, S.; Goldenberg, D.; Horowitz, M.; Pertwee, R.G.; Ross, R.A.; Mechoulam, R.; Fride, E. HU-308: A specific agonist for CB<sub>2</sub>, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14228–14233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Malan, T.P., Jr.; Ibrahim, M.M.; Vanderah, T.W.; Makriyannis, A.; Porreca, F. Inhibition of pain responses by activation of CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *121*, 191–200. [[CrossRef](#)]
234. Ross, R.A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 790–801. [[CrossRef](#)]
235. Starowicz, K.; Finn, D.P. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv. Pharmacol.* **2017**, *80*, 437–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Durnett-Richardson, J. Cannabinoids Modulate Pain by Multiple Mechanisms of Action. *J. Pain* **2000**, *1*, 2–14. [[CrossRef](#)]
237. Bahr, B.A.; Karanian, D.A.; Makanji, S.S.; Makriyannis, A. Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2006**, *15*, 351–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Galve-Roperh, I.; Aguado, T.; Palazuelos, J.; Guzman, M. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 2279–2288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Wallace, M.J.; Blair, R.E.; Falenski, K.W.; Martin, B.R.; DeLorenzo, R.J. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 129–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Khaspekov, L.G.; Brenz Verca, M.S.; Frumkina, L.E.; Hermann, H.; Marsicano, G.; Lutz, B. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19*, 1691–1698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

241. Karanian, D.A.; Brown, Q.B.; Makriyannis, A.; Bahr, B.A. Blocking cannabinoid activation of FAK and ERK1/2 compromises synaptic integrity in hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *508*, 47–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Schomacher, M.; Muller, H.D.; Sommer, C.; Schwab, S.; Schabitz, W.R. Endocannabinoids mediate neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res.* **2008**, *1240*, 213–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Hohmann, A.G.; Suplita, R.L.; Bolton, N.M.; Neely, M.H.; Fegley, D.; Mangieri, R.; Krey, J.F.; Walker, J.M.; Holmes, P.V.; Crystal, J.D.; et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* **2005**, *435*, 1108–1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Meng, I.D.; Johansen, J.P. Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. *Neuroscience* **2004**, *124*, 685–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Finn, D.P.; Jhaveri, M.D.; Beckett, S.R.; Roe, C.H.; Kendall, D.A.; Marsden, C.A.; Chapman, V. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology* **2003**, *45*, 594–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Pertwee, R.G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 397–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Di Marzo, V. Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 438–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Izzo, A.A.; Camilleri, M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: Basic and clinical aspects. *Gut* **2008**, *57*, 1140–1155. [[CrossRef](#)]
249. Kearn, C.S.; Blake-Palmer, K.; Daniel, E.; Mackie, K.; Glass, M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB<sub>1</sub> and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: A mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1697–1704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Carriba, P.; Ortiz, O.; Patkar, K.; Justinova, Z.; Stroik, J.; Themann, A.; Muller, C.; Woods, A.S.; Hope, B.T.; Ciruela, F.; et al. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 2249–2259. [[CrossRef](#)]
251. Pertwee, R.G. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J.* **2005**, *7*, E625–E654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Di Marzo, V. Endocannabinoids: Synthesis and degradation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2008**, *160*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Katona, I.; Freund, T.F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 923–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. Margraf, A.; Ludwig, N.; Zarbock, A.; Rossaint, J. Systemic Inflammatory Response Syndrome After Surgery: Mechanisms and Protection. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1693–1707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
255. Richebe, P.; Capdevila, X.; Rivat, C. Persistent Postsurgical Pain: Pathophysiology and Preventative Pharmacologic Considerations. *Anesthesiology* **2018**, *129*, 590–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
256. Lavand'homme, P. The progression from acute to chronic pain. *Curr. Opin. Anesthesiol.* **2011**, *24*, 545–550. [[CrossRef](#)]
257. Bouhassira, D.; Lanteri-Minet, M.; Attal, N.; Laurent, B.; Touboul, C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* **2008**, *136*, 380–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
258. Rosenberger, D.C.; Pogatzki-Zahn, E.M. Chronic post-surgical pain-update on incidence, risk factors and preventive treatment options. *BJA Educ.* **2022**, *22*, 190–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
259. Kehlet, H.; Jensen, T.S.; Woolf, C.J. Persistent postsurgical pain: Risk factors and prevention. *Lancet* **2006**, *367*, 1618–1625. [[CrossRef](#)]
260. Fowler, C.J. Possible involvement of the endocannabinoid system in the actions of three clinically used drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 59–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
261. Smith, P.B.; Compton, D.R.; Welch, S.P.; Razdan, R.K.; Mechoulam, R.; Martin, B.R. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 219–227. [[PubMed](#)]
262. Calignano, A.; La Rana, G.; Giuffrida, A.; Piomelli, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* **1998**, *394*, 277–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
263. Lee, M.T.; Mackie, K.; Chiou, L.C. Alternative pain management via endocannabinoids in the time of the opioid epidemic: Peripheral neuromodulation and pharmacological interventions. *Br. J. Pharmacol.* **2023**, *180*, 894–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
264. Wolf, J.; Urits, I.; Orhurhu, V.; Peck, J.; Orhurhu, M.S.; Giacomazzi, S.; Smoots, D.; Piermarini, C.; Manchikanti, L.; Kaye, A.D.; et al. The Role of the Cannabinoid System in Pain Control: Basic and Clinical Implications. *Curr. Pain Headache Rep.* **2020**, *24*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
265. Haller, V.L.; Cichewicz, D.L.; Welch, S.P. Non-cannabinoid CB<sub>1</sub>, non-cannabinoid CB<sub>2</sub> antinociceptive effects of several novel compounds in the PPQ stretch test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *546*, 60–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

266. Agarwal, N.; Pacher, P.; Tegeder, I.; Amaya, F.; Constantin, C.E.; Brenner, G.J.; Rubino, T.; Michalski, C.W.; Marsicano, G.; Monory, K.; et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 870–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
267. Maione, S.; De Petrocellis, L.; de Novellis, V.; Moriello, A.S.; Petrosino, S.; Palazzo, E.; Rossi, F.S.; Woodward, D.F.; Di Marzo, V. Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 766–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
268. Costa, B.; Trovato, A.E.; Colleoni, M.; Giagnoni, G.; Zarini, E.; Croci, T. Effect of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist, SR141716, on nociceptive response and nerve demyelination in rodents with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain* **2005**, *116*, 52–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
269. Saez-Cassanelli, J.L.; Fontanella, G.H.; Delgado-Garcia, J.M.; Carrion, A.M. Functional blockage of the cannabinoid receptor type 1 evokes a kappa-opiate-dependent analgesia. *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 2629–2639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
270. Lunn, C.A.; Fine, J.S.; Rojas-Triana, A.; Jackson, J.V.; Fan, X.; Kung, T.T.; Gonsiorek, W.; Schwarz, M.A.; Lavey, B.; Kozłowski, J.A.; et al. A novel cannabinoid peripheral cannabinoid receptor-selective inverse agonist blocks leukocyte recruitment in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *316*, 780–788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
271. Croci, T.; Zarini, E. Effect of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist rimonabant on nociceptive responses and adjuvant-induced arthritis in obese and lean rats. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 559–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
272. Oka, S.; Wakui, J.; Ikeda, S.; Yanagimoto, S.; Kishimoto, S.; Gokoh, M.; Nasui, M.; Sugiura, T. Involvement of the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 8796–8805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
273. Azim, S.; Nicholson, J.; Rebecchi, M.J.; Galbavy, W.; Feng, T.; Reinsel, R.; Volkow, N.D.; Benveniste, H.; Kaczocha, M. Endocannabinoids and acute pain after total knee arthroplasty. *Pain* **2015**, *156*, 341–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
274. Pertwee, R.G. Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* **2001**, *63*, 569–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
275. Richardson, J.D.; Kilo, S.; Hargreaves, K.M. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB<sub>1</sub> receptors. *Pain* **1998**, *75*, 111–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
276. Martin, W.J.; Loo, C.M.; Basbaum, A.I. Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain* **1999**, *82*, 199–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
277. Rahn, E.J.; Hohmann, A.G. Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: From the bench to the bedside. *Neurotherapeutics* **2009**, *6*, 713–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
278. Bloom, A.S.; Dewey, W.L.; Harris, L.S.; Brosius, K.K. 9-nor-9beta-hydroxyhexahydrocannabinol, a cannabinoid with potent antinociceptive activity: Comparisons with morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1977**, *200*, 263–270. [[PubMed](#)]
279. Buxbaum, D.M. Analgesic activity of 9 -tetrahydrocannabinol in the rat and mouse. *Psychopharmacologia* **1972**, *25*, 275–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
280. Jacob, J.J.; Ramabadran, K.; Campos-Medeiros, M. A pharmacological analysis of levonantradol antinociception in mice. *J. Clin. Pharmacol.* **1981**, *21*, 327S–333S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
281. Walker, J.M.; Hohmann, A.G.; Martin, W.J.; Strangman, N.M.; Huang, S.M.; Tsou, K. The neurobiology of cannabinoid analgesia. *Life Sci.* **1999**, *65*, 665–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
282. Alsalem, M.; Altarifi, A.; Haddad, M.; Aldossary, S.A.; Kalbouneh, H.; Aldaoud, N.; Saleh, T.; El-Salem, K. Antinociceptive and Abuse Potential Effects of Cannabinoid/Opioid Combinations in a Chronic Pain Model in Rats. *Brain Sci.* **2019**, *9*, 328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
283. Maguire, D.R.; France, C.P. Antinociceptive effects of mixtures of mu opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists in rats: Impact of drug and fixed-dose ratio. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *819*, 217–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
284. Welch, S.P.; Stevens, D.L. Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *262*, 10–18. [[PubMed](#)]
285. Bloom, A.S.; Dewey, W.L. A comparison of some pharmacological actions of morphine and delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Psychopharmacology* **1978**, *57*, 243–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
286. Lichtman, A.H.; Smith, F.L.; Martin, B.R. Evidence that the antinociceptive tail-flick response is produced independently from changes in either tail-skin temperature or core temperature. *Pain* **1993**, *55*, 283–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
287. Smith, P.B.; Martin, B.R. Spinal mechanisms of delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol-induced analgesia. *Brain Res.* **1992**, *578*, 8–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
288. Thorat, S.N.; Bhargava, H.N. Evidence for a bidirectional cross-tolerance between morphine and delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *260*, 5–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
289. Cravatt, B.F.; Lichtman, A.H. The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J. Neurobiol.* **2004**, *61*, 149–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

290. Goya, P.; Jagerovic, N.; Hernandez-Folgado, L.; Martin, M.I. Cannabinoids and neuropathic pain. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 765–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
291. Bisogno, T.; Maurelli, S.; Melck, D.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3315–3323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
292. Di Marzo, V.; Blumberg, P.M.; Szallasi, A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, *12*, 372–379. [[CrossRef](#)]
293. Anand, U.; Otto, W.R.; Sanchez-Herrera, D.; Facer, P.; Yiangou, Y.; Korchev, Y.; Birch, R.; Benham, C.; Bountra, C.; Chessell, I.P.; et al. Cannabinoid receptor CB<sub>2</sub> localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain* **2008**, *138*, 667–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
294. Aviram, J.; Samuelly-Leichtag, G. Efficacy of Cannabis-Based Medicines for Pain Management: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain Physician* **2017**, *20*, E755–E796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
295. Petzke, F.; Tolle, T.; Fitzcharles, M.A.; Hauser, W. Cannabis-Based Medicines and Medical Cannabis for Chronic Neuropathic Pain. *CNS Drugs* **2022**, *36*, 31–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
296. Russo, E.B. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1614–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
297. Buggy, D.J.; Toogood, L.; Maric, S.; Sharpe, P.; Lambert, D.G.; Rowbotham, D.J. Lack of analgesic efficacy of oral delta-9-tetrahydrocannabinol in postoperative pain. *Pain* **2003**, *106*, 169–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
298. Kraft, B.; Frickey, N.A.; Kaufmann, R.M.; Reif, M.; Frey, R.; Gustorff, B.; Kress, H.G. Lack of analgesia by oral standardized cannabis extract on acute inflammatory pain and hyperalgesia in volunteers. *Anesthesiology* **2008**, *109*, 101–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
299. Naef, M.; Curatolo, M.; Petersen-Felix, S.; Arendt-Nielsen, L.; Zbinden, A.; Brenneisen, R. The analgesic effect of oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), morphine, and a THC-morphine combination in healthy subjects under experimental pain conditions. *Pain* **2003**, *105*, 79–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
300. Naef, M.; Russmann, S.; Petersen-Felix, S.; Brenneisen, R. Development and pharmacokinetic characterization of pulmoal and intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1176–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
301. Wallace, M.; Schulteis, G.; Atkinson, J.H.; Wolfson, T.; Lazzaretto, D.; Bentley, H.; Gouaux, B.; Abramson, I. Dose-dependent effects of smoked cannabis on capsaicin-induced pain and hyperalgesia in healthy volunteers. *Anesthesiology* **2007**, *107*, 785–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
302. Campbell, F.A.; Tramer, M.R.; Carroll, D.; Reynolds, D.J.; Moore, R.A.; McQuay, H.J. Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ* **2001**, *323*, 13–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
303. Fitzcharles, M.A.; Baerwald, C.; Ablin, J.; Hauser, W. Efficacy, tolerability and safety of cannabinoids in chronic pain associated with rheumatic diseases (fibromyalgia syndrome, back pain, osteoarthritis, rheumatoid arthritis): A systematic review of randomized controlled trials. *Schmerz* **2016**, *30*, 47–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
304. Mucke, M.; Phillips, T.; Radbruch, L.; Petzke, F.; Hauser, W. Cannabis-based medicines for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *3*, CD012182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
305. Phillips, T.J.; Cherry, C.L.; Cox, S.; Marshall, S.J.; Rice, A.S. Pharmacological treatment of painful HIV-associated sensory neuropathy: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e14433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
306. Stockings, E.; Campbell, G.; Hall, W.D.; Nielsen, S.; Zagic, D.; Rahman, R.; Murnion, B.; Farrell, M.; Weier, M.; Degenhardt, L. Cannabis and cannabinoids for the treatment of people with chronic noncancer pain conditions: A systematic review and meta-analysis of controlled and observational studies. *Pain* **2018**, *159*, 1932–1954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
307. Johal, H.; Devji, T.; Chang, Y.; Simone, J.; Vannabouathong, C.; Bhandari, M. Cannabinoids in Chronic Non-Cancer Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* **2020**, *13*, 1179544120906461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
308. Fisher, E.; Moore, R.A.; Fogarty, A.E.; Finn, D.P.; Finnerup, N.B.; Gilron, I.; Haroutounian, S.; Krane, E.; Rice, A.S.C.; Rowbotham, M.; et al. Cannabinoids, cannabis, and cannabis-based medicine for pain management: A systematic review of randomised controlled trials. *Pain* **2021**, *162*, S45–S66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
309. Chou, R.; Gordon, D.B.; de Leon-Casasola, O.A.; Rosenberg, J.M.; Bickler, S.; Brennan, T.; Carter, T.; Cassidy, C.L.; Chittenden, E.H.; Degenhardt, E.; et al. Management of Postoperative Pain: A Clinical Practice Guideline From the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *J. Pain* **2016**, *17*, 131–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
310. Inturrisi, C.E. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin. J. Pain* **2002**, *18*, S3–S13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

311. Oderda, G.M.; Gan, T.J.; Johnson, B.H.; Robinson, S.B. Effect of opioid-related adverse events on outcomes in selected surgical patients. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2013**, *27*, 62–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
312. Kumar, K.; Kirksey, M.A.; Duong, S.; Wu, C.L. A Review of Opioid-Sparing Modalities in Perioperative Pain Management: Methods to Decrease Opioid Use Postoperatively. *Anesth. Analg.* **2017**, *125*, 1749–1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
313. Weber, L.; Yeomans, D.C.; Tzabazis, A. Opioid-induced hyperalgesia in clinical anesthesia practice: What has remained from theoretical concepts and experimental studies? *Curr. Opin. Anesthesiol.* **2017**, *30*, 458–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
314. Edwards, D.A.; Hedrick, T.L.; Jayaram, J.; Argoff, C.; Gulur, P.; Holubar, S.D.; Gan, T.J.; Mythen, M.G.; Miller, T.E.; Shaw, A.D.; et al. American Society for Enhanced Recovery and Perioperative Quality Initiative Joint Consensus Statement on Perioperative Management of Patients on Preoperative Opioid Therapy. *Anesth. Analg.* **2019**, *129*, 553–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
315. Lee, L.A.; Caplan, R.A.; Stephens, L.S.; Posner, K.L.; Terman, G.W.; Voepel-Lewis, T.; Domino, K.B. Postoperative opioid-induced respiratory depression: A closed claims analysis. *Anesthesiology* **2015**, *122*, 659–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
316. Nagappa, M.; Weingarten, T.N.; Montandon, G.; Sprung, J.; Chung, F. Opioids, respiratory depression, and sleep-disordered breathing. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2017**, *31*, 469–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
317. Shaikh, S.I.; Nagarekha, D.; Hegade, G.; Marutheesh, M. Postoperative nausea and vomiting: A simple yet complex problem. *Anesth. Essays Res.* **2016**, *10*, 388–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
318. de Boer, H.D.; Detriche, O.; Forget, P. Opioid-related side effects: Postoperative ileus, urinary retention, nausea and vomiting, and shivering. A review of the literature. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2017**, *31*, 499–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
319. Dorn, S.; Lembo, A.; Cremonini, F. Opioid-induced bowel dysfunction: Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and initial therapeutic approach. *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* **2014**, *2*, 31–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
320. Farmer, A.D.; Holt, C.B.; Downes, T.J.; Ruggeri, E.; Del Vecchio, S.; De Giorgio, R. Pathophysiology, diagnosis, and management of opioid-induced constipation. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *3*, 203–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
321. Kurz, A.; Sessler, D.I. Opioid-induced bowel dysfunction: Pathophysiology and potential new therapies. *Drugs* **2003**, *63*, 649–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
322. Verhamme, K.M.; Sturkenboom, M.C.; Stricker, B.H.; Bosch, R. Drug-induced urinary retention: Incidence, management and prevention. *Drug Saf.* **2008**, *31*, 373–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
323. Devlin, J.W.; Roberts, R.J. Pharmacology of commonly used analgesics and sedatives in the ICU: Benzodiazepines, propofol, and opioids. *Crit. Care Clin.* **2009**, *25*, 431–449, vii. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
324. Wheeler, M.; Oderda, G.M.; Ashburn, M.A.; Lipman, A.G. Adverse events associated with postoperative opioid analgesia: A systematic review. *J. Pain* **2002**, *3*, 159–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
325. Athanasos, P.; Smith, C.S.; White, J.M.; Somogyi, A.A.; Bochner, F.; Ling, W. Methadone maintenance patients are cross-tolerant to the antinociceptive effects of very high plasma morphine concentrations. *Pain* **2006**, *120*, 267–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
326. Chia, Y.Y.; Liu, K.; Wang, J.J.; Kuo, M.C.; Ho, S.T. Intraoperative high dose fentanyl induces postoperative fentanyl tolerance. *Can. J. Anesth.* **1999**, *46*, 872–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
327. Guignard, B.; Bossard, A.E.; Coste, C.; Sessler, D.I.; Lebrault, C.; Alfonsi, P.; Fletcher, D.; Chauvin, M. Acute opioid tolerance: Intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology* **2000**, *93*, 409–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
328. Joseph, E.K.; Reichling, D.B.; Levine, J.D. Shared mechanisms for opioid tolerance and a transition to chronic pain. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 4660–4666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
329. Vinik, H.R.; Kissin, I. Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanyl infusion in humans. *Anesth. Analg.* **1998**, *86*, 1307–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
330. Wright, C.; Bigelow, G.E.; Stitzer, M.L.; Liebson, I.A. Acute physical dependence in humans: Repeated naloxone-precipitated withdrawal after a single dose of methadone. *Drug Alcohol Depend.* **1991**, *27*, 139–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
331. Angst, M.S.; Clark, J.D. Opioid-induced hyperalgesia: A qualitative systematic review. *Anesthesiology* **2006**, *104*, 570–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
332. Angst, M.S.; Koppert, W.; Pahl, I.; Clark, D.J.; Schmelz, M. Short-term infusion of the mu-opioid agonist remifentanyl in humans causes hyperalgesia during withdrawal. *Pain* **2003**, *106*, 49–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
333. Chu, L.F.; Clark, D.J.; Angst, M.S. Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: A preliminary prospective study. *J. Pain* **2006**, *7*, 43–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

