

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO CANABIDIOL E
SEU ANÁLOGO SINTÉTICO HU-474**

NICOLE RODRIGUES DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

NICOLE RODRIGUES DA SILVA

**Comparação dos efeitos farmacológicos do canabidiol e seu análogo
sintético HU-474**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

RIBEIRÃO PRETO

2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Silva, Nicole Rodrigues

Comparação dos efeitos farmacológicos do canabidiol e seu análogo sintético HU-474./ Nicole Rodrigues da Silva; orientador: Francisco Silveira Guimarães. – Ribeirão Preto, 2016.

97 f.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2016.

1. HU-474 2. Canabidiol 3. Canabinóides 4. Transtorno obsessivo-compulsivo 5. Nocicepção.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, Nicole Rodrigues

Título: Comparação dos efeitos farmacológicos do canabidiol e seu análogo sintético HU-474

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ___ / ___ / 2016

Banca examinadora

Prof. Dr.: Francisco S. Guimarães Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Sandra Yasuyo Fukada Alves: FCFRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Waldiceu Aparecido Verri Junior: UEL

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho aos meus pais, Itamar e Leonor
pelo incentivo e apoio incondicional e ao meu irmão
Igor, que do céu torce pelas minhas vitórias.
Eu amo muito vocês!”*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proteger e me guiar em todas as escolhas e decisões, não deixando enfraquecer a minha fé.

Aos meus pais, Itamar e Leonor por confiarem em mim. Vocês são exemplos de pessoas honestas e dignas. Tudo que faço nessa vida é para retribuir o incentivo incondicional, educação, companheirismo, amor e carinho que vocês me dão. O que sinto por vocês é mais do que amor é algo inexplicável.

Ao meu irmão, Igor, que partiu cedo dessa vida, mas que foi meu primeiro exemplo a ser seguido. Se hoje sou farmacêutica, foi para concluir o que a vida não o permitiu fazer. Tenho certeza que você é meu anjo da guarda. Um dia, ao seu lado, me sentirei orgulhosa por tudo que conquistei por você!

A minha família, e madrinha Conceição pelo carinho, incentivo, orações e por me lembrarem sempre que sou capaz. Peço desculpas pela ausência em todos esses anos!

Aos meus amados amigos de Viçosa, em especial Marcus Paniago, Pedro Mota, Thuany e Vanessa, obrigada por serem tão presentes na minha vida. Mesmo de longe vocês são essenciais na minha caminhada. Eu amo vocês!

Ao Samir, meu amigo e primeiro “orientador” da vida acadêmica. Obrigada pelo incentivo e confiança em todos os trabalhos realizados juntos e pela amizade sincera.

Aos amigos de Alfenas, em especial Karina, Marcela, Letícia, Jéssica, Thaisa, Lara, Juliane e Mariane pela amizade que construímos. E a Rafaela Scalco, por

ser muito mais que uma companheira de apartamento, por cuidar de mim e ser essencial nos meus dias. Amo muito todos vocês!

Ao mestre e orientador Francisco Silveira Guimarães, pela confiança em me aceitar no seu grupo de pesquisa. Obrigada pelas oportunidades, incentivo e ensinamentos acadêmicos e culturais. Por tornar essa caminhada mais alegre com bom humor e conversas descontraídas em todos os dias de trabalho. Você é um exemplo de dedicação profissional a ser seguido.

Ao Felipe, pela ajuda incondicional, paciência (que não foi pouca), conselhos, descontração e pela ideia de um plano B quando achei que nada mais daria certo. Tenho uma gratidão muito especial por tudo o que fez por mim. Você também é um exemplo de profissional a ser seguido e nada disso teria sido possível sem o seu conhecimento e experiência científica.

As minhas queridas amigas de laboratório Alice, Andreza, Naielly, Manoela, Carla, Sabrina e também a Ana Luiza, por ter feito os meus dias mais felizes dentro e fora do laboratório. Obrigada de coração pela amizade, conselhos, ajuda e discussões científicas durante essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, pelas oportunidades e por sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas e por deixar seu laboratório sempre disponível para mim. E aos demais membros do seu laboratório Sara, Téo, Leandro, Orlando, Gabi, Mayara, Laura, Dani, Davi, Lu, Jéssica, Cassiano, Anna Bárbara e Ana Terzian por proporcionarem momentos agradáveis e por me acolherem e permitirem que eu trabalhasse e convivesse com vocês. Agradeço em especial a Mayara pela amizade e pela preocupação comigo. Ao

Leandro por estar comigo desde o início me escutando, dando conselhos e por ser motivos de muitas risadas durante esses anos.

Ao Prof. Dr Thiago Mattar Cunha pela colaboração e por ter cedido gentilmente o espaço do seu laboratório para que eu trabalhasse. Obrigada por sempre estar disponível para discussões e pelos ensinamentos nesse tempo.

À Prof. Dr. Aline Campos por todos os conselhos, conversas e discussões científicas. Obrigada por ser sempre tão disponível em ajudar e ensinar.

A Miriam, por ter sido fundamental nesse trabalho. Sem a sua ajuda tenho certeza que não conseguiria. Obrigada por ter sido sempre tão disponível e por ter se tornado uma grande amiga.

A Amanda Sales, por ter sido fundamental no início dessa caminhada.

Aos meus amigos de Ribeirão, Alice, Carla e Andreza, obrigada de coração pela preocupação comigo, por todos os ensinamentos, conselhos e por me proporcionarem em meio a tantas dificuldades encontrar amizades verdadeiras.

Vocês são essenciais para que eu consiga seguir em frente. A Naielly, pelo alto astral e alegria contagiante que faz meus dias melhores. Douglas e Gustavo, pelos momentos de descontração e por estarem sempre disposto a me ajudar.

A Vanessa, por ter sido uma das incentivadoras para que seguisse esse caminho e por ter sido a primeira a me acolher em Ribeirão junto com a Miriam.

A Valéria e ao Daniel por me “adotarem” e se tornarem tão especiais na minha vida.

Ao apoio técnico da Laura, José Carlos, Eleni, Inês, Marcos e Ieda por me ensinarem e auxiliarem com suas habilidades técnicas. Em especial a Laura e Ieda, muito obrigada pela eficiência e competência no trabalho feito por vocês.

Ao apoio técnico de Eliana, Orlando e Marcos pelo cuidado e respeito que dedicam aos animais do biotério.

A todos os funcionários do Depto. de Farmacologia, em especial ao Ramon, Soninha e Fátima, pela competência, disponibilidade, conversas, carinho e atenção com que sempre nos recebem e resolvem nossos problemas, vocês são essenciais para que tudo dê certo nesse departamento.

Aos membros da banca, Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior e Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves pela disponibilidade, atenção, auxílio e colaboração na finalização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) pelo apoio financeiro.

**“Pra quem tem fé a vida nunca tem fim!”
(Marcelo Falcão)**

RESUMO

RESUMO

SILVA, N. R. **Comparação dos efeitos farmacológicos do canabidiol e seu análogo sintético HU-474**. 2016. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

