

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

Avaliação do efeito antinociceptivo do canabidiol na dor neuropática e  
mecanismos endógenos envolvidos neste evento

Douglas Lamounier de Almeida

BELO HORIZONTE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA-FARMACOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Avaliação do efeito antinociceptivo do canabidiol na dor neuropática e  
mecanismos endógenos envolvidos neste evento

Douglas Lamounier de Almeida

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.

BELO HORIZONTE

2021

043 Almeida, Douglas Lamounier de.  
Avaliação do efeito antinociceptivo do canabidiol na dor neuropática e mecanismos endógenos envolvidos neste evento [manuscrito] / Douglas Lamounier de Almeida. - 2021.  
102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Analgésicos. 3. Canabidiol. 4. Dor. I. Romero, Thiago Roberto Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE Nº 343 DE DOUGLAS LAMOUNIER DE ALMEIDA

**"Avaliação do Efeito Antinociceptivo do Canabidiol na Dor Neuropática e Mecanismos Endógenos Envolvidos Neste Evento"**

**DOUGLAS LAMOUNIER DE ALMEIDA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 18 de agosto de 2021, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, FMRP/USP  
Prof. Dr. Giovane Galvão de Souza, ICB/UNIFAL  
Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais  
Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais  
Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientador

Belo Horizonte, 18 de agosto de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galvão de Souza**, Usuário Externo, em 25/08/2021, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávio Almeida Amaral**, Professor do Magistério Superior, em 25/08/2021, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Roberto Lima Romero**, Professor do Magistério Superior, em 25/08/2021, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele Cristina de Aguiar**, Professora do Magistério Superior, em 25/08/2021, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Silveira Guimaraes**, Usuário Externo, em 26/08/2021, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://seil.ufmg.br/seil/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://seil.ufmg.br/seil/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0864204 e o código CRC FC62B86A.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio e suporte incondicional desde o início da minha formação. À minha mãe, Silvana, pelo enorme carinho, amor e pelos inúmeros ensinamentos, conversas e risadas. Ao meu pai, Douglas, pelo enorme carinho, amor e por ter sempre me dito: “...tudo na vida é treino. Se você quiser ficar bom em algo na vida, treine e treine muito!” Ao meu irmão, André, por ser sempre um exemplo e inspiração pra mim, além de ser um dos meus melhores amigos, sempre me ajudando quando eu preciso e dando risada quando é hora de dar risada.

À minha namorada Deborah, por sempre me incentivar nas minhas decisões, sempre me motivar quando eu preciso, me distrair quando estou com a cabeça cheia e por me amar tanto quanto eu a amo de volta.

Ao meu orientador, Prof. Thiago Romero pelos valiosos ensinamentos, por acreditar no meu potencial como pesquisador e como professor, por me acolher em seu laboratório e por ser uma grande fonte de inspiração para a minha carreira profissional.

Aos professores Igor Dimitri e Andrea Perez pelo companheirismo e por sempre me esclarecerem dúvidas de experimentos ou de conceitos de farmacologia quando eu precisava.

À minha melhor amiga no laboratório, Renata Mendes, por ter me criado e me ensinado tudo sobre o laboratório de Dor e Analgesia, por ter me ensinado a importância de se manter organizado e planejar os experimentos com antecedência e fazer as coisas do jeito certo. Além disso, queria agradecer pelas incontáveis horas de risadas e momentos engraçados que vivemos no laboratório.

Ao William, meu colega de doutorado, que me incentiva e me bota pra cima tantas vezes, me oferece tantas oportunidades de crescimento profissional e me motiva tanto.

Aos demais membros do laboratório, Wallace, Flávia, William, Bárbara, Daniel, Vanessa, Thais, Dani pelo companheirismo, parcerias, risadas, cobranças e ensinamentos e por proporcionarem um ambiente tão convidativo para o trabalho.

À minha orientadora em Nova York, Prof. Dra Lakshmi A. Devi, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter me proporcionado a experiência de conhecer um laboratório referência mundial no estudo de farmacologia molecular. E aos meus colegas de laboratório,

especialmente o Chenge e a Mariana, por me receberem tão bem no laboratório e por me mostrarem tanto da cidade de Nova Iorque.

Ao professor Dr. Francisco Silveira Guimarães da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (FMRP) por ter gentilmente doado o canabidiol que foi utilizado na execução do presente trabalho e por ter aceitado fazer parte da banca de avaliação da minha tese.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia que contribuíram de alguma forma para a minha formação, bem como a todos os servidores do Programa pela disponibilidade e paciência.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, que possibilitaram a execução do meu projeto de doutorado.

Gostaria de dedicar um agradecimento especial ao skate como sendo meu estilo de vida, minha cultura, meu esporte, meu hobby, meu motivo de alegrias incondicionais e gostaria de agradecer a todos os amigos que o skate me trouxe. Foram muitos momentos inesquecíveis que tive desde que pisei em um skate em 2002, aos 12 anos. E um agradecimento especial ao laque, meu melhor amigo no meu mundo do skate, por sempre puxar minha orelha quando é necessário, por me mostrar como enxergar o mundo com outros olhos e por me proporcionar tantas memórias e vivências positivas.

## Resumo

**Introdução:** O canabidiol (CBD) é o segundo componente farmacologicamente ativo de maior quantidade presente nas variedades da planta *Cannabis sp.* Diferentemente do THC, o principal componente psicotomimético responsável pelos sinais comumente observados em pessoas que fazem o uso recreativo da Cannabis, o CBD não apresenta efeitos psicotomiméticos e recentemente vem recebendo grande interesse por parte da comunidade científica devido ao seu potencial como um agente farmacológico no tratamento da ansiedade e de distúrbios do sono. Além disso, sabe-se que o canabidiol apresenta um grande potencial anti-inflamatório, podendo ser utilizado para o tratamento de algumas dores de origem inflamatória. Nesse contexto, sabe-se do potencial do canabidiol como um agente analgésico, mas pouco se sabe sobre sua eficiência no tratamento da dor neuropática, uma dor de difícil tratamento cujos impactos provocam grandes prejuízos para a qualidade de vida de pacientes que sofrem dessa condição. Além disso, os tratamentos disponíveis para a dor neuropática são limitados e nem sempre trazem ao paciente um alívio completo da sensação dolorosa. Por esse motivo, novas abordagens farmacológicas são necessárias para melhorar o tratamento a esses pacientes.

**Objetivo:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar a hipótese do mecanismo analgésico do canabidiol administrado sistemicamente, e de forma crônica, para o tratamento da dor neuropática e determinar quais são os mecanismos endógenos envolvidos com essa analgesia.

**Métodos:** A dor neuropática foi induzida pela constrição do nervo ciático e o limiar nociceptivo foi medido através do teste de compressão da pata em camundongos. O canabidiol foi administrado pela via intraperitoneal durante 10 dias consecutivos, a partir do 11º dia após a cirurgia, e todas as demais drogas foram administradas no 21º dia após a cirurgia de constrição do nervo ciático pela via intraplantar, com exceção das drogas utilizadas no teste de avaliação da coordenação motora que também foram administradas por via intraperitoneal. Para a avaliação dos níveis proteicos de canais para potássio sensíveis ao ATP na pata dos camundongos, foi utilizada a técnica de western blot. **Resultados:** A cirurgia de constrição do nervo ciático foi eficiente para induzir a neuropatia e o CBD provocou antinocicepção de maneira dose-dependente, apresentando um efeito máximo na maior dose de 20 mg/Kg. Tal dose não é capaz de causar sedação ou ataxia, uma vez que os animais tiveram o mesmo tempo de permanência na haste giratória do teste de RotaRod que animais injetados com salina. Todos os experimentos farmacológicos subsequentes foram realizados no 21º dia após a cirurgia (ao final de 10 dias consecutivos de tratamento diário com CBD na maior dose de 20 mg/Kg). O NAN-190 e o SB366791, antagonistas seletivos dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e TRPV1, respectivamente, reverteram o efeito antinociceptivo induzido pelo CBD. De forma semelhante, o AM251 e o AM630, antagonistas seletivos dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> canabinoides, respectivamente, também reverteram a antinocicepção provocada por 20 mg/Kg de CBD. Paralelamente, a inibição da recaptação de endocanabinoides e das hidrólises de anandamida e 2-AG usando o VDM11, MAFP e o JZL184, respectivamente, foi capaz de potencializar a antinocicepção produzida por uma dose intermediária de 2 mg/Kg de CBD. Os antagonistas seletivos de receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides, CTOP e naltrindole, respectivamente, reverteram a antinocicepção causada pelo CBD, porém o Nor-BNI, antagonista seletivo de receptores  $\kappa$  opioides, não provocou alteração na antinocicepção induzida pelo CBD. A inibição da hidrólise de peptídeos opioides endógenos com a bestatina também foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo de uma dose intermediária de CBD. Partindo para a avaliação da via intracelular no efeito

antinociceptivo do CBD, a inibição da PI3K $\gamma$  com o AS605240 reverteu de forma dose-dependente a antinocicepção induzida pelo CBD. Em seguida, a inibição não seletiva das enzimas óxido nítrico sintase com o L-NOarg, bem como a inibição seletiva da enzima NOS<sub>n</sub>, usando o L-NPA, reverteu de forma dose dependente a antinocicepção induzida pelo CBD. Porém, a inibição seletiva das enzimas NOS<sub>i</sub> e NOS<sub>e</sub>, usando o L-NIL e o L-NIO, respectivamente, não alterou a antinocicepção induzida pelo CBD. De forma interessante, a inibição da produção de GMPc usando o ODQ, inibidor seletivo de guanilato ciclase solúvel, não alterou a antinocicepção mediada pelo CBD, porém o bloqueio seletivo de canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, usando a glibenclamida, reverteu de forma dose dependente a antinocicepção induzida pelo CBD. **Conclusão:** O canabidiol apresenta um efeito antinociceptivo frente a dor neuropática quando administrado sistemicamente e este efeito é mediado pela ativação de receptores canabinoides, opioides, pela via PI3K $\gamma$ /NOS/NO/K<sub>ATP</sub> nos tecidos periféricos. **Apoio financeiro:** CNPq e CAPES.

Palavras-chave: Canabidiol; Dor neuropática; Sistema canabinoide; Óxido nítrico; Analgesia

## Abstract

**Introduction:** Cannabidiol (CBD) is the second most abundant pharmacologically active component present in the Cannabis sp. Unlike THC, the main psychoactive component responsible for the signs commonly observed in people who make recreational use of Cannabis, CBD has no psychotomimetic effects and has recently received significant interest from the scientific community due to its potential as a pharmacological agent in the treatment of anxiety and sleep disorders. In addition, it is known that cannabidiol has an excellent anti-inflammatory potential and can be used to treat some types of inflammatory pain. In this context, the potential of cannabidiol as an analgesic agent is known, but little is known about its efficiency in the treatment of neuropathic pain, a difficult-to-treat pain which greatly impacts the quality of life of patients suffering from this condition. In addition, the treatments available for neuropathic pain are limited and do not always bring complete relief from the painful sensation. For this reason, new pharmacological approaches are needed to improve treatment for these patients.

**Aim:** The present study aims to evaluate the analgesic mechanism of cannabidiol administered systemically for the acute treatment of neuropathic pain and determine the endogenous mechanisms involved with this analgesia. **Methods:** Neuropathic pain was induced by sciatic nerve constriction surgery, and the nociceptive threshold was measured using the paw compression test in mice. Cannabidiol was administered intraperitoneally, and all other drugs were administered intraplantar, apart from drugs used in the motor coordination assessment test. **Results:** Sciatic nerve constriction surgery efficiently induced neuropathy, and CBD caused dose-dependent antinociception and had a maximum effect at the highest dose of 20 mg/kg. Such a dose is not capable of causing sedation or ataxia since the animals spent similar times on the RotaRod test as animals injected with saline. NAN-190 and SB366791, selective antagonists of 5-HT<sub>1A</sub> and TRPV1 receptors, respectively, reversed the antinociceptive effect induced by CBD. Similarly, AM251 and AM630, selective cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor antagonists, respectively, also reversed antinociception caused by 20 mg/kg of CBD. Parallel to that, the inhibition of hydrolysis and reuptake of anandamide and 2-AG using MAFP, VDM11, and JZL184, respectively, potentiated the antinociception produced by an intermediate dose of 2 mg/kg of CBD. The selective  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor antagonists, CTOP and naltrindole, respectively, reversed the antinociception caused by CBD. However, Nor-BNI, a selective  $\kappa$  opioid receptor antagonist, did not cause alteration in CBD-induced antinociception. Hydrolysis inhibition of endogenous opioid peptides with bestatin also potentiates the antinociceptive effect of an intermediate dose of CBD. After assessing the intracellular pathway in the antinociceptive effect of CBD, the inhibition of PI3K $\gamma$  with AS605240 reversed the CBD-induced antinociception in a dose-dependent manner. The non-selective inhibition of nitric oxide synthase enzymes with L-NOarg, as well as the selective inhibition of nNOS enzymes using L-NPA, reversed the dose-dependent antinociception induced by CBD. However, the selective inhibition of iNOS and eNOS, using L-NIL and L-NIO, respectively, did not alter CBD-induced antinociception. Interestingly, the inhibition of cGMP production using ODQ, a selective soluble guanylate cyclase inhibitor, did not alter CBD-mediated antinociception, but selective blocking of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, using glibenclamide, dose-dependently reversed CBD-induced antinociception. **Conclusion:** Cannabidiol has an antinociceptive effect when administered systemically and this effect is mediated by the activation of cannabinoid and opioid receptors and via the PI3K $\gamma$ /NOS/NO/K<sub>ATP</sub> pathway in peripheral tissues. **Financial support:** CNPq and CAPES.

## Sumário

Resumo.....	7
Abstract .....	9
Lista de abreviaturas .....	8
Introdução.....	17
Considerações sobre o estudo da dor.....	17
Dor neuropática e suas particularidades .....	22
Sistemas analgésicos endógenos e o canabidiol .....	25
Via analgésica endógena do óxido nítrico.....	28
Justificativa.....	31
Objetivo geral .....	32
Objetivos específicos.....	32
Materiais e Métodos .....	32
Animais de experimentação.....	32
Construção do nervo ciático.....	32
Avaliação do limiar nociceptivo – método de compressão da pata .....	33
Teste de avaliação da Coordenação Motora.....	34
Drogas .....	35
Substância antinociceptiva sob teste.....	35
Fármacos antagonistas dos receptores 5-HT <sub>1A</sub> e TRPV1 .....	35
Fármacos envolvidos com o sistema canabinoide .....	36
Fármacos envolvidos com o sistema opioide.....	37
Fármacos envolvidos com a via PI3K $\gamma$ /NOS/NO/GCs/GMPc/K <sub>ATP</sub> .....	38
Fármaco inibidor da reação de S-nitrosilação.....	39
Vias de administração .....	39
Western blot.....	40
Delineamento experimental .....	41
Western Blot .....	42
Resultados.....	43
Caracterização da analgesia mediada por CBD .....	43
.....	47
Receptores 5-HT <sub>1A</sub> e TRPV1.....	48
.....	50

Sistema endocanabinoide .....	51
Sistema opioide .....	58
Via PI3K $\gamma$ /NOS/NO/GC/GMPc/K <sub>ATP</sub> .....	65
S-nitrosilação de canais para potássio sensíveis ao ATP (K <sub>ATP</sub> ) .....	75
Quantificações dos níveis proteicos de canais para potássio sensíveis ao ATP .....	77
Discussão .....	79
Referências .....	93

## **Lista de abreviaturas**

**2-AG** – 2 araquidonoil glicerol

**5-HT** - Serotonina

**5-HT<sub>1A</sub>** – Receptor serotoninérgico tipo 1

**AEA** – N-araquidonoiletanolamina

**AKT** – Proteína Serina/treonina quinase

**AMPC** - Monofosfato cíclico de adenosina

**AMT** - Transportador de anandamida na membrana

**ANOVA** – Análise de variância

**ATP** – Trifosfato de adenosina

**Ca<sup>2+</sup>** - íons cálcio

**CB<sub>1</sub>** – Receptor canabinoide tipo 1

**CB<sub>2</sub>** – Receptor canabinoide tipo 2

**CBD** – Canabidiol

**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** – Constricção do nervo ciático

**DAG** - Diacilglicerol

**DOR** – Receptor opioide tipo delta

**DRG** – Gânglio da raiz dorsal

**FAAH** – Ácido graxo amida hidrolase

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico

**GCs** - guanilato ciclase solúvel

**GMPC** – Monofosfato cíclico de guanosina

**GTP** - Trifosfato de adenosina

**IASP** – Associação Internacional de Estudos para Dor

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina tipo 1 beta

**IL-17** – Interleucina tipo 17

**K<sub>ATP</sub>** – Canais para potássio sensíveis ao ATP

**K<sub>d</sub>** – Constante de afinidade

**K<sub>i</sub>** – Constante de inibição

**KOR** – Receptor opioide tipo kappa

**L-NOArg** - NG-Nitro-L-arginina

**MAGL** – Monoacilglicerol lipase

**MAPK** - Proteína quinase ativada por mitógenos

**MOR** – Receptor opioide tipo mi

**NAT** - N-aciltransferase

**NAPE** - N-acil-fosfatidiletanolamina

**NE** - Norepinefrina

**NO** – Óxido nítrico

**NO<sub>e</sub>** – Óxido nítrico sintase do tipo endotelial

**NO<sub>i</sub>** – Óxido nítrico sintase do tipo induzível

**NO<sub>n</sub>** – Óxido nítrico sintase do tipo neuronal

**PAG** – Substância cinzenta periaquedutal

**PG** – Prostaglandinas

**PEA** - Palmitoiletanolamida

**PI3K** – Fosfatidilinositol 3 quinase

**PKA** - Proteína quinase A

**SNC** – Sistema nervoso central

**SP** – Substância P

**THC** – Tetra hidrocanabinol

**TNF** – fator de necrose tumoral

**TRPV1** – Receptor de potencial transiente vaniloide tipo 1

## Lista de figuras

Figura 1: Esquema de um nociceptor e alguns componentes da nocicepção. Modificado de “Principles of neural sciences. Erick Kandel; 2000” .....	18
Figura 2: Principais vias aferentes da dor para centros superiores de processamento no sistema nervoso central. O trato espinotalâmico é o trato mais proeminente na transmissão dos estímulos aferentes nociceptivos para o sistema nervoso central.....	20
Figura 3: Quatro tipos principais de dor, seus estímulos causadores e principais respostas do organismo à sensação dolorosa (Woolf et al., 2004).....	21
Figura 4: Teoria do portal da dor (Melzack and Wall, 1965). SG – Substância gelatinosa; T – células de transmissão. ....	22
Figura 5: Vias que levam à dor na neuropatia periférica e potenciais locais para interferência farmacológica (Mendell e Sahenk, 2003).....	24
Figura 6: Diversidade de alvos moleculares e vias de sinalização para o CBD (Almeida e Devi, 2020). ....	26
Figura 7: Mecanismo analgésico da morfina por meio da ativação da via PI3K $\gamma$ /Akt/NOS $n$ /NO/K $_{ATP}$ . PI3K $\gamma$ – Fosfatidilinositol-3-cinase gamma; Akt – proteína cinase B; NOS $n$ – Óxido nítrico sintase neuronal; NO – Óxido nítrico; Gc – Guanilato ciclase; GTP – Guanosina trifosfato; GMPc – Guanosina monofosfato cíclico; PKG – Proteína cinase G; K $_{ATP}$ – Canal para potássio sensível ao ATP. (Adaptado de Cunha et al., 2010). ....	30
Figura 8: Aparelho utilizado para medir o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.....	34
Figura 9: Teste de avaliação da coordenação motora em camundongos.....	35
Figura 10: Esquema do mecanismo de ação dos antagonistas de receptores 5-HT $_{1A}$ e TRPV1. ....	36
Figura 11: Esquema do mecanismo de ação dos fármacos do sistema canabinoide. ....	37
Figura 12: Esquema do mecanismo de ação dos fármacos envolvidos com o sistema opioide. ....	38
Figura 13: Esquema do mecanismo de ação dos fármacos da via PI3K $\gamma$ /NOS/NO/GCs/GMPc/K $_{ATP}$ . ....	39
Figura 14: Mecanismo de inibição da S-nitrosilação pelo NEM.....	39
Figura 15: Via intraperitoneal de administração do CBD.....	40
Figura 16: Administração intraplantar subcutânea na pata posterior direita de camundongo. ....	40
Figura 17: <b>Caracterização do pico de atividade analgésica do CBD.</b> ....	44
Figura 18: <b>Avaliação do possível efeito de sedação do CBD quando injetado via intraperitoneal.</b> .....	45

Figura 19: Estudo do tratamento crônico do CBD após o estabelecimento da dor neuropática. ....	47
Figura 20: Participação dos receptores 5-HT <sub>1A</sub> no mecanismo analgésico do CBD. ....	49
Figura 21: Participação dos receptores TRPV1 no mecanismo analgésico do CBD. ....	50
Figura 22: Efeito da inibição da hidrólise de anandamida sobre uma dose analgésica intermediária de CBD. ....	52
Figura 23: Efeito da inibição da hidrólise de 2-AG sobre uma dose analgésica intermediária de CBD. ....	53
Figura 24: Efeito da inibição da recaptção de anandamida sobre uma dose analgésica intermediária de CBD. ....	54
Figura 25: Participação dos receptores CB <sub>1</sub> no mecanismo analgésico do CBD. ....	56
Figura 26: Participação dos receptores CB <sub>2</sub> no mecanismo analgésico do CBD. ....	57
Figura 27: Efeito da inibição da hidrólise de opioides endógenos no mecanismo analgésico de uma dose intermediária de CBD. ....	59
Figura 28: Efeito do antagonismo não seletivo de receptores opioides no mecanismo analgésico do CBD. ....	60
Figura 29: Participação dos receptores $\mu$ opioides no mecanismo analgésico do CBD. ....	62
Figura 30: Participação dos receptores $\delta$ opioides no mecanismo analgésico do CBD. ....	63
Figura 31: Participação dos receptores $\kappa$ opioides no mecanismo analgésico do CBD. ....	64
Figura 32: Participação da enzima PI3K $\gamma$ no mecanismo analgésico do CBD. ....	66
Figura 33: Participação das enzimas óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD. ....	67
Figura 34: Participação da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD. ....	69
Figura 35: Participação da isoforma indutível da enzima óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD. ....	70
Figura 36: Participação da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD. ....	71
Figura 37: Participação da enzima guanilato ciclase no mecanismo analgésico do CBD. ....	73
Figura 38: Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K <sub>ATP</sub> ) no mecanismo analgésico do CBD. ....	74
Figura 39: Efeito da S-nitrosilação da subunidade regulatória SUR1 na ativação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K <sub>ATP</sub> ). ....	76

**Figura 40: Western blot de tecidos do coxim plantar direito de camundongos sob tratamento crônico com CBD..... 78**

**Figura 41: Esquema do possível mecanismo analgésico do CBD na dor neuropática periférica.  
..... 91**

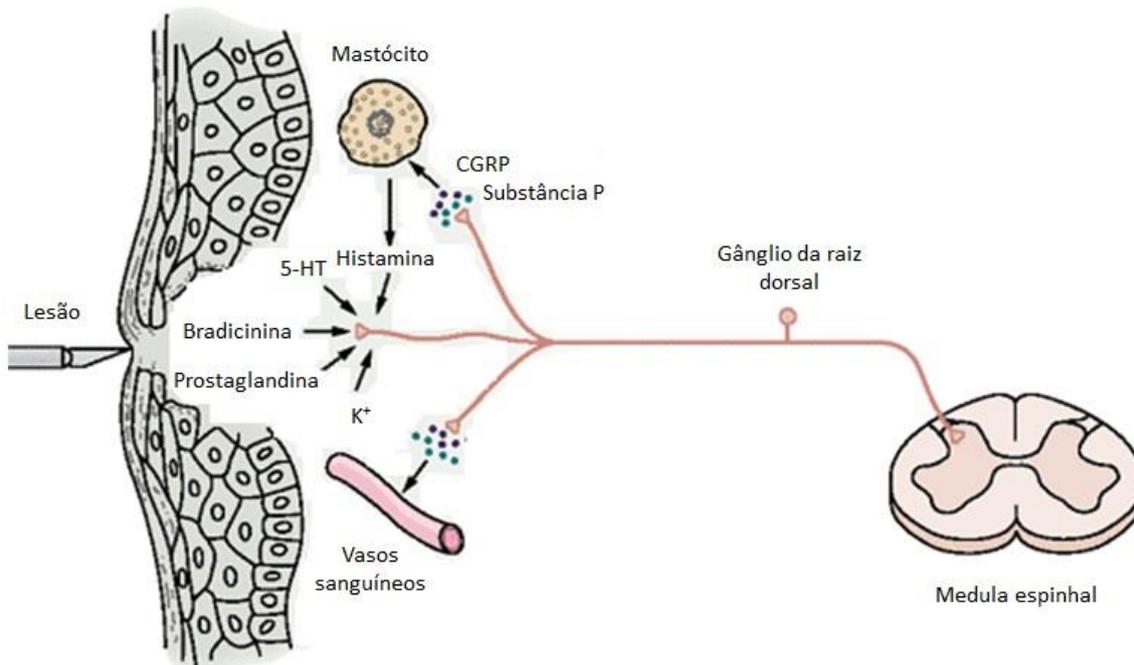
## Introdução

### Considerações sobre o estudo da dor

De acordo com a definição mais atualizada de dor pela IASP (International Association for the Study of Pain), a dor pode ser considerada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou assemelhando-se àquela associada, a dano real ou potencial ao tecido (Raja et al., 2020). Pode variar em intensidade (leve, moderada ou forte); tipo ou qualidade (fincada, queimação); duração (aguda, intermitente ou persistente) e referência espacial (superficial ou profunda; localizada ou difusa). Apesar de ser uma modalidade sensorial, a dor apresenta um grande componente emocional associado que determina tipos de comportamento característicos, como vocalização, expressões faciais e reflexos motores de retirada, responsáveis por afastar o organismo da fonte causadora de lesão (Woolf et al., 2004). De um ponto de vista evolutivo, a dor é uma modalidade sensorial fundamental para garantir a sobrevivência dos seres vivos, uma vez que funciona como um alerta para a procura de abrigo e para que o indivíduo tome medidas para evitar a fonte de lesão tecidual dentro de um contexto mais abrangente de autopreservação. De uma forma mais direta, a dor pode ser classificada como um determinante evolutivo, sendo contextualizada como parte de um grande e complexo comportamento de autopreservação que antecede os comportamentos de luta e fuga (Bonavita e De Simone, 2011).

Independente do estímulo doloroso, a unidade sensorial responsável pela nocicepção é o nociceptor, formado a partir de terminações nervosas livres presentes em tecidos periféricos, cuja função é perceber o estímulo que causa lesão tecidual e transformar tal estímulo em impulsos nervosos que serão transmitidos para o sistema nervoso central (SNC) com o objetivo de produzir uma resposta do organismo ao estímulo percebido. O nociceptor é uma estrutura extremamente especializada (Pinho-Ribeiro et al., 2017), capaz de detectar alterações teciduais e transmitir essas informações para o SNC por meio do neurônio aferente primário, cujo corpo celular está representado pelo gânglio da raiz dorsal (Kandel et al., 2000. Figura 1). Diversas substâncias são capazes de alterar a sensibilidade do nociceptor, como é o caso da prostaglandina, bradicinina, histamina, serotonina, e tais substâncias podem facilitar ou dificultar a aferência nociceptiva (McMahon et al., 2013). O nociceptor localiza-se principalmente em tecidos periféricos, e faz sinapse diretamente com o neurônio secundário na via aferente nociceptiva, presente no corno dorsal da medula espinhal (Kandel et al., 2000; McMahon et al., 2013). A partir desse ponto, a sinalização nociceptiva chega ao SNC e continuará a ser processada para melhor informar ao organismo de características como localização,

intensidade de estímulo, tipo de estímulo. Usando das informações trazidas pelo nociceptor (neurônio aferente primário) o SNC começa a planejar estratégias comportamentais para afastar o organismo da fonte de lesão.

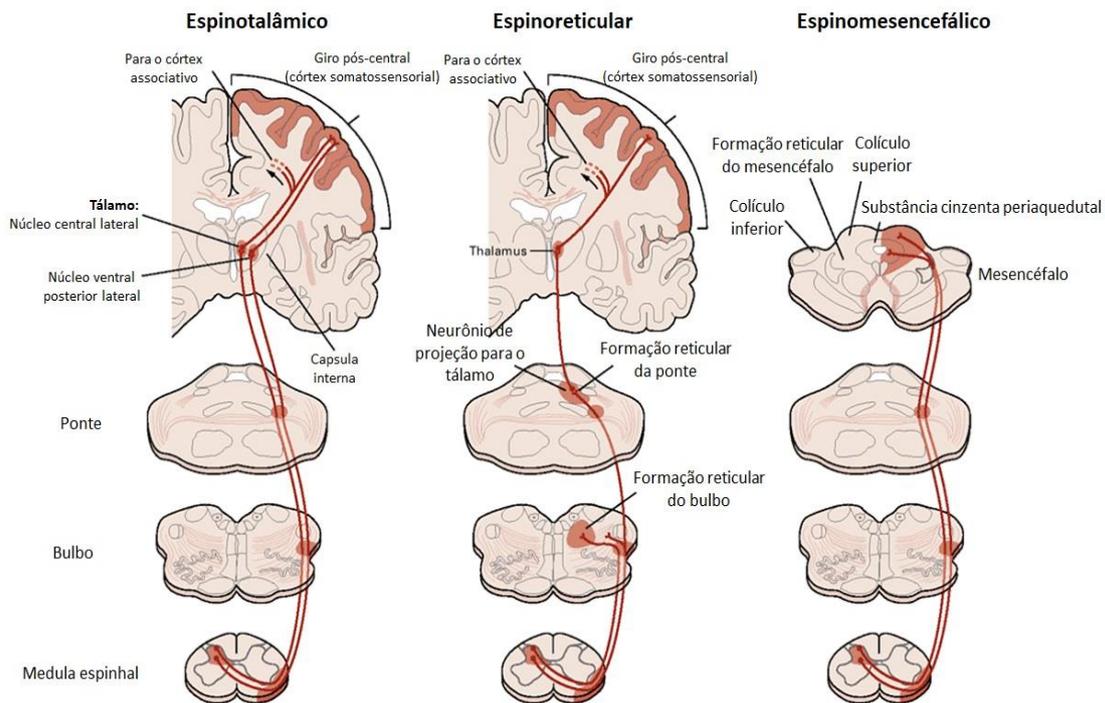


**Figura 1:** Esquema de um nociceptor e alguns componentes da nocicepção. Modificado de “Principles of neural sciences. Erick Kandel; 2000”

A informação sobre a lesão tecidual é transmitida da medula espinal para o cérebro por meio de três vias ascendentes principais: o trato espinotalâmico (dividido ainda em tratos paleoespinotalâmico e neoespinotalâmico), o trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico.