334. Fletcher, D.; Martinez, V. Opioid-induced hyperalgesia in patients after surgery: A systematic review and a meta-analysis. *Br. J. Anaesth.* **2014**, *112*, 991–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
335. Alam, A.; Gomes, T.; Zheng, H.; Mamdani, M.M.; Juurlink, D.N.; Bell, C.M. Long-term analgesic use after low-risk surgery: A retrospective cohort study. *Arch. Intern. Med.* **2012**, *172*, 425–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
336. Bateman, B.T.; Franklin, J.M.; Bykov, K.; Avorn, J.; Shrank, W.H.; Brennan, T.A.; Landon, J.E.; Rathmell, J.P.; Huybrechts, K.F.; Fischer, M.A.; et al. Persistent opioid use following cesarean delivery: Patterns and predictors among opioid-naïve women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2016**, *215*, 353.e1–353.e18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
337. Bates, C.; Laciak, R.; Southwick, A.; Bishoff, J. Overprescription of postoperative narcotics: A look at postoperative pain medication delivery, consumption and disposal in urological practice. *J. Urol.* **2011**, *185*, 551–555. [[CrossRef](#)]
338. Dowell, D.; Haegerich, T.M.; Chou, R. CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain—United States, 2016. *JAMA* **2016**, *315*, 1624–1645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
339. Rodgers, J.; Cunningham, K.; Fitzgerald, K.; Finnerty, E. Opioid consumption following outpatient upper extremity surgery. *J. Hand Surg.* **2012**, *37*, 645–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
340. Curatolo, M.; Svetcic, G. Drug combinations in pain treatment: A review of the published evidence and a method for finding the optimal combination. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2002**, *16*, 507–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
341. O’Neill, A.; Lirk, P. Multimodal Analgesia. *Anesthesiol. Clin.* **2022**, *40*, 455–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
342. Alger, B.E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *68*, 247–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
343. Kano, M.; Ohno-Shosaku, T.; Hashimoto-dani, Y.; Uchigashima, M.; Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 309–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
344. Schlicker, E.; Kathmann, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 565–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
345. Mao, J.; Price, D.D.; Lu, J.; Keniston, L.; Mayer, D.J. Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. *Neurosci. Lett.* **2000**, *280*, 13–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
346. Manzanares, J.; Corchero, J.; Romero, J.; Fernandez-Ruiz, J.J.; Ramos, J.A.; Fuentes, J.A. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 287–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
347. Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **1994**, *372*, 686–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
348. Cadas, H.; Gaillet, S.; Beltramo, M.; Venance, L.; Piomelli, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 3934–3942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
349. Costa, B.; Siniscalco, D.; Trovato, A.E.; Comelli, F.; Sotgiu, M.L.; Colleoni, M.; Maione, S.; Rossi, F.; Giagnoni, G. AM404, an inhibitor of anandamide uptake, prevents pain behaviour and modulates cytokine and apoptotic pathways in a rat model of neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 1022–1032. [[CrossRef](#)]
350. Hojo, M.; Sudo, Y.; Ando, Y.; Minami, K.; Takada, M.; Matsubara, T.; Kanaide, M.; Taniyama, K.; Sumikawa, K.; Uezono, Y.  
mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor: Electrophysiological and FRET assay analysis. *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, *108*, 308–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
351. Babalonis, S.; Walsh, S.L. Therapeutic potential of opioid/cannabinoid combinations in humans: Review of the evidence. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2020**, *36*, 206–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
352. An, D.; Peigneur, S.; Hendrickx, L.A.; Tytgat, J. Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
353. Yao, B.B.; Mukherjee, S.; Fan, Y.; Garrison, T.R.; Daza, A.V.; Grayson, G.K.; Hooker, B.A.; Dart, M.J.; Sullivan, J.P.; Meyer, M.D. In vitro pharmacological characterization of AM1241: A protean agonist at the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor? *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 145–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
354. Lu, H.C.; Mackie, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry* **2016**, *79*, 516–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
355. Cichewicz, D.L.; Martin, Z.L.; Smith, F.L.; Welch, S.P. Enhancement mu opioid antinociception by oral delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol: Dose-response analysis and receptor identification. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 859–867. [[PubMed](#)]
356. Fuentes, J.A.; Ruiz-Gayo, M.; Manzanares, J.; Vela, G.; Reche, I.; Corchero, J. Cannabinoids as potential new analgesics. *Life Sci.* **1999**, *65*, 675–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
357. Ghosh, P.; Bhattacharya, S.K. Cannabis-induced potentiation of morphine analgesia in rat—role of brain monoamines. *Indian J. Med. Res.* **1979**, *70*, 275–280. [[PubMed](#)]

358. Reche, I.; Fuentes, J.A.; 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*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
359. Smith, F.L.; Cichewicz, D.; Martin, Z.L.; Welch, S.P. The enhancement of morphine antinociception in mice by delta<sup>9</sup>tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, *60*, 559–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
360. Cichewicz, D.L.; Haller, V.L.; Welch, S.P. Changes in opioid and cannabinoid receptor protein following short-term combination treatment with delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol and morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *297*, 121–127. [[PubMed](#)]
361. Reche, I.; Ruiz-Gayo, M.; Fuentes, J.A. Inhibition of opioid-degrading enzymes potentiates delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol-induced antinociception in mice. *Neuropharmacology* **1998**, *37*, 215–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
362. Yesilyurt, O.; Dogrul, A.; Gul, H.; Seyrek, M.; Kusmez, O.; Ozkan, Y.; Yildiz, O. Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain* **2003**, *105*, 303–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
363. Levin, D.N.; Dulberg, Z.; Chan, A.W.; Hare, G.M.; Mazer, C.D.; Hong, A. A randomized-controlled trial of nabilone for the prevention of acute postoperative nausea and vomiting in elective surgery. *Can. J. Anesth.* **2017**, *64*, 385–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
364. Seeling, W.; Kneer, L.; Buchele, B.; Gschwend, J.E.; Maier, L.; Nett, C.; Simmet, T.; Steffen, P.; Schneider, M.; Rockemann, M. [Delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol and the opioid receptor agonist piritramide do not act synergistically in postoperative pain]. *Anaesthetist* **2006**, *55*, 391–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
365. Miranda, H.F.; Sierralta, F.; Pinardi, G. Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135*, 1591–1597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
366. Mitchell, J.A.; Warner, T.D. Cyclo-oxygenase-2: Pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 1121–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
367. Smith, W.L.; DeWitt, D.L.; Garavito, R.M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 145–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
368. Warner, T.D.; Mitchell, J.A. Cyclooxygenases: New forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* **2004**, *18*, 790–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
369. Miranda, H.F.; Puig, M.M.; Prieto, J.C.; Pinardi, G. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain* **2006**, *121*, 22–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
370. Fimiani, C.; Liberty, T.; Acuirre, A.J.; Amin, I.; Ali, N.; Stefano, G.B. Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **1999**, *57*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
371. Reichman, M.; Nen, W.; Hokin, L.E. Delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol increases arachidonic acid levels in guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 823–828. [[PubMed](#)]
372. Guindon, J.; Beaulieu, P. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* **2006**, *50*, 814–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
373. Guindon, J.; De Lean, A.; Beaulieu, P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain* **2006**, *121*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
374. Ulugol, A.; Ozyigit, F.; Yesilyurt, O.; Dogrul, A. The additive antinociceptive interaction between WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, and ketorolac. *Anesth. Analg.* **2006**, *102*, 443–447. [[CrossRef](#)]
375. Diaz-Reval, M.I.; Cardenas, Y.; Huerta, M.; Trujillo, X.; Sanchez-Pastor, E.A.; Gonzalez-Trujano, M.E.; Virgen-Ortiz, A.; PerezHernandez, M.G. Activation of Peripheral Cannabinoid Receptors Synergizes the Effect of Systemic Ibuprofen in a Pain Model in Rat. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
376. Paunescu, H.; Coman, O.A.; Coman, L.; Ghita, I.; Georgescu, S.R.; Draghia, F.; Fulga, I. Cannabinoid system and cyclooxygenases inhibitors. *J. Med. Life* **2011**, *4*, 11–20. [[PubMed](#)]
377. Klinger-Gratz, P.P.; Ralvenius, W.T.; Neumann, E.; Kato, A.; Nyilas, R.; Lele, Z.; Katona, I.; Zeilhofer, H.U. Acetaminophen Relieves Inflammatory Pain through CB<sub>1</sub> Cannabinoid Receptors in the Rostral Ventromedial Medulla. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 322–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
378. Mallet, C.; Daulhac, L.; Bonnefont, J.; Ledent, C.; Etienne, M.; Chapuy, E.; Libert, F.; Eschalier, A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain* **2008**, *139*, 190–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
379. Hama, A.T.; Sagen, J. Cannabinoid receptor-mediated antinociception with acetaminophen drug combinations in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Neuropharmacology* **2010**, *58*, 758–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
380. Ottani, A.; Leone, S.; Sandrini, M.; Ferrari, A.; Bertolini, A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *531*, 280–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

381. Dani, M.; Guindon, J.; Lambert, C.; Beaulieu, P. The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *573*, 214–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
382. Mallet, C.; Barriere, D.A.; Ermund, A.; Jonsson, B.A.; Eschaliier, A.; Zygmunt, P.M.; Hogestatt, E.D. TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12748. [[CrossRef](#)]
383. Hogestatt, E.D.; Jonsson, B.A.; Ermund, A.; Andersson, D.A.; Bjork, H.; Alexander, J.P.; Cravatt, B.F.; Basbaum, A.I.; Zygmunt, P.M. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31405–31412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
384. Ahluwalia, J.; Urban, L.; Capogna, M.; Bevan, S.; Nagy, I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* **2000**, *100*, 685–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
385. Farquhar-Smith, W.P.; Egertova, M.; Bradbury, E.J.; McMahon, S.B.; Rice, A.S.; Elphick, M.R. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor expression in rat spinal cord. *Mol. Cell. Neurosci.* **2000**, *15*, 510–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
386. Salio, C.; Doly, S.; Fischer, J.; Franzoni, M.F.; Conrath, M. Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* **2002**, *329*, 13–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
387. Szallasi, A.; Blumberg, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 159–212. [[PubMed](#)]
388. Kang, S.; Kim, C.H.; Lee, H.; Kim, D.Y.; Han, J.I.; Chung, R.K.; Lee, G.Y. Antinociceptive synergy between the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and bupivacaine in the rat formalin test. *Anesth. Analg.* **2007**, *104*, 719–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
389. Tonner, P.H. Additives used to reduce perioperative opioid consumption 1: Alpha2-agonists. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2017**, *31*, 505–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
390. Boyd, R.E. Alpha2-adrenergic receptor agonists as analgesics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1*, 193–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
391. Giovannitti, J.A., Jr.; Thoms, S.M.; Crawford, J.J. Alpha-2 adrenergic receptor agonists: A review of current clinical applications. *Anesth. Prog.* **2015**, *62*, 31–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
392. Pan, H.L.; Wu, Z.Z.; Zhou, H.Y.; Chen, S.R.; Zhang, H.M.; Li, D.P. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **2008**, *117*, 141–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
393. Manzanares, J.; Julian, M.; Carrascosa, A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr. Neuropharmacol.* **2006**, *4*, 239–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
394. Holdcroft, A.; Maze, M.; Dore, C.; Tebbs, S.; Thompson, S. A multicenter dose-escalation study of the analgesic and adverse effects of an oral cannabis extract (Cannador) for postoperative pain management. *Anesthesiology* **2006**, *104*, 1040–1046. [[CrossRef](#)]
395. Guillaud, J.; Legagneux, F.; Paulet, C.; Leoni, J.; Lassner, J. Essai du Ivonantradol pour l'analgsie postopratoire. *Cah. D'anesthesiologie* **1983**, *31*, 243–248.
396. Jain, A.K.; Ryan, J.R.; McMahon, F.G.; Smith, G. Evaluation of intramuscular levonantradol and placebo in acute postoperative pain. *J. Clin. Pharmacol.* **1981**, *21*, 320S–326S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
397. Beaulieu, P. Effects of nabilone, a synthetic cannabinoid, on postoperative pain. *Can. J. Anesth.* **2006**, *53*, 769–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
398. Hickernell, T.R.; Lakra, A.; Berg, A.; Cooper, H.J.; Geller, J.A.; Shah, R.P. Should Cannabinoids Be Added to Multimodal Pain Regimens After Total Hip and Knee Arthroplasty? *J. Arthroplast.* **2018**, *33*, 3637–3641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
399. Alaia, M.J.; Li, Z.I.; Chalem, I.; Hurley, E.T.; Vasavada, K.; Gonzalez-Lomas, G.; Rokito, A.S.; Jazrawi, L.M.; Kaplan, K. Cannabidiol for Postoperative Pain Control After Arthroscopic Rotator Cuff Repair Demonstrates No Deficits in Patient-Reported Outcomes Versus Placebo: 1-Year Follow-up of a Randomized Controlled Trial. *Orthop. J. Sports Med.* **2024**, *12*, 23259671231222265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
400. Haffar, A.; Khan, I.A.; Abdelaal, M.S.; Banerjee, S.; Sharkey, P.F.; Lonner, J.H. Topical Cannabidiol (CBD) After Total Knee Arthroplasty Does Not Decrease Pain or Opioid Use: A Prospective Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Trial. *J. Arthroplast.* **2022**, *37*, 1763–1770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
401. Narang, G.; Moore, J.; Wymer, K.; Chang, Y.H.; Lim, E.; Adeleye, O.; Humphreys, M.R.; Stern, K.L. Effect of Cannabidiol Oil on Post-ureteroscopy Pain for Urinary Calculi: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *J. Urol.* **2023**, *209*, 726–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
402. Kalliomaki, J.; Segerdahl, M.; Webster, L.; Reimfelt, A.; Huizar, K.; Annas, P.; Karlsten, R.; Quiding, H. Evaluation of the analgesic efficacy of AZD1940, a novel cannabinoid agonist, on post-operative pain after lower third molar surgical removal. *Scand. J. Pain* **2013**, *4*, 17–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

403. Ostenfeld, T.; Price, J.; Albanese, M.; Bullman, J.; Guillard, F.; Meyer, I.; Leeson, R.; Costantin, C.; Ziviani, L.; Nocini, P.F.; et al. A randomized, controlled study to investigate the analgesic efficacy of single doses of the cannabinoid receptor-2 agonist GW842166, ibuprofen or placebo in patients with acute pain following third molar tooth extraction. *Clin. J. Pain* **2011**, *27*, 668–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
404. Moore, A.; Straube, S.; Fisher, E.; Eccleston, C. Cannabidiol (CBD) Products for Pain: Ineffective, Expensive, and With Potential Harms. *J. Pain* **2024**, *25*, 833–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
405. Khelemsky, Y.; Goldberg, A.T.; Hurd, Y.L.; Winkel, G.; Ninh, A.; Qian, L.; Oprescu, A.; Ciccone, J.; Katz, D.J. Perioperative Patient Beliefs Regarding Potential Effectiveness of Marijuana (Cannabinoids) for Treatment of Pain: A Prospective Population Survey. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2017**, *42*, 652–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
406. Garcia-Gutierrez, M.S.; Navarrete, F.; Gasparyan, A.; Austrich-Olivares, A.; Sala, F.; Manzanares, J. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
407. Vigil, J.M.; Stith, S.S.; Brockelman, F.; Keeling, K.; Hall, B. Systematic combinations of major cannabinoid and terpene contents in Cannabis flower and patient outcomes: A proof-of-concept assessment of the Vigil Index of Cannabis Chemovars. *J. Cannabis Res.* **2023**, *5*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
408. Gaston, T.E.; Friedman, D. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav.* **2017**, *70*, 313–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
409. Grotenhermen, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 327–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
410. Lucas, C.J.; Galettis, P.; Schneider, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *84*, 2477–2482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
411. Huestis, M.A. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1770–1804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
412. Liu, C.W.; Bhatia, A.; Buzon-Tan, A.; Walker, S.; Ilangomaran, D.; Kara, J.; Venkatraghavan, L.; Prabhu, A.J. Weeding Out the Problem: The Impact of Preoperative Cannabinoid Use on Pain in the Perioperative Period. *Anesth. Analg.* **2019**, *129*, 874–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
413. Mlost, J.; Bryk, M.; Starowicz, K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
414. British Medical Association. *Therapeutic Uses of Cannabis*; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1997; 142p.
415. Zieglgansberger, W.; Brenneisen, R.; Berthele, A.; Wotjak, C.T.; Bandelow, B.; Tolle, T.R.; Lutz, B. Chronic Pain and the Endocannabinoid System: Smart Lipids—A Novel Therapeutic Option? *Med. Cannabis Cannabinoids* **2022**, *5*, 61–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
416. Pertwee, R.G.; Gibson, T.M.; Stevenson, L.A.; Ross, R.A.; Banner, W.K.; Saha, B.; Razdan, R.K.; Martin, B.R. O-1057, a potent water-soluble cannabinoid receptor agonist with antinociceptive properties. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 1577–1584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
417. Rajesh, B. Gandhi, J.R.R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1994**, *13*, 43–74. [[CrossRef](#)]
418. Martin, J.H.; Schneider, J.; Lucas, C.J.; Galettis, P. Exogenous Cannabinoid Efficacy: Merely a Pharmacokinetic Interaction? *Clin. Pharmacokinet.* **2018**, *57*, 539–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
419. Hua, S. Advances in Nanoparticulate Drug Delivery Approaches for Sublingual and Buccal Administration. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
420. Mahmoudinooodezh, H.; Telukutla, S.R.; Bhangu, S.K.; Bachari, A.; Cavalieri, F.; Mantri, N. The Transdermal Delivery of Therapeutic Cannabinoids. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
421. Challapalli, P.V.; Stinchcomb, A.L. In vitro experiment optimization for measuring tetrahydrocannabinol skin permeation. *Int. J. Pharm.* **2002**, *241*, 329–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
422. Stinchcomb, A.L.; Valiveti, S.; Hammell, D.C.; Ramsey, D.R. Human skin permeation of Delta<sup>8</sup>-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabiniol. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 291–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
423. Fantegrossi, W.E.; Moran, J.H.; Radomska-Pandya, A.; Prather, P.L. Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Delta<sup>9</sup>-THC: Mechanism underlying greater toxicity? *Life Sci.* **2014**, *97*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
424. Ng, T.; Gupta, V.; Keshock, M.C. Tetrahydrocannabinol (THC). In *StatPearls*; StatPearls Publishing LLC: Treasure Island, FL, USA, 2023.
425. Englund, A.; Stone, J.M.; Morrison, P.D. Cannabis in the arm: What can we learn from intravenous cannabinoid studies? *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 4906–4914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