Vários estudos indicam que o canabidiol (CBD) apresenta grande potencial terapêutico por possuir propriedades anti-inflamatória, analgésica, anticonvulsivante, anticomulsiva, entre outras. No entanto, o CBD apresenta baixa biodisponibilidade, o que pode comprometer seu uso clínico. Além disso, os múltiplos efeitos farmacológicos do CBD ocorrem por diferentes mecanismos. Nesse sentido, o desenvolvimento de compostos com efeitos semelhantes ao CBD, porém mais potentes e/ou com melhor perfil farmacocinético, seria importante. Assim, no presente estudo, nós avaliamos os efeitos induzidos por um derivado fluorado do CBD, o HU-474, comparando-os com aqueles induzidos pelo CBD. Para isso, camundongos suíços machos foram submetidos a modelos animais sensíveis a drogas anticomulsivas (teste de enterrar esferas) e antinociceptivas (teste da placa quente, contorção abdominal e hiperalgesia inflamatória). Para o estudo dos mecanismos envolvidos nos efeitos destes compostos, foram utilizados os antagonistas dos receptores canabinóides CB1, AM251, e CB2, AM630. Adicionalmente, nós avaliamos se o HU-474 induziria os efeitos clássicos (tétrade canabinóide) observados após a administração de agonistas dos receptores CB1 como hipolocomoção, hipotermia, catalepsia e antinocicepção. Os possíveis efeitos antinociceptivos e da tétrade canabinóide induzidos pelo CBD e HU-474 foram comparados com os efeitos induzidos pelo WIN55,212-2, uma agonista dos receptores CB1/2. Foi observado que o CBD (30 e 60mg/kg) e o HU-474 (10mg/kg) induziram uma diminuição no número de esferas enterradas, efeito

comparado ao da fluoxetina e atenuado pelos antagonistas AM251 e AM630. Como esperado, o WIN55,212-2 induziu a téttrade canabinóide, um efeito não observado com o CBD e HU-474. No teste da placa quente o HU-474 (30 mg/kg) e WIN55,212-2 (5mg/kg) induziram efeito antinociceptivo. O pré-tratamento com AM251 e AM630 atenuaram os efeitos do HU-474 e WIN55,212-2. No teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético, o CBD (30 e 90 mg/kg), HU-474 (30mg/kg) e WIN55,212-2 (3 e 5mg/kg) induziram efeito antinociceptivo caracterizado pela redução no número de contorções abdominais. O pré-tratamento com AM251 atenuou o efeito apenas do WIN55,212-2, mas não dos outros compostos. Já o antagonista AM630 não foi capaz de atenuar o efeito de nenhum dos compostos testados. No modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina, o CBD (30 e 90mg/kg), HU-474 (3, 10 e 30mg/kg) e WIN55,212-2 (1mg/kg) foram capazes de diminuir a intensidade de hiperalgesia mecânica, avaliada pelo método de von Frey. Sendo que os efeitos do WIN55,212-2, CBD e HU-474 foram atenuados pelo pré-tratamento com AM251 e AM630. Estes resultados indicam que o HU-474 induz efeitos anticomulsivos semelhantes ao CBD, mas em doses mais baixas, através de mecanismo dependente da ativação dos receptores CB1 e CB2. Além disso, o HU-474 apresentou propriedades antinociceptivas em todos os testes utilizados, em doses semelhantes ou menores que o CBD. Os efeitos antinociceptivos dos três compostos testados foram dependentes da ativação de receptores CB1 e CB2, com exceção do teste de contorção abdominal, onde os efeitos do CBD e HU-474 não foram bloqueados por nenhum dos dois antagonistas testados. Diferente do WIN55,212-2, o CBD e HU-474 não induziram téttrade canabinóide. Esses resultados evidenciaram efeitos mais

significativos do HU-474, indicando que a adição de um átomo de flúor a molécula de CBD foi capaz de melhorar o seu perfil farmacológico. Além disso, os resultados com o pré-tratamento com os antagonistas AM251 e AM630 nos permitem sugerir um mecanismo misto, visto que há o envolvimento dos receptores CB1 e CB2. Desse modo, esse novo composto poderia ser uma alternativa terapêutica para o tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo, bem como dores agudas em doses menores que o CBD.

Palavras-chave: HU-474, canabidiol, canabinóides, transtorno obsessivo-compulsivo, nocicepção.

ABSTRACT

ABSTRACT

SILVA, N. R. **Comparative study of pharmacological effects of cannabidiol and its synthetic analog HU-474.** 2016. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

Cannabidiol (CBD) has several therapeutic properties such as anti-inflammatory, analgesic, anticonvulsant and anticomulsive. These multiple pharmacological effects occur by different mechanisms. However, CBD exhibits low bioavailability, which may compromise its clinical use. Thus, the development of CBD analogues, more powerful and/or better pharmacokinetic profile would be interest. Here, we evaluated the effects of a fluorinated derivative of CBD, HU-474, comparing its effects with those induced by CBD. Male Swiss mice were submitted to animal models predictive to anti-compulsive (marble burying test) and antinociceptive drugs (hot plate, abdominal writhing and inflammatory hyperalgesia test). To study the mechanisms involved in their effects were used antagonist of the cannabinoid receptor CB1(AM251) and CB2 (AM630). We also evaluated whether HU-474 would induce the classic effects (cannabinoid tetrad) observed after the administration of CB1 receptors agonists. The cannabinoid tetrad is characterized by hypolocomotion, hypothermia, catalepsy, and antinociception. The possible antinociceptive effects and cannabinoid tetrad induced by CBD and HU-474 were compared with those induced by WIN55,212-2, a CB1/2 receptor agonist. CBD (30 and 60mg/kg), and HU-474 (10mg/kg) decreased the number of buried marble, an effect compared with fluoxetine an attenuated by AM251 and AM630. As expected, WIN55,212-2 induced the cannabinoid tetrad, an effect that was not observed after CBD or HU-474 administration. In the hot plate test, HU-474 (30mg/kg) and WIN55,212-2 (5mg/kg) induced antinociceptive effect.

Pretreatment with AM251 and AM640 attenuated the effects induced by HU-474 and WIN55,212-2. In the abdominal writhing test induced by acetic acid, CBD (30 and 90mg/kg), HU-474 (30mg/kg) and WIN55,212-2 (3 and 5mg/kg) induced antinociceptive effects characterized by a reduction in the number of writhing. Pretreatment with AM251 only attenuated the effect of WIN55,212-2, but not of the other compounds, while AM630 didn't attenuated the effect of any of the tested compounds. In an inflammatory hyperalgesia model induced by carrageenan, CBD (30 and 90mg/kg), HU-474 (3, 10 and 30mg/kg) and WIN55,212-2 (1mg/kg) decreased the intensity of mechanical hyperalgesia measured by electronic von Frey method. The effects of all compounds were attenuated by the pretreatment with AM251 and AM630. These results indicate that HU-474 exhibits anti-compulsive effects similar to CBD, but at lower doses, through a mechanism dependent of the activation of CB1 and CB2 receptors. Furthermore, HU-474 showed antinociceptive properties in all tests at similar or lower doses than CBD. The antinociceptive effects of the three compounds tested were dependent on the activation of CB1 and CB2 receptors, excepted to the writhing test, where the effects of CBD and HU-474 were not attenuated by any of the two antagonists tested. Moreover, unlike WIN55,212-2, CBD and HU-474 didn't induce cannabinoid tetrad. These results showed more significant effects of HU-474, indicating that the addition of fluoride improved the pharmacological profile of CBD. Furthermore, the results with pretreatment with the antagonist AM251 and AM630 allow us to suggest that these effects involve the activation of CB1 and CB2 receptors. Thus, this new compound could be a therapeutical alternative for the treatment of obsessive-compulsive disorder and acute pain in lower doses than CBD.

Keywords: HU-474, cannabidiol, cannabinoids, obsessive-compulsive disorder, nociception.

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Canabidiol e o Sistema endocanabinóide.....	25
1.2 Transtorno Obsessivo Compulsivo	28
1.3. Aspectos gerais da dor	30
1.4 Dor e o Sistema endocanabinóide	31
1.5. Biodisponibilidade do CBD e novos compostos	33
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Animais.....	39
3.2 Drogas	39
3.3 Procedimentos experimentais.....	40
3.3.1. Teste de enterrar esferas.....	40
3.3.2. Teste da placa quente	41
3.3.3. Contorção abdominal induzida por ácido acético.....	42
3.3.4. Método de avaliação da hiperalgesia mecânica inflamatória - von Frey eletrônico	43
3.3.5. Tétrade canabinóide	44
3.3.5.1 Catalepsia.....	44
3.3.5.2 Medida de temperatura da cauda.....	45
3.3.5.3 Atividade locomotora	45
3.3.5.4 Atividade antinociceptiva.....	46
3.4. Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS	48
4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento com CBD e HU-474 no teste de enterrar esferas.....	48
4.2. Experimento 2: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo CBD e HU-474 no teste de enterrar esferas.	49
4.3. Experimento 3: Efeito do pré-tratamento com AM630 sobre as alterações produzidas pelo CBD e HU-474 no teste de enterrar esferas.....	50
4.4. Experimento 4: Efeitos do tratamento com WIN55,212-2 na tétrade canabinóide.	51