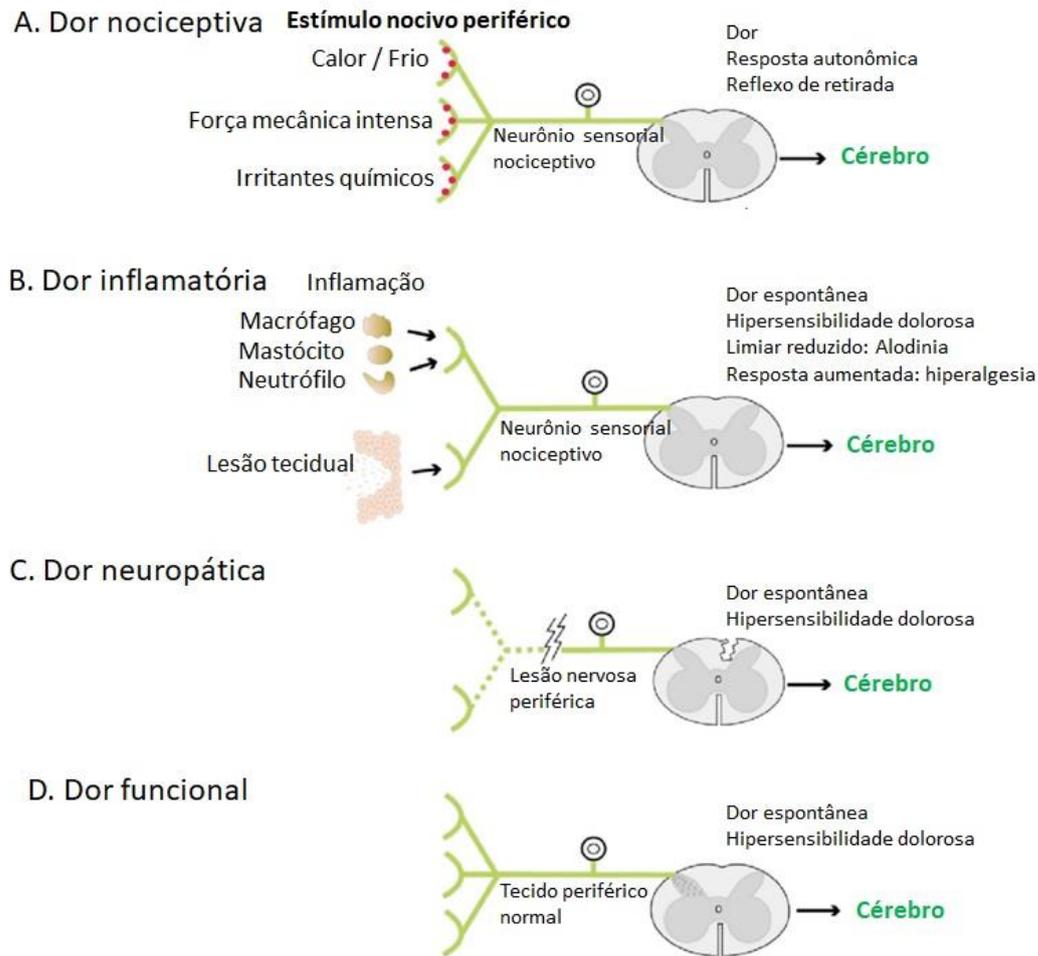
O trato espinotalâmico é a via ascendente nociceptiva mais proeminente na medula espinal. É formado por axônios de neurônios nociceptivo-específicos e de amplo alcance dinâmico a partir das lâminas I e V-VII do corno dorsal da medula (Figura 2). Esses axônios projetam-se para a porção contralateral da medula e ascendem pela porção anterolateral da substância branca da medula, terminando no tálamo. A estimulação elétrica do trato espinotalâmico resulta em dor, enquanto lesões deste trato (realizadas através de um procedimento denominado cordotomia anterolateral) resulta em reduções marcantes da sensação de dor no lado oposto ao da lesão medular. O trato espinoreticular é composto por axônios de neurônios provenientes das lâminas VII e VIII. Ele ascende no quadrante anterolateral da medula espinal e termina em ambos, formação reticular e tálamo. Em contraste com o trato espinotalâmico, diversos axônios do trato espinoreticular não cruzam a linha medial. O trato espinomesencefálico é composto por axônios

de neurônios provenientes das lâminas I e V. Ele projeta para o quadrante anterolateral da medula espinhal até a formação reticular do mesencéfalo e a substância cinzenta periaquedutal e, por meio do trato espinobraquial, projeta-se para o núcleo parabraquial. Por sua vez, neurônios do núcleo parabraquial projetam-se para a amígdala, um importante componente do sistema límbico, o sistema neuronal envolvido com as emoções. Portanto, o trato espinomesencefálico contribui para o componente afetivo da dor. Muitos dos axônios dessa via aferente projetam-se na parte dorsal do funículo lateral ao invés de se projetarem no quadrante anterolateral (Figura 2 (Kandel et al., 2000)).



**Figura 2:** Principais vias aferentes da dor para centros superiores de processamento no sistema nervoso central. O trato espinotalâmico é o trato mais proeminente na transmissão dos estímulos aferentes nociceptivos para o sistema nervoso central. Modificado de “Principles of neural sciences. Erick Kandel; 2000”

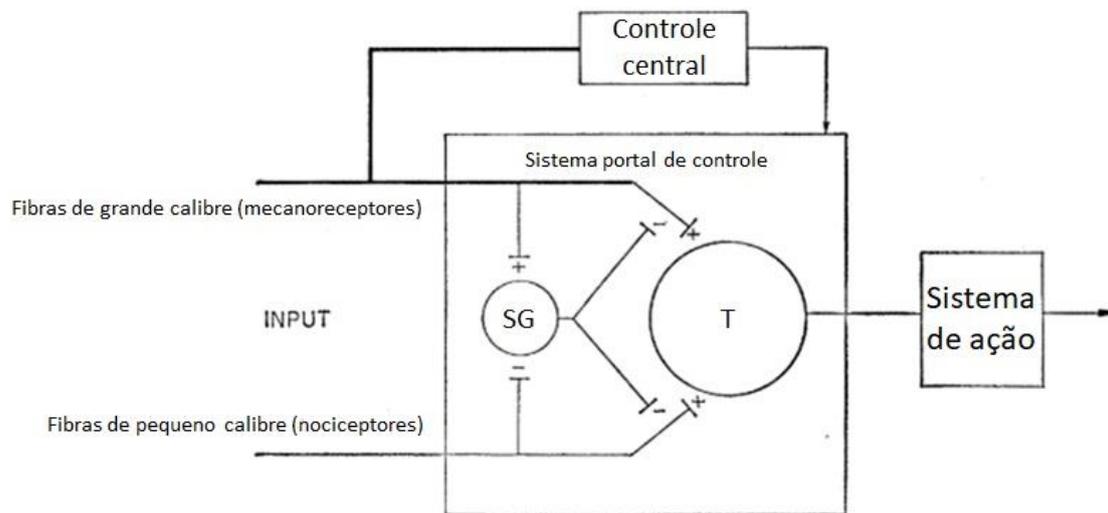
De forma geral, existem 4 tipos principais de dor, classificados de acordo com a origem ou fonte causadora do estímulo doloroso. A primeira, dor nociceptiva (Figura 3A), é desencadeada quando estímulos térmicos, mecânicos ou químicos têm intensidade grande suficiente para provocar lesão tecidual e, conseqüentemente, iniciar a resposta nociceptiva. O segundo tipo de dor é a dor inflamatória (Figura 3B) na qual mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e as cininas, produzidos por células no local de uma lesão, causam a sensibilização do terminal sensorial nociceptivo, e conseqüentemente, sinalizam o estímulo doloroso para o SNC. O terceiro tipo de dor, a dor neuropática (Figura 3C), acontece devido a uma lesão causada no nervo periférico que, por diversos mecanismos teciduais e moleculares, provoca um aumento na aferência nociceptiva para o SNC. O quarto e último tipo de dor classificado é a dor funcional (Figura 3D) no qual aparentemente não existe lesão tecidual associada, mas um erro no processamento das informações sensoriais, normalmente a nível de SNC, acaba por produzir a sensação de dor (Woolf et al., 2004).



**Figura 3:** Quatro tipos principais de dor, seus estímulos causadores e principais respostas do organismo à sensação dolorosa (Figura adaptada de Woolf et al., 2004).

Cada tipo de dor apresenta mecanismos moleculares diferentes responsáveis pela geração dos impulsos nervosos e das respostas dolorosas em um indivíduo (Julius e Basbaum, 2001) e paralelamente a isso, o organismo apresenta mecanismos celulares e neuronais específicos responsáveis pelo controle da resposta a um estímulo doloroso (Hunt e Mantyh, 2001). Um desses mecanismos já classicamente caracterizados é o mecanismo do “portal da dor” proposto por Melzack e Wall (1965). De acordo com essa teoria, a estimulação de fibras mecanorreceptoras estimula interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa da medula espinhal, de forma que tais interneurônios inibem a aferência nociceptiva proveniente de fibras A $\delta$  e fibras do tipo C vindas da periferia (Figura 4). A teoria do portal da dor foi o primeiro mecanismo de controle endógeno da dor proposto (Melzack and Wall, 1965), e a partir

daí, uma grande linha de pesquisa surgiu com o objetivo de melhor compreender tais mecanismos.



**Figura 4:** Teoria do portal da dor (Melzack and Wall, 1965). SG – Substância gelatinosa; T – células de transmissão. Figura adaptada de Melzack e Wall, 1965

Dada a grande variedade de estímulos que podem causar dor e os diferentes tipos de dor decorrentes do estímulo lesivo, é cada vez mais necessário desenvolver estratégias farmacológicas apropriadas a cada tipo de dor, de acordo com sua etiologia, mecanismos de ação e controle (Woolf e Max, 2001).

### Dor neuropática e suas particularidades

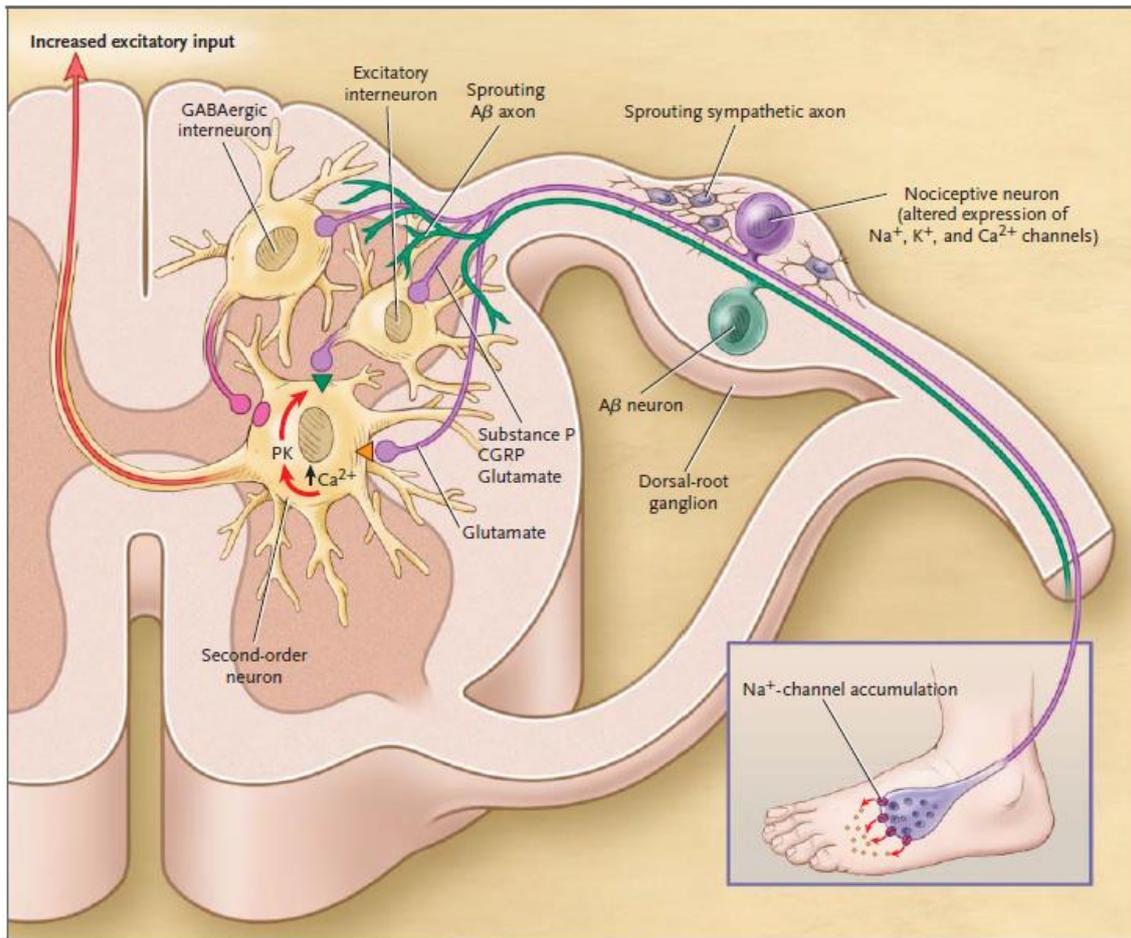
Dentre os quatro tipos principais de dor mencionados anteriormente, o presente trabalho tem foco na dor neuropática, a qual pode ser caracterizada como uma dor crônica que surge em consequência direta de uma lesão ou uma doença que afeta o sistema somatossensorial periférico (Geber et al., 2009). Essa dor é relativamente comum e pode ser muito debilitante (Woolf e Salter, 2000), pode envolver componentes do SNC, porém é caracterizada por lesão ou disfunção principalmente no sistema nervoso periférico. A partir do momento em que a lesão no nervo se estabelece, diversos processos de plasticidade neuronal começam a acontecer e alteram o processamento e a funcionalidade da dor, dentre esses processos está a fosforilação de receptores e canais iônicos e o aumento na expressão de

proteínas de membrana responsáveis pela aferência de estímulos nociceptivos a partir da periferia (Woolf e Salter, 2000).

Após a lesão do nervo periférico (Figura 5), uma cascata de eventos ditos mal adaptativos é responsável por aumentar a expressão de canais iônicos de membrana nos neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (DRG). Brotamentos de axônios provenientes de neurônios simpáticos formam bolsas entrelaçadas ao redor dos corpos celulares neuronais do DRG causando aumento na excitabilidade dos neurônios, e conseqüentemente, uma dor exacerbada, que pode ser inibida por antidepressivos tricíclicos como a amitriptilina e nortriptilina (Tasmuth et al., 2002). No local da lesão periférica (inserto na figura 5), canais para sódio se espalham ao longo do axônio resultando em descargas neuronais ectópicas. Alguns fármacos são ferramentas úteis para o controle da dor nesses casos, como inibidores de canais para sódio que podem ser utilizados para controlar as aferências nociceptivas nesse local e incluem a lidocaína, fenitoína e antidepressivos tricíclicos como a amitriptilina (Sindrup e Jensen, 2000) e carbamazepina (Sindrup et al., 1990). Canais para cálcio também podem ser alvos farmacológicos importantes nessa condição e drogas como gabapentina e lamotrigina são potenciais inibidores de canais para cálcio que podem ser efetivamente empregados no tratamento da dor neuropática (Morello et al., 1999).

Projeções de neurônios nociceptivos no DRG para interneurônios na medula espinhal aumentam a aferência excitatória por meio de liberação de moléculas como a substância P, proteína relacionada ao gene da calcitonina (CGRP) e glutamato (Mendell e Sahenk, 2003). Os neurônios de segunda ordem na medula espinhal, que são normalmente ativados por glutamato via receptores AMPA (Figura 5, triângulos laranja), são induzidos a disparar espontaneamente por meio da ativação dos receptores NMDA (Figura 5, triângulos verdes). A excitação de neurônios de segunda ordem leva a um aumento nos níveis intracelulares de cálcio e conseqüente ativação de proteínas cinases (PK) que fosforilam proteínas intracelulares como os receptores NMDA. Potenciais inibidores desses mecanismos incluem gabapentina (Morello et al., 1999), lamotrigina, tramadol, opiáceos, inibidores seletivos de recaptação de serotonina (Sindrup et al., 1990) e venlafaxina (Tasmuth et al., 2002). Ainda, parte do mecanismo envolve a perda de inibição de neurônios de segunda ordem devido à uma redução da aferência de neurônios GABAérgicos decorrente de redução na expressão de receptores GABA<sub>A</sub> (Figura 5, oval rosa). Brotamentos de terminais centrais nos neurônios nociceptivos do DRG (Figura 5, neurônios A $\beta$ )

expressam substâncias nociceptivas que contribuem para a hiperalgesia e alodina tática característica da dor neuropática (Mendell e Sahenk, 2003).



**Figura 5:** Vias de condução dor na neuropatia periférica e potenciais locais para interferência farmacológica (Adaptada de Mendell e Sahenk, 2003).

Os sintomas mais comuns da dor neuropática aparecem na forma de alterações sensoriais como aumento de sensibilidade a um estímulo nocivo (hiperalgesia), sensação dolorosa a um estímulo não doloroso (alodinia) e dor espontânea (Bridges et al., 2001). O tratamento de escolha para pacientes nessa condição é feito com o uso de fármacos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes como é o caso da amitriptilina e da gabapentina, porém somente cerca de apenas 50% dos pacientes conseguem melhora significativa da condição dolorosa uma vez iniciado o tratamento. Ainda, os efeitos colaterais dos fármacos usados são bastante comuns e acabam dificultando ainda mais a adesão de muitos pacientes ao tratamento disponível (Mendell e Sahenk, 2003). Diferentes tipos de neuropatia podem acometer a população, mas todas elas causam uma piora considerável na qualidade de vida dos

pacientes, além de representarem um grande gasto para a saúde pública (Alleman et al., 2015), fazendo com que seja de grande importância o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas capazes de contornar a sensação dolorosa em pacientes neuropáticos.

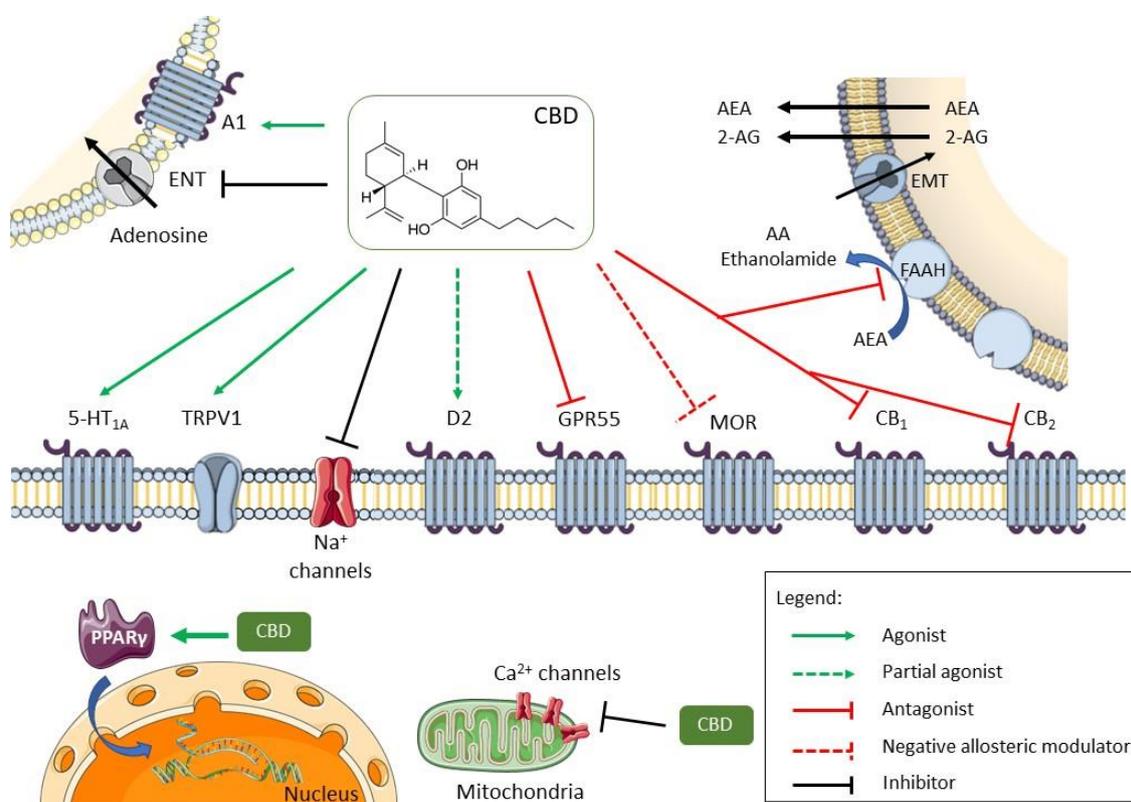
### Sistemas analgésicos endógenos e o canabidiol

O uso de substâncias canabinoides vem constantemente atraindo atenção da comunidade científica para o tratamento de dor neuropática como uma alternativa à terapêutica clássica para essa condição (Lee et al., 2018). Uma meta análise publicada por (Andreae et al., 2015) mostrou que o uso de cannabis na sua forma inalada foi capaz de produzir alívio de curto prazo em 1 de cada 6 pacientes portadores de dor neuropática crônica. Aparentemente, quando vaporizada, a cannabis pode ser seguramente entregue e distribuída pelo organismo de forma eficiente e facilmente titulável para doses que efetivamente produzem alguma melhora dos sinais dolorosos (Wilsey et al., 2013, 2016; Wallace et al., 2015). Muitos ensaios clínicos foram conduzidos para testar o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) como um candidato para o tratamento da dor neuropática, porém os efeitos psicotomiméticos provenientes do uso do THC dificultam a escolha dessa substância como uma droga potencial para ser utilizada na terapêutica. Em contrapartida a isso, o canabidiol apresenta grande potencial como agente analgésico sem apresentar os efeitos de adicção e recompensa característicos do THC (Katsidoni et al., 2013), fazendo com que seja um forte candidato para o tratamento de dor neuropática, bem como para o tratamento de outras condições, como ansiedade (Blessing et al., 2015).

O canabidiol (CBD) é um fitocanabinoide extremamente abundante na *Cannabis sativa* (Mechoulam et al., 2007) e, apesar de não apresentar efeitos psicotomiméticos, desempenha um amplo papel sobre diversos alvos farmacológicos tendo, portanto grande aplicabilidade no tratamento de doenças psiquiátricas (Campos et al., 2012) e de dores de difícil tratamento (Russo, 2008).

Existem diversas discussões sobre o mecanismo de ação do canabidiol nos sistemas biológicos. A literatura é ampla e diversos alvos moleculares já foram encontrados para o CBD, mas nesse aspecto, muitas pesquisas ainda são necessárias para melhor entender o efeito dessa molécula no tratamento da dor neuropática. O CBD pode agir como um agonista parcial de receptores CB<sub>2</sub> (Mechoulam et al., 2007) bem como agonista total de receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (Campos et al., 2012), receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (Russo et al.,

2005) e receptores de potencial transitório vaniloide (TRPV1) (Campos et al., 2012). O CBD ainda pode agir como um agonista competitivo do receptor GPR55, descrito como um possível receptor canabinoide e um receptor de lisofosfatidil inositol (Ryberg et al., 2007). Além disso, o CBD pode agir como um modulador alostérico negativo de receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides (Kathmann et al., 2006). De forma importante, foi mostrado que o CBD pode exercer efeito modulatório alostérico negativo e antagonístico sobre receptores CB<sub>1</sub> em concentrações muito abaixo do K<sub>i</sub> de afinidade relatado para o sítio ortostérico do CBD no receptor CB<sub>1</sub>. Este dado sugere que um sítio de alta afinidade para o CBD existe no receptor CB<sub>1</sub>, que seja diferente do sítio ortostérico predito para endocanabinóides (Pertwee et al., 2002; Kathmann et al., 2006; Thomas et al., 2007; Laprairie et al., 2015). Os principais alvos moleculares do CBD foram revisados por (Almeida e Devi, 2020) e estão representados na figura 6.



**Figura 6:** Diversidade de alvos moleculares e vias de sinalização para o CBD (Almeida e Devi, 2020).

Trabalhos mais recentes veem demonstrando o potencial do CBD como um agente analgésico, principalmente atuando por meio do agonismo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> em modelos animais de neuropatia diabética (Jesus et al., 2019). Em estudos pré-clínicos, a aplicação transdérmica de óleo de CBD (250 mg/3 fl oz) foi capaz de atenuar significativamente a sensação

de dor intensa, aguda, bem como alterações nas sensações de frio e prurido em pacientes idosos com sintomas crônicos de neuropatia periférica (Xu et al., 2020). No tratamento da dor neuropática consequente do uso de quimioterápicos, o CBD também mostrou efeitos analgésicos em camundongos (Harris et al., 2016) e esses achados foram posteriormente corroborados por (King et al., 2017) que mostraram a eficácia do CBD utilizado juntamente com o THC no tratamento da neuropatia induzida por diferentes quimioterápicos.

A dor neuropática crônica é uma condição altamente debilitante que pode comprometer a qualidade de vida das pessoas acometidas, sendo tratada como um problema mundial de saúde pública (Jensen et al., 2007). A compreensão dos mecanismos geradores de dor, bem como dos tipos diferentes de alterações moleculares que precedem o estabelecimento da neuropatia são de fundamental importância para profissionais da área da saúde (Finnerup e Jensen, 2006) pois permitem direcionar o tratamento farmacológico mais apropriado para cada paciente. A dor crônica é uma condição mal adaptativa e acontece como consequência de lesão ou dano ao sistema nervoso somatossensorial e, em humanos, tem algumas características marcantes, como a duração normalmente maior do que 3 meses, a intensidade desproporcional em relação ao tamanho ou grau da lesão e, muitas vezes, a ausência de resposta ao tratamento farmacológico (Treede et al., 2015). Na dor neuropática, após a lesão do nervo, tem início uma atividade ectópica nos nociceptores (Liu et al., 2000; Wu et al., 2001) e tal atividade é fundamental para a manutenção da dor neuropática, como foi demonstrado recentemente por meio da avaliação da eficácia de anestésicos locais em reverter a dor neuropática periférica (Haroutounian et al., 2014). A atividade ectópica pode surgir em axônios lesados, axônios não lesados nas proximidades de axônios lesados ou em corpos celulares correspondentes a tais axônios (Liu et al., 2000; Wu et al., 2001).

Nesse contexto, os canais para sódio sensíveis à voltagem desempenham um papel fundamental na fisiopatologia da dor neuropática controlando a excitabilidade dos neurônios primários presentes na periferia e que fazem a aferência nociceptiva para o SNC. De acordo com a literatura, os canais para sódio voltagem-dependentes implicados no contexto da dor são os canais  $Na_v1.3$ ;  $1.7$ ;  $1.8$ ;  $1.9$  (Bennett et al., 2019). O acúmulo de canais  $Na_v1.3$  na porção proximal de uma fibra nervosa lesada é consistente com estudos demonstrando que axônios presentes em neuromas são hiperexcitáveis e podem funcionar como geradores de impulsos ectópicos (Scadding, 1981; Wang et al., 1998). É importante ressaltar que a observação do funcionamento de uma isoforma de canal isoladamente não representa o contexto fisiológico amplo presente na dor neuropática, portanto é fundamental a análise da participação desses canais de forma integrada na nocicepção (Bennett et al., 2019).

O presente trabalho não avaliou a participação dos canais para sódio no mecanismo analgésico do canabidiol em animais neuropáticos, mas deve-se levar em consideração que canais para sódio voltagem-dependentes podem ser modulados diretamente pelo CBD. O CBD é capaz de estabilizar a conformação inativada de canais para sódio voltagem-dependentes e inibir correntes de sódio em células imortalizadas e em neurônios em cultura primária (Ghovanloo et al., 2018). Tal mecanismo pode representar parte da explicação de como o controle de disparos ectópicos provenientes do terminal nervoso pode ser um componente do efeito analgésico do CBD em animais neuropáticos. Diversos são os mecanismos de ação propostos para o CBD, e a variedade de alvos farmacológicos para essa substância é o que confere o grande potencial terapêutico para uso na clínica (Almeida e Devi, 2020). No contexto da dor inflamatória, células imunes, por meio da liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A, podem alterar a sensibilidade do neurônio atuando sobre canais iônicos, principalmente Nav1.7, Nav1.8, e Nav1.9 facilitando a aferência nociceptiva (Pinho-Ribeiro et al., 2017). Paralelamente, Ghovanloo et al. (2018) mostrou que o CBD é capaz de prevenir a abertura de canais para sódio, estabilizando a conformação inativada do canal e portanto reduzindo a aferência nociceptiva de forma a se opor ao estado inflamatório com a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A.