426. Raft, D.; Gregg, J.; Ghia, J.; Harris, L. Effects of intravenous tetrahydrocannabinol on experimental and surgical pain. Psychological correlates of the analgesic response. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1977**, *21*, 26–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
427. Lindgren, J.E.; Ohlsson, A.; Agurell, S.; Hollister, L.; Gillespie, H. Clinical effects and plasma levels of delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (delta<sup>9</sup>-THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology* **1981**, *74*, 208–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
428. Maykut, M.O. Health consequences of acute and chronic marihuana use. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **1985**, *9*, 209–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
429. Ohlsson, A.; Lindgren, J.E.; Andersson, S.; Agurell, S.; Gillespie, H.; Hollister, L.E. Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1986**, *13*, 77–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
430. Casati, S.; Angeli, I.; Ravelli, A.; Del Fabbro, M.; Minoli, M.; Orioli, M. 11-OH-THC in hair as marker of active cannabis consumption: Estimating a reliable cut-off by evaluation of 672 THC-positive hair samples. *Forensic. Sci. Int.* **2019**, *304*, 109951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
431. Martin-Santos, R.; Crippa, J.A.; Batalla, A.; Bhattacharyya, S.; Atakan, Z.; Borgwardt, S.; Allen, P.; Seal, M.; Langohr, K.; Farre, M.; et al. Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 4966–4979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
432. Zendulka, O.; Dovrtelova, G.; Noskova, K.; Turjap, M.; Sulcova, A.; Hanus, L.; Jurica, J. Cannabinoids and Cytochrome P450 Interactions. *Curr. Drug Metab.* **2016**, *17*, 206–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
433. Ujvary, I.; Hanus, L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2016**, *1*, 90–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
434. Heuberger, J.A.; Guan, Z.; Oyetayo, O.O.; Klumpers, L.; Morrison, P.D.; Beumer, T.L.; van Gerven, J.M.; Cohen, A.F.; Freijer, J. Population pharmacokinetic model of THC integrates oral, intravenous, and pulmonary dosing and characterizes short- and long-term pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **2015**, *54*, 209–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
435. Lucas, C.J.; Galettis, P.; Song, S.; Solowij, N.; Reuter, S.E.; Schneider, J.; Martin, J.H. Cannabinoid Disposition After Human Intraperitoneal Use: An Insight Into Intraperitoneal Pharmacokinetic Properties in Metastatic Cancer. *Clin. Ther.* **2018**, *40*, 1442–1447. [[CrossRef](#)]
436. Toennes, S.W.; Ramaekers, J.G.; Theunissen, E.L.; Moeller, M.R.; Kauert, G.F. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 470–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
437. Skopp, G.; Potsch, L. Cannabinoid concentrations in spot serum samples 24–48 hours after discontinuation of cannabis smoking. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 160–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
438. Doohan, P.T.; Oldfield, L.D.; Arnold, J.C.; Anderson, L.L. Cannabinoid Interactions with Cytochrome P450 Drug Metabolism: A Full-Spectrum Characterization. *AAPS J.* **2021**, *23*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
439. Lopera, V.; Rodriguez, A.; Amariles, P. Clinical Relevance of Drug Interactions with Cannabis: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
440. Maldonado, C.; Peyraube, R.; Fagiolino, P.; Oricchio, F.; Cunetti, L.; Vazquez, M. Human Data on Pharmacokinetic Interactions of Cannabinoids: A Narrative Review. *Curr. Pharm. Des.* **2024**, *30*, 241–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
441. Kocis, P.T.; Wadrose, S.; Wakefield, R.L.; Ahmed, A.; Calle, R.; Gajjar, R.; Vrana, K.E. CANNabinoid Drug Interaction Review (CANN-DIR). *Med. Cannabis Cannabinoids* **2023**, *6*, 1–7. [[CrossRef](#)]
442. Russo, E.B. Current Therapeutic Cannabis Controversies and Clinical Trial Design Issues. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
443. Vazquez, M.; Guevara, N.; Maldonado, C.; Guido, P.C.; Schaiquevich, P. Potential Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions between Cannabinoids and Drugs Used for Chronic Pain. *Biomed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 3902740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
444. Arellano, A.L.; Papaseit, E.; Romaguera, A.; Torrens, M.; Farre, M. Neuropsychiatric and General Interactions of Natural and Synthetic Cannabinoids with Drugs of Abuse and Medicines. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2017**, *16*, 554–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
445. Vaughn, S.E.; Strawn, J.R.; Poweleit, E.A.; Sarangdhar, M.; Ramsey, L.B. The Impact of Marijuana on Antidepressant Treatment in Adolescents: Clinical and Pharmacologic Considerations. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

446. Jiang, R.; Yamaori, S.; Okamoto, Y.; Yamamoto, I.; Watanabe, K. Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2013**, *28*, 332–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
447. Yamaori, S.; Okamoto, Y.; Yamamoto, I.; Watanabe, K. Cannabidiol, a major phytocannabinoid, as a potent atypical inhibitor for CYP2D6. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2011**, *39*, 2049–2056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
448. Yamaori, S.; Ebisawa, J.; Okushima, Y.; Yamamoto, I.; Watanabe, K. Potent inhibition of human cytochrome P450 3A isoforms by cannabidiol: Role of phenolic hydroxyl groups in the resorcinol moiety. *Life Sci.* **2011**, *88*, 730–736. [[CrossRef](#)]
449. Balachandran, P.; Elsohly, M.; Hill, K.P. Cannabidiol Interactions with Medications, Illicit Substances, and Alcohol: A Comprehensive Review. *J. Gen. Intern. Med.* **2021**, *36*, 2074–2084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
450. MacCallum, C.A.; Russo, E.B. Practical considerations in medical cannabis administration and dosing. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, *49*, 12–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
451. Dewey, W.L. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1986**, *38*, 151–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
452. Hampson, R.E.; Deadwyler, S.A. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci.* **1999**, *65*, 715–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
453. Heyser, C.J.; Hampson, R.E.; Deadwyler, S.A. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: Alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *264*, 294–307. [[PubMed](#)]
454. Adams, I.B.; Martin, B.R. Cannabis: Pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* **1996**, *91*, 1585–1614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
455. Hollister, L.E. Cannabis—1988. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* **1988**, *345*, 108–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
456. Hollister, L.E. Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev.* **1986**, *38*, 1–20. [[CrossRef](#)]
457. Barnett, G.; Licko, V.; Thompson, T. Behavioral pharmacokinetics of marijuana. *Psychopharmacology* **1985**, *85*, 51–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
458. Huestis, M.A.; Sampson, A.H.; Holicky, B.J.; Henningfield, J.E.; Cone, E.J. Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1992**, *52*, 31–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
459. Johns, A. Psychiatric effects of cannabis. *Br. J. Psychiatry* **2001**, *178*, 116–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
460. Stanley, C.P.; Hind, W.H.; Tufarelli, C.; O’Sullivan, S.E. Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB<sub>1</sub> activation. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *107*, 568–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
461. Stanley, C.P.; Hind, W.H.; Tufarelli, C.; O’Sullivan, S.E. The endocannabinoid anandamide causes endothelium-dependent vasorelaxation in human mesenteric arteries. *Pharmacol. Res.* **2016**, *113*, 356–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
462. Malinowska, B.; Baranowska-Kuczko, M.; Schlicker, E. Triphasic blood pressure responses to cannabinoids: Do we understand the mechanism? *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 2073–2088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
463. Gorelick, D.A.; Heishman, S.J.; Preston, K.L.; Nelson, R.A.; Moolchan, E.T.; Huestis, M.A. The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist rimonabant attenuates the hypotensive effect of smoked marijuana in male smokers. *Am. Heart J.* **2006**, *151*, 754.e751–754.e755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
464. Huestis, M.A.; Gorelick, D.A.; Heishman, S.J.; Preston, K.L.; Nelson, R.A.; Moolchan, E.T.; Frank, R.A. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB<sub>1</sub>-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch. Gen. Psychiatry* **2001**, *58*, 322–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
465. Jones, R.T. Cardiovascular system effects of marijuana. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 585–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
466. Tashkin, D.P.; Levisman, J.A.; Abbasi, A.S.; Shapiro, B.J.; Ellis, N.M. Short-term effects of smoked marijuana on left ventricular function in man. *Chest* **1977**, *72*, 20–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
467. Perez-Reyes, M. The Psychologic and Physiologic Effects of Active Cannabinoids. In *Marihuana and Medicine*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1999.
468. Shook, J.E.; Burks, T.F. Psychoactive cannabinoids reduce gastrointestinal propulsion and motility in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *249*, 444–449. [[PubMed](#)]
469. Hollmann, M.W.; Rathmell, J.P.; Lirk, P. Optimal postoperative pain management: Redefining the role for opioids. *Lancet* **2019**, *393*, 1483–1485. [[CrossRef](#)]
470. Hall, W.; Solowij, N. Adverse effects of cannabis. *Lancet* **1998**, *352*, 1611–1616. [[CrossRef](#)]
471. Beaulieu, P.; Boulanger, A.; Desroches, J.; Clark, A.J. Medical cannabis: Considerations for the anesthesiologist and pain physician. *Can. J. Anesth.* **2016**, *63*, 608–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
472. Laudanski, K.; Wain, J. Considerations for Cannabinoids in Perioperative Care by Anesthesiologists. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
473. Mallat, A.; Roberson, J.; Brock-Utne, J.G. Preoperative marijuana inhalation—an airway concern. *Can. J. Anesth.* **1996**, *43*, 691–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
474. Boyce, S.H.; Quigley, M.A. Uvulitis and partial upper airway obstruction following cannabis inhalation. *Emerg. Med.* **2002**, *14*, 106–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

475. Guarisco, J.L.; Cheney, M.L.; LeJeune, F.E., Jr.; Reed, H.T. Isolated uvulitis secondary to marijuana use. *Laryngoscope* **1988**, *98*, 1309–1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
476. White, S.M. Cannabis abuse and laryngospasm. *Anaesthesia* **2002**, *57*, 622–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
477. Ghuran, A.; Nolan, J. Recreational drug misuse: Issues for the cardiologist. *Heart* **2000**, *83*, 627–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
478. Kuczkowski, K.M. Anesthetic implications of drug abuse in pregnancy. *J. Clin. Anesth.* **2003**, *15*, 382–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
479. Badowski, S.; Smith, G. Cannabis use during pregnancy and postpartum. *Can. Fam. Physician* **2020**, *66*, 98–103.
480. Conner, S.N.; Bedell, V.; Lipsey, K.; Macones, G.A.; Cahill, A.G.; Tuuli, M.G. Maternal Marijuana Use and Adverse Neonatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* **2016**, *128*, 713–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
481. Grant, K.S.; Petroff, R.; Isoherranen, N.; Stella, N.; Burbacher, T.M. Cannabis use during pregnancy: Pharmacokinetics and effects on child development. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *182*, 133–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
482. Ortiz-Medina, M.B.; Perea, M.; Torales, J.; Ventriglio, A.; Vitrani, G.; Aguilar, L.; Roncero, C. Cannabis consumption and psychosis or schizophrenia development. *Int. J. Soc. Psychiatry* **2018**, *64*, 690–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
483. Sellers, E.M.; Schoedel, K.; Bartlett, C.; Romach, M.; Russo, E.B.; Stott, C.G.; Wright, S.; White, L.; Duncombe, P.; Chen, C.F. A Multiple-Dose, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group QT/QTc Study to Evaluate the Electrophysiologic Effects of THC/CBD Spray. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2013**, *2*, 285–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
484. Hurd, Y.L.; Manzoni, O.J.; Pletnikov, M.V.; Lee, F.S.; Bhattacharyya, S.; Melis, M. Cannabis and the Developing Brain: Insights into Its Long-Lasting Effects. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, 8250–8258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
485. Whiting, P.F.; Wolff, R.F.; Deshpande, S.; Di Nisio, M.; Duffy, S.; Hernandez, A.V.; Keurentjes, J.C.; Lang, S.; Misso, K.; Ryder, S.; et al. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* **2015**, *313*, 2456–2473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
486. Abdallah, F.W.; Hussain, N.; Weaver, T.; Brull, R. Analgesic efficacy of cannabinoids for acute pain management after surgery: A systematic review and meta-analysis. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2020**, *45*, 509–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
487. Stevens, A.J.; Higgins, M.D. A systematic review of the analgesic efficacy of cannabinoid medications in the management of acute pain. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **2017**, *61*, 268–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
488. Fisher, B.A.; Ghuran, A.; Vadamalai, V.; Antonios, T.F. Cardiovascular complications induced by cannabis smoking: A case report and review of the literature. *J. Emerg. Med.* **2005**, *22*, 679–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
489. Kleine-Brueggeney, M.; Greif, R.; Brenneisen, R.; Urwyler, N.; Stueber, F.; Theiler, L.G. Intravenous Delta-9-Tetrahydrocannabinol to Prevent Postoperative Nausea and Vomiting: A Randomized Controlled Trial. *Anesth. Analg.* **2015**, *121*, 1157–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
490. Alaia, M.J.; Hurley, E.T.; Vasavada, K.; Markus, D.H.; Britton, B.; Gonzalez-Lomas, G.; Rokito, A.S.; Jazrawi, L.M.; Kaplan, K. Buccally Absorbed Cannabidiol Shows Significantly Superior Pain Control and Improved Satisfaction Immediately After Arthroscopic Rotator Cuff Repair: A Placebo-Controlled, Double-Blinded, Randomized Trial. *Am. J. Sports Med.* **2022**, *50*, 3056–3063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
491. Allegri, M.; Clark, M.R.; De Andres, J.; Jensen, T.S. Acute and chronic pain: Where we are and where we have to go. *Minerva Anestesiol.* **2012**, *78*, 222–235. [[PubMed](#)]
492. Gupta, A.; Kaur, K.; Sharma, S.; Goyal, S.; Arora, S.; Murthy, R.S. Clinical aspects of acute post-operative pain management & its assessment. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2010**, *1*, 97–108. [[PubMed](#)]
493. Miller, L.K.; Devi, L.A. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: Mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 461–470. [[CrossRef](#)]
494. D'Souza, D.C.; Perry, E.; MacDougall, L.; Ammerman, Y.; Cooper, T.; Wu, Y.T.; Braley, G.; Gueorguieva, R.; Krystal, J.H. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: Implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology* **2004**, *29*, 1558–1572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
495. Jennings, J.M.; Angerame, M.R.; Eschen, C.L.; Phocas, A.J.; Dennis, D.A. Cannabis Use Does Not Affect Outcomes After Total Knee Arthroplasty. *J. Arthroplast.* **2019**, *34*, 1667–1669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
496. Mackie, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2005. [[CrossRef](#)]
497. Pazos, M.R.; Nunez, E.; Benito, C.; Tolon, R.M.; Romero, J. Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *81*, 239–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
498. Hu, S.S.; Mackie, K. Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; Volume 231, pp. 59–93. [[CrossRef](#)]

499. Tao, R.; Li, C.; Jaffe, A.E.; Shin, J.H.; Deep-Soboslay, A.; Yamin, R.; Weinberger, D.R.; Hyde, T.M.; Kleinman, J.E. Cannabinoid receptor CNR1 expression and DNA methylation in human prefrontal cortex, hippocampus and caudate in brain development and schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **2020**, *10*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
500. Kunos, G.; Osei-Hyiaman, D.; Batkai, S.; Sharkey, K.A.; Makriyannis, A. Should peripheral CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 1–7. [[CrossRef](#)]
501. Atwood, B.K.; Mackie, K. CB<sub>2</sub>: A cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 467–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
502. Maccarrone, M.; Bab, I.; Biro, T.; Cabral, G.A.; Dey, S.K.; Di Marzo, V.; Konje, J.C.; Kunos, G.; Mechoulam, R.; Pacher, P.; et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 277–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
503. Dhopeswarkar, A.; Mackie, K. CB<sub>2</sub> Cannabinoid receptors as a therapeutic target—what does the future hold? *Mol. Pharmacol.* **2014**, *86*, 430–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
504. Pernia-Andrade, A.J.; Kato, A.; Witschi, R.; Nyilas, R.; Katona, I.; Freund, T.F.; Watanabe, M.; Filitz, J.; Koppert, W.; Schuttler, J.; et al. Spinal endocannabinoids and CB<sub>1</sub> receptors mediate C-fiber-induced heterosynaptic pain sensitization. *Science* **2009**, *325*, 760–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
505. Cooper, S.A.; Desjardins, P.J.; Turk, D.C.; Dworkin, R.H.; Katz, N.P.; Kehlet, H.; Ballantyne, J.C.; Burke, L.B.; Carragee, E.; Cowan, P.; et al. Research design considerations for single-dose analgesic clinical trials in acute pain: IMMEDIATE recommendations. *Pain* **2016**, *157*, 288–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content

## 13.2. Artículo 2

- Carrascosa AJ, García-Gutiérrez MS, Saldaña R, Manzanares J. Additive antinociceptive action of intrathecal anandamide reuptake inhibitor and morphine in the management of post-incisional pain in rats. *Biomed Pharmacother.* 2024 Aug; 177:117054. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117054. Epub 2024 Jun 28. PMID: 38943991

Biomedicine & Pharmacotherapy 177 (2024) 117054



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biopha](http://www.elsevier.com/locate/biopha)



### Additive antinociceptive action of intrathecal anandamide reuptake inhibitor and morphine in the management of post-incisional pain in rats

Antonio J. Carrascosa<sup>a</sup>, María S. García-Gutiérrez<sup>b,c,d</sup>, Raquel Saldaña<sup>a</sup>, Jorge Manzanares<sup>b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Anesthesiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Neurociencias, Campus de San Juan, Universidad Miguel Hernández-CSIC, San Juan de Alicante, Alicante, Spain

<sup>c</sup> Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Post-incisional pain  
Rat  
UCM707  
Morphine  
CB1r and CB2r

#### ABSTRACT

Spinal opioids have mixed efficacy and their adverse effects force treatment cessation of postoperative pain. Consequently, there is an ongoing search for new therapeutic strategies. Here, we evaluated the analgesic efficacy of intrathecal UCM707, an anandamide reuptake inhibitor, and morphine combination. Firstly, we assessed the effects of morphine (1, 5 and 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) and its combination in the hot plate. Then, morphine + UCM707 at sub-effective doses was evaluated in a rat post-incisional pain model. In addition,  $\mu$ -, CB1r-, CB2r- and TRPV1-antagonists were pre-administered before the combination. Activation of  $\mu$ -opioid and CB1r, and Cnr1, Cnr2, Oprm1 and TRPV1 expressions were evaluated in the lumbar sacra and periaqueductal grey by [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding autoradiography and qPCR studies. In the hot plate, morphine (1  $\mu$ g) and UCM707 (75  $\mu$ g) induced a more robust analgesic effect than each drug alone. Morphine plus UCM707 did not modify  $\mu$ -opioid nor CB1 receptor function in the PAG or LS. Cnr1 and TRPV1 expression increased in the lumbar sacra (LS). Morphine plus UCM707 significantly reduced post-incisional pain at 1 and 4 days after surgery. Cnr1, Cnr2 and TRPV1 expressions increased in the LS. Blockade of  $\mu$ -opioid receptor reduced combination effects on days 1 and 4. CB1r- and CB2r-antagonism reduced morphine + UCM707 effects on days 1 and 4, respectively. CB1r and TRPV1-antagonism improved their antinociceptive effects on day 4. These results revealed a synergistic/additive analgesic effect of UCM707 and morphine combination controlling postincisional pain. CB1r, CB2r and TRPV1 contribute differently as central sensitization occurs.



## ABSTRACT

Spinal opioids have mixed efficacy and their adverse effects force treatment cessation of postoperative pain. Consequently, there is an ongoing search for new therapeutic strategies. Here, we evaluated the analgesic efficacy of intrathecal UCM707, an anandamide reuptake inhibitor, and morphine combination. Firstly, we assessed the effects of morphine (1, 5 and 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) and its combination in the hot plate. Then, morphine + UCM707 at sub-effective doses was evaluated in a rat post-incisional pain model. In addition,  $\mu$ -, CB1r-, CB2r- and TRPV1-antagonists were pre-administered before the combination. Activation of  $\mu$ -opioid and CB1r, and Cnr1, Cnr2, Oprm1 and TRPV<sub>1</sub> expressions were evaluated in the lumbar sacra and periaqueductal grey by [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding autoradiography and qPCR studies. In the hot plate, morphine (1  $\mu$ g) and UCM707 (75  $\mu$ g) induced a more robust analgesic effect than each drug alone. Morphine plus UCM707 did not modify  $\mu$ -opioid nor CB1 receptor function in the PAG or LS. Cnr1 and TRPV1 expression increased in the lumbar sacra (LS). Morphine plus UCM707 significantly reduced post-incisional pain at 1 and 4 days after surgery. Cnr1, Cnr2 and TRPV1 expressions increased in the LS. Blockade of  $\mu$ -opioid receptor reduced combination effects on days 1 and 4. CB1r- and CB2r-antagonism reduced morphine + UCM707 effects on days 1 and 4, respectively. CB1r and TRPV1-antagonism improved their antinociceptive effects on day 4. These results revealed a synergistic/additive analgesic effect of UCM707 and morphine combination controlling postincisional pain. CB1r, CB2r and TRPV1 contribute differently as central sensitization occurs.

