



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Avaliação do efeito antinociceptivo do canabidiol no tratamento agudo da dor neuropática e mecanismos antinociceptivos endógenos envolvidos nesse evento

Danielle Diniz Aguiar

BELO HORIZONTE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Avaliação do efeito antinociceptivo do canabidiol no tratamento agudo da dor neuropática e mecanismos antinociceptivos endógenos envolvidos nesse evento

Danielle Diniz Aguiar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

Co-orientadores: Vincenzo di Marzo e Alessia Ligresti

BELO HORIZONTE

2020

043 Aguiar, Danielle Diniz.

Avaliação do efeito antinociceptivo do canabidiol no tratamento agudo da dor neuropática e mecanismos antinociceptivos endógenos envolvidos nesse evento [manuscrito] / Danielle Diniz Aguiar. – 2020.

155 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero. Co-orientadores: Vincenzo di Marzo e Alessia Ligresti.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

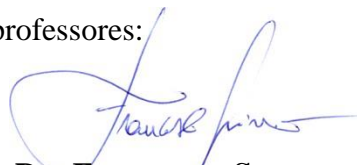
1. Farmacologia. 2. Canabidiol. 3. Analgésicos. 4. Canabinoides. 5. Analgésicos Opioides. I. Romero, Thiago Roberto Lima. II. di Marzo, Vincenzo. III. Ligresti, Alessia. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 615

"AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO CANABIDIOL NO TRATAMENTO AGUDO DA DOR NEUROPÁTICA E MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS ENDÓGENOS ENVOLVIDOS NESSE EVENTO"

DANIELLE DINIZ AGUIAR

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **27 de abril de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. FRANCISCO SILVEIRA GUIMARÃES
FMRP/USP



PROF. DR. GIOVANE GALDINO DE SOUZA
UNIFAL



PROF. DR. JADER DOS SANTOS CRUZ
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. THIAGO ROBERTO LIMA
ROMERO
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e
Farmacologia Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de
Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 27 de abril de 2020

**Estude e não esmoreça
Pois traz erguida a cabeça
Quem sempre cumpre o dever
A vida é luta e batalha
E nela só quem trabalha
Merece e deve vencer**

(Manoel Irineu da Silva)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à N. S. Aparecida por me guiarem e iluminarem em todos os momentos da minha vida. À minha avó Conceição, que sempre me incentivou a estudar. Sei que mesmo no plano espiritual, está feliz pela minha conquista.

Agradeço à minha Grande Família pelo incentivo, carinho e torcida, imprescindíveis para chegar até aqui, em especial minha mãe Marina e minha “prima-irmã” Lud por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos em que eu estive mais distante.

Ao meu marido Marcone pelo amor e apoio incondicional à todas as etapas da minha vida, mesmo que isso significasse minha ausência.

À todos meus amigos por trazerem alegria e leveza sempre que precisei, sem vocês essa caminhada seria mais difícil, especialmente Aldimar, Ana, Babi, Cris, Ney, Gláucia, Gu, Lucas, Raquel, Sam, que estiveram mais próximos nesse momento particular.

À Cybele, Daniela, Zaine e ao grupo Miudinho por me ajudarem a encontrar meu equilíbrio emocional e espiritual nessa jornada.

Ao Prof. Thiago Roberto Lima Romero pela parceria e oportunidades de crescimento pessoal e profissional ao longo desses 6 anos trabalhando juntos.

Ao Prof. Igor Dimitri Gama Duarte pela agradável convivência, ensinamentos e contribuições nesse trabalho.

À Prof^a. Andréa de Castro Perez pela agradável convivência dentro e fora do laboratório.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Dor e Analgesia: Adriane, Amanda, Bárbara, Caio, Clarice, Douglas, Júlia, Laís, Loyara, Mariana, Raquel, Renata, Thamyris, Thaís e William Gonçalves e William Valadares; todos esses anos de ótima convivência, aprendizados, momentos divertidos e o ambiente tranquilo foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. De modo particular, agradeço ao Daniel pela amizade, ajuda nos experimentos e companhia no Mineirão; e à Cris e Flávia pela amizade, parceria, paciência, colaboração, risos, ansiedades, curiosidades... vocês são especiais!

Ao Programa PicJr/PRPq pela experiência enriquecedora de orientar as alunas Ana Luiza Teófilo e Fernanda Almeida Miranda.

À todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, pela competência e comprometimento.

Aos colegas de Pós-graduação pelo companheirismo e convívio agradável.

Aos servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia Rinaldo do Nascimento, Wellington Palhares, Cintya Menezes Fonseca e Thiago Abílio pela disponibilidade e paciência.

Ao professor Francisco Silveira Guimarães pela doação do canabidiol para realização dessa pesquisa.

Ao prof. Vincenzo Di Marzo pela oportunidade de trabalhar com uma equipe mundialmente reconhecida pelo trabalho de excelência.

À Prof^a. Alessia Ligresti pelo carinho com que me recebeu e por todas as contribuições nesse trabalho, além dos momentos agradáveis que me proporcionou.

À Fabiana Piscitelli pelo carinho, convivência e aprendizado.

À Roberta Verde pelo aprendizado, paciência, carinho e por tornar meus dias no CNR super divertidos.

À Fanny Defranoux e Margarita Salazar por serem minha família na Itália. À Magda e Ali pela amizade e momentos felizes. À minha mãe italiana Pina por todo cuidado e carinho, além do Natal inesquecível.

À todos os colegas do Istituto di Chimica Biomolecolare pela agradável convivência.

Ao grupo Portici-Napoli-Pozzuoli por trazerem a alegria brasileira aos meus dias italianos, em especial à Rosana, minha parceira de aventuras.

À Annachiara, Orestes, Chiara e Nicola, amigos e anjos da guarda italianos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

E à todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIV
LISTA DE QUADROS	XVI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Plantas medicinais.....	22
1.2. Uso medicinal da Cannabis.....	25
1.3. Uso do canabidiol (CBD)	34
1.4. A dor	38
2. JUSTIFICATIVA.....	50
3. OBJETIVOS.....	52
3.1. Objetivo Geral	52
3.2. Objetivos Específicos	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1. Animais.....	54
4.2. Modelo de Indução de Dor Neuropática: Constrição do Nervo Ciático (CNC).....	54
4.3. Teste algométrico de mensuração da hiperalgesia da pata de camundongos.....	55
4.4. Teste de avaliação da Coordenação Motora	57
4.5. Purificação e quantificação de endocanabinoides através da técnica de LC-MS.....	58
4.6. Quantificação da produção de Óxido Nítrico a partir da produção de nitrito pelo método de Reação de Griess.....	59
4.7 - Drogas	61
4.7.1 Substância antinociceptiva sob teste.....	61
4.7.2 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica	61
4.7.3 Fármacos envolvidos na via opioidérgica	62
4.7.4 Fármacos envolvidos na via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K _{ATP}	63
4.7.5 Fármacos antagonistas dos receptores 5-HT _{1A} e TRPV1	64
4.8. Administração das Drogas.....	65
4.9. Procedimento Experimental	66

4.10 Análise Estatística	67
5. RESULTADOS	69
5.1. Avaliação temporal da dor neuropática na pata de camundongos induzida pela constricção do nervo ciático	69
5.2 - Efeito antinociceptivo periférico do canabidiol	70
5.3 - Exclusão do efeito sistêmico	70
5.4 – Avaliação da coordenação motora.....	71
5.5 – Participação do sistema canabinoide na antinocicepção induzida por canabidiol.....	72
5.6 – Participação do sistema opioide na antinocicepção induzida por canabidiol.....	76
5.7 - Participação da via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K _{ATP} na antinocicepção induzida por canabidiol	77
5.8 - Participação dos receptores 5-HT _{1A} e TRPV1 na antinocicepção induzida por canabidiol	81
6. DISCUSSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXO	156

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-AG** – 2 araquidonoil glicerol
- 5-HT** - Serotonina
- 5-HT_{1A}** – Receptor serotoninérgico tipo 1
- A β** – beta amilose
- A.C** – Antes de Cristo
- AEA** - Anandamida
- AKT** – Proteína Serina/treonina quinase
- AMPC** - Monofosfato cíclico de adenosina
- AMT** - Transportador de anandamida na membrana
- ANOVA** – Análise de variância
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APB** - Avulsão do plexo braquial
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- Ca²⁺** - íons cálcio
- CB₁** – Receptor canabinoide tipo 1
- CB₂** – Receptor canabinoide tipo 2
- CBD** – Canabidiol
- CBN** – Canabinol
- CCK** – colecistocinina
- CeBio** - Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CGRP** - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CNC** – Constrição do nervo ciático
- CIPLAN** - Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação
- COX-2** – Ciclo-oxigenase 2
- DAG** - Diacilglicerol
- D.C** – Depois de Cristo
- DCB** - Denominações Comuns Brasileiras
- DOR** – Receptor opioide tipo delta
- DRG** – Gânglio da raiz dorsal
- EAE** – Encefalomielite auto-imune

EFNS – European Federation of Neurological Societies
EPM – Erro padrão da média
FAAH – Ácido graxo amida hidrolase
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GCs - guanilato ciclase solúvel
GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina
GTP - Trifosfato de adenosina
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HCT – *Houttuynia cordata* Thunb
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IASP – Associação Internacional de Estudos para Dor
IFN γ – Interferon tipo gama
IL- 1 β – Interleucina tipo 1 beta
IL-17 – Interleucina tipo 17
IUPHAR – União Internacional de Farmacologistas
K_{ATP} – Canais para potássio sensíveis ao ATP
K_d – Constante de afinidade
K_i – Constante de inibição
K_{ir} - Canais para potássio retificadores de entrada
KOR – Receptor opioide tipo kappa
LC-MS – Cromatografia líquida com espectrometria de massa
LNE - Ligadura no nervo espinhal
LNP – Lesão nervosa poupada
L-NOArg - NG-Nitro-L-arginina
LNPC - Lesão parcial do nervo ciático
LPS - Lipopolissacarídeo
MAGL – Monoacilglicerol lipase
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos
MDSCs – Células supressoras derivadas de mieloides
MOR – Receptor opioide tipo mi
mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamífero
NADA - N-araquidonoil-dopamina
NAT - N-aciltransferase

NAPE - N-acil-fosfatidiletanolamina
NE - Norepinefrina
NeuPSIG – Neurophatic Pain Special Interest Group
NFκB – Fator nuclear kappa B
NKA – Neurocinina A
NKB – Neurocinina B
NO – Óxido nítrico
eNOS – Óxido nítrico sintase do tipo endotelial
iNOS – Óxido nítrico sintase do tipo induzível
nNOS – Óxido nítrico sintase do tipo neuronal
OEA - Oleolanolamida
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAG – Substância cinzenta periaquedutal
PG – Prostaglandinas
PEA - Palmitoiletanolamida
PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase
PKA - Proteína quinase A
PLA2 – Fosfolipase A2
PNPIC – Política Nacional de Práticas de Planejamento e Coordenação
RBD – Distúrbio comportamental do sono REM
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RNA_m – Ácido ribonucleico tipo mensageiro
ROS – Espécies reativas do oxigênio
RVM – Medula rostroventral
SG – Substância gelatinosa
SNC – Sistema nervoso central
SP – Substância P
SUS - Sistema Único de Saúde
THC – Tetra hidrocanabinol
TNC - Trisseção do nervo ciático
TNF – fator de necrose tumoral
TNFR1 -Receptor para fator de necrose tumoral tipo 1
TRPV1 – Receptor de potencial transiente vaniloide tipo 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécies de <i>Cannabis</i>	25
Figura 2 - Linha do tempo: desenvolvimento de pesquisa com fitocanabinoides e endocanabinoides.....	29
Figura 3 - Número de publicações relacionadas com Cannabis entre os anos de 1955 a 2018.....	30
Figura 4 - Estrutura química do Δ^9 - tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol (CBD)..	32
Figura 5 – Via ascendente da dor.....	39
Figura 6 – Representação esquemática da Teoria do Portal da Dor.....	40
Figura 7 – Sistema de controle descendente da dor.....	41
Figura 8 – Dor rápida e dor lenta.....	42
Figura 9 – Dor aguda e dor crônica.....	43
Figura 10 - Classificação dos tipos de dor.....	44
Figura 11 – Manguito de polietileno implantado no nervo ciático para induzir dor neuropática.....	55
Figura 12 - Camundongo sendo submetido ao teste de retirada de pata.....	55
Figura 13 - Parte compressor do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.....	56

Figura 14 - Teste de avaliação da coordenação motora.....	57
Figura 15 - Purificação das amostras em colunas de sílica gel (A); Aparelhagem para realização da cromatografia, espectrometria de massas e análise por software (B).....	59
Figura 16 – Reações químicas envolvidas na Reação de Griess.....	60
Figura 17 - Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via canabinoidérgica.....	62
Figura 18 – Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via opioidérgica.....	63
Figura 19 – Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K _{ATP}	64
Figura 20 – Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem nos receptores 5-HT _{1A} e TRPV1.....	65
Figura 21 – Vias de administração das drogas.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação temporal da dor neuropática na pata de camundongos após constrição do nervo ciático.....	68
Gráfico 2 - Efeito do canabidiol no limiar nociceptivo em camundongos frente a hiperalgesia induzida 15 dias após a constrição do nervo ciático.....	69
Gráfico 3 - Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico induzido pelo canabidiol	70
Gráfico 4 - Efeito da administração de canabidiol no teste de coordenação motora em camundongos.....	71
Gráfico 5 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de antagonistas dos receptores canabinoides.....	72
Gráfico 6 - Administração intraplantar de inibidores enzimáticos potencializa o efeito antinociceptivo periférico do canabidiol.....	73
Gráfico 7 - Dosagem de endocanabinoides através da técnica LC-MS.....	74
Gráfico 8 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de antagonistas seletivos dos receptores opioides.....	75
Gráfico 9 - Administração intraplantar de bestatina (Best) potencializa o efeito antinociceptivo periférico do canabidiol.....	76
Gráfico 10 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de inibidores enzimáticos.....	77
Gráfico 11 - Efeito da administração periférica do canabidiol nos níveis de nitrito.....	78

Gráfico 12 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de ODQ.....	79
Gráfico 13 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de glibenclamida.....	79
Gráfico 14 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de antagonistas seletivos dos receptores 5-HT _{1A} e Vaniloide 1.....	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sinais e sintomas da dor neuropática.....	46
Quadro 2 – Tratamento farmacológico da dor neuropática.....	47

RESUMO

São conhecidos mais de 100 fitocanabinoides e o canabidiol (CBD) é o componente não-psicoativo mais abundante em plantas do gênero *Cannabis*. Ele pode ser usado para o tratamento de diversas doenças como Alzheimer, Parkinson, epilepsia, depressão, esclerose múltipla, diabetes, vários tipos de dor, incluindo dor neuropática. Seu efeito analgésico para o tratamento de neuropatia é amplamente estudado, entretanto, pouco se sabe sobre seus efeitos no tratamento agudo quando administrado periféricamente. Nossa proposta é avaliar o efeito antinociceptivo do CBD quando administrado periféricamente para tratamento agudo da dor neuropática e quais os sistemas analgésicos endógenos podem estar envolvidos. A dor neuropática foi induzida pela constrição do nervo ciático e o limiar nociceptivo foi medido através do teste de pressão da pata de camundongo. Foram realizadas dosagem de endocanabinoides pela técnica LC-MS e dosagem de nitrito através de Reação de Griess. Para os testes farmacológicos, as análises estatísticas foram realizadas através do *one-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para as dosagens, foi utilizado *two-way* ANOVA, seguido do pós-teste Newman-Keuls. Todas as drogas foram administradas pela via intraplantar, com exceção das drogas utilizadas no teste de avaliação da coordenação motora. A técnica utilizada foi eficiente para induzir a neuropatia, e o CBD (5, 10 e 30 µg/pata) induziu antinocicepção de maneira dose-dependente. A dose utilizada que induziu efeito mais potente (30 µg/pata) não induziu resposta sistêmica, demonstrada tanto pelo Teste de avaliação da coordenação motora (RotaRod) quanto pelo efeito antinociceptivo restrito à pata tratada com CBD. O AM251 (80 µg/pata) e AM630 (100 µg/pata), antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂ canabinoides, respectivamente, reverteram o efeito antinociceptivo induzido pelo CBD, sugerindo a participação destes receptores. O MAFP (0,5 µg/pata), inibidor da enzima FAAH, o JZL184 (3,75 µg/pata), inibidor da enzima MAGL e o VDM11 (2,5 µg/pata), inibidor da recaptção de anandamida, potencializaram o efeito antinociceptivo do CBD administrado na sua menor dose (5 µg/pata), sugerindo a participação de endocanabinoides nesse evento, embora a administração do CBD não tenha demonstrado aumentar o nível dessas substâncias nos animais neuropáticos, como demonstrado pela técnica biomolecular de dosagem de endocanabinoides. A técnica demonstrou ainda que o CBD reduziu os níveis de anandamida nos animais neuropáticos, sugerindo que o CBD controla de maneira negativa os níveis desse endocanabinoide. O antagonista não seletivo dos receptores opioides, naloxona (50 µg/pata), bem como o clocinnamox (40 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores µ reverteram a

antinocicepção induzida pelo CBD. Já o naltrindole (60 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores δ, e a nor-binaltorfimina (200 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores κ, reverteram parcialmente a antinocicepção induzida pelo CBD. Em consonância com esses resultados, a bestatina potencializou o efeito antinociceptivo da menor dose administrada de CBD (5 µg/pata), sugerindo a participação dos receptores opioides e peptídeos opioides endógenos no evento estudado. O efeito antinociceptivo do CBD também foi revertido pela administração de AS605240 (90 µg/pata), inibidor da enzima PI3Kγ, rapamicina (30 µg/pata), inibidor seletivo da proteína mTOR, L-NOArg (24 µg/pata), inibidor não seletivo de isoformas de NOS, ODQ (100 µg/pata), inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, glibenclamida (80 µg/pata) bloqueador dos canais K_{ATP}, sugerindo a participação da via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP}. A administração de canabidiol aumentou a produção de NO nos grupos Naive CBD, Operado Controle e Operado CBD quando comparado com o grupo controle (naive) mas não aumentou a produção de NO quando comparado com o grupo operado. A administração de NAN-190 (10 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, e SB-366791 (16 µg/pata), antagonista seletivo de TRPV1, reverteram, de maneira parcial, a antinocicepção induzida pelo CBD. Nossos resultados fornecem evidências de que o mecanismo de ação pelo qual o canabidiol induz antinocicepção em animais neuropáticos é complexo, e envolve a participação de vários sistemas analgésicos. Nossa hipótese é que o canabidiol possa se ligar nos receptores canabinoides presentes nos nociceptores, inibindo a excitação neuronal, ou ainda induzir aumento da produção de endocanabinoides, por conjunto celular ainda não evidenciado, e estes se ligarem aos receptores canabinoides nos nociceptores e/ou em células imunes e células residentes, liberando peptídeos opioides, que induzem antinocicepção por ativação direta desses receptores nos nociceptores e ainda com consequente ativação da via PI3K/AKT/mTOR/NOS/NO/GMPc/K_{ATP}. Adicionalmente, CBD ativa os receptores 5HT_{1A} presente nos nociceptores, causando inibição neuronal; o CBD também ativa TRPV1, com posterior dessensibilização, induzindo analgesia. **APOIO FINANCEIRO: CAPES. PROTOCOLO CEUA: 57/2017.**

PALAVRAS-CHAVE: canabidiol, antinocicepção periférica, sistema canabinoide, sistema opioide, via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP}, receptores 5-HT_{1A} e TRPV1.

ABSTRACT

More than 100 phytocannabinoids are known and cannabidiol (CBD) is the most abundant non-psychoactive component in plants of the genus *Cannabis*. It can be used for the treatment of various diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, epilepsy, depression, multiple sclerosis, diabetes, various types of pain, including neuropathic pain. Its analgesic effect for the treatment of neuropathy is widely studied, however, little is known about its effects on acute treatment when administered peripherally. Our proposal is to evaluate the antinociceptive effects of CBD when administered peripherally for acute treatment of neuropathic pain and which endogenous analgesic systems may be involved. Neuropathic pain was induced by constriction of the sciatic nerve and the nociceptive threshold was measured by the mouse paw pressure test. Endocannabinoids were taken by LC-MS and nitrite was taken using Griess Reaction. For pharmacological tests, the statistical analyses were performed through the One-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. For the dosages, two-way ANOVA was used, followed by Newman-Keuls post-tests. All drugs were administered intraplantarly, except for the drugs used in the motor coordination assessment test. The technique used was efficient to induce neuropathy, and CBD (5, 10 and 30 $\mu\text{g/paw}$) induced antinociception in a dose-dependent manner. The dose used that induced a more potent effect (30 $\mu\text{g/paw}$) did not induce systemic response, demonstrated by both the Motor Coordination Assessment Test (RotaRod) and by the antinociceptive effect restricted to the paw treated with CBD. AM251 (80 $\mu\text{g/paw}$) and AM630 (100 $\mu\text{g/paw}$), CB_1 and CB_2 antagonist cannabinoids receptors, respectively, reversed the antinociceptive effect induced by CBD, demonstrating the participation of these receptors. MAFP (0.5 $\mu\text{g/paw}$), FAAH enzyme inhibitor, JZL184 (3.75 $\mu\text{g/paw}$), inhibitor of the MAGL enzyme and VDM11 (2.5 $\mu\text{g/paw}$), inhibitor of anandamide reuptake, potentiated the antinociceptive effect of CBD administered at its lowest dose (5 $\mu\text{g/paw}$) suggesting the participation of endocannabinoids in this event, although the CBD administration has not been shown to increase the level of these substances in neuropathic animals, as demonstrated by the biomolecular technique of endocannabinoid dosage. The technique also demonstrated that CBD reduced anandamide levels in neuropathic animals, suggesting that CBD negatively controls the levels of this endocannabinoid. The non-selective antagonist opioid receptor, naloxone (50 $\mu\text{g/paw}$), as well as clocinnamox (40 $\mu\text{g/paw}$), μ selective antagonist receptor reversed CBD-induced antinociception. Naltrindole (60 $\mu\text{g/paw}$) δ selective antagonist receptor, and norbinaltorfimin (200 $\mu\text{g/paw}$), κ selective antagonist receptors, partially reversed CBD-induced

antinociception. In line with these results, a bestatin enhanced the antinociceptive effect of the lowest administered dose of CBD (5 µg/paw), suggesting the participation of opioid receptors and endogenous opioid peptides in the event studied. The antinociceptive effect of CBD was also reversed by the administration of AS605240 (90 µg/paw), inhibitor of the PI3K γ enzyme, rapamycin (30 µg/paw), selective mTOR protein inhibitor, L-NOArg (24 µg/paw), non-selective NOS isoform inhibitor, ODQ (100 µg/paw), soluble guanylate cyclase inhibitor, glibenclamide (80 µg/paw) K_{ATP} channel blocker, suggesting the participation of the PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP} pathway.. The administration of cannabidiol increased the production of NO in CBD-naive, control-Operated and CBD-Operated groups when compared to the control group (naive) did not increase the production of NO when compared to the operated group. On the other hand, the administration of NAN 190 (10 µg/paw), selective antagonist of 5-HT_{1A} receptors, and SB-366791 (16 µg/paw), selective antagonist of TRPV1, partially reversed the antinociception induced by CBD. Our results provide evidence that the mechanism of action by which cannabidiol induces antinociception in neuropathic animals is complex and involves the participation of various analgesic systems. Our hypothesis is that cannabidiol can bind to the present cannabinoid receptors in nociceptors, inhibiting neuronal excitation, or induce increased production of endocannabinoids and these bind to cannabinoid receptors in nociceptors and/or in immune cells and resident cells, releasing opioid peptides, which induce antinociception by direct activation of these receptors in nociceptors and also by activation of the PI3K/AKT/mTOR/NOS/NOS/GMPc/KATP pathway. Additionally, CBD activates 5HT_{1A} receptors present in nociceptors, causing inhibition of nociceptors; CBD also activates TRPV1, with subsequent desensitization, inducing analgesia. **FINANCIAL SUPPORT:** CAPES. **PROTOCOL:** 57/2017.

KEYWORDS: cannabidiol, peripheral antinociception, cannabinoid system, opioid system, PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP} pathway, 5-HT_{1A} and TRPV1 receptors.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais para os mais diversos tratamentos acompanha a evolução da humanidade. Os primeiros registros fitoterápicos datam entre 2.838- 2.698 A.C. e são do imperador chinês Shen Nung, que catalogou 365 ervas medicinais e venenos usados na época sob inspiração taoísta de Pan Ku, considerado deus da criação. Esse primeiro herbário era organizado em consonância com dois polos opostos: yang - luz, céu, calor, esquerdo; e o yin - trevas, terra, frio, direito (França et al., 2008). Outro registro importante é conhecido como “O Papiro de Ebers”, datado de 1.550 A.C., que é um documento com mais de 20 metros de comprimento, relaciona mais de 7.000 substâncias medicinais presentes em mais de oitocentas fórmulas (Dias, 2005). Por volta de 1.500 A. C. a base da medicina hindu já estava revelada em dois textos sagrados: Veda (Aprendizado) e Ayurveda (Aprendizado de Longa Vida) (França et al., 2008). Dentre os fármacos utilizados pelo famoso médico grego Hipócrates, 91% eram de origem vegetal (Pires, 1984, Cunha, 2005). No registro “História das Plantas”, Teophrastus descreve cerca de quinhentas drogas de origem vegetal, detalhando espécies, propriedades terapêuticas e toxicidade (Rocha et al., 2015). “De Materia Medica” escrito pelo médico grego Dioscórides e considerado o manual médico e farmacopeia mais importante da Grécia e Roma antigas, descreve cerca de 600 plantas medicinais, e devido à sua importância, fez com que Dioscórides fosse reconhecido como o fundador da Farmacognosia (Rocha et al., 2015).

Entre os séculos VII e VIII o Império Islâmico transferiu espécies vegetais entre o Sudeste da Ásia, Oriente Médio, Norte da África e Europa, enriquecendo o “De Materia Medica” muçulmano com espécies como o cominho negro, cedro, limão, berinjela, figo, alho, hena, cebola, arroz e melancia (Lev, 2007; Rocha et al., 2015).

Entre os séculos XI e XIV o “De Materia Medica” da comunidade judia do Cairo relacionou 168 espécies vegetais correspondente a 81,6% das drogas recomendadas. Já as drogas de origem inorgânica correspondem a 10,6% do total e as de origem animal correspondem a 7,8% (Rocha et al., 2015). Por volta do século XV, os mosteiros e conventos da Europa Medieval, especialmente os da Ordem Beneditina, utilizavam enfermarias, boticas e jardins botânicos (Medeiros, 2010; Dias, 2005), reconhecendo que as plantas curam por suas propriedades medicinais e não por poderes místicos (Rocha et al., 2015).

Introdução

Um marco histórico importante sobre o uso de plantas medicinais no mundo foi a “Declaração de Alma Ata” em 1978, onde a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, e desse total, 85% usam plantas ou preparações destas. Desde então, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais e de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa e paliativa (Rosa et al., 2011; Ibiapina et al., 2014).

No Brasil, o uso de plantas medicinais advém principalmente das práticas indígenas (Walker, 2013). Os relatos acerca da flora brasileira iniciaram-se logo após a descoberta. Pero Vaz de Caminha descreve em sua famosa carta enviada à Portugal o uso de várias espécies vegetais (Rocha et al., 2015). O “Tratado descritivo do Brasil” escrito por Gabriel Soares de Souza em 1.587, chama de “árvores e ervas da virtude” os produtos empregados na medicina indígena (Walker, 2013). Um marco importante no registro das espécies medicinais brasileiras é a chegada dos jesuítas, já que não se limitavam apenas à catequese, mas atuavam também como boticários, médicos e enfermeiros, e se dedicaram à elaboração de tratados médicos (Polleto & Welter, 2011), podendo ser considerados, portanto, como pioneiros na elaboração de uma Farmacopeia brasileira (Calainho, 2005, Rocha et al., 2015).

No século XIX, O “Livro de Receitas de Medicamentos”, manuscrito contendo as formulações utilizadas por monges beneditinos, permitiu a identificação de grande número de plantas medicinais: no Rio de Janeiro foram identificadas um total de 152 espécies, sendo que 25 são espécies brasileiras e 127 são exóticas (Medeiros, 2010). Em Olinda foram identificadas 43 espécies, e as partes mais utilizadas dos vegetais eram as raízes (31%), folhas e flores (16% cada), caules (13%), frutas e resinas (7%) (Alencar, 2010; Medeiros e Albuquerque, 2012; Rocha et al., 2015).

Entre os anos de 1940 e 1950 houve uma grande diminuição do uso de plantas medicinais pela população brasileira, mas atualmente podemos ver um crescente surgimento de estabelecimentos que comercializam plantas medicinais nos centros urbanos, além do aumento da presença de raizeiros nas feiras livres (Rocha et al., 2015).

O Brasil possui a maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conhecimento popular do uso de plantas medicinais é transmitido entre as gerações. Apesar da riqueza da flora brasileira, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente, considerando os últimos 20 anos (Fonseca, 2012).

Introdução

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é toda planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (ANVISA, 2010). O uso de plantas medicinais no Sistema de Saúde Pública brasileiro se iniciou em 1988, quando a Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN), através da Resolução nº 08, regulamentou o uso da Fitoterapia nos serviços de saúde e, em 2004, a ANVISA regulamentou os padrões de qualidade e segurança dos produtos fitoterápicos (Figueiredo et al., 2014). O Decreto nº 5813, publicado em 2006, aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a) sendo um dos principais instrumentos norteadores para o desenvolvimento de ações e programas de plantas medicinais e fitoterapia na saúde pública. Este Decreto traz diretrizes para desenvolvimento da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos.

Em 2006 foi publicada a Portaria MS/GM N. 971, que instituiu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), seguindo a orientação da OMS para introdução do uso de fitoterápicos nos sistemas de saúde pública, além de estimular a criação de hortos medicinais e o uso destas plantas no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006b, Rocha et al., 2015). Para implementação das ações, a ANVISA elaborou a seguinte regulamentação: RDC nº10 de 09/03/2010 e RDC nº 14 de 31/03/2010, que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à ANVISA (revogadas posteriormente pela RDC nº 26 de 13/05/2014 que dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos; ANVISA, 2014); RDC nº 13 de 14/03/2013, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (ANVISA, 2013a); RDC nº 18 de 03/04/2013, que dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do sistema Único de Saúde–SUS (ANVISA, 2013b; Rocha et al., 2015). Outro marco importante foi a publicação da Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse para o SUS (RENISUS) em 2009, e continua em processo de atualização (BRASIL, 2009).

Na Conferência Internacional sobre Medicina Tradicional (MT) dos países da Ásia Sul oriental, realizada em 2013, a diretora geral da OMS, Dra. Margareth Chan, declarou que a medicina tradicional de qualidade, segura e com eficácia comprovada contribui para assegurar o acesso de todas as pessoas à atenção primária de saúde. Para milhões de pessoas, as plantas, os tratamentos tradicionais e as práticas da medicina tradicional representam a principal fonte de atenção à saúde e às vezes a única (OMS, 2014; Beleza, 2016). Essa declaração fortalece a

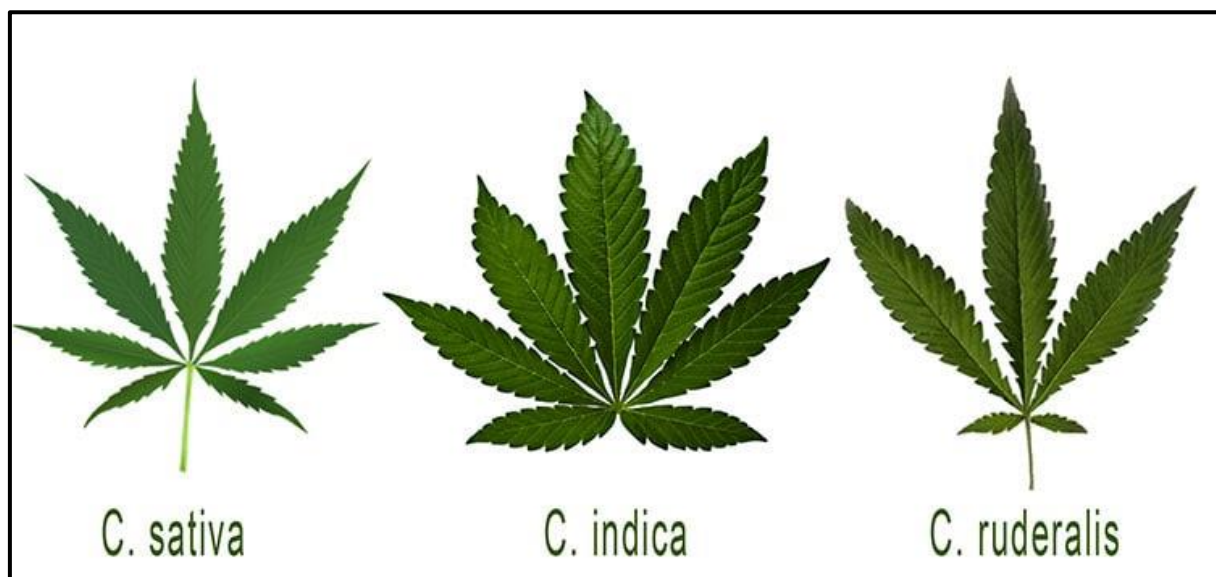
Introdução

importância das pesquisas com plantas medicinais para facilitar o acesso à população de tratamentos com eficácia e segurança comprovados.

1.2. Uso medicinal da Cannabis

A planta do gênero *Cannabis* é um membro da família *Cannabaceae*, e existem 3 espécies de *Cannabis* primárias que variam na morfologia e em seus constituintes bioquímicos: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica*, e *Cannabis ruderalis* (Schultes et al., 1974).

Figura 1 - Espécies de Cannabis



Fonte: Google Imagens

Entre os registros mais antigos do uso medicinal da *Cannabis*, 2.350 A.C, estão textos numa pedra da pirâmide do antigo reino de Memphis, no Egito. Documentos sugerem seu uso ativo durante os tempos faraônicos e, posteriormente, em uma sucessão de papiros médicos. Na Assíria (800 A.C.) recebia o nome de gan-zi-gun-nu ("a droga que tira a mente ") ou azallu (quando usado de forma terapêutica), sugerindo a dualidade de sua atividade e seus efeitos bifásicos em muitos sintomas (Ligesti et al., 2016). Um outro registro antigo está relatado na farmacopeia mais antiga do mundo, o Pen-ts'ao Ching, que foi escrito baseado em tradições transmitidas oralmente desde o tempo do Imperador Shen Nung. A *Cannabis* era indicada para tratar dor reumática, constipação intestinal, distúrbios do sistema reprodutor feminino, malária,

Introdução

entre outros. Nesse mesmo livro há relatos dos efeitos alucinógenos da planta, como observado em uma de suas frases: “... *ma-fen (o fruto da Cannabis) ... se tomado em excesso produzirá visões de demônios ... a longo prazo, fará com que se comunique com espíritos e ilumine o corpo de alguém...*”. Documentos também relatam que Hua T'o, o fundador da cirurgia chinesa (110 -207 D.C.) usou a planta misturada com vinho para anestesiá-los durante as cirurgias (Zuardi et al., 2006).

Vários benefícios da *Cannabis* foram traduzidos da literatura sânscrito e hindi sob muitos nomes diferentes, como Bhangá, Indracana e Vijaya or Jaya, sendo o mais antigo registro em 1.400-2.000 A.C. (Indian Hemp Drugs Commission Report, 2011; Chopra & Chopra, 1957), embora seu uso medicinal foi mais completamente descritos na medicina ayurvédica indiana e a planta seja cultivada desde 900 A.C. (Kuddus et al., 2013). Na Índia, o uso da *Cannabis* tanto medicinal quanto recreativo era amplamente disseminado, principalmente por sua relação com a religião. O Atharva Veda (textos sagrados de autor desconhecido) refere-se à *Cannabis* como uma planta sagrada, sendo fonte de felicidade, doadora de alegria e portadora da liberdade. Suas indicações médicas estavam relacionadas às suas funções como analgésico (neuralgia, dor de cabeça, dor de dente), anticonvulsivante, hipnótico, tranquilizante, anestésico, anti-inflamatório, antibiótico, antiparasita, antiespasmódico (cólicas, diarreia), digestivo, estimulante do apetite, diurético, afrodisíaco ou anafrodisíaco, antitussígeno e expectorante (Zuardi et al., 2006).

Os efeitos psicoativos da planta eram bem conhecidos e variavam de acordo com sua preparação: o tipo mais fraco, Bhangá, consiste em folhas secas das quais as flores são cuidadosamente removidas; outro tipo mais forte, Ganja, é preparado com as flores da planta feminina; O mais forte de todos é o Charas, feito exclusivamente da resina que cobre flores femininas (Zuardi et al., 2006).

Outros registros também mostram que os médicos gregos Claudius Galeno (131-201 D.C.) e Dioscórides (40-90 D.C.) já haviam descrito indicações medicinais para *Cannabis* (Brunner, 1973).

No continente americano, o uso de *Cannabis* provavelmente começou na América do Sul. As sementes da planta chegaram ao Brasil no início do século XVI, trazido por escravos africanos. Há relatos do uso da *Cannabis* nos rituais religiosos populares, especialmente no 'Catimbó', que inclui cultos de divindades africanas e presume o valor da planta para prática mágica e tratamento de doenças, entre elas dor de dente e cólicas menstruais (Zuardi et al., 2006).

Introdução

A introdução efetiva da *Cannabis* medicinal no Ocidente ocorreu em meados do século XIX através dos trabalhos do médico irlandês Willian B. O'Shaughnessy, e pelo psiquiatra francês Jacques-Joseph Moreau. O'Shaughnessy estudou a literatura sobre a planta, descreveu muitas preparações populares, avaliou sua toxicidade em animais e, posteriormente, testou seu efeito em pacientes com diferentes patologias. Em 1839, publicou o trabalho: "Sobre os preparativos do Cânhamo indiano ou gunjah", em que descreve vários experimentos em humanos usando preparações de maconha para reumatismo, convulsões, e principalmente por espasmos musculares de tétano e raiva (Zuardi et al., 2006; Ligesti et al., 2016).

Já Moreau, depois de experimentar sistematicamente diferentes preparações contendo *Cannabis*, tanto em si mesmo quanto em seus alunos, publicou o livro "*Du Hachisch et de l'Alienation Mentale: Etudes Psychologiques*", onde afirma que viu no haxixe "...mais especificamente em seus efeitos em habilidades mentais, um método poderoso e único para investigar a gênese da doença mental." (Zuardi et al., 2006).

Em 1860, a primeira conferência clínica sobre *Cannabis* ocorreu nos Estados Unidos da América, organizado pela Sociedade Médica do Estado de Ohio. Na segunda metade do século XIX, mais de 100 artigos científicos foram publicados na Europa e nos Estados Unidos sobre o seu valor terapêutico. Vários laboratórios começaram a comercializar *Cannabis* nas formas de extratos ou tinturas, tais como Merck (Alemanha), Burroughs Wellcome (Inglaterra), Bristol-Meyers Squibb (Estados Unidos), Parke-Davis (Estados Unidos) e Eli Lilly (Estados Unidos). As indicações médicas de *Cannabis* no início de século XX foram resumidas na Enciclopédia Analítica para Prática da Medicina (1924) em três áreas: sedativa ou hipnótica, analgésica e outros usos (apetite, digestão, diarreia, diabetes mellitus, vertigem, entre outros) (Zuardi et al., 2006).

No início do século XX o uso medicinal da *Cannabis* diminuiu consideravelmente; as causas mais prováveis foram a dificuldade de obter efeitos replicáveis, devido à extrema variação da eficácia de diferentes amostras da planta, o princípio ativo da planta ainda não havia sido isolado e a droga era usada na forma de tinturas ou extratos cujo poder dependia de diferentes fatores, como origem, idade e modo de preparação). Além disso, vários medicamentos (aspirina, morfina, barbitúricos) e vacinas (antitetânica) de eficácia segura e conhecidas surgiram e foram assim, substituindo o uso da *Cannabis*. Outro fator importante que contribuiu para o declínio da *Cannabis* medicinal foram as várias restrições legais devidas aos seus efeitos psicoativos. (Zuardi et al., 2006).