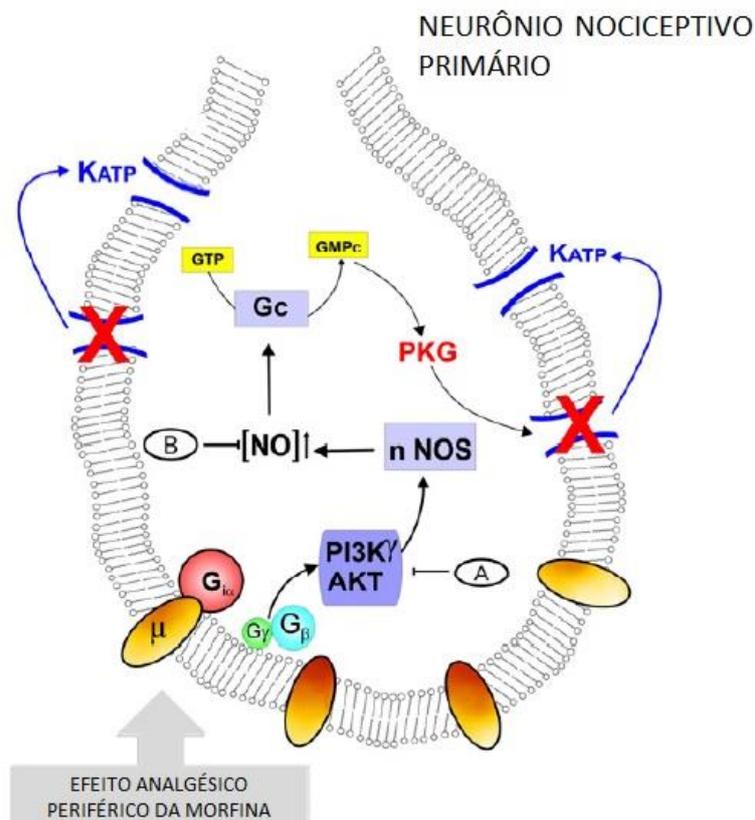
### Via analgésica endógena do óxido nítrico

Após a interação do CBD com seus alvos moleculares na membrana das células, tem início uma cascata de sinalização intracelular que é responsável por transmitir e propagar o efeito dessa molécula nos tecidos. Sabe-se da literatura que a via do óxido nítrico-GMPc está envolvida com eventos analgésicos endógenos em modelos experimentais de dor inflamatória (Duarte et al., 1990, 1992). Trabalhos de Romero et al. (2012a) mostram a participação desta mesma via no mecanismo analgésico da N-palmitoil-etanolamina (PEA), um canabinoide endógeno. Além disso, a administração de inibidores da síntese de óxido nítrico, como por exemplo o L-NIO ou o L-NMMA, reverteu a analgesia periférica mediada por morfina de maneira dose-dependente (Ferreira et al., 1991). A modulação da sinalização da via NO/GMPc nos tecidos periféricos representa um grande potencial terapêutico e pode ser explorada posteriormente como alternativa na prática clínica (Gomes et al., 2020). Em animais knockout para as isoformas neuronal e induzida das enzimas NOS, o tratamento com morfina ou DPDPE, agonistas seletivos de receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides, respectivamente, não produziu o mesmo efeito

analgésico quando comparado com animais selvagens (Leáñez et al., 2009). Ainda, é importante ressaltar que esta via parece mediar o efeito analgésico periférico de várias substâncias endógenas e exógenas, especialmente o efeito periférico dos opioides (Smith et al., 1982).

Foi demonstrado que a bremazocina, um agonista seletivo de receptores  $\kappa$  opioides, também induz antinocicepção por meio da ativação da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc (Amarante and Duarte, 2002b). Complementando esses trabalhos, foi demonstrado que a morfina desempenha seu efeito analgésico em tecidos periféricos, frente a um estímulo nociceptivo pela  $PGE_2$ , por meio da ativação da via PI3K $\gamma$ /Akt/NOSn/NO/ $K_{ATP}$  (Cunha et al., 2010). Sumarizando esses dados da literatura, sabe-se, de uma forma geral, que a ativação da via do óxido nítrico em tecidos periféricos está envolvida com analgesia em tecidos periféricos (Gomes et al., 2020). A figura 7 é uma representação esquemática da via do óxido nítrico e seu caminho até a ativação e abertura de canais para potássio sensíveis ao ATP de forma a gerar hiperpolarização do terminal nociceptivo primário e, conseqüentemente, analgesia.

O alvo final da via do óxido nítrico são os canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e a ativação/abertura desses canais provoca um efluxo de íons  $K^+$  para o meio extracelular, o que induz uma hiperpolarização da membrana dos neurônios aferentes primários (nociceptores) (Edwards and Weston, 1993). Um trabalho elegante de Kawano et al. (2009b) mostrou que as propriedades biofísicas e farmacológicas dos  $K_{ATP}$  são preservadas mesmo após uma axotomia, sugerindo que esses canais presentes em neurônios aferentes primários ainda permanecem disponíveis para o direcionamento terapêutico contra uma dor neuropática já estabelecida. Foi demonstrado que a administração intraplantar de diazóxido e de NN414, agonistas da subunidade regulatória SUR1 do canal para potássio sensível ao ATP, foi capaz de aumentar o limiar de sensibilidade mecânica em camundongos neuropáticos por meio da ligação do nervo espinhal (Luu et al., 2019). A literatura já demonstrou que o efeito anticonvulsivante do canabidiol pode depender de outros tipos de canais para potássio, como por exemplo os canais BK (Shirazi-zand et al., 2013), porém pouco se sabe sobre os efeitos do CBD sobre os  $K_{ATP}$ , e mais estudos nessa área se fazem necessários.



**Figura 7:** Mecanismo analgésico da morfina por meio da ativação da via PI3K $\gamma$ /Akt/NOSn/NO/K<sub>ATP</sub>. PI3K $\gamma$  – Fosfatidilinositol-3-cinase gamma; Akt – proteína cinase B; NOSn – Óxido nítrico sintase neuronal; NO – Óxido nítrico; Gc – Guanilato ciclase; GTP – Guanosina trifosfato; GMPc – Guanosina monofosfato cíclico; PKG – Proteína cinase G; K<sub>ATP</sub> – Canal para potássio sensível ao ATP. (Adaptado de Cunha et al., 2010).

Essa diversidade de efeitos farmacodinâmicos confere ao CBD um alto poder terapêutico, principalmente no tratamento de dores crônicas de difícil tratamento, uma vez que o CBD é capaz de modular a atividade de receptores opioides e canabinoides, principais receptores envolvidos com respostas analgésicas (Russo, 2008; Stein e Lang, 2009).

### **Justificativa**

As estimativas da prevalência de dor neuropática crônica devido a lesão nervosa periférica variam 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 (Torrance et al., 2013; Murnion, 2018). Além disto, os tratamentos farmacológicos atuais são frequentemente insatisfatórios em proporcionar alívio da dor, além de induzirem vários efeitos adversos que dificultam a aderência do paciente ao tratamento.

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. O número de fármacos fitoterápicos sendo desenvolvidos para medicina vem aumentando significativamente (Chiappedi e Bejor, 2010), incluindo analgésicos e diversas outras classes de fármacos (Zareba, 2009; Kanodia et al., 2010). Paralelamente, o crescente número de trabalhos envolvendo o canabidiol para o tratamento de ansiedade, epilepsia, diabetes, depressão e doenças neurodegenerativas (Moreira et al., 2006; Iuvone et al., 2009; Vilela et al., 2017) bem como da dor neuropática (Ward et al., 2011; Philpott et al., 2017; Xu et al., 2020), fornece uma base sólida para a continuação das pesquisas com o canabidiol e seus usos terapêuticos.

Além disso, devido ao comprovado baixo índice de efeitos adversos e devido à alta tolerabilidade o CBD (Hurd et al., 2015; Hurd, 2017), nosso trabalho busca elucidar os mecanismos pelos quais o canabidiol pode emergir como um agente analgésico no tratamento da dor neuropática.

## Objetivo geral

Verificar o potencial analgésico do canabidiol no tratamento da dor neuropática e estudar possíveis mecanismos responsáveis por essa ação analgésica.

## Objetivos específicos

- Caracterizar a analgesia sistêmica induzida pelo tratamento crônico com o CBD em camundongos neuropáticos.
- Verificar a participação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e TRPV1 na analgesia induzida pelo CBD.
- Estudar a participação dos sistemas canabinoide e opioide na analgesia induzida pelo CBD.
- Estudar a participação da via PI3K $\gamma$ /NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> na analgesia induzida pelo CBD.
- Verificar a quantidade de canais para potássio sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) na pata de camundongos submetidos ao tratamento crônico com CBD.

## Materiais e Métodos

### Animais de experimentação

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). Os animais foram alocados em caixas plásticas de dimensões 30x16x12 centímetros (4/caixas) com cama de forragem, tendo livre acesso à ração e água e mantidos 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 de dose letal de mistura de ketamina (300 mg/Kg) e xilazina (25 mg/Kg). Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e aprovado sob o Protocolo de nº: 57/2017.

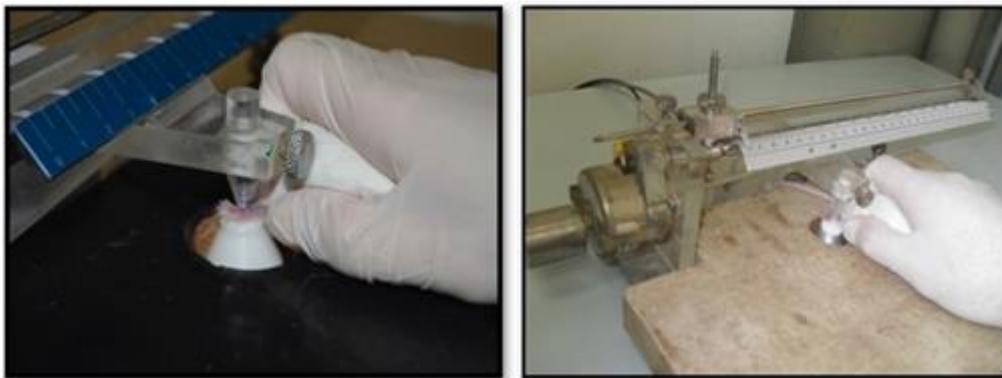
### Construção do nervo ciático

A técnica cirúrgica que foi empregada para estudar a dor neuropática é a técnica de constrição frouxa do nervo ciático, adaptada de Bennet and Xie, (1988) para camundongos Swiss. Nesse procedimento, o animal foi primeiramente anestesiado com solução de cloridrato de ketamina 10% (50 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (5 mg/Kg), injetados por via intraperitoneal na proporção de 100  $\mu$ L/30 g de peso e, então, colocado em uma mesa cirúrgica, na posição de decúbito dorsal. A região lateral da coxa direita foi epilada e o animal foi

posicionado de forma que fique exposta toda a região dorsolateral do quadril direito e lateral da coxa. Inicialmente, com auxílio de uma pinça e uma tesoura de ponta afiada, foi realizada uma incisão na pele sobre os músculos bíceps femoral e vasto lateral. Em seguida, com ajuda de uma tesoura, foi feita divulsão dos músculos da região até acessar o nervo ciático. Com auxílio de um instrumento curvo sem ponta, todo o nervo foi liberado de qualquer aderência e exposto. Duas ligaduras frouxas, com fio flexível resinado, foram colocadas ao redor do nervo, separadas uma da outra por aproximadamente dois milímetros. Após isso, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de nylon agulhado 5.0. Os animais foram monitorados atentamente após o procedimento até o momento do despertar da anestesia.

### **Avaliação do limiar nociceptivo – método de compressão da pata**

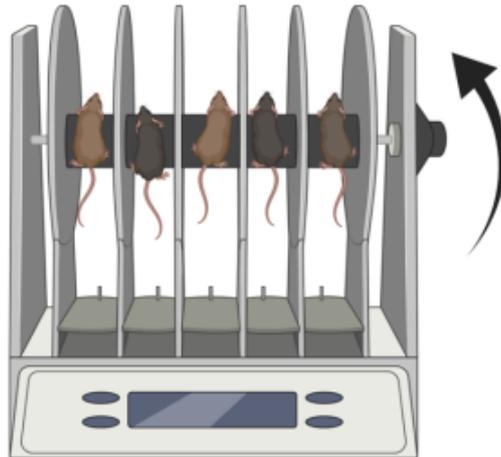
O método de retirada da pata submetida à compressão, descrito originalmente por Randall e Selitto, (1957) e posteriormente adaptado para camundongos por Kawabata et al., (1992) foi utilizado para a mensuração da hiperalgesia periférica em camundongos. No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata em 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 coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm<sup>2</sup> na extremidade, que aplica uma pressão na superfície plantar da pata do animal. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante, 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, através do reflexo de retirada da pata, o experimentador desaciona 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). Os animais foram ambientalizados ao aparelho dois dias antes do teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. A pata do animal é submetida ao aparelho por três vezes, sendo esse procedimento importante para permitir uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deve permanecer quieto, evitando que desenvolva uma reação aversiva simplesmente devido à situação estranha imposta a ele.



**Figura 8:** Aparelho utilizado para medir o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.

### Teste de avaliação da Coordenação Motora

A coordenação motora foi avaliada pelo tempo em que o animal permaneceu caminhando sobre uma haste giratória (Dunham and Miya, 1957) durante 2 minutos (tempo de corte). O aparelho utilizado foi (Ugo Basile mod. 7600; Rota-Rod). Consta de uma haste giratória horizontal, revestida de plástico antideslizante, suspensa a uma altura de 25-30 cm e com rotação constante (16 rpm). A coordenação motora foi avaliada após a aplicação de canabidiol (20 mg/kg) por via intraperitoneal em animais não operados avaliados durante intervalos constantes de 5 em 5 minutos até alcançar 1 hora. Como controle positivo foi utilizada a xilazina (16 mg/kg) injetado via intraperitoneal. O objetivo deste teste foi verificar se a dose de canabidiol utilizada em nossos experimentos seria capaz de interferir na coordenação motora e na capacidade de retirada da pata dos animais submetidos ao teste algesimétrico, excluindo possível efeito sedativo do fármaco sob teste.



**Figura 9:** Teste de avaliação da coordenação motora em camundongos

Drogas

Substância antinociceptiva sob teste

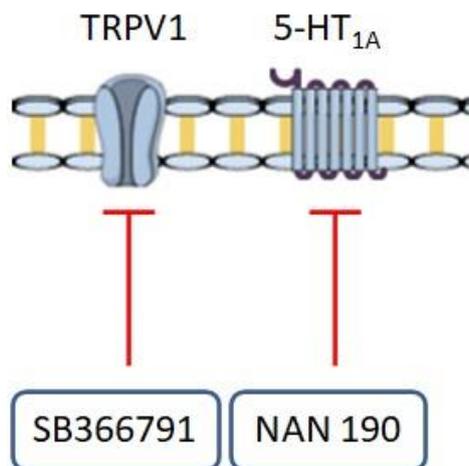
Canabidiol (98% CBD; 2% THC) usado nas doses de 0,2; 2 e 20 mg/Kg de peso corporal dissolvido em DMSO 10%.

Obs: O canabidiol foi gentilmente doado pelo Professor Dr. Francisco Silveira Guimarães da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (FMRP)

Fármacos antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e TRPV1

- NAN 190 (Tocris, EUA) antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%;

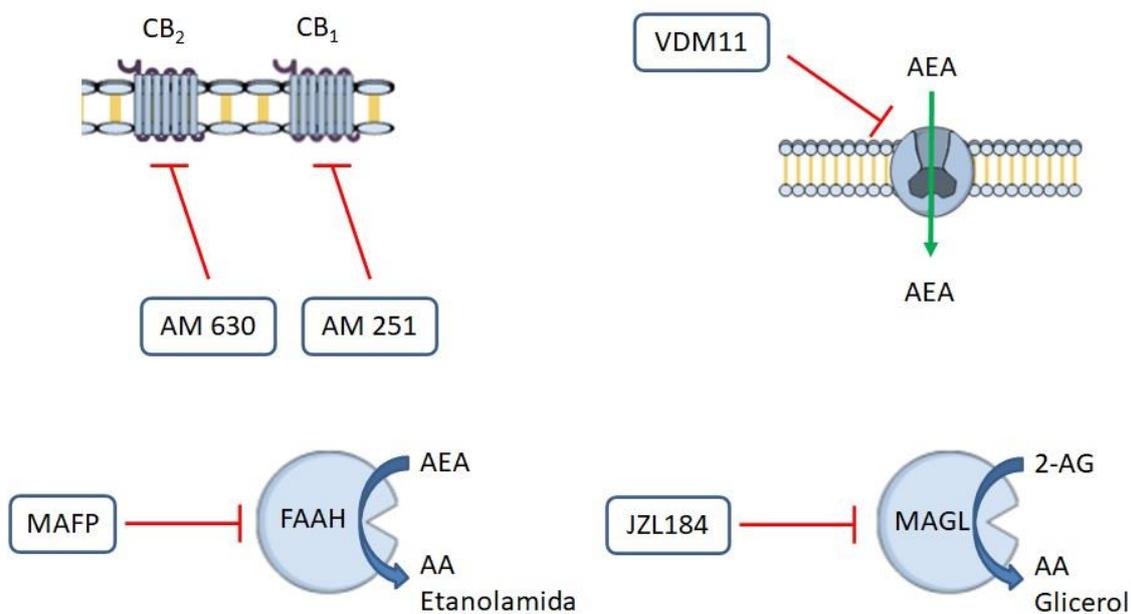
- SB-366791 (Tocris, EUA) antagonista seletivo de TRPV1, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%.



**Figura 10:** Esquema do mecanismo de ação dos antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e TRPV1 (Fonte: Douglas Almeida, elaborado no site Mind The Graph).

#### Fármacos envolvidos com o sistema canabinoide

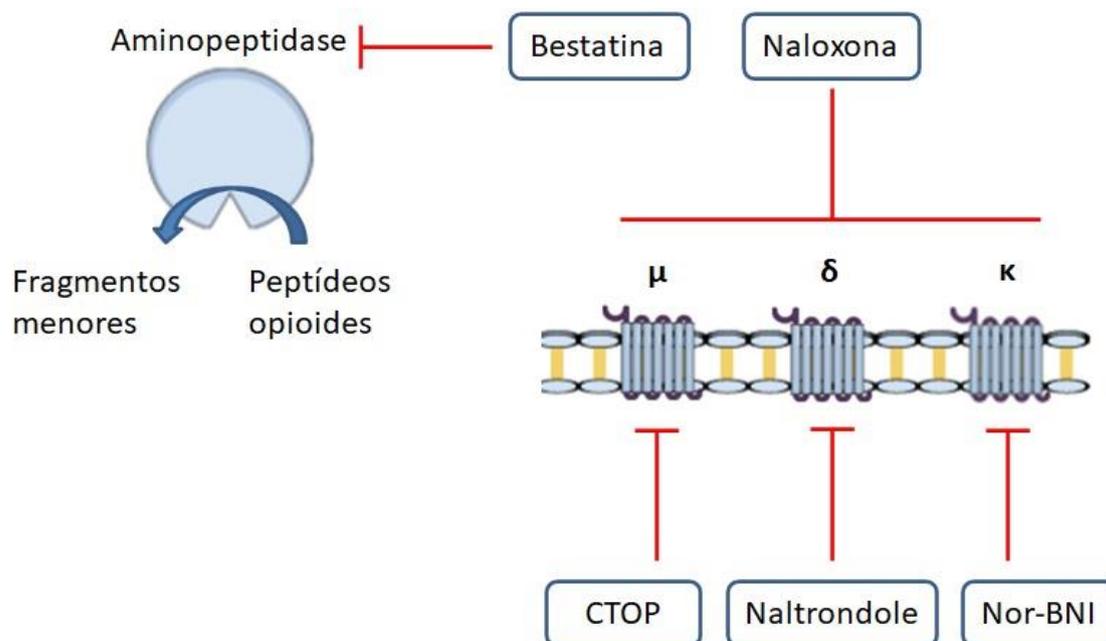
- AM251 [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil) pirazol-3 carboxamida] (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores CB<sub>1</sub> canabinoides, dissolvido em DMSO 100% e diluído antes das injeções em solução salina, atingindo uma concentração final de DMSO 10%;
- AM630 [6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) etil]-1H-indol-3 il] (4metoxifenil) metanona (Tocris), antagonista seletivo dos receptores CB<sub>2</sub> 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, EUA), 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, EUA), inibidor do transportador de anandamida, dissolvido em solução de tocrisolve a 10% em salina;
- JZL184 (ácido 4-[Bis (1,3-benzodioxil-5-il) hidroximetil]-1-piperidinocarboxílico 4-nitrofenil éster) (Tocris, EUA), inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), dissolvido em salina.



**Figura 11:** Esquema do mecanismo de ação dos fármacos do sistema canabinoide. (Fonte: Douglas Almeida, elaborado no site Mind The Graph).

#### Fármacos envolvidos com o sistema opioide

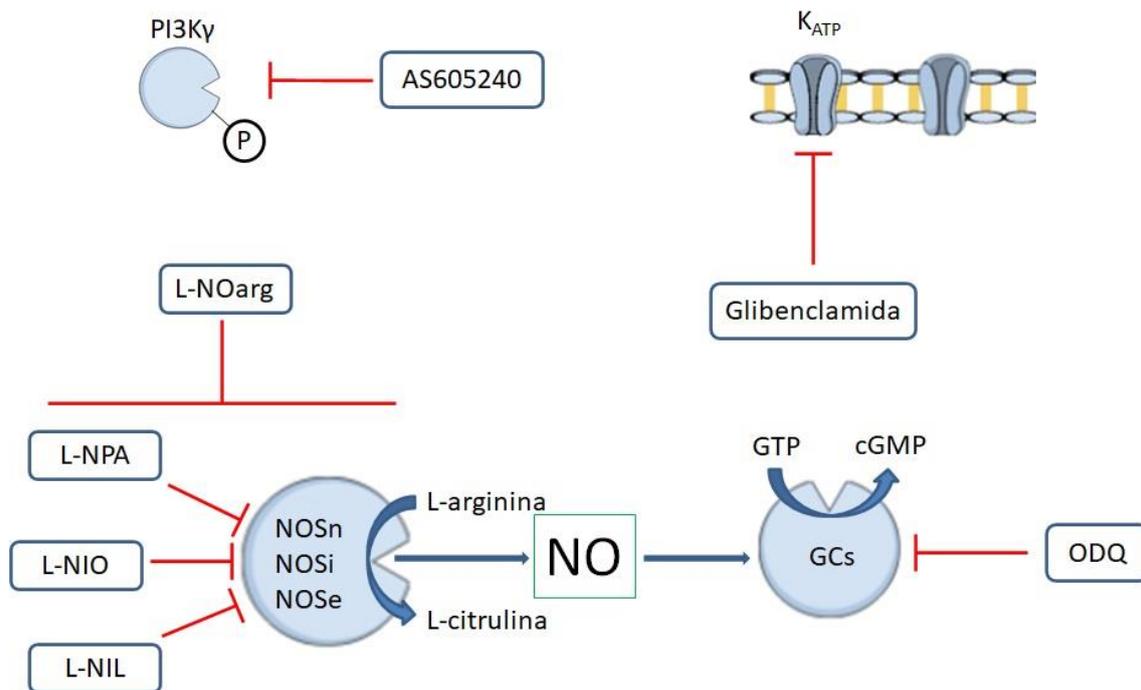
- Naloxona (Sigma, EUA), antagonista não seletivo de receptores opioides, dissolvida em salina;
- CTOP (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores  $\mu$  opioides, dissolvido em salina;
- Naltrindole (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores  $\delta$  opioides, dissolvido em salina;
- Nor-binaltorfimina (Nor-BNI, Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores  $\kappa$  opioides, dissolvida em salina;
- Bestatina (Tocris, EUA), inibidor da enzima aminopeptidase N, enzima que degrada peptídeos opioides endógenos, dissolvida em salina.



**Figura 12:** Esquema do mecanismo de ação dos fármacos envolvidos com o sistema opioide. (Fonte: Douglas Almeida, elaborado no site Mind The Graph).

#### Fármacos envolvidos com a via PI3K $\gamma$ /NOS/NO/GCs/GMPc/K<sub>ATP</sub>

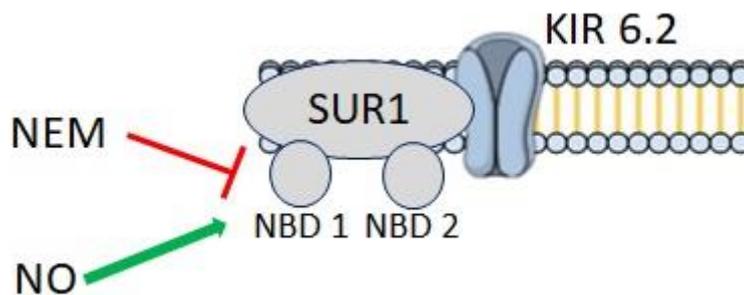
- AS605240 (Sigma), inibidor seletivo da enzima PI3K gama, dissolvido em salina;
- L-NOArg (N<sup>6</sup>-Nitro-L-arginina) (RBI, EUA), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), dissolvido em salina;
- L-NPA (Sigma, EUA), inibidor seletivo da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS), dissolvido em salina;
- L-NIO (Sigma, EUA), inibidor seletivo da isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), dissolvido em salina;
- L-NIL (Sigma, EUA), inibidor seletivo da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), dissolvido em salina;
- ODQ (1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a]quinoxalina-1-ona) (RBI, EUA), inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, dissolvido em DMSO 10% em salina;
- Glibenclamida (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>), dissolvida em solução salina e Tween 20 a 1%.



**Figura 13:** Esquema do mecanismo de ação dos fármacos da via PI3K $\gamma$ /NOS/NO/GCs/GMPc/K<sub>ATP</sub>. (Fonte: Douglas Almeida, elaborado no site Mind The Graph).

#### Fármaco inibidor da reação de S-nitrosilação

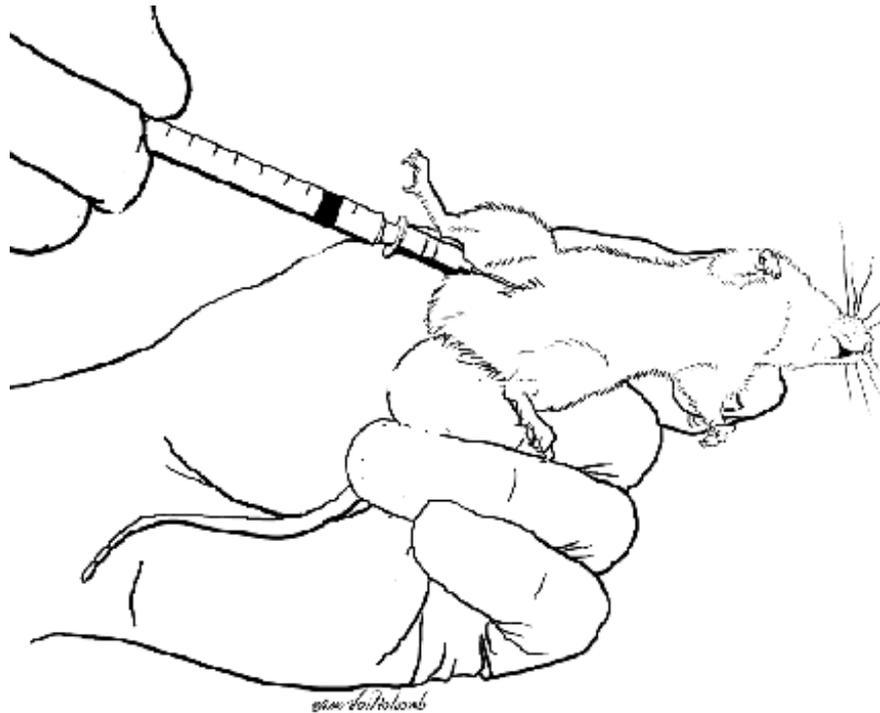
- N-etilmaleimida (NEM, Sigma, EUA), inibidor da S-nitrosilação de resíduos de cisteína na subunidade regulatória SUR1 do K<sub>ATP</sub>, dissolvido em DMSO 10% em salina.



**Figura 14:** Mecanismo de inibição da S-nitrosilação pelo NEM. (Fonte: Douglas Almeida, elaborado no site Mind The Graph).

#### Vias de administração

O canabidiol foi administrado por via intraperitoneal em um volume final de 100  $\mu$ L, dissolvido em DMSO 10%.



**Figura 15:** Via intraperitoneal de administração do CBD.

Todas as demais drogas utilizadas foram administradas pela via intraplantar em um volume final de 20  $\mu$ L.



**Figura 16:** Administração intraplantar subcutânea na pata posterior direita de camundongo.

#### Western blot

Os tecidos da pata dos camundongos foram retirados no 21º dia após a constrição do nervo ciático e em seguida submetidos à dosagem de proteínas, feita utilizando a técnica de Bradford, (1976). O tecido homogenizado foi então separado por eletroforese e posteriormente

transferido para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente com solução de albumina (BSA) 5% em TBS-T. A membrana foi lavada e incubada com anticorpos em tampão contendo BSA 3%. Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando uma solução de luminescência (Luminata, Milipore) e reveladas no revelador Image Quant TL 7.0 Image Analysis Software. Quantificação da densidade de pixels nas imagens foi feita utilizando o protocolo de quantificação descrito por Davarinejad, (2015) usando o software Image J. Foram usados os anticorpos: anti Kir 6.2 (Mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, INC – 1:1.000); secundário Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) – 1.10.000 (Abcam).

### **Delineamento experimental**

Os animais foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático no dia 0 e separados em quatro grupos: Sham veículo (animais falsamente operados e tratados por 10 dias com o veículo do canabidiol – DMSO 10% em salina); Sham CBD (animais falsamente operados e tratados por 10 dias com o CBD); Neuropático veículo (animais operados e tratados por 10 dias com o veículo do CBD); Neuropático CBD (animais operados e tratados por 10 dias com CBD). No 11º dia após a cirurgia é iniciado o tratamento diário com o canabidiol na dose de 20 mg/Kg por via intraperitoneal. Este protocolo perdura até o 21º dia, no qual são feitas as análises de limiar nociceptivo em resposta ao canabidiol no teste algésimétrico de Randall e Sellito (para a avaliação da resposta nociceptiva, o canabidiol foi injetado 30 minutos antes das medidas algésimétricas, tempo necessário para que seja observada a analgesia máxima mediada pelo canabidiol).

Para avaliar a participação dos sistemas periféricos envolvidos com o mecanismo de ação do canabidiol, os animais foram separados nos grupos Sham veículo; Sham CBD; Neuropático veículo; Neuropático CBD e ainda Neuropático CBD + droga em teste (antagonista, inibidor ou bloqueador) e foram injetados na pata com os antagonistas dos respectivos sistemas em análise. As drogas AM251; AM630; MAFP; VDM11; JZL184 e ODQ foram injetadas 10 minutos antes das medidas algésimétricas. As drogas naloxona; CTOP; naltrindole; Nor-BNI, bestatina, L-NOarg; L-NIO; L-NIL; AS605240 e NEM foram injetadas 30 minutos antes das medidas algésimétricas. O NAN-190 foi injetado 20 minutos, o SB366791 foi injetado 15 minutos e a glibenclamida foi injetada 5 minutos antes das medidas algésimétricas. Cada antagonista, inibidor ou bloqueador, possui um pico de ação específico já previamente determinado por outros trabalhos publicados por nosso grupo de pesquisa (Pacheco et al., 2008, 2009; Romero and Duarte, 2009; Romero et al., 2011a, 2012c, 2013; Costa et al., 2014).