**Keywords:** post-incisional pain, rat, UCM707, morphine, CB1r and CB2r.

## CONTENTS

1. Introduction
2. Material and methods
  - 2.1 Animals
  - 2.2 Intrathecal catheter implantation
  - 2.3 Experimental design
    - 2.3.1. Experimental design for 1st phase: to find a subeffective dose of morphine and UCM707
    - 2.3.2. Experimental design for 2nd phase: to evaluate the antinociceptive effects of subeffective doses of morphine plus UCM707 in modulating allodynia and the mechanisms underlying these effects
  - 2.4 Postsurgical pain model: plantar incision model
  - 2.5 Drugs
  - 2.6. Behavioral tests
    - 2.6.1. Thermal nociception: hot-plate test
    - 2.6.2 Mechanical nociception: behavior test for assessing tactile allodynia
  - 2.7 Histological procedures
    - 2.7.1 WIN-55,212-2 and DAMGO stimulated [<sup>35</sup>S] GTP (s binding autoradiography
    - 2.7.2 Gene expression studies by real-time PCR
  - 2.8. Statistical Analyses

### 3. Results

#### 3.1. Phase 1: Antinociceptive effects of spinal morphine and UCM707 using a hot plate test

##### 3.1.1 Responsiveness to thermic nociceptive stimulation (Hot plate)

##### 3.1.2 Histological procedures

###### 3.1.2.1 DAMGO stimulated (35S]-GTP (s binding autoradiography

###### 3.1.2.2. WIN55,212 stimulated (35S]-GTP (s binding autoradiography

##### 3.1.3 Gene expression studies: qPCR

#### 3.2 Phase 2: Antinociceptive effects of subeffective dose UCM707 (75(g) + morphine (1(g) in the rat model of incisional pain

##### 3.2.1 Responsiveness to mechanical nociception

##### 3.2.2 Gene expression studies: qPCR

##### 3.2.3 Effects of the antagonists naloxone, SR141716A, AM630 and AMG9810 in the antinociceptive effects of UCM707 (75 (g) + morphine (1 (g) in the rat model of incisional pain

### 4. Discussion

### 5. Conclusions

### 6. Figures and legends

### 7. References

## 1. Introduction

Postoperative pain (POP) is a significant clinical problem that needs prompt and effective management to reduce patient suffering, promote the healing process and rehabilitation, minimize the risk of complications, and discourage the development of chronic pain [1,2].

For decades, opioid agonists have been widely employed for the treatment of POP. However, their widespread use is increasingly challenged due to their limited efficacy and narrow therapeutic window [3-8]. Consequently, there is an ongoing search for effective and safe therapeutic strategies [9,10].

Multimodal analgesia, which involves the use of a combination of pharmacologic agents with diverse mechanisms of action, has emerged as a promising approach for achieving superior pain control while minimizing risks. This approach has gained attraction due to its effectiveness, including the combination of opioids with other pain modulators, such as cannabinoids [11-15]. In this context, previous studies revealed that the combination of opioids with cannabinoid agonists can produce additive and even synergistic effects in different pain models [16-19]. Low doses of tramadol combined with the cannabinoid CB1r agonist WIN55,212-2 induced antinociceptive effects in a neuropathic pain model in rats [20]. Similarly, the coadministration of WIN55,212-2 with morphine produced a synergistic antinociception effect in the formalin test [21] and a mouse model of neuropathic pain [22]. Besides, combining mu-opioid and CB2r agonists synergistically reduced pain in different animal models [23-25]. Moreover, FAAH and MAGL inhibitors improve the antinociceptive effects of morphine in a neuropathic pain model [26,27].

Based on the studies above, we aimed to further investigate the potential synergistic or additive effects of UCM707, an anandamide reuptake inhibitor [28], with morphine in the rat model of post-incisional pain following spinal administration. The spinal route was chosen due to the expression of endocannabinoid system components in the spinal cord's dorsal horn, allowing direct interaction with therapeutic targets and modulation of nociceptive signaling [11,13-15,29]. This approach focuses on inhibiting endocannabinoid reuptake, thus increasing anandamide at the spinal level and its concentration in active neural circuits. This strategy aims to achieve pain relief by modulating pain transmission and preventing central sensitization without the side effects associated with generalized cannabinoid and opioid receptor activation [3,5,30-34]. We hypothesize that the increase of spinal endocannabinoids would allow us to reduce the opioid doses needed to achieve an analgesic effect in a rat model of post-incisional pain and, consequently, the undesirable effects associated with morphine treatment.

To test this, we assessed the dose-response effects of spinal administration of morphine, UCM707 and its combination in the hot plate. Once the sub-effective doses were established, we examined the efficacy of combining intrathecal UCM707 and morphine in a rat model of post-incisional pain, evaluating the involvement of cannabinoid and opioid receptors by the pre-administration of the opioid antagonist naloxone [35], the CB1r-antagonist SR14176A [36], the CB2r-antagonist AM630 [37] and the TRPV1-antagonist AMG9810 [38].

## 2. Material and methods

### 2.1 Animals

Male Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain) were used for all behavioral experiments. Each animal was used only once. At the beginning of the experiments, rats were 2-3 months old and weighed 200-225 g. They were maintained at a constant temperature of  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and under a 12:12 h light-dark cycle (light from 8:00 to 20:00 h), with free access to food and water. All experimental procedures were carried out between 09:00 and 13:00 h and were performed following the highest standards of animal care, monitoring health, and minimizing pain and suffering under the Spanish Royal Decree 53/2013, the Spanish Law 32/2007, and the European Union Directive of 22nd September 2010 (2010/63/UE).

### 2.2 Intrathecal catheter implantation

Rats were spinal lumbar catheterized 5-7 days before the experiments. Intrathecal catheters were inserted during halothane anesthesia by passing a sterile and nonpyrogenic 0,85 x 0,45, 20 G made of pure polyamide with a closed distal end and 3 lateral holes (Perifix® Epidural Anesthesia Catheter - B. Braun Medical Inc.) through a laminectomy in the lumbar spine to a position 2 cm proximal to the L4-L5 intervertebral space (**Figure 1**).

Briefly, rats were anesthetized with 2% halothane in oxygen and placed with flexion of the spine using a 50 ml syringe transversely under the abdomen. Once the L4-L5 intervertebral space was identified and the skin was secured, a longitudinal incision was made over the spinous processes of the adjacent lumbar vertebrae and the fascia of the paravertebral muscles was cut to separate them from the spine using a blunt object. After exposure and release of the inferior spinous process to the space to be catheterized by cutting the interspinous ligaments, laminectomy was performed with disc forceps. Then, an 18G Tuohy needle was introduced until reaching the ligamentum flavum. Its penetration (about 2-5 mm) is perceived as resistance change. Subsequently, the catheter was inserted through a 2 cm cranial needle into the spinal subarachnoid space. The correct positioning was assured if one of the 2 following signs were noted: the presence of CSF in the needle hub before injection and/or twitch of the tail during the injection. Finally, the interspinous area was covered by muscle suture, and the catheter was tunneled subcutaneously lumbar to the posterior cervical region. The catheter was externalized on the top of the skull and sealed with a steel wire until the day of the experiment.

Following intrathecal catheter implantation, general anesthesia was stopped, and rats were kept in individual cages to observe the return of ambulatory functions. Rats with signs of neurologic dysfunction, such as limping or sensory deficits, were immediately euthanized with volatile anesthetics. Rats without neurologic deficits were returned to the vivarium and housed in individual cages for a week. The correct placement of the catheter was checked by administering lidocaine (15  $\mu\text{l}$ , 2 %) 2 days after the implantation. Locomotor recovery (injury severity) and the ability of the animal to perform the behavioral tests were evaluated using a 6-point locomotor score: 0 = no movement in limb, no weight bearing; 1 = barely perceptible movement of a limb, no weight bearing; 2 = frequent and/or vigorous movement in limb, no weight bearing; 3 = can support weight on limb, may take one or two steps; 4 = walks with deficit, balance and foot positioning; 5 = walks with only mild deficit; 6 = normal walking<sup>1</sup>. If animals had a score of 0 to 4, they were excluded.

Moreover, the correct placement of the catheter was verified postmortem again by removing the catheter from the cervical hole of the spinal canal after rat decapitation.

## 2.3 Experimental design

This study was conducted in two phases. The first aimed to select a subeffective dose of intrathecal morphine and UCM707. To this aim, the dose-response effects of morphine and UCM707 were evaluated in the hot plate test.

The second one was designed to assess the potential antinociceptive effect of intrathecal administration of subeffective doses of morphine + UCM 707, previously selected in phase 1, in the model of incisional pain in rats using the Von Frey Filaments.

### ***2.3.1. Experimental design for 1<sup>st</sup> phase: to find a subeffective dose of morphine and UCM707***

On day -7, rats were catheterized intrathecally (**Figure 2**). On day 0, rats were divided into four groups to receive: 1) Saline, 2) Morphine (1 µg), 3) Morphine (5 µg), 4) Morphine (10 µg), 5) UCM707 (75 µg), or 6) UCM707 (75 µg) + Morphine (1 µg). Hot-plate measurements were evaluated at 30 and 120 minutes after drug administration. Then, rats were sacrificed, and brains and spinal cords were collected for DAMGO or WIN-55,212-2 [<sup>35</sup>S] GTP γS binding autoradiography and Rt-PCR studies.

### ***2.3.2. Experimental design for 2<sup>nd</sup> phase: to evaluate the antinociceptive effects of subeffective doses of morphine plus UCM707 in modulating allodynia and the mechanisms underlying these effects***

#### ***Experiment 1: to evaluate the effects of morphine plus UCM707 (Figure 3).***

On days 1 and 4 after incisional pain, the tactile allodynia was measured 15' before and 30', 60' and 120' after administering saline or UCM707 + morphine coadministration. At the end of day 4, rats were sacrificed, and the spinal cord was removed and stored at -80°C for q-PCR studies.

#### ***Experiment 2: to elucidate the mechanism underlying morphine + UCM707 effects (Figure 4)***

On days 1 and 4 after incisional pain, the µ antagonist naloxone (12 µg), CB1r-antagonist SR141716A (30 µg), CB2r-antagonist AM630 (10 µg) and TRPV1-antagonist AMG9810 (30 µg) were pre-administered 30' before morphine (1 µg) + UCM707 (75 µg) or vehicle administration, evaluating the effects on tactile allodynia by electronic von Frey at 30, 60 and 120 minutes after its administration.

## 2.4 Postsurgical pain model: plantar incision model

Paw incision was carried out following the plantar incision model in rats [39]. Firstly, the entire right hind paw was disinfected with ethanol absolute and povidone-iodine. Then, a longitudinal incision from the epidermis to the musculus digitorum brevis was made on the plantar aspect using a scalpel (no. 11; 1 cm in length). The wound was subsequently stitched using two 5-0 Prolene mattress sutures and covered with a cotton swab with povidone-iodine.

## 2.5 Drugs

Morphine ((5α,6α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-diol) (Merck, Madrid, Spain) and the cannabinoid reuptake inhibitor UCM707 (N-(3-furanyl-methyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-

eicosatetraenamide) (Tocris, Madrid, Spain) were dissolved in their corresponding vehicle (saline and ethanol:cremophor: saline (1:1:18), respectively) immediately before use and intrathecal administered at the desired concentrations (morphine: 1, 5 or 10 µg; UCM707: 75 µg; UCM707 (75 µg) + morphine (1 µg)).

For the study testing antagonist effects, the opioid antagonist naloxone (Merck, Madrid, Spain) was dissolved in saline and administered at the desired concentration (12 µg). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A ((N-(piperidine-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1 H-pyrazole-3-carboxamide-hydrochloride) (Tocris, Madrid, Spain) [40] and the antagonist of TRPV1 receptor AMG9810 ((E)-3-(4-tert-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)acrylamide(1)) (Tocris, Madrid, Spain) [41] were dissolved in ethanol:cremophor: saline (1:1:18) and administered at the desired concentrations (30 and 50 µg, respectively). The cannabinoid CB2 receptor antagonist AM630 (6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl](4-methoxyphenyl)methanone) (Tocris, Madrid, Spain) [42] was dissolved with dimethylsulfoxide and saline (1:1) and administered at the desired concentration (10 µg).

The intrathecally administered drugs were delivered in a total volume of 20 µl, followed by 10 µl of saline to flush the catheter.

## 2.6. Behavioral tests

Each rat was placed in a plastic cage (25 cm long x 10 cm wide x 14 cm high) with a wire mesh floor and acclimatized to the cage for 15 minutes before each test session.

### 2.6.1. Thermal nociception: hot-plate test

Each rat was placed on a hot plate ( $55 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ), and the time-lapse for the rat to respond to the thermal pain (reaction time) was noted. A glass cylinder was used to keep the rat on the heated surface of the plate. Two responses were examined: paw-lick and jump latencies. The reaction time was determined at 30 and 120 minutes after each treatment. The antinociceptive response for each treated group was selected and compared with that obtained before treatment. The percent maximal possible effect (%MPE) was calculated as  $[(\text{Test latency after drug} - \text{baseline latency}) / (\text{cut-off latency (25s)} - \text{baseline latency})] \times 100$ .

### 2.6.2 Mechanical nociception: behavior test for assessing tactile allodynia

The tactile sensitivity of the plantar surface was assessed ipsilaterally to paw incision in each animal using an automated von Frey Dynamic Plantar Anesthesiometer (Ugo Basile 37400 Dynamic Plantar Aesthesiometer®), which does not produce tissue damage. Paw withdrawal response was elicited by applying an increasing force using a blunt-end metal filament (0.5 mm in diameter) focused on the proximal and distal area of the injured paw. The force was initially below the detection threshold, increasing from 1 to 40 g in 5 seconds. Paw withdrawal reflex is automatically recorded using two metrics: the latency until withdrawal, in seconds, and the force at which the paw was withdrawn, in grams, recorded as the mean of 2 measurements at 1-minute intervals. The antinociceptive response was calculated as  $\%MPE = [(\text{withdrawal threshold after drug} - \text{withdrawal threshold 1 or 4 days after paw incision}) / (\text{Cut-off time (20 s)} - \text{withdrawal threshold 1 or 4 days after paw incision})] \times 100$ .

## 2.7 Histological procedures

### 2.7.1 WIN-55,212-2 and DAMGO stimulated [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S binding autoradiography

Cannabinoid CB<sub>1</sub>r and  $\mu$ -receptor-stimulated [<sup>35</sup>S]-GTP  $\gamma$ S binding autoradiography was performed as previously described using the CB<sub>1</sub>r-agonist WIN-55,212-2 [43] and the  $\mu$ -opioid-agonist DAMGO [44], respectively. The lumbar sacra (LS) level spinal cord and coronal brain sections at the periaqueductal gray (PAG) level were cut on a cryostat [45] and mounted on gelatin-coated slides. The slides were rinsed in assay buffer (50nM Tris, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, pH 7.4) at 25°C for 10 min. Next, the sections were incubated with 2 mM GDP in assay buffer for 30 min at 25°C. Immediately, sections were incubated for two hours at 25°C in assay buffer with 0.04 nM [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S, 2mM GDP and the  $\mu$ -opioid-agonist DAMGO 3  $\mu$ M or CB<sub>1</sub>r-agonist WIN-55,212-2 3  $\mu$ M. The basal activity was assessed without an agonist, whereas non-specific binding was measured in 10  $\mu$ M unlabeled [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S. After incubation, slides were rinsed twice in 50 mM Tris buffer pH 7.4 and once in cold deionized water, air-dried and exposed to film (Kodak BioMax MR-1, Amersham, Madrid, Spain) for 24-48 h. Autoradiograms were analyzed with a PC using the public domain NIH Image program (developed at the US National Institutes of Health and available online at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Optical densities were calculated by subtracting in each “stimulated” measurement its corresponding “basal” value.

### 2.7.2 Gene expression studies by real-time PCR

The gene expression of Cnr1, Cnr2, Oprm1 and TRPV1 receptors was examined by real-time PCR (qPCR) in the LS spinal cord and different brain regions of rats exposed to a hot plate or underwent paw incision surgery. Briefly, two and a half hours later, after the administration of drugs, rats were killed. The spinal cord was removed rapidly and dissected at a level containing the LS, mounted onto slides and stored at -80°C.

LS was cut at 500  $\mu$ m, mounted onto slides, and stored at -80 °C. Later, LS sections were dissected following the method described by Palkovits [46]. Total RNA was obtained from LS using Biozol® Total RNA extraction reagent (Bioflux, Inilab, Madrid, Spain). After DNase digestion, the reverse transcription followed the manufacturer’s instructions (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Applied Biosystems, Madrid, Spain). Cnr1, Cnr2, Oprm1 and TRPV<sub>1</sub> gene expression were measured by using Taqman® Gene Expression assays (Rn00562880\_m1, Rn01637602\_gh, Rn01430371\_m1 and Rn01460299\_m1, respectively) (Applied Biosystems, Madrid, Spain) as a double-stranded DNA-specific fluorescent dye and performed on the StepOne Sequence Detector System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). The reference gene was 18S rRNA, detected using Taqman® ribosomal RNA control reagents. All primer-probe combinations were optimized and validated for relative quantification of gene expression. Briefly, data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene abundance was determined using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> method [47].

## 2.8. Statistical Analyses

According to the experimental data requirements, we performed a one-way analysis of variance (ANOVA), a two-way ANOVA with repeated measures, and a student’s t-test analysis. Post hoc tests were only applied when ANOVA (F value) indicated significance. All statistical analyses were performed with Sigma Plot v11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) software. Differences were considered significant if the error probability was less than 5%. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

### 3. Results

#### 2.1. Phase 1: Antinociceptive effects of spinal morphine and UCM707 using a hot plate test

##### 3.1.1 Responsiveness to thermic nociceptive stimulation (Hot plate)

Acute administration of morphine (5 or 10 $\mu$ g) resulted in antinociceptive activity as reflected in an increased MPE (%) at 30 (**Figure 5A**) and 120 minutes (**Figure 5B**) after their administration in rats. In contrast, morphine (1 $\mu$ g) and UCM707 (75 $\mu$ g) resulted in antinociceptive activity at 30 minutes (**Figure 5A**) with no effect at 120 minutes compared with the vehicle group (**Figure 5B**). Interestingly, the combination of morphine (1 $\mu$ g) and UCM707 (75 $\mu$ g) resulted in an apparent antinociceptive effect at the different time points examined (30 minutes: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test;  $F_{(5, 47)} = 25.878$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 5A**) (120 minutes: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test;  $F_{(5, 44)} = 9.322$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 5B**) (n= 7-9).

##### 3.1.2 Histological procedures

###### 3.1.2.1 DAMGO stimulated [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ s binding autoradiography

Low doses of morphine (1  $\mu$ g) failed to induce any alterations of  $\mu$ -opioid receptor activation in the PAG (**Figure 6A** and **Figure 6B**) but decreased stimulation in LS (**Figure 6C** and **Figure 6D**). Interestingly, intermediate and high doses of morphine (5 and 10 $\mu$ g) reduced  $\mu$ -opioid receptor stimulation in PAG and LS compared with the vehicle group. In contrast, no modification was observed in rats treated with UCM707 (75  $\mu$ g) or UCM707 (75  $\mu$ g)+ morphine (1  $\mu$ g) in PAG and LS (PAG: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test;  $F_{(5, 45)} = 6.987$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 6A** and **Figure 6B**) (LS: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test;  $F_{(5, 44)} = 8.353$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 6C** and **Figure 6D**) (n= 7-9).

###### 3.1.2.2. WIN55,212 stimulated [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ s binding autoradiography

No modification was observed in CB<sub>1</sub>r function in PAG with any drugs administered (**Figure 7A**). Only the high doses of morphine (10 $\mu$ g) significantly increased CB<sub>1</sub>r function in the LS (PAG: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keul test;  $F_{(6, 49)} = 0.846$ ,  $p = 0.542$ ; **Figure 7A**) (LS: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keul test;  $F_{(5, 36)} = 4.363$ ,  $p = 0.004$ ; **Figure 7B** and **Figure 7C**) (n= 7-9).