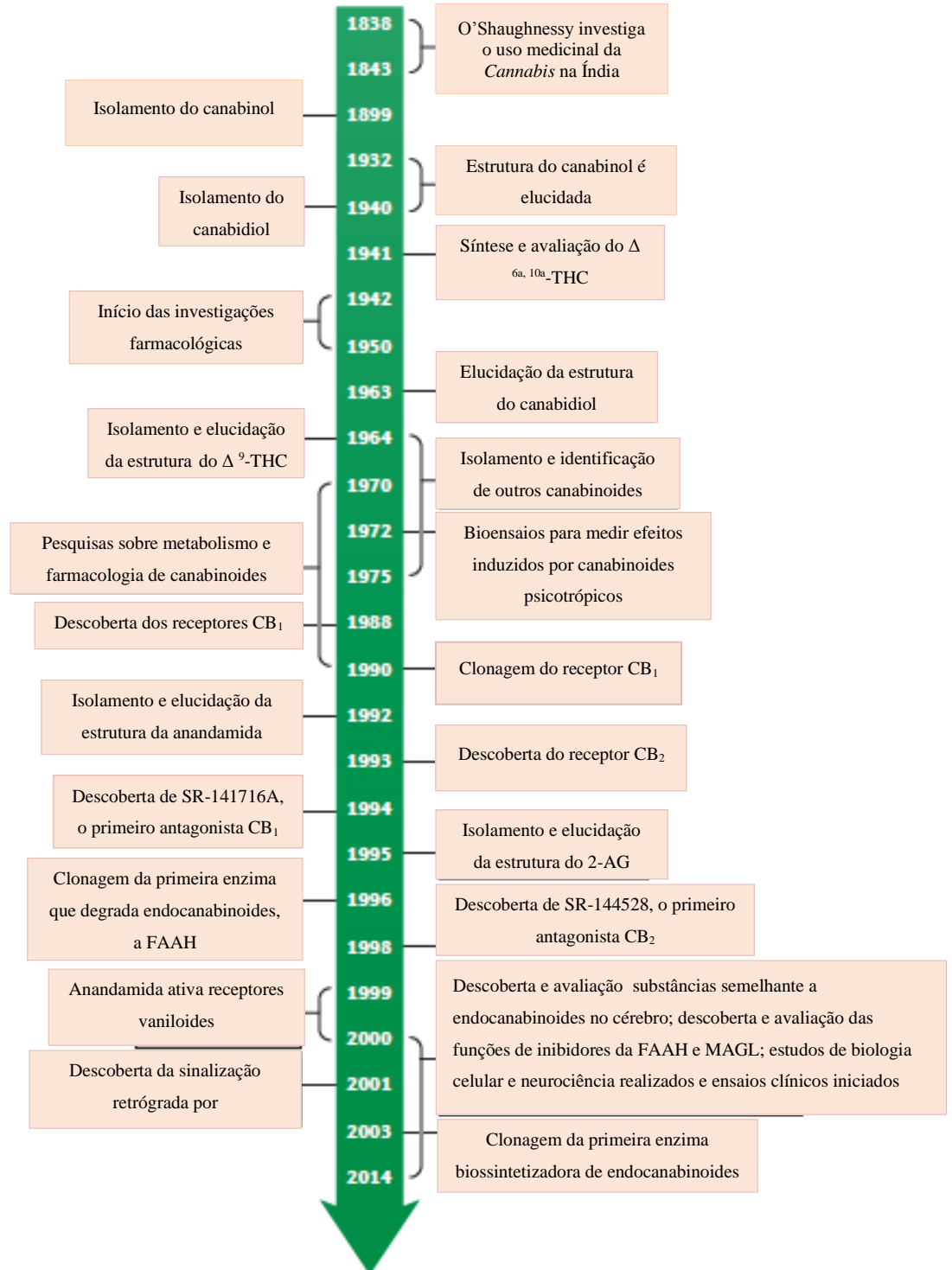
Introdução

Já o uso recreativo da planta cresceu rapidamente entre a população jovem de todo o mundo; nos Estados Unidos, a porcentagem de jovens adultos que consumiram a planta, pelo menos uma vez, passou de 5%, em 1967 para 64%, em 1982. Esse aumento significativo no consumo recreativo contribuiu para aumento no interesse em pesquisas envolvendo a *Cannabis* (Zuardi et al., 2006). Estudos recentes demonstram que o uso de *Cannabis* aumentou consideravelmente nos últimos 15 anos entre adultos, assim como as conseqüências adversas à saúde do uso, incluindo distúrbios do uso de *Cannabis*, acidentes fatais e atendimentos de emergência nos hospitais. No entanto, a prevalência do uso de *Cannabis* não mudou acentuadamente entre os adolescentes (Carliner et al., 2017)

O primeiro fitocanabinoide isolado foi o canabinol (CBN) por volta do ano de 1899, entretanto sua estrutura só foi elucidada por volta de 1932; pouco tempo depois, em 1940, um outro componente, o canabidiol (CBD) foi isolado, mas sua estrutura também só foi elucidada anos mais tarde, em 1963 (Mechoulam et al., 2014). Em 1964, a estrutura química do Δ^9 -THC foi identificada, o que contribuiu para a proliferação de estudos sobre os constituintes ativos da *Cannabis* (Zuardi et al., 2006; Mechoulam et al., 2014). A **figura 2** mostra uma linha do tempo das descobertas dos fitocanabinoides e endocanabinoides.

Introdução

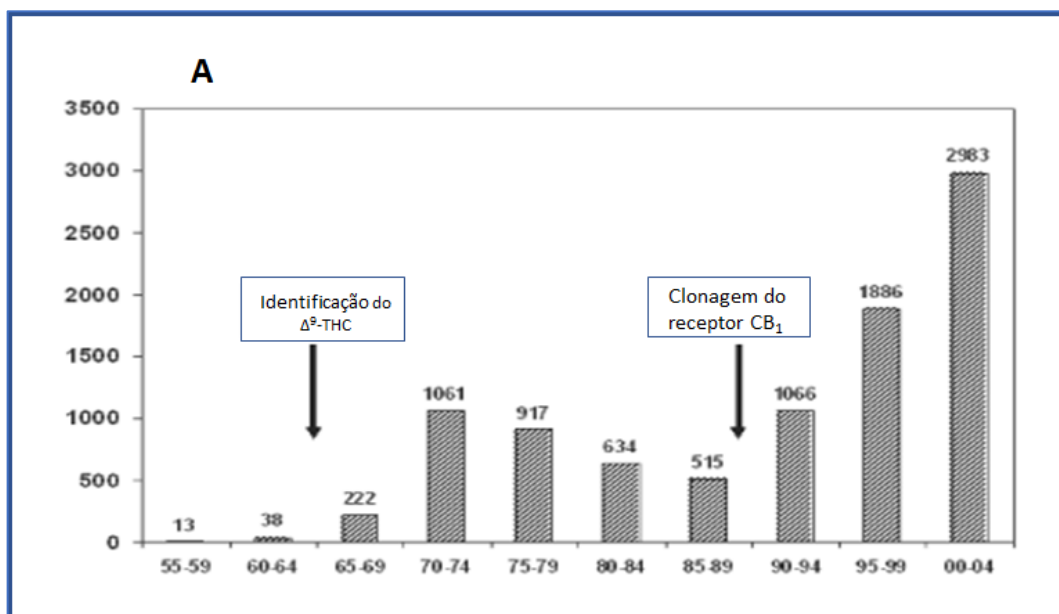
Figura 2 - Linha do tempo: desenvolvimento de pesquisa com fitocanabinoides e endocanabinoides.



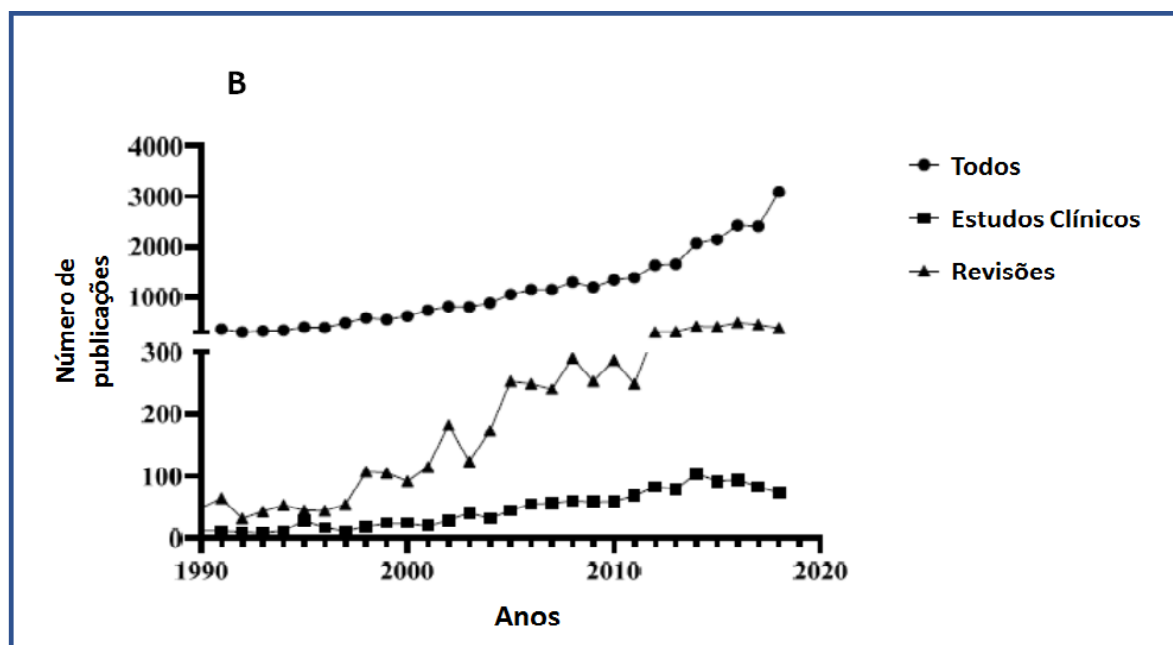
Fonte: Adaptado de Mechoulam e colaboradores, 2014.

Introdução

A partir de 1965 o número de publicações sobre a *Cannabis* cresceu muito, atingindo seu pico no início dos anos 70. Nesse período, um grupo de pesquisadores brasileiros, liderado pelo professor Elisaldo Carlini, teve uma grande contribuição, especialmente sobre as interações do Δ^9 -THC com outros canabinoides. A partir de meados da década de 70 o número de publicações começou a diminuir lentamente, quadro que se manteve na décadas seguinte. O interesse em estudos sobre a *Cannabis* voltou a aumentar no início dos anos 90, com a descrição e clonagem de receptores canabinoides no sistema nervoso e o posterior isolamento dos endocanabinoides anandamida e 2-araquidonoil glicerol (2-AG). A partir desse momento o número de publicações sobre a *Cannabis* cresceu consideravelmente (Zuardi et al., 2006) e se mantêm em crescimento até o momento atual (Alsherbiny & Li, 2018). A **figura 3A** mostra a evolução do número de publicações os anos 1955 a 2004 e a figura **3B** mostra a evolução do número de publicações dos anos 90 até 2018.



Fonte: Adaptado de Zuardi e colaboradores, 2006.



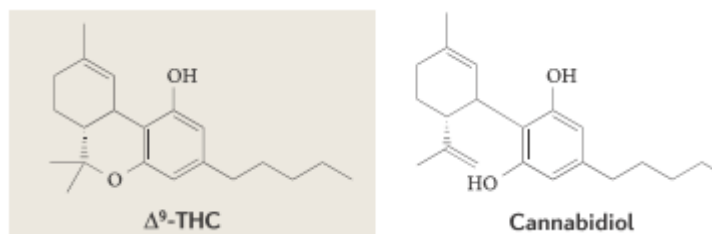
Fonte: Adaptado de Alsherbiny & Li, 2018

Figura 3 - Número de publicações relacionadas com *Cannabis* entre os anos de 1955 a 2018. Na figura A, a fonte usada foi "a ISI web of Knowledge" com palavras-chave: cannabis ou marijuana ou marihuana. Na figura B, a fonte usada foi "PubMed" com palavras chave: cannabis medicinal ou marijuana ou canabinoides ou tetrahydrocannabinol ou canabidiol.

Até o momento foram identificados mais de 100 fitocanabinoides presentes em variados percentuais de composição nas várias plantas do gênero *Cannabis*. (Pertwee, 2014), sendo que os mais estudados são o Δ^9 - tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol (CBD) (**Figura 4**). O Δ^9 -THC é o fitocanabinoide mais abundante na *Cannabis* e é também o principal componente psicoativo desta planta. Os efeitos psicoativos do Δ^9 -THC são principalmente atribuíveis à sua ação como agonista parcial dos receptores canabinoides; entretanto, o canabidiol é o mais abundante fitocanabinoide não-psycoativo contido na *Cannabis* e tem baixa afinidade pelos receptores canabinoides (Pertwee, 1997 e 2014).

Introdução

Figura 4 - Estrutura química do Δ^9 - tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol (CBD).



Fonte: Mechoulam e colaboradores, 2014.

No início de 2005, o laboratório farmacêutico GW Pharmaceuticals recebeu a aprovação no Canadá, Reino Unido e na União Europeia para comercializar o medicamento Sativex® que contém Δ^9 -THC e CBD para o alívio da dor neuropática em pacientes com esclerose múltipla (Zuardi et al., 2006). Inicia-se assim, um novo ciclo para o uso e pesquisa da *Cannabis* medicinal, dessa vez com eficácia e segurança comprovadas cientificamente.

Em relação ao uso medicinal da *Cannabis* no Brasil, a resolução RDC nº 17 de 06/05/2015 (ANVISA, 2015) define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de canabidiol em associação com outros canabinoides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde; já a resolução RDC nº 156 de 03/05/2017 inclui a *Cannabis sativa* L. na lista das Denominações Comuns Brasileiras (DCB) (ANVISA, 2017a). Essa inclusão é o primeiro passo para que um fabricante peça o registro de um medicamento, já que as substâncias precisam estar presentes nessa lista para que a ANVISA inicie a análise. Essa publicação não significa que a *Cannabis* foi reconhecida como planta medicinal pela ANVISA; para que isso aconteça é necessário que uma empresa apresentasse um pedido para registro de um medicamento feito com a planta em si e isso ainda não aconteceu. O registro do medicamento não analisa apenas as substâncias utilizadas, mas todo o processo de extração, síntese e produção do produto. É isso que vai garantir que o produto gere os efeitos desejados de tratamento.

O medicamento registrado no Brasil, o Mevatyl®, contém substâncias extraídas da *Cannabis*, mas não a planta em si. Ou seja, o Mevatyl® é obtido a partir de extratos isolados da *Cannabis*, e é o mesmo produto descrito anteriormente registrado como Sativex® no Canadá, Reino Unido e na União Europeia. é indicado para o tratamento sintomático da

Introdução

espasticidade moderada a grave relacionada à esclerose múltipla, sendo destinado a pacientes adultos não responsivos a outros medicamentos antiespásticos e que demonstram melhoria clinicamente significativa dos sintomas relacionados à espasticidade durante um período inicial de tratamento com o Mevatyl®. (ANVISA, 2017b).

Até esse momento, uma comissão do Senado aprovou o projeto de lei nº 514 de 2017, que altera o art. 28 da Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006, para descriminalização do cultivo da *Cannabis sativa* para uso pessoal terapêutico. Essa alteração permitirá o semeio, cultivo e colheita da planta para uso pessoal terapêutico, em quantidade não mais do que suficiente para o tratamento, de acordo com a indispensável prescrição médica. O projeto está na Comissão de Constituição e Justiça aguardando parecer do relator indicado. Se aprovado, irá para apreciação no Plenário do Senado e, posteriormente, será analisado pela Câmara dos Deputados (Senado, 2018).

Em 14 de junho de 2019, ANVISA publicou no Diário Oficial da União duas propostas de consulta pública relacionadas à regulamentação do cultivo controlado de *Cannabis sativa* para uso medicinal e científico e do registro de medicamentos produzidos com princípios ativos da planta. Com essa iniciativa, a ANVISA quer favorecer a produção nacional de terapias feitas à base de *Cannabis* com garantia de qualidade e segurança, além de permitir a ampliação do acesso da população a medicamentos. Uma das propostas trata dos requisitos técnicos e administrativos para o cultivo da planta por empresas farmacêuticas, única e exclusivamente para fins medicinais e científicos; a outra traz os procedimentos para o registro e monitoramento de medicamentos produzidos à base de *Cannabis* spp., seus derivados e análogos sintéticos. Das contribuições recebidas, 67,8% consideraram que as propostas da ANVISA possuem impactos positivos. Outros 13,4% participantes opinaram que as propostas possuem impactos positivos e negativos e 2,3% que possuem impactos negativos. Já 16,5% dos participantes das consultas públicas não responderam a essa pergunta (ANVISA, 2019a).

Em dezembro de 2019 ANVISA publicou no Diário Oficial da União, a RDC nº 327 de 09/12/2019, que “*Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências*”. A regulamentação entrou em vigor em 11/03/2020 e deverá ser revisada em até três anos em razão do estágio técnico-científico em que se encontram produtos à base de *Cannabis* mundialmente. O texto aprovado prevê que o comércio será feito exclusivamente por farmácias e drogarias (não poderá ser manipulado), mediante

Introdução

receita médica de controle especial (ANVISA, 2019b).

Os novos produtos não serão considerados medicamentos, mas sim uma categoria nova de produtos. A regra para o registro de medicamentos novos ou inovadores prevê a realização de pesquisas clínicas que sejam capazes de comprovar a eficácia desses produtos, além de outros requisitos para o seu enquadramento como medicamento. O atual estágio técnico-científico em que se encontram os produtos à base de *Cannabis* no mundo não seria suficiente para a sua aprovação como medicamentos. A nova categoria vai permitir que os pacientes no Brasil tenham acesso a esses produtos. Já a proposta de cultivo da planta para pesquisa e produção de medicamentos foi rejeitada, o que significa que as empresas deverão importar a matéria-prima para a produção. As regras para prescrição variam de acordo com a concentração de tetra-hidrocanabinol (THC). Nas formulações com concentração de THC de até 0,2%, o produto deverá ser prescrito por meio de receituário tipo B, com numeração fornecida pela Vigilância Sanitária local e renovação de receita em até 60 dias. Já os produtos com concentrações de THC superiores a 0,2% só poderão ser prescritos a pacientes terminais ou que tenham esgotado as alternativas terapêuticas de tratamento. Nesse caso, o receituário para prescrição será do tipo A, com validade de 30 dias, fornecido pela Vigilância Sanitária local, padrão semelhante ao da morfina, por exemplo (ANVISA, 2019c).

Baseada no aumento da demanda pela importação de produtos à base do canabidiol (desde 2015 houve aumento de cerca de 700% das solicitações), a ANVISA simplificou o processo de importação com a publicação da RDC nº 335, de 24 de janeiro de 2020 (ANVISA, 2020a). A partir das mudanças, o pedido de importação poderá ser feito apenas com uma prescrição médica indicando a necessidade de uso do produto, que deverá ser anexada pelo paciente ou seu representante legal na hora de fazer o cadastro do pedido. Além disso, essa resolução prevê o aumento do prazo de validade da autorização de importação de 1 para 2 anos. As medidas previstas na resolução têm como objetivo agilizar o processo de importação de produtos à base de canabidiol em associação com outros canabinoides, por pessoa física, para uso próprio (ANVISA, 2020b).

1.3. Uso do canabidiol (CBD)

Como já dito, o CBD foi isolado no início da década de 40, mas sua estrutura química só foi elucidada na década de 60 por Raphael Mechoulam e colaboradores (Mechoulam et al., 2014). Vários trabalhos mostram o potencial terapêutico do CBD para o tratamento das mais

Introdução

diversas doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, diabetes, artrite reumatoide, dor (das mais variadas etiologias), lesão isquêmica, epilepsia, depressão e ansiedade (Booz, 2011; Campos et al., 2012; Sultan et al., 2018).

O CBD possui baixa afinidade pelos receptores CB₁ e CB₂ canabinoides (Pertwee, 2014) e seus mecanismos de ação estão relacionados à inibição da recaptação ou hidrólise enzimática da anandamida e ativação indireta dos receptores canabinoides (Mechoulam & Hanus, 2002), além de apresentar propriedades agonísticas nos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} (Gomes et al., 2012) e ativação/dessensibilização dos receptores vaniloide do tipo 1 (TRPV1) (Bisogno et al., 2001; Costa et al., 2007) e aumentar a sinalização mediada pela adenosina através da inibição da sua recaptação (Carrier et al., 2006). Todos esses alvos estão implicados na ativação da via antinociceptiva descendente por CBD (Maione et al., 2011; Ligresti et al., 2016). A ativação de receptores de glicina também está relacionada aos efeitos do CBD em modelos de dor aguda e crônica (Xiong et al., 2011 e 2012).

No Brasil, desde a década de 1960 o professor Elisaldo Carlini estuda as alterações comportamentais induzidas pelo uso da *Cannabis* (Carlini & Kramer, 1965; Carlini, 1968; Carlini & Mansur, 1969) e os efeitos antiepilépticos do canabidiol (Carlini et al., 1973; Carlini & Cunha, 1981) onde seu uso no tratamento melhorou significativamente o estado da doença, além de provocar uma melhora da qualidade do sono.

Além dos efeitos anticonvulsivantes, o canabidiol demonstra propriedades terapêuticas em outras desordens neurológicas como na Doença de Parkinson (DP). Utilizando um modelo experimental de DP (ratos lesionados com 6-hidroxidopamina) o CBD demonstrou ação neuroprotetiva e antioxidante, uma vez que diminuiu a depleção de dopamina por redução da morte de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e reduziu o estresse oxidativo por aumentar a expressão da enzima superóxido dismutase, que é um importante mecanismo endógeno que defende a célula contra o estresse oxidativo (Garcia-Arencibia et al., 2007; Fernandez-Ruiz et al., 2013). Em outro trabalho o CBD atenuou a distonia relacionada à Doença de Parkinson, mas não tremor (Consroe et al., 1986).

Em relação a doença de Alzheimer, o CBD inibiu a formação de placas de A β (β -amilose), preveniu a produção de ROS (espécies reativas do oxigênio) e a peroxidação de lipídios em células PC12 expostas a A β , limitou a apoptose neuronal por redução de caspase 3 e limitou os aumentos de Ca²⁺ intracelular induzidos por A β . Em um modelo *in vivo*, o CBD induziu efeito anti-inflamatório por redução da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da expressão e liberação da IL-1 β . Também inibiu a hiperfosforilação da proteína tau em

Introdução

neurônios PC12 estimulados por A β . Além disto outros trabalhos demonstraram a atividade neurogênica de CBD e anandamida indicando um possível potencial terapêutico (Esposito et al., 2006; Russo, 2018).

Em relação ao tratamento da esclerose múltipla, vários trabalhos apontam a eficácia do medicamento Sativex® (THC:CBD) no tratamento dos diversos sintomas relacionados à doença como bexiga hiperativa e espasticidade (Maniscalco et al., 2018; Keating, 2017). Ao avaliar apenas o efeito do CBD num modelo murino de esclerose múltipla induzida por encefalomielite auto-imune (EAE), Elliot e colaboradores (2018) verificaram que o tratamento com CBD induziu redução significativa nos escores clínicos de paralisia, diminuiu a infiltração de células T no sistema nervoso central e reduziu os níveis de IL-17 e IFN γ . Adicionalmente, o tratamento com CBD levou a um aumento significativo das células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) em camundongos EAE quando comparados aos controles com EAE tratados com veículo. Estas células MDSCs causaram significativa inibição da proliferação de células T *in vitro*. Além disso, a transferência de células MDSCs induzidas por CBD melhorou a EAE, enquanto a depleção de MDSC reverteu os efeitos benéficos do tratamento com CBD, demonstrando pela primeira vez que o tratamento com CBD pode melhorar a EAE através da indução de MDSCs imunossupressoras.

O uso do canabidiol no tratamento das comorbidades do diabetes também tem demonstrado resultados interessantes. Rajesh e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com CBD em modelo animal de diabetes tipo 1 atenuou a disfunção miocárdica, a fibrose cardíaca, o estresse oxidativo/nitrativo, a inflamação, a morte celular e as vias de sinalização inter-relacionadas. Além disso, o CBD também atenuou a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio induzidas pela glicose, a ativação do fator nuclear-kB e a morte celular em cardiomiócitos humanos primários.

Em um modelo animal para artrite reumatoide induzida pela administração de colágeno, Malfait e colaboradores (2000) demonstraram que células de linfonodos de camundongos tratados com CBD mostraram diminuição da produção de IFN γ , bem como liberação diminuída de TNF pelas células sinoviais do joelho. Os efeitos *in vitro* do CBD incluem supressão da proliferação de linfócitos, de maneira dose dependente, e redução acentuada da produção de TNF e NO (óxido nítrico) por macrófagos peritoneais; também suprimiu as respostas de linfócitos à mitógenos e a estímulos alogênicos e bloqueou o aumento de TNF sérico induzido por lipopolissacarídeos (Mechoulam & Hanus, 2002). O uso tópico de CBD, na forma de gel, demonstrou potencial terapêutico no tratamento da inflamação e dor associadas à artrite em

Introdução

modelo animal de artrite no joelho induzido por administração de Adjuvante de Freud (Hammell et al., 2016).

O CBD também demonstrou efeito neuroprotetor em ratos, uma vez que sua administração intra-cerebral induziu significativa redução no infarto cerebral ou acidente vascular encefálico, no edema cerebral e na permeabilidade da barreira hematoencefálica em comparação com o grupo controle, além de suprimir a expressão de TNF- α , TNFR1 e NF- κ B (Khaksar & Bigdeli, 2017); também reverteu danos cerebrais causados por isquemia em ratos (Mechoulam et al., 2007). Em leitões recém-nascidos com isquemia pós-hipóxia causada por oclusão temporária das artérias carótidas, o CBD melhorou a atividade metabólica cerebral, reduziu o edema cerebral e convulsões associadas com esta condição, e produziu efeitos benéficos cardíacos, hemodinâmicos, e ventilatórios (Alvarez et al., 2008; Ligresti et al., 2016)

Vários trabalhos demonstram que o CBD é um dos candidatos mais promissores para uso terapêutico em uma ampla gama de transtornos psiquiátricos e parte de seus efeitos parece depender da facilitação da neurotransmissão mediada pelo sistema endocanabinoide (Marco et al., 2011). Os resultados dos trabalhos conduzidos por Linge e colaboradores (2016) e Zanelati e colaboradores (2010) indicam que o CBD induz efeito antidepressivo através de mecanismos dependente do receptor 5-HT_{1A}. Outros trabalhos demonstram que o CBD atenua as respostas autonômicas agudas associadas ao estresse em ratos, facilitando a neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{1A} (Resstel et al., 2009; Fogaça et al., 2014). Em seus experimentos, Moreira e colaboradores (2006) demonstram que o CBD induz efeito ansiolítico no teste de conflito de Vogel e que este efeito não está relacionado à ativação de receptores benzodiazepínicos.

Em relação ao câncer, o CBD tem demonstrado atividades antiproliferativas e pró-apoptóticas, induzindo modulação da tumorigênese em diferentes tipos de câncer, incluindo mama, pulmão, cólon, cérebro e outros (Pellati et al., 2018; Namdar & Koltai, 2018).

Vários estudos pré-clínicos demonstraram as propriedades analgésicas do CBD. Entre eles, Ward e colaboradores (2011) demonstram que o CBD (5-10 mg/kg) previne o desenvolvimento de alodinia fria e mecânica em camundongos tratados com paclitaxel. Em outro trabalho, Costa et al. (2004a) demonstraram que o CBD (10 mg / kg) aboliu a hiperalgesia induzida por carragenina em um modelo de estímulo térmico em ratos. Outras evidências clínicas mostraram a eficácia do CBD no tratamento de sintomas de dor neuropática, isoladamente (Wade et al., 2003) ou em combinação com THC (Kwiatkowska et al, 2004; Nurmikko et al, 2007). Em seu recente trabalho, De Gregório e colaboradores (2019)

Introdução

demonstraram que o tratamento repetido com baixa dose de CBD induz analgesia predominantemente através da ativação do TRPV1, reduz a ansiedade por meio da ativação do receptor 5-HT_{1A} e resgata a neurotransmissão da 5-HT em condições de dor neuropática.

1.4. A dor

A Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) define o termo dor como “uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável associada a dano real ou potencial dos tecidos ou descrita em termos de tal dano”. O componente sensorial da dor é denominado nociceção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual.

A detecção do estímulo da dor ocorre primeiramente nos nociceptores, cuja função é transformar estímulos de natureza química, mecânica, elétrica ou térmica em potenciais de ação carreando a informação nociceptiva da periferia ao corno dorsal da medula espinhal (Rang et al., 1991), onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem, em lâminas distintas: fibras C nas lâminas I e II, e fibras A δ na lâmina II, também conhecida como substância gelatinosa (SG) da medula espinhal (Basbaum & Jessell, 2000; Basbaum et al., 2009). Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente até o tálamo, onde será realizada uma segunda sinapse com os neurônios de terceira ordem que emitem axônios ao córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção do estímulo nocivo, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde é processado o componente emocional da dor (Russo & Brose, 1998) (**figura 5**).

Introdução

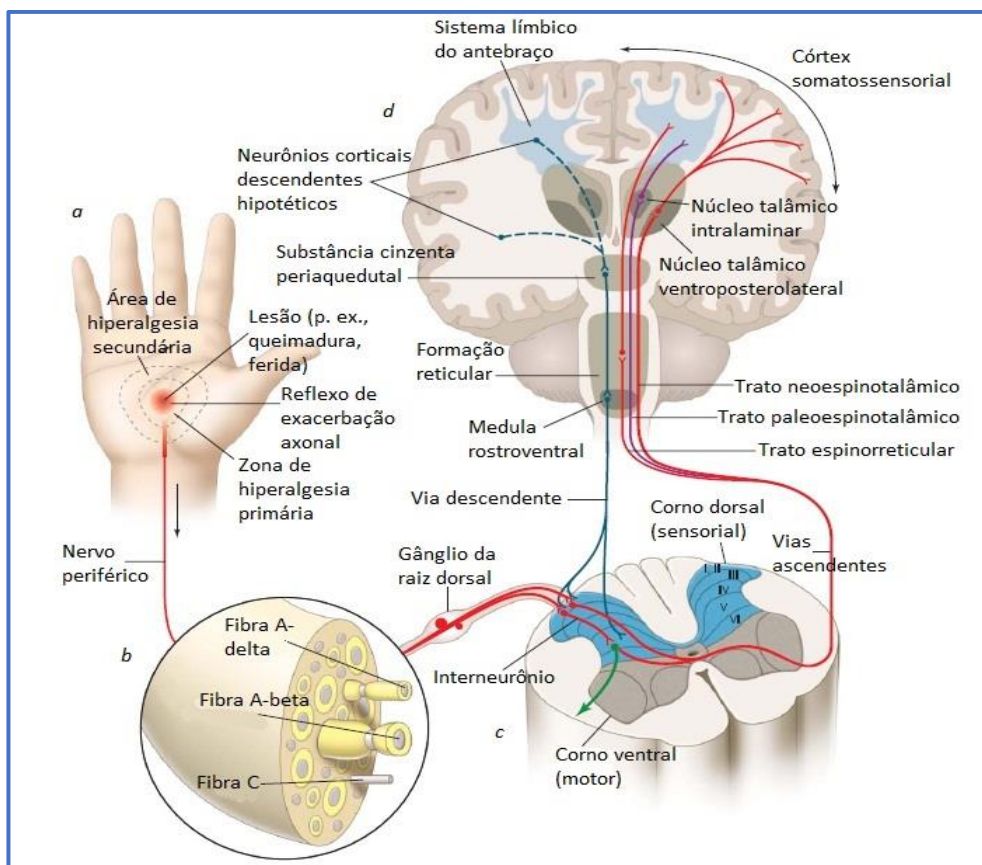


Figura 5 – Via ascendente da dor

(Fonte: [Http://www.medicinanet.com.br/imagens/20121218101957.jpg](http://www.medicinanet.com.br/imagens/20121218101957.jpg))

Diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos são liberados pelas terminações aferentes primárias no corno dorsal da medula, onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva. Entre tais substâncias destacam-se o glutamato e aspartato (aminoácidos excitatórios), as taquicinas [substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB)], peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, NO, prostaglandinas (PG), galanina, encefalinas e endorfinas (Woolf, 1994; Cao et al., 1995; Millan, 1999).

O organismo humano possui sistemas de controle dor tanto a nível espinal como a nível supraespinal. A nível espinal temos a Teoria do Portão da Dor (**figura 6**), proposta por Melzack & Wall (1965), que sugere que a lâmina II do corno dorsal é constituída principalmente por interneurônios inibitórios, que uma vez ativados por fibras mais mielinizadas (táteis), inibem as sinapses excitatórias no corno dorsal da medula. Já a estimulação por fibras menos mielinizadas (nociceptivas) inibem, através de ramificações colaterais, os interneurônios da substância gelatinosa, permitindo a chegada da informação nociceptiva aos neurônios

Introdução

secundários do corno dorsal. Em resumo, o balanço entre as informações conduzidas pelas fibras periféricas nociceptivas e táteis modulam a informação nociceptiva ao nível do corno dorsal da medula espinhal.

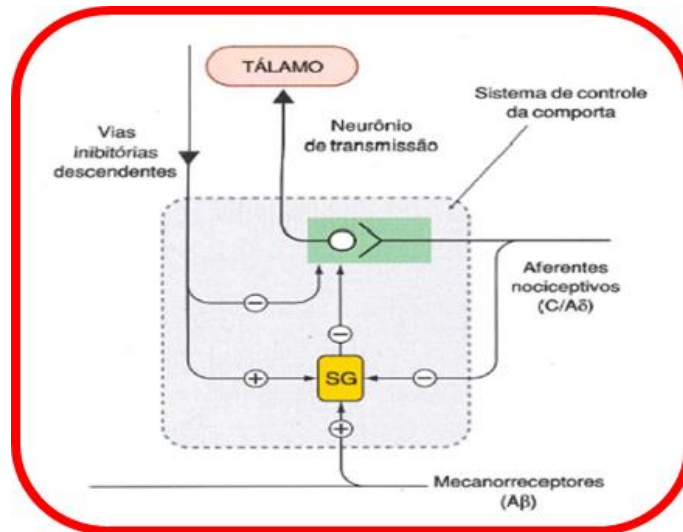


Figura 6 - Representação esquemática da Teoria do Portão da Dor. Sinal (-) significa inibição e o sinal (+) significa estimulação. (Fonte: Rang & Dale, 7ª edição)

Ao nível supra espinhal, a principal via descendente inibitória da dor passa via funículo dorsolateral, tendo início na substância cinzenta periaquedutal (PAG), localizada no mesencéfalo, e recebe aferências do hipotálamo e do trato espinotalâmico ascendente; descende na via do núcleo magno da rafe, que dá origem a neurônios liberadores de serotonina (5-HT) e de encefalinas, cujos papéis inibitórios descendentes contribuem para analgesia. As terminações dessas fibras fazem sinapses com neurônios na raiz dorsal completando um longo feedback negativo (Dickenson, 1995; Stamford, 1995). Além da substância cinzenta, existem numerosos sítios antinociceptivos supraespinhais originando vias descendentes para o corno dorsal, dentre elas o hipotálamo, núcleo magno da rafe, núcleo reticular paragigantocelular, núcleo parabraquial, locus coeruleus, núcleo do trato solitário e núcleo reticular dorsal (Millan, 2002) (**figura 7**).

Introdução

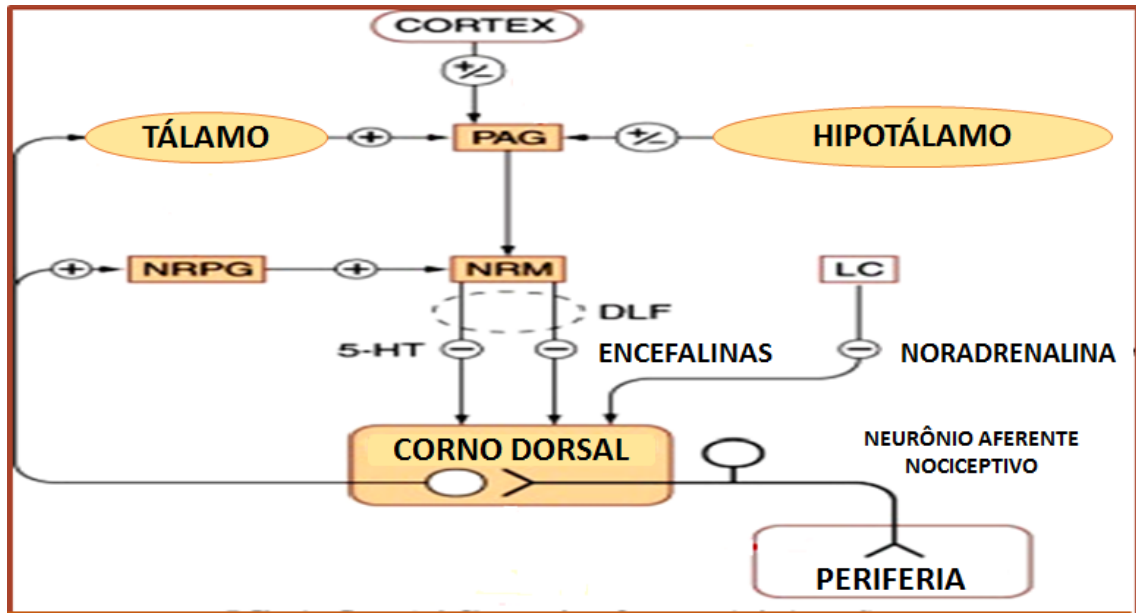


Figura 7 - Sistema de controle descendente da dor

PAG (Substância Cinzenta Periaquedutal), NRPG (Núcleo Paragigantocelular Reticular), NMR (Núcleo Magno Da Rafe), LC (Locus Ceruleus), DLF (Funículo Dorsolateral) (Fonte: Adaptado de Rang & Dale – Farmacologia 6ª edição).

Além da serotonina e noradrenalina, vários outros neurotransmissores atuam na inibição nociceptiva no corno dorsal, entre eles aminoácidos inibitórios como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina, bem como neuropeptídeos como as encefalinas (Curtis et al., 1968; Lin et al., 1994).

A dor pode ser classificada de acordo com vários critérios. Em relação a velocidade de transmissão, pode ser classificada como rápida ou lenta (**figura 8**). A dor rápida é sentida cerca de 0,1 s após o estímulo doloroso. Os impulsos dolorosos são transmitidos pelos nervos periféricos para a medula espinhal pelas fibras aferentes primárias mielinizadas A δ , com velocidade de condução entre 12 e 30 m/s. Por outro lado, a dor lenta começa após 1 segundo ou mais e aumenta lentamente, sendo os impulsos conduzidos por fibras aferentes primárias não mielinizadas do tipo C, com velocidade de 0,5 a 2,0 m/s (Newmann et al., 1996; Millan, 1999).