Para as coletas de tecidos, outro grupo de animais submetido ao mesmo tratamento (10 dias consecutivos de tratamento com o canabidiol) foi eutanasiado no 21º dia após a cirurgia e os tecidos da pata foram coletados e processados para a dosagem de proteínas e subsequente análise por Western Blot. No total, 4 grupos tiveram seus tecidos coletados para análises biomoleculares posteriores: Sham veículo; Sham CBD; Neuropático veículo; Neuropático CBD.

### Western Blot

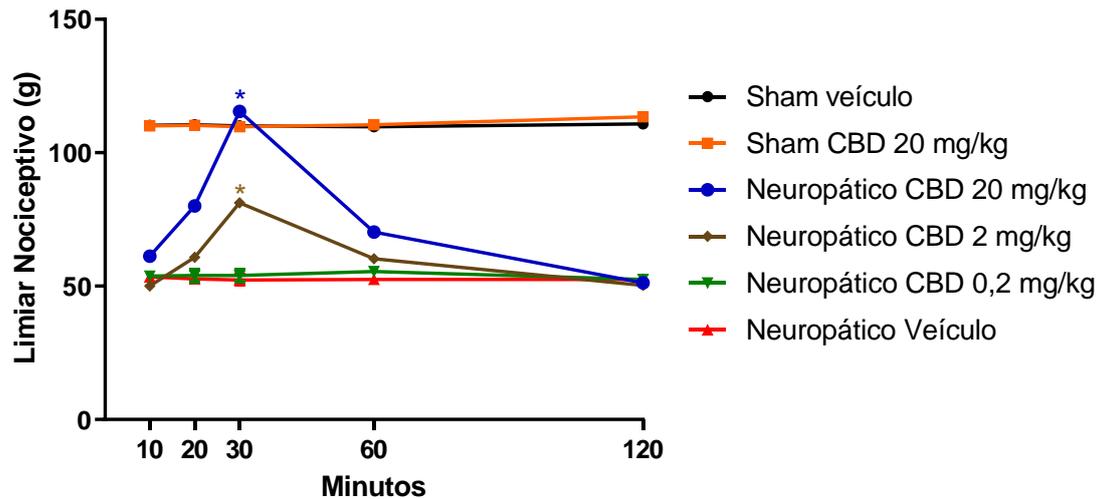
Os tecidos da pata dos camundongos foram retirados no 21º dia após a constrição do nervo ciático e em seguida submetidos à dosagem de proteínas, feita utilizando a técnica de Bradford, (1976). O tecido homogenizado foi então separado por eletroforese e posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente com solução de albumina (BSA) 5% em TBS-T. A membrana foi lavada e incubada com anticorpos em tampão contendo BSA 3%. Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando uma solução de luminescência (Luminata, Milipore) e reveladas no revelador Image Quant TL 7.0 Image Analysis Software. Quantificação da densidade de pixels nas imagens foi feita utilizando o protocolo de quantificação descrito por Davarinejad, (2015) usando o software Image J. Foram usados os anticorpos: anti Kir 6.2 (Mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, INC – 1:1.000); secundário Rabbit Anti-Mouse IgG (HRP) – 1.10.000.

## Resultados

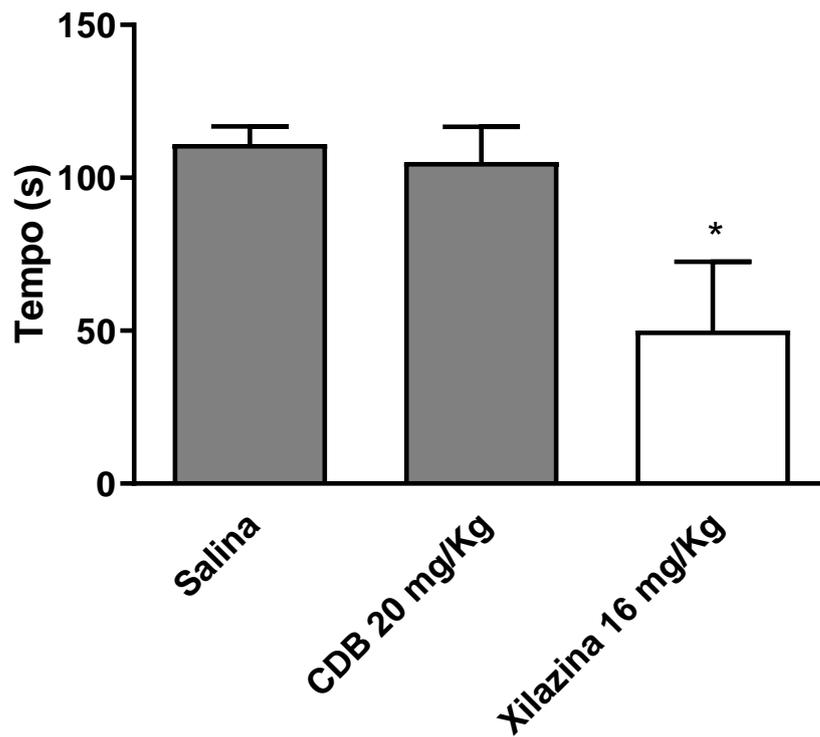
### Caracterização da analgesia mediada por CBD

O canabidiol induziu antinocicepção de forma dose dependente em animais neuropáticos e apresentou um pico de ação de 30 minutos após injeção intraperitoneal. Duas horas após o tratamento com o CBD por via intraperitoneal, não é mais observado efeito analgésico, e os animais retornam o limiar nociceptivo para o basal, caracterizando um efeito analgésico agudo promovido pelo CBD. A dose de 20 mg/Kg de CBD reverteu completamente a resposta nociceptiva, e a dose intermediária de 2 mg/Kg de CBD induziu um efeito analgésico intermediário em relação à dose maior, indicando um efeito analgésico dose dependente induzido pelo canabidiol (Figura 17). A dose de 0,2 mg/Kg não foi capaz de induzir um efeito antinociceptivo significativo, visto que a resposta ao estímulo de compressão foi semelhante à dos animais neuropáticos tratados com veículo.

A possibilidade de efeito sedativo e ataxia causado pelo CBD foi descartada com o teste de RotaRod, no qual o tempo de permanência na haste giratória pelos animais tratados com CBD, na dose de 20 mg/Kg, foi semelhante ao tempo dos animais tratados com salina e diferente dos animais tratados com xilazina na dose de 16 mg/Kg, sedativo utilizado como controle positivo, significativamente menor do que dos animais tratados com salina (Figura 18).



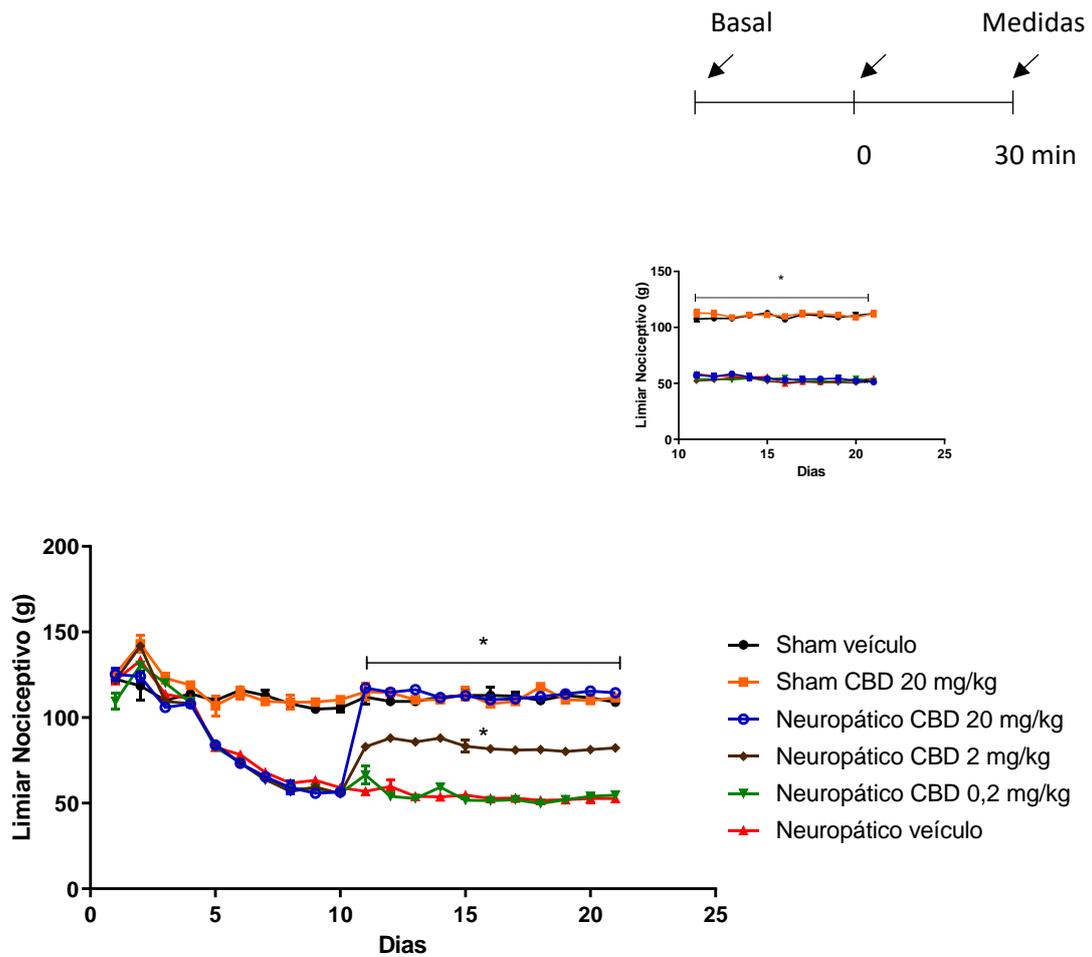
**Figura 17: Caracterização do pico de atividade analgésica do CBD.** Avaliação do limiar nociceptivo de animais neuropáticos tratados com CBD em comparação com animais neuropáticos tratados com veículo do CBD (DMSO 10%) no decorrer de 2 horas. O CBD foi injetado por via intraperitoneal e o limiar nociceptivo foi avaliado 10, 20, 30, 60 e 120 minutos após a injeção. Sham representa animais falsamente operados. \* representa diferença significativa em comparação com o grupo neuropático veículo (Two-Way RM ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .  $F(5, 18) = 1401$ ).



**Figura 18: Avaliação do possível efeito de sedação do CBD quando injetado via intraperitoneal.** Latência de permanência na barra rotatória de animais tratados com CBD na dose de 20 mg/Kg em comparação com animais tratados com salina e xilazina na dose de 16 mg/Kg. A xilazina foi injetada 5 minutos e o CBD foi injetado 30 minutos antes do teste. \* representa diferença significativa em comparação com o grupo salina. Ordinary one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni,  $F(2, 12) = 5,038$ .

O tratamento crônico com CBD se mostrou efetivo em reduzir a nocicepção a partir do primeiro dia de injeção pela via intraperitoneal (11 dias após a cirurgia de contração), de forma dose dependente, até o 21º dia de tratamento (Figura 19), e a resposta analgésica se manteve ao longo de todo o tratamento, descartando um possível efeito de tolerância induzido pelo CBD. O limiar nociceptivo dos animais neuropáticos não sofreu alteração nos momentos que antecederam o tratamento com o CBD (inserto figura 19). A dose de 20 mg/Kg foi capaz de promover analgesia completa em todos os dias de tratamento, enquanto a dose de 2 mg/Kg promoveu analgesia parcial também em todos os dias de tratamento.

A partir deste ponto, a dose de CBD escolhida para os experimentos subsequentes com os antagonistas farmacológicos seletivos foi de 20 mg/Kg, dose cujo efeito analgésico é máximo e facilita a visualização do antagonismo farmacológico buscado com os experimentos utilizando os antagonistas.

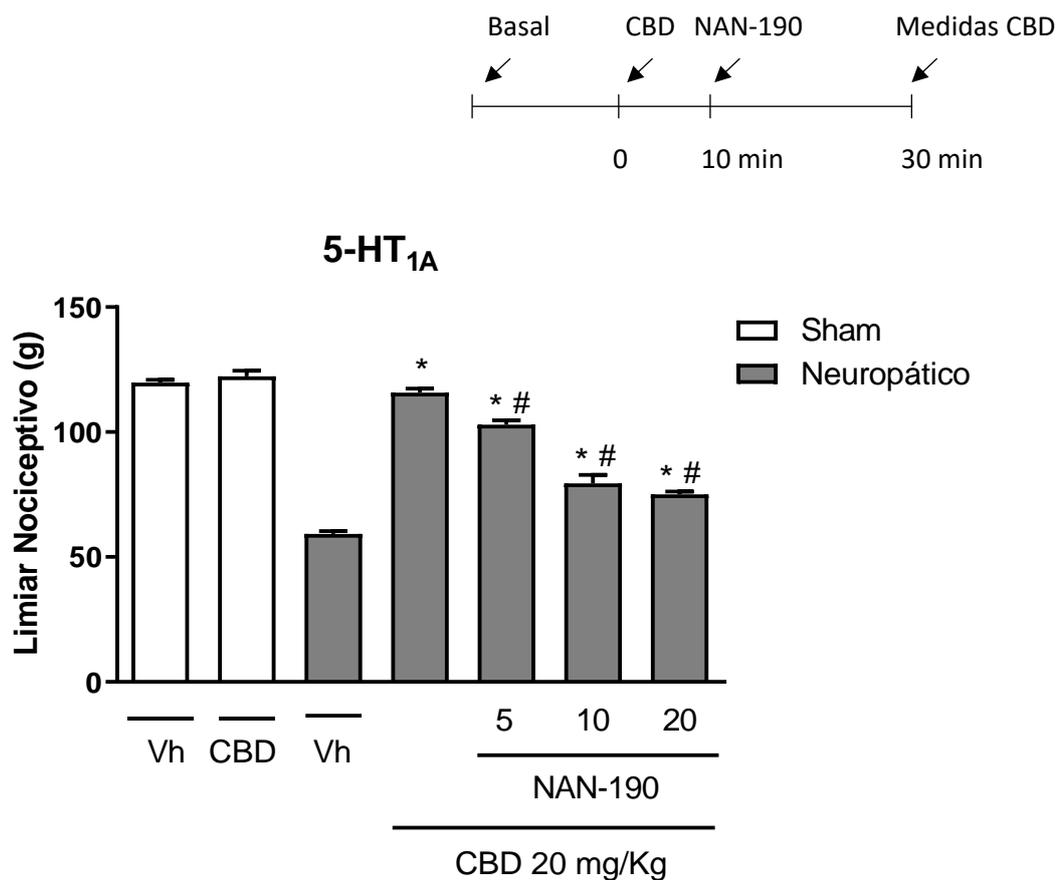


**Figura 19: Estudo do tratamento crônico do CBD após o estabelecimento da dor neuropática.** Avaliação do limiar nociceptivo de animais neuropáticos em comparação com animais sham ao longo de 21 dias. Início do tratamento com CBD nas três doses testadas começando no 11º dia. Em todos os dias avaliados, o CBD foi injetado 30 minutos antes dos testes algésimétricos. Inseto: Limiar nociceptivo dos animais antes das injeções com CBD. \* representa diferença significativa em comparação com o grupo neuropático veículo (Two-way RM ANOVA com pós-teste de Bonferroni  $F(5, 24) = 1206$ ).

## Receptores 5-HT<sub>1A</sub> e TRPV1

Os experimentos seguintes foram todos realizados no 21º dia após a cirurgia de constrição do nervo ciático. O antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, NAN-190, reverteu de forma dose dependente o efeito analgésico do CBD na dose de 20 mg/Kg. No entanto, o efeito do NAN-190 foi parcial, uma vez que não aboliu totalmente o efeito analgésico do CBD mesmo em sua maior dose 20 µg (Figura 20).

De forma semelhante, o antagonista seletivo dos receptores TRPV1, SB366791, atenuou, parcialmente, o efeito analgésico do CBD na dose de 20 mg/Kg (Figura 21).



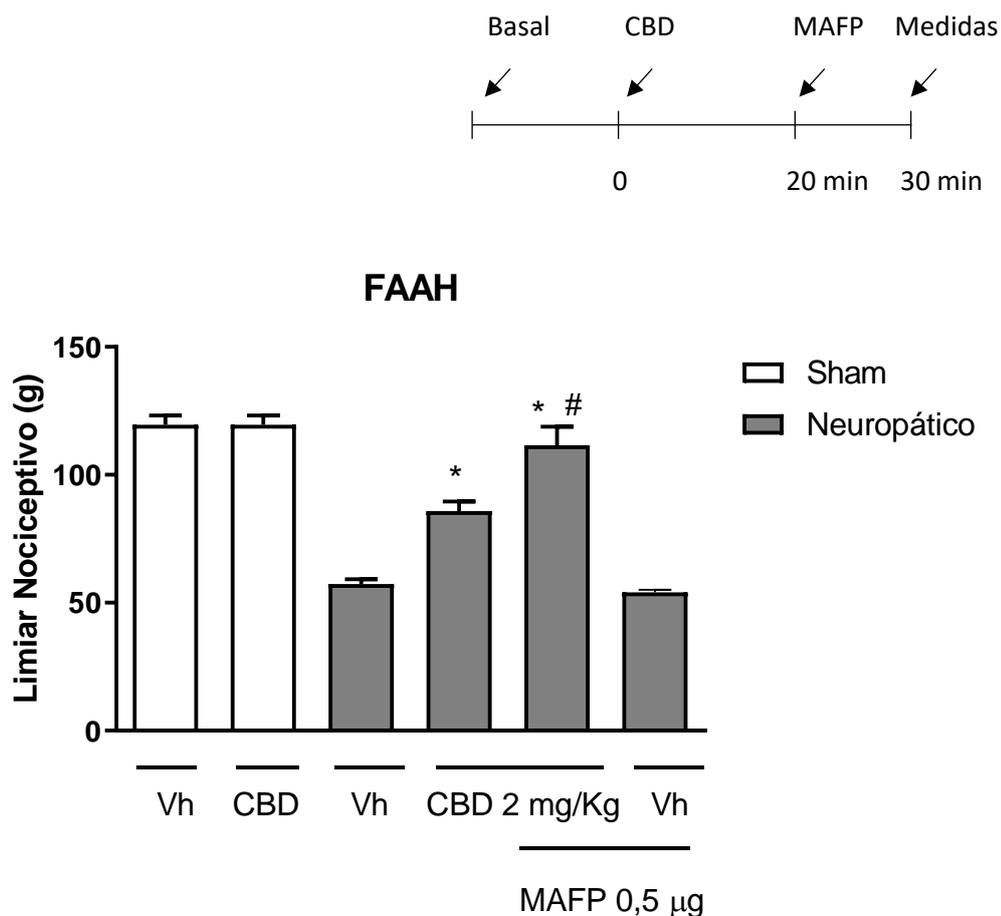
**Figura 20: Participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com NAN-190 pela via intraplantar. O CBD foi injetado 30 minutos antes e o NAN-190 foi injetado 20 minutos antes das medidas de limiar. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).  $F(6, 28) = 166,6$ .



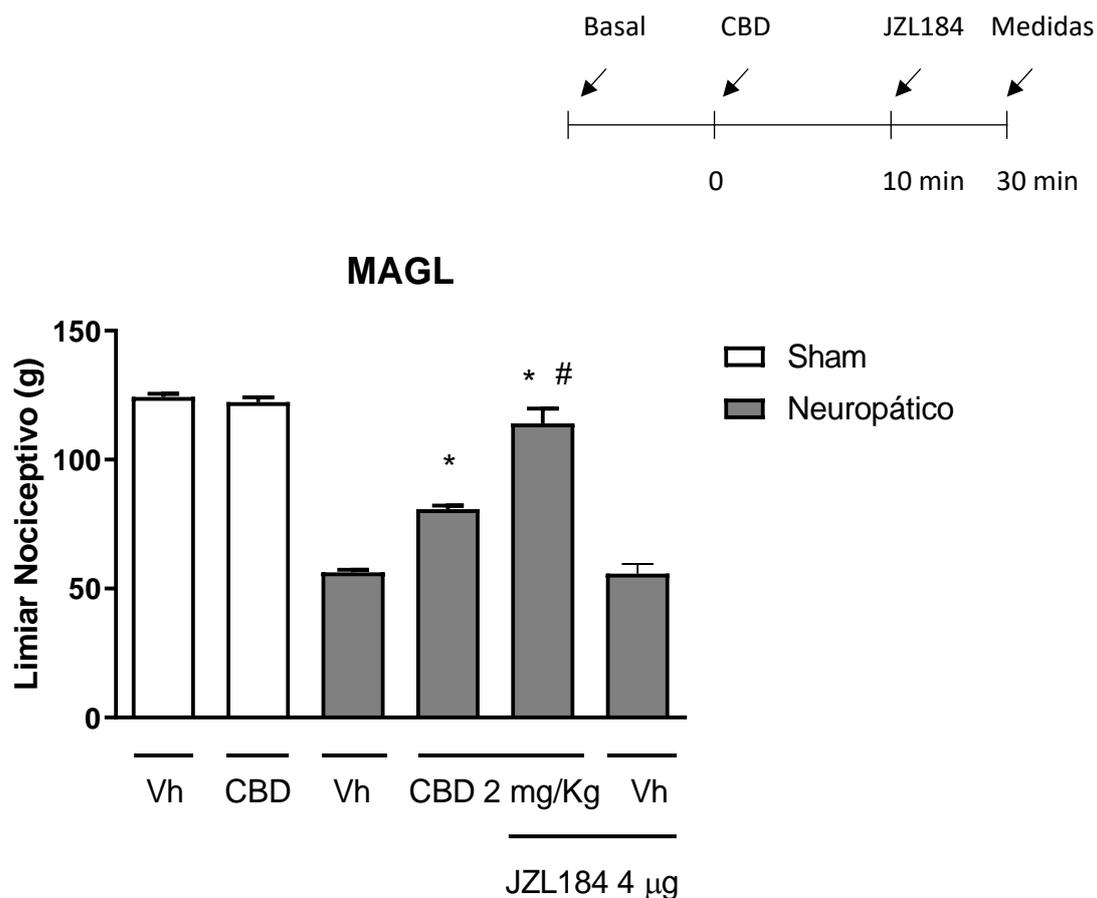
## Sistema endocanabinoide

A inibição da hidrólise de canabinoides endógenos (anandamida e 2-AG) utilizando os inibidores enzimáticos MAFP e JZL 184 (inibidores seletivos de FAAH e MAGL, respectivamente), potencializou o efeito analgésico da dose intermediária de CBD de 2 mg/Kg. A combinação de CBD 2 mg/Kg + MAFP 0,5 µg (Figura 22) e CBD 2 mg/Kg + JZL 184 4µg (Figura 23) produziu uma analgesia completa nos animais neuropáticos. Quando administrados na ausência do CBD, tanto o MAFP quanto o JZL 184 não modificaram o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos.

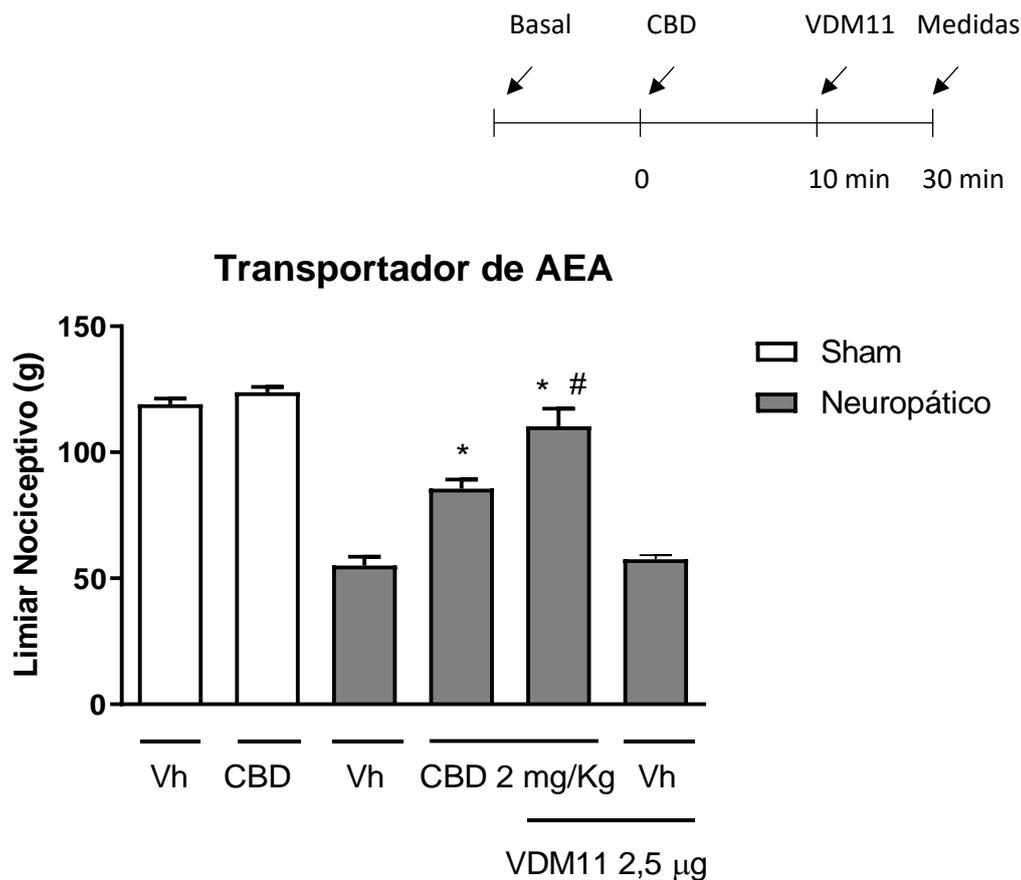
De forma semelhante, a inibição da recaptção de anandamida por meio da inibição do transportador de endocanabinoides de membrana (com o VDM11 também potencializou o efeito analgésico da dose intermediária de CBD 2 mg/Kg. A combinação de CBD 2 mg/Kg + VDM11 2,5 µg produziu analgesia completa nos animais neuropáticos (Figura 24). Quando administrado na ausência do CBD, o VDM11 alterou o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos.



**Figura 22: Efeito da inibição da hidrólise de anandamida sobre uma dose analgésica intermediária de CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (2 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com MAFP (inibidor seletivo de FAAH) pela via intraplantar. O CBD foi injetado 30 minutos antes e o MAFP foi injetado 10 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 2 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ . a)  $F(4, 20) = 184,7$ .



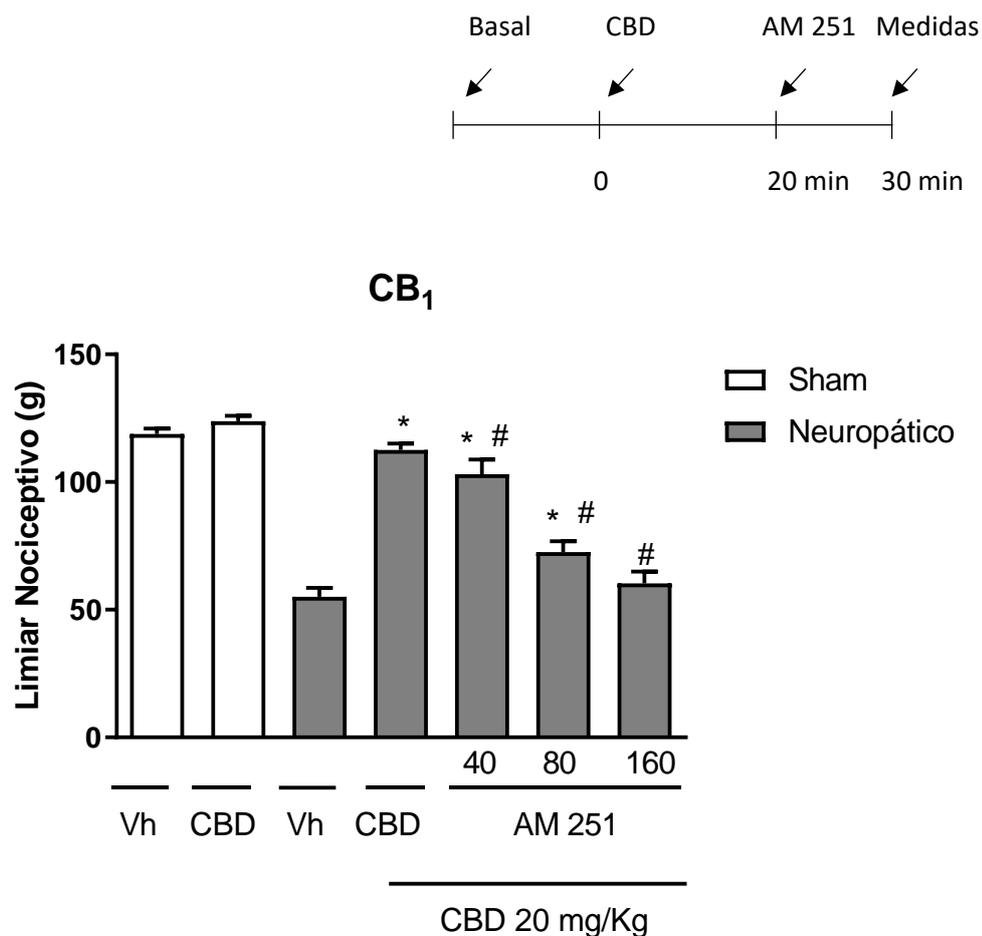
**Figura 23: Efeito da inibição da hidrólise de 2-AG sobre uma dose analgésica intermediária de CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (2 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com JZL184 (inibidor seletivo de MAGL) pela via intraplantar. O CBD foi injetado 30 minutos antes e o JZL184 foi injetado 10 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 2 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ . c)  $F(4, 20) = 527,0$ .