##### 3.1.3 Gene expression studies: qPCR

The results revealed that UCM707 (75  $\mu$ g) significantly increased Cnr2 (**Figure 8B**) and Oprm1 (**Figure 8D**) expression in the LS compared to the vehicle group. However, UCM707 (75  $\mu$ g) did not modify Cnr1 (**Figure 8A**) nor TRPV1 (**Figure 8C**) expression when it was given alone. Curiously, the combination of UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) significantly increase Cnr1, Cnr2, TRPV<sub>1</sub> and Oprm1 expression in the LS in comparison to the vehicle group (Cnr1: One way ANOVA

followed by the Student- Newman-Keuls test;  $F_{(2, 27)}= 5.425$ ,  $p= 0.011$ ; **Figure 8A**) ( $n= 8-14$ ), (Cnr2: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test;  $F_{(2, 18)}= 23.334$ ,  $p< 0.001$ ; Fig 8B) ( $n= 6-8$ ), (TRPV1: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test;  $F_{(2, 21)}= 3.403$ ,  $p=0.05$ ; **Figure 8C**) ( $n= 6-9$ ), (Oprm1: One way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test;  $F_{(2, 31)}= 13.853$ ,  $p<0.001$ ; **Figure 8D**) ( $n= 11-15$ ).

### 3.2 Phase 2: Antinociceptive effects of subeffective dose UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) in the rat model of incisional pain

#### 3.2.1 Responsiveness to mechanical nociception

The combination of morphine plus UCM707 induced an antinociceptive effect since it increased MPE (%) at 30, 60 and 120 minutes on day 1, both at proximal (**Figure 9A**) (Two way ANOVA with repeated measures: Group  $F_{(1,53)}=32.235$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 53)}= 0.459$ ,  $p=0.635$ ; group x time  $F_{(2,53)}=0.309$ ,  $p=0.735$ ) and distal level (**Figure 9B**) (Two way ANOVA with repeated measures: Group  $F_{(1,54)}=30.525$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 54)}= 6.136$ ,  $p=0.004$ ; group x time  $F_{(2,53)}=6. 873$ ,  $p=0.002$ ), compared to control group. Similarly, identical results were observed on day 4, following an increase of MPE (%) at each time point evaluated both at proximal (**Figure 9C**) (Two way ANOVA with repeated measures: Group  $F_{(1,56)}=36.720$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 56)}= 1.150$ ,  $p=0.324$ ; group x time  $F_{(2,56)}=1. 220$ ,  $p=0.303$ ) and distal level (**Figure 9D**) (Two way ANOVA with repeated measures: Group  $F_{(1,55)}=14.840$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 55)}= 0.393$ ,  $p=0.677$ ; group x time  $F_{(2,55)}=2.003$ ,  $p=0.145$ ).

#### 3.2.2 Gene expression studies: qPCR

The results revealed that the combination of morphine + UCM707 increase the expression of Cnr1 (Student t-test,  $t= -11.570$ ,  $p<0.001$ ; **Figure 10A**), Cnr2 (Student t-test,  $t= -15.940$ ,  $p<0.001$ ; **Figure 10B**) and TRPV1 (Student t-test,  $t= -7.516$ ,  $p<0.001$ ; **Figure 10C**) ( $n= 6-8$ ) in the LS. In contrast, no effect was observed in the gene expression of Oprm1 (Student t-test,  $t= -0.646$ ,  $p=0.531$ ; **Figure 10D**) ( $n= 6-8$ ) in the LS.

#### 3.2.3 Effects of the antagonists naloxone, SR141716A, AM630 and AMG9810 in the antinociceptive effects of UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) in the rat model of incisional pain

On day 1, the combination of UCM707 + morphine-induced an antinociceptive effect since it increased the %MPE at 30, 60 and 120 minutes at a proximal level compared to the vehicle group. Naloxone and SR141716A reversed the effects of UCM707 + morphine since it reduced %MPE at each time point evaluated. The antagonism of CB2r by the AM630 and the antagonism of TRPV1 by the AMG9810, did not modified the effects of UCM707 + morphine (**Figure 11A**) (Two way ANOVA with repeated measures: group  $F_{(5,84)}=12.283$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 84)}= 5.157$ ,  $p=0.008$ ; group x time  $F_{(10,84)}=2.656$ ,  $p=0.007$ ).

At the distal level, the combination of UCM707 + morphine showed an increase of %MPE at 30 and 60 minutes in comparison to rats treated with vehicle. Naloxone reversed the effects of the combination only at the time point of 30 minutes. No effect over antinociception induced by UCM707 + morphine was observed with SR141716A or AM630. Curiously, the AMG9810 significantly increased the %MPE induced by UCM707 + morphine at 60 minutes (**Figure 11B**)

(Two-way ANOVA with repeated measures: Group  $F_{(5,82)}=9.496$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 82)}= 16.129$ ,  $p<0.001$ ; group x time  $F_{(10,82)}= 2.676$ ,  $p= 0.007$ ).

On day 4, UCM707 + morphine presented an antinociceptive effect, increasing the %MPE at 30 and 60 minutes but not at 120 minutes at the proximal level (**Figure 11c**). Naloxone and AM630 reversed the effects of UCM707 + morphine at both time points, 30 and 60 minutes. Interestingly, the SR141716A significantly increased the antinociceptive effects of UCM707 + morphine at 30, 60 and 120 minutes. The antagonist AMG9810 also improved the effects of UCM707 + morphine at 30 and 120 minutes (Two way ANOVA with repeated measures: Group  $F_{(5,80)}=4.964$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 80)}= 0.562$ ,  $p= 0.572$ ; group x time  $F_{(10,80)}=0.0982$ ,  $p=1.000$ ).

At distal level, only the combination of SR141716A and AMG9810 with UCM707 + morphine increased the %MPE at 30, 60 and 120 minutes (**Figure 11b**) (Two way ANOVA with repeated measures: Group  $F_{(5,84)}=13.647$ ,  $p<0.001$ ; time  $F_{(2, 84)}= 6.802$ ,  $p=0.002$ ; group x time  $F_{(10,84)}= 2.534$ ,  $p= 0.010$ ).

#### 4. Discussion

The present study demonstrated that subeffective doses of spinal morphine and UCM707 induced a robust synergistic antinociception effect in rats' hot plate and post-incisional pain models. The following findings support this assumption: 1) The coadministration of UCM707 and morphine at subeffective doses induced a significant analgesic effect in the hot plate, 2) No effect was observed in the  $\mu$ -opioid receptor nor in the CB1r binding by the UCM707 + morphine combination in the regions analyzed, PAG and LS, 3) an increase of Cnr1, Cnr2, Oprm1 and TRPV1 was found in the LS of rats treated with the UCM707 + morphine combination, 4) the coadministration of UCM707 and morphine at subeffective doses significantly attenuated pain behaviors on postoperative days 1 and 4 after hind paw incision both in the proximal and distal areas of the surgical incision, 5) these behavioral alterations were associated to increase in Cnr1, Cnr2, and TRPV1 gene expressions in the LS without any alteration in Oprm1, 6) pretreatment with different antagonists revealed that the involvement of  $\mu$ -opioid, cannabinoid and TPRV1 receptors in the antinociceptive effects of UCM707 plus morphine varies depending on the time course, being  $\mu$  and CB1r more crucial on the postoperative day 1 and TPRV1 and CB2r on the postoperative day 4.

To our knowledge, this is the first study investigating the efficacy of drugs increasing endogenous cannabinoid signaling by blocking reuptake as an alternative approach to achieving spinal morphine analgesia in a rat model of incisional pain. Previous studies have provided information about synergistic antinociceptive effects of opioids and cannabinoids, mostly CB1r-agonists and, to a lesser extent, CB2r-agonists, in different chronic pain models [16-23,25]. Similarly, inhibiting the endocannabinoid metabolism using FAAH and MAGL inhibitors also induced antinociceptive effects per se [26,48-51]. It improved the analgesic effects of morphine in a neuropathic pain model [26,27]. Interestingly, the antihyperalgesic effects of FAAH inhibitors were blocked by the administration of the  $\mu$ -opioid antagonist naloxone or the kappa opioid receptor antagonist norbinaltorphimine [50,51]. These findings support the hypothesis that increasing eCB levels using inhibitors of endocannabinoid degradation elicits antinociception by a mechanism similar to direct activation of CB1r through the release of endogenous opioid peptides. Previous studies indicated that the increase in the endogenous cannabinoid tone facilitates adaptation or habituation to stress, protecting against the development of stress-related dysfunctions [52] and, therefore, preventing the perpetuation of acute POP following surgical insult [53]. Here, the UCM707, a potent and selective inhibitor of eCB uptake, was

selected to evaluate further the potential of increasing ECS signaling for post-incisional pain management, which has not been explored to date.

Firstly, we analyzed the analgesic properties of the combination of subeffective doses of UCM707 plus intrathecal morphine on the hot plate paradigm that assesses supraspinally organized responses to a noxious stimulus [54,55]. Intermediate (5  $\mu$ g) and high doses (10  $\mu$ g) of morphine display antinociceptive effects since increased the %MPE at both time points tested. Maximum effects were found at 30 minutes, with an increase of 76 % MPE with doses of 10  $\mu$ g. However, a single administration of morphine at 1  $\mu$ g induced antinociceptive effects at 30 minutes but not at 120 minutes. These results agree with previous studies showing that morphine caused an antinociceptive effect on models of acute pain at doses higher than 3  $\mu$ g [56,57]. Similarly, UCM707 at 75  $\mu$ g induced antinociceptive effects only at 30 minutes. Surprisingly, when combining both drugs, UCM707 and morphine, at subeffective doses, the analgesic effect is more significant than either alone, increasing %MPE at both 30 and 120 minutes. This result supports a synergistic or additive effect between the two drugs, in agreement with previous studies revealing such effects with the combination of opioids and cannabinoids (CB1r and CB2r-agonists) or FAAH/MAGL inhibitors in additional rodent models of pain [16-27].

The study's first phase extended the behavioral results evaluating the functional activation of  $\mu$ -receptor and CB1r by DAMGO- and WIN-55,212-2 [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding autoradiography, respectively, in the PAG and LS. These areas were chosen considering their role in nociception and the involvement of endocannabinoids and endogenous opioid peptides controlling response to pain in these areas [58-63]. Interestingly, morphine at intermediate (5 $\mu$ g) and high doses (10  $\mu$ g) reduced stimulation of  $\mu$ -opioid receptors in both regions. This inhibition did not support the decreased pain sensitivity in hot plate since a decrease in  $\mu$ -opioid receptor-mediated transmembrane signaling would have led to hyperalgesia rather than an antinociception [64]. Thus, our results suggest that the decreased pain sensitivity observed in these animals could not be due to enhanced  $\mu$ -opioid receptor signaling. Curiously, neither UCM707 alone nor in association with morphine produces any change in the  $\mu$ -opioid receptor signaling. In the case of CB1r, the results of the assessment of its functional activation by WIN55,1212-2 revealed a significant increase only in the group of rats treated with morphine at high doses (10  $\mu$ g) in the LS. As previously observed with the  $\mu$ -opioid receptor, no effect was observed in rats treated with UCM707 or UCM707 + morphine combination on CB1r activation.

However, the combination of UCM707 + morphine increased the gene expression of Cnr1, Cnr2, TRPV1 and Oprm1 in the LS. Discrepancies between CB1r and  $\mu$ -opioid receptor agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding and qPCR studies may be related to the time point of sample collection (120 minutes). It is tempting to speculate that the change in CB1r and  $\mu$ -opioid function may be less pronounced at this time, making it more difficult to detect, especially considering that maximum analgesic effects were observed at 30 minutes. In contrast, the time course required to observe changes in gene expression coincides with that of sample collection, which may explain why changes in the gene and not in activation are observed.

Curiously, UCM707 given alone increased Cnr2 and Oprm1 gene expression. Considering that the combination of UCM707 + morphine displayed antinociceptive effects at 120 minutes and the lack of effect at this time point of UCM707 when given alone, it is possible to hypothesize that TRPV1 and CB1r may play a relevant role in the antinociceptive effects of the combination since UCM707 alone did not modify their expressions.

In the study's second phase, based on the results obtained in the hot plate test, the coadministration of subeffective doses of UCM707 and morphine was evaluated in a rat model of

incisional pain. In this model, a surgical incision causes reproducible, quantifiable mechanical hyperalgesia that parallels the postoperative course of patients [39,65]. Rats develop short-lasting non-evoked guarding pain behavior (for a short time of approximately 2 days after incision), and longer-lasting evoked pain-related behavior to punctate mechanical stimuli (von Frey hairs) [66,67]. Interestingly, several lines of evidence suggest that the nature of hypersensitivity in this pain model is different from that of other sustained pain models, such as antigen-induced inflammation, chemical irritation or neuropathic pain [65,68-70]. In this context, although descending facilitation from the rostral ventromedial medulla contributes to behavioral hypersensitivity of diverse animal models of inflammatory and neuropathic pain [71], this mechanism is not involved in the hypersensitivity after incision [68]. Glial activation might contribute to developing and maintaining behavioral hypersensitivity after peripheral nerve insult [72]. Hence, glia and neuronal-glia interactions are attractive targets for treating post-incisional pain [73,74].

We found that intrathecal coadministration of subeffective doses of UCM707 and morphine reduced pain behaviors on days 1 and 4 after surgical incision, with the magnitude of hypoalgesia higher at 30 minutes. This relevant result supports that UCM707 and morphine have a synergistic or additive effect in this animal model. Accordingly, the combination of both drugs would avoid using higher doses of morphine to obtain an analgesic effect. Previous studies showed that morphine can reduce post-incisional nociception in rats but at higher doses and by other routes of administration [56,75]. Thus, the relevance of the present results is double: the use of intrathecal administration and the potential synergistic effects of UCM707 and morphine, which would reduce opioid dosage and provide a more complete analgesic action profile.

The mechanisms involved in the spinal antinociception of this pharmacological combination were evaluated by measuring the gene expression of key elements of the ECS and opioidergic system playing a relevant role in analgesia in the LS at the end of 4 days post-surgery. In this respect, the combination of UCM707 + morphine significantly increased the gene expression of *Cnr1*, *Cnr2* and *TRPV1* compared to rats treated with vehicle, with no change in *Oprm1* gene expression. The lack of effect on *Oprm1* may be related to the time the samples were obtained (on day 4 and 120 minutes after the administration of UCM707 + morphine). The absence of change in gene expression does not rule out that, functionally, the receptor is involved in the antinociceptive effects of the combination.

Consequently, to further explore the involvement of these receptors in the spinal antinociception induced by UCM707 and morphine, we pre-administered the opioid antagonist naloxone [35], the CB1r-antagonist SR141716A [36], the CB2r-antagonist AM360 [37] and the TRPV1-antagonist AMG9810 [38] before coadministration of the combination. Pretreatment with naloxone (12 µg) suppressed the paw withdrawal response on day 1 and day 4 after incisional pain. These findings support the hypothesis that endocannabinoid uptake inhibition may exert an antinociceptive effect by activating the µ-opioid receptors in the LS, independent of supraspinal influences. In line with this result, previous studies well-documented the interaction between opioids and cannabinoids; both are synthesized and released in active neural circuits, mediating an adaptive response to reduce pain and inflammation in response to injury and stress [52,76]. Besides, the blockade of cannabinoid CB1r reversed the analgesic effects of opioids [12,77-80].

Moreover, additional receptors, CB1r, CB2r and TRPV1, appear to play a role in the antinociceptive effects of the combination, which varies over time. The CB1r-antagonist SR141716A (30 µg) partially blocked the antinociceptive activity of subeffective doses of morphine plus UCM707 on day 1 but not on day 4, in which it improves. Interestingly, CB2r-antagonism induces just the opposite since AM630 (12 µg) blocked the antinociceptive activity of

the combination on day 4. Regarding the antagonism of TRPV1, the AMG9810 (50 µg) surprisingly improved the antinociceptive effect of UCM707 + morphine mostly on day 4. To understand these results, we must consider that the nervous system is plastic, able to change and readapt in response to environmental stimuli [81,82]. In this context, an adaptive plasticity process can result in a different function of the ECS [83], pointing out the relevance of assessing the effect of various compounds after plantar incision considering the time point of a temporal pattern when optimizing analgesic treatment after surgery.

Based on the results, activation of CB1r by endocannabinoids in LS appears to be mediated, at least in part, by the antinociceptive effects of UCM707 and morphine in the short-term (day 1). This assumption is consistent with previous studies demonstrating that agonism of CB1r induces antinociceptive actions in a variety of acute and persistent pain models [84-86] associated both with presynaptic terminals of nociceptive primary afferent neurons and with the dorsal horn neurons postsynaptically [87-89]. However, it should be considered that the regional upregulation of CB1r, which occurs at later stages, induces mechanical hyperalgesia-mediated suppression of inhibitory synapses [90]. This should explain why antagonism of CB1r on day 4 improves the antinociceptive effects of the combination.

The latter effect is possibly due to the pain-promoting adaptations to inhibitory synapses caused by activated microglia [91]. BDNF released by activated microglia collapses the chloride gradient of some pain transmission neurons in the dorsal horn of the LS, causing a shift to excitation at inhibitory synapses [92,93]. On the other hand, inflammation and nerve injury dramatically increase the expression of CB2r in microglia and astrocytes [94,95]; cumulative evidence showed that glial CB2r activation serves as a negative feedback mechanism to regulate glial activity. Consequently, CB2r is more relevant as the neuroinflammatory responses establish central sensitization mechanisms. This may explain why CB2r blockade only reduces the antinociceptive efficacy of UCM707 and morphine on day 4 after surgical incision. Consistent with our findings, Romero-Sandoval has described spinal analgesia evoked through CB2r in a model of postincisional pain [37]. Both microglia and astrocytes in the LS are activated in a rat model of postoperative pain, with a peak up-regulation of glia 3 days after surgery. Astrocytes are activated within 24 hours after hind paw incision, whereas microglia are not significantly upregulated until 3-4 days after incision [37,72]. Activation of CB2r might cause both anti-inflammatory effects by reducing cytokine release and pro-inflammatory actions [96,97].

Regarding the effects obtained after administration of TRPV1-antagonist AMG9810, it is tempting to speculate that UCM707 prevents the activation of TRPV1 receptors in the first instance by hindering the entry of AEA into the cell and its intracellular interaction. In contrast, as central sensitization mechanisms are established in the postoperative period, AEA at higher concentrations increased the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents recorded in substantia gelatinosa neurons acting on TRPV1. In this situation, spinal TRPV1 expressed in the central terminals of primary afferent nerve fibers contributes to secondary hyperalgesia [98,99]. Emerging data have led to recognizing of the spinal TRPV1 ion channel as a potential target for suppressing central pain facilitation, as indicated by the reduction of mechanical hypersensitivity following the administration of a TRPV1 antagonist [100]. This could explain why, in our study, TRPV1 antagonism on day 4 improves the antinociceptive efficacy of the combination of UCM707 and morphine.

## 5. Conclusions

In summary, our results propose that subeffective doses of UCM707 and morphine reduce pain in a post-incisional pain model in rats, suggesting that UCM707 may be acting as a co-adjuvant drug in patients requiring treatment with opioids for relief of POP. Moreover, the therapeutic potential of enhancing ECS signaling and reducing POP appears to be related to the activation of spinal CB1r and CB2r at different stages. These results highlight the relevance of assessing the analgesic effects of drugs acting on the ECS, considering the time point of a temporal pattern when optimizing analgesic treatment after surgery. One limitation of the study is the non-inclusion of female rats, which needed to include both sexes to understand better the therapeutic and safety effects of treatments in the entire population.

### Author contribution

AJC: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Writing - original draft. MSGG: Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing - original draft; and Writing - review & editing. RS: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing - original draft. JM: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Writing - review & editing.