4.5. Experimento 5: Efeitos do tratamento com CBD na tétrade canabinóide.	52
4.6. Experimento 6: Efeitos do tratamento com HU-474 na tétrade canabinóide.....	53
4.7. Experimento 7: Efeito do tratamento com WIN55,212-2, CBD e HU-474 na placa quente.	54
4.8. Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1 e 3mg/kg) sobre as altera�es produzidas pelo WIN55,212-2 e HU-474 na placa quente.....	55
4.9. Experimento 9: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 e 3mg/kg) sobre as altera�es produzidas pelo WIN55,212-2 e HU-474 na placa quente.....	56
4.10. Experimento 10: Efeito do tratamento com WIN55,212-2, CBD e HU-474 no modelo de contor�o abdominal induzida por ácido acético.....	57
4.11. Experimento 11: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1 e 3mg/kg) sobre as altera�es produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 no modelo de contor�o abdominal induzida por ácido acético.	59
4.12. Experimento 12: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 e 3mg/kg) sobre as altera�es produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 no modelo de contor�o abdominal induzida por ácido acético.	61
4.13. Experimento 13: Efeito do tratamento com WIN55,212-2, CBD e HU-474 sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina - avaliada pelo método de von Frey eletrônico.	63
4.14. Experimento 14: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1 e 3mg/kg) sobre as altera�es produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina - avaliada pelo método de von Frey eletrônico.	65
4.15. Experimento 15: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 e 3mg/kg) sobre as altera�es produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina - avaliada pelo método de von Frey eletrônico.	67
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO	86
7. REFERÊNCIAS	88

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Canabidiol e o Sistema endocanabinóide

Dentre os mais de 400 compostos químicos da planta *Cannabis sativa*, aproximadamente 60 são denominados canabinóides (Atakan, 2012). Dentre estes, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), composto identificado na metade do século passado por Rafael Mechoulam e colaboradores, é o principal responsável pelos efeitos psicomiméticos induzidos por essa planta (Mechoulam, 1970). Já entre os fitocanabinóides não psicomiméticos, mas que exercem múltiplas ações farmacológicas destaca-se o canabidiol (CBD), componente que produz efeitos muitas vezes opostos ao Δ^9 -THC (Mechoulam et al., 2007).

De fato, foi relatado que o CBD foi capaz de atenuar os efeitos psicomiméticos e ansiogênicos induzidos por altas doses de Δ^9 -THC em paciente saudáveis (Karniol et al., 1974), fornecendo as primeiras evidências para possíveis propriedades ansiolítica e antipsicótica desse composto (Zuardi et al., 1982). Atualmente diversos estudos demonstram outras propriedades farmacológicas atribuídas ao CBD em humanos e em modelos animais. Dentre eles, podemos destacar o efeito anticonvulsivante em humanos (Maa e Figi, 2014) e em modelos animais (Gobira et al., 2015); efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo em animais e humanos (Costa et al., 2007; Ruhaak et al., 2011; Feliú et al., 2015); bem como efeito anti-compulsivo em modelos animais (Casarotto et al., 2010). Os múltiplos efeitos farmacológicos desse composto estão relacionados a sua ação em diversos receptores no sistema nervoso central (SNC), dentre eles os receptores CB1, CB2, GPR55, TRPV1 e 5-HT1A

(Costa et al., 2004a; Campos e Guimarães, 2009; Casarotto et al., 2010; Pazos et al., 2013; Casarotto, et al., 2015).

Em relação ao sistema endocanabinóide, além dos receptores CB1 e CB2 mencionados anteriormente, compreende também os agonistas endógenos conhecidos como endocanabinóides (ECs), anandamina (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) e as proteínas responsáveis pela síntese e degradação destas substâncias (Piomelli, 2005).

O receptor do tipo CB1 encontra-se localizado, preferencialmente, em neurônios pré-sinápticos em áreas do cérebro envolvidas na transmissão e processamento da dor, tais como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), bulbo rostral ventromedial (RVM), córtex e na medula espinal e também em áreas importantes envolvidas no transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) como o estriado, córtex, substância nigra e em menor quantidade no tálamo (Herkenham et al., 1990; Tsou et al., 1998; Casarotto et al., 2015). Já os receptores CB2, inicialmente foram considerados expressos apenas em células do sistema imune periférico e hematopoiético. No entanto, estudos vêm mostrando a expressão desses receptores no SNC, em células gliais e neuronais, tendo como função a modulação da liberação de citocinas e a migração de células do sistema imune (Luongo et al., 2014). Ambos são receptores acoplados a proteína G que, quando ativada, inibe a enzima adenilato ciclase, aumenta a abertura de canais de potássio e inibe canais de cálcio, modulando a liberação de outros neurotransmissores (Piomelli et al., 2003).

Os ECs são produzidos conforme a demanda (diferentemente dos neurotransmissores clássicos) por neurônios pós-sinápticos e modulam as

atividades neuronais como neurotransmissores retrógrados (Egertová et al., 1998). No entanto, assim como para a maioria dos neurotransmissores clássicos, as ações dos ECs são limitadas por um processo de duas etapas: internalização, seguida por catabolismo (Para revisão, ver Saito et al., 2010). Após a internalização, essas substâncias sofrem hidrólise enzimática, sendo a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH-*fatty acid amide hydrolase*) e a monoacilglicerol lipase (MGL) responsáveis pela hidrólise da AEA e da 2-AG, respectivamente (Dinh et al., 2002).

O CBD apresenta baixa afinidade para se ligar aos receptores CB1 e CB2. Dessa forma, é proposto que os efeitos desse composto que são mediados por esses receptores ocorram, principalmente, devido a sua capacidade de inibir a enzima FAAH responsável pelo metabolismo da AEA, aumentando os níveis disponíveis desta molécula e facilitando indiretamente a neurotransmissão mediada pelos endocanabinóides (Bisogno et al., 2001; de Filippis et al., 2008).

Vale ressaltar que algumas propriedades farmacológicas atribuídas aos agonistas canabinóides em modelos animais são tipicamente associadas a efeitos colaterais significativos, incluindo catalepsia, déficits motores, antinocicepção e hipotermia (Sain et al., 2009), sendo esses efeitos decorrentes principalmente da ativação dos receptores CB1 no SNC (Ledent et al., 1999; Lichtman e Martin, 1997). Dessa forma, drogas que inibem a FAAH e ativam de forma indireta esses receptores, como o CBD, não causam esses efeitos e é um importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas (El-Alfy et al., 2010; Thors et al., 2010).

1.2 Transtorno Obsessivo Compulsivo

O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) é um transtorno psiquiátrico comum, marcado por pensamentos intrusivos e perturbadores denominados obsessões e comportamentos repetitivos denominados compulsão (Goodman et al., 2014). Os tipos mais comuns de obsessões incluem preocupações relacionadas à contaminação, a segurança, atos de agressão indesejados, pensamentos envolvendo assuntos sexuais ou religiosos e a necessidade de simetria ou exatidão. Já as compulsões incluem limpeza excessiva, rituais de organização/verificação e dificuldade de desapego de algum bem, independente do seu valor monetário ou sentimental (Storch et al., 2010).

A mais nova edição do Manual Diagnóstico e Estatístico para Doenças Mentais (DSM-5) reclassificou o TOC, removendo-o dos transtornos de ansiedade e o adicionando a uma nova seção denominada transtorno obsessivo-compulsivo e distúrbios relacionados, sendo a presença de comportamentos repetitivos uma característica comum dessa seção. No entanto, esta mudança não implica que a ansiedade esteja ausente no TOC, já que esta muitas vezes é uma característica proeminente da doença. (American Psychiatric Association, 2013; Husted et al., 2006).