Introdução

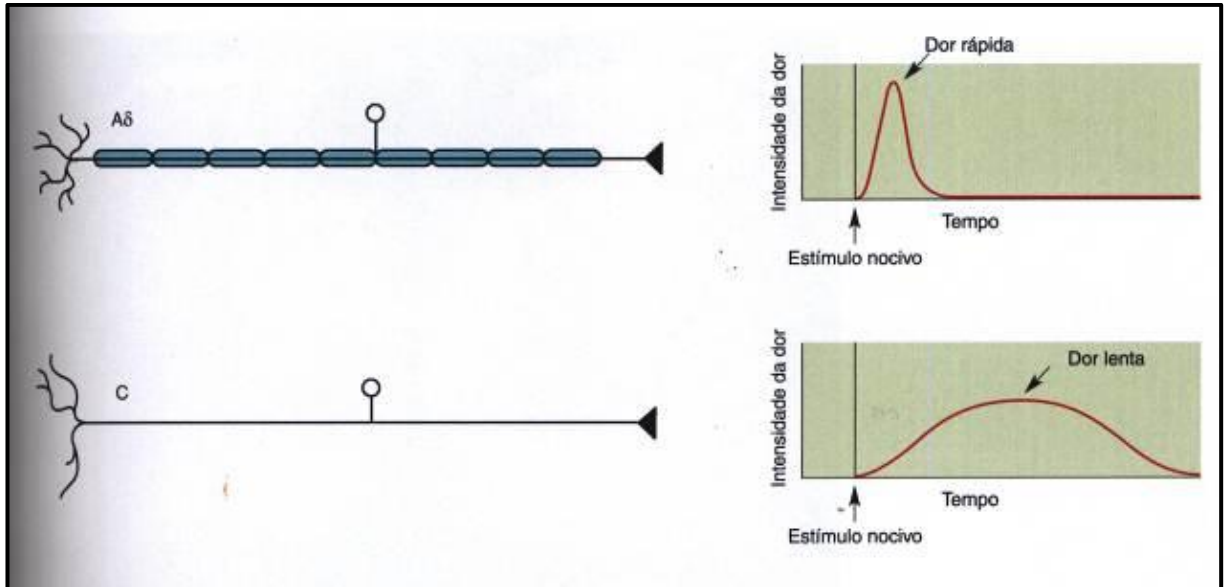


Figura 8 – Dor rápida e dor lenta (Fonte: Google imagens)

De acordo com a duração pode ser denominada aguda ou crônica. A dor aguda não persiste por mais de 3 meses, mas é uma resposta limitada no tempo devido a estímulos nocivos que danificam ou ameaçam danificar os tecidos normais. Pode ser causada por lesão traumática, no contexto de uma condição médica subjacente ou secundária ao tratamento e geralmente ocorre lesão e ativação dos nociceptores no sítio lesionado (Loeser & Melzack, 1999; Michaelides & Zis, 2019), podendo rapidamente cronificar (Carr & Goudas, 1999). A dor crônica é definida como dor que dura ou se repete por mais de três meses, e pode ser dividida em dor crônica primária, onde a dor crônica é considerada a doença em si, e dor crônica secundária, onde a dor é um sintoma de uma condição subjacente (IASP, 2019). Está relacionada à hiperalgesia e à alodinia, além de sensibilização central (Loeser & Melzack, 1999; Souza, 2007), como mostrado na **figura 9**.

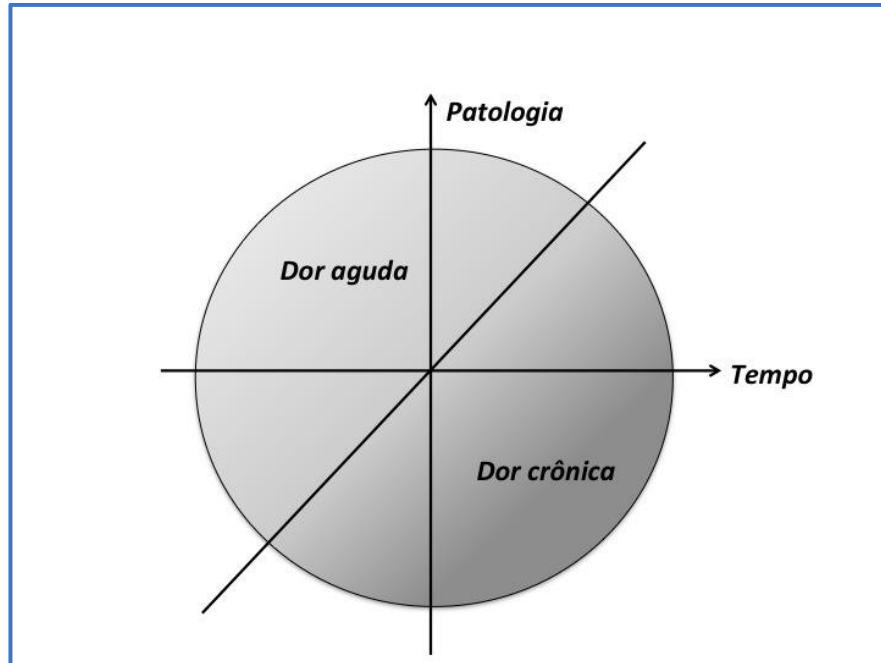


Figura 9 – Dor aguda e dor crônica.

A dor aguda, quando não resolvida, ao longo do tempo torna-se crônica

Fonte: Adaptada de Google imagens.

Já Woolf classifica a dor em três tipos: nociceptiva, inflamatória e patológica (**figura 10**). A dor nociceptiva faz parte de um sistema de proteção fisiológica de alerta precoce, essencial para detectar e minimizar o contato com estímulos prejudiciais ou nocivos, e ocorre a partir da ativação direta do nociceptor por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. A dor inflamatória, após lesão tecidual, dá origem a um processo inflamatório através da ativação celular e liberação de mediadores que ativam ou sensibilizam os neurônios nociceptivos periféricos; também é considerada um tipo de dor adaptativa e protetora. A dor patológica não é protetora, mas mal-adaptativa, resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso. Pode ocorrer após danos no sistema nervoso (dor neuropática), mas também em condições em que não há tal dano ou inflamação (dor disfuncional) (Woolf, 2010).

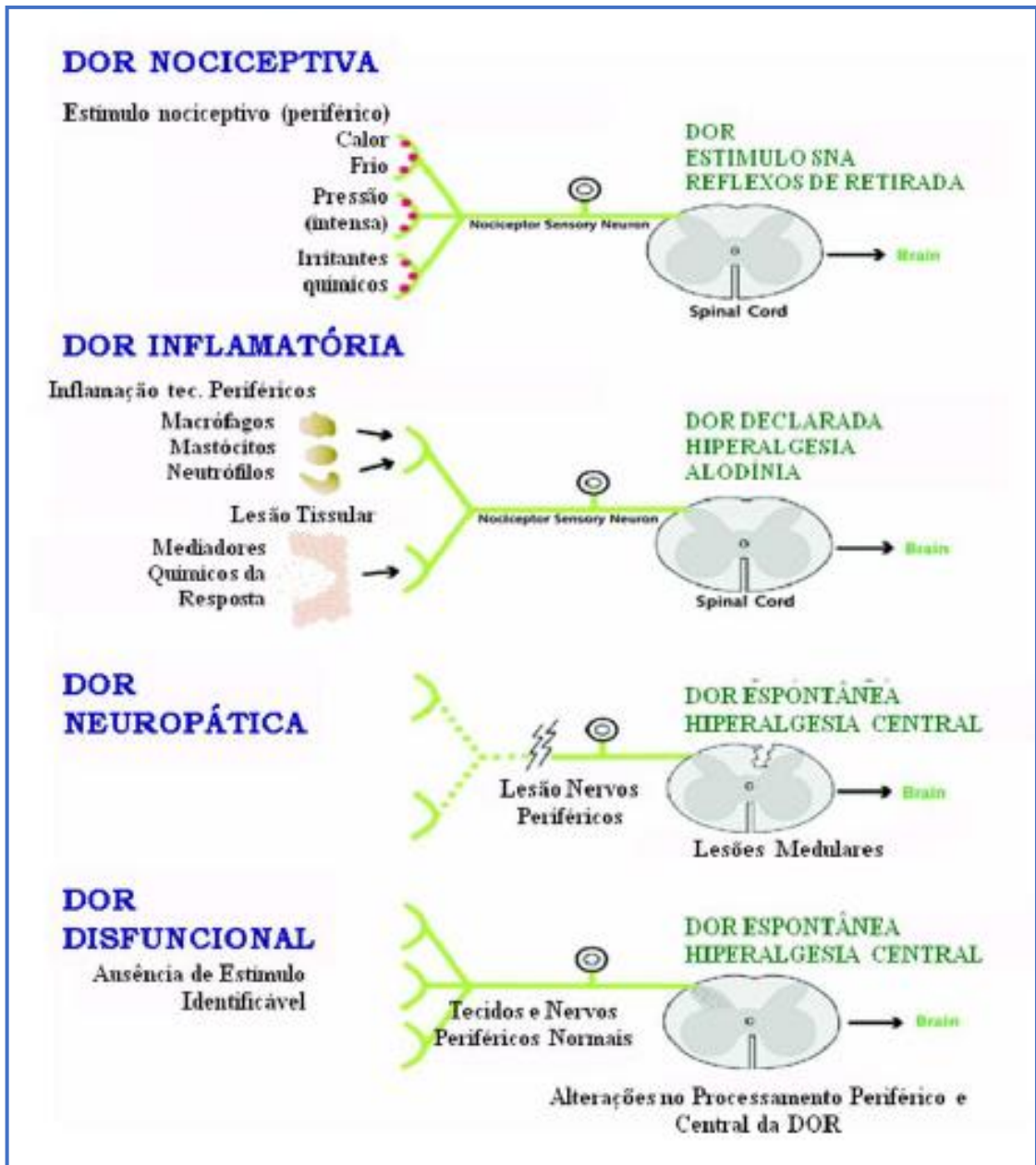


Figura 10 - Classificação dos tipos de dor (Fonte: Figura adaptada de Clifford & Woolf, 2004).

Inicialmente a IASP classificava a dor em dois tipos: nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva é definida como dor que surge de danos reais ou ameaçados ao tecido não-neural e é devida à ativação de nociceptores. A dor neuropática é definida como dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial. Essa dicotomia entre as definições mecanicistas da dor criou uma lacuna para numerosos pacientes que sentem dor sem que ocorra ativação de nociceptores, lesão ou doença do sistema nervoso, como pacientes com dor inespecífica nas costas, dor inespecífica nas articulações periféricas, fibromialgia e síndrome

Introdução

da dor regional complexa tipo 1 (Trouvin & Perrot, 2019). Dada essa situação, um novo termo foi proposto pelo conselho da IASP em 2017, dor nociplástica, que é definida como a dor que surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara de dano tecidual real ou ameaçado, causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial que causa a dor. A nota que acompanha esta definição sugere que os pacientes podem ter uma combinação de dor nociceptiva e nociplástica (IASP; Trouvin & Perrot, 2019). As definições são revisadas com frequência e sua utilidade avaliada em referência a novos conhecimentos sobre aspectos clínicos e científicos básicos da dor.

Alterações tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico podem resultar em dor neuropática, incluindo alteração na expressão e função dos canais para sódio e potássio, aumento do influxo celular de cálcio, alteração das resposta ao glutamato e substância P, reestruturação organizacional celular, aumento da excitabilidade neuronal, brotamento de fibras do sistema nervoso periférico, diminuição da atividade ou perda dos neurônios inibitórios, ativação da via facilitatória descendente e inibição da via inibitória descendente da transmissão dolorosa, entre outros (Leonard et al., 2009; Costigan et al., 2009; Basbaum et al., 2009; Austin & Moalen, 2010; Cohen & Mao, 2014). Essas alterações desencadeiam variações na síntese de neurotransmissores, na expressão e ativação de receptores e canais iônicos, levando à sensibilização periférica e central, gerando descargas ectópicas, que se amplificam e ativam células vizinhas caracterizando a dor crônica (Kraychete et al., 2006; Machelska, 2011), e normalmente se manifestam como dor intensa e persistente, podendo ser espontânea, associada a sensação de queimação e alfinetadas, hiperalgesia e/ou alodinia (Jensen et al., 2011).

Além dos neurônios diretamente envolvidos na dor neuropática, as células da glia, como micróglia e astrócitos, também participam da geração e manutenção dos sintomas da dor neuropática. Estes grupos celulares liberam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, que são um dos principais componentes de mediação ou na manutenção de hiperalgesia e alodínia (Watkins et al., 2001).

A dor neuropática está associada a comprometimento da qualidade da vida, e é muitas vezes mal gerida. Em torno de 7-8% de adultos apresentam dor com características neuropáticas; 25% das pessoas com diabetes e 35% das pessoas com o HIV têm dor neuropática. (Murnion, 2018).

Introdução

Os sinais e sintomas da dor neuropática podem ser positivos e/ou negativos (**Quadro 1**); os positivos podem ser espontâneos ou evocados e os negativos estão relacionados à perda ou redução da sensibilidade tátil, vibratória, térmica e dolorosa (Baron et al., 2010).

Quadro 1 – Sinais e sintomas da dor neuropática

Sintomas	Dor espontânea	Sensação dolorosa sem estímulo aparente	
Positivos	Evocados	Alodínia	Dor gerada por estímulo não doloroso
		Hiperalgisia	Dor exagerada a um estímulo doloroso Moderado
	Espontâneos	Disestesia	Sensação dolorosa desagradável espontânea
		Parestesia	Sensação anormal não dolorosa
Negativos	Hipoestesia	Diminuição da sensibilidade a estímulos, excluindo os sentidos especiais	
	Anestesia	Perda total da sensibilidade	
	Analgesia	Ausência de dor em resposta a estímulos normalmente doloroso	
	Hipoalgisia	Resposta diminuída a um estímulo doloroso Moderado	

Fonte: Adaptado de Moreira Lima, 2017.

O tratamento da dor neuropática pode ser desafiador e, como com toda a dor, deve ser abordado com uma estrutura biopsicossocial e interdisciplinar. Existem várias opções para o tratamento medicamentoso como parte de uma abordagem geral para melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Moreira Lima, 2017; Murnion, 2018). A IASP, o Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG) e a European Federation of Neurological Societies (EFNS) atualizaram as diretrizes do consenso de tratamento farmacológico da dor neuropática (**Quadro 2**):

Introdução

Quadro 2 – Tratamento farmacológico da dor neuropática

Fármacos de primeira linha				
Tratamento sistêmico	Antidepressivos	Antidepressivos tricíclico (ATC), aminas secundárias	Nortriptilina	
			Desipramina	
			Amitriptilina	
		Inibidores da recaptação da serotonina e norepinefrina	Duloxetina	
Anticonvulsivantes	Ligantes dos $\alpha 2$ - δ do canal de cálcio		Gabapentina	
			Pregabalina	
Tratamento tópico	Analgésico local	Amina do tipo amida	Lidocaína	
Fármacos de segunda linha				
Tratamento sistêmico	Opioides fortes	Morfina		
		Oxicodona		
		Metadona		
		Fentanil		
	Opioides Fracos	Tramadol		
Fármacos de terceira linha				
Tratamento sistêmico	Antidepressivos	Inibidores da recaptação de dopamina e noradrenalina (IRDN)	Bupropiona	
		Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRS)	Citalopram	
			Paroxetina	
	Anticonvulsivantes		Carbamazepina	
			Lamotrigina	
			Oxcarbazepina	
			Topiramato	
			Ácido valproico	

Fonte: Adaptado de Moreira Lima, 2017.

Assim como as diretrizes, vários trabalhos sugerem o uso de fármacos antidepressivos para tratamento da dor persistente e dor neuropática (Finnerup et al., 2005; Attal et al., 2010; Dworkin et al., 2003), outros estudos também relatam o efeito antinociceptivo do sistema canabinoide, e do canabidiol, em diferentes modelos animais de dor (Costa et al., 2007; Hammel et al., 2016), incluindo dor neuropática (Costa et al., 2007; Xiong et al., 2012; Ward et al., 2014). Estudos demonstram que canabinoides suprimem a dor neuropática induzida por lesão

Introdução

traumática no nervo, quimioterapias e alterações metabólicas (Guindon & Hohmann 2008). O agonista não seletivo para receptores canabinoides, WIN55-212, atenuou a dor neuropática induzida por paclitaxel e vincristina através de mecanismos de ação via receptores CB₁ e CB₂ (Pascual et al., 2005; Rahn & Hohmann, 2009); o agonista dos receptores CB₂, AM1710, também demonstrou atenuar a dor neuropática induzida por cisplatina e paclitaxel (Deng et al., 2012). Ward e colaboradores (2011; 2014) demonstraram que o canabidiol previne o desenvolvimento da sensibilidade mecânica induzida por paclitaxel.

Diversos estudos sugerem relação entre depressão e dor neuropática (Barrot et al., 2009; Micó et al., 2006; Von & Simon, 1996), sendo que vários trabalhos atribuem o efeito analgésico de fármacos antidepressivos (como nortriptilina, venlafaxina e duloxetina) na dor neuropática às suas ações na melhora da transmissão monoaminérgica (Attal et al., 2010; Barrot et al., 2010).

Além do sistema monoaminérgico, vários trabalhos relatam participação do sistema opioide (Benbouzid et al., 2008a e 2008b; Bohren et al., 2010; Nozaki & Kamei, 2006) nos mecanismos analgésicos subjacentes induzidos por antidepressivos, e também os efeitos antidepressivos e analgésicos conhecidos após a ativação do sistema canabinoide (Bambico et al., 2007; Hill & Gorzalka, 2005; Romero et al., 2013; Harris et al., 2016), além do efeito antinociceptivo sinérgico dos sistemas opioide e canabinoide em vários modelos de dor (Viganò et al., 2005; Reis et al., 2009), incluindo a dor neuropática (Bushlin et al., 2010; Kazantzis et al., 2016).

Vários trabalhos demonstram também participação da via antinociceptiva nitrérgica em modelos de dor, (Cunha et al., 2010), com posterior ativação de K_{ATP} (canais para potássio dependentes de ATP) (Rodrigues e Duarte, 2000; Soares & Duarte, 2001). Além desses trabalhos, Koh e colaboradores (2016) demonstraram, em um modelo de dor neuropática que os efeitos anti-alodínicos do Nefopam, droga analgésica de efeito central, foram aumentados pelo agonista do canal K_{ATP} Pinacidil, e revertidos pelo antagonista do canal K_{ATP} Glibenclamida.

Sabe-se que a ativação da via PI3K/AKT tem importante papel no efeito analgésico de algumas drogas, como a morfina (Cunha et al., 2010) no modelo de dor por sensibilização nociceptiva. Recentemente foi demonstrado, em células *in vivo*, que o extrato de HCT (*Houttuynia cordata* Thunb) aumentou a proliferação celular *in vivo*, e aumentou a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR *in vitro* em células do tipo Th17. Essas células estão envolvidas principalmente na recuperação endógena da neuropatia. (Wan et al., 2016).

2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Estimativas da prevalência de dor neuropática crônica devido a lesão nervosa periférica varia de 5% a 15,7% (Kuffler, 2020). Em torno de 7-8% da população adulta apresenta dor com características neuropáticas, além de 25% da população diabética e 35% dos portadores de HIV serem acometidos por esse tipo de dor (Murnion, 2018). Os tratamentos farmacológicos atuais - antidepressivos, anticonvulsivantes, opioides - são frequentemente insatisfatórios em proporcionar alívio da dor, e induzem vários efeitos adversos. A EFNS recomenda o uso de drogas únicas, em doses relativamente altas (até 150 mg de antidepressivos tricíclicos, 3600 mg de gabapentina, 400 mg de tramadol) como a primeira e a segunda linha de tratamento, enquanto as terapias combinadas são recomendadas para pacientes que mostram apenas resposta parcial a todos os medicamentos administrados isoladamente (Attal et al., 2010).

Assim, a pesquisa por tratamentos que diminuam a dor, e, de preferência, com baixo índice de efeitos adversos, é uma necessidade social e clínica de extrema importância. Com o aumento do número de fitoquímicos sendo desenvolvidos para medicina (Chiappedi & Bejor, 2010), incluindo analgésicos (Kanodia et al., 2010; Zareba, 2009), e ainda, o crescente número de trabalhos envolvendo o canabidiol para os mais diversos tratamentos como ansiedade, epilepsia, diabetes, depressão e doenças neurodegenerativas (Moreira et al., 2006; Carlini e Cunha, 1981; Weiss et al., 2008; Zanelati et al., 2010; Iuvone et al., 2009) além de dor neuropática (Xiong et al., 2012), com comprovado baixo índice de efeitos adversos (Carlini e Cunha, 1981; Hoggart et al., 2015), nosso trabalho busca entender os mecanismos pelos quais o canabidiol é eficiente analgésico no tratamento da dor neuropática.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito antinociceptivo periférico do canabidiol e elucidar se os sistemas canabinoide, opioide, nitrérgico e os receptores 5-HT_{1A} e TRPV₁ estão envolvidos nesse evento.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliação temporal da dor neuropática na pata de camundongos induzida pela constrição do nervo ciático;
- II. Avaliação do efeito periférico do canabidiol na dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático;
- III. Avaliação do envolvimento do sistema canabinoidérgico, opioidérgico, da via intracelular PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP}, bem como dos receptores 5-HT_{1A} e TRPV1 no efeito antinociceptivo periférico induzido pelo canabidiol, frente à constrição do nervo ciático;
- IV. Quantificação de endocanabinoides em tecidos de pata na presença e ausência de neuropatia em camundongos tratados com canabidiol;
- V. Quantificação da produção de Óxido Nítrico a partir da produção de nitrito .

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 30 e 40 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG). Esses foram alojados em caixas plásticas de dimensões 30x16x12 centímetros (4/caixas) com cama de forragem, tendo livre acesso à ração e água. Permaneceram em ambiente com temperatura controlada (23 a 25°C), em regime claro-escuro de 12 horas. Após os procedimentos experimentais os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal dos agentes anestésicoa ketamina e xilazina na dose 3 vezes maior do que a dose anestésica usada (300 mg/Kg e 15 mg/Kg em 150 µl). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o Protocolo nº 57/2017.

4.2. Modelo de Indução de Dor Neuropática: Constrição do Nervo Ciático (CNC)

Os animais foram anestesiados com solução de Cloridrato de Ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, Brasil) na dose de 100 mg/ Kg e Cloridrato de Xilazina 2% (Dopaser, Calier, Brasil) com a dose de 5 mg/Kg, injetados por via intraperitoneal num volume final de 150 µl de solução. A técnica cirúrgica empregada é uma adaptação do método descrito por Yalcin et al. (2014). Cada camundongo, após ser anestesiado, foi colocado em uma mesa cirúrgica, na posição decúbito dorsal. Foi realizada a epilação local, e com auxílio de uma pinça e uma tesoura de ponta afiada, foi realizado um pequeno corte paralelo ao fêmur. Os músculos foram então divulsionados, com objetivo de localizar e expor o nervo ciático. Diferente do procedimento realizado por Yalcin et al. (2014), que implantaram um manguito de polietileno no nervo ciático (**figura 11**), em nosso modelo realizamos duas ligaduras frouxas ao redor do nervo, com fio flexível resinado e inócuo, separadas uma da outra por aproximadamente dois milímetros. Feito isso, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de nylon cirúrgico agulhado 5.0 esterilizado. Os grupos experimentais foram divididos nos grupos “naive”, “operado”, “sham sem fio” “sham com fio”. Os animais “naive” não receberam nenhum tipo de manipulação cirúrgica. Os grupos falso-operado (sham) foram submetidos a todos os procedimentos experimentais realizados no grupo “operado”, exceto a constrição do nervo ciático.



Figura 11. Manguito de polietileno implantado no nervo ciático para induzir dor neuropática (Fonte: Vídeo disponibilizado como material suplementar do trabalho de Yalcin e colaboradores (2014)).

4.3 Teste algesimétrico de mensuração da hiperalgesia da pata de camundongos

O método de retirada da pata submetida à compressão, descrito originalmente para ratos por Randall & Selitto (1957) e posteriormente adaptado para camundongos por Kawabata et al. (1992), foi utilizado para a mensuração da hiperalgesia periférica em camundongos (**figura 12**).

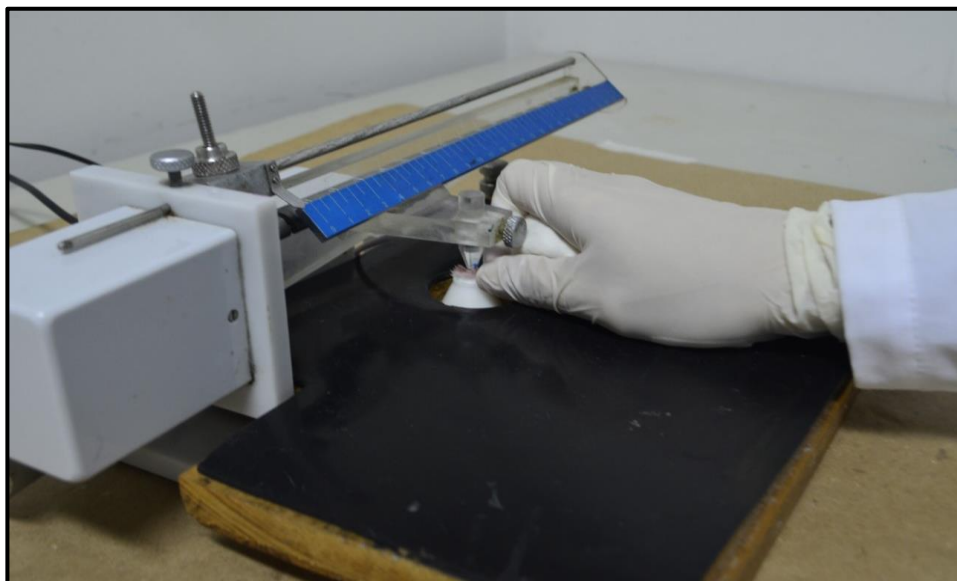


Figura 12- Camundongo sendo submetido ao teste de retirada de pata.

Materiais e Métodos

Descrição do teste

No teste, o animal é cuidadosamente mantido imobilizado sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste é colocada, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho. A parte compressora consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se apoia a região dorsal da pata do animal e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² em sua extremidade, por meio da qual é aplicado uma pressão na superfície plantar da pata do animal (**figura 13**). A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/s (o que equivale dizer que a cada centímetro percorrido na régua há o acréscimo de 10 gramas à pata do animal), mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador.

Ao observar a resposta nociceptiva do animal (reflexo de retirada da pata), o experimentador desacionará o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g).

Cabe ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. Esse procedimento é importante para permitir uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deve permanecer quieto, evitando que desenvolva uma reação de fuga simplesmente devido à situação estranha imposta a ele.

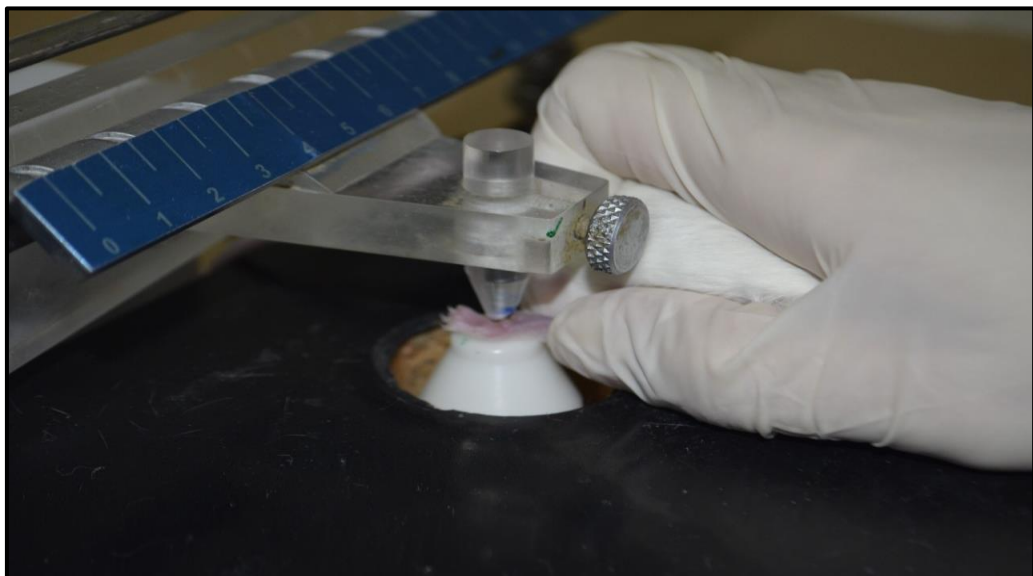


Figura 13 - Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.

4.4 Teste de avaliação da Coordenação Motora

A coordenação motora foi avaliada pelo tempo em que o animal passou caminhando sobre uma haste giratória (Dunham & Miya, 1957) durante 2 minutos (tempo de corte). O aparelho utilizado (Ugo Basile mod. 7600) consta de uma haste giratória horizontal, revestida de plástico antideslizante, suspensa a uma altura de 25-30 cm e com rotação constante (16 rpm) (figura 14). Os animais foram submetidos à três sessões diárias de treinamento, nos três dias que antecederam os experimentos, totalizando 9 sessões de treinamento. A coordenação motora foi avaliada imediatamente antes (basal), 10, 20, 30, 60 e 120 minutos após o tratamento com veículo (Tocrisolve 5% em salina, s.c.), canabidiol (30 μ g/pata, s.c.), diazepam (4 mg/kg, i.p.) ou xilazina (16mg/kg, s.c. dorsal). É importante ressaltar que para esse experimento os animais não foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático, pois a técnica inviabilizaria a permanência dos animais sobre a haste, sendo o objetivo do teste verificar se a dose de canabidiol usada induziria alteração da coordenação motora nos animais.

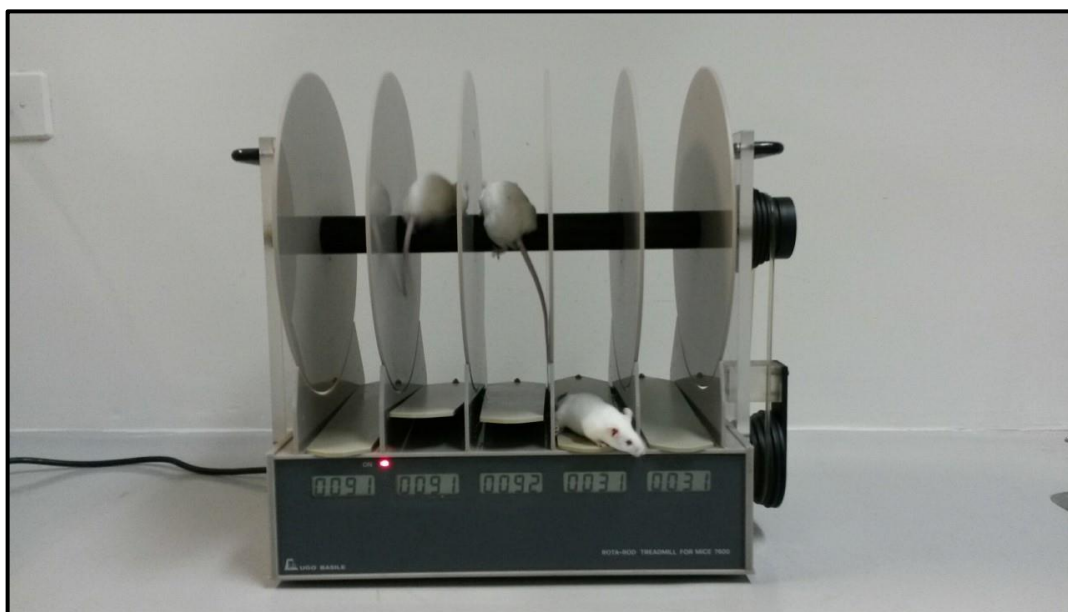


Figura 14 – Teste de avaliação da coordenação motora.

4.5 Purificação e quantificação de endocanabinoides através da técnica de LC-MS

O canabidiol (30 µg/pata) foi administrado na pata posterior direita de animais naive e neuropáticos. Após 15 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o tecido da superfície plantar das patas posteriores direitas dos camundongos foi coletado. A extração, purificação e quantificação de endocanabinoides a partir dos tecidos de coxins plantares foram realizadas como descrito anteriormente (Bisogno et al., 1997; Di Marzo et al., 2001). Primeiro, os coxins plantares foram homogeneizados com pistilos plásticos descartáveis, em solução contendo clorofórmio / metanol / Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (2: 1: 1, v / v). Após serem sonicadas por 8 minutos, foram adicionados às amostras as soluções standarts [10 µl de solução contendo 2-AG (50 picomoles de d⁵ 2-AG) e 10 µl de solução mix contendo AEA, PEA e OEA (5 picomoles de d⁸ AEA + 50 picomoles d⁴ PEA + 50 picomoles d² OEA)]. Foram realizadas 4 extrações adicionando 600 µl de clorofórmio às amostras. A fase orgânica foi separada da fase aquosa por centrifugação. O extrato pré-purificado foi colocado em câmeras abertas de cromatografia em colunas de sílica gel, eluída com concentrações crescentes de metanol em clorofórmio (1:99, 1:9, 1:1).

Após a extração e a purificação, frações de amostras foram submetidas à análise de cromatografia líquida por ionização química em pressão atmosférica e espectrometria de massa (LC-APCI-MS) através da utilização de um aparelho Shimadzu de LC (LC-10ADVP) acoplado a um aparelho Shimadzu (LCMS-2020). O software usado para análise foi o LabSolution, que permite fazer a integração entre as amostras, de modo tal que se possa fazer uma razão entre a área dos endocanabinoides e a área dos canabinoides “d” alterados (standarts), podendo assim, calcular a concentração do endógeno explorando a quantidade de standart adicionado. Essa razão fornece a quantidade em picomol de standart, no interior das amostras. Depois se deve normalizar quantidade de tecido da amostra (µg) e/ou de lipídios extraídos (µg). A quantidade de endocanabinoides foi expressa em picomoles por miligrama de peso tecido. A dosagem de endocanabinoides foi realizada no Istituto di Chimica Biomoleculare del Consiglio Nazionale delle Ricerche, em Pozzuoli, Nápoles, Itália.

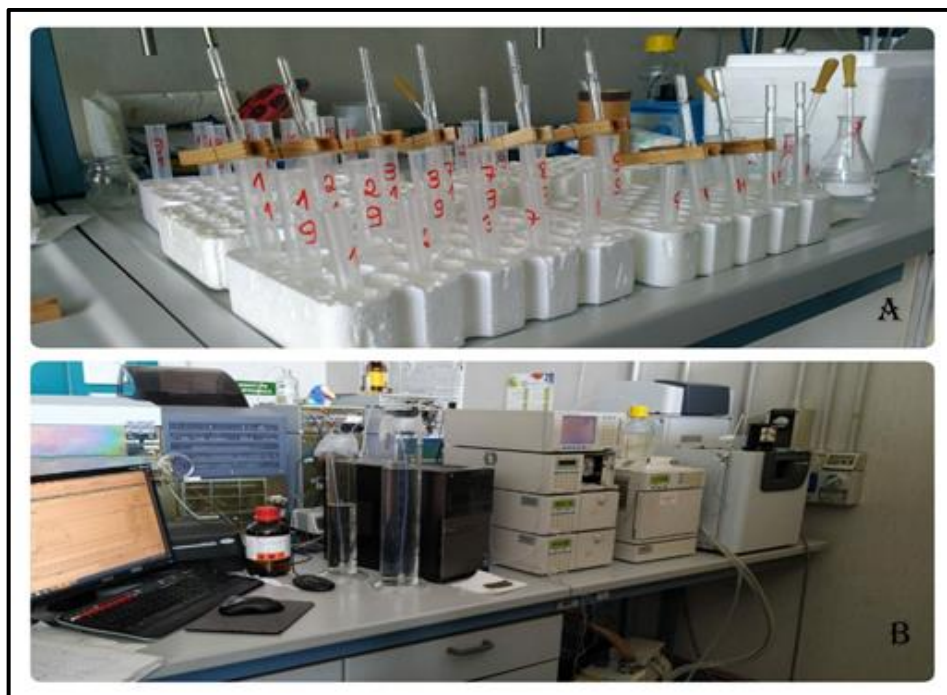


Figura 15 - Purificação das amostras em colunas de sílica gel (A); Aparelhagem para realização da cromatografia, espectrometria de massas e análise por software (B).

4.6 Quantificação da produção de Óxido Nítrico a partir da produção de nitrito pelo método de Reação de Griess

A dosagem de nitrito (NO_2^-) foi realizada usando a Reação de Griess (Green *et al.*, 1982). O canabidiol (30 $\mu\text{g/pata}$) foi administrado na pata posterior direita de animais naive e neuropáticos. Após 15 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o tecido da superfície plantar das patas posteriores direitas dos camundongos foi coletado. As amostras foram homogeneizadas individualmente em solução tampão (20 μL de tampão para cada 1 mg de tecido) contendo Tris-HCl 30 mM, pH 6,8, EDTA 5 mM, sacarose 250 mM, KCl 30 mM, β -mercaptoetanol a 2%, PMSF (100 $\mu\text{g/mL}$), benzamidina (5 $\mu\text{g/mL}$), aprotinina (2 $\mu\text{g/ml}$) e leupeptina (2 $\mu\text{g/ml}$). As amostras foram então centrifugadas (12.000 rpm, 4°C, 15 min).

Posteriormente, 100 μL do sobrenadante foi adicionado em cada poço de uma placa de ELISA, seguido por 100 μL de reagente de Griess (2% [p/v] de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% [v/v] e 0,2% [p/v] naftiltilenodiamina). As curvas de referência padrão de nitrito foram feitas com nitrito de sódio em água destilada em concentrações de 100, 50, 25,

Materiais e Métodos

12,5, 6,25, 3,13 e 1,56 μM . Após 10 minutos de desenvolvimento de cor à temperatura ambiente, a absorbância foi medida com um leitor de microplacas (Titertek Multiskan MCC/340; Flow Laboratories, McLean, VA) a um comprimento de onda de 540 nm.

A quantidade de nitrito foi normalizada utilizando a quantidade de proteína em cada amostra. Para tanto, em outra placa de ELISA foram adicionados em cada poço 5 μl do sobrenadante diluído 20 vezes, seguido por 250 μL de reagente de Bradford. Para a curva padrão de proteína foi utilizada a albumina nas concentrações de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg/mL. Após 15 minutos de desenvolvimento de cor à temperatura ambiente, a absorbância foi medida com um leitor de microplacas (Titertek Multiskan MCC/340; Flow Laboratories, McLean, VA) a um comprimento de onda de 595 nm. Tanto para o reagente de Griess quanto para o reagente de Bradford foram realizados ensaios em duplicatas.

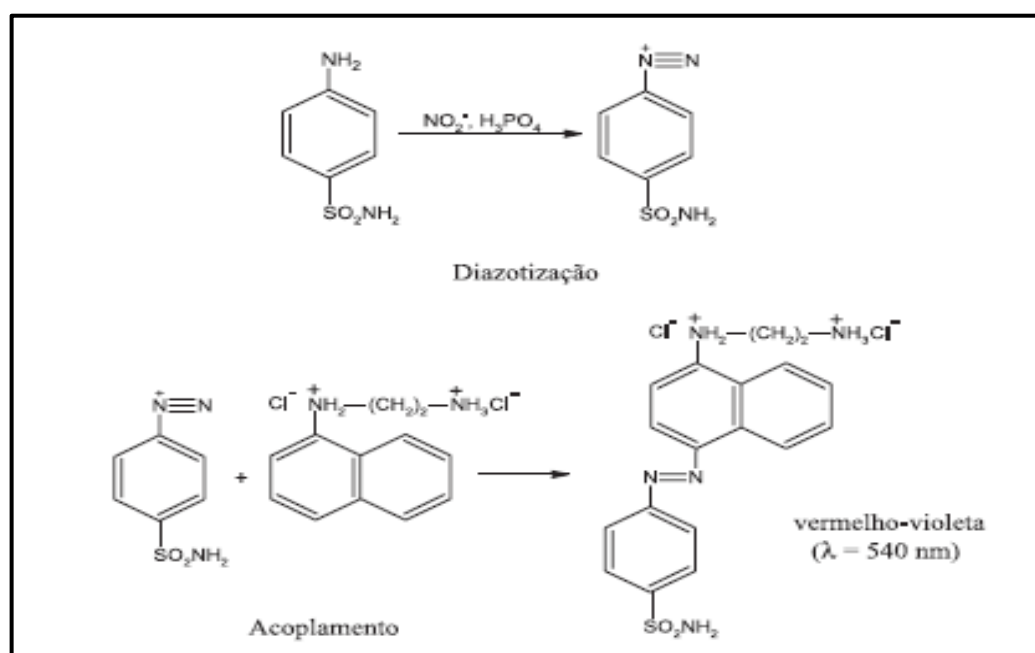


Figura 16 – Reações químicas envolvidas na Reação de Griess.

Na primeira etapa da reação de Griess, o nitrito, em meio ácido, reage com a sulfanilamida formando um íon diazônio. Na segunda etapa esse íon se liga com a naftil-etilendiamina para formar um corante azo vermelho-violeta, solúvel em água (Fonte: Adaptado de Campos et al., 2006).