**Acknowledgments:** We thank Biorender for image 1.

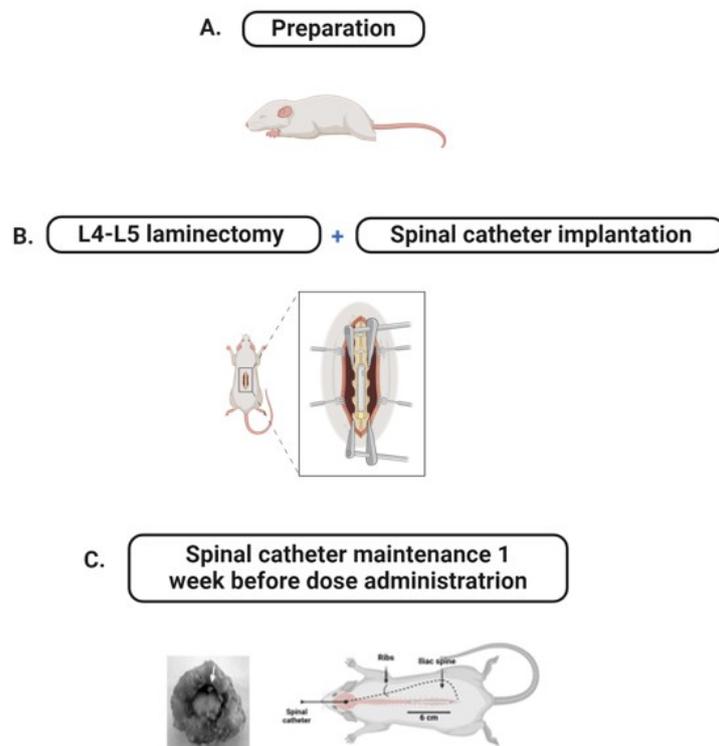
**Funding:** This work was supported by external funding for JM (Research Foundation Mutua Madrileña 2006 and 2009).

## 6. Figures and legends

<b>Figure 1.</b> Lumbar spinal catheterization.....	277
<b>Figure 2.</b> Time course of experiments of the first phase: hot plate.....	278
<b>Figure 3.</b> Schematic representation of time course experiments of the second phase: post-incisional pain model. ....	279
<b>Figure 4.</b> Schematic representation of the experiments to evaluate the effects of intrathecal $\mu$ , CB1r, CB2r and TRPV1 receptor antagonists on reversal antinociceptive effects of UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) on day 1 and day 4 after surgical paw incision. ....	280
<b>Figure 5.</b> Effects of intrathecal morphine (1, 5 and 10 $\mu$ g), UCM707 (75 $\mu$ g) or UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) on the hot plate test.....	281
<b>Figure 6.</b> $\mu$ -receptor function in the periaqueductal gray and lumbar sacra spine of rats treated with morphine (1, 5 or 10 $\mu$ g), UCM707 (75 $\mu$ g) or UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) and exposed to the hot plate using DAMGO [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S binding autoradiography.....	282
<b>Figure 7.</b> CB <sub>1</sub> -receptor function in the periaqueductal gray and lumbar sacra spine of rats treated with morphine (1, 5 or 10 $\mu$ g), UCM707 (75 $\mu$ g) or UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) and exposed to the hot plate using WIN55,1212-2 [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S binding autoradiography.....	283
<b>Figure 8.</b> Relative Cnr1, Cnr2, TRPV1 and Oprm1 gene expression in lumbar sacra spine of rats treated with UCM707 (75 $\mu$ g) or UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) exposed to the hot plate.....	284
<b>Figure 9.</b> Effects of UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) on tactile allodynia, measured by electronic von Frey, following incision plantar surface of the rat hind paw.....	285
<b>Figure 10.</b> Relative Cnr1, Cnr2, TRPV1 and Oprm1 gene expression in lumbar sacra spine of rats treated with UCM707 (75 $\mu$ g) or UCM707 (75 $\mu$ g) + morphine (1 $\mu$ g) exposed to the incisional pain model. ....	286
<b>Figure 11.</b> Effects of $\mu$ -antagonist naloxone (12 $\mu$ g), CB <sub>1</sub> r-antagonist SR141716A (30 $\mu$ g), CB <sub>2</sub> r-antagonist AM630 (10 $\mu$ g) and TRPV1-antagonist AMG9810 (30 $\mu$ g) on reversal the antinociceptive effects of UCM707 + morphine in the post incisional rat model.....	287

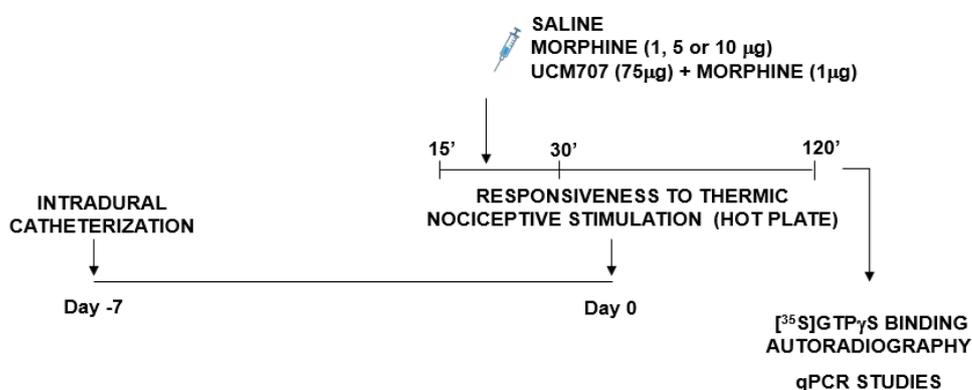


**Figure 1.** Lumbar spinal catheterization.



*Note.* A) Preparation. Anesthetic induction and placement of the animal in the prone position. Flexion of lumbar spine; B) Laminectomy and intrathecal catheter placement. Excision of the spinous process inferior to the space to be catheterized. Approach the interspinous space with an 18G Tuohy needle and insert the previously purged catheter 2 cm cranially into the intrathecal space. C) Maintenance of the intrathecal catheter 1 week before dose administration.

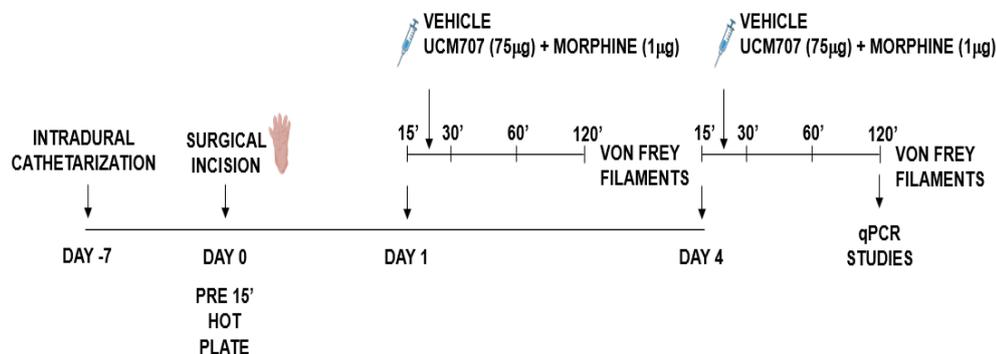
**Figure 2.** Time course of experiments of the first phase: hot plate.



*Note.* **Day -7:** Rats were catheterized intrathecally. **Day 0:** the potential antinociceptive effects of acute intrathecal administration of morphine (1, 5 and 10 µg), UCM707 (75 µg), UCM707 + morphine (1 µg) and vehicle (day 0) were evaluated in the hot plate test 30 and 120 minutes after its corresponding administration. At the end of the test, rats were sacrificed by decapitation and samples were used for subsequent studies of GTP $\gamma$ -binding autoradiography and qPCR.

*Nota.* **Día -7:** Las ratas fueron cateterizadas. **Día 0:** Se evaluaron los posibles efectos antinociceptivos de la administración IT de morfina (1, 5 y 10 µg) , UCM707 (75 µg) , UCM707+morfina (1 µg) y vehículo en la prueba de la placa caliente antes de la administración del fármaco y a los 30 y 120 minutos de su correspondiente administración. Al final de la prueba, las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación.

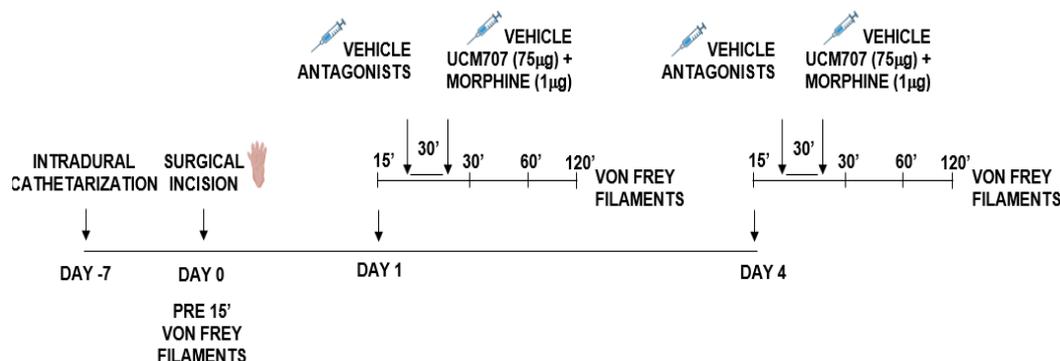
**Figure 3.** Schematic representation of time course experiments of the second phase: post-incisional pain model.



*Note .* **Day -7:** Rats were intradural catheterized. **Day 0:** surgical incision. **Day 1 and Day 4:** The effects of acute intrathecal administration of UCM707 (75 µg) + morphine (1 µg) or vehicle on tactile allodynia, measured by electronic von Frey, were evaluated 30, 60 and 120 minutes after its corresponding administration. At the end of day 4, rats were sacrificed, and the spinal cord was removed and stored at -80°C for qPCR studies.

*Nota .* **Día -7:** Se realizó la cateterización IT de las ratas. **Día 0:** Se realizó la incisión quirúrgica. **Día 1 y Día 4:** Se evaluaron los efectos de la administración IT aguda de UCM707 (75 µg) + morfina (1 µg) o vehículo sobre la alodinia táctil, medida mediante el von Frey electrónico, a los 30, 60 y 120 minutos de la administración correspondiente. **Al final del día 4:** Se sacrificaron las ratas, se extrajo la médula espinal y se almacenó a -80 °C para estudios de q-PCR.

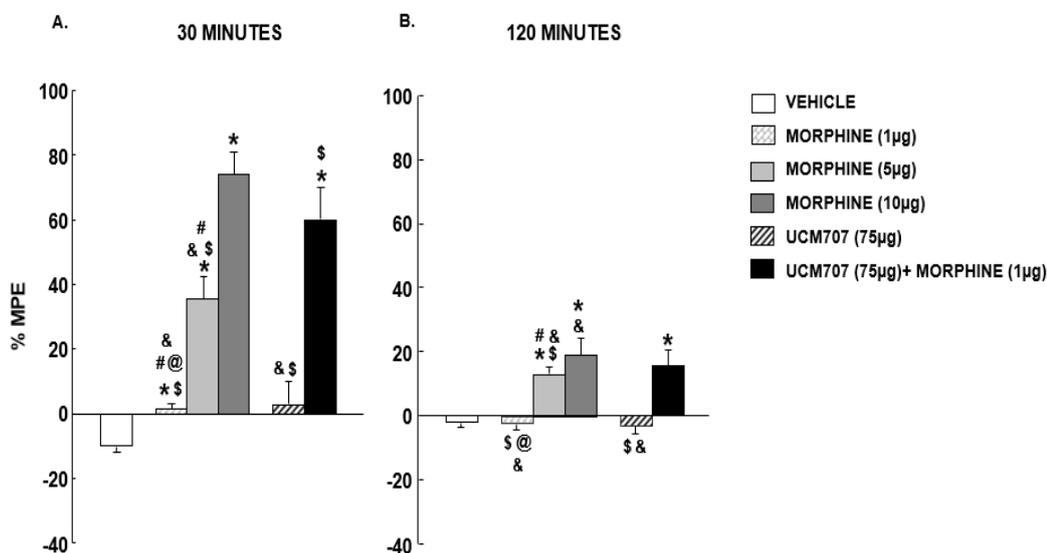
**Figure 4.** Schematic representation of the experiments to evaluate the effects of intrathecal  $\mu$ , CB1r, CB2r and TRPV1 receptor antagonists on reversal antinociceptive effects of UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) on day 1 and day 4 after surgical paw incision.



**Note . Day -7:** Rats were intradural catheterized. **Day 0:** surgical incision. **Day 1 and day 4:** The effects of acute intrathecal administration of  $\mu$ -antagonist naloxone (12  $\mu$ g), CB<sub>1</sub>r-antagonist SR141716A (30  $\mu$ g), CB<sub>2</sub>r-antagonist AM630 (10  $\mu$ g) and TRPV1-antagonist AMG9810 (30  $\mu$ g) on reversal antinociceptive effects of UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) were evaluated 30, 60 and 120 minutes after its corresponding administration. Antagonists were administered 30' before the administration of the combination UCM707+morphine. Electronic von Frey filaments measured tactile allodynia.

**Nota . Día -7:** Se realizó la cateterización IT de las ratas. **Día 0:** Se realizó la incisión quirúrgica. **Día 1 y Día 4:** Se evaluaron los efectos de la administración IT aguda de naloxona (12  $\mu$ g), SR141716A (30  $\mu$ g), AM630 (10  $\mu$ g) y AMG9810 (30  $\mu$ g), antagonistas de los receptores  $\mu$ , CB<sub>1</sub>r, CB<sub>2</sub>r y TRPV1, respectivamente, sobre la reversión de los efectos antinociceptivos de UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g) a los 30, 60 y 120 minutos de su administración correspondiente. Los antagonistas se administraron 30 minutos antes de la administración de la combinación UCM707+morfina. Se midió la alodinia táctil mediante filamentos electrónicos de von Frey. **Al final del día 4:** Se sacrificaron las ratas, se extrajo la médula espinal y se almacenó a -80 °C para estudios de q-PCR.

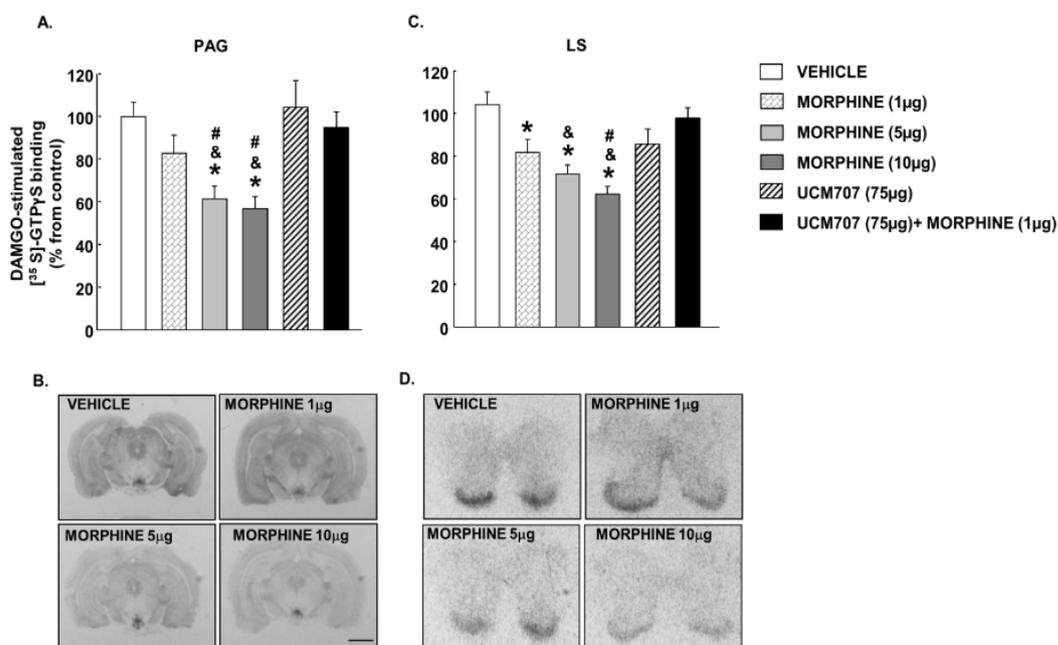
**Figure 5.** Effects of intrathecal morphine (1, 5 and 10  $\mu\text{g}$ ), UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) or UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) + morphine (1  $\mu\text{g}$ ) on the hot plate test.



*Note.* The antinociceptive activity is expressed as a percentage of the maximum possible effect (% MPE) at 30 (panel A) and 120 minutes (panel B) after drug administration. Columns represent the means and vertical lines  $\pm$  SEM of %MPE. \*, values that are significantly different from the saline group; @, values are significantly different from morphine (5  $\mu\text{g}$ ) group; #, values that are significantly different from UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) group; \$ values significantly differ from the morphine 5  $\mu\text{g}$  group; &, values that are significantly different from UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) + morphine (1  $\mu\text{g}$ ) group.

*Nota.* La actividad antinociceptiva se expresa como porcentaje del efecto máximo posible (% EMP) a los 30 minutos (panel A) y 120 minutos (panel B) tras la administración de los fármacos. Las columnas representan las medias y las líneas verticales  $\pm$  SEM del % EMP. \* valores significativamente diferentes respecto al grupo de solución salina; @ valores significativamente diferentes respecto al grupo de morfina (5  $\mu\text{g}$ ); # valores significativamente diferentes respecto al grupo de UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ); \$ valores significativamente diferentes respecto al grupo de morfina (5  $\mu\text{g}$ ); & valores significativamente diferentes respecto al grupo de UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) + morfina (1  $\mu\text{g}$ ).

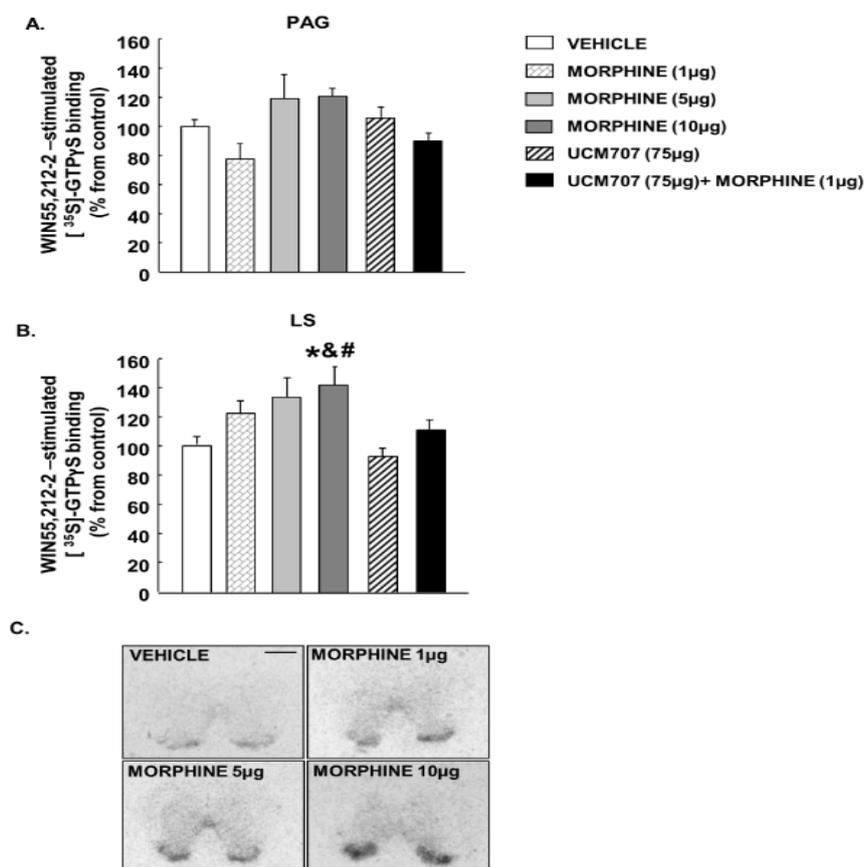
**Figure 6.**  $\mu$ -receptor function in the periaqueductal gray and lumbar sacra spine of rats treated with morphine (1, 5 or 10  $\mu$ g), UCM707 (75  $\mu$ g) or UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) and exposed to the hot plate using DAMGO [ $^{35}$ S]-GTP  $\gamma$ S binding autoradiography.



*Note.* Columns represent the mean and vertical lines  $\pm$  SEM of the  $\mu$ -opioid receptor function in the periaqueductal gray (PAG) (panel A) and lumbar sacra (LS) (panel C). \*, values that are significantly different from the vehicle group; #, values that are significantly different from the UCM707 group (75  $\mu$ g); &, values that are significantly different from the UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) group. Representative autoradiograms for  $\mu$ -opioid receptor function in the periaqueductal gray (B) and lumbar sacra spine (D). Bar represents 1 mm.