Atualmente, as opções terapêuticas existentes para tratar pacientes diagnosticados com TOC não são capazes de eliminar completamente os sintomas, mas apenas controlá-los (Simpson, 2010), sendo que 25-40% dos pacientes são refratários ao tratamento (Abudy et al., 2011). Os tratamentos mais utilizados consistem na terapia cognitiva-comportamental (Olatunji et al., 2013) e farmacoterapia (Fineberg et al., 2013). Em casos mais graves, lesões neurocirúrgicas de estruturas do circuito dos gânglios da base-tálamo-córtex

são uma opção (Albelda e Joel, 2011). Em relação ao tratamento farmacoterapêutico, os inibidores da recaptção de serotonina são geralmente prescritos para o alívio das obsessões e compulsões. Dentre esses medicamentos incluem os antidepressivos tricíclicos como a clomipramina e os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), como a fluoxetina (Simpson, 2010).

Estudos de neuroimagem sugerem que vários sistemas neurais estejam envolvidos na patofisiologia do TOC, dentre eles, destaca-se a via cortico-estriado-tálamo-cortical (CETC) (Saxena e Rauch, 2000), onde encontram-se localizados receptores CB1, que ao serem ativados pelos endocanabinóides são capazes de diminuir a liberação de neurotransmissores via proteína Gi, como glutamato, GABA, dopamina e serotonina que são os principais neurotransmissores presentes no circuito CETC (Chevalleyre et al., 2006).

Outros dados da literatura demonstram o possível envolvimento do sistema endocanabinóide no TOC. Estudos com animais mostram que o tratamento com o agonista dos receptores CB1 e CB2, bem como com os inibidores da enzima FAAH, e inibidor da recaptção da AEA, diminuem o comportamento tipo-compulsivo no teste de enterrar esferas. Sendo que a administração prévia de antagonistas de receptores CB1 e CB2 reverte os efeitos desses compostos (Gomes et al., 2011; Kinsey et al., 2011b; Umathe; Manna; Jain, 2012; Bahi et al., 2014). Em humanos, existem poucos estudos investigando o possível efeito anti-TOC induzidos por canabinóides. Por exemplo, os dados com o Dronabinol, uma formulação sintética de Δ^9 -THC, mostrou que quando administrado junto à clomipramina (antidepressivo tricíclico), esse composto levou à melhora dos efeitos terapêuticos antes

observados apenas com a monoterapia (Schindler et al., 2008). Dessa forma, esses resultados sugerem que os canabinóides poderiam ser uma nova alternativa terapêutica para o tratamento desse transtorno.

1.3. Aspectos gerais da dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é definida como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual ou potencial ou descrita em termos de tal dano”. Vários estudos descrevem o papel fisiológico da dor como um “alarme”, que ativa o sistema de reação e induz comportamentos de precaução com a função de proteger o organismo e limitar os danos (Almeida et al., 2004). Desta forma, apesar da dor ser uma sensação desagradável, ela é de fundamental importância para a sobrevivência do organismo, tendo uma importante função protetora.

A dor pode ser classificada de diversas formas, sendo uma delas em relação a sua duração (aguda e crônica). A dor aguda é caracterizada pela permanência ou aparecimento de alterações neurovegetativas (sinais de alerta) e persiste por um período de curta duração. Além disso, é considerada pontual e delimitada, e desaparece com a resolução do processo patológico. Já a dor crônica, não tem a função de “sinais de alerta”. Persiste por um longo período de tempo, sendo associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal. Dessa forma, a presença constante e duração prolongada da dor podem ser perturbadoras e acarreta alterações significativas na qualidade de vida (Sallum et al., 2012).

O processamento da dor é complexo e ainda não está completamente entendido. Resumidamente, a aplicação de estímulos nocivos no organismo provoca ativação de receptores sensoriais especializados, denominados nociceptores, os quais são terminações nervosas livres de neurônios aferentes primários, responsáveis pela transdução de estímulos térmicos, mecânicos e/ou químicos de alta intensidade. O efeito imediato dessa ativação é a alteração do potencial elétrico da membrana da fibra nervosa. Posteriormente, este estímulo é transmitido para medula espinal e depois para regiões superiores do SNC. Além da ativação dos nociceptores por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos, na dor inflamatória, a produção de mediadores inflamatórios podem ativar ou sensibilizar esses nociceptores locais que também irão desencadear o estímulo doloroso (Julius e Basbaum, 2001). Além disso, a dor pode ser modulada em diferentes pontos da transmissão de forma inibitória ou facilitatória (Guyton e Hall, 2002).

Para a experimentação animal, é necessário que faça a distinção entre dor e nocicepção. Sendo que o último termo foi criado para se referir à sensação de dor observada em animais de laboratório. A nocicepção consiste nos sinais que chegam ao SNC após a ativação de nociceptores, que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos. Já a dor envolve componentes emocionais que é subjetivo para cada indivíduo, e pode alterar a sensação produzida por estímulos nocivos, sendo incapaz de se medir em animais (ver Fein, 2012).

1.4 Dor e o Sistema endocanabinóide

Vários estudos em animais indicam que os canabinóides produzem efeitos antinociceptivos em sítios periféricos, bem como na região espinal e supraespinal, sendo esses efeitos mediados pela ativação dos receptores CB1 e CB2 (ver Fein, 2012), devido a sua expressão em neurônios do sistema nervoso central e periférico, incluindo neurônios nociceptivos aferentes primários (Ross et al., 2001). De fato, sabe-se que nas terminações centrais e periféricas de nervos sensoriais nociceptivos, receptores CB1 modulam a transdução do estímulo nocivo periférico para o SNC (Guindon e Beaulieu 2006); em nível da medula espinal, os receptores CB1 podem modular a propagação de sinais de dor para o cérebro (Sagar et al., 2010a; Sagar et al., 2010b; Woodhams et al., 2012). Já os receptores localizados em regiões supraespinais, associadas com o processamento e controle da dor, tais como PAG e RVM, ao serem ativados podem levar a ativação da via descendente inibitória, ou bloquear a facilitação descendente da dor para a medula espinal (Petrosino et al., 2007; Nadal et al., 2013).

Como já mencionado os receptores CB2 são expressos principalmente na periferia, em células imunes, tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos. Já no SNC são encontrados em astrócitos e micróglia e evidências mostram sua localização também em neurônios (Van Sickle et al., 2005; Woodhams et al., 2015). Vários estudos mostram que a ativação de CB2 medeia efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em modelos animais de dor inflamatória (Quartilho et al., 2003; Khasabova et al., 2011). Por exemplo, o agonista dos receptores CB1/CB2, WIN55,212-2, induziu efeitos antinociceptivos em modelos animais de hiperalgesia induzida por carragenina, na dor associada ao câncer ósseo, bem como na dor inflamatória. Já o agonista do receptor CB2,

AM1241, reduziu a nocicepção térmica. Sendo que todos esses efeitos foram bloqueados por antagonistas dos receptores CB2 (Nackley et al., 2003; Kehl et al., 2003; Malan et al., 2001).

Além da participação dos receptores CB1 e CB2 no controle na hiperalgesia, estudos demonstraram o efeito antinociceptivo da administração local (pata de animais) de AEA (Guindon e Beaulieu, 2006) e 2-AG (Desroches et al., 2008), bem como por níveis aumentados desses ECs em tecidos periféricos em modelos pré-clínicos de dor inflamatória (Beaulieu et al., 2000). Acredita-se que estes efeitos antinociceptivos induzidos por ECs não sejam exclusivamente mediados via receptores CB1 neuronal, mas que o efeito observado após a administração periférica de 2-AG em modelo de dor inflamatória seja principalmente via receptores CB2 (Guindon et al., 2007).

Apesar dos inúmeros resultados mostrarem a eficácia dos agonistas canabinóides na produção de antinocicepção em uma variedade de modelos animais de dor, seus efeitos são tipicamente associados com efeitos colaterais significativos, incluindo catalepsia, déficits motores, antinocicepção e hipotermia (Sain et al., 2009), sendo esses efeitos decorrentes principalmente da ativação dos receptores CB1 no SNC (Ledent et al., 1999; Lichtman e Martin, 1997).