4.7 - Drogas

4.7.1 Substância antinociceptiva sob teste

- Canabidiol (THC Pharm, pureza >98%) dissolvido em Tocrisolve 5% em em solução aquosa estéril de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (solução salina fisiológica);

OBS: O Canabidiol usado em todo este trabalho foi gentilmente doado pelo professor Francisco Silveira Guimarães (FMRP/USP).

4.7.2 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica

- AM251 [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil) pirazol-3 carboxamida] (Tocris), antagonista dos receptores CB₁ canabinoides, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%;

- AM630 [6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) etil]-1H-indol-3 il] (4metoxifenil) metanona (Tocris), antagonista dos receptores CB₂ canabinoides, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%;

- MAFP (metil araquidonil fluorofosfonato) (ácido (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-eicosatetraenil-fosfonofluorídrico metil ester) (Tocris), inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH, fatty acid amide hydrolase), dissolvido em etanol 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de etanol 3%;

- VDM11 [(5Z, 8Z, 11Z, 14Z) - N-(4-Hidroxi-2-metilfenil) -5, 8, 11,14-eicosatetraenamida] (Tocris), inibidor do transportador de anandamida, dissolvido em solução de tocrisolve a 10% em solução salina;

- JZL184 (ácido 4 - [Bis (1,3-benzodioxo-5-il) hidroximetil] - 1-piperidinocarboxílico 4 - nitrofenil éster) (Tocris), inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), dissolvido em solução salina.

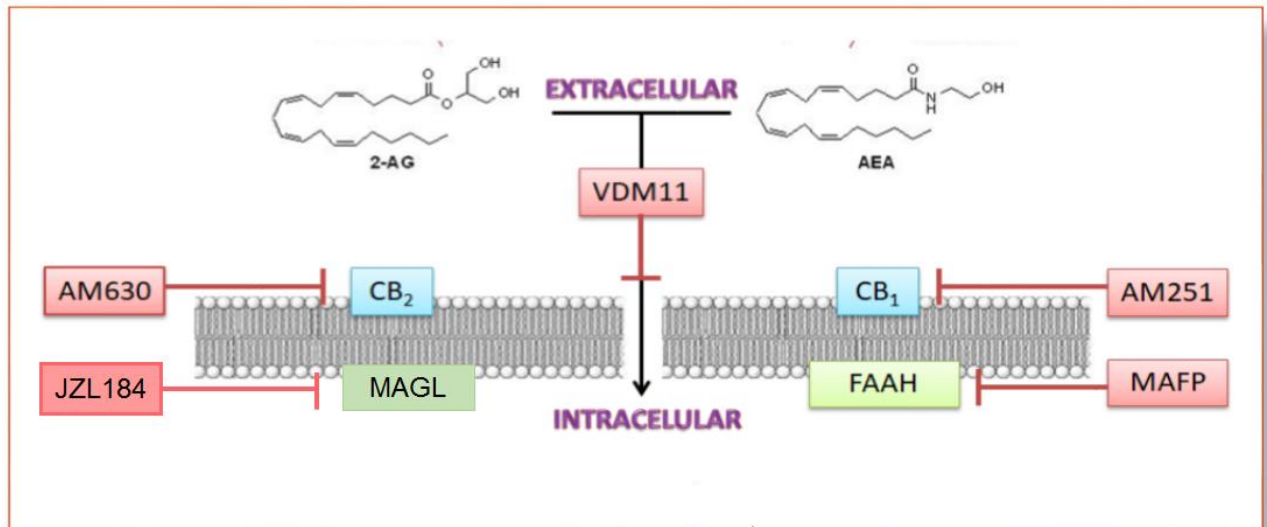


Figura 17 – Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via canabinoidérgica

4.7.3 Fármacos envolvidos na via opioidérgica

- Naloxona (Sigma), antagonista não seletivo de receptores opioides, dissolvida em solução salina;
- Clocinnamox (Tocris), antagonista seletivo dos receptores μ opioides, dissolvido em solução salina;
- Naltrindole (Tocris), antagonista seletivo dos receptores δ opioides, dissolvido em solução salina;
- Nor-binaltorfimina (Tocris), antagonista seletivo dos receptores κ opioides, dissolvida em solução salina;
- Bestatina (Tocris), inibidor da enzima aminopeptidase N, enzima que degrada peptídeos opioides endógenos, dissolvida em solução salina.

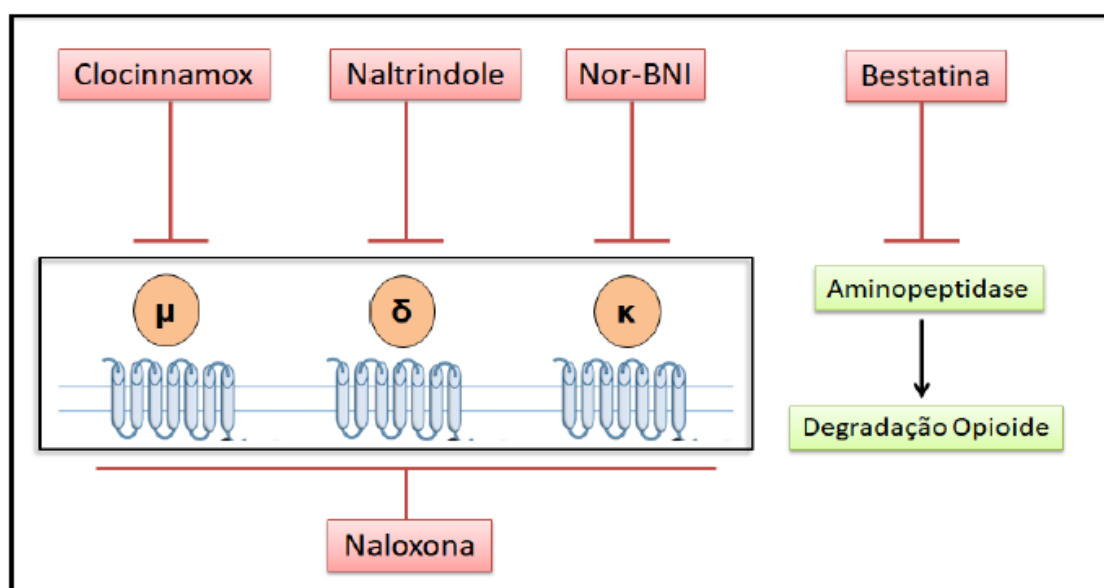


Figura 18– Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via opioidérgica

4.7.4 Fármacos envolvidos na via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPC/K_{ATP}

- AS605240 (Sigma), inibidor seletivo da enzima PI3K gama, dissolvido em solução salina;
- Rapamicina (Sigma), inibidor da proteína mTOR, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%);
- L-NOArg (N^G-Nitro-L-arginina) (RBI), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), dissolvido em solução salina;
- ODQ (1*H*-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-*a*]quinoxalina-1-ona) (RBI), inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%);
- Glibenclamida (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), dissolvida em solução salina e Tween 20 a 1%.

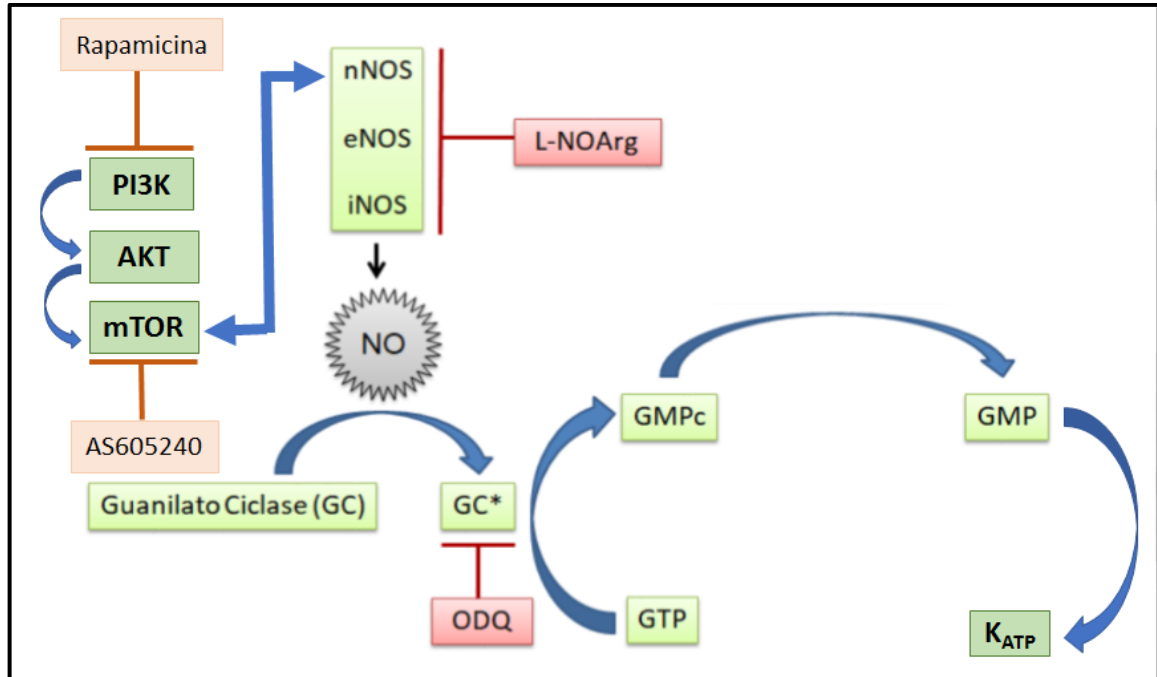


Figura 19 – Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP}

4.7.5 Fármacos antagonistas dos receptores 5-HT_{1A} e TRPV1

- NAN 190 (Tocris) antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%;
- SB-366791 (Tocris) antagonista seletivo de TRPV1, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%.

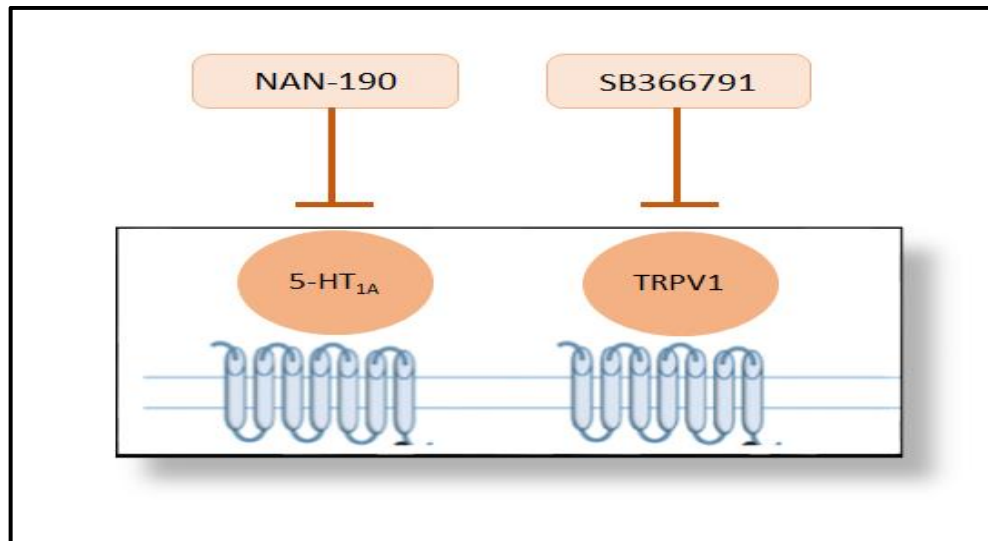


Figura 20 – Esquema do mecanismo de ação dos fármacos que agem nos receptores 5-HT_{1A} e TRPV1

4.8 Administração das Drogas

Todas as drogas foram administradas por via intraplantar na pata posterior direita dos camundongos (**figura 20A**), num volume de 20 μ l para todas as drogas, com exceção do diazepam e xilazina que foram administrados pela via intraperitoneal (**figura 20B**) e subcutânea dorsal (**figura 20C**), respectivamente, num volume de 100 μ l.



Figura 21 – Vias de administração das drogas

4.9 Procedimento Experimental

O limiar nociceptivo de cada animal foi determinado antes e após da constrição do nervo ciático, bem como antes da administração de cada droga. O limiar é sempre medido três vezes, sendo o resultado a média dessas medidas.

As doses e os tempos de injeção das drogas utilizadas foram baseados em dados da literatura e em experimentos preliminares (pilotos) de curva dose-resposta e tempo-efeito com cada agente a ser utilizado (Pacheco & Duarte, 2005; Costa et al., 2007; Romero et al., 2012 e 2013; Salat & Filipek, 2015; Diniz et al., 2015; Almeida-Santos et al., 2015). Os protocolos de administração foram registrados nas legendas de todos os gráficos.

Os antagonistas dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂ (AM251 e AM630, respectivamente) bem como os inibidores da degradação e recaptção de anandamida (MAFP e VDM11, respectivamente) e o inibidor da degradação de 2-AG (JZL184) foram administrados 10 minutos antes do canabidiol.

Os antagonistas dos receptores μ , δ e κ opioides (naloxona, clocinnamox, naltrindole e nor-binaltorfimina, respectivamente) bem como o inibidor de encefalinases (bestatina) foram administrados 30 minutos antes do canabidiol.

Os inibidores seletivos das enzimas PI3K γ e mTOR (AS-605240 e rapamicina, respectivamente), o inibidor não seletivo das isoformas da enzima NO-sintase (L-NOArg), bem como o inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) foram administrados 30 minutos antes do canabidiol. O bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP (glibenclamida) foi administrado 5 minutos antes da administração do canabidiol.

O antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (NAN-190) foi administrado 15 minutos antes da administração do canabidiol e o antagonista seletivo dos receptores TPV1(SB-366791) foi co-administrado com o canabidiol.

4.10 Análise Estatística

Para análise dos dados foi usado o software GraphPad Prism versão 8.0.2. Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) das medidas e submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni, para verificar a significância das diferenças entre as médias (comparações múltiplas), sendo consideradas significantes quando os valores de p foram menores que 0,05. Para a dosagem de endocanabinoides e nitrito foi utilizado o *two-way* ANOVA com o pós-teste de Newman-Keuls, para múltiplas comparações, sendo consideradas significantes quando os valores de p foram menores que 0,05.

5. Resultados

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação temporal da dor neuropática na pata de camundongos induzida pela constrição do nervo ciático

A fim de avaliar a dinâmica da indução da dor neuropática, foram realizadas, durante 21 dias consecutivos, medidas dos limiares nociceptivos na pata posterior direita dos animais que foram operados. Também foram realizadas medidas dos limiares nociceptivos dos grupos controles, grupo naive, que são os animais que não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento cirúrgico; grupo sham com fio, que são os animais que foram submetidos à cirurgia, foi introduzido o fio mas sem realizar as ligaduras de constrição, e o grupo sham sem fio, que são os animais que foram submetidos à cirurgia, mas não houve introdução do fio. Foi observado que no 3º dia de constrição os animais apresentaram um efeito hipoalгésico, voltando ao limiar basal no 5º dia, com diminuição do limiar nociceptivo a partir do 6º dia e estabilização da resposta hiperalгésica no 11º dia, como mostra o **gráfico 1**. Os grupos sham com e sem fio não demonstraram diferença estatística quando comparado com o grupo naive, e também não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si. Todos os outros experimentos foram realizados 15 dias após a cirurgia de constrição do nervo ciático.

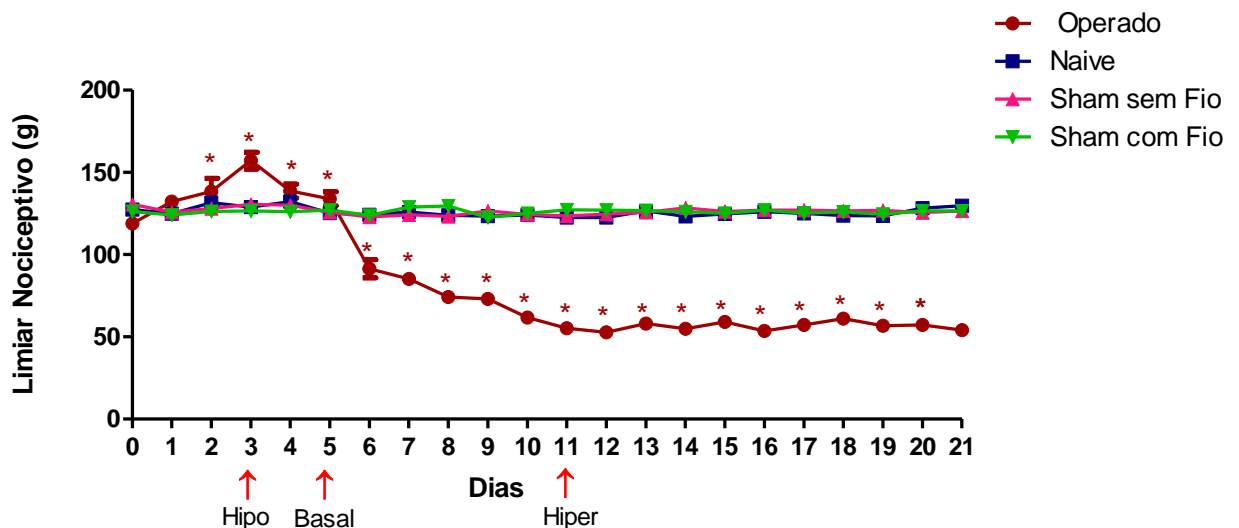


Gráfico 1 - Avaliação temporal da dor neuropática na pata de camundongos após constrição do nervo ciático. Cada linha representa a média \pm E.P.M. referentes ao $n = 5$ de animais. * indica uma diferença estatística

Resultados

significativa em relação ao grupo controle sham com fio ($P < 0,05$, ANOVA por análise de medidas repetidas + pós-teste Bonferroni).

5.2 - Efeito antinociceptivo periférico do canabidiol

Para avaliar o possível efeito antinociceptivo periférico induzido pelo canabidiol, fizemos experimentos para determinar as curvas de tempo-efeito e dose resposta da antinocicepção induzida por essa droga. A administração de canabidiol (5, 10 e 30 μg) na pata posterior direita induziu resposta antinociceptiva frente à hiperalgesia induzida pela constrição do nervo ciático, tendo seu pico de ação 15 minutos após a administração do CBD. A dose de 30 μg /pata produziu maior resposta antinociceptiva (**gráfico 2**), sendo essa dose usada nos experimentos posteriores, com exceção daqueles experimentos em que avaliamos a potencialização de efeitos das drogas; nesses experimentos usamos a dose de 5 μg /pata. Nos experimentos seguintes, o efeito do canabidiol foi avaliado 15 minutos após sua administração.

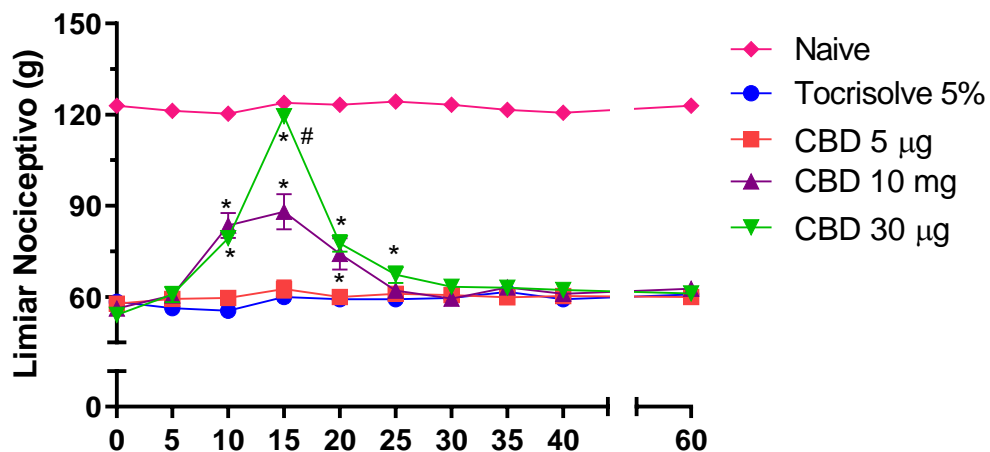


Gráfico 2 - Efeito do canabidiol no limiar nociceptivo em camundongos frente a hiperalgesia induzida 15 dias após a constrição do nervo ciático. O canabidiol foi administrado na pata posterior direita e a resposta nociceptiva foi medida durante 60 minutos através do teste de compressão da pata tal como descrito em Materiais e Métodos. Cada linha representa a média \pm E.P.M. referentes ao $n = 5$ de animais. * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Tocrisolve 5% e ao grupo CBD 10 μg , respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

5.3 - Exclusão do efeito sistêmico

Em seguida, para exclusão de um possível efeito sistêmico, o canabidiol, ou seu veículo, foi administrado na pata posterior direita em um grupo, e na pata posterior esquerda em outro

Resultados

grupo. As medidas do limiar nociceptivo foram feitas apenas da pata posterior direita, antes e 15 minutos após a administração do canabidiol (**gráfico 3**). Esses resultados demonstram que o canabidiol induziu efeito antinociceptivo restrito à pata tratada, uma vez que não alterou a hiperalgesia na pata contralateral, sugerindo somente um efeito local.

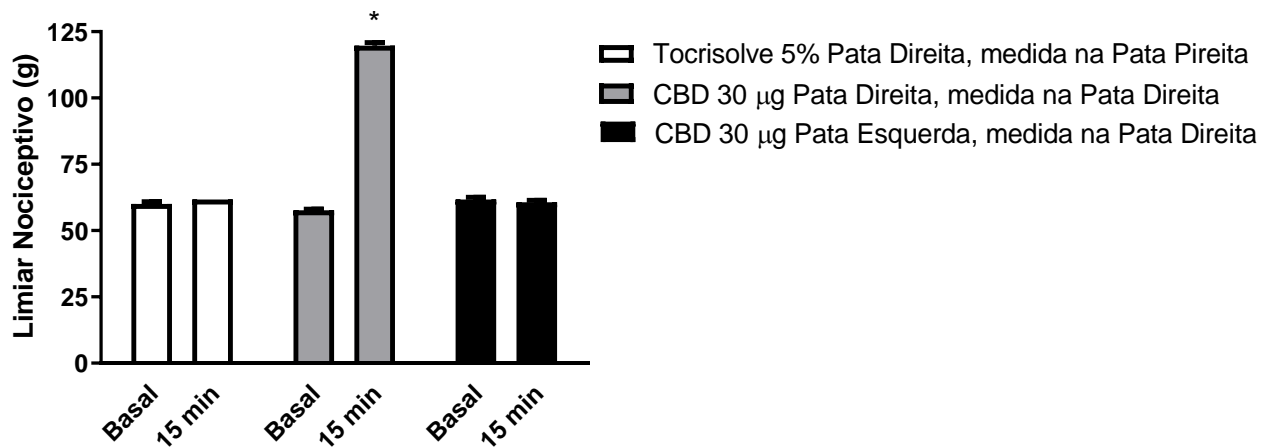


Gráfico 3 - Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico induzido pelo canabidiol. Canabidiol (30 µg) foi administrado na pata posterior direita em um grupo, e na pata posterior esquerda em outro grupo. Tocrisolve, como controle do canabidiol, foi administrado na pata posterior direita dos animais. A resposta antinociceptiva foi medida na pata posterior direita em todos os grupos. Cada coluna representa a média ± E.P.M. (n = 5). * indica uma diferença estatística significativa em relação ao grupo controle Tocrisolve 5% Pata Direita ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

5.4 – Avaliação da coordenação motora

Nosso próximo objetivo foi avaliar se o canabidiol na dose de 30 µg/pata induz alterações na coordenação motora. Utilizando o teste de Rota Rod verificamos que os animais tratados com canabidiol ou seu veículo (Tocrisolve 5%), não apresentaram nenhum tipo de alteração na coordenação motora; já o tratamento com os controles positivos diazepam (4 mg/kg, i.p.) e xilazina (16 mg/kg, s.c), drogas indutoras de relaxamento muscular com marcante alteração da coordenação motora (Young & Prielipp, 2001; Payen et al., 2007; William et al., 2001), por sua vez, reduziram significativamente o tempo de permanência dos animais sobre a haste giratória (**gráfico 4**), sugerindo a dose administrada de canabidiol não possui efeitos sedativos e/ou relaxantes nas doses utilizadas neste estudo.

Resultados

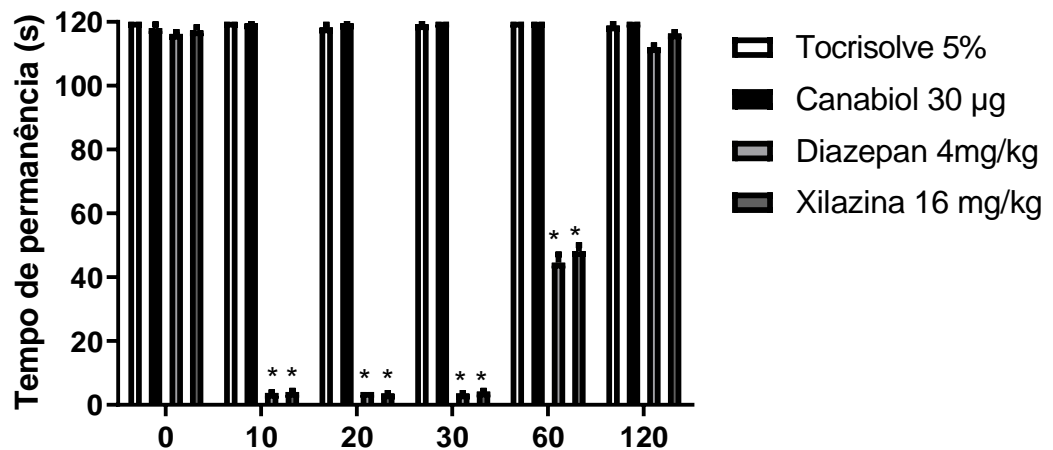


Gráfico 4 - Efeito da administração de canabidiol no teste de coordenação motora em camundongos. 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos após a administração das drogas o tempo de permanência sobre a haste giratória foi medido (s). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 5$). * indica uma diferença estatística significativa em relação ao grupo canabidiol 30 µg. ($P < 0,05$, ANOVA por análise de medidas repetidas + pós-teste Bonferroni).

5.5 – Participação do sistema canabinoide na antinocicepção induzida por canabidiol

Como mostrado nos **gráficos 5A e 5B**, o AM251 (80 µg/pata), antagonista dos receptores canabinoidérgicos CB₁ e o AM630 (100 µg/pata), antagonista dos receptores canabinoidérgicos CB₂, respectivamente, reverteram a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol (30 µg/pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático, sugerindo a participação desses receptores no evento estudado. Os antagonistas quando administrados sozinhos não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais.

Resultados

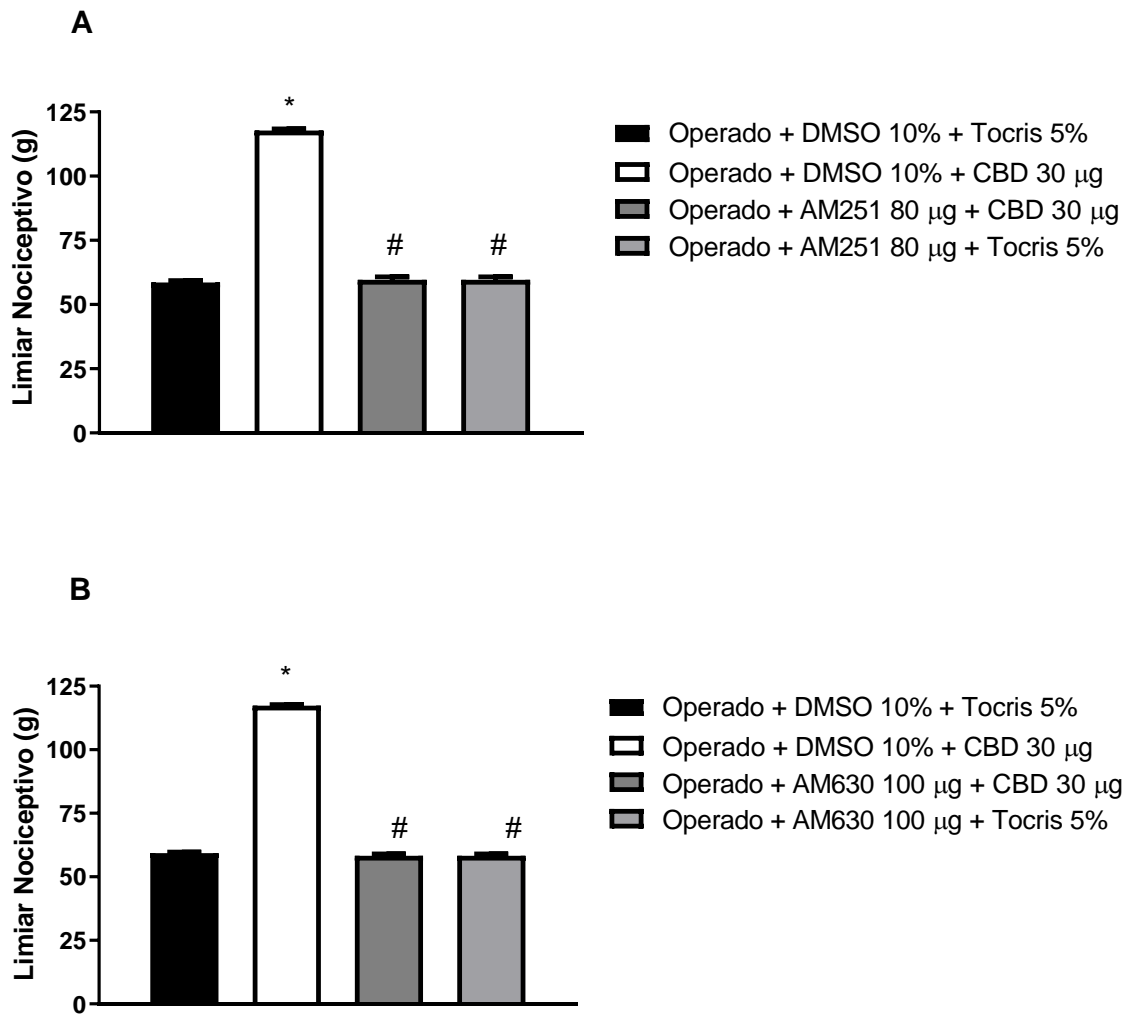


Gráfico 5 – Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de antagonistas dos receptores canabinoides. O AM251 (A) e o AM630 (B) foram administrados 10 minutos antes do canabidiol (30 µg/pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média ± E.P.M. (n = 5). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + DMSO 10% + Tocris 5% e Operado + DMSO 10% + CBD 30 µg injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Como mostram os **gráficos 6A, 6B e 6C**, respectivamente, o MAFP (0,5 µg/pata), inibidor da enzima FAAH que degrada o endocanabinoide anandamida, e o JZL184 (3,75 µg/pata), inibidor da enzima MAGL que degrada o endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG), bem como o VDM11, inibidor da recaptação da anandamida, potencializaram a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol em sua menor dose (5 µg/pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Os inibidores quando administrados sozinhos não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais.

Resultados

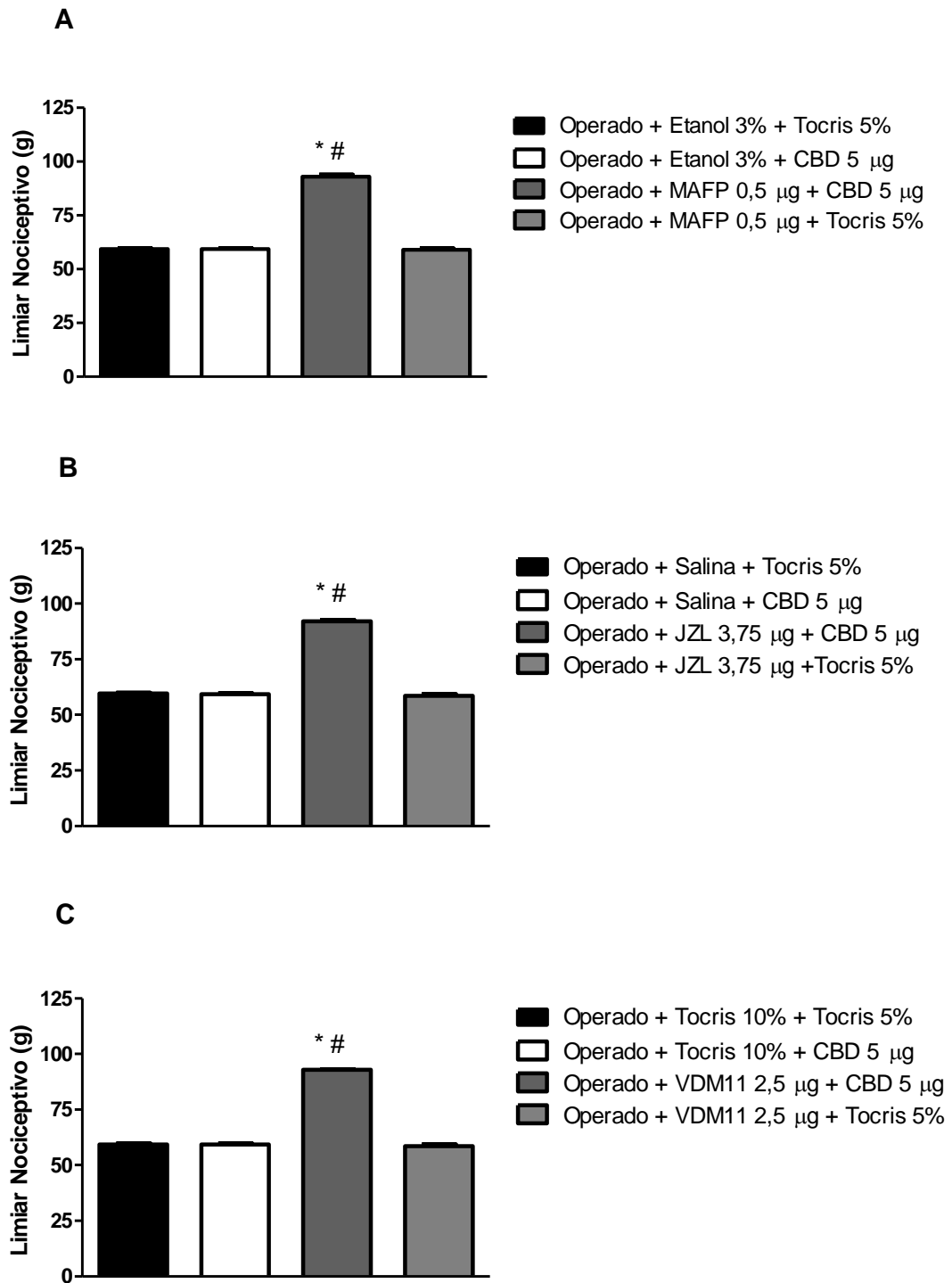


Gráfico 6 – Administração intraplantar de inibidores enzimáticos potencializa o efeito antinociceptivo periférico do canabidiol. O MAFP (A), o JZL184 (B) e o VDM11 (C) foram administrados 10 minutos antes do canabidiol (5µg/ pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n = 5). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + Etanol 3% + Tocris 5% e Operado + Etanol 3% + CBD 5 µg injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Resultados

Como mostra o **gráfico 7**, através da técnica biomolecular de purificação e quantificação de endocanabinoides, a indução da neuropatia aumentou os níveis endógenos de anandamida e a administração do canabidiol diminuiu os níveis deste endocanabinoide (**figura A**). Não houve alteração dos níveis dos endocanabinoides 2 araquidonoil glicerol (**figura B**), palmitoil etanolamida (**figura C**), e oleil etanolamida (**figura D**), quando comparado com o grupo operado.

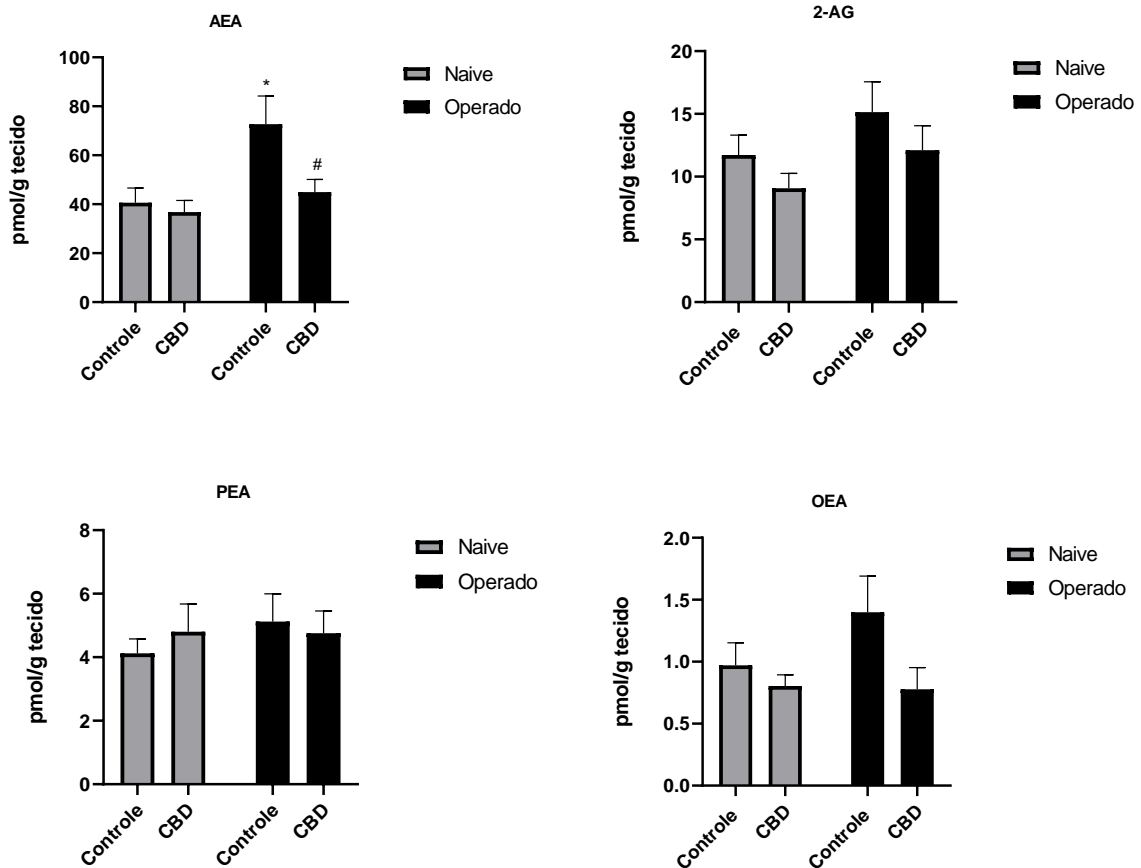


Gráfico 7 – Dosagem de endocanabinoides através da técnica LC-MS. A dosagem foi realizada a partir de coxins plantares de camundongos de acordo com os respectivos grupos em animais não operados ou operados com 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 5$). * e # indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo Naive Controle e Operado Controle, respectivamente. ($P < 0,05$, Two Way ANOVA + pós-teste Newman-Keuls).

Resultados

5.6 – Participação do sistema opioide na antinociceção induzida por canabidiol

Como mostrado nos **gráficos 8A e 8B**, respectivamente, a naloxona (50 µg/pata), antagonista não seletivo dos receptores opioides, e o clocinnamox (40 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores opioides tipo µ, reverteram a antinociceção periférica induzida pelo canabidiol (30 µg/ pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Os antagonistas quando administrados sozinhos não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais.