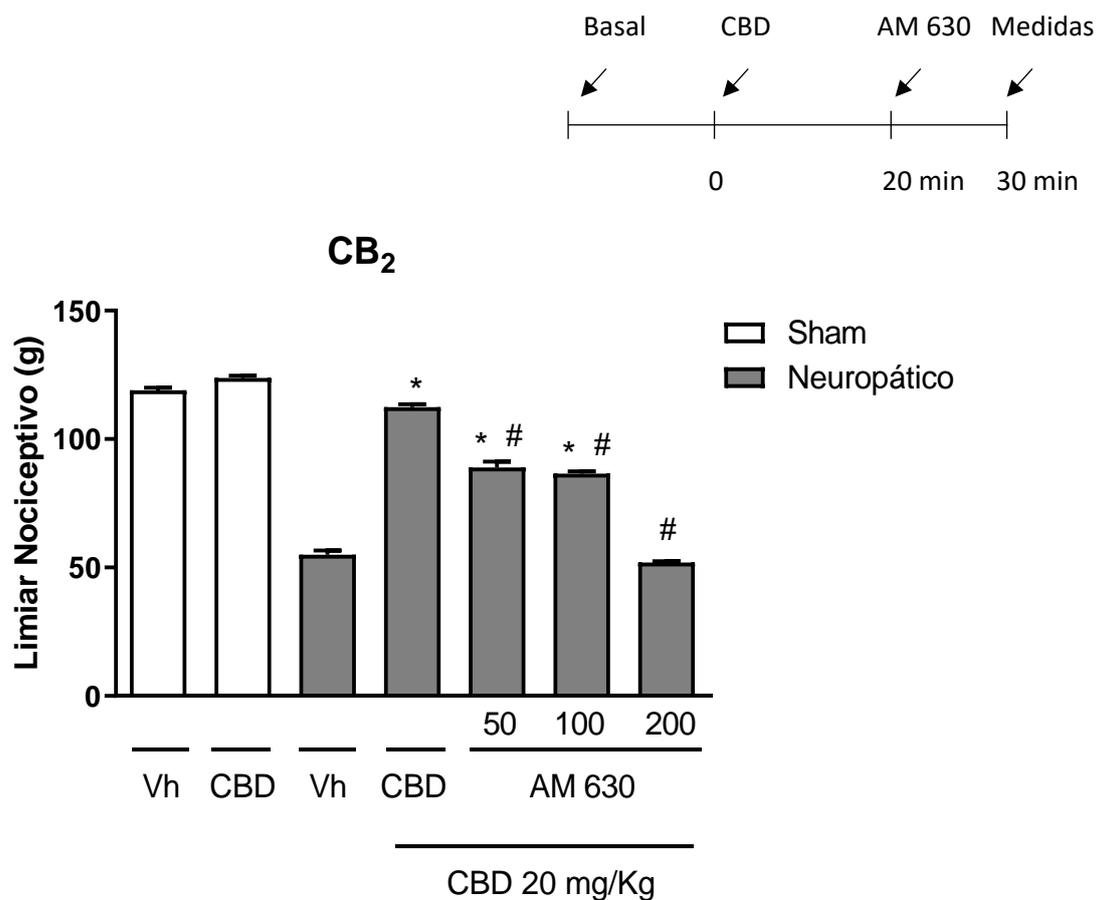
**Figura 24: Efeito da inibição da recaptação de anandamida sobre uma dose analgésica intermediária de CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (2 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com VDM11 (inibidor seletivo de EMT) pela via intraplantar. O CBD foi injetado 30 minutos antes e o VDM11 foi injetado 10 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 2 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ . b)  $F(4, 20) = 236,4$ .

O antagonista seletivo dos receptores CB<sub>1</sub>, AM251, reverteu de forma dose dependente o efeito analgésico do CBD na dose de 20 mg/Kg. A dose de 160 µg de AM251 reverteu a analgesia de forma completa, uma vez que não foi observada diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais do grupo Neuropático CBD 20 mg/Kg + AM251 160 µg quando comparados com os animais do grupo Neuropático Veículo (Figura 25).

De forma semelhante, o antagonista seletivo dos receptores CB<sub>2</sub>, AM630, reverteu de forma dose dependente, o efeito analgésico do CBD na dose de 20 mg/Kg em sua dose de 200 µg. (Figura 26).



**Figura 25: Participação dos receptores  $CB_1$  no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com AM251 pela via intraplantar. O CBD foi injetado 30 minutos antes e o AM251 foi injetado 10 minutos antes das medidas de limiar. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido dos pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).  $F(6, 28) = 284,2$ .

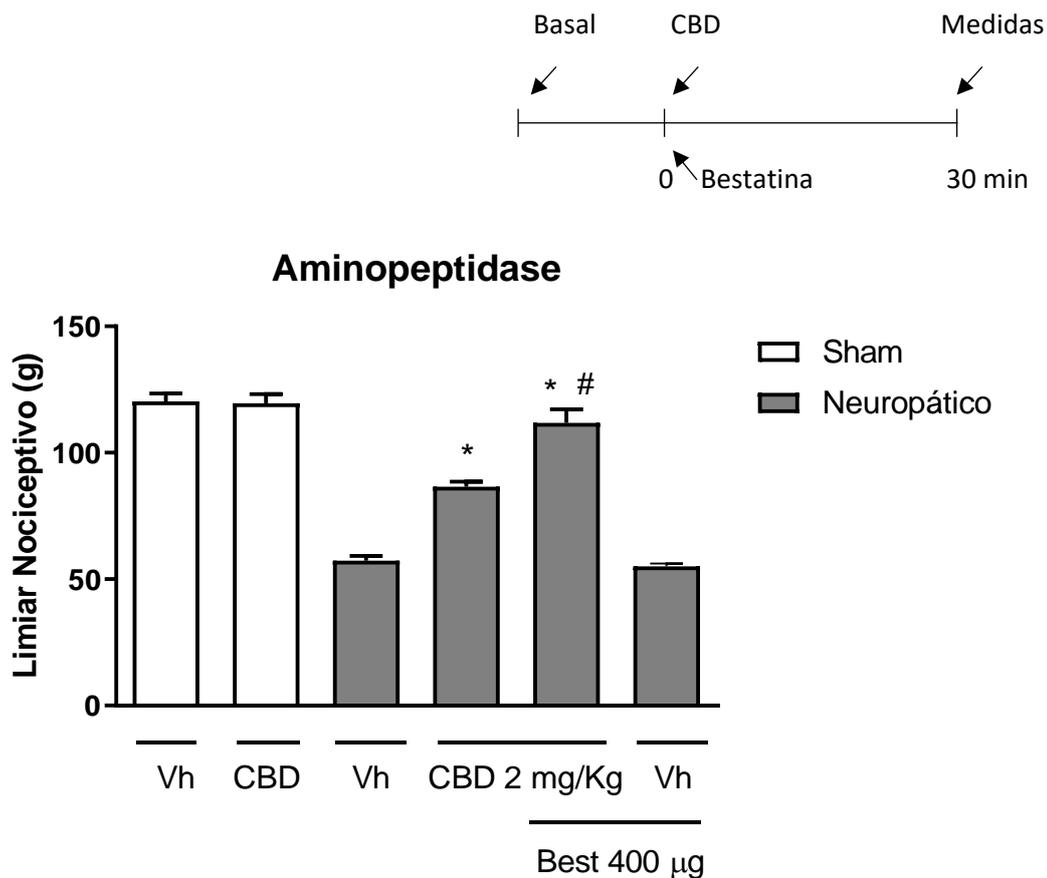


**Figura 26: Participação dos receptores CB<sub>2</sub> no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com AM630 pela via intraplantar. O CBD foi injetado 30 minutos antes e o AM630 foi injetado 10 minutos antes das medidas de limiar. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido dos pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).  $F(6, 28) = 500,1$ .

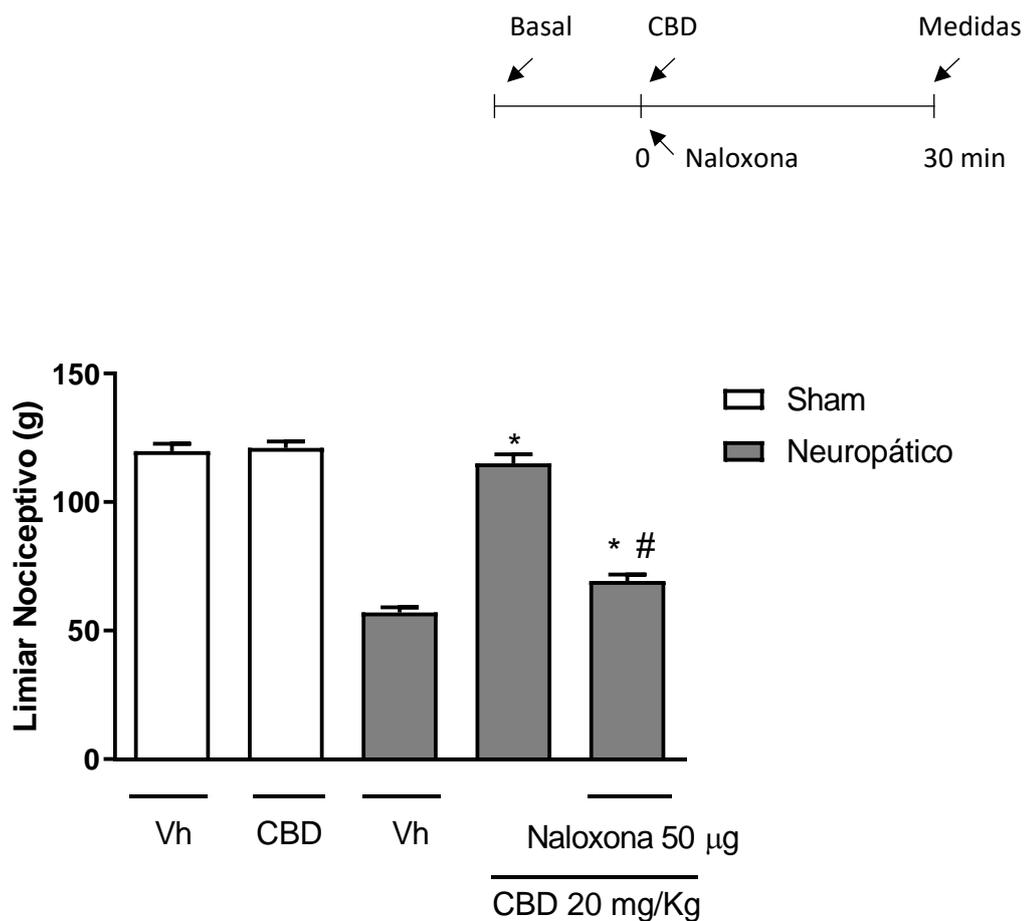
## Sistema opioide

Em relação ao sistema opioide, a inibição da hidrólise de peptídeos opioides endógenos por meio da inibição seletiva da enzima aminopeptidase com a bestatina, na dose de 400 µg, potencializou o efeito analgésico da dose intermediária de CBD de 2 mg/Kg. A combinação de CBD 2 mg/Kg + bestatina 400 µg produziu analgesia completa nos animais neuropáticos (Figura 27). Quando administrado na ausência do CBD, a bestatina não alterou o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos.

A naloxona, antagonista não seletivo de receptores opioides, reverteu a analgesia induzida pela dose de 20 mg/Kg de CBD na dose de 50 µg (Figura 28) levando o limiar nociceptivo dos animais para próximo dos valores dos animais neuropáticos tratados com veículo. A reversão da analgesia não foi completa, visto que ainda existe diferença significativa entre os limiares nociceptivos do grupo neuropático CBD 20 mg/Kg + Naloxona 50 µg (Figura 28).



**Figura 27: Efeito da inibição da hidrólise de opioides endógenos no mecanismo analgésico de uma dose intermediária de CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD 2 mg/Kg via intraperitoneal e injetados, no 21<sup>o</sup> dia, com bestatina (inibidor da aminopectidase). Tanto CBD quanto bestatina foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg ou CBD 2 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(4, 20) = 302,8$ ).

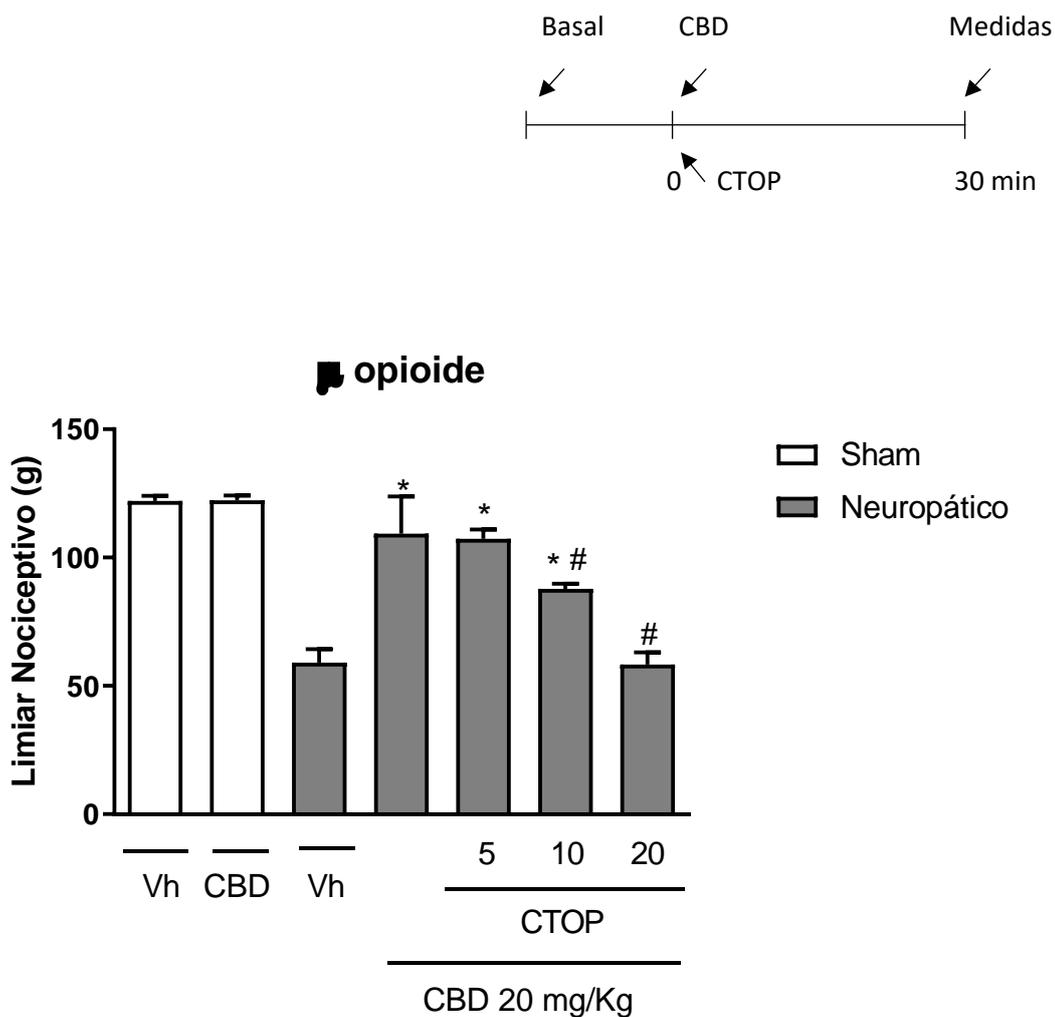


**Figura 28: Efeito do antagonismo não seletivo de receptores opioides no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD 20 mg/Kg via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opioides) pela via intraplantar. Tanto CBD quanto naloxona foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(4, 20) = 608,7$ ).

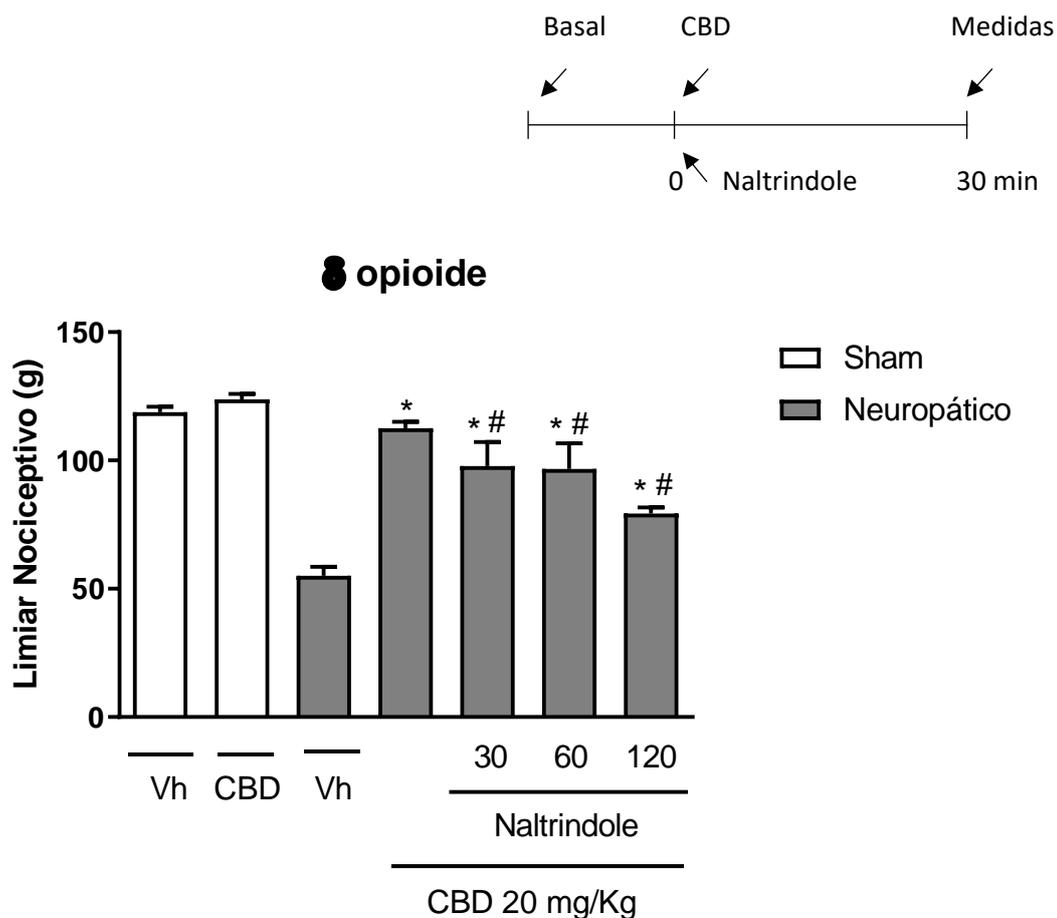
O antagonista seletivo dos receptores  $\mu$  opioides, CTOP, reverteu de forma dose dependente o efeito analgésico do CBD na dose de 20 mg/Kg. A dose de 20  $\mu$ g de CTOP reverteu a analgesia de forma completa, pois não foi observada diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais do grupo neuropático CBD 20 mg/Kg + CTOP 20  $\mu$ g quando comparados com os animais do grupo neuropático veículo (Figura 29).

O antagonista seletivo de receptores  $\delta$  opioide, naltrindole, também reduziu o limiar nociceptivo de animais neuropáticos tratados com 20 mg/Kg de CBD, apesar de a maior dose de 120  $\mu$ g exercer um efeito parcial sobre o limiar nociceptivo dos animais tratados com CBD 20 mg/Kg (Figura 30).

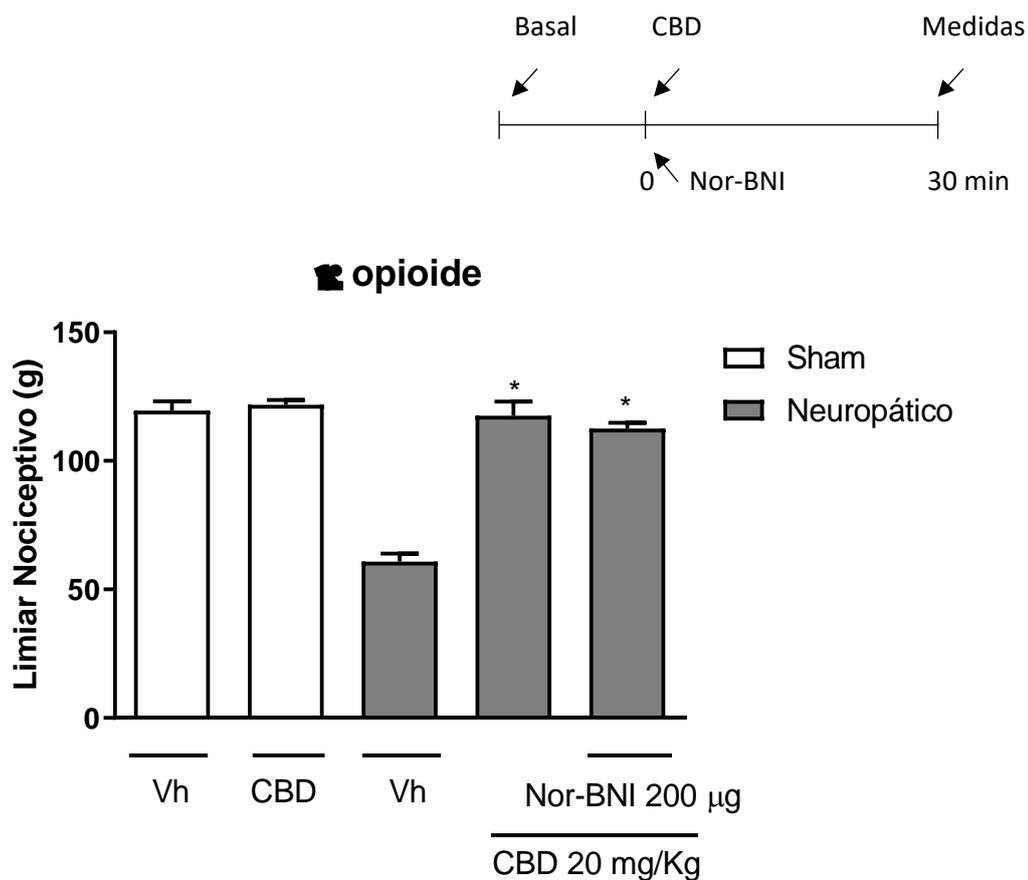
Por outro lado, o antagonismo seletivo dos receptores  $\kappa$  opioides, usando o Nor-BNI, não alterou o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com 20 mg/Kg de CBD, visto que, em sua maior dose de 200  $\mu$ g, o Nor-BNI não alterou a resposta analgésica dos animais tratados com CBD (Figura 31).



**Figura 29: Participação dos receptores  $\mu$  opioides no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com CTOP (antagonista seletivo de receptores  $\mu$  opioides) pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o CTOP foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(6, 28) = 90,55$ ).



**Figura 30: Participação dos receptores  $\delta$  opioides no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com naltrindole (antagonista seletivo de receptores  $\delta$  opioides) pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o naltrindole foram injetados 30 minutos antes da medida de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(6, 28) = 90,94$ ).

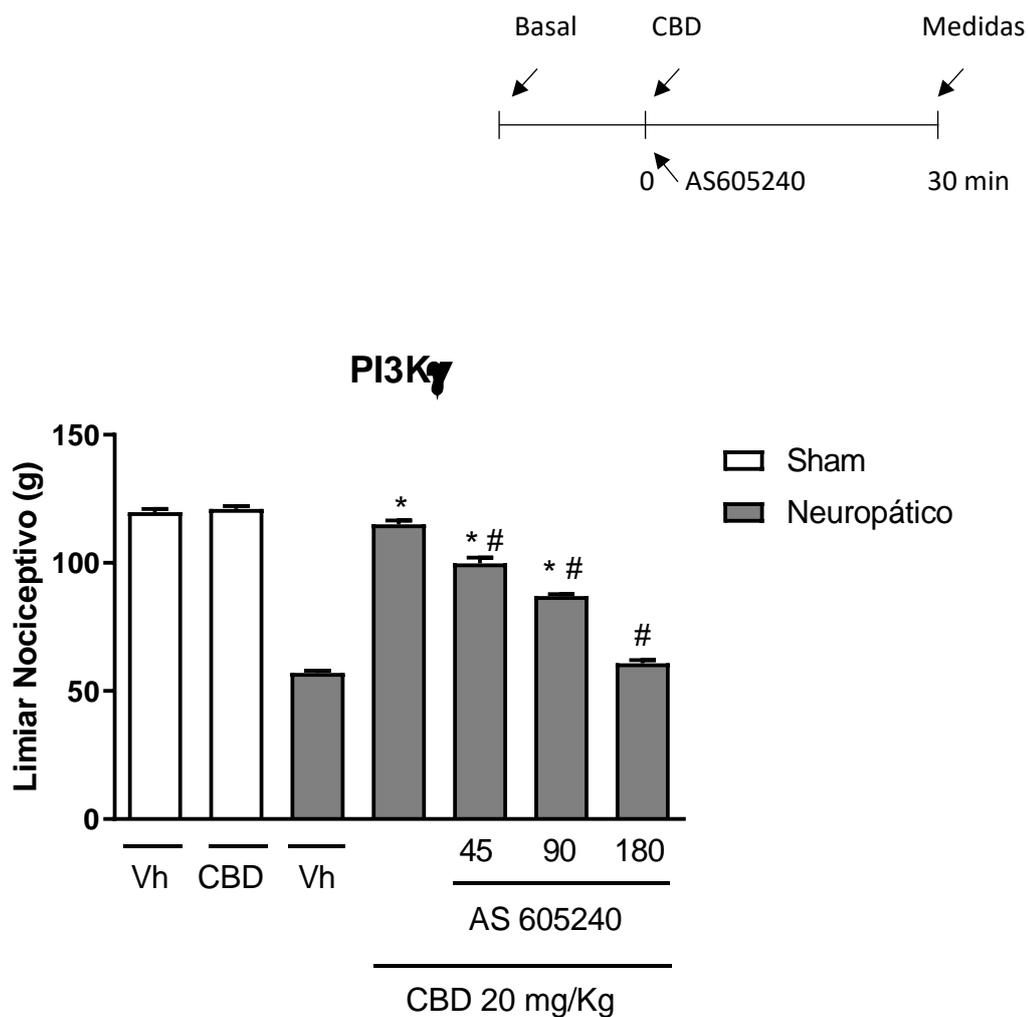


**Figura 31: Participação dos receptores  $\kappa$  opioides no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21<sup>o</sup> dia, com Nor-BNI (antagonista seletivo de receptores  $\kappa$  opioides) injetado pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o Nor-BNI foram injetados 30 minutos antes da medida de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(4, 20) = 260,5$ ).

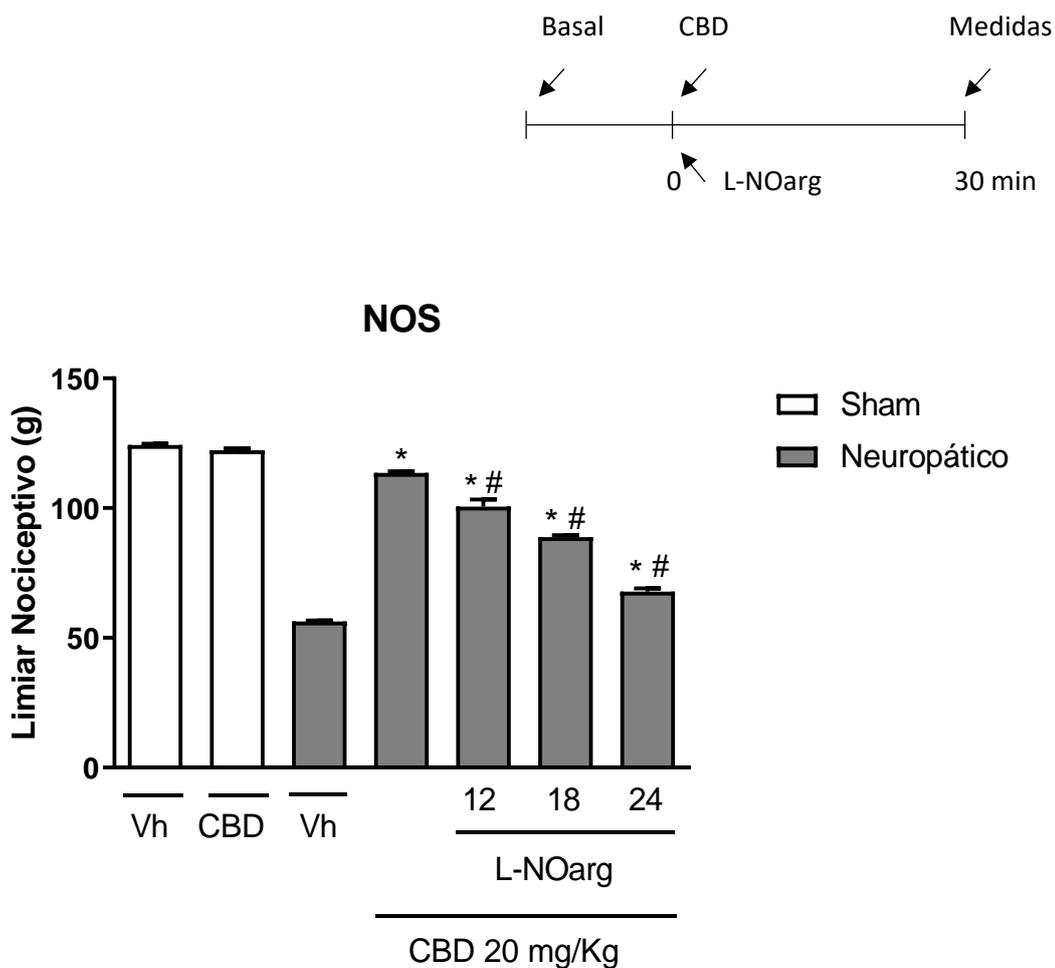
### Via PI3K $\gamma$ /NOS/NO/GC/GMPc/K<sub>ATP</sub>

O inibidor seletivo da enzima PI3K $\gamma$ , AS605240, reverteu completamente e de forma dose dependente a analgesia induzida pelo CBD (Figura 32). A dose de 180  $\mu$ g de AS605240 reverteu a analgesia de forma completa, uma vez que não foi observada diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais do grupo neuropático CBD 20 mg/Kg + AS605240 180  $\mu$ g quando comparados com os animais do grupo neuropático veículo.

A inibição não seletiva das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) usando o L-NOarg reverteu a analgesia mediada pelo CBD de forma dose dependente. A redução do limiar nociceptivo causada pela inibição de NOS não foi completa, visto que o limiar nociceptivo de animais tratados com L-NOarg 24  $\mu$ g + 20 mg/Kg de CBD ainda é significativamente mais alto do que dos animais neuropáticos tratados com veículo (Figura 33).



**Figura 32: Participação da enzima PI3K $\gamma$  no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21<sup>o</sup> dia, com AS 605240 (inibidor seletivo de PI3K $\gamma$ ) pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o AS605240 foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(6, 28) = 366,0$ ).