1.5. Biodisponibilidade do CBD e novos compostos

Apesar das inúmeras evidências da ação do CBD em diversos alvos farmacológicos e do seu potencial terapêutico em várias patologias, como seu efeito anticomulsivo e antinociceptivo, como descrito anteriormente, uma limitação para o uso clínico do CBD é a sua baixa e variável biodisponibilidade

oral em humanos (Agurell et al., 1981). Adicionalmente, a essa limitação, CBD induz efeitos em curva de U invertido (aspecto de sino), sendo que em estudos com animais, ele possui uma limitada faixa de dose efetiva. Assim, o desenvolvimento de novos compostos com perfil clínico e segurança semelhante ao CBD, mas com uma biodisponibilidade e potência clínica maiores poderia ser uma alternativa para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (Campos et al., 2012).

Nesse sentido, na tentativa de superar esta dificuldade, o grupo do Prof. Raphael Mechoulam, da Hebrew University de Jerusalém, Israel, vem realizando modificações químicas na molécula do CBD na tentativa de aumentar sua biodisponibilidade e melhorar os parâmetros farmacológicos desse composto. Um exemplo dessas modificações deu origem ao composto HU-474, que é um análogo fluorado do CBD.

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho é que a administração sistêmica de HU-474 em camundongos teria efeitos anticomulsivos e antinociceptivos em doses menores que do CBD por facilitar a neurotransmissão via receptores CB1 e/ou CB2, sem causar a tétrede canabinoide, um conjunto de alterações comportamentais comumente induzidas por agonistas dos receptores CB1.

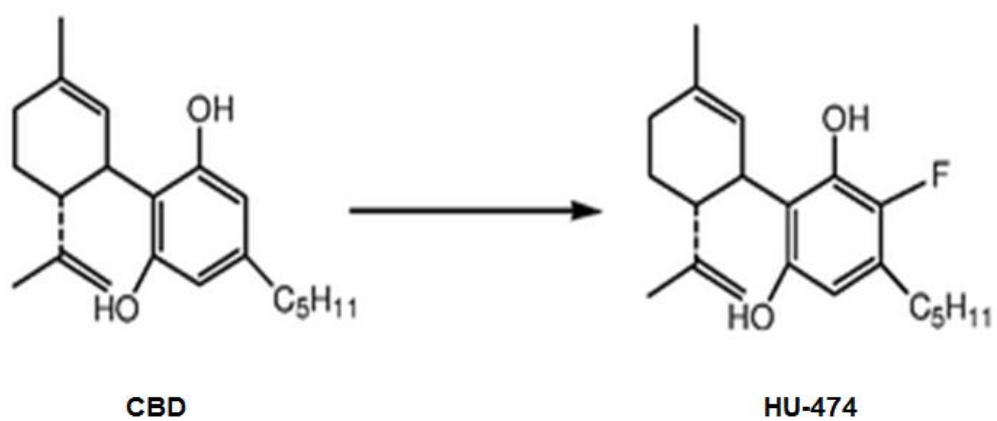


Figura 1: Fórmula estrutural do CBD e HU-474.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do HU-474 em modelos animais sensíveis a drogas anticomulsivas e antinociceptivas, comparando seus efeitos aos do CBD.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos de diferentes doses de HU-474 com diferentes doses do CBD, administradas intraperitonealmente, em modelos animais sensíveis a drogas com propriedades anticomulsivas e antinociceptivas;
- Avaliar a participação dos receptores CB1 e CB2 nos efeitos do HU-474 e CBD;
- Avaliar se as modificações químicas feitas na molécula do HU-474 podem induzir a tétrede canabinóide, um efeito comum a agonistas dos receptores CB1.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados camundongos suíços machos, com 8 a 9 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os animais permaneceram no biotério do departamento, em gaiolas micro-isoladas, com água e ração *ad libitum* sob condições laboratoriais padrões. Os protocolos experimentais utilizados no presente projeto receberam aprovação da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo n. 058/2013).

3.2 Drogas

- Canabidiol (THC Pharm, Alemanha); Veículo: 2% Tween 80 e salina. Utilizado nas doses de 15, 30 e 60mg/kg no teste de enterrar esferas (doses baseadas em Cassaroto et al., 2010); 30 e 90mg/kg na avaliação da tétrede canabinóide (dose efetiva do teste de enterrar esferas e uma dose três vezes maior, respectivamente); 10, 30 e 90mg/kg nos testes de avaliação antinociceptiva (doses baseadas em Costa et al., 2004b).
- HU-474 (sintetizados pelo grupo do Prof. Raphael Mechoulam, Hebrew University, Jerusalem, Israel); Veículo: 2% Tween 80 e salina. Utilizado nas doses de 1, 3 e 10mg/kg no teste de enterrar esferas (doses baseadas em dados prévios e não publicados do nosso grupo); 10 e 30mg/kg na avaliação da tétrede canabinóide (dose efetiva do teste de enterrar esferas e uma dose três vezes maior, respectivamente); 3, 10 e

30mg/kg nos testes de avaliação antinociceptiva (doses baseadas em Gomes et al., 2013 dados não publicados).

- WIN55,212-2 (Tocris, USA); Veículo: 2% Tween 80 e salina. Utilizado na dose de 5mg/kg na avaliação da tétrede canabinóide (dose baseada em Gomes et al., 2013); 1, 3 e 5mg/kg nos testes de avaliação antinociceptiva (doses baseadas em Suplita et al., 2008).
- AM630 (Tocris, USA); Veículo: 10% DMSO e salina. Utilizado nas doses de 1 e 3mg/kg (doses baseadas em Bisogno et al., 2009; Deng et al., 2012).
- AM251 (Tocris, USA); Veículo: 10% DMSO e salina. Utilizado nas doses de 1 e 3mg/kg (doses baseadas em Gomes et al., 2011; Ahmed et al., 2010).
- Carragenina (FMC Corp., Philadelphia, PA); Veículo: salina. Utilizado 100µg em 20µL, sendo injetada na pata direita do animal (baseado em Fonseca et al., 2015).
- Fluoxetina (A Farmacêutica, Brasil); Veículo: 2% Tween 80 e salina. Utilizado na dose de 10mg/kg no teste de enterrar esferas (dose baseada em Nardo et al., 2013).

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1. Teste de enterrar esferas

Para o teste de enterrar esferas foi utilizado uma caixa retangular (38 x 32 x 28 cm) com 5 cm do fundo coberto por serragem. Um total de 25 esferas verdes de vidro transparente (1,5 cm de diâmetro) foi distribuído de forma

uniforme pela serragem. Uma hora antes do teste os animais foram habituados ao ambiente da sala experimental. Em seguida foi realizada uma pré-exposição à caixa, sem as esferas por 5 min, para reduzir comportamentos de busca de novidades durante o teste. Após a sessão de pré-exposição os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p) de Fluoxetina (controle positivo), CBD, HU-474 ou veículo e após 30 min foram colocados no centro da caixa contendo as esferas. Trinta minutos mais tarde, os animais foram retirados das respectivas caixas e o número de esferas enterradas foi contado.

Para avaliar a participação dos receptores CB1 e CB2 nos efeitos desses compostos, uma primeira injeção de AM251 (antagonista dos receptores CB1), AM630 (antagonista dos receptores CB2) ou veículo foi realizada. Trinta minutos depois, uma segunda injeção de veículo ou das doses efetivas de CBD ou HU-474 foi administrada e após 30 min realizou-se o teste como descrito anteriormente. O comportamento tipo-compulsivo está relacionado com o número de esferas que são enterradas, sendo que o critério para considerar a esfera enterrada foi que pelo menos, dois terços dela estivesse sob a serragem (Njung'e e Handley, 1991).