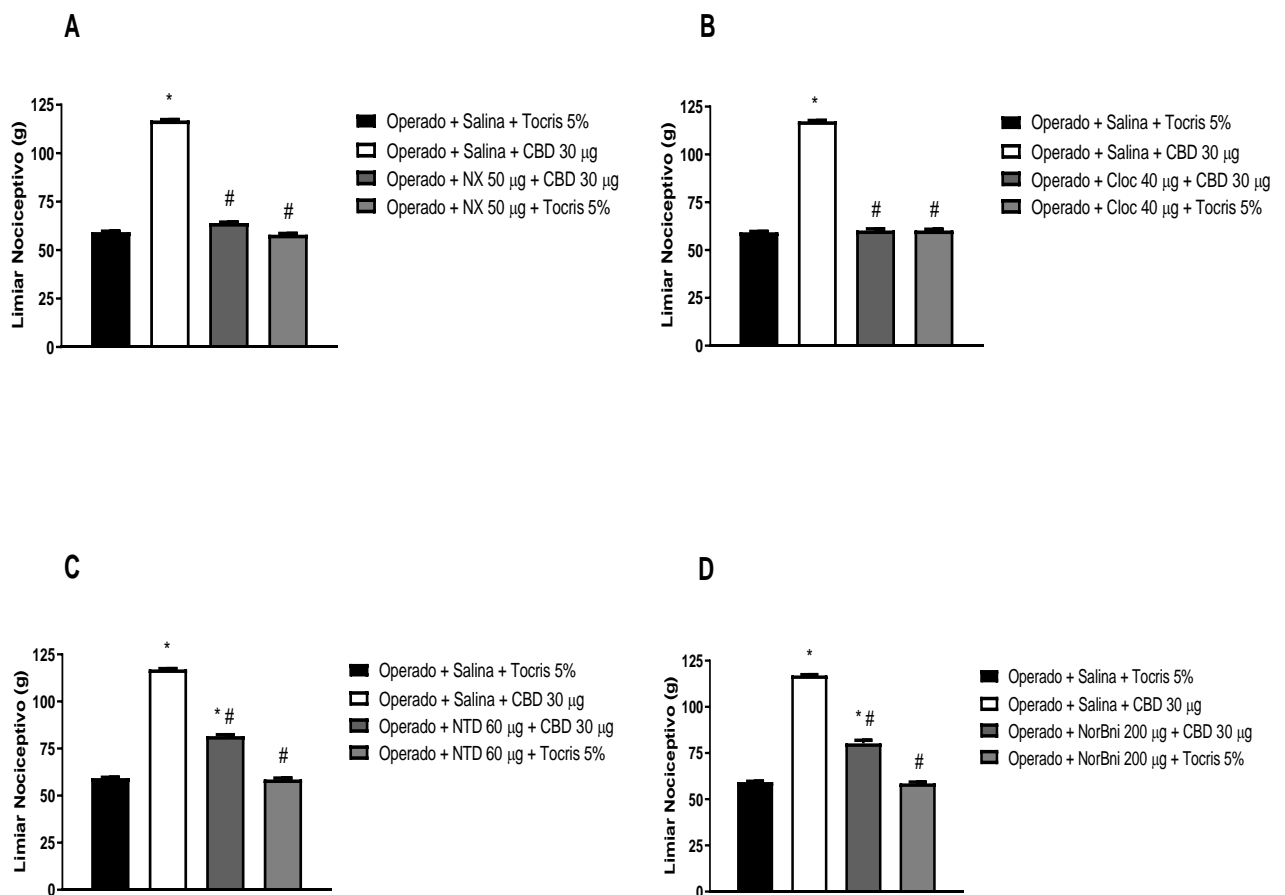


Gráfico 8 – Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de antagonistas seletivos dos receptores opioides. A naloxona (NX, **A**), o clocinnamox (Cloc, **B**) o naltrindole (NTD, **C**) e a nor-binaltorfimina (NorBni, **D**) foram administrados 30 minutos antes do canabidiol (30 µg/ pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média ± E.P.M. (n = 5). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + Salina + Tocris 5% e Operado + Salina + CBD 30 µg injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Resultados

Por outro lado, os **gráficos 8C e 8D** mostram que o naltrindole (60 $\mu\text{g/pata}$), antagonista seletivo dos receptores opioides tipo δ , e a nor-binaltorfimina (200 $\mu\text{g/pata}$), antagonista seletivo dos receptores opioide tipo κ , reverteram, de maneira parcial, a antinociceção periférica induzida pelo canabidiol (30 $\mu\text{g/pata}$) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Os antagonistas quando administrados sozinhos não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais.

Em nossos dados a bestatina (400 $\mu\text{g/pata}$), inibidor da enzima aminopeptidase N, envolvida na degradação de peptídeos opioides, potencializou a antinociceção periférica induzida pelo canabidiol em sua menor dose (5 $\mu\text{g/pata}$) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático (**gráfico 9**). A bestatina quando administrada sozinha não causou alteração no limiar nociceptivo dos animais.

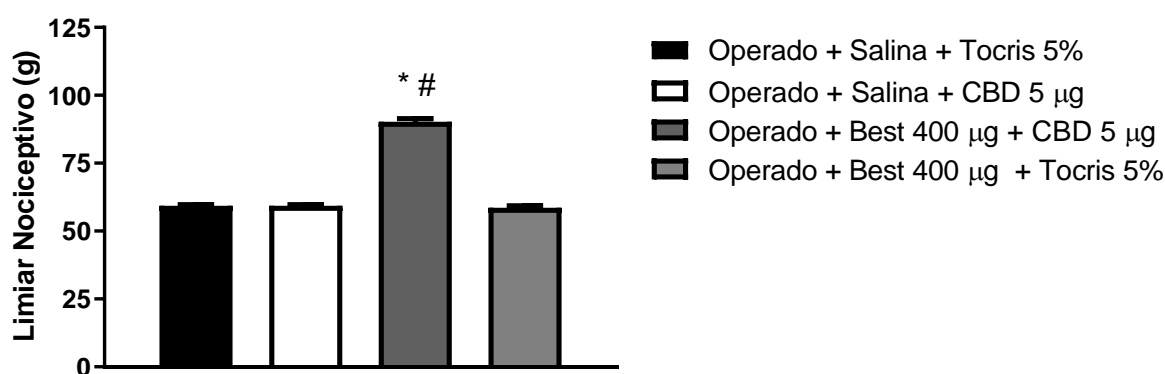


Gráfico 9 - Administração intraplantar de bestatina (Best) potencializa o efeito antinociceptivo periférico do canabidiol. A bestatina (μg) foi administrada 30 minutos antes do canabidiol (5 $\mu\text{g/pata}$) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 5$). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + Salina + Tocris 5% e Operado + Salina + CBD 5 μg injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

5.7 - Participação da via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPC/K_{ATP} na antinociceção induzida por canabidiol

O AS-605240, inibidor seletivo da enzima PI3K gama, e a rapamicina, inibidor seletivo da enzima mTOR, também reverteram o efeito antinociceptivo periférico induzido pelo canabidiol nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático, como mostram os **gráficos 10A e 10B**, respectivamente. Os inibidores quando administrados sozinhos não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais.

Resultados

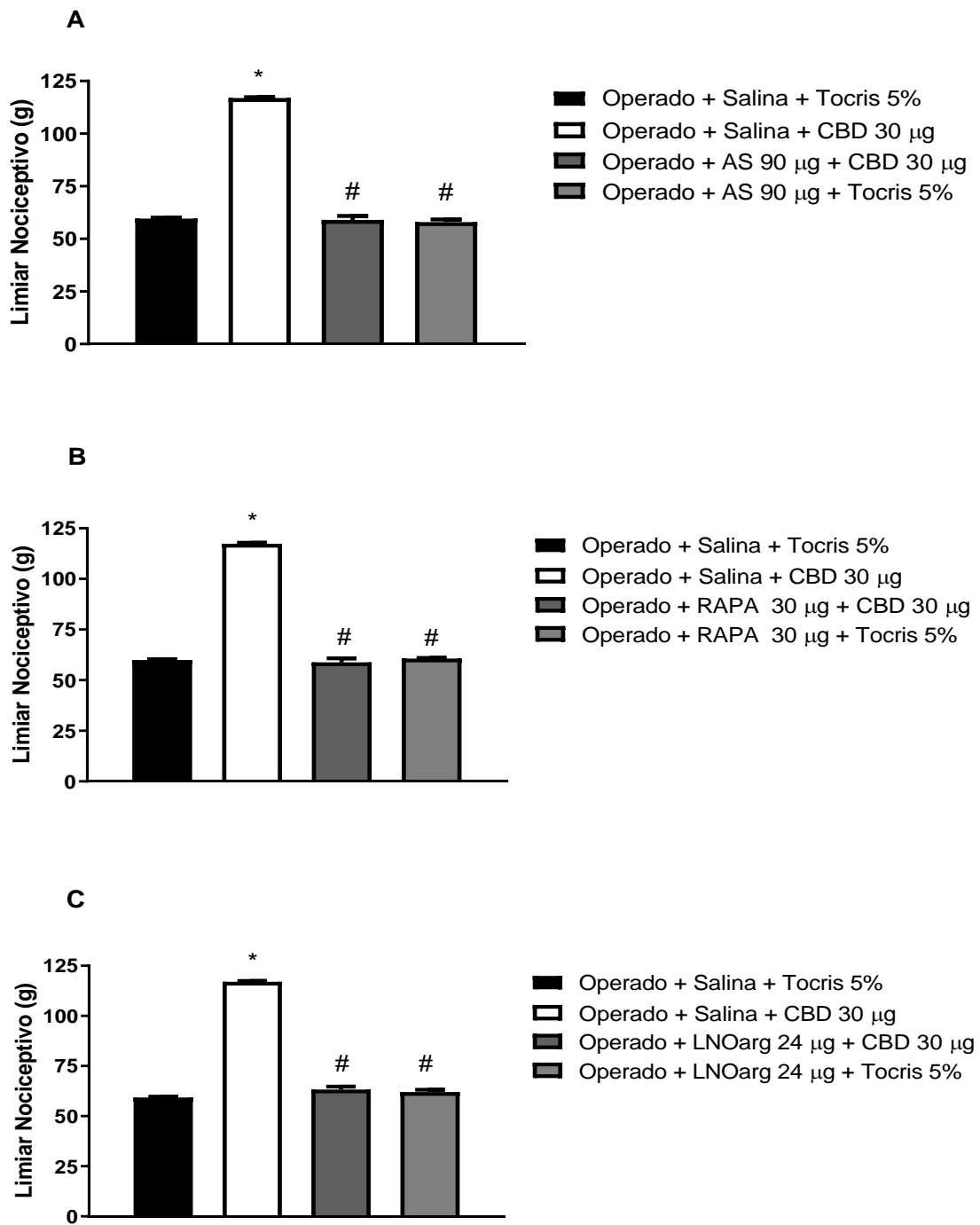


Gráfico 10 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de inibidores enzimáticos. O AS (A) e a RAPA (B) e o L-NOarg (C) foram administrados 30 minutos antes do canabidiol (30 µg/pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média ± E.P.M. (n = 5). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + Salina + Tocris 5% e Operado + Salina + CBD 30 µg injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Resultados

O **gráfico 10C** mostra que o L-NOarg (50 µg), inibidor não seletivo da enzima NO-sintase, reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol (30 µg/ pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático.

Utilizando o método de Reação de Griess (**gráfico 11**) foi demonstrado que tanto a administração do canabidiol quanto a neuropatia instalada aumentaram os níveis de nitrito, indicando indiretamente, aumento da produção de óxido nítrico. Não houve diferença dos níveis de nitrito entre os grupos Naive CDB, Operado Controle e Operado + CBD.

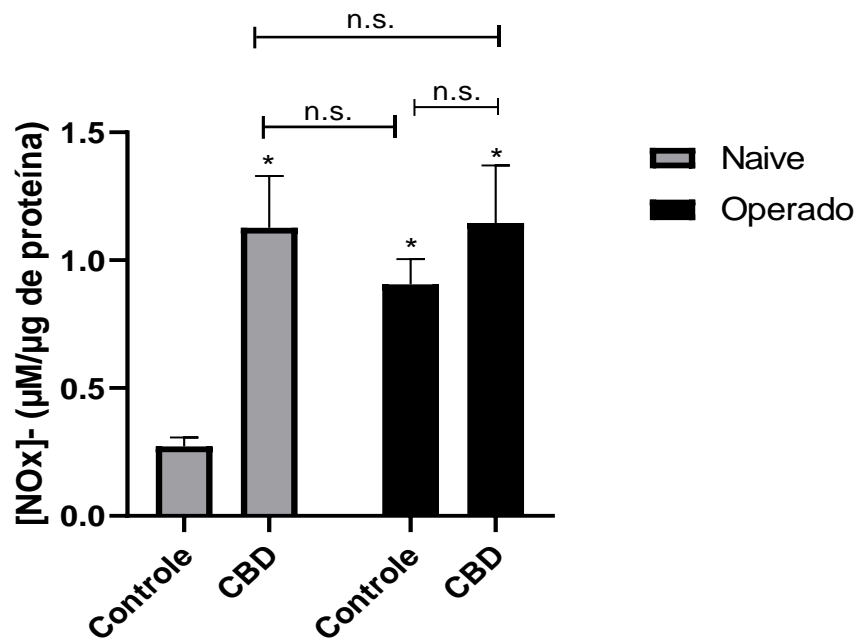


Gráfico 11 – Efeito da administração periférica do canabidiol nos os níveis de nitrito. O canabidiol (30 µg/ pata) foi injetado 15 minutos antes da eutanásia para coleta dos coxins plantares nos animais naive ou em animais com 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média ± E.P.M. (n = 8). * indica uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Naive Controle ($P < 0,05$, two way ANOVA + pós-teste Newman-Keuls).

Como mostrado no **gráfico 12**, o ODQ (100 µg), inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol (30 µg/ pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Tanto o L-Noarg quanto o ODQ quando administrados sozinhos não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais.

Resultados

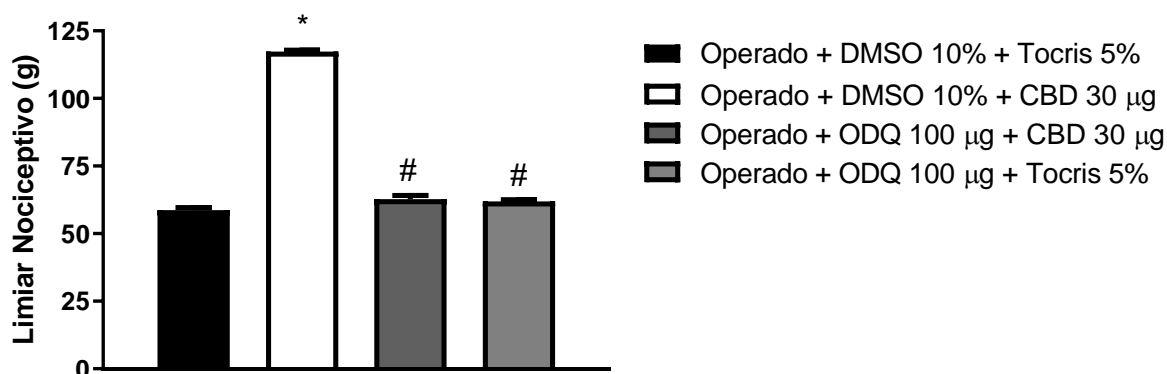


Gráfico 12 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de ODQ. O ODQ (μg) foi administrado 30 minutos antes do canabidiol ($30 \mu\text{g/}$ pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 5$). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + DMSO 10% + Tocris 5% e Operado + DMSO 10% + CBD $30 \mu\text{g}$ injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

A glibenclamida ($80 \mu\text{g}$), bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP, também reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol ($30 \mu\text{g}$) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático (**gráfico 13**), sugerindo a participação desse canal nesse evento. A glibenclamida quando administrada sozinha não causou alteração no limiar nociceptivo dos animais.

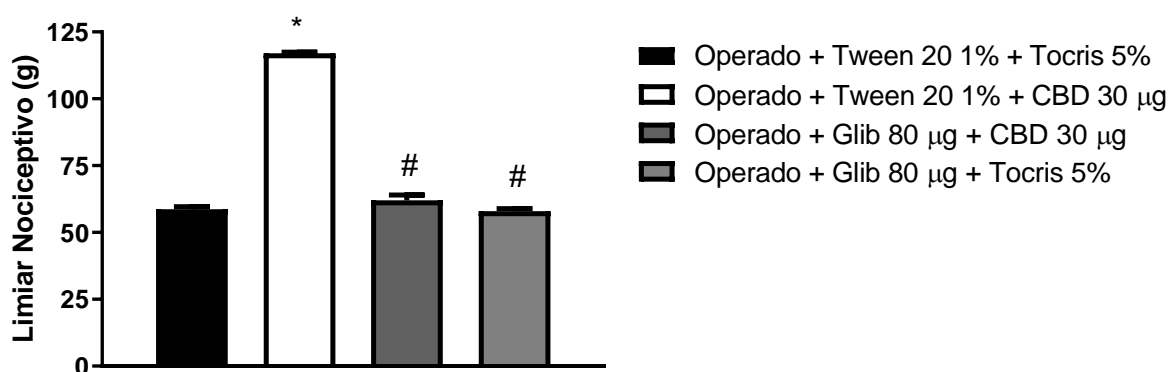


Gráfico 13 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de glibenclamida. A glibenclamida (μg) foi administrada 5 minutos antes do canabidiol ($30 \mu\text{g/}$ pata) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 5$). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + Tween 20 1% + Tocris 5% e Operado + Tween 20 1% + CBD $30 \mu\text{g}$ injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Resultados

5.8 - Participação dos receptores 5-HT_{1A} e TRPV1 na antinocicepção induzida por canabidiol

Como mostram os **gráficos 14A e 14B**, respectivamente, O NAN-190, antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, e o SB-366791, antagonista seletivo dos receptores TRPV1, reverteram, de maneira parcial, a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol (30 µg) nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Os antagonistas quando administrados sozinhos não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais.

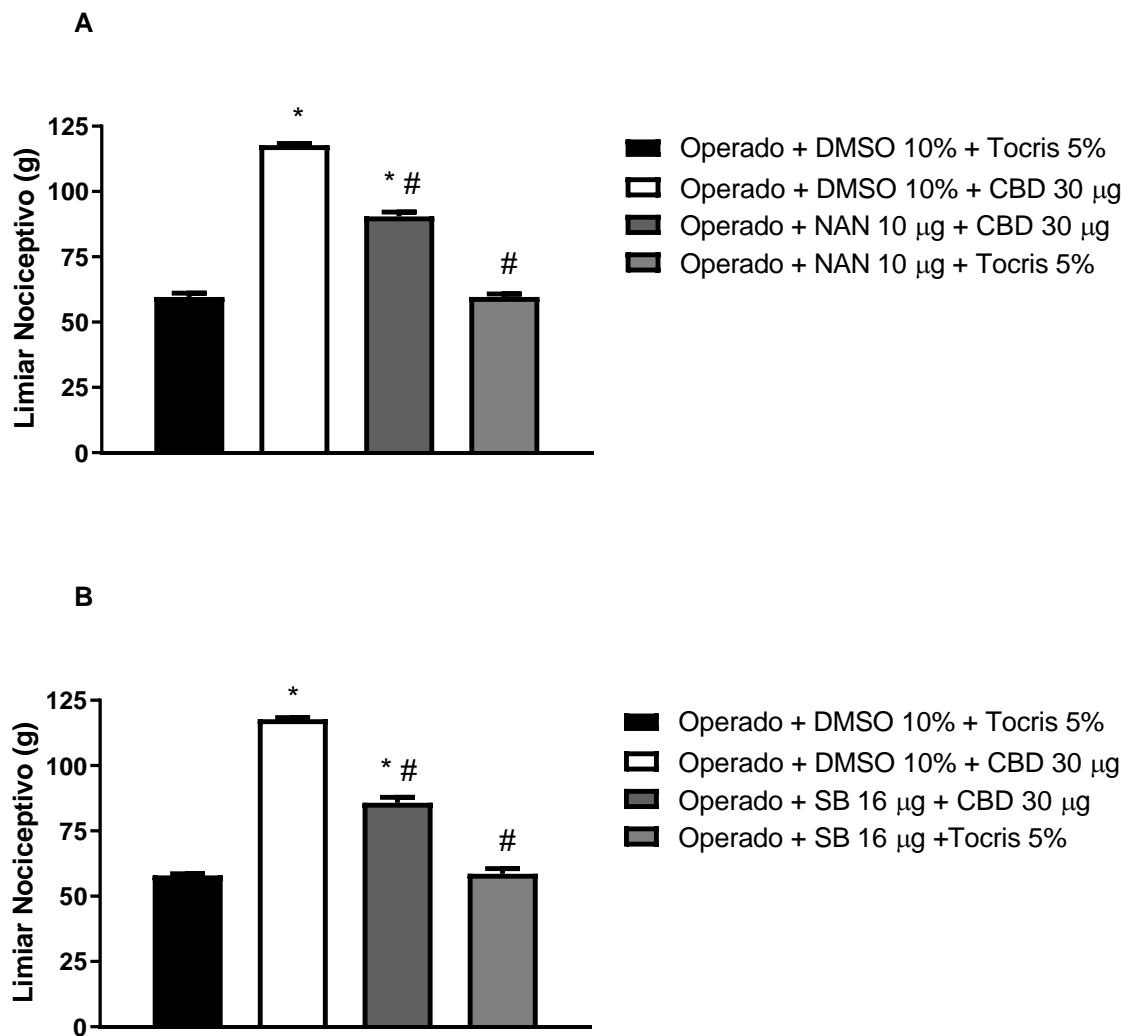


Gráfico 14 - Reversão do efeito antinociceptivo periférico do canabidiol pela administração intraplantar de antagonistas seletivos dos receptores 5-HT_{1A} e Vaniloide 1. O NAN (A) foi administrado 15 minutos antes do canabidiol (30 µg/pata) e o SB (B) foi co-administrado com o canabidiol (30 µg/pata), nos animais 15 dias após constrição do nervo ciático. Cada coluna representa a média ± E.P.M. (n = 5). * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo Operado + DMSO 10% + Tocris 5% e Operado + DMSO 10% + CBD 30 µg injetados como controles, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Entre os maiores desafios para o desenvolvimento de novos fármacos eficientes para o tratamento da dor neuropática está a diversidade de estados que a dor crônica se apresenta em humanos. Vários modelos animais de dor neuropática foram desenvolvidos com o objetivo de estudar a fisiologia da dor e sua transmissão, testar novos alvos para fármacos clássicos e ainda testar a eficácia de novas drogas. Entre os modelos de dor neuropática, os modelos cirúrgicos têm importância primordial na indução de estados de dor similares aos estados de dor encontrados em humanos, sendo os modelos mais comumente usados: constrição do nervo ciático (CNC), lesão parcial do nervo ciático (LPNC), ligadura no nervo espinhal (LNE), lesão nervosa poupada (LNP), avulsão do plexo braquial (APB), e trissecção do nervo ciático (TNC) (Challa, 2015).

Em nosso trabalho escolhemos o modelo de constrição do nervo ciático (CNC), que entre suas principais características, estão (Challa, 2015):

- a) Resulta em edema intraneural que estrangula o nervo, causando axotomia em muitos, mas não em todos os axônios;
- b) Imita os estados de neuropatia dolorosa periférica pós-traumática em humanos;
- c) A denervação parcial preserva algumas respostas comportamentais aos estímulos periféricos;
- d) Mostra sinais comportamentais de dor espontânea;
- e) Produz significativa redução das fibras A β e a grande maioria das fibras A δ são transecionadas, enquanto muitas fibras C permanecem intactas.

Nosso trabalho demonstra que a técnica empregada foi eficiente em induzir a dor neuropática, caracterizada pela redução do limiar nociceptivo com o passar dos dias e estabilização da resposta hiperalgésica no 11º dia após a cirurgia. Estes resultados são corroborados pelos trabalhos de Motta et al. (2011), que, em técnica semelhante, obtiveram perfil similar de resultados em experimentos realizados em ratos. O perfil de resposta no 3º dia de constrição parece se dever ao fato de que a constrição do nervo periférico resulta em uma imediata interrupção da condução dos impulsos nervosos, seguida de degeneração Walleriana (degeneração de axônios e suas bainhas de mielina após constrição do nervo), causando o quadro de hipoalgesia nos primeiros dias (Motta et al., 2011). Na medida em que o neuroma se desenvolve, o limiar nociceptivo diminui gradativamente até se instalar um quadro

Discussão

hiperalgésico (Zimmermann, 2001), sendo indicado por Welk et al. (1990) que o neuroma só estará completamente formado uma semana após a lesão nervosa, corroborando nossos dados que evidenciaram início de quadro hiperalgésico somente no sexto dia após a constrição. A comparação com o grupo em que o fio ficou apenas em contato com o nervo ciático, sem as ligaduras, isto é, sem compressão, mostram que o fio não foi capaz, por si só, de causar neuropatia, indicando que todo sinal observado nos resultados foi devido à constrição do nervo. Considerando essa informação, e com o intuito de evitar o sofrimento animal desnecessário, para todos os outros experimentos escolhemos os animais naïve como grupo controle.

Com exceção do teste de avaliação da coordenação motora, o período de 15º dia após a cirurgia foi o prazo escolhido para fazer todos os outros experimentos, para assegurar uma margem de confiança de que o perfil de resposta não seria alterado. A ideia neste trabalho é estudar a ação do canabidiol frente a uma neuropatia já instalada, e não em formação, assim sendo, procedemos com a escolha do período onde a hiperalgesia já estaria estabelecida e manifestada de forma uniforme.

Em nossos experimentos, o canabidiol administrado periféricamente em várias doses se mostrou eficaz em produzir antinocicepção frente à neuropatia induzida por CNC. Esse resultado é corroborado por outros trabalhos que demonstraram o efeito antinociceptivo do canabidiol, ainda que administrado por via oral, em modelos murinos de neuropatia por CNC (Costa et al., 2007; Comelli et al., 2008); nossas doses foram calculadas proporcionalmente às doses administradas nesses trabalhos, uma vez que até o momento, não foram publicados trabalhos avaliando o efeito do canabidiol administrado periféricamente para o tratamento da dor neuropática. Desse modo, nos baseamos no fato de que a pata representa cerca de 1% da massa corporal dos camundongos(35-40g), e assim a dose inicial (5 µg/pata) foi de aproximadamente 1% da dose sistêmica utilizada nesses trabalhos (10 mg/kg) (portanto seria cerca de 350 a 400 µg por animal e 1% da massa corporal daria 3,5 a 4 µg/pata que arredondamos para 5 µg/pata) . A dose de 30 µg produziu o efeito antinociceptivo mais intenso, sendo, portanto, a dose usada para os outros experimentos, com exceção para aqueles experimentos que testamos potencialização das drogas, quando foi escolhido a dose de 5 µg para facilitar a visualização da possível potencialização sinérgica do efeito antinociceptivo do CBD combinado com outros fármacos. O gráfico demonstra ainda que o pico do efeito antinociceptivo do canabidiol ocorreu 15 minutos após sua administração. A maior parte dos fármacos antinociceptivos de ação periférica tem a duração do seu efeito em função da cinética de absorção, já que ao serem absorvidos tem sua concentração local diminuída, e

Discussão

consequentemente seu efeito. Sendo assim, vários fatores podem influenciar esse processo, como pH do meio, tamanho e polaridade da molécula, lipossolubilidade, etc., (Martinez & Amidon, 2002).

A nossa estratégia de exclusão do possível efeito sistêmico do canabidiol demonstrou que a dose de 30 µg só induz efeito local, não havendo participação de vias centrais neste evento, resultado esse em consonância com os resultados obtidos no teste RotaRod, onde a administração da dose utilizada não foi capaz de induzir efeitos sedativos e/ou relaxantes, sugerindo que a redução do comportamento nociceptivo dos animais ocorreu, de fato, em função de um efeito antinociceptivo ao nível periférico e não em decorrência de alguma alteração no desempenho motor, contribuindo para a sustentação da hipótese sobre os mecanismos de ação periférica proposta para o canabidiol neste trabalho.

Embora os primeiros fitocanabinoides tivessem suas estruturas elucidadas entre os anos de 1932 e 1964 (Mechoulam et al., 2014), o primeiro receptor canabinoide, CB₁ só foi descoberto em 1988 por Devane e colaboradores, após pesquisas com cérebro de ratos (Devane et al., 1988). Os receptores são ativados principalmente por moléculas endógenas, razão essa para se pesquisar a existência de canabinoides endógenos. Como o Δ⁹-THC e seus compostos relacionados são lipídios, era esperado que os possíveis ligantes endógenos dos receptores canabinoides também fossem lipídios (Mechoulam et al., 2014). Em 1992, o primeiro endocanabinoide foi isolado: uma amida do ácido araquidônico – araquidonoil etanolamida (anandamida) – foi encontrada por ter atividade inibitória equivalente ao do Δ⁹-THC, e posteriormente, foi demonstrado que possui atividade canabimimética, uma vez que inibiu a resposta de contração em vasos isolados de ratos (Devane et al., 1992).

Em 1993, o segundo receptor canabinoide, CB₂, foi identificado por homologia de sequência, em células HL60 e tecidos de ratos (Munro et al., 1993). Presumiu-se que fosse encontrado principalmente na periferia, assim, foi iniciada uma busca por um agonista endógeno “periférico”. A partir das mesmas técnicas usadas para isolar a anandamida, foi isolado um éster do ácido araquidônico – 2-araquidonoil glicerol (2-AG) – que se ligou tanto em CB₁ quanto CB₂, inibindo a adenilato ciclase com uma potência semelhante ao Δ⁹-THC, além de inibir as contrações de vasos isolados de ratos, embora de maneira menos potente que o Δ⁹-THC (Mechoulam et al., 1995; Mechoulam et al., 2014).

Os receptores canabinoides pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, subfamília G_{i/o}, cuja ativação resulta em alterações conformacionais onde a subunidade G_{iα} inibe a ação da enzima adenilato ciclase, com consequente redução da produção de monofosfato

Discussão

cíclico de adenosina (AMPc); desse modo, diminui também a fosforilação/ativação da proteína quinase A (PKA), responsável por modular vias de sinalização como ativação de canais iônicos. Já a subunidade $G_i\beta\gamma$ atua na modulação de canais iônicos, como inibição dos canais para Ca^{2+} voltagem-dependente e redução do influxo de cálcio, e ativação dos canais para potássio, provocando aumento de efluxo desse íon, além de modular as enzimas proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K) (Howlett et al., 2002). Como consequência dessa cascata de sinalização ocorre hiperpolarização celular, resultando na diminuição da excitabilidade neuronal e inibição dos estímulos dolorosos (Lötsch et al., 2018).

Os receptores CB_1 são expressos principalmente no cérebro, medula espinhal, gânglio da raiz dorsal (DRG) e neurônios sensoriais nociceptivos primários (Sanudo-Pena et al., 1999; Ahluwalia et al., 2000; Howlett et al., 2002); já os receptores CB_2 são expressos principalmente nas células imunes (Howlett et al., 2002). No entanto, receptores CB_1 também foram encontrados em células não neuronais, como células imunes enquanto que receptores CB_2 foram encontrados em células neuronais dentro e fora do cérebro, no DRG e substância cinzenta periaquedutal (Ross et al., 2001; Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006; Iuvone et al., 2009).

A participação dos receptores CB_1 na antinocicepção periférica é bem relatada na literatura. Nosso grupo de pesquisa demonstrou o envolvimento desses receptores na ação antinociceptiva periférica da noradrenalina (Romero et al., 2013) frente ao modelo de dor induzida pela prostaglandina E_2 , na ação antinociceptiva da eletroacupuntura frente a dor orofacial induzida por calor (Almeida et al., 2016), e também na ação antinociceptiva periférica do resveratrol frente a dor inflamatória induzida pela carragenina (Oliveira et al., 2019).

Vários trabalhos também sugerem a participação dos receptores CB_1 na antinocicepção após administração de agonistas canabinoides. A administração local de anandamida reduziu a hiperalgesia térmica e edema cutâneo induzidos por carragenina, e o efeito da anandamida foi revertido pelo antagonista dos receptores CB_1 , SR141716A (Richardson et al., 1998). Estudos sobre liberação de neuropeptídeos sugerem que o mecanismo para esse efeito é que a anandamida diminua a liberação de neuropeptídeos nos neurônios aferentes primários, o que contribui tanto para a analgesia primária quanto central (Richardson et al., 1998; Rice, 2001 e 2002). Calignano e colaboradores (1998) demonstraram que a administração local de AEA e PEA (palmitoiletanolamida) atenuaram a resposta comportamental no teste da formalina, via receptores CB_1 . O AEA foi eficaz apenas na primeira fase do teste, provavelmente devido à sua rápida degradação; já o PEA reduziu ambas as fases da resposta ao teste da formalina. Fox e colaboradores (2001) demonstraram que a administração periférica do canabinoide sintético

Discussão

Win 55,212-2 reverteu a dor neuropática num modelo de ligação parcial do nervo ciático. Scott e colaboradores (2004) demonstraram que receptores CB₁ e CB₂ estão envolvidos na analgesia induzida pelo agonista não seletivo dos receptores canabinoides, CP55,940, no modelo de dor neuropática induzida por ligação do nervo espinhal. Foi demonstrado também que há aumento da expressão dos receptores CB₁ após constrição do nervo ciático e que essa regulação foi responsável pelo aumento dos efeitos antinociceptivos do agonista canabinoide WIN 55, 212-2 (Lim et al., 2013). Em consonância, nossos resultados demonstraram que os receptores CB₁ participam da antinocicepção periférica do canabidiol em nosso modelo de dor neuropática.

Os mecanismos moleculares através dos quais o CBD modula os receptores CB₁ não são claros. Evidências experimentais sugerem que o CBD tenha uma afinidade muito baixa ($K_i = 10 \mu\text{M} \sim 30 \mu\text{M}$) e mostra pouca atividade agonista ($EC_{50} > 10 \mu\text{M}$) nos receptores CB₁ e CB₂, em comparação com Δ^9 -THC ($K_i = 3 \text{ nM} \sim 80 \text{ nM}$ para CB₁ / CB₂), e sugerem que o CBD pode alterar a ligação dos endocanabinoides ao sítio ortostérico do CB₁ (Bisogno et al., 2001; Pertwee, 2008). Estudos recentes sugerem que o CBD é um potente modulador alostérico negativo não competitivo (ou antagonista) dos receptores CB₁ (Thomas et al., 2007; Laprairie et al., 2015; Straiker et al., 2015; Tham et al., 2019).

Embora o CBD não provoque a tetrade clássica mediada pela ativação dos receptores CB₁, a saber hipolocomoção, analgesia, catalepsia e hipotermia (Long et al., 2010), a literatura aponta várias pesquisas sobre a interação CBD-CB₁ nos mais variados eixos de investigação. Howlett e colaboradores (1989) sugerem que o CBD pode alterar a atividade do receptor CB₁ aumentando a fluidez da membrana. O CBD exerceu atividade semelhante a um agonista do receptor CB₁ em alguns ensaios funcionais *in vitro* em altas concentrações ($> 10 \mu\text{M}$), que pode ser revertido por agonistas inversos do receptor CB₁ e essa resposta não foi observada em animais nocautes para esse receptor. Provavelmente isso ocorre por aumento do tônus endocanabinoide por ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2), com consequente mobilização de ácido araquidônico (AA) – a matéria-prima para síntese de AEA e 2-AG (McPartland et al., 2015). Stern e colaboradores (2017) demonstraram que o CBD atua na diminuição da consolidação das memórias relacionadas ao medo, através da participação dos receptores CB₁ e CB₂. O CBD também diminuiu o comportamento agressivo induzido por isolamento social, em camundongos, através da ativação dos receptores CB₁ (Hartmann et al., 2019). Maione et al. (2011) demonstraram que o CBD injetado na substância cinzenta periaquedutal ativa a via descendente antinociceptiva, através da interação com vários alvos,

Discussão

entre eles o receptor CB₁, já que o efeito antinociceptivo foi antagonizado pela administração de AM251.

Os receptores CB₁ e CB₂ compartilham semelhanças estruturais consideráveis (44% de homologia no nível da proteína, e 68% quando apenas a região transmembranar é considerada, Guindon & Hohmann, 2009), inclusive evidências sugerem a formação de heterodímeros CB₁/CB₂ (Ligresti et al., 2016). Os receptores CB₂ cumprem papel importante na função imune e na inflamação e há ampla evidência de que a ativação do receptor CB₂ reduz a nocicepção em uma variedade de modelos para o estudo da dor. Trabalhos conduzidos por nosso grupos de pesquisa demonstraram a participação desses receptores na antinocicepção periférica induzida por serotonina, tingenona e alguns anti-inflamatórios não esteroidais, além do próprio agonista CB₂ endógeno PEA (Silva et al., 2012; Diniz et al., 2015; Romero et al., 2013; Veloso et al., 2018). Investigações envolvendo dor inflamatória induzida por carragenina demonstraram que a ativação de receptores CB₂ por agonistas seletivos diminuiu a atividade neuronal no corno dorsal por meio da redução da atividade das fibras C e neurônios de alcance dinâmico amplo (Quartilho et al., 2003; Nackley et al., 2004).

Outros trabalhos demonstram que há o aumento de proteínas do receptor CB₂ ou de seu RNAm em locais onde ocorre o processamento nociceptivo da dor neuropática no SNC e na periferia, bem como em tecidos inflamados e no gânglio da raiz dorsal em modelos de dor neuropática. (Walczak et al., 2005; Wotherspoon et al., 2005; Beltramo et al., 2006; Richardson et al., 2008). Scott e colaboradores (2004) demonstraram que o antagonista seletivo dos receptores CB₂ SR144520 reverteu o efeito antinociceptivo do agonista CP55,940, assim como Ibrahim e colaboradores (2003) demonstraram que o efeito antinociceptivo do agonista seletivo dos receptores CB₂, AM1241 foi revertido pelo antagonista seletivo desses receptores; ambos os trabalhos foram realizados utilizando modelo de dor neuropática induzida por ligação do nervo espinhal. Além dos receptores CB₁, nossos resultados também sugerem a participação dos receptores CB₂ no evento antinociceptivo induzido pelo canabidiol, uma vez que esse efeito foi revertido pelo AM630, antagonista seletivo para esses receptores.

Os mecanismos moleculares através dos quais o CBD modula os receptores CB₂ também não estão totalmente esclarecidos. Como já mencionado, o CBD tem baixa afinidade para o sítio de ligação ortostérico dos receptores CB₂. Trabalhos demonstraram que o CBD possui atividade agonística inversa dos receptores CB₂, uma vez que antagonizou os efeitos do agonista CP55.940 em células transfectadas com receptores CB₂ humanos (Thomas et al., 2007). Posteriormente foi demonstrado que o CBD possui alta afinidade de

Discussão

ligação no sítio alostérico dos receptores CB₂, mesmo em concentrações nanomolares, além de demonstrar habilidade de diminuir a afinidade (K_d) do agonista ortostérico Vermelho CM - 157 (Martínez-Pinilla, et al., 2016 e 2017; Bi et al., 2019). Além disso, Laprairie et al. (2015) relataram que o CBD possui atividade agonista parcial do CB₂ na ausência de ligantes ortostéricos.

As ações induzidas por CBD nos receptores CB₂ é relatada em diversos trabalhos. Galaj et al. (2019) demonstraram que o CBD inibiu a auto-administração de cocaína, de maneira dose-dependente e também atenuou a recompensa por estimulação cerebral com cocaína, e que esses efeitos foram bloqueados pela administração de AM630. O tratamento com CBD diminuiu os processos inflamatório e de remodelação no modelo de asma alérgica em camundongos e os mecanismos de ação envolvem receptores CB₁ / CB₂ (Vuolo et al., 2019). Afim de avaliar os ações do CBD num modelo *in vitro* de hipóxia-isquêmica, Castillo et al. (2010), verificaram que a administração dessa substância produziu reduções significativas na concentração de IL-6 e na expressão de TNF- α , COX-2 e iNOS, efeito esse que foi reduzido após a administração de AM630, demonstrando a participação dos receptores CB₂ nesse evento neuroprotetivo. Em pesquisas envolvendo linhagens celulares de câncer (glioblastoma, cervical e pulmão), o CBD inibiu viabilidade/proliferação de células cancerígenas e esse efeito foi revertido na presença de antagonistas de CB₂ (McAllister et al., 2015).

Como vários trabalhos demonstram que há aumento da expressão dos receptores CB₁ e CB₂ em modelos de neuropatia (Siegling et al., 2001; Walczak et al., 2005; Wotherspoon et al., 2005) não é surpreendente que várias classes de canabinoides induzam supressão da dor neuropática por constrição do nervo ciático, entre eles agonistas mistos CB₁/CB₂, e moduladores do sistema endocanabinoide que inibem as enzimas FAAH e MAGL bem como inibidores da recaptção de anandamida, através do aumento do aporte de endocanabinoides (Rahn & Hohmann, 2009).