*Nota.* Las columnas representan la media y las líneas verticales  $\pm$  SEM de la función del receptor  $\mu$ -opioides en el área gris periacueductal (PAG) (panel A) y en la médula espinal lumbar sacra (LS) (panel C). \* valores significativamente diferentes respecto al grupo vehículo; # valores significativamente diferentes respecto al grupo UCM707 (75  $\mu$ g); & valores significativamente diferentes respecto al grupo UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g). Se muestran autoradiogramas representativos de la función del receptor  $\mu$ -opioides en el área gris periacueductal (panel B) y en la médula espinal lumbar sacra (panel D). La barra representa 1 mm.

**Figure 7.** *CB<sub>1</sub>-receptor function in the periaqueductal gray and lumbar sacra spine of rats treated with morphine (1, 5 or 10 μg), UCM707 (75 μg) or UCM707 (75 μg) + morphine (1μg) and exposed to the hot plate using WIN55,1212-2 [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding autoradiography.*

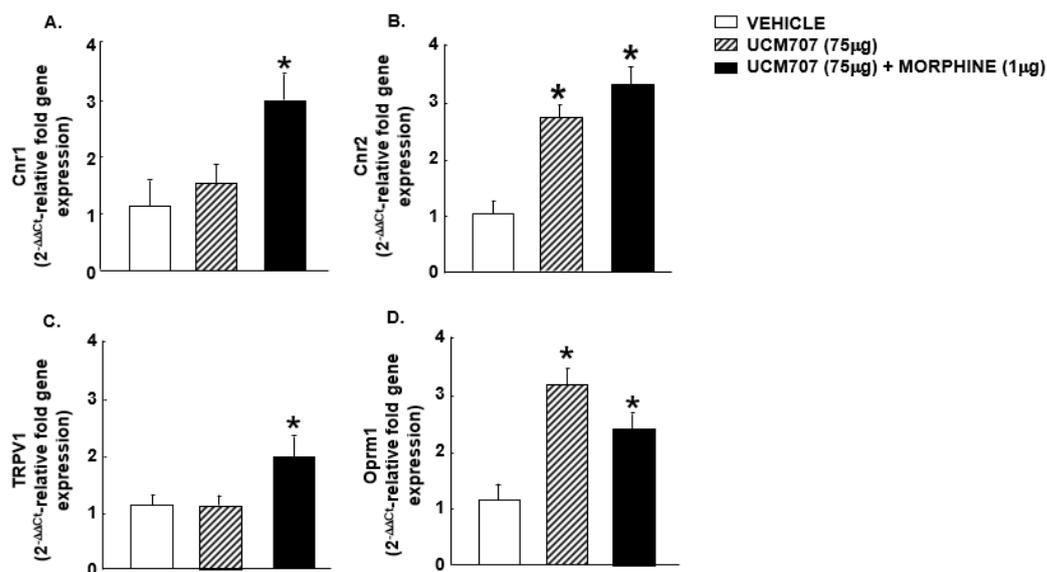


*Note.* Columns represent the mean and vertical lines  $\pm$  SEM of the CB<sub>1</sub>-receptor function in the periaqueductal gray (PAG) (panel A) and lumbar sacra (LS) (panel B). \*, values that are significantly different from the vehicle group; #, values that are significantly different from the UCM707 group; &, values that are significantly different from the UCM707 + morphine group. Representative autoradiograms for CB<sub>1</sub> receptor function in lumbar sacra spine (panel C). Bar represents 1 mm.

*Nota.* Las columnas representan la media y las líneas verticales  $\pm$  SEM de la función del receptor CB<sub>1</sub> en el área gris periacueductal (PAG) (panel A) y en la médula espinal lumbar sacra (LS) (panel B). \* valores significativamente diferentes respecto al grupo vehículo; # valores significativamente diferentes respecto al grupo UCM707 (75 μg); & valores significativamente diferentes

respecto al grupo UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) + morfina (1  $\mu\text{g}$ ). Se presentan autorradiogramas representativos de la función del receptor CB1 en la médula espinal lumbar sacra (panel C). La barra representa 1 mm.

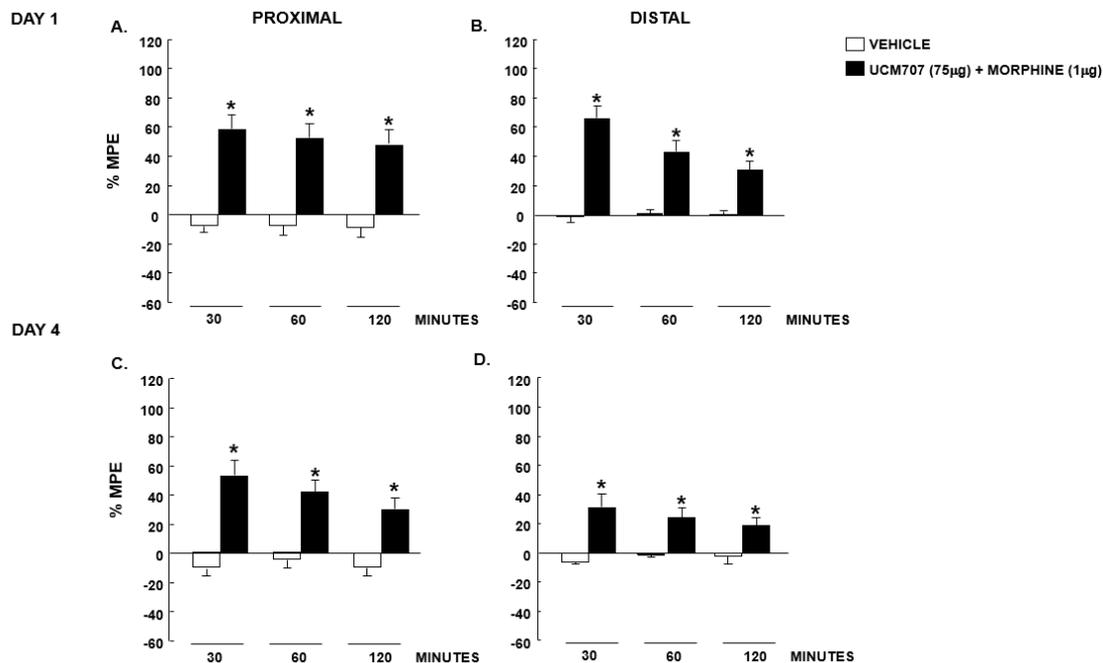
**Figure 8.** Relative *Cnr1*, *Cnr2*, *TRPV1* and *Oprm1* gene expression in lumbar sacra spine of rats treated with UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) or UCM707 (75  $\mu\text{g}$ ) + morphine (1  $\mu\text{g}$ ) exposed to the hot plate.



*Note*. Columns represent the mean and vertical lines  $\pm$  SEM of relative *Cnr1* (panel A), *Cnr2* (panel B), *TRPV1* (panel C) and *Oprm1* (panel D) expression. \*, Values that are significantly different from the control group.

*Nota*. Las columnas representan la media y las líneas verticales  $\pm$  SEM de la expresión relativa de *Cnr1* (panel A), *Cnr2* (panel B), *TRPV1* (panel C) y *Oprm1* (panel D). \*, Valores que son significativamente diferentes del grupo control.

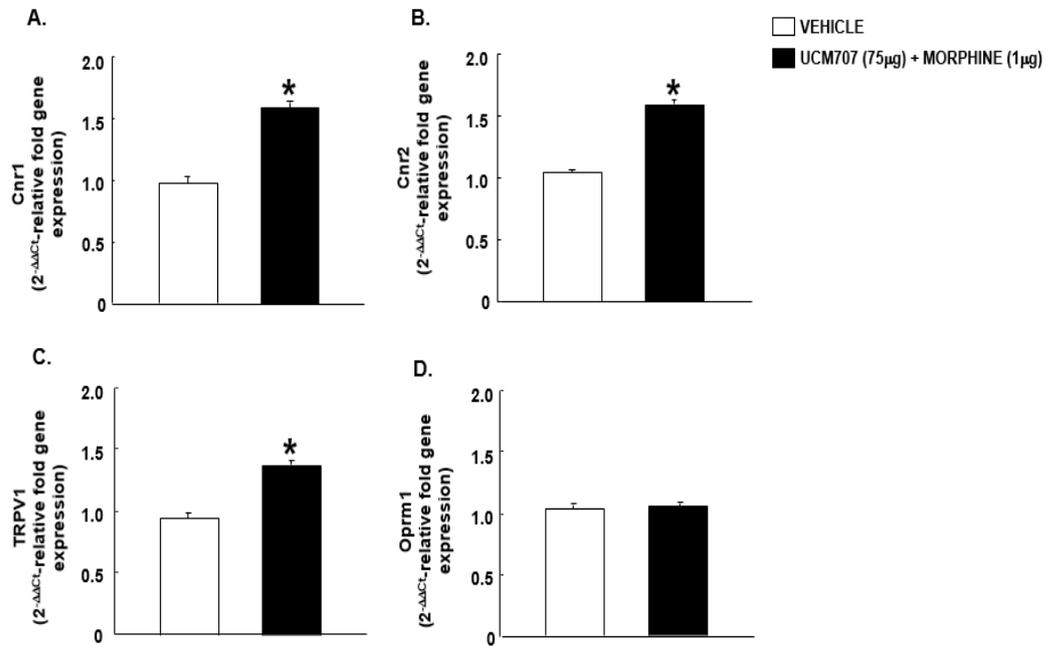
**Figure 9.** Effects of UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) on tactile allodynia, measured by electronic von Frey, following incision plantar surface of the rat hind paw.



Note . On day 1 (panels A and B) and day 4 (panels C and D) after the surgical incision, the tactile allodynia was measured at different time points (30', 60' and 120') after the administration of vehicle or UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g). Columns represent the means and vertical lines  $\pm$  SEM of maximal possible effect (%MPE). \* Values that are significantly different from the control group.

*Nota.* En el día 1 (paneles A y B) y el día 4 (paneles C y D) después de la incisión quirúrgica, se midió la alodinia táctil en diferentes puntos de tiempo (30', 60' y 120') tras la administración de vehículo o UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g). Las columnas representan las medias y las líneas verticales  $\pm$  SEM del efecto máximo posible (% EMP). \* Valores significativamente diferentes respecto al grupo control.

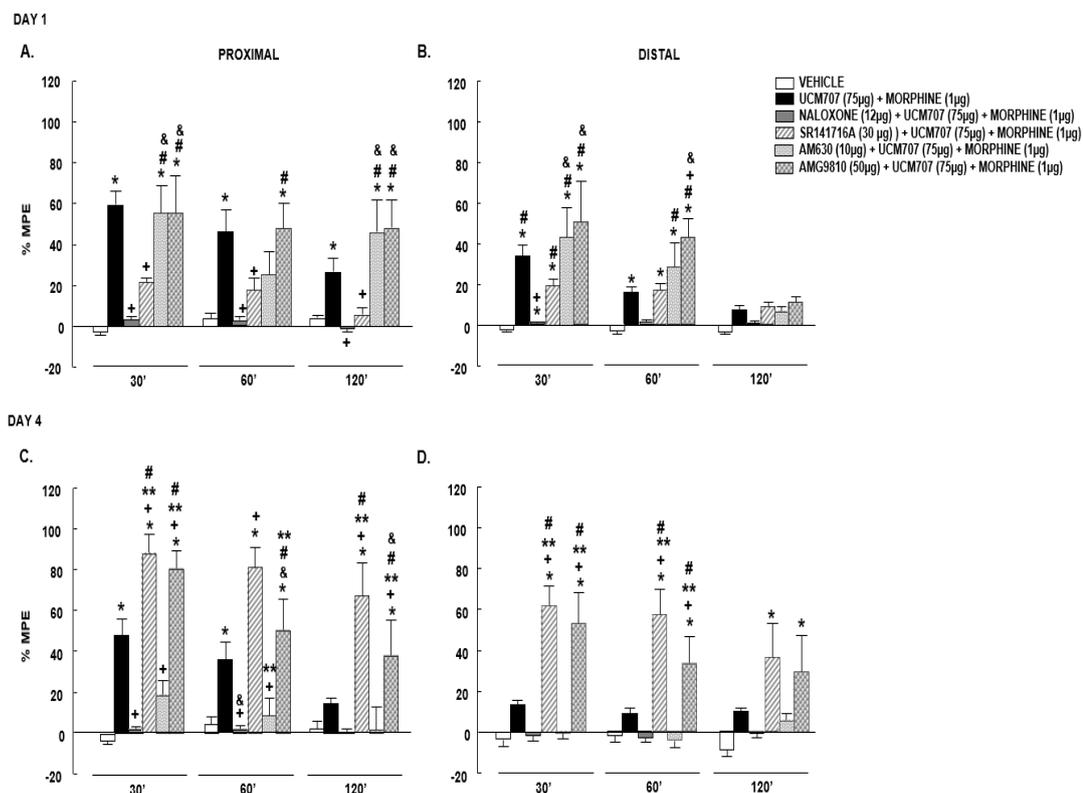
**Figure 10.** Relative *Cnr1*, *Cnr2*, *TRPV1* and *Oprm1* gene expression in lumbar sacra spine of rats treated with UCM707 (75  $\mu$ g) or UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g) exposed to the incisional pain model.



*Note.* Columns represent the mean and vertical lines  $\pm$  SEM of relative *Cnr1* (panel A), *Cnr2* (panel B), *TRPV1* (panel C) and *Oprm1* (panel D) expression. \*, Values that are significantly different from the control group.

*Nota.* Las columnas representan la media y las líneas verticales  $\pm$  SEM de la expresión relativa de *Cnr1* (panel A), *Cnr2* (panel B), *TRPV1* (panel C) y *Oprm1* (panel D). \* Valores significativamente diferentes respecto al grupo control.

**Figure 11.** Effects of  $\mu$ -antagonist naloxone (12 $\mu$ g),  $CB_1$ -antagonist SR141716A (30 $\mu$ g),  $CB_2$ -antagonist AM630 (10 $\mu$ g) and TRPV1-antagonist AMG9810 (30 $\mu$ g) on reversal the antinociceptive effects of UCM707 + morphine in the post incisional rat model.



*Note.* On days 1 and 4 after hind paw incision, rats were pretreated with their corresponding antagonist 30 minutes before the administration of UCM707 (75  $\mu$ g) + morphine (1  $\mu$ g). The time of maximal reversal for each compound was measured at 30, 60 and 120 minutes after the last administration in proximal (day 1, panel A; day 4, panel C) and distal (day 1, panel B; day 4, panel D) areas. Columns represent the mean and vertical lines  $\pm$  SEM maximal possible effect (%MPE). \*, Values that are significantly different from the control group. #, Values that are significantly different from the naloxone group; &, Values that are significantly different from the SR141716A group; +, Values that are significantly different from the UCM707 + morphine group; \*\*, values that are significantly different from the AM630 group.

*Nota.* En los días 1 y 4 después de la incisión en la pata trasera, las ratas fueron pretratadas con el antagonista correspondiente 30 minutos antes de la administración de UCM707 (75  $\mu$ g) + morfina (1  $\mu$ g). Se midió el tiempo de

reversión máxima para cada compuesto a los 30, 60 y 120 minutos después de la última administración, tanto en áreas proximales (día 1, panel A; día 4, panel C) como distales (día 1, panel B; día 4, panel D). Las columnas representan la media y las líneas verticales  $\pm$  SEM del efecto máximo posible (%MPE). \*, Valores que son significativamente diferentes del grupo control. \*, Valores que son significativamente diferentes del grupo tratado con naloxona; &, Valores que son significativamente diferentes del grupo tratado con SR141716A; +, Valores que son significativamente diferentes del grupo UCM707 + morfina; \*\*, Valores que son significativamente diferentes del grupo AM630.

## 7. References

1. Margraf, A.; Ludwig, N.; Zarbock, A.; Rossaint, J. Systemic Inflammatory Response Syndrome After Surgery: Mechanisms and Protection. *Anesth Analg* **2020**, *131*, 1693-1707, doi:10.1213/ANE.0000000000005175.
2. Sinatra, R. Causes and consequences of inadequate management of acute pain. *Pain Med* **2010**, *11*, 1859-1871, doi:10.1111/j.1526-4637.2010.00983.x.
3. Oderda, G.M.; Gan, T.J.; Johnson, B.H.; Robinson, S.B. Effect of opioid-related adverse events on outcomes in selected surgical patients. *J Pain Palliat Care Pharmacother* **2013**, *27*, 62-70, doi:10.3109/15360288.2012.751956.
4. Ueda, H.; Inoue, M.; Takeshima, H.; Iwasawa, Y. Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence. *J Neurosci* **2000**, *20*, 7640-7647, doi:10.1523/JNEUROSCI.20-20-07640.2000.
5. Wheeler, M.; Oderda, G.M.; Ashburn, M.A.; Lipman, A.G. Adverse events associated with postoperative opioid analgesia: a systematic review. *J Pain* **2002**, *3*, 159-180, doi:10.1054/jpai.2002.123652.
6. Colvin, L.A.; Bull, F.; Hales, T.G. Perioperative opioid analgesia-when is enough too much? A review of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Lancet* **2019**, *393*, 1558-1568, doi:10.1016/S0140-6736(19)30430-1.
7. de Boer, H.D.; Detriche, O.; Forget, P. Opioid-related side effects: Postoperative ileus, urinary retention, nausea and vomiting, and shivering. A review of the literature. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **2017**, *31*, 499-504, doi:10.1016/j.bpa.2017.07.002.
8. Hah, J.M.; Bateman, B.T.; Ratliff, J.; Curtin, C.; Sun, E. Chronic Opioid Use After Surgery: Implications for Perioperative Management in the Face of the Opioid Epidemic. *Anesth Analg* **2017**, *125*, 1733-1740, doi:10.1213/ANE.0000000000002458.
9. WHO. Opioid overdose. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/opioid-overdose> (accessed on 11/03/2024).
10. Lee, M.T.; Mackie, K.; Chiou, L.C. Alternative pain management via endocannabinoids in the time of the opioid epidemic: Peripheral neuromodulation and pharmacological interventions. *Br J Pharmacol* **2023**, *180*, 894-909, doi:10.1111/bph.15771.
11. Manzanares, J.; Corchero, J.; Romero, J.; Fernandez-Ruiz, J.J.; Ramos, J.A.; Fuentes, J.A. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* **1999**, *20*, 287-294, doi:10.1016/s0165-6147(99)01339-5.
12. Cichewicz, D.L.; Martin, Z.L.; Smith, F.L.; Welch, S.P. Enhancement mu opioid antinociception by oral delta9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, *289*, 859-867.
13. Vigano, D.; Rubino, T.; Parolaro, D. Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav* **2005**, *81*, 360-368, doi:10.1016/j.pbb.2005.01.021.
14. Bouchet, C.A.; Ingram, S.L. Cannabinoids in the descending pain modulatory circuit: Role in inflammation. *Pharmacol Ther* **2020**, *209*, 107495, doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107495.
15. Starowicz, K.; Finn, D.P. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv Pharmacol* **2017**, *80*, 437-475, doi:10.1016/bs.apha.2017.05.003.
16. Alsalem, M.; Altarifi, A.; Haddad, M.; Aldossary, S.A.; Kalbouneh, H.; Aldaoud, N.; Saleh, T.; El-Salem, K. Antinociceptive and Abuse Potential Effects of Cannabinoid/Opioid Combinations in a Chronic Pain Model in Rats. *Brain Sci* **2019**, *9*, doi:10.3390/brainsci9110328.
17. Abrams, D.I.; Couey, P.; Shade, S.B.; Kelly, M.E.; Benowitz, N.L. Cannabinoid-opioid interaction in chronic pain. *Clin Pharmacol Ther* **2011**, *90*, 844-851, doi:10.1038/clpt.2011.188.
18. Lynch, M.E.; Clark, A.J. Cannabis reduces opioid dose in the treatment of chronic non-cancer pain. *J Pain Symptom Manage* **2003**, *25*, 496-498, doi:10.1016/s0885-3924(03)00142-8.
19. Miller, L.L.; Picker, M.J.; Umberger, M.D.; Schmidt, K.T.; Dykstra, L.A. Effects of alterations in cannabinoid signaling, alone and in combination with morphine, on pain-elicited and pain-suppressed behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **2012**, *342*, 177-187, doi:10.1124/jpet.112.191478.