3.3.2. Teste da placa quente

O teste da placa quente consiste em avaliar a nocicepção térmica manifestada por reflexo de lambem ou retirada da pata. Para isso, os animais foram colocados em um cilindro de plexiglas de 10 cm de diâmetro sobre uma placa quente mantida a aproximadamente 56^oC. A latência para que os animais lambessem as patas, “sapateassem” ou pulassem foi medida inicialmente (valor basal). Os animais foram imediatamente retirados do aparato assim que

apresentaram esses comportamentos. Após a medida basal, os animais receberam injeções (i.p) de WIN55,212-2, HU-474, CBD ou veículo e as latências foram medidas novamente 45 min após o tratamento. Os resultados foram expressos em delta do tempo (em segundos) que foi calculado pela subtração do valor após o tratamento pelo valor basal. O tempo máximo de permanência sobre a placa quente em cada medida foi de 30s para evitar danos teciduais (Kisney et al., 2011a). Para avaliar a participação dos receptores CB1 e CB2 nestes efeitos, realizou-se uma primeira injeção de AM251, AM630 ou veículo. Trinta minutos depois, uma segunda injeção de veículo ou das doses efetivas de WIN55,212-2, CBD ou HU-474 foi administrada e após 45 min realizou-se o teste como descrito anteriormente.

3.3.3. Contorção abdominal induzida por ácido acético

Após a injeção intraperitoneal de agentes nociceptivos em camundongos, observam-se respostas que consistem em uma sequência de contorções e extensões do abdômen, algumas vezes acompanhada por torções do tronco e extensão dos membros posteriores do animal. Este comportamento foi denominado de contorção abdominal por Whittle em 1964. Para indução dessa resposta, os animais receberam, 30 min após o tratamento (i.p) com a WIN55,212-2, HU-474, CBD ou veículo, uma injeção (i.p) de ácido acético 0,8% (0,1ml por 10g de peso corporal). O número de contorções foi registrado por um período de 20 min que se iniciou imediatamente após a injeção de ácido acético (Colier et al., 1968). Para avaliar o envolvimento dos receptores CB1 e CB2 na participação destes efeitos, uma primeira injeção de AM251, AM630 ou veículo foi administrada. Trinta minutos depois, uma

segunda injeção de veículo ou das doses efetivas de WIN55,212-2, CBD ou HU-474 foi administrada e realizou-se o teste como descrito anteriormente.

3.3.4. Método de avaliação da hiperalgesia mecânica inflamatória - von Frey eletrônico

O von Frey eletrônico consiste na medida da hiperalgesia por pressão crescente na pata dos animais. Para realização desse teste, um anesthesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Sciences Instruments, Califórnia, EUA), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g) foi utilizado. O contato do transdutor de pressão à pata dos animais é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a este. Para realização da medida, os animais foram alojados em caixas de acrílico, cujo assoalho é feito de uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Um dia antes do experimento, os animais foram colocados nas caixas para adaptação do ambiente por 30 min antes da medida basal ser avaliada. Para isso, aplicou-se, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como 'sacudida' ("flinch") da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, até que o animal apresentasse três medidas similares com uma clara resposta de "flinch" após a retirada da pata. No dia seguinte, os animais foram tratados com WIN55,212-2, HU-474, CBD ou veículo, e 30 min depois, receberam 100µg de carragenina em um volume de 20µL via intraplantar na pata direita e foram colocados na caixa de acrílico. Três horas após, a

intensidade de hiperalgesia foi quantificada e os resultados foram expressos em delta do limiar mecânico (em gramas) que foi calculado pela subtração da média dos valores basais e a média após os tratamentos (Cunha et al., 2004). Para avaliar a participação dos receptores CB1 e CB2 nestes efeitos, realizou-se uma primeira injeção de AM251, AM630 ou veículo seguida, trinta minutos após, por uma segunda injeção de veículo ou das doses efetivas de WIN55,212-2, CBD ou HU-474 e realizou-se o teste como descrito anteriormente.

3.3.5. Tétrade canabinóide

Para avaliar a indução da téttrade canabinóide os animais receberam injeções (i.p) de veículo, HU-474 ou CBD nas doses efetivas no teste de enterrar esferas ou três vezes maiores do que essas. A figura 2, abaixo, ilustra o desenho experimental. Cada animal foi submetido sequencialmente aos quatro testes e o WIN55,212-2 foi utilizado como controle positivo.

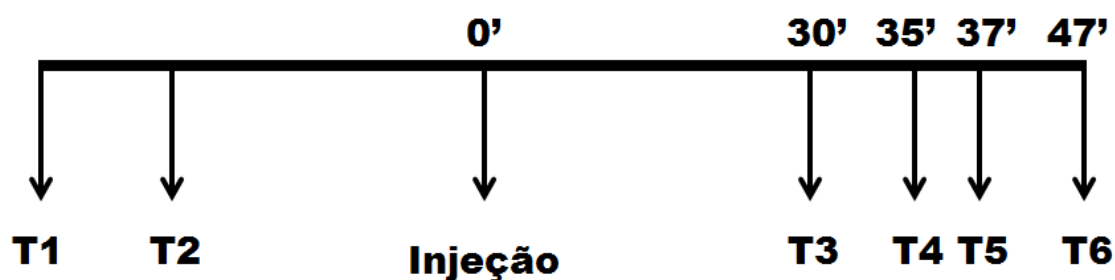


Figura2: Esquema experimental da téttrade canabinóide. T1: temperatura basal da cauda. T2: medida basal da placa quente. T3: teste da catalepsia. T4: medida da temperatura da cauda. T5: teste da atividade locomotora. T6: teste da placa quente.

3.3.5.1 Catalepsia

O teste da catalepsia consiste em posicionar o animal em uma postura pouco usual e registrar o tempo que o mesmo permanece nesta posição. Para este experimento foi utilizado uma barra de vidro fixa a uma altura de 4 centímetros da superfície (Sanberg et al., 1988). Trinta minutos após a injeção das drogas ou veículo, os animais foram posicionados na barra de vidro de modo que as patas dianteiras ficassem sobre a barra. O tempo que ambas as patas permaneceram sobre o aparato foi registrado, sendo o tempo máximo de permanência de 300 s (Gomes et al., 2013).

3.3.5.2 Medida de temperatura da cauda

A temperatura da cauda dos animais foi realizada antes (basal) e 35 min após a injeção das drogas ou veículo, utilizando uma câmera térmica Termovisor Modelo NV 384 (THERMOCOM®, Nashua, NH 03062, EUA) colocada a uma distância de 50 cm do animal. Foram tiradas cinco fotos de cada animal, sendo coletadas as medidas de 5 pontos diferentes da cauda de cada imagem. Uma média destes pontos foi calculada e a média de cada imagem depois do tratamento menos a basal foi feita para o resultado final.

3.3.5.3 Atividade locomotora

Para avaliar possíveis efeitos motores das drogas, trinta e sete minutos após a injeção das drogas ou veículo, a atividade locomotora de cada animal foi avaliada individualmente em uma arena circular de plexiglas (campo aberto; 40 cm de diâmetro com paredes de 40 cm de altura) através do registro da distância total percorrida durante 10 min que foi determinada com o auxílio do programa ANY-MAZE (Stoelting). Este software tem a capacidade de detectar a posição do animal na arena e calcular a distância percorrida pelo animal.

3.3.5.4 Atividade antinociceptiva

Os animais foram colocados na placa quente antes do tratamento (basal) e 47 min após. O teste procedeu como descrito anteriormente no item 3.3.2.

3.4. Análise estatística

Os resultados comportamentais foram representados como média \pm EPM e analisados por teste *t-student* ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. As análises pós-teste foram realizadas pelo teste de Dunnett ou Newman-Keuls (S-N-K), conforme o desenho experimental. O nível de significância estatístico utilizado foi de 95% ($p < 0,05$) e a análise foi realizada com o auxílio do software SPSS (versão 20.0).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento com CBD e HU-474 no teste de enterrar esferas.

CBD nas doses de 30 e 60mg/kg ($F_{3,39} = 3,7$; $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett) diminuiu o número de esferas enterradas. Da mesma forma que o HU-474 (10mg/kg) e a Fluoxetina (FLX; 10mg/kg) também diminuiram o número de esferas enterradas ($F_{4,59} = 4,8$; $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett, Figura 3).