O termo "endocanabinoide" foi proposto em meados dos anos 90 após a descoberta dos receptores para THC e seus ligantes endógenos. Os compostos mais estudados do sistema endocanabinoide são a AEA e 2-AG (Kisková et al., 2019). No entanto, palmitoiletanolamida (PEA), oleolanolamida (OEA), 2-palmitoil-e2-linoleoil-glicerol, também podem aumentar a atividade endocanabinoide, além de outros lipídios endógenos como éter 2-araquidonil-gliceril (éteranoladina), N-araquidonoil-dopamina (NADA) e O-araquidonoil-etanolamina (viroadamina) que também são conhecidos por se ligarem aos receptores canabinoides (Ligresti et al., 2016).

A biossíntese de AEA ocorre a partir da ativação da N-aciltransferase (NAT), que

Discussão

transfere um grupo acil para o fosfolípido de membrana fosfatidiletanolamina. Deste modo, é gerada N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), que, por ação da enzima fosfolipase D específica para NAPE, forma AEA. A principal via biossintética para 2-AG envolve as hidrólises sequenciais de fosfolípidos de inositol via diacilglicerol (DAG) por ação das enzimas fosfolipase C e DAG lipase (Kisková et al., 2019). AEA e 2-AG são produzidos sob demanda pelas células a partir do aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Ligresti et al., 2016). Recentemente um sistema de armazenamento para esses mediadores foi proposto, segundo o qual, os canabinoides são secretados das células microgliais através de vesículas da membrana extracelular conhecidas como exossomos (Gabrielli et al., 2015).

Logo após sua produção, os endocanabinoides são liberados por neurônios pós-sinápticos e ativam receptores canabinoides nos terminais pré-sinápticos através de um mecanismo de sinalização retrógrada (Alger, 2002). No entanto, há também evidências sugerindo que sinalização endocanabinoide pode ocorrer de maneira não retrógrada ou autócrina, e podem modular a função neural e a transmissão sináptica, envolvendo receptores de potencial transitório tipo 1 (TRPV1) e receptores CB₁ localizados na célula pós-sináptica ou por meio de astrócitos modulando indiretamente as funções pré-sinápticas ou pós-sinápticas (Egertova et al., 2008; Castillo et al., 2012). A sinalização é finalizada através ação de transportadores de endocanabinoides presentes na membrana neuronal, internalizando esses compostos, sendo que a anandamida é hidrolisada pela enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH, do inglês fatty acid amide hydrolase), localizada em neurônios pós-sinápticos (Seierstad & Breitenbucher, 2008), tendo como produtos o ácido araquidônico e a etanolamina (Di Marzo, 1994) e o 2-AG é hidrolisado pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), presente em neurônios pré-sinápticos (Dinh et al., 2002), tendo como produtos o ácido graxo e glicerol (Guindon & Hohmann, 2009).

A anandamida liga-se preferencialmente a receptores CB₁, e o 2-AG possui afinidade semelhante para os receptores CB₁ e CB₂ (Pertwee & Ross, 2002) e o presente trabalho mostrou que o efeito antinociceptivo do canabidiol foi dependente desses receptores sugerindo a participação desses endocanabinoides no evento. A fim de confirmar essa hipótese utilizamos o MAFP, inibidor da enzima FAAH, o JZL184, inibidor da enzima MAGL bem como o VDM11, inibidor da recaptção do anandamida, todos em doses que não induzem nenhuma alteração no limiar dos animais, e as drogas potencializaram a antinocicepção periférica induzida por canabidiol em sua menor dose.

Discussão

Trabalhos conduzidos por Ryan e colaboradores (2007) sugerem que o MAFP induziu um aumento acentuado nas respostas induzidas pelo CBD em experimentos envolvendo cultura de células hipocâmpais. Schlosburg et al. (2010) também propôs que o uso do inibidor da enzima FAAH, PF-3845, e o inibidor da enzima MAGL, JZL184, produziu efeito antinociceptivo em camundongo neuropático induzido por CNC.

Brindisi e colaboradores (2016) sintetizaram um composto inibidor da enzima MAGL, que denominaram “4a” e testaram sua eficácia utilizando o teste da formalina, onde reduziu a resposta nociceptiva na primeira e segunda fase do teste, aumentou os níveis de 2-AG, ativando indiretamente os receptores CB₁ e CB₂, além de reduzir a hipersensibilidade em um modelo de dor neuropática induzida pelo quimioterápico oxaliplatina. Embora tenham usado um composto diferente, esse trabalho, assim como o nosso, mostra que a inibição da enzima MAGL pode ser um alvo terapêutico importante para redução da nocicepção.

Trabalhos conduzidos por Galdino e colaboradores (2014), e Oliveira e colaboradores (2017) demonstraram que o uso do VDM11, assim como dos inibidores MAFP e JZL184, potencializaram o efeito antinociceptivo induzido por exercícios físicos e por um peltatosídeo isolado de *Annona crassiflora*, respectivamente, corroborando nossos resultados em que utilizamos esses mesmos inibidores. Adicionalmente, resultados recentes da pesquisa desenvolvida por Crivelaro do Nascimento e colaboradores (2020) demonstraram que o efeito antinociceptivo do CBD foi potencializado pelo uso de um inibidor da FAAH (URB597), e que tal efeito foi revertido pelo uso de antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂, assim como em nosso trabalho.

Além da ligação aos receptores canabinoides, a literatura propõe outros mecanismos de ação para o canabidiol, como inibição da enzima FAAH (Watanabe et al., 1996; Bisogno et al., 2001) e inibição do transportador de anandamida na membrana (AMT) (Rakhshan et al., 2000), o que levaria ao aumento das concentrações de anandamida em experimentos *in vitro*. O 2-AG também pode ser hidrolisado enzimicamente pela FAAH, e portanto, esse endocanabinoide também poderia ter suas concentrações aumentadas pelo uso do canabidiol (Di Marzo et al., 1998; Di Marzo, 1999; Khanolkar & Makriyannis, 1999; Dinh et al., 2002). Baseados nessas informações, nosso próximo passo foi avaliar se a administração do canabidiol em nosso modelo neuropático induziria aumento das concentrações de endocanabinoides.

Surpreendentemente, a administração de canabidiol nos animais neuropáticos diminuiu os níveis de AEA, mas não alterou os níveis de 2-AG, PEA e OEA. Embora inicialmente pareça contraditório, esse achado pode ser relacionado com a transdução de sinal inibitória dos

Discussão

receptores canabinoides, que, uma vez ativados, inibem os canais para cálcio, diminuindo assim sua concentração intracelular, e conseqüentemente, inibindo a síntese de endocanabinoides, já que estes são sintetizados sob demanda à partir do aumento das concentrações intracelulares desse íon. Estudos mostram que o CBD induziu liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, mas também inibiu os canais para Ca^{2+} controlados por estoque, que são ativados em resposta à liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, em cultura de neurônios corticais de camundongo, sugerindo um mecanismo de controle por feedback negativo desse fitocanabinoide (Bouron, 2018). Ryan e colaboradores (2007) demonstram que o CBD libera Ca^{2+} dos estoques intracelulares de neurônios do hipocampo e que o aumento dos níveis dos endocanabinoides por administração exógena de AEA e 2-AG diminuiu consideravelmente a liberação de Ca^{2+} induzida por CBD. Em nosso modelo, CBD pode estar através de G_i diminuindo a entrada de Ca^{2+} e conseqüentemente diminuindo a liberação de AEA na pata dos animais neuropáticos. Uma outra possibilidade está relacionada à dose do CBD e o sistema fisiológico em que esse efeito é estudado. Ensaio *in vitro* mostram que altas doses de CBD (> 20 μM) inibem a atividade da enzima (Bisogno et al., 2001; Ibeas Bih et al., 2015). Já doses mais baixas em estudo *in vitro* (16 μM) e estudos *in vivo* usando camundongos mostram que o CBD aumentou a atividade da enzima (Massi et al., 2008; Ibeas Bih et al., 2015). Esse efeito dual, que varia com a dose e com o ambiente, sugere que mais de um mecanismo de ação pode estar envolvido nas respostas do sistema canabinoide induzidas pelo CBD (Ibeas Bih et al., 2015). Assim sendo em nosso modelo parece que CBD pode estar aumentando a atividade de FAAH e com isto diminuindo a quantidade de AEA nos tecidos periféricos tratados com CBD.

Nossos dados também mostram que o estado neuropático por si só aumenta os níveis endógenos de AEA. Possivelmente os níveis de anandamida tenham aumentado em resposta à neuropatia, uma vez que a desmielinização do nervo induz potenciais de ações frequentes que promovem a abertura dos canais para cálcio, aumentando o influxo, que é o estímulo necessário para a síntese de endocanabinoides. De modo semelhante, outros achados sugerem que a constrição do nervo ciático aumenta os níveis de AEA e 2-AG na medula ventromedial e rostral da substância cinzenta periaquedutal, locais implicado na modulação descendente da dor além de aumentar os níveis de AEA na rafe dorsal (Palazzo et al., 2006; Petrosino et al., 2007); a neuropatia induziu aumento de AEA e 2-AG no DRG (Mitrirattanakul et al., 2006), e o desenvolvimento de dor neuropática foi acompanhado por uma elevação significativa dos níveis de AEA no nível da medula espinhal, e aumento da expressão de enzimas relacionadas à síntese de AEA no DRG e medula espinhal (Starowicz et al., 2013; Malek et al., 2014).

Discussão

Deste modo, sugerimos que o CBD induz analgesia por ação no sistema canabinoide tanto por ativação direta dos receptores CB₁ e CB₂, como pela ação indireta, a partir do controle na síntese e degradação de endocanabinoides. A administração de CBD inicialmente aumenta a síntese de anandamida por liberação de cálcio do retículo endoplasmático, com posterior inativação dos canais de cálcio responsáveis por reestabelecer o estoque de íons dessa organela; o CBD também aumenta a atividade da enzima FAAH, com consequente aumento da degradação de anandamida, além de exercer controle negativo da síntese desse composto, resposta essa que pode ser reforçada pela ativação dos receptores canabinoides, por meio de sua ação inibitória via transdução do sinal por G_i.

Ainda que nossos dados de dosagem não mostraram aumento do nível de 2-AG, uma outra possibilidade de mecanismo de ação para o CBD é que ele possa também induzir a síntese e liberação deste endocanabinoide, uma vez que possui afinidade semelhante para os receptores CB₁ e CB₂, e nosso trabalho demonstra a participação desses receptores no efeito antinociceptivo do CBD. Essa sugestão vai ao encontro dos dados do trabalho de Guindon et al. (2011) que sugerem que aumentos nos níveis de 2-AG podem ser mascarados pelo alto conteúdo lipídico na pele da pata analisada por LC/MS.

Devido a sua baixa afinidade pelos receptores canabinoides, um crescente corpo da literatura indica que o CBD tem maior afinidade por muitos outros alvos moleculares, incluindo receptores opioides, receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e TRPV1 (Ibeas Bi et al., 2015; Morales et al., 2017). No entanto, a maioria das descobertas acima derivam de linhas celulares *in vitro* e, atualmente, existe uma falta de evidências convincentes indicando que qualquer um desses alvos pode contribuir diretamente para os efeitos terapêuticos produzidos pelo CBD *in vivo* ou em ensaios clínicos em humanos (Bi et al., 2019). Sendo assim, nos propusemos a investigar a participação desses receptores na antinocicepção induzida pelo canabidiol frente a dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático.

A partir desses dados e somando-se o fato de que várias pesquisas demonstram a interação entre os sistemas canabinoide e opioide (Welch & Eads, 1999; Varvel et al., 2004; Pacheco et al., 2008; Seely et al., 2012) nosso próximo experimento foi avaliar a participação dos sistema opioide a partir do uso da naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opioides, que antagonizou a resposta antinociceptiva induzida pelo CBD. Afim de avaliar a seletividade dos receptores opioides envolvidos, utilizamos como ferramentas farmacológicas antagonistas seletivos para esses receptores. Como resposta, obtivemos que o clocinnamox, antagonista seletivo dos receptores opioides tipo μ , reverteu a antinocicepção periférica

Discussão

induzida por canabidiol. Já o naltrindole, antagonista seletivo dos receptores opioides tipo δ , e a nor-binaltorfimina, antagonista seletivo dos receptores opioide tipo κ reverteram, de maneira parcial, a antinocicepção periférica induzida pelo CBD.

Embora em nossos trabalhos a dose administrada de naltrindole e nor-binaltorfimina reverteram apenas parcialmente o efeito antinociceptivo do canabidiol, dados do nosso grupo de pesquisa demonstram que as doses usadas são eficazes, não sendo necessário aumentá-la, uma vez que em experimentos pilotos a mesma dose de naltrindole foi capaz de reverter totalmente o efeito do agonista δ opioide SNC80 (dados não publicados) e em outros trabalhos foi demonstrado que a mesma dose de nor-binaltorfimina foi capaz de reverter totalmente o efeito do agonista κ opioide U-50,488 em um modelo de inflamação crônica em ratos, (Pacheco et al., 2008) e do agonista bremazocina em modelos de dor aguda e inflamatória (Amarante et al., 2004).

Os receptores opioides pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, subfamília $G_{i/o}$, cuja ativação resulta em uma cascata de sinalização que culmina com a diminuição da excitabilidade neuronal (Kieffer et al., 2002). São classificados como μ , δ e κ , embora outras classificações foram sugeridas como MOR, DOR e KOR, propostas por biólogos moleculares, e OP1 (δ), OP2 (κ) e OP3 (μ) proposta pela International Union of Pharmacologists (IUPHAR) de acordo com a ordem cronológica de clonagem (Dhawan et al, 1996). Os receptores opioides estão amplamente distribuídos tanto no sistema nervoso central quanto periférico. No que diz respeito à áreas que envolvem o processamento da dor, estão localizados no tálamo, medula rostroventral (RVM), substância cinzenta periaquedutal, medula espinhal do corno dorsal, e terminais pré-sinápticos de fibras nociceptivas primárias (Dhawan et al, 1996; Listos et al., 2019).

Pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório já demonstraram o envolvimento sistema opioide na antinocicepção periférica induzida por vários compostos, como a participação dos receptores μ na antinocicepção induzida pelo resveratrol (Oliveira et al., 2019); a participação dos receptores κ na antinocicepção induzida pelos anti-inflamatórios não esteroidais diclofenaco e dipirona (Silva et al., 2016); a participação dos três receptores opioides na antinocicepção induzida pela serotonina (Diniz et al., 2018); e também na antinocicepção induzida por atividade física em animais com diabetes induzida por dieta rica em gordura (Valadares et al., 2018), dentre outros trabalhos.

Labuz e Machelska (2013) demonstraram a participação do sistema opioide nos modelos de dor neuropática por constrição do nervo ciático, onde DAMGO (agonista do receptor μ

Discussão

opioide), DPDPE (agonista do receptor δ opioide) e U50,488H (agonista do receptor κ opioide) injetados no local da constrição reverteram de maneira dose-dependente a sensibilidade mecânica induzida pela neuropatia. Todos os três agonistas opioides, também foram eficazes quando injetados por via intraplantar na pata submetida à constrição, embora os efeitos foram apenas parciais.

Xu e colaboradores (2019) demonstraram que o peptídeo DN-9 foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de constrição do nervo ciático, possivelmente por ativação dos receptores μ e κ , na periferia. Além disso, esse composto diminuiu a corrente dos canais de cálcio ativado por voltagem e canais de cálcio ativados por potássio em cultura de neurônios do DRG, evento importante que leva à hiperpolarização celular após ativação de receptores Gi. Tiwari et al. (2016) demonstraram que a antinocicepção induzida pela administração de dermorfina ocorre através da ativação de receptores μ periféricos em animais neuropáticos. O agonista seletivo dos receptores δ opioides UFP-512 inibiu a dor neuropática além de reduzir o comportamento depressivo crônico associado à neuropatia persistente (Polo et al., 2019). Rutten e colaboradores (2018) demonstraram que a norbinaltorfimina reverteu o efeito antinociceptivo dos compostos SNC-80 e U50488H, agonistas seletivos dos receptores δ e κ , respectivamente, no modelo de neuropatia induzida por ligação do nervo espinal. Em conjunto, esses dados corroboram nossos resultados, uma vez que demonstram a participação dos três receptores opioides na antinocicepção em modelos de dor neuropática.

Estudos já demonstraram haver aumento da expressão de receptores μ opioide na pata e no DRG no modelo de dor neuropática por constrição do nervo safeno (Walczak et al., 2005), e também aumento da expressão desses receptores no nervo ciático após neuropatia induzida por constrição do nervo ciático (Truong et al., 2003). Kabli & Cahill (2007) demonstraram que houve aumento da expressão de receptores δ opioides no DRG e dentro do nervo ciático de animais neuropáticos. Além disso, a literatura aponta que o receptor CB_1 canabinoide e μ opioide formariam heterodímeros (Rios et al., 2006) e que a sinalização intracelular ocorre através de uma proteína G comum (Hojo et al., 2008), e ainda, que o AM251 tem ação antagonística direta nos receptores μ opioide (Seely et al., 2012), sustentando nossos dados que demonstraram que o CBD poderia ativar tanto receptores CB_1 quanto receptores μ .

Em relação à interação canabidiol e sistema opioide, Kathmann e colaboradores (2006) demonstraram, usando estudos de ligação cinética, que o CBD é um modulador alostérico dos receptores opioides μ e δ , ou seja, facilita a ação de substâncias agonistas desses receptores. No que diz respeito à essa interação em modelos de dor, Neelakantan et al. (2015) relatam que uma

Discussão

combinação CBD-opioide apresenta analgesia sinérgica no teste de contorção induzida por ácido acético.

O mecanismo pelo qual o sistema opioide produz analgesia está relacionado à ação de ligantes endógenos que se ligam com afinidades diferentes aos receptores opioides: β -endorfina tem afinidade semelhante para receptores μ e δ , e baixa afinidade para receptores κ ; encefalinas possuem alta afinidade para receptores δ , baixa afinidade para receptores μ e nenhuma afinidade para receptores κ ; dinorfina A e dinorfina B possuem alta afinidade para receptores κ , mas também possuem afinidade significativa para receptores μ e δ (Janecka et al., 2004).

Uma estratégia farmacológica utilizada para aumentar os efeitos dos opioides endógenos é a inibição das peptidases. A aminopeptidase-*N* é uma peptidase transmembrânica com um grande domínio extracelular que contém seu sítio ativo, é expressa em leucócitos e neurônios, e é responsável por inativar peptídeos opioides endógenos (Luan & Xu, 2007; Stein & Machelska, 2011).

Com o objetivo de verificar a participação de opioides endógenos no efeito antinociceptivo do CBD, usamos como ferramenta farmacológica a bestatina, inibidor da enzima aminopeptidase-*N*, que potencializou a antinocicepção periférica induzida por canabidiol em sua menor dose, sugerindo a participação de peptídeos opioides endógenos no efeito do CBD.

Estudos prévios relataram que peptídeos opioides provenientes de células imunes podem ativar receptores opioides presentes nas terminações nervosas periféricas em pata inflamada de ratos (Stein et al., 1990; Mousa et al., 2001) e causar analgesia potente ao ativar receptores opioides localizados em terminais de neurônios sensoriais (Stein, 1995). Outra fonte provável destes peptídeos são as células residentes, como os queratinócitos, que são fonte de β -endorfina (Ibrahim et al., 2005), dinorfina A (Tominaga et al., 2007), Met e Leucina-encefalina (Slominski et al., 2011) liberados mediante ativação celular. Os queratinócitos são muito abundantes na pele e expressam constitutivamente receptores CB₁ e CB₂ (Casanova et al., 2003).

Assim, um possível mecanismo de ação para o efeito antinociceptivo do canabidiol pode ser a ativação direta e indireta de receptores CB₁ e CB₂ em células imunes e queratinócitos, induzindo a liberação de peptídeos opioides, ativando por sua vez receptores opioides, consequentemente produzindo antinocicepção. Como explicação para esse fenômeno temos que o CBD poderia mobilizar cálcio do retículo endoplasmático (Ryan et al., 2007; Bouron, 2018), e o aumento intracelular desse íon está relacionado à liberação de opioides endógenos

Discussão

por queratinócitos e células imunes (Cabot et al., 1997). Essa hipótese pode ser sustentada pelo trabalho de Ibrahim et al. (2005) que sugeriu que a ativação de receptores CB₂ por seu agonista AM1241 produz antinocicepção por liberação de β-endorfina; a liberação de β-endorfina parece desempenhar um papel crítico na antinocicepção mediada por receptores CB₂ já que os efeitos da AM1241 foram completamente abolidos após a utilização de um anti-soro que sequestra β-endorfina. Nossos dados também estão de acordo com os resultados de Pugh et al. (1996) e Welch & Eads (1999) que demonstraram que o THC libera dinorfina endógena A e encefalina leucina, e o levonantradol (canabinoide sintético 30 vezes mais potente que o THC; Hosking & Zajicek) libera dinorfina B, potencializando o efeito antinociceptivo da morfina. Adicionalmente, os animais que demonstraram tolerância ao THC apresentaram níveis diminuídos de dinorfina A (Welch & Eads, 1999).

Em trabalhos conduzidos por Cunha e colaboradores (2010), foi demonstrado que a morfina administrada periféricamente ativou receptores μ opioides através da subunidade βγ com posterior ativação da via PI3K/AKT, e induziu a ativação da enzima nNOS com consequente ativação da via NO/GMPc/K_{ATP} no nociceptor. Como em nossos experimentos sugerimos o possível mecanismo do canabidiol induzindo a liberação de opioides endógenos e ativação dos seus respectivos receptores, e, sabendo que opioides (Rodrigues & Duarte, 2000; Pacheco et al., 2005; Pacheco & Duarte, 2005) e canabinoides (Reis et al., 2011; Romero et al., 2012a e 2012b) induzem antinocicepção periférica também pela ativação da via L-arginina/NO/GMPc e canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), nós avaliamos a possibilidade da participação da via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP} na antinocicepção induzida por canabidiol.

Nessa série de experimentos, primeiramente, usamos como ferramenta farmacológica o AS605240, inibidor seletivo da enzima PI3K gama, e a rapamicina, inibidor da enzima mTOR, que reverteram a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol.

A via PI3K/AKT/mTOR é bem conhecida e desempenha papéis vitais no crescimento, diferenciação, apoptose, autofagia e metabolismo celular (Zhang et al., 2017), efeitos neuroprotetivos (Li et al., 2015) e antinociceptivos (Cunha et al., 2010 e 2012). Recentemente foi demonstrado que o extrato de HCT (*Houttuynia cordata* Thunb) aumentou a proliferação celular *in vivo*, e aumentou a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR *in vitro* em células do tipo Th17. Essas células estão envolvidas principalmente na recuperação endógena da neuropatia (Wan et al., 2016). Trabalhos conduzidos por Stanley et al. (2015) foi demonstrado que o CBD induz relaxamento de artérias mesentéricas humanas por aumento nos níveis de fosforilação de

Discussão

AKT. O tratamento com canabidiol aumentou a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR, com redução de mediadores pró-inflamatórios, além de aumentar a sobrevivência neuronal por inibição da via MAP quinase, num modelo de esclerose múltipla em camundongos (Giacoppo et al., 2017).

Ainda que esses experimentos não tenham relação com a modulação da nocicepção, demonstram que, assim como em nosso modelo, o CBD pode ativar a via PI3K/AKT/mTOR nas mais diversas condições. Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstram que canabinoides, ao se ligarem aos receptores CB₁ e CB₂, podem ativar a via PI3K/AKT/mTOR, aumentando a sobrevivência de astrócitos e oligodendrócitos, além de promover efeito neuroprotetivo em neurônios corticais primários (Gomez Del Pulgar et al., 2002; Molina-Holgado et al., 2002 e 2005). A icariina, um composto fenólico presente em plantas do gênero *Epimedium*, induziu efeitos anti-inflamatórios, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, por ativação da via PI3K/AKT e inibição de NF-kappaB, na resposta inflamatória aguda produzida por LPS (Xu et al., 2010). Em seus trabalhos, Xu e colaboradores (2007 e 2011) demonstraram haver aumento da expressão de PI3K, AKT e mTOR no DRG e medula espinhal, e embora relacionem esse aumento à manutenção da dor inflamatória e neuropática, em nosso modelo o efeito antinociceptivo do canabidiol parece depender da ativação dessa via, uma vez que a inibição das enzimas reverteu a antinocicepção induzida pelo CBD.

Dando continuidade ao estudo da via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP}, nosso próximo experimento teve como objetivo avaliar a participação do óxido nítrico em nosso trabalho. Muitos trabalhos sugerem que AKT, e não mTOR, seja responsável pela ativação da NOS (El-Mas et al., 2009; Cunha et al., 2010; Chu & Zhang, 2018), e também, trabalhos sugerem que NO aumenta a fosforilação de mTOR (Wang et al., 2018) e que a inibição de NOS diminuiu a atividade de mTOR (Xiao et al., 2017); entretanto, nossa proposta é que ocorra ativação da via PI3K/AKT/mTOR/NO no efeito antinociceptivo do CBD. Tal proposta se apoia no trabalho de Zeng e colaboradores (2013) que demonstraram que administração intrauterina de wortmannin (inibidor da enzima PI3K) ou rapamicina diminuiu a expressão de iNOS e eNOS. e sugerem que a arginina melhora a implantação embrionária em ratos através da ativação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR/NO no início da gravidez. Para esse fim, utilizamos o inibidor não seletivo da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), o NG-Nitro-L-arginina (L-NOArg), um análogo da L-arginina, que inibe competitivamente a enzima NOS, bloqueando a síntese de NO (Iacopucci et al., 2012). Como demonstrado, L-NOarg reverteu a

Discussão

antinocicepção periférica induzida por canabidiol, sugerindo que o NO é um mediador importante para tal efeito.

O NO possui papel biológico essencial na regulação de várias funções fisiológicas e fisiopatológicas, incluindo neurotransmissão, regulação do tônus dos vasos sanguíneos, resposta imune (Calabrese et al., 2007; Francis et al., 2010). É uma pequena molécula gasosa de curta meia-vida que permeia facilmente as membranas celulares. Como o NO não pode ser armazenado em vesículas, é secretado de maneira controlada e suas funções são reguladas pela expressão e atividade das enzimas NOS que produzem NO e L-citrulina a partir do precursor L-arginina (Schmidtko, 2015). Foram identificadas três isoformas de NOS que são codificadas por três genes distintos, e são classificadas de acordo com suas origens ou propriedades primárias: NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), NOS induzível (iNOS ou NOS-2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS-3). Tanto a nNOS quanto a eNOS são expressas constitutivamente, exibem baixa atividade basal e são estimuladas pelo influxo de Ca^{2+} e pela ligação Ca^{2+} /calmodulina. A iNOS é induzida em resposta a estímulos inflamatórios e sua atividade não depende de Ca^{2+} intracelular. As atividades dessas enzimas são reguladas por vários mecanismos, incluindo fosforilação, nitrosilação, interação com outras proteínas, disponibilidade de co-fator/substrato e alterações na transcrição (Francis et al., 2010; Schmidtko, 2015)

Não obstante alguns trabalhos sugeriram a participação do óxido nítrico na indução e manutenção da dor neuropática (De Alba et al., 2006; O'Reilly & Loomis, 2006; Costa et al., 2007), em nosso modelo o óxido nítrico mostrou propriedades antinociceptivas uma vez que o bloqueio da sua síntese reverteu o efeito antinociceptivo do canabidiol. Esse efeito dual do NO depende do segmento do sistema nociceptivo (central ou periférico), local anatômico do evento e da quantidade de NO no local específico. A dor neuropática e pós-operatória em ratos foi inibida pela administração intratecal de baixas doses do doador de NO SIN-1, enquanto foi aumentada por doses elevadas desse doador (Sousa & Prado, 2001; Kina et al., 2005). Já na periferia, a estimulação da via NOS/NO na epiderme e na derme causa hipernocicepção e antinociceção mecânica, respectivamente (Vivancos et al., 2003), e, embora contraditórios, esses resultados podem ser explicados pelo fato de que cada tecido é predominantemente inervado por diferentes subconjuntos de neurônios nociceptivos primários, que respondem de maneira diferente ao NO (Cunha et al., 2010).

A partir desses estudos que sugerem que a quantidade de NO no tecido pode influenciar na resposta nociceptiva, optamos realizar a dosagem desse mediador. A produção de NO foi

Discussão

avaliada com base nas concentrações de íons nitrito (NO_2^-), que é um dos produtos finais da oxidação do NO (Misko et al., 1993). A administração de CBD aumentou a quantidade de nitrito no animal naive. Nossos resultados também mostram que o quadro neuropático aumentou os níveis de nitrito em níveis semelhantes ao do animal naive tratado com CBD, mas que a administração de CBD no animal operado não produziu o sinergismo esperado.

A literatura contém vários trabalhos com resultados controversos no que diz respeito ao papel das enzimas NOS e do NO na nocicepção. Trabalhos envolvendo neuropatia indicam aumento da expressão de iNOS e nNOS no nervo lesionado, macrófagos, células de Schwann, medula espinhal e DRG (Levy et al., 1999, Hervera et al., 2010a), e que o NO produzido por essas isoformas da enzima está envolvido na manutenção da dor neuropática (Guan et al., 2007, Hervera et al., 2010b). Em nosso modelo, entretanto, ao bloquear a síntese de NO, o efeito antinociceptivo foi revertido, sugerindo que seu importante papel na analgesia periférica. Em outros modelos de dor, a ativação da nNOS/NO está envolvida na antinocicepção periférica induzida pela morfina (Cunha et al., 2010). A morfina não foi capaz de exercer efeitos antinociceptivos em camundongos knockout para nNOS (Leáñez et al., 2009). O agonista do receptor δ -opioide SNC80 induz antinocicepção periférica a partir da ativação da via do NO (Pacheco et al., 2005).

Já é de conhecimento que a neuropatia induz respostas inflamatórias. Poucos minutos após a lesão axonal, ocorre ativação das células de Schwann e liberação de citocinas pró-inflamatórias, fatores tróficos e quimioatraentes que recrutam macrófagos, neutrófilos e outras células inflamatórias no local da lesão. Esses mediadores ativam cascatas de sinalização que desencadeiam a sensibilização dos neurônios nociceptivos e hiperexcitabilidade, com geração espontânea de potenciais de ação ectópicos, subjacentes à sensação de dor neuropática (Kuffler, 2020). A ativação de neutrófilos contribui para resposta inflamatória, por produzir, entre outros mediadores, radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-). O NO também pode interagir com O_2^- para formar peroxinitrito (ONOO^-), uma molécula oxidante potente que pode induzir a peroxidação lipídica e danos celulares, influenciando a nocicepção por participação na degeneração Waleriana (Levy et al., 1999; Costa et al., 2002). As células da glia também participam da geração e manutenção dos sintomas da dor neuropática, a partir da liberação uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (Watkins et al., 2001).

Vários trabalhos demonstram as atividades anti-inflamatória e antioxidante do CBD, e esses efeitos são parcialmente mediados por receptores CB_2 e TRPV1 (Ligresti et al., 2016). CBD diminuiu a atividade de COX, com conseqüente diminuição da produção de

Discussão

prostaglandinas e a peroxidação lipídica em tecidos inflamados por carragenina (Costa et al., 2004b). O CBD diminuiu a inflamação no miocárdio induzida por doxorubicina por diminuir, entre outros fatores, a peroxidação lipídica e os níveis de glutatona (Hao et al., 2015). Os efeitos anti-inflamatórios do CBD estão relacionados ao controle da ativação da microglia e da liberação de mediadores pró-inflamatórios produzidos por essas células (Fernandez-Ruiz et al., 2013). Também foi relatado que o CBD é neuroprotetor, reduz os sinais de estresse oxidativo e atividade de lipoxigenase, e também modula a liberação de citocinas (Fernandez-Ruiz et al., 2013). Fouad e colaboradores (2013) demonstraram que o CBD demonstrou efeito protetor do fígado ao diminuir a expressão COX-2, peroxidação lipídica e mediadores inflamatórios e aumentar a expressão de eNOS e NO em um modelo de hepatotoxicidade induzida por cádmio.

Desso modo, sugerimos que o CBD, em nosso modelo, poderia reduzir a nocicepção por diminuição da resposta inflamatória local e do estresse oxidativo apesar de apenas nos basearmos na literatura para elencar esta hipótese, uma vez que não temos em nosso conjunto de dados nenhum resultado para embasar tal afirmação.

O NO, uma vez formado, ativa enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que promove a conversão de trifosfato de adenosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Moncada et al., 1991) e este segundo mensageiro está relacionado com o efeito antinociceptivo periférico de vários compostos analgésicos (Ferreira et al., 1991; Duarte et al., 1992; Romero et al., 2012a). Nosso trabalho avaliou a participação do GMPc no mecanismo antinociceptivo periférico do CBD utilizando o ODQ, inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, que se mostrou capaz de reverter a antinocicepção periférica induzida por canabidiol em nosso modelo experimental.

O GMPc atua principalmente nos compartimentos intracelulares do local da produção, e o padrão de expressão de guanilato ciclase na medula espinhal e nos DRGs sugere que a produção de GMPc mediada por NO pode modular o processamento da dor em diferentes locais (Schmidtke, 2015). Assim como o NO, a participação de GMPc na fisiologia da dor é conflitante, e a dose administrada parece ser relevante para esse efeito dual. Em seus trabalhos Tegeder et al. (2002 e 2004) e Schmidtke et al. (2008) demonstraram que administração intratecal de análogos do GMPc em baixas doses induziu antinocicepção, e quando administrado em altas doses, induziu hipernocicepção em vários modelos de dor. Estudos eletrofisiológicos em fatias de medula espinhal de ratos também sugerem o efeito antinociceptivo de NO e GMPc, uma vez que o tratamento dessas fatias com vários doadores de NO ou um análogo de GMPc inibiu a atividade neural nas lâminas superficiais do corno

Discussão

dorsal (Pehl et al., 1997; Schmidtko et al., 2009). Adicionalmente, o inibidor de fosfodiesterases sildenafil aumenta os níveis de GMPc citosólico induzindo analgesia periférica via ativação da via NO/GMPc/PKG (Jain et al., 2001).

Para finalizar o estudo da via e suportado pelo fato de que nosso grupo de pesquisa também já demonstrou a relação entre a via NO/GMPc e a ativação de canais para potássio na antinocicepção periférica (Rodrigues & Duarte, 2000; Soares e Duarte, 2001), bem como trabalhos de outros pesquisadores (Barreras-Espinoza et al., 2017; Zapata-Morales et al., 2018), utilizamos como ferramenta farmacológica a glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP, que reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo CBD, sugerindo a participação desse canal no evento estudado. Assim como em nosso trabalho, pesquisadores verificaram que a glibenclamida, poderia antagonizar o efeito antinociceptivo do agonista opioide morfina (Ocaña et al., 1990) bem como de anandamida (Reis et al., 2011) e PEA (Romero et al., 2012b). Estudos demonstraram que há diminuição da corrente de K_{ATP} após lesão nervosa, provavelmente por redução da abertura desses canais como parte da gênese da dor neuropática (Kawano et al., 2009a). O aumento da formação de NO a partir de um doador exógeno restaurou as correntes dos canais K_{ATP} em neurônios do DRG em ratos axotomizados por ligação do nervo espinhal, e que o bloqueio dos K_{ATP} induziu hiperalgesia e aumento da liberação de mediadores inflamatórios (Kawano et al., 2009a e 2009b). Estudos conduzidos por Chi e colaboradores (2007) demonstram que a ativação do K_{ATP} pode reverter a sensibilização produzida pela PGE_2 em neurônios sensoriais periféricos.

Em neurônios e outras células excitáveis, os receptores acoplados à proteína G podem ativar canais para potássio retificadores de entrada (Kir), dentre os quais estão os K_{ATP} . Os canais K_{ATP} podem ser inibidos por concentrações fisiológicas de ATP intracelular; (Chi et al., 2007). Esses canais estão envolvidos em várias funções celulares, como regulação da liberação de insulina, do fluxo sanguíneo no tecido muscular, cardíaco e renal, e nos neurônios a ativação desses canais aumenta o efluxo desse íon, resultando em hiperpolarização da membrana e redução da excitabilidade neuronal (Mackie et al., 1995; Chi et al., 2007). Algumas drogas, como diclofenaco (Alves et al., 2004), cetarolaco (Lazaro-Ibanez et al., 2001), morfina (Rodrigues & Duarte., 2000) e resveratrol (Granados-Soto et al., 2002) produzem analgesia periférica por ativação da via NO/ K_{ATP} .

Além da antinocicepção, outros trabalhos já demonstraram a participação de canais para potássio nas ações induzidas pelo CBD. Foi demonstrado que o CBD causa relaxamento de

Discussão

artéria mesentérica humana e que esse efeito é mediado NO e ativação de canais para potássio (Stanley et al., 2015; Wheal et al., 2017).

Foi demonstrado em um modelo *in vitro* que os canabinoides anandamida e Win 55,212-2 ativam canais Kir e inibem canais para cálcio, provocando hiperpolarização celular, via receptores CB₁ (Mackie et al., 1995). Esses resultados estão em consonância com a transdução de sinal dos receptores canabinoides, e corroboram nossos resultados que demonstraram o envolvimento tanto dos receptores canabinoides quanto dos canais K_{ATP} no evento antinociceptivo induzido pelo CBD.

Após analisar esse conjunto de dados, nós sugerimos que, como possível mecanismo de ação, o canabidiol, de forma direta ou indireta, ativa receptores canabinoides e/ou opioides, com posterior ativação da via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP} e consequente hiperpolarização celular, culminando com a antinocicepção periférica observada em nossos resultados.

Como já citado anteriormente, devido à sua baixa afinidade pelos receptores canabinoides demonstrado em *in vitro*, vários trabalhos sugerem que o mecanismo de ação do CBD não envolva ativação direta desses receptores (Bi et al., 2019). Desse modo, avaliamos a participação do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} e do receptor de potencial transiente vaniloide tipo 1 (TRPV1). Assim, utilizamos o NAN-190, antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, e o SB-366791, antagonista seletivo de TRPV1, que reverteram, ambos de maneira parcial, a antinocicepção periférica induzida pelo canabidiol frente a animais neuropáticos por CNC.

A serotonina, importante neurotransmissor no contexto de antinocicepção central, é classicamente classificada como agente hiperalgésico quando administrada periféricamente (Nascimento, 2011). Entretanto, nosso grupo de pesquisa demonstrou, pela primeira vez, que a serotonina administrada em baixas doses periféricamente induz antinocicepção (Diniz et al., 2015). A serotonina apresenta importante papel na mudança fenotípica dos nociceptores e seus efeitos resultam de sua interação com receptores pertencentes a sete famílias, divididos em pelo menos quatorze subtipos, que apresentam ampla distribuição no sistema nervoso central e periférico, bem como em vários outros tecidos (Hoyer et al., 1994 e 2002; Sanders-Bush & Hazelwood, 2011).

Os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} são acoplados à proteína G_{i/o}, e sua ativação inibe a adenilato ciclase e ativa canais K⁺, com posterior diminuição da excitabilidade neuronal. Estão distribuídos tanto no SNC quanto em terminais periféricos de fibras aferentes sensoriais

Discussão

primárias (Barnes & Sharp, 1999; Granados-Soto et al., 2010). No corno dorsal espinhal, os ligantes pré-sinápticos dos receptores 5-HT_{1A} inibem correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas por fibras aferentes primárias tipo A δ e C (Jeong et al., 2012). Estudos relatam que os receptores 5-HT_{1A} estão envolvidos na antinocicepção periférica (Granados-Soto et al., 2010) e central (Maione et al., 2011) e sua ativação também demonstra potente efeito antineuropático (Colpaert et al., 2004; Aira et al., 2010; Avila-Rojas et al., 2015).

Pesquisas *in vitro* demonstram que o CBD possui atividade agonística moderada nos receptores 5-HT_{1A} (Russo et al., 2005) e alguns dos efeitos induzidos por essa ligação, como atividade ansiolítica, antidepressivo e neuroproteção, podem ser parcialmente inibidos por antagonistas seletivos desses receptores (Ligresti et al., 2016). Jesus e colaboradores (2019) sugerem que o canabidiol diminuiu a alodínia mecânica em ratos com diabetes induzida por streptozotocina, e que esse efeito foi atenuado pelo bloqueio dos receptores 5-HT_{1A}. Ward e colaboradores (2014) demonstraram que o CBD preveniu a sensibilidade mecânica em um modelo de dor neuropática induzida pelo paclitaxel, e que o uso do antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635, atenuou esse efeito antinociceptivo. Esses resultados estão em consonância com o resultado que apresentamos no presente estudo, uma vez que em nosso modelo o efeito antinociceptivo do CBD foi mediado em parte pelos receptores 5-HT_{1A}.