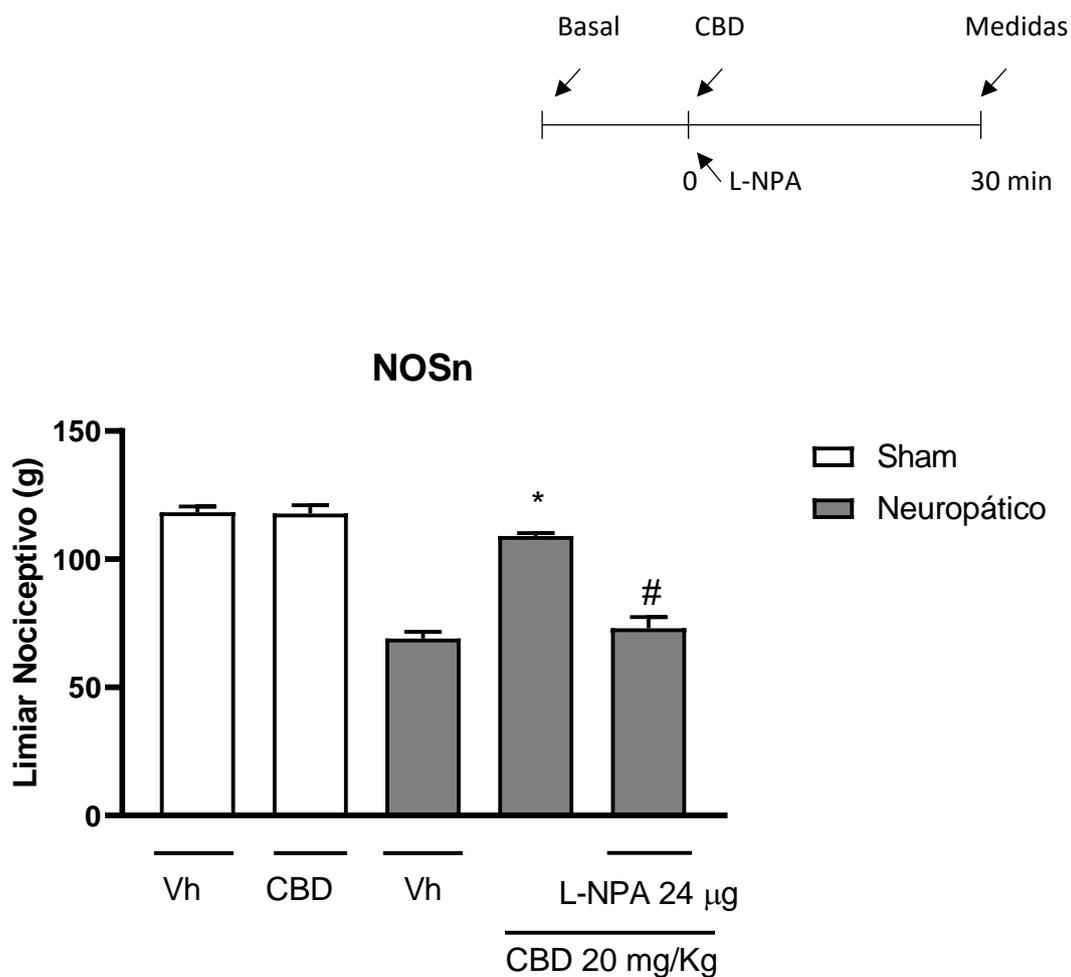


**Figura 33: Participação das enzimas óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com L-NOarg (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase) injetado pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o L-NOarg foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(6, 28) = 403,0$ ).

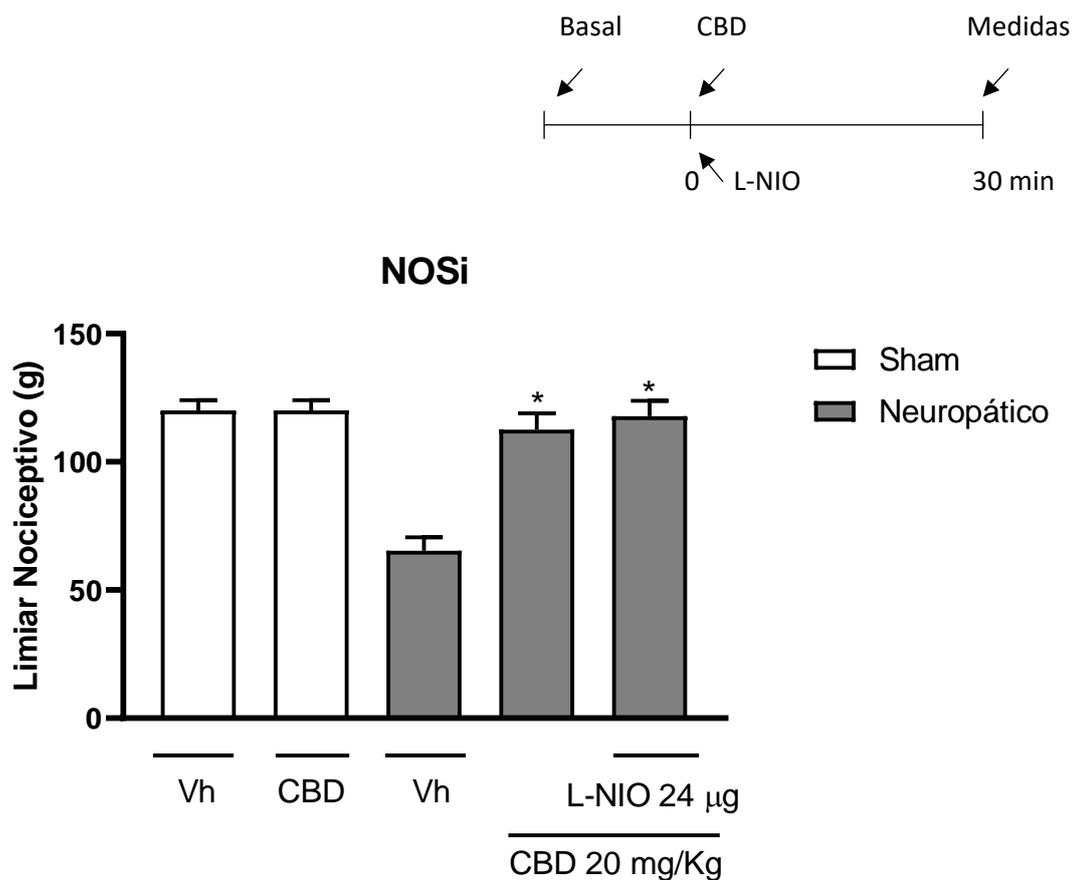
Tendo confirmado a participação da enzima óxido nítrico sintase, e a fim de verificar qual das três isoformas seria responsável pelo efeito analgésico do CBD, foram utilizados os inibidores seletivos L-NPA; L-NIO; L-NIL respectivamente das isoformas NOS<sub>n</sub>; NOS<sub>i</sub>; NOS<sub>e</sub>.

A inibição da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (NOS<sub>n</sub>) usando o L-NPA reverteu analgesia induzida pelo CBD. A dose de 24 µg de L-NPA reverteu a analgesia de forma completa, uma vez que não foi observada diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais do grupo neuropático CBD 20 mg/Kg + L-NPA 24 µg quando comparados com os animais do grupo neuropático veículo (Figura 34).

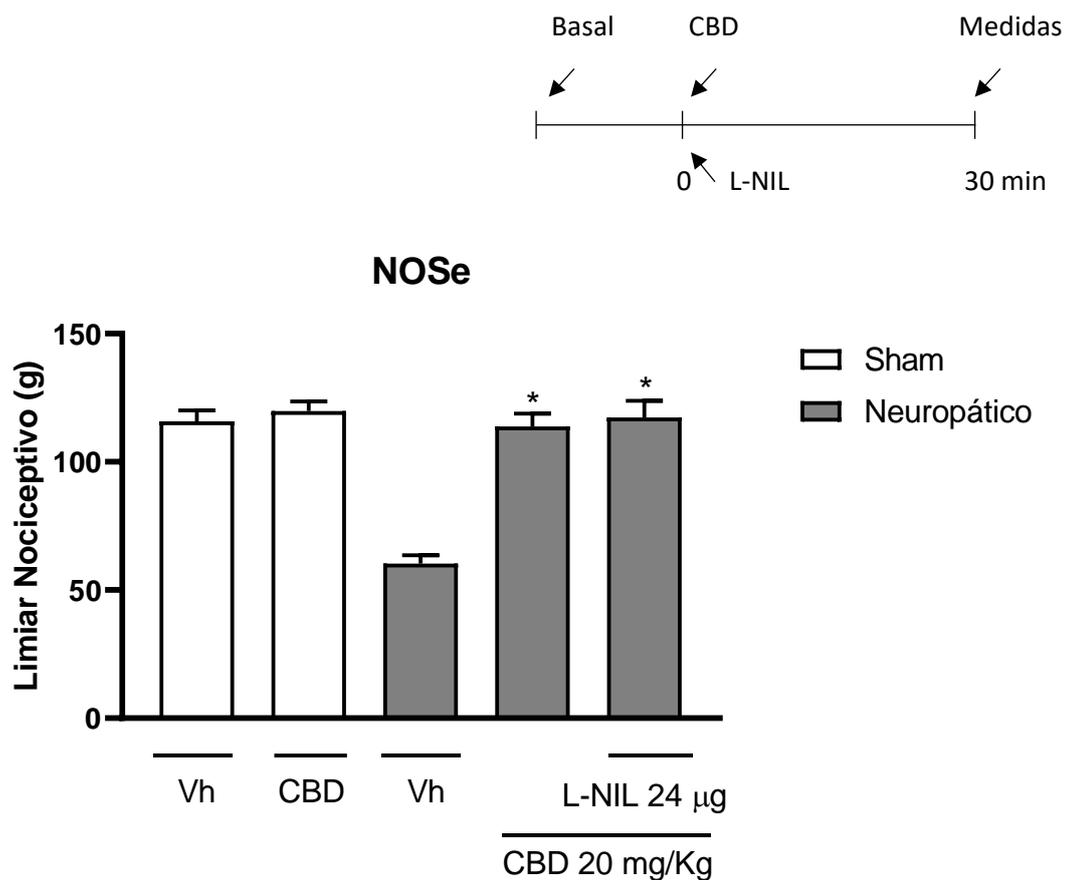
Por outro lado, a inibição das duas outras isoformas, indutível (NOS<sub>i</sub>) e endotelial (NOS<sub>e</sub>) da enzima óxido nítrico sintase, não foram capazes de não alterou analgésica produzida pelo CBD. O limiar nociceptivo dos animais tratados com CBD 20 mg/Kg + L-NIO 24 µg (Figura 35) ou CBD 20 mg/Kg + L-NIL 24 µg (Figura 36) não apresentou diferença significativa quando comparado com o limiar dos animais neuropáticos tratados com CBD 20 mg/Kg.



**Figura 34: Participação da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com L-NPA (inibidor seletivo da enzima NOS neuronal) pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o L-NPA foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).  $F(4, 15) = 268,0$ .



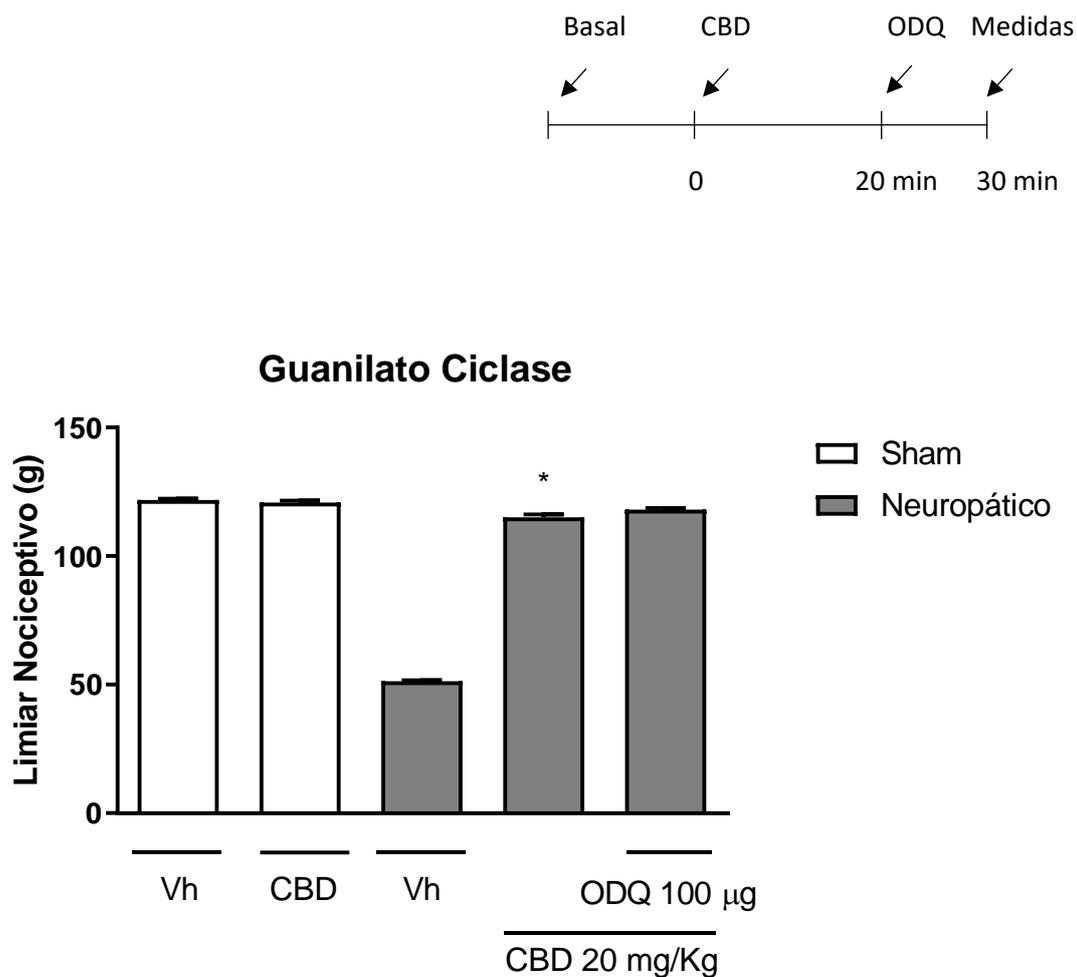
**Figura 35: Participação da isoforma indutível da enzima óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com L-NIO (inibidor seletivo da enzima NOS indutível) pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o L-NIO foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).  $F(4, 15) = 79,81$ .



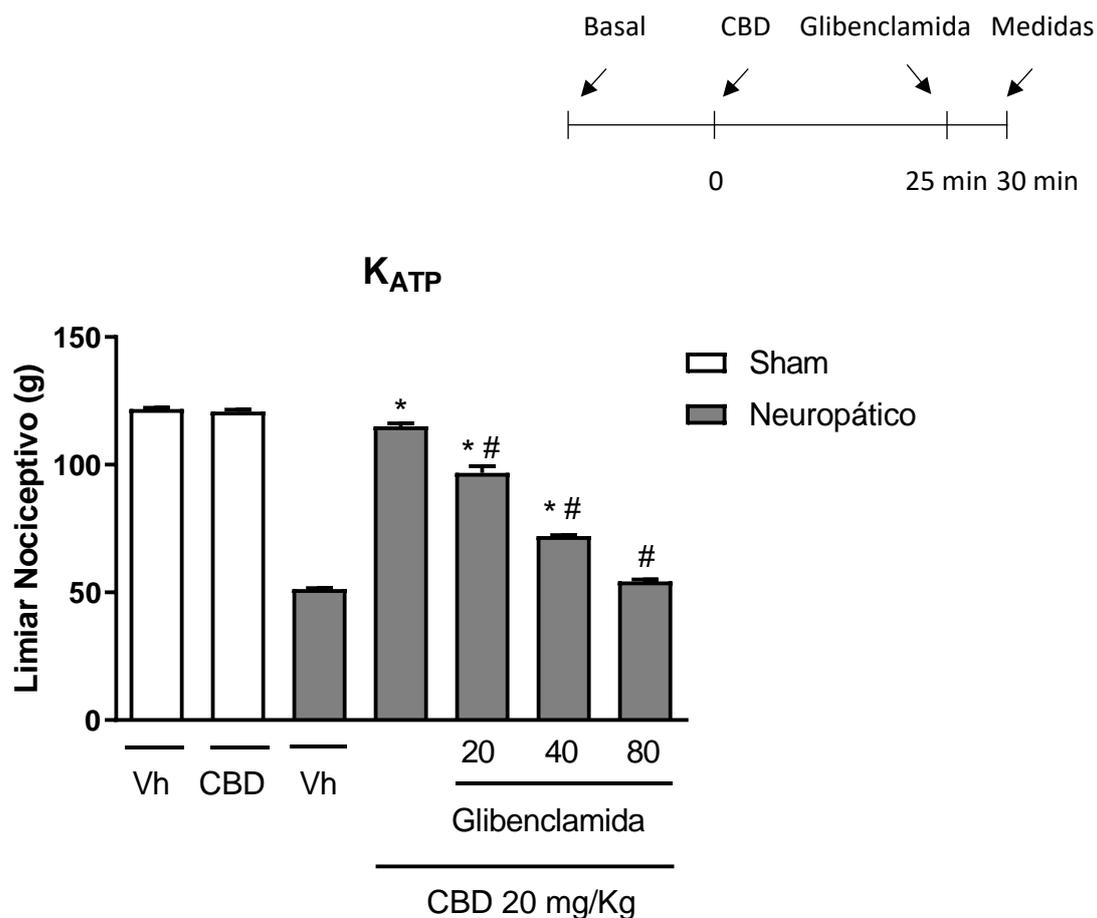
**Figura 36: Participação da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21<sup>o</sup> dia, com L-NIL (inibidor seletivo da enzima NOS endotelial) pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o L-NIL foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).  $F(4, 15) = 113,8$ .

A inibição seletiva da enzima guanilato ciclase solúvel usando o ODQ, por outro lado, não reverteu o limiar nociceptivo de animais neuropáticos tratados com 20 mg/Kg de CBD (Figura 37). A dose de 100 µg de ODQ não causou alteração na resposta analgésica mediada pelo CBD em camundongos neuropáticos, de forma que o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD 20 mg/Kg + ODQ 100 µg não apresentou diferença significativa quando comparado com o limiar dos animais neuropáticos tratados com CBD 20 mg/Kg.

Verificando a participação do canal para potássio sensível ao ATP demonstramos que a glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao ATP, reverteu de forma dose dependente a analgesia produzida pelo CBD. A dose máxima de 80 µg de glibenclamida reverteu completamente a analgesia produzida pelo CBD (Figura 38), uma vez que o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD 20 mg/Kg + glibenclamida 80 µg não apresentou diferença significativa quando comparado com o limiar dos animais neuropáticos tratados com veículo.



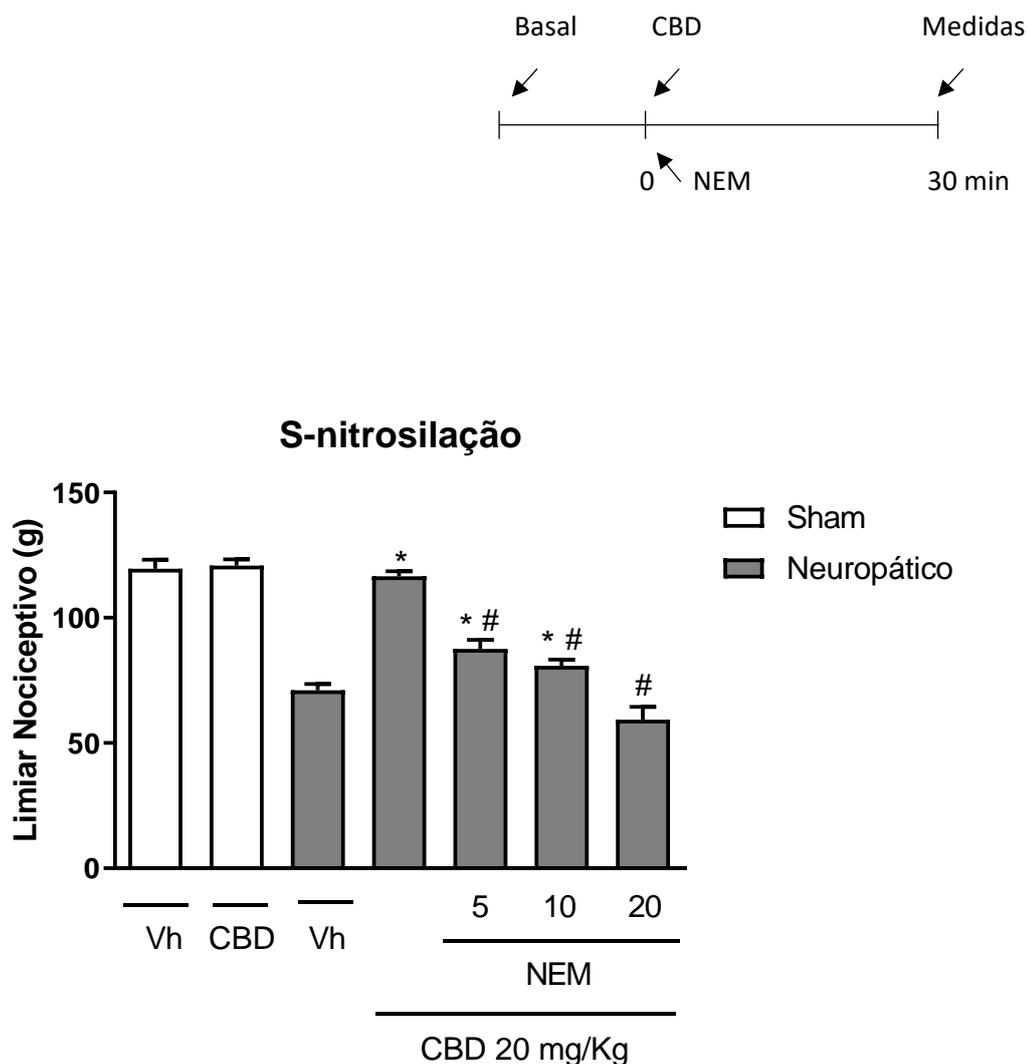
**Figura 37: Participação da enzima guanilato ciclase no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com ODQ (inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel) pela via intraplantar. O CBD foi injetado 30 minutos e o ODQ foi injetado 10 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(4, 20) = 1582$ ).



**Figura 38: Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no mecanismo analgésico do CBD.** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com glibenclamida (bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao ATP). O CBD foi injetado 30 minutos e a glibenclamida foi injetada 5 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(6, 28) = 619,4$ ).

### S-nitrosilação de canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ )

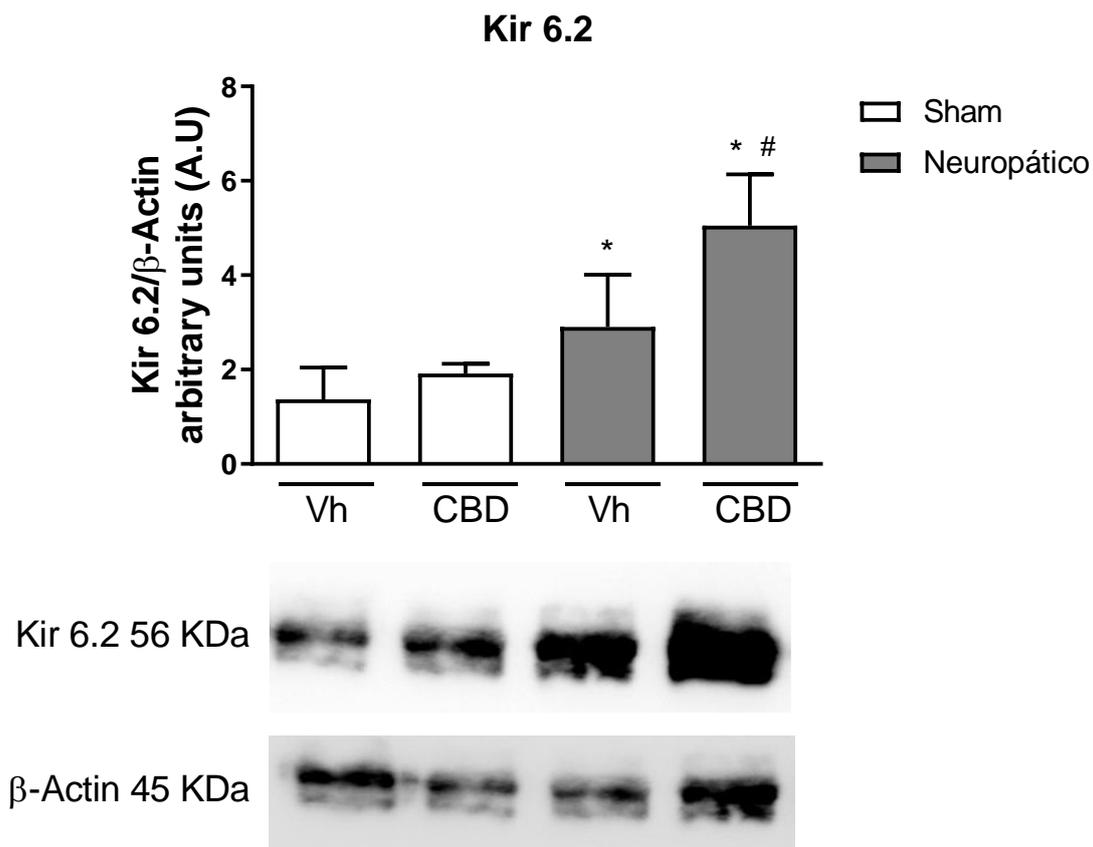
Finalmente, a inibição da S-nitrosilação de resíduos de cisteína na subunidade regulatória SUR1 do canal para potássio sensível ao ATP também reverteu de forma dose dependente a analgesia produzida pelo CBD. A dose máxima de 20  $\mu$ g de NEM reverteu completamente a analgesia produzida pela dose de 20 mg/Kg de CBD, uma vez que o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD 20 mg/Kg + NEM 20  $\mu$ g não apresentou diferença significativa quando comparado com o limiar dos animais neuropáticos tratados com veículo (Figura 39).



**Figura 39: Efeito da S-nitrosilação da subunidade regulatória SUR1 na ativação dos canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ).** Limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CBD (20 mg/Kg) via intraperitoneal e injetados, no 21º dia, com N-etilmaleimida (NEM - inibidor da S-nitrosilação de resíduos de cisteína na subunidade regulatória SUR1) pela via intraplantar. Tanto o CBD quanto o NEM foram injetados 30 minutos antes das medidas de limiar nociceptivo. \* indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo. # indica diferença significativa em relação ao grupo neuropático CBD 20 mg/Kg (Ordinary one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ;  $F(6, 28) = 288,6$ ).

## Quantificações dos níveis proteicos de canais para potássio sensíveis ao ATP

A quantificação dos canais para potássio sensíveis ao ATP mostrou que o procedimento de constrição do nervo ciático de forma crônica por 21 dias induziu um aumento na quantidade de canais para potássio sensíveis ao ATP quando comparado com os animais sham. Ainda o tratamento crônico com o CBD promoveu um aumento significativo nas quantidades deste canal nos tecidos do coxim plantar de camundongos neuropáticos em comparação com os animais neuropáticos tratados com veículo (Figura 40).



**Figura 40: Western blot de tecidos do coxim plantar direito de camundongos sob tratamento crônico com CBD.** Nível de expressão proteica dos canais para potássio sensíveis ao ATP. A  $\beta$ -actina foi usada como controle positivo para o teste. \* representa diferença significativa em relação ao grupo sham CBD; # representa diferença significativa em relação ao grupo neuropático veículo (Ordinary One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .  $F(3, 10) = 13,91$ ).

## Discussão

Avaliando nossos dados verificamos que o CBD, quando administrado via intraperitoneal, apresentou um pico de ação analgésica de 30 minutos. Após 120 minutos de administração, já não foi mais observado um efeito analgésico quando administrado por esta via, visto que o limiar nociceptivo de animais neuropáticos tratados com CBD retornou a níveis basais. Esses dados caracterizam o CBD como um agente analgésico de efeito agudo quando injetado via intraperitoneal. A eficácia farmacológica do CBD pode ser considerada como máxima, uma vez que a dose máxima de 20 mg/Kg foi capaz de reverter completamente o limiar hiperalgésico de camundongos neuropáticos para valores semelhantes ao dos animais sham, não neuropáticos. A dose de 20 mg/Kg também foi empregada de forma efetiva para o tratamento de epilepsia (Lattanzi et al., 2018) e de síndrome de Dravet (Devinsky et al., 2018). Outro trabalho também demonstrou a eficácia do CBD como um agente analgésico quando utilizado na dose de 20 mg/Kg em um modelo de dor neuropática e dor inflamatória (Costa et al., 2007). É interessante ressaltar que, em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, o CBD também demonstrou o mesmo perfil de resposta analgésica aguda quando administrado periféricamente pela via intraplantar, porém na dose de 30 µg e com pico de ação analgésica em 15 minutos (Diniz, 2018), ao invés de 30 minutos como no presente trabalho. Vale ressaltar que as vias de administração diferentes e as doses diferentes de CBD podem explicar as diferenças na cinética da resposta analgésica observada nos dois trabalhos. Isso confirma que a dose de escolha para o CBD no presente trabalho corrobora com o que é encontrado na literatura. Além disso, visto que o pico de ação analgésica do CBD, quando injetado por via intraperitoneal em camundongos, foi de 30 minutos, este tempo foi escolhido e padronizado para os experimentos seguintes como tempo de injeção. Dessa forma, nos experimentos com os inibidores e antagonistas farmacológicos, o CBD foi injetado 30 minutos antes da medida do limiar nociceptivo mecânico dos animais no aparelho de Randall e Selito.

No teste de RotaRod, não houve diferença significativa no tempo de permanência dos animais na haste giratória entre os grupos tratados com CBD e salina, confirmando que a dose máxima testada de CBD não produziu um efeito de sedação e ataxia, não comprometendo a marcha e a força muscular dos animais. Este teste é importante para garantir que os camundongos tenham equilíbrio e coordenação motora suficientes para serem submetidos ao analgesímetro e que tenham força suficiente para gerar uma resposta de retirada de pata satisfatória. Sabe-se que em alguns tipos de teste o CBD pode apresentar efeitos sobre a motricidade, principalmente sobre a atividade vertical em camundongos, mediados pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub> nos núcleos da base (Espejo-Porras et al., 2013) quando administrado na dose

de 20 mg/Kg por via intraperitoneal. Porém, tais efeitos não foram suficientes para alterar a marcha e a força muscular dos animais, visto que seu desempenho no teste do RotaRod foi semelhante ao dos animais tratados com salina.