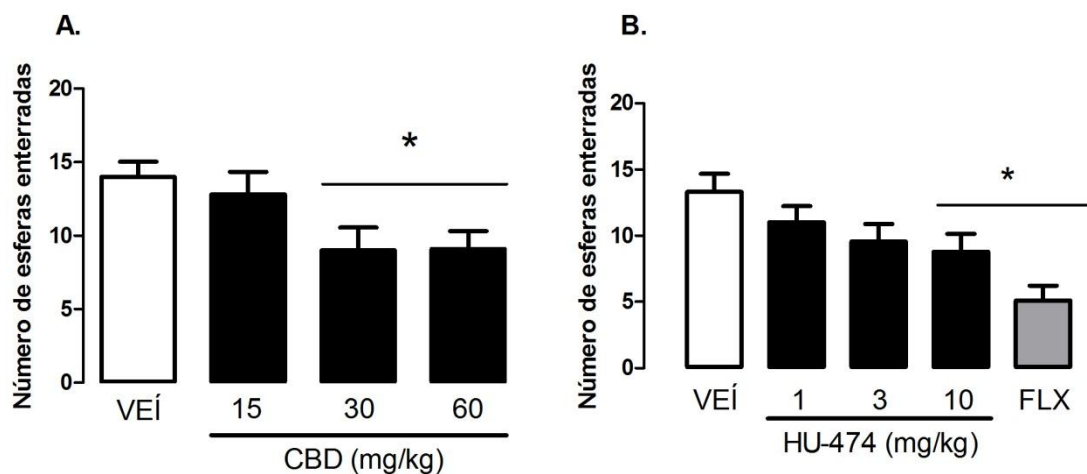


Figura 3: CBD (30 e 60mg/kg) e HU-474 (10mg/kg) diminuiram o número de esferas enterradas. **A.** Camundongos receberam uma injeção (i.p) de veículo (VEÍ, n=11) ou canabidiol (CBD, 15, 30, 60mg/kg, n=10-11/grupo) 30 min antes do teste de enterrar esferas. **B.** Camundongos receberam uma injeção (i.p) de veículo (VEÍ, n=13), HU-474 (1, 3, 10mg/kg, n=13-14/grupo) ou Fluoxetina (FLX 10mg/kg, n=10/grupo) 30 min antes do teste de enterrar esferas. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ, pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett.

4.2. Experimento 2: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo CBD e HU-474 no teste de enterrar esferas.

O pré-tratamento com AM251 (1mg/kg) foi capaz de bloquear os efeitos do CBD e aumentar o número de esferas enterradas (Interação entre tratamentos: $F_{1,33} = 5,2$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$) assim como para o HU-474 (Interação entre os tratamentos: $F_{1,34} = 7,9$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$, Figura 4).

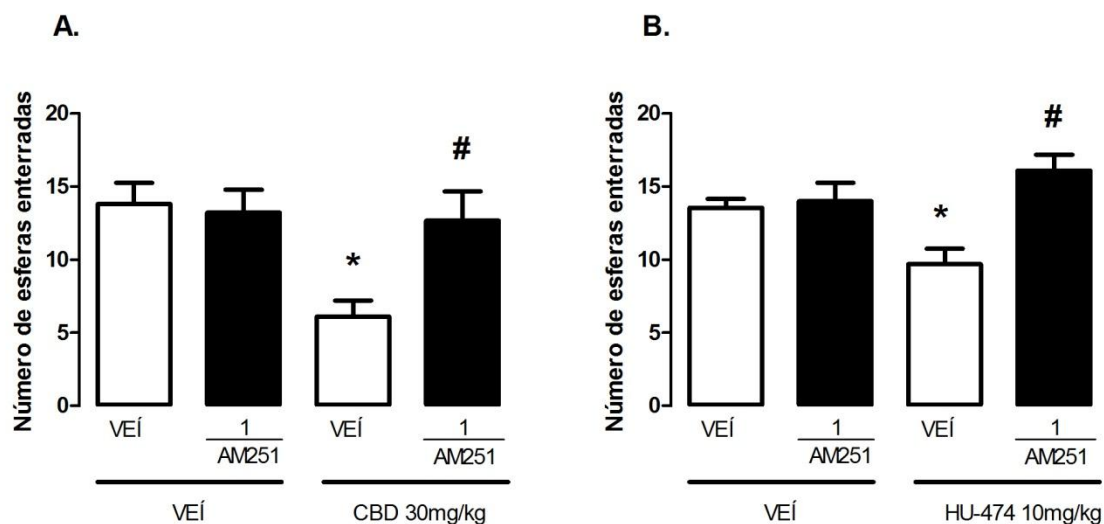


Figura 4: AM251 (1mg/kg) bloqueia o efeito do CBD (30mg/kg) e HU-474 (10mg/kg) no teste de enterrar esferas. **A.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251(1mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou CBD (30mg/kg) 30 min antes do teste de esferas enterradas (n=9-10/grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251(1mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (10mg/kg) 30 min antes do teste de esferas enterradas (n=9-10/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ. # $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-CBD ou VEÍ-HU-474 pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de S-N-K.

4.3. Experimento 3: Efeito do pré-tratamento com AM630 sobre as alterações produzidas pelo CBD e HU-474 no teste de enterrar esferas.

O pré-tratamento com AM630 na dose 1mg/kg foi capaz de atenuar o efeito do CBD e aumentar o número de esferas enterradas (Interação entre os tratamentos: $F_{2,35} = 0,6$; $p > 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$), sendo observado efeito significativo apenas para a segunda injeção ($F_{1,35} = 17,8$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias). Para o grupo de animais tratados com HU-474, as duas doses testadas de AM630 foram capazes de atenuar o efeito desse composto e aumentar o número de esferas enterradas (Interação entre os tratamentos: $F_{2,48} = 1,1$; $p > 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$), sendo observado efeito significativo apenas para a segunda injeção ($F_{1,48} = 14,2$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias, Figura 5).

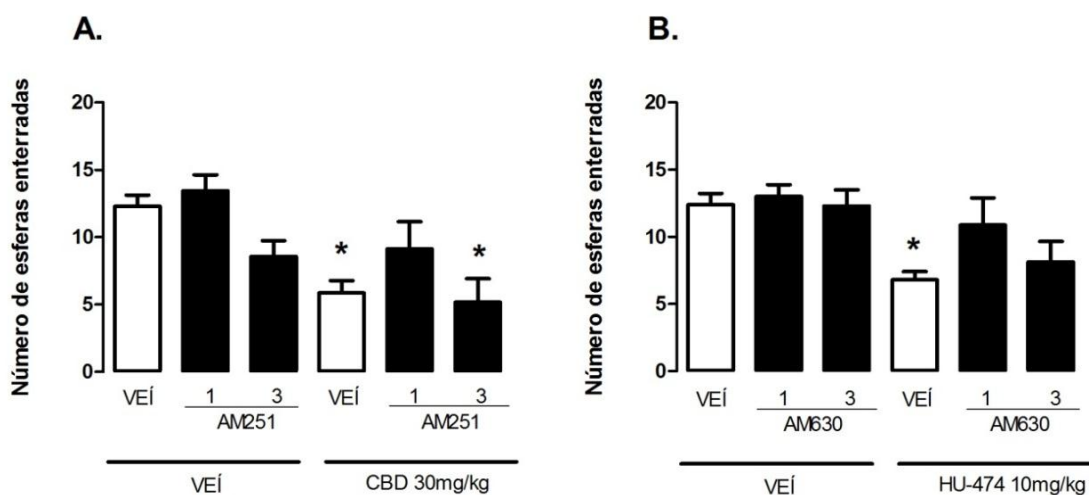


Figura 5: AM630 na dose de 1mg/kg atenua o efeito do CBD (30mg/kg) e nas doses de 1 e 3mg/kg atenua os efeitos do HU-474 (10mg/kg) no teste de enterrar esferas. A. Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou CBD (30mg/kg) 30 min antes do teste de enterrar esferas ($n=6-7$ /grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (10mg/kg) 30 min antes do teste de enterrar esferas ($n=7-10$ /grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de S-N-K.

4.4. Experimento 4: Efeitos do tratamento com WIN55,212-2 na tétrede canabinóide.

Como esperado o WIN55,212-2 (5 mg/kg) induziu as quatro alterações características da tétrede canabinóide, causando catalepsia ($t_{(16)}= 3,7$; $p<0,05$), hipotermia ($t_{(16)}= 2,9$; $p<0,05$) e hipolocomoção ($t_{(16)}= 2,7$; $p<0,05$). Como também foi observado um tendência ao efeito antinociceptivo, no teste da placa quente ($t_{(16)}= 1,9$; $p=0,7$, Figura 6).