O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo, mas altamente permeável ao Ca²⁺, possui 6 domínios transmembrana e pertence à família dos receptores de potencial transiente (TRP). Pode ser encontrado no SNC e em alguns tecidos não neuronais, e é particularmente abundante em neurônios sensoriais, principalmente em fibras C e A δ , que desempenham papel chave da detecção de estímulos dolorosos nocivos como calor ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) e acidez (Maione et al., 2006a). Esses receptores podem ser ativados por vários ligantes endógenos, os chamados “endovaniloides”, e entre eles estão a AEA, NADA, e alguns metabólitos de lipoxigenases como leucotrienos e ácido 12 -S- hidroxiperoxi-eicosatetraenoico (Starowicz & Przewlocka, 2012), e também por ligantes exógenos, como a capsaicina e outra toxina de planta, a resiniferatoxina (Di Marzo et al., 2002).

Existem fortes evidências de que não apenas a sensibilidade, mas também a densidade de TRPV1 é aumentada nos neurônios do DRG durante condições inflamatórias e neuropáticas, e dentro das fibras nervosas no local da inflamação (Amaya et al., 2003; Rashid et al., 2003; Maione et al., 2006a). A capsaicina, agonista TRPV1, vaniloide irritante presente em pimentas, excita os neurônios sensoriais por ação direta agindo em TRPV1 presentes nos terminais nervosos sensoriais que gera potenciais de ação percebidos como dor em queimação e,

Discussão

posteriormente, evoca um estado refratário tradicionalmente chamado dessensibilização, no qual os neurônios previamente excitados não respondem mais a estímulos dolorosos. Acredita-se que este último fenômeno seja o responsável pela analgesia causada pela capsaicina e outros agonistas TRPV1 (Costa et al., 2004a).

Nos trabalhos conduzidos por Bisogno e colaboradores (2001) foi demonstrado que o CBD, comparado à capsaicina, é um agonista de TRPV1. O CBD dessensibilizou o TRPV1 à ação da capsaicina, abrindo assim a possibilidade de que este fitocanabinoide exerça suas ações, em parte, pela dessensibilização dos nociceptores sensoriais. Esse resultado, juntamente com o resultado das pesquisas conduzidas por Costa e colaboradores (2004a), que demonstraram que o antagonista seletivo para TRPV1, capsazepina, reverteu, de maneira parcial, o efeito antinociceptivo induzido pelo CBD em um modelo de dor inflamatória, justificam e corroboram nosso resultado que demonstrou a participação parcial de TRPV1 em nosso modelo experimental utilizando o CBD, possivelmente por dessensibilização desses receptores, e consequente diminuição da excitabilidade neuronal. A ação direta do CBD nos receptores vaniloides foi confirmada pela técnica de eletrofisiologia patch-clamp (Iannotti et al., 2014) e pesquisas demonstraram que o CBD exerce seus efeitos através da ativação/dessensibilização de TRPV1, modulando ansiedade e dor (Ligresti et al., 2016). De maneira complementar, Costa et al. (2007) e Comelli et al. (2008) sugerem que o efeito antinociceptivo do CBD frente a dor neuropática por constrição do nervo ciático ocorre por dessensibilização de TRPV1, e ainda, De Gregório et al. (2019) demonstraram que o efeito antialodínico do CBD foi revertido pelo uso do antagonista de TRPV1 capsazepina em modelo animal de neuropatia induzida por ligação de nervo espinhal.

Após essa série de experimentos, nossos resultados mostram que o canabidiol possui efeito antinociceptivo quando administrado periféricamente frente à neuropatia induzida por constrição do nervo ciático, através de complexo mecanismo de ação, uma vez que envolve participação de diversos sistemas analgésicos endógenos, que podem ser ativados simultaneamente ou em série. Nossa proposta para explicar o mecanismo de ação do CBD envolve várias hipóteses: (i) o CBD ativaria diretamente aos receptores CB₁ e CB₂ canabinoides expressos nos nociceptores, causando antinocicepção por inibição da excitação neuronal via sua transdução por G_i; (ii) o CBD poderia exercer controle negativo da síntese endocanabinoides, diminuindo cálcio intracelular mais uma vez pela ativação dos receptores canabinoides com sua ação inibitória via transdução do sinal por G_i, além de poder reduzir os níveis de anandamida por aumento da atividade de FAAH; (iii) o CBD poderia se ligar aos

Discussão

receptores canabinoides presentes em queratinócitos e células imunes, induzindo liberação de peptídeos opioides, que ativariam receptores opioides presentes nos nociceptores, e subsequente antinocicepção via Gi; (iv) o CBD poderia induzir antinocicepção por ativação da via PI3K/AKT/mTOR/NO/GMPc/K_{ATP} de forma indireta à partir da subunidade Gi/βγ da proteína G acoplada aos receptores canabinoides e opioides, com consequente hiperpolarização neuronal; (v) O CBD ativaria os receptores 5-HT_{1A} presente nos nociceptores, induzindo analgesia por diminuição da excitabilidade neuronal; e (vi) o CBD poderia também induzir ativação com posterior dessensibilização de TRPV1, com subsequente analgesia.

Embora nossos dados não nos permitam tal afirmação, podemos hipotetizar também que o CBD induza seu efeito antinociceptivo a partir de ações sinérgicas dos sistemas analgésicos endógenos, uma vez que literatura indica que a ativação do CB₁ pode sensibilizar TRPV1 ao efeito de seus agonistas quando esses dois receptores são co-expressos nas mesmas células e neurônios periféricos co-expressam esses receptores (Maione et al., 2006b), bem como neurônios da PAG podem ser co-expressos com receptores μ opioide e TRPV1 (Maione et al., 2009); receptores CB₂ podem formar heterodímeros com receptores TRPV1 (Burstein, 2015); receptores CB₁ poderiam formar heterodímeros com receptores μ opioide (Rios et al., 2006); além da interação entre receptores μ opioide e 5-HT_{1A} no controle da nocicepção (Millan & Colpaert, 1990).

Tendo em vista a complexidade dos mecanismos evocados pelo CBD ao nível periférico e as limitações de tempo e orçamento deste projeto, não nos furtamos da possibilidade de fazer novos experimentos para corroborar ou refutar as hipóteses propostas neste trabalho.

7. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLUWALIA, J.; URBAN, L.; CAPOGNA, M.; BEVAN, S.; NAGY, I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurones. *Neuroscience*. 100: 685–688, 2000.

AIRA, Z.; BUESA, I.; SALGUEIRO, M.; BILBAO, J.; AGUILERA, L.; ZIMMERMANN, M.; AZKUE, J. J. Subtype-specific changes in 5-HT receptor-mediated modulation of C fibre-evoked spinal field potentials are triggered by peripheral nerve injury. *Neuroscience*. 168:831-841, 2010.

ALGER B. E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*. 68: 247-86, 2002.

ALENCAR, N. L. Medicinal Plants Prescribed in the Hospital of the São Bento Monastery between 1823 and 1824 in Olinda – Northeastern Brazil. *The Open Complementary Medicine Journal*. 74-79, 2010.

ALMEIDA, R. T.; ROMERO, T. R.; ROMERO, M. G.; DE SOUZA, G. G.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. Endocannabinoid mechanism for orofacial antinociception induced by electroacupuncture in acupoint St36 in rats. *Pharmacol Rep*. 68:1095-1101, 2016.

ALMEIDA-SANTOS, A.F.; FERREIRA, R.C.; DUARTE, I.D.; AGUIAR, D.C.; ROMERO, T.R.; MOREIRA, F.A. The antipsychotic aripiprazole induces antinociceptive effects: Possible role of peripheral dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol*. 15;765:300-6, 2015.

ALSHERBINY, M. A.; LI, C. G. Medicinal Cannabis-Potential Drug Interactions. *Medicines*. 23:6(1). pii: E3, 2018.

Referências Bibliográficas

ALVAREZ, F. J.; LAFUENTE, H.; REY-SANTANO, M. C.; MIELGO, V. E.; GASTIASORO, E. RUEDA, M.; PERTWEE, R. G.; CASTILLO, A. I.; ROMERO, J.; MARTINEZ-ORGADO, J. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res.* 64: 653–658, 2008.

ALVES, D. P.; TATSUO, M. A.; LEITE, R.; DUARTE, I. D. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. *Life Sci.* 74:2577-2591, 2004.

AMARANTE, L. H.; ALVES, D. P.; DUARTE, I. D. Study of the involvement of K⁺ channels in the peripheral antinociception of the kappa-opioid receptor agonist bremazocine. *Eur J Pharmacol.* 494:155-60, 2004.

AMAYA F., OH-HASHI K., NARUSE Y., IJIMA N., UEDA M., SHIMOSATO G., TOMINAGA M., TANAKA Y., TANAKA M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res.* 963:190–196, 2003.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°10, de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências, Brasília, 2010. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 13, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos Brasília, 2013a. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014_14_03_2013.pdf. Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

Referências Bibliográficas

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 18, de 3 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e officinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do sistema Único de Saúde – SUS. Brasília, 2013b. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0018_03_04_2013.pdf Acesso em 25 fevereiro de 2019.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, 2014. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3171284/RDC_26_2014_COMP.pdf/aa3877d0-67d2-48a4-8e46-b9502092df0f . Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 17, de 6 de maio de 2015. Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. Brasília, 2015. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/%281%29RDC_17_2015_COMP.pdf/9d27a357-8a83-4246-a0b3-2711ef7ad916?version=1.0 Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 156, de 3 de maio de 2017a. Dispõe sobre a alteração das Resoluções da Diretoria Colegiada - RDC n° 64/2012, n° 29/2013, n° 42/2014, n° 01/2015, n° 11/2015, n° 71/2016 e n° 104/2016, para a inclusão, alteração e exclusão de Denominações Comuns Brasileiras – DCB, na lista completa das DCB da Anvisa. Brasília, 2017. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_156_2017_.pdf/8513f1a8-8f85-436a-a48c-1ae3e4c6556b Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017b.

Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/lista-oficial-de-farmacos-inclui-cannabis-/219201 Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

Referências Bibliográficas

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019a. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=cannabis-normas-para-uso-medicinal-entram-em-consulta&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=5528808&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content Acesso em 15 de Agosto de 2019.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 327, de 09 de dezembro de 2019b. Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. Brasília, 2019. Disponível em <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-327-de-9-de-dezembro-de-2019-232669072> Acesso em 20 de fevereiro de 2020.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019c. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5711081&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=entenda-produtos-derivados-de-cannabis&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Dcannabis%26_3_cur%3D1%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_format%3D%26_3_formDate%3D1441824476958&inheritRedirect=true

Referências Bibliográficas

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2020a. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-simplifica-importacao-de-canabidiol/219201?inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-2%26p_p_col_count%3D1%26p_r_p_564233524_tag%3Dcanabidiol acesso em 20 de fevereiro de 2020.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 335 de 24 de janeiro de 2020b. Define os critérios e os procedimentos para a importação de Produto derivado de Cannabis, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. Brasília, 2020. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867344/RDC_335_2020_.pdf/e4ca7e95-f5af-4212-9360-d662c50018e2 Acesso em 20 de fevereiro de 2020.

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S.; NURMIKKO, T. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: revision. *Eur. J. Neurol.* 17:1113-1123, 2010.

AUSTIN, P. J.; MOALEM, T. G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines, *Journal of Neuroimmunology.* 229:26-50, 2010.

AVILA-ROJAS, S. H.; VELÁZQUEZ-LAGUNAS, I.; SALINAS-ABARCA, A. B.; BARRAGÁN-IGLESIAS, P.; PINEDA-FARIAS, J. B.; GRANADOS-SOTO, V. Role of spinal 5-HT_{5A}, and 5-HT_{1A/1B/1D}, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res.* 1622:377-85, 2015.

BAMBICO, F. R.; KATZ, N.; DEBONNEL, G.; GOBBI, G. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci.* 27:11700-11, 2007.

Referências Bibliográficas

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 38:1083–1152, 1999.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. 9:807-819, 2010.

BARRERAS-ESPINOZA, I.; SOTO-ZAMBRANO, J. A.; SERAFÍN-HIGUERA, N.; ZAPATA-MORALES, R.; ALONSO-CASTRO, A.; BOLOGNA-MOLINA, R.; ISIODIA-ESPINOZA, M. A. The antinociceptive effect of a Tapentadol-ketorolac combination in a mouse model of trigeminal pain mediated by opioid receptors and ATP-sensitive K⁺ channels. *Drug Development Research*. 78:63–70, 2017.

BARROT, M.; YALCIN, I.; CHOUCAIR-JAAFAR, N.; BENBOUZID, M.; FREUND-MERCIER, M. J. From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain. *Recent Pat.C.N. S Drug Discov*. 4:182e18, 2009.

BARROT, M.; YALCIN, I.; TESSIER, L. H.; FREUND-MERCIER, M. J. Antidepressant treatment of neuropathic pain: looking for the mechanism. *Future Neurol*. 5:247-257, 2010.

BASBAUM, A. I., JESSELL, T. The perception of pain. In *Principles of Neuroscience*. E.R. Kandel, J. Schwartz, and T. Jessell, eds. (New York: Appleton and Lange). 472–491, 2000.

BASBAUM, A. I., BAUTISTA, D. M., SCHERRER, G., JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*. 139:267-284, 2009.

BELEZA, J. A. M. Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais prescritores. Monografia - Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, 2016.

BELTRAMO, M.; BERNARDINI, N.; BERTORELLI, R.; CAMPANELLA, M.; NICOLUSSI, E.; FREDDUZZI, S.; REGGIANI, A. CB2 receptor mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci*. 23:1530 –1538, 2006.

Referências Bibliográficas

BENBOUZID, M.; CHOUCAIR-JAAFAR, N.; YALCIN, I.; WALTISPERGER, E.; MULLER, A., FREUND-MERCIER, M.J., BARROT, M. Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur. J. Pain.* 12:1008-1017, 2008a.

BENBOUZID, M.; GAVÉRIAUX-RUFF, C.; YALCIN, I.; WALTISPERGER, E.; TESSIER, L.H.; MULLER, A.; KIEFFER, B.L.; FREUND-MERCIER, M.J.; BARROT, M. Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol. Psychiatry.* 63: 633-636, 2008b.

BI, G. H.; GALAJ, E.; HE, Y.; XI, Z. X. Cannabidiol inhibits sucrose self-administration by CB1 and CB2 receptor mechanisms in rodents. *Addict Biol.* 19:12783, 2019.

BISOGNO, T.; SEPE, N.; MELCK, D.; MAURELLI, S.; DE PETROCELLIS, L. DI MARZO, V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J.* 322:671-7, 1997.

BISOGNO, T.; HANUS, L.; DE PETROCELLIS, L.; TCHILIBON, S.; PONDE, D. E.; BRANDI, I.; MORIELLO, A. S.; DAVIS, J. B.; MECHOULAM, R.; DI MARZO, V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 134:845-52, 2001.

BOHREN, Y.; KARAVELIC, D.; TESSIER, L. H.; YALCIN, I.; GAVÉRIAUX-RUFF, C.; KIEFFER, B.L.; FREUND-MERCIER, M. J.; BARROT, M. Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur. J. Pain.* 14:700-704, 2010.

BOOZ, G. W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 51:1054-1061, 2011.

BOURON, A. Phyto and endocannabinoids exert complex actions on calcium and zinc signaling in mouse cortical neurons. *Biochem Pharmacol.* 152:244-251, 2018.

Referências Bibliográficas

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. DECRETO nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Brasília, 2006a. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, 2006b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>. Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS – RENISUS, 2009. Disponível em:
<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf> Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

BRINDISI, M.; MARAMAI, S.; GEMMA, S.; BROGI, S.; GRILLO, A.; DI CESARE MANNELLI, L.; GABELLIERI, E.; LAMPONI, S.; SAPONARA, S.; GORELLI, B.; TEDESCO, D.; BONFIGLIO, T.; LANDRY, C.; JUNG, K. M.; ARMIROTTI, A.; LUONGO, L.; LIGRESTI, A.; PISCITELLI, F.; BERTUCCI, C.; DEHOUCK, M. P.; CAMPIANI, G.; MAIONE, S.; GHELARDINI, C.; PITTALUGA, A.; PIOMELLI, D.; DI MARZO, V.; BUTINI, S. Development and Pharmacological Characterization of Selective Blockers of 2-Arachidonoyl Glycerol Degradation with Efficacy in Rodent Models of Multiple Sclerosis and Pain. *J Med Chem.* 59:2612-32, 2016.

BRUNNER, T. F. Marijuana in ancient Greece and Rome? The literary evidence. *Bull Hist Med.* 47:344-355, 1973.

BUSHLIN, I.; ROZENFELD, R.; DEVI, L. A. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 10:80–86, 2010.

BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg Med Chem.* 23:1377-1385, 2015.

Referências Bibliográficas

CABOT, P. J.; CARTER, L.; GAIDDON, C.; ZHANG, Q.; SCHÄFER, M.; LOEFFLER, J. P.; STEIN, C. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest.* 100:142-148, 1997.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 8:766-75, 2007.

CALAINHO, D. B. Jesuítas e Medicina no Brasil Colonial. *Tempo.* 19:61-75, 2005.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; GIUFFRIDA, A.; PIOMELLI, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 394: 277–281, 1998.

CAMPOS, V. P.; CRUZ, L. P. S.; ALVES, E. M.; SANTOS, T. S.; SILVA, A. D.; SANTOS, A. C. C.; LIMA, A. M. V.; PAIXÃO, C. S.; SANTOS, D. C. M. B.; BRANDÃO, D. S.; ANDRADE, E. J. S.; MOREIRA JR., J. I.; CONCEIÇÃO, K. C. S.; RAMOS, M. S.; PONTES, M. C. G.; AMARAL, M. F.; MATTOS, R. R. Monitoramento atmosférico passivo de SO₂, NO₂ e O₃ em áreas urbanas e de influência industrial como prática de química ambiental para alunos de graduação. *Quím. Nova.* 29:872-875, 2006.

CAMPOS, A. C.; MOREIRA, F. A.; GOMES, F. V.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:3364-3378, 2012.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain. Its possible role in the febrile response. *Brain Res.* 697: 187-196, 1995.

CARLINER, H.; BROWN, Q. L.; SARVET, A. L.; HASIN, D. S. Cannabis use, attitudes, and legal status in the U.S.: A review. *Prev Med.* 104:13-23, 2017.

CARLINI, E. A.; KRAMER, C. Effects of *Cannabis sativa* (marihuana) on maze performance of the rat. *Psychopharmacologia.* 7:175-81, 1965.

Referências Bibliográficas

CARLINI, E. A. Tolerance to chronic administration of *Cannabis sativa* (marihuana) in rats. *Pharmacology*. 1:135-42, 1968.

CARLINI, E. A.; MASUR, J. Development of aggressive behavior in rats by chronic administration of *Cannabis sativa* (marihuana). *Life Sci*. 8:607-20, 1969.

CARLINI, E. A.; LEITE, J. R.; TANNHAUSER, M.; BERARDI, A. C. Letter: Cannabidiol and *Cannabis sativa* extract protect mice and rats against convulsive agents. *J Pharm Pharmacol*. 25:664-5, 1973.

CARLINI, E. A.; CUNHA, J. M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol*. 21:417S-427S, 1981.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. *Lancet*. 353:2051-2058, 1999.

CARRIER, E. J.; AUCHAMPACH, J. A.; HILLARD, C. J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A*. 103:7895–900, 2006.

CASANOVA, M. L.; BLÁZQUEZ, C.; MARTÍNEZ-PALACIO, J.; VILLANUEVA, C.; FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M. J.; HUFFMAN, J. W.; JORCANO, J. L.; GUZMÁN, M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*. 111:43-50, 2003.

CASTILLO, A.; TOLÓN, M. R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ROMERO, J.; MARTINEZ-ORGADO, J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB (2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis*. 37:434-440, 2010.

CASTILLO, P. E.; YOUNTS, T. J.; CHÁVEZ, A. E.; HASHIMOTODANI, Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 76:70-81, 2012.

Referências Bibliográficas

CHALLA, S. R. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int J Neurosci.*125:170-4, 2015.

CHI, X. X.; JIANG, X.; NICOL, G. D. ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE₂-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. *Brain Res.* 1145:28–40, 2007.

CHIAPPEDI, M.; BEJOR, M. Herbals and natural dietary supplements in psychiatric practice. *Recent Pat.C.N.S Drug Discov.* 5:164-171, 2010.

CHOPRA, I. C.; CHOPRA, R. W. The use of cannabis drugs in India. *Bull. Narcotics.* 9:4-29, 1957.

CHU, D.; ZHANG, Z. Trichosanthis Pericarpium Aqueous Extract Protects H9c2 Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation Injury by Regulating PI3K/Akt/NO Pathway. *Molecules.* 23 pii: E2409, 2018.

CLIFFORD, J.; WOOLF, M. D. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine.* 140:441-451, 2004.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ.* 348:7656, 2014.

COMELLI, F.; GIAGNONI, G.; BETTONI, I.; COLLEONI, M.; COSTA B. Antihyperalgesic effect of a Cannabis sativa extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phytother Res.* 22:1017-1024, 2008.

CONSROE, P.; SANDYK, R.; SNIDER, S. R. Open label evaluation of cannabidiol in dystonic movement disorders. *Int J Neurosci.* 30: 277–282, 1986.

COLPAERT, F. C.; WU, W. P.; HAO, J. X.; ROYER, I.; SAUTEL, F.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; XU, X. J. High-efficacy 5-HT_{1A} receptor activation causes a curative-like action on allodynia in rats with spinal cord injury. *Eur J Pharmacol.* 497:29-33, 2004.

Referências Bibliográficas

COSTA, B.; CONTI, S.; GIAGNONI, G.; COLLEONI, M. Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems. *Br. J. Pharmacol.* 37:413–420, 2002.

COSTA, B.; GIAGNONI, G.; FRANKE, C.; TROVATO, A. E.; COLLEONI, M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol.* 143:247–50, 2004a.

COSTA, B.; COLLEONI, M.; CONTI, S.; PAROLARO, D.; FRANKE, C.; TROVATO, A. E.; GIAGNONI, G. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369:294-9, 2004b.

COSTA, B.; TROVATO, A. E.; COMELLI, F.; GIAGNONI, G.; COLLEONI, M. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 556:75-83, 2007.

CRIVELARO DO NASCIMENTO, G.; FERRARI, D. P.; GUIMARAES, F. S.; DEL BEL, E. A.; BORTOLANZA, M.; FERREIRA-JUNIOR, N. C. Cannabidiol increases the nociceptive threshold in a preclinical model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 163:107808, 2020.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci.* 32:1-32, 2009.

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. ESALQ/USP, 2005. Base de dados. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf. Acesso em 24/02/2019.

CUNHA, T. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C. M.; DUARTE, H. L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W. A. JR.; FUNEZ, M. I.; DIAS, Q. M.; SCHIVO, I. R.; DOMINGUES, A. C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M. M.; HOTHERSALL, J. S.; CRUZ, J. S.;

Referências Bibliográficas

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:4442-4447, 2010.

CUNHA, T. M.; SOUZA, G. R.; DOMINGUES, A. C.; CARREIRA, E.U.; LOTUFO, C. M.; FUNEZ, M. I.; VERRI, W. A. JR, CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol Pain*. 8:8-10, 2012.

CURTIS, D. H.; HOSLI, L.; JOHNTON, G. A. R. A pharmacological study of the depression spinal neurons by glycine and related amino acids. *Experimental Brain Research*. 6:1-18, 1968.

DHAWAN, B. N.; CESSSELIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T. BRADLEY, P. B.; PORTOGHESE, P. S.; HAMON, M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.*, 48:567-592, 1996.

DE ALBA, J.; CLAYTON, N. M.; COLLINS, S. D.; COLTHUP, P.; CHESSELL, I.; KNOWLES, R. G. GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 120:170-81, 2006.

DE GREGORIO, D.; MCLAUGHLIN, R.J.; POSA, L.; OCHOA-SANCHEZ, R.; ENNS, J.; LOPEZ-CANUL, M.; ABOUD, M.; MAIONE, S.; COMAI, S.; GOBBI, G. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*. 160:136-150, 2019.

DENG, L.; GUINDON, J.; VEMURI, V. K.; THAKUR, G. A.; WHITE, F. A.; MAKRIYANNIS, A.; HOHMANN, A. G. The maintenance of cisplatin- and paclitaxel-induced mechanical and cold allodynia is suppressed by cannabinoid CB₂ receptor activation and independent of CXCR4 signaling in models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Mol Pain*. 8:71, 2012.

Referências Bibliográficas

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A. 3RD.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34:605-13, 1988.

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.* 258:1946-1949, 1992.

DICKENSON, A. H. Spinal cord pharmacology of pain. *Brazilian Journal of Anaesthesiology.* 75:193-200, 1995.

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.* 372:686-91, 1994.

DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21: 521–528, 1998.

DI MARZO, V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci.* 65:645–655, 1999.

DI MARZO, V.; GOPARAJU, S. K.; WANG, L.; LIU, J.; BATKAI, S.; JARAI, Z. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature.* 410:22–825, 2001.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L.; FEZZA, F.; LIGRESTI, A.; BISOGNO, T. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66:377-91, 2002.

Referências Bibliográficas

DIAS, J. P. S. A farmácia e a história: uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2005, 83 p. Disponível em: < <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacia-e-Historia.pdf>>. Acesso em: 19 janeiro de 2019.

DINH, T. P.; FREUND, T. F.; PIOMELLI, D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*. 121:149-58, 2002.

DINIZ, D. A.; PETROCCHI, J. A.; NAVARRO, L. C.; SOUZA, T. C.; CASTOR, M. G.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D.; ROMERO, T. R. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. *Eur J Pharmacol*. 767:94-97, 2015.

DINIZ, D. A.; PETROCCHI, J. A.; NAVARRO, L. C.; SOUZA, T. C.; CASTOR, M. G. M. E.; DUARTE, I. D. G.; ROMERO, T. R. L. Serotonin induces peripheral antinociception via the opioidergic system. *Biomed Pharmacother*. 97:1434-1437, 2018.

DUARTE, I. D.; FERREIRA, S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol*. 221: 171-174, 1992.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detection of neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 46:208–209, 1957.

DWORKIN, R. H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M. C.; ALLEN, R. R.; ARGOFF, C. R.; BENNETT, G. J.; BUSHNELL, M. C.; FARRAR, J. T.; GALER, B. S.; HAYTHORNTHWAITE, J. A.; HEWITT, D. J.; LOESER, J. D.; MAX, M. B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K. E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D. C.; WALLACE, M. S.; WATKINS, L. R.; WEINSTEIN, S. M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*. 60:1524-34, 2003.

Referências Bibliográficas

EGERTOVA, M.; SIMON, G. M.; CRAVATT, B. F.; ELPHICK, M. R. Localization of *N*-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: a new perspective on *N*-acylethanolamines as neural signaling molecules. *J Comp Neurol* 506:604–615, 2008.

EL-MAS, M. M.; FAN, M.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Facilitation of myocardial PI3K/Akt/nNOS signaling contributes to ethanol-evoked hypotension in female rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 33:1158-1168, 2009.

ELLIOTT, D. M.; SINGH, N.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Cannabidiol Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis Through Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Front Immunol*. 9:1782, 2018.

ESPOSITO, G.; DE FILIPPIS, D.; MAIURI, M. C.; DE STEFANO, D.; CARNUCCIO, R.; IUVONE, T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in β -amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF- κ B involvement. *Neurosci. Lett*. 399:91–95, 2006.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; SAGREDO, O.; PAZOS, M. R.; GARCÍA, C.; PERTWEE, R.; MECHOULAM, R.; MARTÍNEZ-ORGADO, J. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br J Clin Pharmacol*. 75:323-33, 2013.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol*. 201:121-122, 1991.

FIGUEIREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JÚNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. *Physis Revista de Saúde Coletiva*. 24:381-400, 2014.

FINNERUP, N. B.; OTTO, M.; MCQUAY, H. J.; JENSEN, T. S.; SINDRUP, S.H. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain*. 118:289-305, 2005.

Referências Bibliográficas

FOGAÇA, M. V.; REIS, F. M.; CAMPOS, A. C.; GUIMARAES, F. S. Effects of intra-prelimbic pré-frontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT_{1A} receptors and previous stressful experience. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24: 410–419, 2014.

FONSECA, M.C.M. Epamig - pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.

FOUAD, A. A.; AL-MULHIM, A. S.; GOMAA, W. Protective effect of cannabidiol against cadmium hepatotoxicity in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 27:355-63, 2013.

FOX, A.; KESINGLAND, A.; GENTRY, C.; MCNAIR, K.; PATEL, S.; URBAN, L.; JAMES, I. F. The role of central and peripheral cannabinoid₁ receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain.* 92: 91–100, 2001.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem.* 61: 201-8, 2008.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D.; SIBLEY, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Ver.* 62:525–563, 2010.

GABRIELLI, M.; BATTISTA, N.; RIGANTI, L.; PRADA, I.; ANTONUCCI, F.; CANTONE, L.; MATTEOLI, M.; MACCARRONE, M.; VERDERIO, C. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep.* 16:213–220, 2015.

GALAJ, E.; BI, G. H.; YANG, H. J., XI, Z.X. Cannabidiol attenuates the rewarding effects of cocaine in rats by CB₂, 5-TH_{1A} and TRPV₁ receptor mechanisms. *Neuropharmacology.* 19:107740, 2019.

Referências Bibliográficas

GALDINO, G.; ROMERO, T. R.; SILVA, J. F.; AGUIAR, D. C.; DE PAULA, A. M.; CRUZ, J. S.; PARRELLA, C.; PISCITELLI, F.; DUARTE, I. D.; DI MARZO, V.; PEREZ, A. C. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology*. 77:313-24, 2014.

GARCIA-ARENCEBIA, M.; GONZALEZ, S.; DE LAGO, E.; RAMOS, J.A.; MECHOULAM, R.; FERNANDEZ-RUIZ, J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res*. 1134: 162–170, 2007.

GIACOPPO, S.; POLLASTRO, F.; GRASSI, G.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Target regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway by cannabidiol in treatment of experimental multiple sclerosis. *Fitoterapia*. 116:77-84, 2017.

GOMES, F. V.; REIS, D. G.; ALVES, F. H.; CORREA, F.M.; GUIMARÃES, F. S.; RESSEL, L. B. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. *J Psychopharmacol*. 26: 104–113, 2012.

GÓMEZ DEL PULGAR, T.; DE CEBALLOS, M.L.; GUZMÁN, M.; VELASCO, G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem*. 277:36527-36533, 2002.

GONG, J. P.; ONAIVI, E. S.; ISHIGURO, H.; LIU, Q. R.; TAGLIAFERRO, P. A.; BRUSCO, A.; UHL, G. R. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 1071:10–23, 2006.

GRANADOS-SOTO, V.; ARGUELLES, C. F.; ORTIZ, M. I. The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacology*. 43:917-923, 2002.

Referências Bibliográficas

GRANADOS-SOTO, V.; ARGUELLES, C. F.; ROCHA-GONZALEZ, H. I.; GODINEZ-CHAPARRO, B.; FLORES-MURRIETA, F. J.; VILLALON, C. M. The role of peripheral 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience*, 165:561-568, 2010.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126:131–138, 1982.

GUAN, Y., YASTER, M., RAJA, S. N. & TAO, Y. X. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain*, 3:29, 2007.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol*. 153:319334, 2008.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The Endocannabinoid System and Pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 8:403-421, 2009.

GUINDON, J.; GUIJARRO, A.; PIOMELLI, D.; HOHMANN, A. G. Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol*. 163:1464-1478, 2011.

HAMMELL, D. C.; ZHANG, L. P.; MA, F.; ABSHIRE, S. M.; MCILWRATH, S.L.; STINCHCOMB, A. L.; WESTLUND, K. N. Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *Eur J Pain*. 20:936-48, 2016.

HAO, E. K.; MUKHOPADHYAY, P.; CAO, Z. X.; ERDELYI, K.; HOLOVAC, E.; LIAUDET, L.; LEE, W. S.; HASKO, G.; MECOULAM, R.; PACHER, P. Cannabidiol protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by modulating mitochondrial function and biogenesis. *Mol Med*. 21: 38–45, 2015.

Referências Bibliográficas

HARRIS, H. M.; SUFKA, K. J.; GUL, W.; ELSOHLY, M. A. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. *Planta Med.* 82:1169-1172, 2016.

HARTMANN, A.; LISBOA, S. F.; SONEGO, A. B.; COUTINHO, D., GOMES, F. V. GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 94:109637, 2019.

HERVERA, A., NEGRETE, R., LEANEZ, S., MARTIN-CAMPOS, J. M. & POL, O. The spinal cord expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases and their contribution in the maintenance of neuropathic pain in mice. *PLoS One*, 5, e14321, 2010a.

HERVERA, A., NEGRETE, R., LEANEZ, S., MARTIN-CAMPOS, J. & POL, O. The role of nitric oxide in the local antiallodynic and antihyperalgesic effects and expression of delta-opioid and cannabinoid-2 receptors during neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 334:887-896, 2010b.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav. Pharmacol.* 16:333-352, 2005.

HOGGART, B.; RATCLIFFE, S.; EHLER, E.; SIMPSON, K. H.; HOVORKA, J.; LEJČKO, J.; TAYLOR, L.; LAUDER, H.; SERPELL, M. A multicentre, open-label, follow-on study to assess the long-term maintenance of effect, tolerance and safety of THC/CBD oromucosal spray in the management of neuropathic pain. *J Neurol.* 262:27-40, 2015.

HOJO, M.; SUDO, Y.; ANDOY, MINAMI, K.; TAKADA, M.; MATSUBARA, T.; KANAIDE, M.; TANIYAMA, K.; SUMIKAWA, K.; UEZONO, Y. μ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB₁ receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J. Pharmacol Sci.* 108, 308–19, 2008.

HOSKING, R. D.; ZAJICEK, J. P. Therapeutic potential of cannabis in pain medicine. *Br J Anaesth.* 101: 59-68, 2008.

Referências Bibliográficas

HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R.; HUMPHREY, P. P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46:157-203, 1994.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71:533-54, 2002.

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.; MECHOULAM R., PERTWEE, R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54:161-202, 2002.

IACOPUCCI, A. P.; MELLO, R. O.; BARBOSA-SILVA, R.; MELO-THOMAS, L. L. NOarg-induced catalepsy can be influenced by glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research.* 234:149-154, 2012.

IANNOTTI, F. A.; HILL, C. L.; LEO, A.; ALHUSAINI, A.; SOUBRANE, C.; MAZZARELLA, E.; RUSSO, E.; WHALLEY, B. J.; DI MARZO, V.; STEPHENS, G. J. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci* 5:1131–1141, 2014.

IASP (International Association for the Study of Pain). Classification of chronic pain. 2019. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/NewsDetail.aspx?ItemNumber=8340&navItemNumber=643>
Acesso em 28 de janeiro de 2019.

IBEAS BIH, C.; CHEN, T.; NUNN, A. V. W.; BAZELOT, M.; DALLAS, M.; WHALLEY, B. J. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics.* 12:699-730, 2015.

Referências Bibliográficas

IBIAPINA, W.V.; LEITÃO, B.P.; BATISTA, M.M.; PINTO, D. S. Inserção da Fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. *Ciência Saúde Nova Esperança*. 12:58-68, 2014.

IBRAHIM, M. M.; DENG, H.; ZVONOK, A.; COCKAYNE, D. A; KWAN, J.; MATA, H. P; VANDERAH, T. W.; LAI, J.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A.; MALAN, T. P. Jr. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10529-33, 2003.

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.; MALAN JR, T. P. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *PNAS*. 102:3093-3098, 2005.

INDIAN HEMP DRUGS COMMISSION REPORT. Note by Mr. G.A. Grierson, C.I.E., Magistrate and Collector, Howrah, on references o the Hemp Plant Occurring in Sanskrit and Hindi Literature. Last updated January, 2011. Available at <http://www.druglibrary..org/schaffer/library/studies/inhemp/6app1.htm> (Accessed March 20, 2017).

IUVONE, T.; ESPOSITO, G.; DE FILIPPIS, D.; SCUDERI, C.; STEARDO, L. Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci Ther*. 15:65-75, 2009.

JAIN, N. K.; PATIL, C. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res*. 909:170-178, 2001.

JANECKA, A.; FICHNA, J.; JANECKI, T. Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem*. 4:1-17, 2014.

JENSEN, T. S.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; KALSO, E.; LOESER, J. D.; RICE, A. S, TREEDE, R. D. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 152:2204-2205, 2011.

Referências Bibliográficas

JEONG, H. J.; MITCHELL, V. A.; VAUGHAN, C. W. Role of 5-HT (1) receptor subtypes in the modulation of pain and synaptic transmission in rat spinal superficial dorsal horn. *Br J Pharmacol.* 165:1956-1965, 2012.

JESUS, C. H. A.; REDIVO, D. D. B.; GASPARIN, A. T.; SOTOMAIOR, B. B.; DE CARVALHO, M. C.; GENARO, K.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E. C.; CRIPPA, J. A.; ZANOVELI, J. M.; DA CUNHA, J. M. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. *Brain Res.* 1715:156-164, 2019.

KANODIA, A. K.; LEGEDZA, A. T.; DAVIS, R. B.; EISENBERG, D. M. PHILLIPS, R. S. Perceived benefit of Complementary and Alternative Medicine (CAM) for back pain: a national survey. *J. Am. Board Fam. Med.* 23, 354e362, 2010.

KATHMANN, M.; FLAU, K.; REDMER, A.; TRANKLE, C.; SCHLICKER, E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 372: 354–361, 2006.

KAWANO, T.; ZOGA, V.; KIMURA, M.; LIANG, M. Y.; WU, H. E.; GEMES, G.; MCCALLUM, J. B.; KWOK, W. M.; HOGAN, Q. H.; SARANTOPOULOS, C. D. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: Action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain* 5:12, 2009a.

KAWANO, T.; ZOGA, V.; GEMES, G.; MCCALLUM, J. B.; WU, H. E.; PRAVDIC, D.; LIANG, M. Y.; KWOK, W. M.; HOGAN, Q.; SARANTOPOULOS, C. Suppressed Ca²⁺/CaM/CaMKII-dependent K(ATP) channel activity in primary afferent neurons mediates hyperalgesia after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:8725–8730, 2009b.

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.* 173:2521-31, 2016.

Referências Bibliográficas

KAWABATA, A.; NISHIMURA, Y.; TAKAGI, H. L-leucyl-L-arginine, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107:1096-1101, 1992.

KEATING, G. M. Delta-9-Tetrahydrocannabinol/Cannabidiol Oromucosal Spray (Sativex®): A Review in Multiple Sclerosis-Related Spasticity. *Drugs.* 77:563-574, 2017.

KHAKSAR, S.; BIGDELI, M. R. Correlation Between Cannabidiol-Induced Reduction of Infarct Volume and Inflammatory Factors Expression in Ischemic Stroke Model. *Basic Clin Neurosci.* 8: 139–146, 2017

KHANOLKAR, A. D.; MAKRIYANNIS, A. Structure-activity relationships of anandamide, an cannabinoid ligand. *Life Sci* 65:607–616, 1999.

KIEFFER, B. L.; GAVERIAUX-RUFF, C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol.* 66:285-306, 2002.

KINA, V. A.; VILLARREAL, C. F.; PRADO, W. A. The effects of intraspinal L-NOARG or SIN-1 on the control by descending pathways of incisional pain in rats. *Life Sci.* 76:1939-51, 2005.

KISKOVÁ, T.; MUNGENAST, F.; SUVÁKOVÁ, M.; JÄGER, W.; THALHAMMER, T. Future Aspects for Cannabinoids in Breast Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 20. pii: E1673, 2019.

KABLI, N.; CAHILL, C. M. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain.* 127:84-93, 2007.