20. Alsalem, M.; Altarifi, A.; Haddad, M.; Azab, B.; Kalbouneh, H.; Imraish, A.; Saleh, T.; El-Salem, K. Analgesic Effects and Impairment in Locomotor Activity Induced by Cannabinoid/Opioid Combinations in Rat Models of Chronic Pain. *Brain Sci* **2020**, *10*, doi:10.3390/brainsci10080523.
21. Chen, X.; Cowan, A.; Inan, S.; Geller, E.B.; Meissler, J.J.; Rawls, S.M.; Tallarida, R.J.; Tallarida, C.S.; Watson, M.N.; Adler, M.W.; et al. Opioid-sparing effects of cannabinoids on morphine analgesia: participation of CB(1) and CB(2) receptors. *Br J Pharmacol* **2019**, *176*, 3378-3389, doi:10.1111/bph.14769.
22. Kazantzis, N.P.; Casey, S.L.; Seow, P.W.; Mitchell, V.A.; Vaughan, C.W. Opioid and cannabinoid synergy in a mouse neuropathic pain model. *Br J Pharmacol* **2016**, *173*, 2521-2531, doi:10.1111/bph.13534.
23. Grenald, S.A.; Young, M.A.; Wang, Y.; Ossipov, M.H.; Ibrahim, M.M.; Largent-Milnes, T.M.; Vanderah, T.W. Synergistic attenuation of chronic pain using mu opioid and cannabinoid receptor 2 agonists. *Neuropharmacology* **2017**, *116*, 59-70, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.12.008.
24. Yuill, M.B.; Hale, D.E.; Guindon, J.; Morgan, D.J. Anti-nociceptive interactions between opioids and a cannabinoid receptor 2 agonist in inflammatory pain. *Mol Pain* **2017**, *13*, 1744806917728227, doi:10.1177/1744806917728227.
25. Iyer, V.; Slivicki, R.A.; Thomaz, A.C.; Crystal, J.D.; Mackie, K.; Hohmann, A.G. The cannabinoid CB(2) receptor agonist LY2828360 synergizes with morphine to suppress neuropathic nociception and attenuates morphine reward and physical dependence. *Eur J Pharmacol* **2020**, *886*, 173544, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173544.
26. Wilkerson, J.L.; Niphakis, M.J.; Grim, T.W.; Mustafa, M.A.; Abdullah, R.A.; Poklis, J.L.; Dewey, W.L.; Akbarali, H.; Banks, M.L.; Wise, L.E.; et al. The Selective Monoacylglycerol Lipase Inhibitor MJN110 Produces Opioid-Sparing Effects in a Mouse Neuropathic Pain Model. *J Pharmacol Exp Ther* **2016**, *357*, 145-156, doi:10.1124/jpet.115.229971.
27. Wilkerson, J.L.; Ghosh, S.; Mustafa, M.; Abdullah, R.A.; Niphakis, M.J.; Cabrera, R.; Maldonado, R.L.; Cravatt, B.F.; Lichtman, A.H. The endocannabinoid hydrolysis inhibitor SA-57: Intrinsic antinociceptive effects, augmented morphine-induced antinociception, and attenuated heroin seeking behavior in mice. *Neuropharmacology* **2017**, *114*, 156-167, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.11.015.
28. Yang, Y.Y.; Liu, H.; Nam, S.W.; Kunos, G.; Lee, S.S. Mechanisms of TNFalpha-induced cardiac dysfunction in cholestatic bile duct-ligated mice: interaction between TNFalpha and endocannabinoids. *J Hepatol* **2010**, *53*, 298-306, doi:10.1016/j.jhep.2010.03.011.
29. Cichewicz, D.L. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci* **2004**, *74*, 1317-1324, doi:10.1016/j.lfs.2003.09.038.
30. Metna-Laurent, M.; Mondesir, M.; Grel, A.; Vallee, M.; Piazza, P.V. Cannabinoid-Induced Tetrad in Mice. *Curr Protoc Neurosci* **2017**, *80*, 9 59 51-59 59 10, doi:10.1002/cpns.31.
31. Rodriguez de Fonseca, F.; Rubio, P.; Menzaghi, F.; Merlo-Pich, E.; Rivier, J.; Koob, G.F.; Navarro, M. Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe<sup>12</sup>,Nle<sup>21,38</sup>,C alpha MeLeu<sup>37</sup>]CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, *276*, 56-64.
32. Maldonado, R.; Berrendero, F.; Ozaita, A.; Robledo, P. Neurochemical basis of cannabis addiction. *Neuroscience* **2011**, *181*, 1-17, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.035.
33. Moreira, F.A.; Lutz, B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* **2008**, *13*, 196-212, doi:10.1111/j.1369-1600.2008.00104.x.
34. Castellano, C.; Rossi-Arnaud, C.; Cestari, V.; Costanzi, M. Cannabinoids and memory: animal studies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **2003**, *2*, 389-402, doi:10.2174/1568007033482670.
35. Takano, Y.; Takano, M.; Sato, I.; Yaksh, T.L. Effects of spinal naloxone and naltrindole on the antinociceptive action of intrathecally administered dexmedetomidine. *J Anesth* **1996**, *10*, 194-198, doi:10.1007/BF02471390.
36. Martin, W.J.; Loo, C.M.; Basbaum, A.I. Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain* **1999**, *82*, 199-205, doi:10.1016/S0304-3959(99)00045-7.

37. Romero-Sandoval, A.; Eisenach, J.C. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology* **2007**, *106*, 787-794, doi:10.1097/01.anes.0000264765.33673.6c.
38. Patwardhan, A.M.; Scotland, P.E.; Akopian, A.N.; Hargreaves, K.M. Activation of TRPV1 in the spinal cord by oxidized linoleic acid metabolites contributes to inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 18820-18824, doi:10.1073/pnas.0905415106.
39. Brennan, T.J.; Vandermeulen, E.P.; Gebhart, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* **1996**, *64*, 493-502, doi:10.1016/0304-3959(95)01441-1.
40. Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Heaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Neliat, G.; Caput, D.; et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* **1994**, *350*, 240-244, doi:10.1016/0014-5793(94)00773-x.
41. Doherty, E.M.; Fotsch, C.; Bo, Y.; Chakrabarti, P.P.; Chen, N.; Gavva, N.; Han, N.; Kelly, M.G.; Kincaid, J.; Klionsky, L.; et al. Discovery of potent, orally available vanilloid receptor-1 antagonists. Structure-activity relationship of N-aryl cinnamides. *J Med Chem* **2005**, *48*, 71-90, doi:10.1021/jm049485i.
42. Bolognini, D.; Cascio, M.G.; Parolaro, D.; Pertwee, R.G. AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. *Br J Pharmacol* **2012**, *165*, 2561-2574, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01503.x.
43. Corchero, J.; Romero, J.; Berrendero, F.; Fernandez-Ruiz, J.; Ramos, J.A.; Fuentes, J.A.; Manzanares, J. Time-dependent differences of repeated administration with Delta9-tetrahydrocannabinol in proenkephalin and cannabinoid receptor gene expression and G-protein activation by mu-opioid and CB1-cannabinoid receptors in the caudate-putamen. *Brain Res Mol Brain Res* **1999**, *67*, 148-157, doi:10.1016/s0169-328x(99)00053-4.
44. Sim, L.J.; Selley, D.E.; Childers, S.R. In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 7242-7246.
45. Paxinos, G., Franklin, K.B.J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*; Academic Press. Harcourt Science and Technology Company: New York, 2001.
46. Palkovits, M. Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol* **1983**, *103*, 368-376.
47. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif)* **2001**, *25*, 402-408.
48. Thomas, A.; Okine, B.N.; Finn, D.P.; Masocha, W. Peripheral deficiency and antiallodynic effects of 2-arachidonoyl glycerol in a mouse model of paclitaxel-induced neuropathic pain. *Biomed Pharmacother* **2020**, *129*, 110456, doi:10.1016/j.biopha.2020.110456.
49. Curry, Z.A.; Wilkerson, J.L.; Bagdas, D.; Kyte, S.L.; Patel, N.; Donvito, G.; Mustafa, M.A.; Poklis, J.L.; Niphakis, M.J.; Hsu, K.L.; et al. Monoacylglycerol Lipase Inhibitors Reverse Paclitaxel-Induced Nociceptive Behavior and Proinflammatory Markers in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* **2018**, *366*, 169-183, doi:10.1124/jpet.117.245704.
50. Jhaveri, M.D.; Richardson, D.; Kendall, D.A.; Barrett, D.A.; Chapman, V. Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *J Neurosci* **2006**, *26*, 13318-13327, doi:10.1523/JNEUROSCI.3326-06.2006.
51. Schlosburg, J.E.; Kinsey, S.G.; Lichtman, A.H. Targeting fatty acid amide hydrolase (FAAH) to treat pain and inflammation. *AAPS J* **2009**, *11*, 39-44, doi:10.1208/s12248-008-9075-y.
52. Di Marzo, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 438-455, doi:10.1038/nrd2553.
53. Alkaitis, M.S.; Solorzano, C.; Landry, R.P.; Piomelli, D.; DeLeo, J.A.; Romero-Sandoval, E.A. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PLoS One* **2010**, *5*, e10891, doi:10.1371/journal.pone.0010891.
54. Gunn, A.; Bobeck, E.N.; Weber, C.; Morgan, M.M. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J Pain* **2011**, *12*, 222-227, doi:10.1016/j.jpain.2010.06.011.

55. Taber, R.I. Predictive value of analgesic assays in mice and rats. *Adv Biochem Psychopharmacol* **1973**, *8*, 191-211.
56. Reimann, W.; Schlutz, H.; Selve, N. The antinociceptive effects of morphine, desipramine, and serotonin and their combinations after intrathecal injection in the rat. *Anesth Analg* **1999**, *88*, 141-145, doi:10.1097/00000539-199901000-00026.
57. Nemirovsky, A.; Chen, L.; Zelman, V.; Jurna, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. *Anesth Analg* **2001**, *93*, 197-203, doi:10.1097/00000539-200107000-00039.
58. Lichtman, A.H.; Cook, S.A.; Martin, B.R. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, *276*, 585-593.
59. Morgan, M.M.; Whitney, P.K.; Gold, M.S. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. *Brain Res* **1998**, *804*, 159-166, doi:10.1016/s0006-8993(98)00669-6.
60. Finn, D.P.; Jhaveri, M.D.; Beckett, S.R.; Roe, C.H.; Kendall, D.A.; Marsden, C.A.; Chapman, V. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology* **2003**, *45*, 594-604, doi:10.1016/s0028-3908(03)00235-1.
61. Maillieux, P.; Vanderhaeghen, J.J. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* **1992**, *48*, 655-668, doi:10.1016/0306-4522(92)90409-u.
62. Kalyuzhny, A.E.; Arvidsson, U.; Wu, W.; Wessendorf, M.W. mu-Opioid and delta-opioid receptors are expressed in brainstem antinociceptive circuits: studies using immunocytochemistry and retrograde tract-tracing. *J Neurosci* **1996**, *16*, 6490-6503, doi:10.1523/JNEUROSCI.16-20-06490.1996.
63. Tsou, K.; Brown, S.; Sanudo-Pena, M.C.; Mackie, K.; Walker, J.M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* **1998**, *83*, 393-411, doi:10.1016/s0306-4522(97)00436-3.
64. Senese, N.B.; Kandasamy, R.; Kochan, K.E.; Traynor, J.R. Regulator of G-Protein Signaling (RGS) Protein Modulation of Opioid Receptor Signaling as a Potential Target for Pain Management. *Front Mol Neurosci* **2020**, *13*, 5, doi:10.3389/fnmol.2020.00005.
65. Brennan, T.J.; Zahn, P.K.; Pogatzki-Zahn, E.M. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol Clin North Am* **2005**, *23*, 1-20, doi:10.1016/j.atc.2004.11.009.
66. Cooper, S.A.; Desjardins, P.J.; Turk, D.C.; Dworkin, R.H.; Katz, N.P.; Kehlet, H.; Ballantyne, J.C.; Burke, L.B.; Carragee, E.; Cowan, P.; et al. Research design considerations for single-dose analgesic clinical trials in acute pain: IMMPACT recommendations. *Pain* **2016**, *157*, 288-301, doi:10.1097/j.pain.0000000000000375.
67. Parker, P. Systematic review of movement-evoked pain versus pain at rest in postsurgical clinical trials and meta-analyses: a fundamental distinction requiring standardized measurement. *Pain* **2012**, *153*, 250, doi:10.1016/j.pain.2011.10.034.
68. Pogatzki, E.M.; Urban, M.O.; Brennan, T.J.; Gebhart, G.F. Role of the rostral medial medulla in the development of primary and secondary hyperalgesia after incision in the rat. *Anesthesiology* **2002**, *96*, 1153-1160, doi:10.1097/00000542-200205000-00019.
69. Zahn, P.K.; Brennan, T.J. Lack of effect of intrathecally administered N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. *Anesthesiology* **1998**, *88*, 143-156, doi:10.1097/00000542-199801000-00022.
70. Zhu, X.; Conklin, D.; Eisenach, J.C. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord plays an important role in postoperative pain. *Pain* **2003**, *104*, 15-23, doi:10.1016/s0304-3959(02)00465-7.
71. Porreca, F.; Ossipov, M.H.; Gebhart, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* **2002**, *25*, 319-325, doi:10.1016/s0166-2236(02)02157-4.
72. Obata, H.; Eisenach, J.C.; Hussain, H.; Bynum, T.; Vincler, M. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain* **2006**, *7*, 816-822, doi:10.1016/j.jpain.2006.04.004.
73. Wen, Y.R.; Tan, P.H.; Cheng, J.K.; Liu, Y.C.; Ji, R.R. Microglia: a promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance. *J Formos Med Assoc* **2011**, *110*, 487-494, doi:10.1016/S0929-6646(11)60074-0.

74. Tang, J.; Bair, M.; Descalzi, G. Reactive Astrocytes: Critical Players in the Development of Chronic Pain. *Front Psychiatry* **2021**, *12*, 682056, doi:10.3389/fpsy.2021.682056.
75. Penning, J.P.; Yaksh, T.L. Interaction of intrathecal morphine with bupivacaine and lidocaine in the rat. *Anesthesiology* **1992**, *77*, 1186-2000, doi:10.1097/00000542-199212000-00021.
76. Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **1994**, *372*, 686-691, doi:10.1038/372686a0.
77. Pacheco Dda, F.; Klein, A.; Perez, A.C.; Pacheco, C.M.; de Francischi, J.N.; Reis, G.M.; Duarte, I.D. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* **2009**, *158*, 225-231, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00310.x.
78. Maguire, D.R.; Yang, W.; France, C.P. Interactions between mu-opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists in rhesus monkeys: antinociception, drug discrimination, and drug self-administration. *J Pharmacol Exp Ther* **2013**, *345*, 354-362, doi:10.1124/jpet.113.204099.
79. Maguire, D.R.; France, C.P. Impact of efficacy at the mu-opioid receptor on antinociceptive effects of combinations of mu-opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **2014**, *351*, 383-389, doi:10.1124/jpet.114.216648.
80. Finn, D.P.; Beckett, S.R.; Roe, C.H.; Madjd, A.; Fone, K.C.; Kendall, D.A.; Marsden, C.A.; Chapman, V. Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur J Neurosci* **2004**, *19*, 678-686, doi:10.1111/j.0953-816x.2004.03177.x.
81. Kuner, R.; Flor, H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **2017**, *18*, 113, doi:10.1038/nrn.2017.5.
82. Meacham, K.; Shepherd, A.; Mohapatra, D.P.; Haroutounian, S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep* **2017**, *21*, 28, doi:10.1007/s11916-017-0629-5.
83. Costa, B.; Siniscalco, D.; Trovato, A.E.; Comelli, F.; Sotgiu, M.L.; Colleoni, M.; Maione, S.; Rossi, F.; Giagnoni, G. AM404, an inhibitor of anandamide uptake, prevents pain behaviour and modulates cytokine and apoptotic pathways in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* **2006**, *148*, 1022-1032, doi:10.1038/sj.bjp.0706798.
84. Sain, N.M.; Liang, A.; Kane, S.A.; Urban, M.O. Antinociceptive effects of the non-selective cannabinoid receptor agonist CP 55,940 are absent in CB1(-/-) and not CB2(-/-) mice in models of acute and persistent pain. *Neuropharmacology* **2009**, *57*, 235-241, doi:10.1016/j.neuropharm.2009.06.004.
85. Wise, L.E.; Shelton, C.C.; Cravatt, B.F.; Martin, B.R.; Lichtman, A.H. Assessment of anandamide's pharmacological effects in mice deficient of both fatty acid amide hydrolase and cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* **2007**, *557*, 44-48, doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.002.
86. Lim, G.; Sung, B.; Ji, R.R.; 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*, 275-283, doi:10.1016/s0304-3959(03)00242-2.
87. Richardson, J.D.; Aanonsen, L.; Hargreaves, K.M. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur J Pharmacol* **1998**, *345*, 145-153, doi:10.1016/s0014-2999(97)01621-x.
88. Ahluwalia, J.; Urban, L.; Capogna, M.; Bevan, S.; Nagy, I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* **2000**, *100*, 685-688, doi:10.1016/s0306-4522(00)00389-4.
89. Welch, S.P.; Thomas, C.; Patrick, G.S. Modulation of cannabinoid-induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J Pharmacol Exp Ther* **1995**, *272*, 310-321.
90. Pernia-Andrade, A.J.; Kato, A.; Witschi, R.; Nyilas, R.; Katona, I.; Freund, T.F.; Watanabe, M.; Filitz, J.; Koppert, W.; Schuttler, J.; et al. Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-fiber-induced heterosynaptic pain sensitization. *Science* **2009**, *325*, 760-764, doi:10.1126/science.1171870.
91. Christie, M.J.; Mallet, C. Endocannabinoids can open the pain gate. *Sci Signal* **2009**, *2*, pe57, doi:10.1126/scisignal.288pe57.

92. Coull, J.A.; Boudreau, D.; Bachand, K.; Prescott, S.A.; Nault, F.; Sik, A.; De Koninck, P.; De Koninck, Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* **2003**, *424*, 938-942, doi:10.1038/nature01868.
93. Coull, J.A.; Beggs, S.; Boudreau, D.; Boivin, D.; Tsuda, M.; Inoue, K.; Gravel, C.; Salter, M.W.; De Koninck, Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **2005**, *438*, 1017-1021, doi:10.1038/nature04223.
94. Stella, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* **2009**, *56 Suppl 1*, 244-253, doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.037.
95. Maresz, K.; Carrier, E.J.; Ponomarev, E.D.; Hillard, C.J.; Dittel, B.N. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* **2005**, *95*, 437-445, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x.
96. Lunn, C.A.; Reich, E.P.; Fine, J.S.; Lavey, B.; Kozłowski, J.A.; Hipkin, R.W.; Lundell, D.J.; Bober, L. Biology and therapeutic potential of cannabinoid CB2 receptor inverse agonists. *Br J Pharmacol* **2008**, *153*, 226-239, doi:10.1038/sj.bjp.0707480.
97. Miller, A.M.; Stella, N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol* **2008**, *153*, 299-308, doi:10.1038/sj.bjp.0707523.
98. Wei, H.; Chapman, H.; Saarnilehto, M.; Kuokkanen, K.; Koivisto, A.; Pertovaara, A. Roles of cutaneous versus spinal TRPV1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat. *Neuropharmacology* **2010**, *58*, 578-584, doi:10.1016/j.neuropharm.2009.12.001.
99. Wei, H.; Koivisto, A.; Saarnilehto, M.; Chapman, H.; Kuokkanen, K.; Hao, B.; Huang, J.L.; Wang, Y.X.; Pertovaara, A. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat. *Pain* **2011**, *152*, 582-591, doi:10.1016/j.pain.2010.11.031.
100. Uchytlova, E.; Spicarova, D.; Palecek, J. TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms. *Mol Pain* **2014**, *10*, 67, doi:10.1186/1744-8069-10-67.

---