Finalmente, após o estabelecimento da neuropatia em camundongos, o tratamento crônico diário com o CBD a partir do 11º dia foi capaz de sustentar uma resposta analgésica ao longo dos 10 dias de tratamento, sendo a intensidade dessa resposta sempre mantida ao longo de todas as medidas. Esse dado sugere que o CBD é capaz de induzir uma resposta analgésica satisfatória em todos os dias de tratamento e não promoveu tolerância farmacológica em camundongos quando injetado cronicamente por via intraperitoneal. De uma forma geral, o CBD é muito bem tolerado em doses relativamente altas, até 1500 mg/dia, quando utilizado em humanos (Bergamaschi et al., 2011) para o tratamento de epilepsia e de demais desordens psiquiátricas (Devinsky et al., 2014) e pode ser seguramente utilizado para controlar sintomas de abstinência por outras drogas, especialmente opioides (Hurd et al., 2015; Hurd, 2017). Porém, existem poucas evidências na literatura relacionadas com o desenvolvimento de tolerância farmacológica ao CBD, tanto em animais quanto em humanos, especialmente durante o uso crônico. Portanto essas informações corroboram o fato de que, no presente trabalho, o CBD foi eficiente em promover analgesia sem causar tolerância quando administrado durante os 10 dias de protocolo experimental bem como embasam a observação de que o CBD não causou alterações da resposta analgésica de animais neuropáticos durante o tratamento.

Por outro lado, o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos não sofreu alterações nos momentos que antecediam o tratamento com o CBD, indicando que o tratamento crônico como desenvolvido em nosso modelo experimental, não demonstrou capacidade de melhorar ou reverter a condição da neuropatia, uma vez instalada. O canabidiol tem mostrado resultados positivos na melhora da dor neuropática induzida por paclitaxel (Ward et al., 2011, 2014) em modelos de neuropatia diabética periférica (Toth et al., 2010) e em modelos de dor inflamatória (Philpott et al., 2017). Em um estudo feito em pacientes portadores dos sintomas de neuropatia periférica, o uso de óleo de canabidiol na dose de 250 mg CBD/3 fl. oz produziu uma redução da dor intensa e aguda, bem como das sensações de formigamento e prurido nos pacientes tratados duas vezes por semana (Xu et al., 2020). De forma geral, dados do presente trabalho, bem como diversos trabalhos da literatura, vem confirmando o potencial analgésico do CBD e fornecendo novas evidências que embasam o uso dessa substância na prática clínica para o tratamento da dor neuropática periférica. Diversos estudos sugerem que o CBD não é tóxico e não induz alterações na ingestão alimentar, não induz catalepsia, não interfere com parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura corporal), e não afeta a

atividade gastrointestinal bem como não altera funções psicomotoras ou psicológicas (Bergamaschi et al., 2011).

Um trabalho interessante do nosso grupo de pesquisa mostrou que o aripiprazole, um antipsicótico de segunda geração, é capaz de induzir antinocicepção periférica em modelo de dor inflamatória por meio da ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgicos e (Almeida-Santos et al., 2015). De forma muito semelhante, no presente trabalho, o NAN 190 também foi capaz de reverter o efeito analgésico do CBD de forma dose dependente em camundongos neuropáticos. Estes dados confirmam a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pelo CBD como forma de produzir analgesia e corroboram os dados de Russo et al., (2005) que mostraram a atividade agonística do CBD sobre o receptor 5-HT<sub>1A</sub> por meio de ensaios de ligação. O perfil de resposta observado nos resultados do presente trabalho, associados com os dados de Russo et al., (2005) permitem inferir que o CBD funciona como um agonista competitivo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> nos tecidos periféricos de camundongos. Mais evidências do efeito antialodínico e ansiolítico do CBD mediado pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub> foram encontradas por De Gregorio et al. (2019) onde doses crescentes de CBD inibiram as taxas de disparo de neurônios do núcleo dorsal da rafe, e tal efeito foi revertido pelo uso do antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, WAY 100635. Apesar de este ser um antagonista seletivo diferente do utilizado no presente trabalho, é possível concluir que o antagonismo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> é capaz de reverter os efeitos farmacológicos do canabidiol em animais. Ainda, é possível afirmar que o CBD pode causar antinocicepção tanto devido ao seu efeito em neurônios do sistema nervoso central quanto do sistema nervoso periférico, como demonstrado no presente estudo.

Além dos efeitos do CBD mediados pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub> demonstrados anteriormente, outro possível alvo molecular responsável pelos efeitos do CBD são os receptores dos canais TRPV1 (Campos and Guimarães, 2008; Galaj et al., 2020). Diversos trabalhos mostraram que antagonistas para os canais TRPV1 são capazes de induzir analgesia em modelos animais de sinovite e osteoartrite (Cathcart et al., 2012; Kelly et al., 2015). Em um trabalho de Philpott et al. (2017) foi mostrado que o SB366791, um antagonista seletivo de canais TRPV1, também é capaz de reverter a analgesia promovida pelo CBD em um modelo de osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de monoiodoacetato de sódio (MIA). De forma semelhante, no presente trabalho foi observado que o SB366791 é capaz de reverter de forma dose dependente a analgesia induzida pela administração sistêmica do CBD. Esse dado sustenta a hipótese de que o CBD é capaz de ativar os canais TRPV1 em animais neuropáticos e induzir antinocicepção, e corrobora os dados de De Gregorio et al. (2019) que demonstraram a reversão do efeito antialodínico do CBD pela capsazepina em ratos neuropáticos. É importante ressaltar

que o TRPV1 é um receptor canal iônico promíscuo, permeável a íons monovalentes e bivalentes, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , e a ativação desses receptores seguida de abertura do canal iônico inicialmente causaria uma despolarização na célula, devido ao influxo de íons positivos para o interior da célula, aumentando a excitabilidade neuronal e facilitando a transmissão nervosa. No entanto, foi mostrado que a ativação de canais TRPV1 pelo CBD promove uma ativação seguida de rápida dessensibilização (Iannotti et al., 2014), culminando com a redução na densidade de corrente proveniente do canal TRPV1 e consequente hiperpolarização da célula. O CBD desencadeia o mesmo tipo de resposta de dessensibilização em canais TRPV1 à capsaicina, o principal agonista proposto para os receptores TRPV1 (Caterina et al., 1997), funcionando como um agonista de eficácia semelhante. Esse mecanismo de dessensibilização é o que confere à capsaicina e ao CBD, e a outras substâncias canabinoides, o potencial antiepiléptico explorado na clínica (Naziroglu, 2015).

Interessantemente, em relação ao sistema endocanabinoide, é importante lembrar que o CBD pode funcionar como um inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH) com um  $\text{IC}_{50}$  menor do que  $100 \mu\text{M}$  e como um inibidor do transportador de anandamida presente na membrana plasmática com um  $\text{IC}_{50}$  menor do que  $25 \mu\text{M}$  (Bisogno et al., 2001). A inibição da degradação e da recaptção de anandamida na fenda sináptica aumenta a disponibilidade deste neurotransmissor para ligação com receptores canabinoides, explicando a participação dos receptores  $\text{CB}_1$  e  $\text{CB}_2$  no mecanismo analgésico do CBD, ou seja, uma ação indireta sobre os receptores devido ao aumento da disponibilidade de endocanabinoides. No presente trabalho, a inibição da FAAH e do transportador de anandamida, usando MAFP e VDM11 respectivamente, reafirmam o envolvimento do sistema endocanabinoide, uma vez que estes inibidores foram capazes de potencializar o efeito analgésico de uma dose intermediária de  $2 \text{ mg/Kg}$  de CBD. Ainda, a inibição da enzima monoacil glicerol lipase (MAGL) usando o JZL 184 apresentou um efeito muito semelhante ao descrito para o MAFP e o VDM11, sugerindo que o CBD pode ser capaz de induzir a liberação de 2-AG, ou mesmo aumentar a concentração deste endocanabinoide liberado pelo próprio processo neuropático, finalmente promovendo a ativação do receptor  $\text{CB}_2$  canabinoide como parte de seu mecanismo analgésico. Estes dados são corroborados por Di Marzo, (2008) que confirmam a inibição da degradação de canabinoides endógenos como mecanismo de indução da analgesia. Sabe-se que durante o desenvolvimento do quadro neuropático, substâncias canabinoides endógenas, principalmente AEA e 2-AG, são liberados nos tecidos periféricos de forma a controlar a aferência nociceptiva (Guindon and Hohmann, 2009). Dessa forma, a inibição da hidrólise e da recaptção de canabinoides endógenos pelo CBD, observada no presente trabalho, pode estar aumentando a

disponibilidade dessas substâncias no tecido periférico de forma a potencializar o efeito analgésico da dose intermediária de CBD de 2 mg/Kg. Desroches et al. (2014) demonstraram que o efeito analgésico da AEA é principalmente mediado pelo receptor CB<sub>1</sub> na periferia, enquanto o efeito analgésico de 2-AG pode ser dependente de ambos os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, tanto para estímulos térmicos quanto mecânicos, e concluíram que a modulação dos níveis de ambas essas substâncias nos tecidos periféricos representa uma possível ferramenta para o tratamento de dores neuropáticas. De forma geral, sabe-se que o CBD é capaz de exercer efeitos positivos sobre diversos tipos de patologias, como doença de Alzheimer, Parkinson, sobre epilepsia e sobre a ansiedade, e acredita-se que grande parte desses efeitos são mediados pelo sistema endocanabinoide (Pisanti et al., 2017).

A literatura demonstrou que o CBD apresenta um inesperado efeito como antagonista de alta potência dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> canabinoides *in vitro* (Thomas et al., 2007). Outro trabalho mostrou que o CBD pode funcionar como um modulador alostérico negativo de receptores CB<sub>1</sub> (Laprairie et al., 2015). Em uma análise de ensaios de ligação realizados para a determinação da interação entre receptores e seus ligantes, Tham et al. (2019) demonstraram que os sítios de ligação alostéricos e ortostéricos para os receptores canabinoides apresentam grande fluidez relacionada à natureza lipofílica dos ligantes. Esta característica ajuda a explicar parte dos resultados obtidos no presente trabalho com os antagonistas seletivos de receptores canabinoides. Ambos, AM251 e AM630, foram capazes de reverter a analgesia induzida por uma dose de 20 mg/Kg, reduzindo o limiar nociceptivo de animais neuropáticos tratados com CBD de forma dose dependente. A reversão completa da analgesia pela dose maior dos antagonistas sugere que, no contexto da neuropatia, ambos os receptores canabinoides podem ser recrutados por substâncias analgésicas e gerar uma analgesia completa e eficaz. A literatura já demonstrou que a ativação de receptores CB<sub>1</sub> em vias descendentes envolvidas com o controle da dor no SNC pode induzir antinocicepção em modelos de dor neuropática e inflamatória (Dogrul et al., 2012; Wu et al., 2020). O CBD exerceu atividade semelhante a um agonista do receptor CB<sub>1</sub> em alguns ensaios funcionais *in vitro* em altas concentrações (> 10 µM), que pode ser revertido por agonistas inversos do receptor CB<sub>1</sub> 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 CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. O CBD também diminuiu o comportamento agressivo induzido por

isolamento social, em camundongos, através da ativação dos receptores CB<sub>1</sub> (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, entre eles o receptor CB<sub>1</sub>, já que o efeito antinociceptivo foi antagonizado pela administração de AM251. Foi ainda demonstrado que o CBD é capaz de interagir com ambos os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> canabinoides em neurônios dopaminérgicos dos gânglios da base e melhorar o quadro patológico da doença de Parkinson, provavelmente por meio da redução do estado inflamatório relacionado com a micróglia (Patricio et al., 2020).

O mecanismo de ação preciso de como o CBD é capaz de gerar analgesia completa por meio de receptores canabinoides não pode ser estritamente descrito com os presentes resultados, uma vez que o CBD pode estar causando a ativação de outros sistemas analgésicos endógenos que eventualmente irão ativar os receptores canabinoides. Vários outros agentes analgésicos como a bremazocina (Amarante and Duarte, 2002a), o SNC80 (Pacheco et al., 2012), a N-araquidonoiletanolamina e a Palmitoiletanolamida (AEA e PEA, respectivamente) (Romero et al., 2013) e o aripiprazol (Ferreira et al., 2018) tiveram seus efeitos revertidos pelo AM251 e pelo AM630, o que, mais uma vez, sugere um sinergismo entre sistemas analgésicos endógenos presentes nos tecidos periféricos com o objetivo de promover analgesia.

É importante ressaltar que, em um trabalho elegante realizado por Ibrahim et al. (2005), foi demonstrado que a ativação de receptores CB<sub>2</sub> canabinoides é capaz de induzir a liberação de  $\beta$ -endorfina por queratinócitos residentes do estrato granuloso da epiderme em ratos Sprague-Dwley de forma a produzir antinocicepção. Dados da literatura mostraram a expressão de receptores CB<sub>2</sub> e de peptídeos opioides em queratinócitos e células imunes residentes da pele, o que sustenta a capacidade de tais células de produzir peptídeos opioides de forma dependente da ativação de receptores CB<sub>2</sub> (Cabot et al., 1997; Rittner et al., 2001; Casanova et al., 2003; Kauser et al., 2003). No presente trabalho, a bestatina, um inibidor de aminopeptidase responsável pela degradação de peptídeos opioides endógenos, foi capaz de potencializar uma dose analgésica intermediária de CBD de forma semelhante aos inibidores de degradação e recaptção de canabinoides endógenos. Nesta situação, devido à natureza lipídica do CBD e devido às diferenças estruturais moleculares do CBD em relação à composição proteica dos opioides endógenos, é pouco provável que o efeito analgésico medido nos animais neuropáticos seja um resultado de interações diretas do CBD com a aminopeptidase, mas a ideia de um efeito sinérgico entre a ativação de receptores canabinoides e opioides se mostra como uma alternativa para explicar o efeito analgésico final atribuído ao CBD.

Paralelamente, sabe-se que substâncias analgésicas canabinoides como a anandamida podem exercer seus efeitos por meio de receptores opioides, como foi demonstrado por Reis e colaboradores (2009b), onde a naloxona, antagonista não seletivo de receptores opioides, reverteu de forma dose dependente a analgesia induzida pela anandamida. De forma muito semelhante, no presente trabalho também foi demonstrada a participação de receptores opioides no mecanismo analgésico do CBD, uma vez que a naloxona atenuou parcialmente a analgesia induzida pelo CBD. O antagonismo seletivo de receptores  $\mu$  usando o CTOP e de receptores  $\delta$  usando o naltrindole também reverteram a analgesia promovida pela dose de 20 mg/Kg de CBD. Interessantemente, os receptores  $\kappa$  opioides parecem não estar envolvidos com a analgesia do CBD, visto que seu antagonismo seletivo usando o Nor-BNI não alterou o efeito analgésico do CBD. O antagonismo de receptores  $\kappa$  opioides com o Nor-BNI é capaz de reverter o efeito antinociceptivo de alguns fármacos analgésicos como a bramazocina, agonista seletivo para os receptores  $\kappa$  opioides (Amarante e Duarte, 2002a) bem como de outros analgésicos como o diclofenaco e a dipirona (Silva et al., 2016). Por outro lado, outros trabalhos mostram que os mesmos receptores  $\kappa$  opioides não estão envolvidos com o mecanismo analgésico do aripiprazole (Ferreira et al., 2017). Portanto, o recrutamento de receptores  $\kappa$  opioides para gerar analgesia depende da substância analgésica testada.

As interações entre receptores canabinoides e opioides no contexto da dor e analgesia já vem sendo exploradas há algum tempo e a ideia de uma relação de sinergismo entre esses dois sistemas para gerar antinocicepção surgiu a partir de uma abordagem farmacológica com o uso de antagonistas seletivos para ambos os receptores (Manzanares et al., 1999). Complementando a ideia de sinergismo farmacológico, a formação de dímeros entre receptores  $CB_1$  canabinoides e  $\mu$  opioides em situações como a modulação da neuritogênese (Rios et al., 2001; Gomes et al., 2003) e durante a neuropatia (Bushlin et al., 2010) sugere que exista ainda um sinergismo molecular que suporta e dá embasamento para os achados com os testes farmacológicos. Além do dímero entre receptores  $CB_1$  canabinoides e  $\mu$  opioides, foi também demonstrada a participação e formação de dímeros entre receptores  $CB_1$  canabinoides e receptores  $\delta$  opioides, e tais dímeros exercem um importante papel no controle da aferência nociceptiva em animais neuropáticos em um modelo de neuropatia induzida pelo paclitaxel (Sierra et al., 2019). Tanto os receptores  $\mu$  quanto os receptores  $\delta$  opioides foram ativados pelo CBD no presente trabalho como forma de indução de analgesia, o que nos leva a supor uma possível interação entre tais receptores e os receptores canabinoides como um mecanismo complementar de geração de analgesia periférica em camundongos neuropáticos. No entanto, essa hipótese não foi testada no presente trabalho.

Ainda considerando que o CBD também foi capaz de ativar receptores CB<sub>2</sub> presentes na periferia, é possível inferir que o CBD também possa induzir a liberação de  $\beta$ -endorfina ou outros peptídeos opioides endógenos como parte do seu mecanismo antinociceptivo. Tal fato é reforçado também pelos achados do presente trabalho com o CTOP e o Naltrindole, antagonistas seletivos de receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides, revertendo o efeito analgésico do CBD.

Após a ativação dos receptores, vias de sinalização intracelulares são ativadas de forma a propagar pela célula o estímulo trazido pelo ligante em questão. Vários trabalhos demonstram que após a ativação de receptores canabinoides e opioides, a via de sinalização NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> é uma via comumente ativada por receptores acoplados à proteína G<sub>i</sub>, e sua ativação pode ser observada tanto por substâncias canabinoides quanto por substâncias opioides (Reis et al., 2009b; Romero et al., 2012a). A via de sinalização do NO já vem sendo investigada como uma importante via efetora de mecanismos analgésicos há algum tempo ao nível periférico (Duarte et al., 1990). Posteriormente, trabalhos do nosso grupo mostraram que esta via está envolvida com a analgesia periférica promovida substâncias analgésicas exógenas como o diclofenaco (Alves et al., 2004), a ketamina (Romero et al., 2011b) e a palmitoiletanolamida (Romero et al., 2012a) bem como em mecanismos endógenos de geração de analgesia central (Duarte and Ferreira, 1992; Galdino et al., 2015a). A ideia completa de ativação da via NO/GMPc até o K<sub>ATP</sub>, efetor final da via que causa hiperpolarização do terminal nociceptivo e dificulta a aferência de estímulos periféricos, já foi sumarizada na literatura (Duarte and Ferreira, 1992; Duarte et al., 1992; Rodrigues and Duarte, 2000). Com base no acima citado, o presente trabalho investigou a participação da via nitrérgica no mecanismo analgésico do CBD.

A via nitrérgica ao nível periférico tem seu início com a ativação da enzima PI3K, como visto no trabalho de Cunha e colaboradores (2010) ao verificar o mecanismo periférico analgésico da morfina frente a dor inflamatória. Resultados estes semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, uma vez que o inibidor seletivo da enzima PI3K $\gamma$ , AS 605240, foi capaz de reverter de forma dose-dependente o efeito analgésico do CBD frente a dor neuropática. A reversão na analgesia foi completa, uma vez que a dose maior de 180  $\mu$ g de AS 605240 foi capaz de inibir completamente os efeitos da dose maior de CBD de 20 mg/Kg. Dados da literatura mostram que a inibição de isoformas da enzima PI3K usando wortmannin (0,7-2,3 nmol) e LY294002 (3-33 nmol) são capazes de reverter de forma dose dependente a analgesia central induzida por agonistas seletivos de receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides, DAMGO e DPDPE, respectivamente (Narita et al., 2002). Paralelamente, um trabalho recente demonstrou que o mesmo inibidor seletivo da PI3K $\gamma$  usado no presente trabalho, o AS605240, reverteu de forma dose-dependente a analgesia periférica induzida pela PGE<sub>2</sub> em ratos (Cecílio et al., 2021), o que

reforça a hipótese da participação da PI3K $\gamma$  em mecanismos periféricos de geração de analgesia. Esses dados da literatura, associados aos dados do presente trabalho, sugerem que a ativação de receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides pode causar analgesia que é dependente da enzima PI3K $\gamma$ . Sabe-se ainda que a analgesia mediada pela morfina, bem como a tolerância à tal substância, depende da cascata de sinalização intracelular iniciada pela PI3K em neurônios do corno dorsal da medula (Xu et al., 2014), o que confirma a participação dessa via de sinalização em mecanismos analgésicos.

Dados da literatura mostram que, após a ativação da PI3K $\gamma$  e Akt, o passo seguinte na via do óxido nítrico, no contexto da analgesia, são as enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Ferreira et al., 1991; Cunha et al., 2010; Hervera et al., 2010; Romero et al., 2011b; Gomes et al., 2020). A inibição dessas enzimas de forma não seletiva com o L-NOarg também foi capaz de reverter o efeito analgésico do CBD de forma dose-dependente. O NO vem sendo demonstrado como um efetor fundamental em mecanismos analgésicos periféricos iniciados por diversos mediadores, como é o caso de substâncias canabinoides como a AEA e o PEA (Romero et al., 2012a), além de vários outros agentes não canabinoides, como os peptídeos opioides (Reis et al., 2009b, 2009a) e a noradrenalina (Romero et al., 2012c, 2012b), cujos efeitos analgésicos também foram antagonizados pelo L-NOarg. Outros grupos de pesquisa também demonstraram a participação do NO no mecanismo analgésico de drogas como o tapentadol (Bujalska-Zadrożny et al., 2016), porém neste último trabalho, a inibição de isoformas da enzima óxido nítrico sintase potencializaram o efeito analgésico do tapentadol, contrapondo-se à hipótese proposta no presente trabalho e sustentada por demais trabalhos publicados na literatura de que a inibição da produção do NO bloqueia o efeito analgésico de substâncias opioides e canabinoides.

Na tentativa de identificar qual das isoformas da NOS estaria associada ao efeito analgésico mediado pelo CBD, foram utilizados os inibidores seletivos das três isoformas da enzima (neuronal (NOS<sub>n</sub>), indutível (NOS<sub>i</sub>) e endotelial (NOS<sub>e</sub>). Verificamos que apenas a inibição seletiva da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase usando o L-NPA 24  $\mu$ g foi promoveu reversão da analgesia. Os demais inibidores seletivos, L-NIO e L-NIL, não foram capazes de interferir com a analgesia mediada pelo CBD. Tal conjunto de dados permite inferir que o NO gerado pelos neurônios para causar analgesia mediada pelo CBD é proveniente apenas da isoforma neuronal da NOS. Outros trabalhos da literatura já demonstraram o papel da NOS<sub>n</sub> em mecanismos analgésicos. Interessantemente, Cunha e colaboradores (2012) demonstraram que o U50488, um agonista seletivo de receptores  $\kappa$  opioides, induz analgesia em ratos administrados com PGE<sub>2</sub> periféricamente por meio da ativação da via PI3K $\gamma$ /AKT/NOS<sub>n</sub>/NO. Interessantemente, neste último trabalho, o agonismo seletivo de receptores  $\kappa$  opioides

promoveu a ativação desta via, ao passo que no presente trabalho, os receptores  $\kappa$  aparentemente não exerceram papel efetivo no mecanismo analgésico do CBD. Demais trabalhos do nosso grupo de pesquisa também mostraram que a ativação da enzima NOSn é responsável pelos efeitos analgésicos do PEA, AEA, morfina, bremazocina e antiinflamatórios não esteroidais, nos tecidos periféricos (Romero et al., 2011c, 2012a; De Carvalho Veloso et al., 2015). Resultados estes corroborados por Lee e colaboradores (2015) e por Freitas e colaboradores (2017) que também verificaram a participação dessa enzima em eventos analgésicos. Paralelo a este fato, foi demonstrado que a NOSn também pode ser ativada pela melatonina em neurônios sensoriais periféricos para causar analgesia em um modelo de dor inflamatória orofacial por meio da injeção de formalina 4% (Xie et al., 2020).

Porém, de forma muito interessante, a guanilato ciclase solúvel, alvo direto de NO na cascata de sinalização, quando inibida pelo ODQ, não alterou no efeito analgésico do CBD em nosso modelo experimental. Este dado sugere que a GC não está envolvida no mecanismo analgésico em estudo. De acordo com os trabalhos iniciados na década de 90 (Duarte et al., 1990, 1992; Ferreira et al., 1991) bem como os trabalhos de Cunha e colaboradores (2010), era de se esperar que o NO produzido pela NOSn prosseguiria na cascata de sinalização com a ativação da GC, esta por sua vez produziria o GMPc que subsequentemente ativaria a PKG que, finalmente, provocaria a fosforilação do  $K_{ATP}$ , com abertura e hiperpolarização devido ao efluxo de íons potássio da célula causando analgesia. A inibição de guanilato ciclase com o ODQ na dose de 100  $\mu\text{g}$  é uma estratégia já utilizada pelo nosso grupo de pesquisa e é capaz de reverter efetivamente o efeito analgésico de diversas substâncias que ativam a via do NO (Romero and Duarte, 2009; Romero et al., 2012b; Costa et al., 2014; De Carvalho Veloso et al., 2015), portanto o resultado encontrado com o ODQ no presente trabalho é uma novidade em relação a achados prévios. Ainda temos o trabalho de Alves e colaboradores (2013) que evidenciou a produção de NO/GMPc como importante para o controle endógeno periférico da hiperalgesia durante um evento inflamatório, além de outros trabalhos na literatura que confirmam a participação do GMPc na sinalização intracelular envolvida com analgesia (Hannig et al., 2014; Ding et al., 2017). Diante do exposto, os achados do presente trabalho com o CBD sugerem uma via alternativa para a geração de analgesia não-dependente de GMPc.

Sabe-se que o óxido nítrico regula os  $K_{ATP}$  que, por sua vez, controlam diversas funções fisiológicas, incluindo proteção à morte celular associada ao NO, vasodilatação e controle da liberação de neurotransmissores (Brayden, 2002; Miki and Seino, 2005; Yamada and Inagaki, 2005; Nichols, 2006), porém, além do efeito do NO sobre alvos moleculares de forma dependente de GMPc/PKG, sabe-se que o NO pode exercer seus efeitos fisiológicos diretamente

por meio da S-nitrosilação de proteínas. Este é um processo de ligação covalente entre a molécula do NO com grupos tiol em resíduos de cisteína nas proteínas (Hess et al., 2005). A S-nitrosilação é uma modificação pós-transducional reversível envolvida em processos de sinalização celular baseados em reações de redox, e participa do controle de diversos eventos patofisiológicos, como o pré-condicionamento isquêmico cardíaco (Sun, 2007) e o desenvolvimento de alterações neurodegenerativas (Chung, 2006). A S-nitrosilação pode ser inibida com a N-etilmaleimida (NEM), e foi demonstrado que o NEM é capaz de reverter a analgesia induzida por opioides em camundongos (Sánchez-Blázquez et al., 1989). O NEM também foi capaz de reverter a analgesia induzida pelo CBD de forma dose dependente, levando o limiar nociceptivo de animais neuropáticos tratados com CBD a valores próximos dos animais neuropáticos tratados com veículo. Este dado sugere, pela primeira vez, que a S-nitrosilação da subunidade SUR1 regulatória dos canais para potássio sensíveis ao ATP pode ser um possível evento molecular envolvido com substâncias analgésicas canabinoides, como é o caso do CBD. Portanto, os dados anteriores sugerem que o NO é capaz de ativar diretamente os canais para potássio sensíveis ao ATP como parte do mecanismo analgésico do CBD, uma vez que a GC não está sendo diretamente ativada pelo NO como demonstrado anteriormente. Tal observação corrobora os dados de Kawano e colaboradores (2009a) que demonstram a capacidade de o NO ativar diretamente a subunidade SUR1 do canal  $K_{ATP}$  promovendo abertura destes canais e efluxo de potássio. A deleção do gene que codifica para a proteína SUR1 que regula a atividade desses resulta em alodinia mecânica e hiperalgesia (Luu et al., 2019), confirmando a importância desta subunidade regulatória para o funcionamento do  $K_{ATP}$  e para seu efeito no controle da nocicepção. Ainda em consonância com o trabalho de Luu e colaboradores (2019), que mostrou o aumento do limiar de excitabilidade mecânica em animais neuropáticos após a administração de agonistas de SUR1, aparentemente o CBD estaria realizando um efeito semelhante, por meio do mecanismo de S-nitrosilação da subunidade SUR1 e provocando a abertura desses canais, causando, por fim, a analgesia observada no presente trabalho.

Finalmente, a glibenclamida, bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao ATP, reverteu de forma dose dependente o efeito analgésico de 20 mg/Kg de CBD, confirmando a participação deste canal como efector final do mecanismo analgésico iniciado pela via do NO. A dose máxima de 80  $\mu$ g de glibenclamida reverteu completamente a analgesia mediada por 20 mg/Kg de CBD. A via NOS/NO/GMPc/PKG/ $K_{ATP}$  já foi demonstrada pela literatura por ser uma via clássica de geração de analgesia (Ocaña and Baeyens, 1993; Romero et al., 2012b; Costa et al., 2014; Galdino et al., 2015b). A partir do conjunto de resultados do presente trabalho, é possível perceber que aparentemente existe um desvio na via analgésica clássica proposta por Cunha et

al. (2010) de forma que os canais  $K_{ATP}$  estão sendo ativados diretamente pelo NO para finalmente causar analgesia quando o agente analgésico é o CBD. Esse achado é uma novidade trazida pelo presente trabalho e representa um dado chave para o entendimento do mecanismo analgésico do CBD dependente da produção do óxido nítrico em tecidos periféricos.

Fechamos nossas investigações ao avaliar a quantidade proteica nos tecidos periféricos do coxim plantar de camundongos neuropáticos para canais para potássio sensíveis ao ATP e assim verificamos um aumento significativo nos níveis proteicos destes canais nos tecidos periféricos. É muito importante ressaltar que a quantidade de canais  $K_{ATP}$  já estava aumentada em animais neuropáticos tratados com o veículo do CBD em relação a animais sham, sugerindo que a própria neuropatia já é estímulo suficiente para gerar alterações nos níveis proteicos desse canal. Porém, o tratamento crônico com o CBD foi capaz de aumentar ainda mais a expressão de canais  $K_{ATP}$  na pata de camundongos neuropáticos, o que sugere um mecanismo complementar ao mecanismo farmacológico produzido pelo CBD quando utilizado cronicamente. Sendo este canal o efetor final do mecanismo analgésico desencadeado pela ativação direta pelo NO, é de grande importância reconhecer que o tratamento crônico com o CBD pode aumentar a expressão de  $K_{ATP}$  em tecidos periféricos como forma de gerar analgesia. A quantidade aumentada de  $K_{ATP}$  nos tecidos periféricos é uma alteração molecular relacionada com a resposta analgésica ao tratamento crônico com CBD e possivelmente é acompanhada de alterações em outros substratos neurais relacionados com o controle da dor, como o corno dorsal da medula e a substância cinzenta periaquedutal, a serem verificadas posteriormente. Os dados da literatura são muito escassos em relação aos efeitos do CBD sobre canais  $K_{ATP}$ , portanto o presente trabalho traz mais esse dado valioso e inovador que relaciona os canais para potássio sensíveis ao ATP com o mecanismo analgésico do CBD.