KOH, W. U.; SHIN, J. W.; BANG, J. Y.; KIM, S. G.; SONG, J. G. The Antiallodynic Effects of Nefopam Are Mediated by the Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel in a Neuropathic Pain Model. *AnesthAnalg.* 123:762-70, 2016.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Pro-inflammatory Cytokines and Pain. *Rev. Bras. Reumatol.* 46:199-206, 2006.

Referências Bibliográficas

KUDDUS, M.; GINAWI, I. A. M.; AL-HAZIMI, A. Cannabis sativa: An ancient wild edible plant of India. *Emir J Food Agric.* 25:736-745, 2013.

KUFFLER, D. P. Injury-Induced Effectors of Neuropathic Pain. *Mol Neurobiol.* 57:51-66, 2020.

KWIATKOWSKA, M.; PARKER, L. A.; BURTON, P.; MECHOULAM, R. A comparative analysis of the potential of cannabinoids and ondansetron to suppress cisplatin-induced emesis in the *Suncus murinus* (house musk shrew). *Psychopharmacology.* 174:254–259, 2004.

LABUZ, D.; MACHELSKA, H. Stronger antinociceptive efficacy of opioids at the injured nerve trunk than at its peripheral terminals in neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 346: 535-544, 2013.

LAPRAIRIE, R. B.; BAGHER, A. M.; KELLY, M. E. M.; DENOVA-WRIGHT, E. M. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol.* 172:4790-4805, 2015.

LAZARO-IBANEZ, G. G.; TORRES-LOPEZ, J. E.; GRANADOS-SOTO, V. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol.* 426:39-44, 2001.

LEÁNEZ, S.; HERVERA, A.; POL, O. Peripheral antinociceptive effects of mu- and delta-opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. *Eur J Pharmacol.* 602:41-9, 2009.

LEONARD, G.; GOFFAUX, P.; MATHIEU, D.; BLANCHARD, J.; KENNY, B.; MARCHAND, S. Evidence of descending inhibition déficit sinatypical but not classical trigeminal neuralgia. *Pain.* 2009 147:217-23, 2009.

LEV, E. Drugs held and sold by pharmacists of the Jewish community of medieval (11– 14th centuries) Cairo according to lists of materia medica found at the Taylor–Schechter Genizah collection, Cambridge. *Journal of Ethnopharmacology.* 110:275–293, 2007.

Referências Bibliográficas

LEVY, D.; HOKE, A.; ZOCHODNE, D. W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*, 260:207-209, 1999.

LI, W.; YANG, Y.; HU, Z.; LING, S.; FANG, M. Neuroprotective effects of DAHP and Triptolide in focal cerebral ischemia via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR pathway activation. *Front Neuroanat*. 9:48, 2015.

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, 2016.

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*. 105:275–283, 2003.

LIN, Q.; PENG, Y. B.; WILLIS, W. D. Glycine and GABAA antagonists reduce the inhibition of primate spinothalamic tract neurons produced by stimulation in periaqueductal gray. *Brain Research*. 654:286-302, 1994.

LINGE, R.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, L.; CAMPA, L.; PILAR-CUÉLLAR, F.; VIDAL R.; PAZOS, A.; ADELL, A.; DÍAZ, Á. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-T1A receptors. *Neuropharmacology*. 103:16-26, 2016.

LISTOS, J.; ŁUPINA, M.; TALAREK, S.; MAZUR, A.; ORZELSKA-GÓRKA, J.; KOTLIŃSKA, J. The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. *Int J Mol Sci*. 20(17). pii: E4302, 2019.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain an overview. *Lancet*, 353:1607-1609, 1999.

LONG, L. E.; CHESWORTH, R.; HUANG, X. F.; MCGREGOR, I. S.; ARNOLD, J. C.; KARL, T. A behavioural comparison of acute and chronic D9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 13: 861–876, 2010.

Referências Bibliográficas

LÖTSCH, J.; WEYER-MENKHOFF, I.; TEGEDER, I. Current evidence of cannabinoid-based analgesia obtained in preclinical and human experimental settings. *European Journal of Pain*. 22:471–484, 2018.

LUAN, Y.; XU, W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Current Medicinal Chemistry*. 14:639-647, 2007.

MACHELSKA, H. Dual peripheral actions of immune cells in neuropathic pain. *Arch. Immunol. Ther Exp*. 59:11-24, 2011.

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*. 15:6552–6561, 1995.

MAIONE, S.; STAROWICZ, K.; PALAZZO, E.; ROSSI, F.; DI MARZO, V. The endocannabinoid and endovanilloid systems and their interactions in neuropathic pain. *Drug Dev Res*. 67:339–54, 2006a.

MAIONE, S.; BISOGNO, T.; DE NOVELLIS, V.; PALAZZO, E.; CRISTINO, L.; VALENTI, M. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 316:969–982, 2006b.

MAIONE, S. Functional interaction between TRPV1 and μ -opioid receptors in the descending antinociceptive pathway activates glutamate transmission and induces analgesia. *J Neurophysiol*. 101:2411–22, 2009.

MAIONE, S.; PISCITELLI, F.; GATTA, L.; VITA, D.; DE PETROCELLIS, L.; PALAZZO, E.; DE NOVELLIS, V.; DI MARZO, V. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br J Pharmacol* 162: 584–596, 2011.

Referências Bibliográficas

- MALEK, N.; KUCHARCZYK, M.; STAROWICZ, K. Alterations in the anandamide metabolism in the development of neuropathic pain. *Biomed Res Int.* 2014:686908, 2014
- MALFAIT, A. M.; GALLILY, R.; SUMARIWALLA, P. F.; MALIK, A. S.; ANDREAKOS, E.; MECHOULAM, R.; FELDMANN, M. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9561-9566, 2000.
- MANISCALCO, G. T.; APONTE, R.; BRUZZESE, D.; GUARCELLO, G.; MANZO, V.; NAPOLITANO, M.; MOREGGIA, O.; CHIARIELLO, F.; FLORIO, C. THC/CBD oromucosal spray in patients with multiple sclerosis overactive bladder: a pilot prospective study. *Neurol Sci.* 39:97-102, 2018.
- MARCO, E. M.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; BERMÚDEZ-SILVA, F. J.; MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F.; MANZANARES, J.; VIVEROS, M. P. Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. *Front Behav Neurosci.* 5:63, 2011.
- MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol.* 42:620-643, 2002.
- MASSI, P.; VALENTI, M.; VACCANI, A.; GASPERI, V.; PERLETTI, G.; MARRAS, E.; FEZZA, F.; MACCARRONE, M.; PAROLARO, D. 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J Neurochem.* 104:1091–1100, 2008.
- MCALLISTER, S. D.; SOROCEANU, L.; DESPREZ, P. Y. The Antitumor Activity of Plant-Derived Non-Psychoactive Cannabinoids. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015 10:255-67, 2015.
- MCPARTLAND, J. M.; DUNCAN, M.; DI MARZO, V.; PERTWEE, R. G. Are cannabidiol and Δ (9)-tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br J Pharmacol.* 172:737-753, 2015.

Referências Bibliográficas

MARTÍNEZ-PINILLA, E.; RABAL, O.; REYES-RESINA, I.; ZAMARBIDE, M.; NAVARRO, G.; SÁNCHEZ-ARIAS, J. A.; DE MIGUEL, I.; LANCIEGO, J. L.; OYARZABAL, J.; FRANCO, R. Two affinity sites of the cannabinoid subtype 2 receptor identified by a novel homogeneous binding assay. *J Pharmacol Exp Ther.* 358:580-587, 2016.

MARTÍNEZ-PINILLA, E.; VARANI, K.; REYES-RESINA, I.; ANGELATS, E.; VINCENZI, F.; FERREIRO-VERA, C.; OYARZABAL, J.; CANELA, E. I.; LANCIEGO, J. L.; NADAL, X.; NAVARRO, G.; BOREA, P. A.; FRANCO, R. Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. *Front Pharmacol.* 8:744, 2017.

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.* 50:83-90, 1995.

MECHOULAM, R.; HANUS, L. Cannabidiol: an overview of some chemical pharmacological aspects. *Chem Phys Lipids.* 121:35-43, 2002.

MECHOULAM, R.; PETERS, M.; MURILLO-RODRIGUEZ, E.; HANUS, L. O. Cannabidiol – recent advances. *Chem Biodivers.* 4:1678–1692, 2007.

MECHOULAM, R.; HANUŠ, L. O.; PERTWEE, R.; HOWLETT, A. C. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* 15:7577-64, 2014.

MEDEIROS, M. F. T.; ANDREATA, R. H. P.; VALLE, L. S. Identificação de termos oitocentistas relacionados às plantas medicinais usadas no Mosteiro de São Bento do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica.* 24:780-789, 2010.

MEDEIROS, M. F. T.; ALBUQUERQUE, U. P. The pharmacy of the Benedictine monks: The use of medicinal plants in Northeast Brazil during the nineteenth century (1823–1829). *Journal of Ethnopharmacology.* 139:280–286, 2012.

Referências Bibliográficas

- MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 150:971-979, 1965.
- MICHAELIDES, A.; ZIS, P. Depression, anxiety and acute pain: links and management challenges. *Postgrad Med*. 131:438-444, 2019.
- MICÓ, J. A.; ARDID, D.; BERROCOSO, E.; ESCHALIER, A. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol.Sci*. 27:348-354, 2006.
- MILLAN, M. J.; COLPAERT, F. C. Attenuation of opioid induced antinociception by 5-HT1A partial agonists in the rat. *Neuropharmacology*. 129:315-318, 1990.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. 57:1-164, 1999.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol*. 66:355-474, 2002.
- MISKO, T.P.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W. M.; CURRIE, M.G. A Fluorimetric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem*. 214:11-16, 1993.
- MITRIRATTANAKUL, S.; RAMAKUL, N.; GUERRERO, A. V.; MATSUKA, Y.; ONO, T.; IWASE, H.; MACKIE, K.; FAULL, K. F.; SPIGELMAN, I. Site-specific increases in peripheral cannabinoid receptors and their endogenous ligands in a model of neuropathic pain. *Pain*. 126:102-114, 2006.
- MOLINA-HOLGADO, E. VELA, J. M.; ARÉVALO-MARTÍN, A.; ALMAZÁN, G.; MOLINA-HOLGADO, F.; BORRELL, J.; GUAZA, C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci*. 22:9742-9753, 2002.

Referências Bibliográficas

- 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.* 28:189–194, 2005.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142, 1991.
- MORALES, P.; REGGIO, P. H. An update on non-CB1, non-CB2 cannabinoid related G-protein-coupled receptors. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2:265-273, 2017.
- MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30:1466-1471, 2006.
- MOREIRA LIMA, F. C. V. Efeito de *Arrabidaea chica* Verlot na dor neuropática pós-traumática em ratos. Tese - Universidade Federal do Maranhão, 2017.
- MOTTA, P. G., PEREZ, A. C., ALVES, D. P. & DUARTE, I. D. 2011. Peripheral control of inflammatory but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system. *Pharmacology*, 88, 18-25.
- MOUSA, S. A.; ZHANG, Q.; SITTE, N.; JI, R-R.; STEIN, C. β -Endorphin-containing memory-cells and μ -opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *Journal of Neuroimmunology.* 115:71-78, 2001.
- MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365:61-5, 1993.
- MURNION, B. P. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Aust Prescr.* 41:60-63, 2018.

Referências Bibliográficas

NACKLEY, A.G.; ZVONOK, A. M.; MAKRIYANNIS, A.; HOHMANN, A. G. Activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses C-fiber responses and windup in spinal wide dynamic range neurons in the absence and presence of inflammation. *J Neurophysiol.* 92: 3562–74, 2004.

NAMDAR, D.; KOLTAI, H. Medical Cannabis for the treatment of inflammation. *Nat. Prod. Commun.* 13:249–254, 2018.

NASCIMENTO J., E. B., Avaliação do papel da 5-hidroxitriptamina (5HT) no processamento periférico da resposta nociceptiva – tese. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

NEELAKANTAN, H.; TALLARIDA, R.J.; REICHENBACH, Z. W.; TUMA, F.; WARD, S. J.; WALKER, E. A. Distinct interactions of cannabidiol and morphine in three nociceptive behavioral models in mice. *Behav Pharmacol.* 26:304–314, 2015.

NEWMANN, S.; DOUBELL, T. P. LESLIE, T. WOOLF, C. J. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature.* 384:364, 1996.

NOZAKI, C., KAMEI, J. Possible involvement of opioidergic systems in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve injured mice. *Eur. J. Pharmacol.* 552:99-104, 2006.

NURMIKKO, T. J.; SERPELL, M. G.; HOGGART, B.; TOOMEY, P. J.; MORLION, B. J. HAINES, D. Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *PAIN.* 133:210–220, 2007.

OCAÑA, M.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L. I.; BAEYENS, J. M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur J Pharmacol* 186:377–378, 1990.

OLINDA, A. C. C. Estudo da atividade antinociceptiva de um novo fator extraído do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*. Dissertação - Universidade Estadual do Ceará, 2010.

Referências Bibliográficas

OLIVEIRA, C. D.; VELOSO, C. C.; FERREIRA, R. C.; LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. DUARTE, I. D.; ROMERO, T. R.; PEREZ, A. C. Peltatoside Isolated from *Annona crassiflora* Induces Peripheral Antinociception by Activation of the Cannabinoid System. *Planta Med.* 83:261-267, 2017.

OLIVEIRA, C. D. C.; CASTOR, M. G. M. E. CASTOR, C. G. M. E.; COSTA, Á. F. FERREIRA, R. C. M.; SILVA, J. F. D.; PELAEZ, J. M. N.; CAPETTINI, L. D. S. A.; LEMOS, V. S.; DUARTE, I. D. G.; PEREZ, A. C.; SANTOS, S. H. S.; ROMERO, T. R. L. Evidence for the involvement of opioid and cannabinoid systems in the peripheral antinociception mediated by resveratrol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 369:30-38, 2019.

OMS - Organização Mundial de Saúde. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional - 2014-2023. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.

O'REILLY, D. D.; LOOMIS, C.W. Increased expression of cyclooxygenase and nitric oxide isoform, and exaggerated sensitivity to prostaglandin E₂, in the rat lumbar spinal cord 3 days after L5–L6 spinal nerve ligation. *Anesthesiology.* 104:328–337, 2006.

O'SHAUGNESSY, W.B. On the preparations of the Indian hemp, or gunjah (*Cannabis indica*): their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases. *Trans Med Phys Soc., Bengal.*, 71–102, 1838– 40;421–461, 1839.

PACHECO, D. F.; DUARTE I. D. G. Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Eur J Pharmacol.* v.512(1), p. 23-82, 2005.

PACHECO, D. F.; REIS, G. M.; FRANCISCHI, J. N.; CASTRO, M. S.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. Delta-Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via delta (1) and delta (2) receptors and activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sci* 78:54–60, 2005.

Referências Bibliográficas

PACHECO, D. F.; KLEIN, A.; PEREZ A. C.; PACHECO, C. M. F.; DE FRANCISCHI, J. N.; DUARTE, I.D. 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.* 154:1143-1149, 2008.

PALAZZO, E. DE NOVELLIS, V.; PETROSINO, S.; MARABESE, I.; VITA, D.; GIORDANO, C.; DI MARZO, V.; MANGONI, G. S.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system. *Eur J Neurosci.* 24:2011–2020, 2006.

PASCUAL, D.; GOICOECHEA, C.; SUARDÍAZ, M.; MARTÍN, M. I. A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. *Pain.* 118:23-34, 2005.

PEHL, U.; SCHMID, H. A. Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. *Neuroscience.* 77:563–573, 1997.

PELLATI, F.; BORGONETTI, V.; BRIGHENTI, V.; BIAGI, M.; BENVENUTI, S.; CORSI L. *Cannabis sativa* L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *Biomed Res.* 2018:1691428, 2018.

PERTWEE, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 74:129-180, 1997.

PERTWEE, R. G.; ROSS, R. A. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66:101–21, 2002.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.* 153:199-215, 2008.

PERTWEE, R.G. *Handbook of Cannabis*, 1st ed. Oxford University Press, Oxford, 2014.

Referências Bibliográficas

PETROSINO, S.; PALAZZO, E.; DE NOVELLIS, V.; BISOGNO, T.; ROSSI, F.; MAIONE, S.; DI MARZO, V. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology*. 52:415–422, 2007.

PAYEN, J.F.; CHANQUES, G.; MANTZ, J.; HERCULE, C.; AURIANT, I.; LEGUILLOU, J.L.; BINHAS, M.; GENTY, C.; ROLLAND, C.; BOSSON, J. L. Current practices in sedation and analgesia for mechanically ventilated critically ill patients: A prospective multicenter patient-based study. *Anesthesiology*. 106:687–695, 2007.

PIRES, M. J. P. Aspectos históricos dos recursos genéticos de plantas medicinais. *Rodriguésia*, v. 35, n. 59, p. 61-66, 1984.

POLETO, R.; WELTER, S. C. A Materia Medica missioneira do Ir. Pedro Montenegro (1710): um estudo sobre as virtudes das plantas medicinais nativas americanas. *Revista do Historiador*. 4:96-116, 2011.

POLO, S.; DÍAZ, A. F.; GALLARDO, N.; LEÁNEZ, S.; BALBONI, G.; POL, O. Treatment With the Delta Opioid Agonist UFP-512 Alleviates Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain: Mechanisms Implicated. *Front Pharmacol*. 26:10:283, 2019.

QUARTILHO, A.; MATA, H. P.; IBRAHIM, M. M.; VANDERAH, T. W.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A.; MALAN, T. P. Jr. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology*. 99:955–960, 2003.

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 D9-THC and morphine in the spinal cord, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279:608–616, 1996.

RAHN, E. J.; HOHMANN, A. G. Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside. *Neurotherapeutics*. 6:713-37, 2009.

Referências Bibliográficas

RAJESH, M.; MUKHOPADHYAY, P.; BÁTKAI, S.; PATEL, V.; SAITO, K.; MATSUMOTO, S.; KASHIWAYA, Y.; HORVÁTH, B.; MUKHOPADHYAY, B.; BECKER, L.; HASKÓ, G.; LIAUDET, L.; WINK, D. A.; VEVES, A.; MECHOULAM, R.; PACHER, P. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 56:2115-2125, 2010.

RAKSHAN, F.; DAY, T. A.; BLAKELY, R. D.; BARKER, E. L. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:960-967, 2000.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 111:409-419, 1957.

RANG, H. P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br. Med. Bull.* 47:534-48, 1991.

RASHID M.H., INOUE M., BAKOSHI S., UEDA H. Increased expression of vanilloid receptor 1 on myelinated primary afferent neurons contributes to the antihyperalgesic effect of capsaicin cream in diabetic neuropathic pain in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306:709–717, 2003.

REIS, G. M. L.; PACHECO, D.; PEREZ, A. C., KLEIN, A.; RAMOS, M. A.; DUARTE, I.D.G. Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. *Life Sci.* 85:351-6, 2009.

REIS, G. M.; RAMOS, M. A.; PACHECO, D. F.; KLEIN, A.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. G. Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Life Sciences.* 88:653-657, 2011.

Referências Bibliográficas

RESSTEL, L. B.; TAVARES, R. F.; LISBOA, S. F.; JOCA, S. R.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol.* 156:181–188, 2009.

REUTOV, V. P.; SOROKINA, E. G. NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry.* 63:874–884, 1998.

RICE, A. S. C. Mechanisms of inflammatory pain: role of neurotrophins and cannabinoids. In: Soulsby L., Morton D., eds. *Pain: Nature and Management in Man and Animals.* London: Royal Society of Medicine Press. 35–45, 2001.

RICE, A. S. C. Local neuro-immune interactions in visceral hyperalgesia: bradykinin, neurotrophins and cannabinoids. In: Bountra C., Schmidt W., Munglani R., eds. *Pain: Current Understanding, Emerging Therapies and Novel Approaches to Drug Discovery.* New York: Marcel Dekker, 2002.

RICHARDSON, J. D.; KILO, S.; HARGREAVES K. M. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain.* 75:111–119, 1998.

RICHARDSON, D.; PEARSON, R. G.; KURIAN, N.; LATIF, M. L.; GARLE, M. J.; BARRETT, D. A.; KENDALL, D. A.; SCAMMELL, B. E.; REEVE, A. J.; CHAPMAN, V. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteo-arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 10: R43, 2008.

RIOS, C.; GOMES, I.; DEVI, L. A. μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neurogenesis. *Br J Pharmacol.* 148:387–395. 2006.

ROCHA, F. A. G.; ARAUJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L. C.; SILVA, R. P. O USO TERAPÊUTICO DA FLORA NA HISTÓRIA MUNDIAL. **HOLOS**, [S.l.], v. 1, p. 49-61, mar. 2015. ISSN 1807-1600. Disponível em: <<http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/2492>>. Acesso em: 07 dez. 2018.

Referências Bibliográficas

- RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *British Journal of Pharmacology*. 129:110-114, 2000.
- ROMERO, T. R. L.; GALDINO, G. S.; SILVA, G. C.; RESENDE, L. C.; PEREZ, A. C.; CORTES, S. F.; DUARTE, I. D. G. Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. *Journal of Neuroscience Research*. 90:1474-1479, 2012a.
- ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G. N-Palmitoyl-ethanolamine (PEA) induces peripheral antinociceptive effect by ATP-sensitive K⁺-channel activation. *Journal of Pharmacological Sciences*. 118:156-160, 2012b.
- ROMERO, T. R. L.; GUZZO, L. S.; RESENDE, L.C.; DUARTE, I. D. G. CB1 and CB2 Cannabinoid Receptor Agonists Induce Peripheral Antinociception by Activation of the Endogenous Noradrenergic System. *Anesthesia and Analgesia*. 116:463-472, 2013.
- ROSA, C. DA; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da Fitoterapia na atenção básica à saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*. 16:311-318, 2011.
- ROSS, R. A.; COUTTS, A. A.; McFARLANE, S. M.; ANAVI-GOFFER, S.; IRVING, A. J.; PERTWEE, R. G.; MACEWAN, D. J.; SCOTT, R. H. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*. 40:221–232, 2001.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. *Ann. Rev. Med.* 49:123-133, 1998.
- RUSSO, E. B.; BURNETT, A.; HALL, B.; PARKER, K. K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res*. 30:1037-1043, 2005.
- RUSSO, E. B. Cannabis Therapeutics and the Future of Neurology. *Front Integr Neurosci*. 12:51, 2018.

Referências Bibliográficas

RUTTEN, K.; SCHRÖDER, W.; CHRISTOPH, T.; KOCH, T.; TZSCHENTKE, T. M. Selectivity profiling of NOP, MOP, DOP and KOP receptor antagonists in the rat spinal nerve ligation model of mononeuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 827:41-48, 2018.

RYAN, D.; DRYSDALE, A. J.; PERTWEE, R. G.; PLATT, B. Interactions of cannabidiol with endocannabinoid signalling in hippocampal tissue. *Eur J Neurosci.* 25:2093-2102, 2007.

SALAŁAT, K.; FILIPEK, B. Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. *J Zhejiang Univ Sci B.* 16:167-178, 2015.

SANDERS-BUSH, E.; HAZELWOOD, L. 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) and Dopamine. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. (Eds.). *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 12th ed. New York: McGraw-Hill. cap. 13, p. 335-361. 2011.

SANUDO-PENA, M. C.; STRANGMAN, N. M.; MACKIE, K.; WALKER, J. M.; TSOU, K. CB1 receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Acta Pharmacol Sin.* 20: 1115–1120, 1999.

SCHLOSBERG, J. E.; BLANKMAN, J. L.; LONG, J. Z.; NOMURA, D. K.; PAN, B.; KINSEY, S. G.; NGUYEN, P. T.; RAMESH, D.; BOOKER, L.; BURSTON, J. J.; THOMAS, E. A.; SELLEY, D. E.; SIM-SELLEY, L. J.; LIU, Q. S.; LICHTMAN, A. H.; CRAVATT, B. F. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13: 1113–1119, 2010.

SCHMIDTKO, A.; GAO, W.; SAUSBIER, M.; RAUHMEIER, I.; SAUSBIER, U.; NIEDERBERGER, E.; SCHOLICH, K.; HUBER, A.; NEUHUBER, W.; ALLESCHER, H. D.; HOFMANN, F.; TEGEDER, I.; RUTH, P.; GEISSLINGER, G. Cysteine-rich protein 2, a novel downstream effector of cGMP/cGMP-dependent protein kinase I-mediated persistent inflammatory pain. *J Neurosci.* 28:1320-30, 2008.

Referências Bibliográficas

SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci.* 32:339-346, 2009.

SCHMIDTKO, A. Nitric oxide-mediated pain processing in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol.* 227:103-17, 2015.

SCHULTES, R. E.; KLEIN, W.M.; PLOWMAN, T.; LOCKWOOD, T.E. Cannabis: An example of taxonomic neglect. *Bot Mus LealfHarv Univ.* 23:337-367, 1974.

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.* 109:124-31, 2004.

SEELY, K. A. BRENTS, L. K.; FRANKS, L. N.; RAJASEKARAN, M.; ZIMMERMAN, S. M.; FANTEGROSSI, W. E.; PRATHER, P. L. AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology.* 63:905-915, 2012.

SEIERSTAD, M.; BREITENBUCHER, J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry.* 51:7327-43, 2008.

SENADO Federal Brasileiro. Atividades legislativas. Disponível em https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/132047?utm_source=Growroom&utm_campaign=ea813a11ac-EMAIL_CAMPAIGN_2017_10_26&utm_medium=email&utm_term=0_8e01aeb1a-ea813a11ac-41440801&mc_cid=ea813a11ac&mc_eid=4c04f25a88 Acesso em 22 de junho de 2019.

SIEGLING, A.; HOFMANN, H. A.; DENZER, D.; MAULER, F.; DE VRY, J. Cannabinoid CB1 receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 415: R5–R7, 2001.

SILVA, L. C.; ROMERO, T. R.; GUZZO, L. S.; DUARTE, I. D. Participation of cannabinoid receptors in peripheral nociception induced by some NSAIDs. *Braz J Med Biol Res.* 45:1240-1243, 2012.

Referências Bibliográficas

SILVA, L. C.; CASTOR, M. G.; NAVARRO, L. C.; ROMERO, T. R.; DUARTE, I. D. κ -Opioid receptor participates of NSAIDs peripheral antinociception. *Neurosci Lett.* 622:6-9, 2016.

SLOMINSKI, A. T.; ZMIJEWSKI, M. A.; ZBYTEK, B.; BROZYNA, A. A., GRANESE, J.; PISARCHIK, A.; SZCZESNIEWSKI, A.; TOBIN, D. J. Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. *The Journal of Investigative Medicine.* 131:613-622, 2011.

SOARES, A. C.; DUARTE, I. D. G. Dibutyl- γ -butyrolactone induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw. *Br. J. Pharmacol.* 134:127-131, 2001.

SOUSA, A.M.; PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Research.* 897:9–19, 2001.

SOUZA, T. F. Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do eugenol. Dissertação - Universidade Estadual do Ceará, 2007.

STAMFORD, J.A. Descending control of pain. *Brazilian Journal Anesthesiology.* 75: 217-227, 1995.

STANLEY, C. P.; HIND, W. H.; TUFARELLI, C.; O'SULLIVAN, S. E. Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB₁ activation. *Cardiovasc Res.* 107:568-578, 2015.

STAROWICZ, K.; PRZEWLOCKA, B. Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:3286-3299, 2012.

Referências Bibliográficas

STAROWICZ, K.; MAKUCH, W.; KOROSTYNSKI, M.; MALEK, N.; SLEZAK, M.; ZYCHOWSKA, M.; PETROSINO, S.; DE PETROCELLIS, L.; CRISTINO, L.; PRZEWLOCKA, B.; DIMARZO, V. Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. *PLoS One*. 8:e60040, 2013.

STEIN, C.; HASSAN, A. H.; PRZEWŁOCKI, R.; GRAMSCH, C.; PETER, K.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:5935-3939, 1990.

STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *The New England Journal of Medicine*. 332:1685-1690, 1995.

STEIN, C.; MACHELSKA, H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: Implications for pain therapy. *Pharmacological Reviews*. 63:860-881, 2011.

STERN, C. A. J.; DA SILVA, T. R.; RAYMUNDI, A. M.; DE SOUZA, C. P.; HIROAKI-SATO, V. A.; KATO, L.; GUIMARÃES, F. S.; ANDREATINI, R.; TAKAHASHI, R. N.; BERTOGLIO, L. J. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB₁ and CB₂ receptors. *Neuropharmacology*. 125:220-230, 2017.

STRAIKER, A.; MITJAVILA, J.; YIN, D.; GIBSON, A.; MACKIE, K. Aiming for allosterism: evaluation of allosteric modulators of CB1 in a neuronal model. *Pharmacol Res*. 99:370-376, 2015.

SULTAN, A. S.; MARIE, M. A.; SHEWEITA, S. A. Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast*. 41:34-41, 2018.

TEGEDER, I.; SCHMIDTKO, A.; NIEDERBERGER, E.; RUTH, P.; GEISSLINGER, G. Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci Lett*. 332:146-150, 2002.

Referências Bibliográficas

TEGEDER, I.; DEL TURCO, D.; SCHMIDTKO, A.; SAUSBIER, M.; FEIL, R.; HOFMANN, F.; DELLER, T.; RUTH, P.; GEISLINGER, G. Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP dependent protein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:3253–3257, 2004.

THAM, M.; YILMAZ, O.; ALAVERDASHVILI, M.; KELLY, M. E. M.; DENOVA-WRIGHT, E. M.; LAPRAIRIE, R. B. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 176:1455-1469, 2019.

THOMAS, A.; BAILLIE, G. L.; PHILLIPS, A. M.; RAZDAN, R. K.; ROSS, R. A.; PERTWEE, R. G. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 150:613–623, 2007.

TIWARI, V.; YANG, F.; HE, S. Q.; SHECHTER, R.; ZHANG, C.; SHU, B.; ZHANG, T.; TIWARI, V.; WANG, Y.; DONG, X.; GUAN, Y.; RAJA, S. N. Activation of Peripheral μ -opioid Receptors by Dermorphin [D-Arg², Lys⁴] (1-4) Amide Leads to Modality-preferred Inhibition of Neuropathic Pain. *Anesthesiology.* 124:706-720, 2016.

TOMINAGA, M.; OGAWA, H.; TAKAMORI, K. Possible roles of epidermal opioid systems in pruritus of atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Medicine.* 127:2228-2235, 2007.

TROUVIN, A. P.; PERROT, S. New concepts of pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 33:101415, 2019.

TRUONG, W.; CHENG, C.; XU, Q. G.; LI, X. Q.; ZOCHODNE, D. W. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol.* 53:366-675, 2003.

VALADARES, W. P.; ALMEIDA, D.; DUARTE, I. D. G.; SANTOS, S. H. S.; ROMERO, T. Acute Physical Exercise Promotes Peripheral Analgesia by Activation of the Opioidergic System in Mice with Diabetic Peripheral Neuropathy (DPN). *Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs.* 5:1-7, 2018.

Referências Bibliográficas

VAN SICKLE, M. D.; DUNCAN, M.; KINGSLEY, P. J.; MOUIHATE, A.; URBANI, P.; MACKIE, K.; STELLA, N.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D.; DAVISON, J. S.; MARNETT, L. J.; DI MARZO, V.; PITTMAN, Q. J.; PATEL, K. D.; SHARKEY, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 310:329–332, 2005.

VARVEL, S. A.; CISHEWICZ, D. L.; LICHTMAN, A. H. Interactions between cannabinoids and opioids. In: Wenger Tibor (eds). *Recent Advances in Pharmacology and Physiology of Cannabinoids*. Kerala Press: Cochin. p. 157–182, 2004.

VELOSO, C. C.; FERREIRA, R. C. M.; RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; KLEIN, A.; DUARTE, I. D.; ROMERO, T. R. L.; PEREZ, A. C. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to cannabinoid receptors activation in mice. *Inflammopharmacology*. 26:227-233, 2018.

VIGANÒ, D.; RUBINO, T.; PAROLARO, D. Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav*. 81:360–388, 2005.

VIVANCOS, G. G.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. *Br J Pharmacol*. 138:1351-1357, 2003.

VON, K. M.; SIMON, G. The relationship between pain and depression. *Br. J. Psychiatry Suppl*. 30:101-108, 1996.

VUOLO, F.; ABREU, S. C.; MICHELS, M.; XISTO, D. G.; BLANCO, N. G.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; REIS, C.; BAHL, M.; PIZZICHINNI, E.; MAURICI, R.; PIZZICHINNI, M. M. M.; ROCCO, P. R. M.; DAL-PIZZOL, F. Cannabidiol reduces airway inflammation and fibrosis in experimental allergic asthma. *Eur J Pharmacol*. 843:251-259, 2019.

Referências Bibliográficas

WADE, D. T.; ROBSON, P.; HOUSE, H.; MAKELA, P.; ARAM, J. A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clin Rehabil.* 17:21–23, 2004.

WALKER, T. D. The medicines trade in the Portuguese Atlantic World: acquisition and dissemination of healing knowledge from Brazil (c. 1580-1800). In: *Social History of Medicine Advanced Access*. Oxford: Oxford University Press, 2013.

WALCZAK, J. S.; PICHETTE, V.; LEBLOND, F.; DESBIENS, K.; BEAULIEU, P. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience.* 132:1093–1102, 2005.

WAN, C. F.; ZHENG, L. L.; LIU, Y.; YU, X. *Houttuynia cordata* Thunb reverses oxaliplatin-induced neuropathic pain in rat by regulating Th17/Treg balance. *Am J Transl Res.* 3:1609-14, 2016.

WANG, R.; JIAO, H.; ZHAO, J.; WANG, X.; LIN, H. L-Arginine Enhances Protein Synthesis by Phosphorylating mTOR (Thr 2446) in a Nitric Oxide-Dependent Manner in C2C12 Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 7569127, 2018.

WARD, S. J.; RAMIREZ, M. D.; NEELAKANTAN, H.; WALKER, E. A. Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. *Anesth Analg.* 113:947-950, 2011.

WARD, S. J.; McALLISTER, S. D.; KAWAMURA, R.; MURASE, R.; NEELAKANTAN, H.; WALKER, E. A. Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT1A receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. *Br J Pharmacol.* 171: 636–645, 2014.

WATANABE, K.; KAYANO, Y.; MATSUNAGA, T.; YAMAMOTO, I.; YOSHIMURA, H. Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol. Pharm. Bull.* 19:1109-1111, 1996.

Referências Bibliográficas

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Spinal cord glia: new players in pain. *Pain*. 93:201-205, 2001.

WEISS, L.; ZEIRA, M.; REICH, S.; SLAVIN, S.; RAZ, I.; MECHOULAM, R.; GALLILY, R. Cannabidiol arrests onset of autoimmune diabetes in NOD mice. *Neuropharmacology*. 54:244-249, 2008.

WELK, E.; LEAH, J. D.; ZIMMERMANN, M. Characteristics of A and C fibers ending in a sensory nerve neuroma in the rat. *J Neurophysiol*. 63:759-766, 1990.

WELCH, S. P.; EADS, M. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoids systems. *Brain Res*. 848:183–190, 1999.

WHEAL, A. J.; JADOON, K.; RANDALL, M. D.; O'SULLIVAN, S. E. *In Vivo* Cannabidiol Treatment Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Mesenteric Arteries of Zucker Diabetic Fatty Rats. *Front Pharmacol*. 8:248, 2017.

WILLIAN, W. M.; JOHN, H.; ROMAN, S. T.; RICHARD, B. M. Fármacos usados na medicação pré-anestésica. [Drugs used in anesthesia.]. In: Willian, W.M. (Ed.), *Manual de anestesia veterinária*. [Handbook of veterinary anesthesia.]. Artmed, Porto Alegre, pp. 31–44, 2001.

WOOLF, C.J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. *Drugs*. 47:1-9, 1994.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*. 120:3742–3744, 2010.

WOTHERSPOON, G.; FOX, A.; MCINTYRE, P.; COLLEY, S.; BEVAN, S.; WINTER, J. Peripheral nerve injury induces canna-binoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience*. 135:235–245, 2005.

Referências Bibliográficas

XIAO, H.; ZENG, L.; SHAO, F.; HUANG, B.; WU, M.; TAN, B.; YIN, Y. The role of nitric oxide pathway in arginine transport and growth of IPEC-1 cells. *Oncotarget*. 8:29976-29983, 2017.

XIONG, W.; KOO, B. N.; MORTON, R.; ZHANG, L. Psychotropic and nonpsychotropic cannabis derivatives inhibit human 5-HT_{3A} receptors through a receptor desensitization-dependent mechanism. *Neuroscience*. 184:28–37, 2011.

XIONG, W.; CUI, T.; CHENG, K.; YANG, F.; CHEN, S. R.; WILLENBRING, D.; GUAN, Y.; PAN, H. L.; REN, K.; XU, Y.; ZHANG, L. Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *J Exp Med*. 209:1121-1134, 2012.

XU, J. T.; TU, H. Y.; XIN, W. J.; LIU, X. G.; ZHANG, G. H.; ZHAI, C. H. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol*. 206:269–279, 2007.

XU, C. Q.; LIU, B. J.; WU, J. F.; XU, Y. C.; DUAN, X. H.; CAO, Y.; X.; DONG, J. C. Icariin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: involvement of PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathway. *Eur J Pharmacol*. 642:146-153, 2010.

XU, Q.; FITZSIMMONS, B.; STEINAUER, J.; O'NEILL, A.; NEWTON, A. C.; HUA, X. Y.; YAKSH, T. L. Spinal phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling cascades in inflammation-induced hyperalgesia. *J Neurosci*. 31:2113-2124, 2011

XU, B.; ZHANG, M.; SHI, X.; ZHANG, R.; CHEN, D.; CHEN, Y.; WANG, Z.; QIU, Y.; ZHANG, T.; XU, K.; ZHANG, X.; LIEDTKE, W.; WANG, R.; FANG, Q. The multifunctional peptide DN-9 produced peripherally acting antinociception in inflammatory and neuropathic pain via mu and kappa opioid receptors. *Br J Pharmacol*. 2019.

YALCIN, I.; MEGAT, S.; BARTHAS, F.; WALTISPERGER, E.; KREMER, M.; SALVAT, E.; BARROT, M. The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. *J Vis Exp*. 89, 2014.

Referências Bibliográficas

YOUNG, C. C.; PRIELIPP, R. C. Benzodiazepines in the intensive care unit. *Crit Care Clin.* 17:843–862, 2001.

ZANELATI, T. V.; BIOJONE, C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol.* 159:122-128, 2010.

ZAPATA-MORALES, J. R.; ALONSO-CASTRO, Á. J.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, S.; ROJAS-BEDOLLA, E. I.; SÁNCHEZ-ENRIQUEZ, S.; RIVAS-CARRILLO, J. D.; SERAFÍN-HIGUERA, N. A.; ISIODIA-ESPINOZA, M. A. Participation of ATP-sensitive K⁺ channels and μ -opioid receptors in the antinociceptive synergism of the paracetamol-tapentadol co-administration in the formalin-induced pain assay in mice. *Drug Dev Res.* 79:400-405, 2018.

ZAREBA, G. Phytotherapy for pain relief. *Drugs Today.* 45:445-467, 2009.

ZENG, X.; MAO, X.; HUANG, Z.; WANG, F.; WU, G.; QIAO, S. Arginine enhances embryo implantation in rats through PI3K/PKB/mTOR/NO signaling pathway during early pregnancy. *Reproduction.* 145:1-7, 2013.

ZHANG, S.; WANG, M.; LI, Q.; ZHU, P. MiR-101 reduces cell proliferation and invasion and enhances apoptosis in endometrial cancer via regulating PI3K/Akt/mTOR. *Cancer Biomark.* 21:179-186, 2017.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 429, 23- 37, 2001.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev. Bras. Psiquiatr.* São Paulo v. 28, n. 2, p. 153-157, June 2006. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462006000200015&lng=en&nrm=iso>. access on 14 Dec. 2018.

Anexo

ANEXO

Protocolo CEUA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 57/2017

Título do projeto: Avaliação do efeito antinociceptivo do canabidiol (Cannabis sp.) na dor neuropática e mecanismos antinociceptivos endógenos envolvidos nesse evento.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Thiago Roberto Lima Romero

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade: 26/06/2017 à 25/06/2022
Belo Horizonte, 26/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br