O conjunto de dados deste trabalho mostram que o CBD apresenta um grande potencial como analgésico e confirma sua capacidade de reverter os principais sintomas dolorosos da neuropatia, representando uma alternativa valiosa para o tratamento de dores crônicas de difícil tratamento. Ainda, de posse dos resultados deste presente trabalho, é possível perceber que o CBD, além do agonismo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e TRPV1, é capaz de produzir um aumento na disponibilidade de substâncias endocanabinoides por meio da inibição da hidrólise e recaptção de tais substâncias (regulando o tônus canabinoide endógeno). Tais substâncias podem por sua vez ativar seus respectivos receptores (CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) presentes no terminal nociceptivo e dificultar a aferência nociceptiva. Paralelamente a isto, a ação de endocanabinoides sobre seus receptores presentes em queratinócitos ou células locais do tecido periférico, mediado pelo CBD, pode levar à um aumento da liberação de peptídeos opioides endógenos que irão atuar em receptores



opioide; PI3K $\gamma$  – Fosfatidil Inositol 3 quinase gamma; NOSn – Óxido nítrico sintase neuronal; NO – Óxido nítrico; SUR1 – Receptor de sulfonil ureia tipo 1; K<sub>ATP</sub> – Canal para potássio sensível ao ATP.

## Referências

- Alleman, C.J.M., Westerhout, K.Y., Hensen, M., Chambers, C., Stoker, M., Long, S., et al. (2015). Humanistic and economic burden of painful diabetic peripheral neuropathy in Europe: A review of the literature. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1–11.
- Almeida-Santos, A.F., Ferreira, R.C.M., Duarte, I.D., Aguiar, D.C., Romero, T.R.L., and Moreira, F.A. (2015). The antipsychotic aripiprazole induces antinociceptive effects: Possible role of peripheral dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 765: 300–6.
- Almeida, D.L., and Devi, L.A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacol. Res. Perspect.* 8: 1–10.
- Alves, D.P., Motta, P.G. da, Romero, T.R.L., Klein, A., and Duarte, I.D.G. (2013). NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 28: 8–13.
- Alves, D.P., Tatsuo, M.A.F., Leite, R., and Duarte, I.D.G. (2004). Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels activation. *Life Sci.* 74: 2577–2591.
- Amarante, L.H., and Duarte, I.D.G. (2002a). The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 454: 19–23.
- Amarante, L.H., and Duarte, I.D.G. (2002b). The  $\kappa$ -opioid agonist ( $\pm$ )-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 454: 19–23.
- Andreae, M.H., Carter, G.M., Shaparin, N., Suslov, K., Ellis, R.J., Ware, M.A., et al. (2015). Inhaled Cannabis for Chronic Neuropathic Pain: A Meta-analysis of Individual Patient Data. *J. Pain* 16: 1221–1232.
- Bennet, G., and Xie, Y. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87–107.
- Bennett, D.L., Clark, A.J., Huang, J., Waxman, S.G., and Dib-Hajj, S.D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol. Rev.* 99: 1079–1151.
- Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Zuardi, A.W., and Crippa, J.A.S. (2011). Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr. Drug Saf.* 6: 237–49.
- Bisogno, T., Petrocellis, L. De, Mechoulam, R., Hanuš, L., Davis, J.B., Marzo, V. Di, et al. (2001). 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: 845–852.
- Blessing, E.M., Steenkamp, M.M., Manzanares, J., and Marmar, C.R. (2015). Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics* 12: 825–36.
- Bonavita, V., and Simone, R. De (2011). Pain as an evolutionary necessity. *Neurol. Sci.* 32 Suppl 1: S61-6.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–54.

- Brayden, J.E. (2002). Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29: 312–6.
- Bridges, D., Thompson, S.W., and Rice, A.S. (2001). Mechanisms of neuropathic pain. *Br. J. Anaesth.* 87: 12–26.
- Bujalska-Zadrożny, M., Wolińska, R., Leśniak, A., and Sacharczuk, M. (2016). Central antinociceptive effect of tapentadol is increased by nitric oxide synthase inhibitors. *Behav. Pharmacol.* 27: 606–14.
- Bushlin, I., Rozenfeld, R., and Devi, L.A. (2010). Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10: 80–6.
- Cabot, P.J., Carter, L., Gaiddon, C., Zhang, Q., Schäfer, M., Loeffler, J.P., et al. (1997). Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J. Clin. Invest.* 100: 142–148.
- Campos, A.C., and Guimarães, F.S. (2008). Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 199: 223–30.
- Campos, A.C., Moreira, F.A., Gomes, F.V., Bel, E.A. del, and Guimarães, F.S. (2012). Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367: 3364–3378.
- Carvalho Veloso, C. De, Rodrigues, V.G., Ferreira, R.C.M., Duarte, L.P., Klein, A., Duarte, I.D., et al. (2015). Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway activation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 755: 1–5.
- Casanova, M.L., Blázquez, C., Martínez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernández-Aceñero, M.J., Huffman, J.W., et al. (2003). Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J. Clin. Invest.* 111: 43–50.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824.
- Cathcart, C.J., Johnston, S.A., Reynolds, L.R., Al-Nadaf, S., and Budsberg, S.C. (2012). Efficacy of ABT-116, an antagonist of transient receptor potential vanilloid type 1, in providing analgesia for dogs with chemically induced synovitis. *Am. J. Vet. Res.* 73: 19–26.
- Cecílio, N.T., Souza, G.R., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., and Cunha, T.M. (2021). The PI3K $\gamma$ /AKT signaling pathway mediates peripheral antinociceptive action of dipyrone. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 35: 364–370.
- Chiappedi, M., and Bejor, M. (2010). Herbals and Natural Dietary Supplements in Psychiatric Practice. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 5: 164–171.
- Chung, K.K.K. (2006). Say NO to Neurodegeneration: Role of S-Nitrosylation in Neurodegenerative Disorders. *Neurosignals* 15: 307–313.
- Costa, A., Galdino, G., Romero, T., Silva, G., Cortes, S., Santos, R., et al. (2014). Ang-(1-7) activates the NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 37: 11–6.

- Costa, B., Trovato, A.E., Comelli, F., Giagnoni, G., and Colleoni, M. (2007). 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.
- Cunha, T.M., Roman-Campos, D., Lotufo, C.M., Duarte, H.L., Souza, G.R., Verri, W. a, et al. (2010). Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 4442–4447.
- Cunha, T.M., Souza, G.R., Domingues, A.C., Carreira, E.U., Lotufo, C.M., Funez, M.I., et al. (2012). Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Kγ/AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol. Pain* 8: 10.
- Davarinejad, H. (2015). Quantifications of western blots with ImageJ. *Univ. York* 3–6.
- Desroches, J., Charron, S., Bouchard, J., and Beaulieu, P. (2014). Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Neuropharmacology* 77: 441–52.
- Devinsky, O., Cilio, M.R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., et al. (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* 55: 791–802.
- Devinsky, O., Patel, A.D., Thiele, E.A., Wong, M.H., Appleton, R., Harden, C.L., et al. (2018). Randomized, dose-ranging safety trial of cannabidiol in Dravet syndrome. *Neurology* 90: e1204–e1211.
- Ding, Y., Yao, P., Hong, T., Han, Z., Zhao, B., and Chen, W. (2017). The NO-cGMP-PKG signal transduction pathway is involved in the analgesic effect of early hyperbaric oxygen treatment of neuropathic pain. *J. Headache Pain* 18: 51.
- Dogrul, A., Seyrek, M., Yalcin, B., and Ulugol, A. (2012). Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 38: 97–105.
- Duarte, I.D., Lorenzetti, B.B., and Ferreira, S.H. (1990). Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 186: 289–93.
- Duarte, I.D., Santos, I.R. dos, Lorenzetti, B.B., and Ferreira, S.H. (1992). Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 217: 225–7.
- Duarte, I.D.G., and Ferreira, S.H. (1992). 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.
- Dunham, N.W., and Miya, T.S. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).* 46: 208–9.
- Edwards, G., and Weston, A.H. (1993). The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 597–637.
- Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., Pertwee, R.G., Mechoulam, R., and García, C. (2013). Motor effects of the non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Neuropharmacology* 75: 155–63.

Ferreira, R.C.M., Almeida-Santos, A.F., Duarte, I.D.G., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., and Romero, T.R.L. (2017). Peripheral Antinociception Induced by Aripiprazole Is Mediated by the Opioid System. *Biomed Res. Int.* 2017: 8109205.

Ferreira, R.C.M., Almeida-Santos, A.F., Duarte, I.D.G., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., and Romero, T.R.L. (2018). Role of Endocannabinoid System in the Peripheral Antinociceptive Action of Aripiprazole. *Anesth. Analg.*

Ferreira, S.H., Duarte, I.D., and Lorenzetti, B.B. (1991). The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* 201: 121–2.

Finnerup, N.B., and Jensen, T.S. (2006). Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain—a critical analysis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2: 107–15.

Freitas, A.C.N., Silva, G.C., Pacheco, D.F., Pimenta, A.M.C., Lemos, V.S., Duarte, I.D.G., et al. (2017). The synthetic peptide PnPP-19 induces peripheral antinociception via activation of NO/cGMP/KATP pathway: Role of eNOS and nNOS. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 64: 31–38.

Galaj, E., Bi, G.-H., Yang, H.-J., and Xi, Z.-X. (2020). Cannabidiol attenuates the rewarding effects of cocaine in rats by CB2, 5-HT1A and TRPV1 receptor mechanisms. *Neuropharmacology* 167: 107740.

Galdino, G.S., Duarte, I.D., and Perez, A.C. (2015a). Central release of nitric oxide mediates antinociception induced by aerobic exercise. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas e Biol.* 48: 790–7.

Galdino, G.S., Xavier, C.H., Almeida, R., Silva, G., Fontes, M.A., Menezes, G., et al. (2015b). The Nitric oxide/cGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats. *Int. J. Neurosci.* 125: 765–73.

Geber, C., Baumgärtner, U., Schwab, R., Müller, H., Stoeter, P., Dieterich, M., et al. (2009). Revised definition of neuropathic pain and its grading system: an open case series illustrating its use in clinical practice. *Am. J. Med.* 122: S3-12.

Ghovanloo, M.-R., Shuart, N.G., Mezeyova, J., Dean, R.A., Ruben, P.C., and Goodchild, S.J. (2018). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *J. Biol. Chem.* jbc.RA118.004929.

Gomes, F.I.F., Cunha, F.Q., and Cunha, T.M. (2020). Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. *Biochem. Pharmacol.* 176: 113862.

Gomes, I., Filipovska, J., and Devi, L.A. (2003). Opioid receptor oligomerization. Detection and functional characterization of interacting receptors. *Methods Mol. Med.* 84: 157–83.

Gregorio, D. De, McLaughlin, R.J., Posa, L., Ochoa-Sanchez, R., Enns, J., Lopez-Canul, M., et al. (2019). Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain* 160: 136–150.

Guindon, J., and Hohmann, A.G. (2009). The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 8: 403–21.

Hannig, G., Tchernychev, B., Kurtz, C.B., Bryant, A.P., Currie, M.G., and Silos-Santiago, I. (2014). Guanylate cyclase-C/cGMP: an emerging pathway in the regulation of visceral pain. *Front. Mol. Neurosci.* 7:.

- Haroutounian, S., Nikolajsen, L., Bendtsen, T.F., Finnerup, N.B., Kristensen, A.D., Hasselstrøm, J.B., et al. (2014). Primary afferent input critical for maintaining spontaneous pain in peripheral neuropathy. *Pain* 155: 1272–1279.
- Harris, H., Sufka, K., Gul, W., and ElSohly, M. (2016). Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. *Planta Med.* 82: 1169–1172.
- Hartmann, A., Lisboa, S.F., Sonogo, A.B., Coutinho, D., Gomes, F.V., and Guimarães, F.S. (2019). Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT1A and CB1 receptors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 94: 109637.
- Hervera, A., Negrete, R., Leáñez, S., Martín-Campos, J., and Pol, O. (2010). 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: 887–96.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150–66.
- Hunt, S.P., and Mantyh, P.W. (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 83–91.
- Hurd, Y.L. (2017). Cannabidiol: Swinging the Marijuana Pendulum From ‘Weed’ to Medication to Treat the Opioid Epidemic. *Trends Neurosci.* 40: 124–127.
- Hurd, Y.L., Yoon, M., Manini, A.F., Hernandez, S., Olmedo, R., Ostman, M., et al. (2015). Early Phase in the Development of Cannabidiol as a Treatment for Addiction: Opioid Relapse Takes Initial Center Stage. *Neurotherapeutics* 12: 807–15.
- Iannotti, F.A., Hill, C.L., Leo, A., Alhusaini, A., Soubrane, C., Mazzarella, E., et al. (2014). 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: 1131–41.
- Ibrahim, M.M., Porreca, F., Lai, J., Albrecht, P.J., Rice, F.L., Khodorova, A., et al. (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 3093–8.
- Iuvone, T., Esposito, G., Filippis, D. De, Scuderi, C., and Steardo, L. (2009). Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci. Ther.* 15: 65–75.
- Jensen, M.P., Chodroff, M.J., and Dworkin, R.H. (2007). The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. *Neurology* 68: 1178–82.
- Jesus, C.H.A., Redivo, D.D.B., Gasparin, A.T., Sotomaior, B.B., Carvalho, M.C. de, Genaro, K., et al. (2019). Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. *Brain Res.* 1715: 156–164.
- Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203–10.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (2000). Principles of neural science. *4th editio*:
- Kanodia, A.K., Legedza, A.T.R., Davis, R.B., Eisenberg, D.M., and Phillips, R.S. (2010). Perceived Benefit of Complementary and Alternative Medicine (CAM) for Back Pain: A National Survey. *J.*

Am. Board Fam. Med. 23: 354–362.

Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Tränkle, C., and Schlicker, E. (2006). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 372: 354–361.

Katsidoni, V., Anagnostou, I., and Panagis, G. (2013). Cannabidiol inhibits the reward-facilitating effect of morphine: involvement of 5-HT1A receptors in the dorsal raphe nucleus. *Addict. Biol.* 18: 286–96.

Kauser, S., Schallreuter, K.U., Thody, A.J., Tobin, D.J., and Gummer, C. (2003). Regulation of Human Epidermal Melanocyte Biology By  $\beta$ -Endorphin. *J. Invest. Dermatol.* 120: 1073–1080.

Kawabata, A., Nishimura, Y., and Takagi, H. (1992). L-leucyl-L-arginine, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107: 1096–101.

Kawano, T., Zoga, V., Kimura, M., Liang, M.-Y., Wu, H.-E., Gemes, G., et al. (2009a). Nitric Oxide Activates ATP-Sensitive Potassium Channels in Mammalian Sensory Neurons: Action by Direct S-Nitrosylation. *Mol. Pain* 5: 1744-8069-5–12.

Kawano, T., Zoga, V., McCallum, J.B., Wu, H.E., Gemes, G., Liang, M.Y., et al. (2009b). ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. *Neuroscience* 162: 431–443.

Kelly, S., Chapman, R.J., Woodhams, S., Sagar, D.R., Turner, J., Burston, J.J., et al. (2015). Increased function of pronociceptive TRPV1 at the level of the joint in a rat model of osteoarthritis pain. *Ann. Rheum. Dis.* 74: 252–9.

King, K.M., Myers, A.M., Soroka-Monzo, A.J., Tuma, R.F., Tallarida, R.J., Walker, E.A., et al. (2017). Single and combined effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* 174: 2832–2841.

Kuffler, D.P. (2020). Injury-Induced Effectors of Neuropathic Pain. *Mol. Neurobiol.* 57: 51–66.

Laprairie, R.B., Bagher, A.M., Kelly, M.E.M., and Denovan-Wright, E.M. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 172: 4790–805.

Lattanzi, S., Brigo, F., Trinka, E., Zaccara, G., Cagnetti, C., Giovane, C. Del, et al. (2018). Efficacy and Safety of Cannabidiol in Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs* 78: 1791–1804.

Leáñez, S., Hervera, A., and Pol, O. (2009). 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.

Lee, G., Grovey, B., Furnish, T., and Wallace, M. (2018). Medical Cannabis for Neuropathic Pain. *Curr. Pain Headache Rep.* 22: 8.

Lee, W.-H., Xu, Z., Ashpole, N.M., Hudmon, A., Kulkarni, P.M., Thakur, G.A., et al. (2015). Small molecule inhibitors of PSD95-nNOS protein-protein interactions as novel analgesics. *Neuropharmacology* 97: 464–75.

Liu, C.-N., Wall, P.D., Ben-Dor, E., Michaelis, M., Amir, R., and Devor, M. (2000). Tactile

- allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 85: 503–521.
- Luu, W., Bjork, J., Salo, E., Entenmann, N., Jurgenson, T., Fisher, C., et al. (2019). Modulation of SUR1 KATP Channel Subunit Activity in the Peripheral Nervous System Reduces Mechanical Hyperalgesia after Nerve Injury in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 2251.
- Maione, S., Piscitelli, F., Gatta, L., Vita, D., Petrocellis, L. De, Palazzo, E., et al. (2011). Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br. J. Pharmacol.* 162: 584–96.
- Manzanares, J., Corchero, J., Romero, J., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., and Fuentes, J.A. (1999). Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 287–94.
- Marzo, V. Di (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 438–55.
- McMahon, S.B., Koltzenburg, M., Tracey, I., and Turk, D. (2013). *Wall and Melzack's Textbook of Pain* (Elsevier Saunders).
- McPartland, J.M., Duncan, M., Marzo, V. Di, and Pertwee, R.G. (2015). Are cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br. J. Pharmacol.* 172: 737–53.
- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., and Hanus, L.O. (2007). Cannabidiol—recent advances. *Chem. Biodivers.* 4: 1678–92.
- Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150: 971–9.
- Mendell, J.R., and Sahenk, Z. (2003). Painful sensory neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 349: 306–307; author reply 306-307.
- Miki, T., and Seino, S. (2005). Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38: 917–25.
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., and Guimarães, F.S. (2006). Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30: 1466–71.
- Morello, C.M., Leckband, S.G., Stoner, C.P., Moorhouse, D.F., and Sahagian, G.A. (1999). Randomized double-blind study comparing the efficacy of gabapentin with amitriptyline on diabetic peripheral neuropathy pain. *Arch. Intern. Med.* 159: 1931–7.
- Murnion, B.P. (2018). Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Aust. Prescr.* 41: 60–63.
- Narita, M., Ohnishi, O., Nemoto, M., Yajima, Y., and Suzuki, T. (2002). Implications of phosphoinositide 3-kinase in the mu- and delta-opioid receptor-mediated supraspinal antinociception in the mouse. *Neuroscience* 113: 647–52.
- Naziroglu, M. (2015). TRPV1 Channel: A Potential Drug Target for Treating Epilepsy. *Curr. Neuropharmacol.* 13: 239–247.
- Nichols, C.G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440: 470–476.

Ocaña, M., and Baeyens, J.M. (1993). Differential effects of K<sup>+</sup> channel blockers on antinociception induced by alpha 2-adrenoceptor, GABAB and kappa-opioid receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* *110*: 1049–54.

Pacheco, D. da F., Pacheco, C.M. da F., and Duarte, I.D.G. (2012).  $\delta$ -Opioid receptor agonist SNC80 induces central antinociception mediated by Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *J. Pharm. Pharmacol.* *64*: 1084–1089.

Pacheco, D., Klein, A., Castro Perez, A. de, Fonseca Pacheco, C.M. da, Francischi, J.N. de, and Duarte, I.D.G. (2008). 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*: 1143–9.

Pacheco, D.D.F., Klein, A., Perez, A.C., Pacheco, C.M. da F., Francischi, J.N. de, Reis, G.M.L., et al. (2009). Central antinociception induced by  $\mu$ -opioid receptor agonist morphine, but not  $\delta$ - or  $\kappa$ -, is mediated by cannabinoid CB 1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* *158*: 225–231.

Patricio, F., Morales-Andrade, A.A., Patricio-Martínez, A., and Limón, I.D. (2020). Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Front. Pharmacol.* *11*: 1–24.

Pertwee, R.G., Ross, R.A., Craib, S.J., and Thomas, A. (2002). (-)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* *456*: 99–106.

Philpott, H.T., O'Brien, M., and McDougall, J.J. (2017). Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis. *Pain* *158*: 2442–2451.

Pinho-Ribeiro, F.A., Verri, W.A., and Chiu, I.M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* *38*: 5–19.

Pisanti, S., Malfitano, A.M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., et al. (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* *175*: 133–150.

Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., et al. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* *161*: 1976–1982.

Randall, L.O., and Selitto, J.J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* *111*: 409–19.

Reis, G.M.L., Pacheco, D., Perez, A.C., Klein, A., Ramos, M.A., and Duarte, I.D.G. (2009a). Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. *Life Sci.* *85*: 351–6.

Reis, G.M.L., Pacheco, D., Perez, A.C., Klein, A., Ramos, M.A., and Duarte, I.D.G. (2009b). Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. *Life Sci.* *85*: 351–356.

Rios, C.D., Jordan, B.A., Gomes, I., and Devi, L.A. (2001). G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol. Ther.* *92*: 71–87.

Rittner, H.L., Brack, A., Machelska, H., Mousa, S.A., Bauer, M., Schäfer, M., et al. (2001). Opioid Peptide-expressing Leukocytes. *Anesthesiology* *95*: 500–508.

- Rodrigues, A.R.A., and Duarte, I.D. (2000). The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *Br. J. Pharmacol.* *129*: 110–114.
- Romero, T.R.L., and Duarte, I.D.G. (2009).  $\alpha$ 2-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. *Eur. J. Pharmacol.* *613*: 64–67.
- Romero, T.R.L., Galdino, G.S., Silva, G.C., Resende, L.C., Perez, A.C., Cortes, S.F., et al. (2012a). Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. *J. Neurosci. Res.* *90*: 1474–1479.
- Romero, T.R.L., Galdino, G.S., Silva, G.C., Resende, L.C., Perez, A.C., Côrtes, S.F., et al. (2011a). Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth. Analg.* *113*: 1254–9.
- Romero, T.R.L., Galdino, G.S., Silva, G.C., Resende, L.C., Perez, A.C., Côrtes, S.F., et al. (2011b). Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth. Analg.* *113*: 1254–9.
- Romero, T.R.L., Guzzo, L.S., Perez, A.C., Klein, A., and Duarte, I.D.G. (2012b). Noradrenaline activates the NO/cGMP/ATP-sensitive K(+) channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Nitric Oxide Biol. Chem.* *26*: 157–61.
- Romero, T.R.L., Guzzo, L.S., Perez, A.C., Klein, A., and Duarte, I.D.G. (2012c). Noradrenaline activates the NO/cGMP/ATP-sensitive K + channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* *26*: 157–161.
- Romero, T.R.L., Resende, L.C., and Duarte, I.D.G. (2011c). The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* *25*: 431–435.
- Romero, T.R.L., Resende, L.C., Guzzo, L.S., and Duarte, I.D.G. (2013). CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. *Anesth. Analg.* *116*: 463–72.
- Russo, E.B. (2008). Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. *Ther. Clin. Risk Manag.* *4*: 245–259.
- Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B., and Parker, K.K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem. Res.* *30*: 1037–1043.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., et al. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* *152*: 1092–1101.
- Sánchez-Blázquez, P., Ulibarri, I., and Garzón, J. (1989). Intracerebroventricular N-ethylmaleimide differentially reduces supraspinal opioid analgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* *166*: 193–200.
- Scadding, J.W. (1981). Development of ongoing activity, mechanosensitivity, and adrenaline sensitivity in severed peripheral nerve axons. *Exp. Neurol.* *73*: 345–364.
- Shirazi-zand, Z., Ahmad-Molaei, L., Motamedi, F., and Naderi, N. (2013). The role of potassium BK channels in anticonvulsant effect of cannabidiol in pentylenetetrazole and maximal electroshock models of seizure in mice. *Epilepsy Behav.* *28*: 1–7.

- Sierra, S., Gupta, A., Gomes, I., Fowkes, M., Ram, A., Bobeck, E.N., et al. (2019). Targeting Cannabinoid 1 and Delta Opioid Receptor Heteromers Alleviates Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2: 219–229.
- Silva, L.C.R., Castor, M.G.M.E., Navarro, L.C., Romero, T.R.L., and Duarte, I.D.G. (2016). kappa-Opioid receptor participates of NSAIDs peripheral antinociception. *Neurosci. Lett.* 622: 6–9.
- Sindrup, S.H., Gram, L.F., Brøsen, K., Eshøj, O., and Mogensen, E.F. (1990). The selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine is effective in the treatment of diabetic neuropathy symptoms. *Pain* 42: 135–44.
- Sindrup, S.H., and Jensen, T.S. (2000). Pharmacologic treatment of pain in polyneuropathy. *Neurology* 55: 915–20.
- Smith, T.W., Buchan, P., Parsons, D.N., and Wilkinson, S. (1982). Peripheral antinociceptive effects of N-methyl morphine. *Life Sci.* 31: 1205–1208.
- Stein, C., and Lang, L.J. (2009). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9: 3–8.
- Stern, C.A.J., Silva, T.R. da, Raymundi, A.M., Souza, C.P. de, Hiroaki-Sato, V.A., Kato, L., et al. (2017). Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. *Neuropharmacology* 125: 220–230.
- Sun, J. (2007). Protein S-nitrosylation: a role of nitric oxide signaling in cardiac ischemic preconditioning. *Sheng Li Xue Bao* 59: 544–52.
- Tasmuth, T., Härtel, B., and Kalso, E. (2002). Venlafaxine in neuropathic pain following treatment of breast cancer. *Eur. J. Pain* 6: 17–24.
- Tham, M., Yilmaz, O., Alaverdashvili, M., Kelly, M.E.M., Denovan-Wright, E.M., and Laprairie, R.B. (2019). Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 176: 1455–1469.
- Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., and Pertwee, R.G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 150: 613–23.
- Torrance, N., Ferguson, J.A., Afolabi, E., Bennett, M.I., Serpell, M.G., Dunn, K.M., et al. (2013). Neuropathic pain in the community: More under-treated than refractory? *Pain* 154: 690–699.
- Toth, C.C., Jedrzejewski, N.M., Ellis, C.L., and Frey, W.H. (2010). Cannabinoid-Mediated Modulation of Neuropathic Pain and Microglial Accumulation in a Model of Murine Type I Diabetic Peripheral Neuropathic Pain. *Mol. Pain* 6: 1744-8069-6–16.
- Treede, R.-D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M.I., Benoliel, R., et al. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* 1.
- Vilela, L.R., Lima, I. V., Kunsch, É.B., Pinto, H.P.P., Miranda, A.S. de, Vieira, É.L.M., et al. (2017). Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy Behav.* 75: 29–35.
- Wallace, M.S., Marcotte, T.D., Umlauf, A., Gouaux, B., and Atkinson, J.H. (2015). Efficacy of

Inhaled Cannabis on Painful Diabetic Neuropathy. *J. Pain* 16: 616–627.

Wang, G.K., Quan, C., and Wang, S.-Y. (1998). A common local anesthetic receptor for benzocaine and etidocaine in voltage-gated mu1 Na<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch.* 435: 293–302.

Ward, S.J., McAllister, S.D., Kawamura, R., Murase, R., Neelakantan, H., and Walker, E.A. (2014). Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT 1A receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. *Br. J. Pharmacol.* 171: 636–645.

Ward, S.J., Ramirez, M.D., Neelakantan, H., and Walker, E.A. (2011). Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. *Anesth. Analg.* 113: 947–50.

Wilsey, B., Marcotte, T., Deutsch, R., Gouaux, B., Sakai, S., and Donaghe, H. (2013). Low-Dose Vaporized Cannabis Significantly Improves Neuropathic Pain. *J. Pain* 14: 136–148.

Wilsey, B., Marcotte, T.D., Deutsch, R., Zhao, H., Prasad, H., and Phan, A. (2016). An Exploratory Human Laboratory Experiment Evaluating Vaporized Cannabis in the Treatment of Neuropathic Pain From Spinal Cord Injury and Disease. *J. Pain* 17: 982–1000.

Woolf, C.J., American College of Physicians, and American Physiological Society (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.* 140: 441–51.

Woolf, C.J., and Max, M.B. (2001). Mechanism-based pain diagnosis: issues for analgesic drug development. *Anesthesiology* 95: 241–9.

Woolf, C.J., and Salter, M.W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765–9.

Wu, G., Ringkamp, M., Hartke, T. V., Murinson, B.B., Campbell, J.N., Griffin, J.W., et al. (2001). Early Onset of Spontaneous Activity in Uninjured C-Fiber Nociceptors after Injury to Neighboring Nerve Fibers. *J. Neurosci.* 21: RC140–RC140.

Wu, Y., Fu, D., Gu, Q., Li, Y., Qian, Z., Han, J., et al. (2020). Activation of CB1 receptors on GABAergic interneurons in the ventrolateral orbital cortex induces analgesia. *Neurosci. Lett.* 736: 135286.

Xie, S.-S., Fan, W.-G., Liu, Q., Li, J.-Z., Zheng, M.-M., He, H.-W., et al. (2020). Involvement of nNOS in the antinociceptive activity of melatonin in inflammatory pain at the level of sensory neurons. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 24: 7399–7411.

Xu, D.H., Cullen, B.D., Tang, M., and Fang, Y. (2020). The Effectiveness of Topical Cannabidiol Oil in Symptomatic Relief of Peripheral Neuropathy of the Lower Extremities. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 21: 390–402.

Xu, J.-T., Zhao, J.-Y., Zhao, X., Ligons, D., Tiwari, V., Atianjoh, F.E., et al. (2014). Opioid receptor-triggered spinal mTORC1 activation contributes to morphine tolerance and hyperalgesia. *J. Clin. Invest.* 124: 592–603.

Yamada, K., and Inagaki, N. (2005). Neuroprotection by KATP channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38: 945–9.

Zareba, G. (2009). Phytotherapy for pain relief. *Drugs Today (Barc).* 45: 445–67.