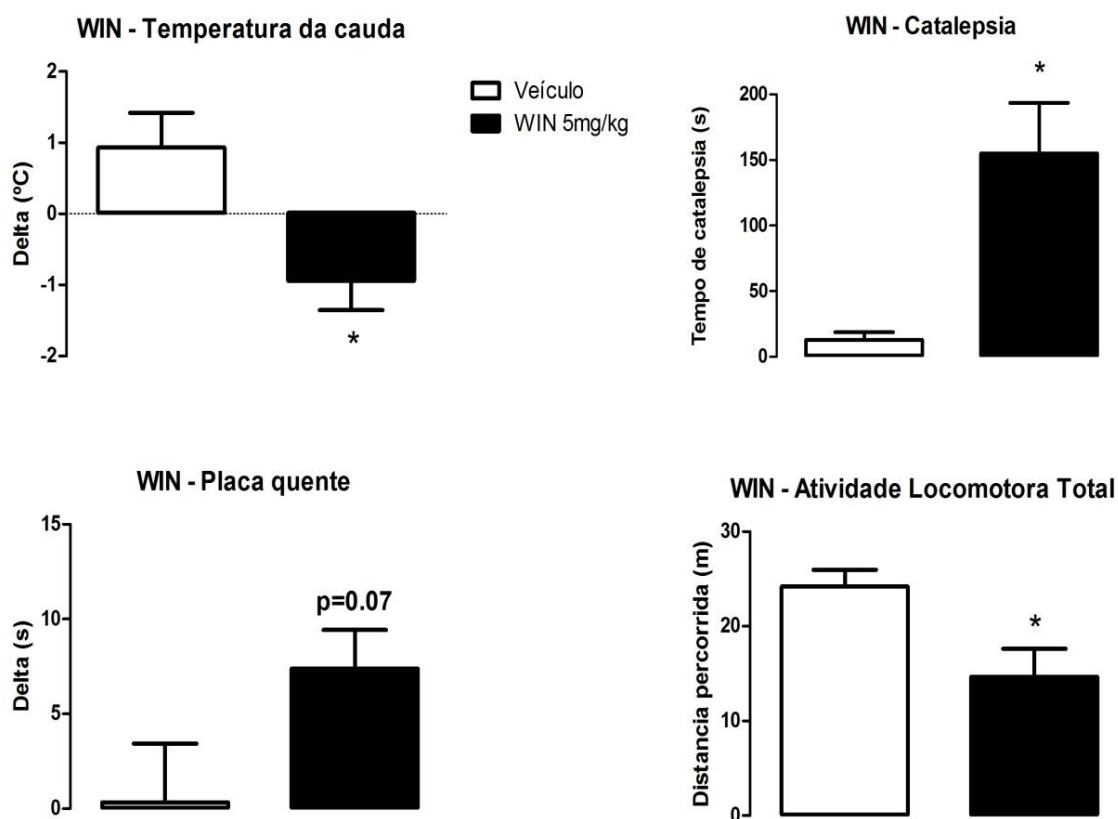


Figura 6: WIN55,212-2 (5mg/kg) induz a tétrede canabinóide. Camundongos foram tratados com veículo ou WIN55,212-2 (5mg/kg) e 30 min após iniciou-se a avaliação da tétrede ($n=9$ /grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p<0,05$, pelo teste *t student*.

4.5. Experimento 5: Efeitos do tratamento com CBD na tétrede canabinóide.

Como esperado, não foi observado os efeitos característicos da tétrede canabinóide após o tratamento com CBD (30 e 90mg/kg). Não ocorreram diferenças significativas em relação ao grupo controle no teste de catalepsia ($F_{2,12}= 0,5$; $p>0,05$), na temperatura da cauda ($F_{2,12}= 0,7$; $p>0,05$), nos testes de atividade locomotora ($F_{2,12}= 0,8$; $p>0,05$) e antinociceptiva ($F_{2,12}= 1,1$; $p>0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett, Figura 7).

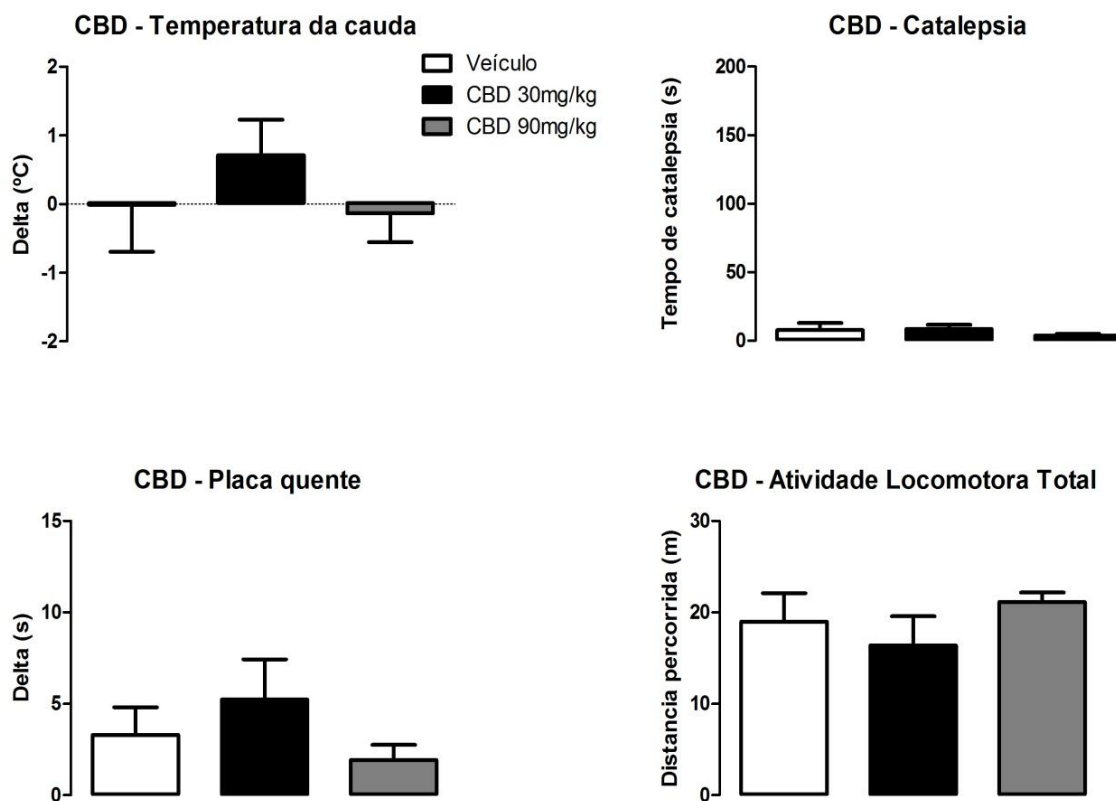


Figura 7: Efeitos do tratamento com CBD (30 e 90mg/kg) na tétrede canabinóide. Camundongos foram tratados com veículo ou CBD (30 ou 90mg/kg) e 30 min após iniciou-se a avaliação da tétrede (n= 5/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM.

4.6. Experimento 6: Efeitos do tratamento com HU-474 na tétrede canabinóide.

O HU-474 também não induziu a tétrede canabinóide. No entanto, no teste da placa quente observou-se um efeito antinociceptivo desse composto na dose de 30mg/kg ($F_{2,12}= 6,5$; $p<0,05$, ANOVA de uma via seguido de Dunnett). Não ocorreram efeitos significativos no teste de catalepsia ($F_{2,12}= 0,8$; $p>0,05$), na medida da temperatura da cauda ($F_{2,12}= 0,4$; $p>0,05$) e no teste da atividade locomotora ($F_{2,12}= 0,7$; $p>0,05$), ANOVA de uma via seguido de Dunnett (Figura 8).

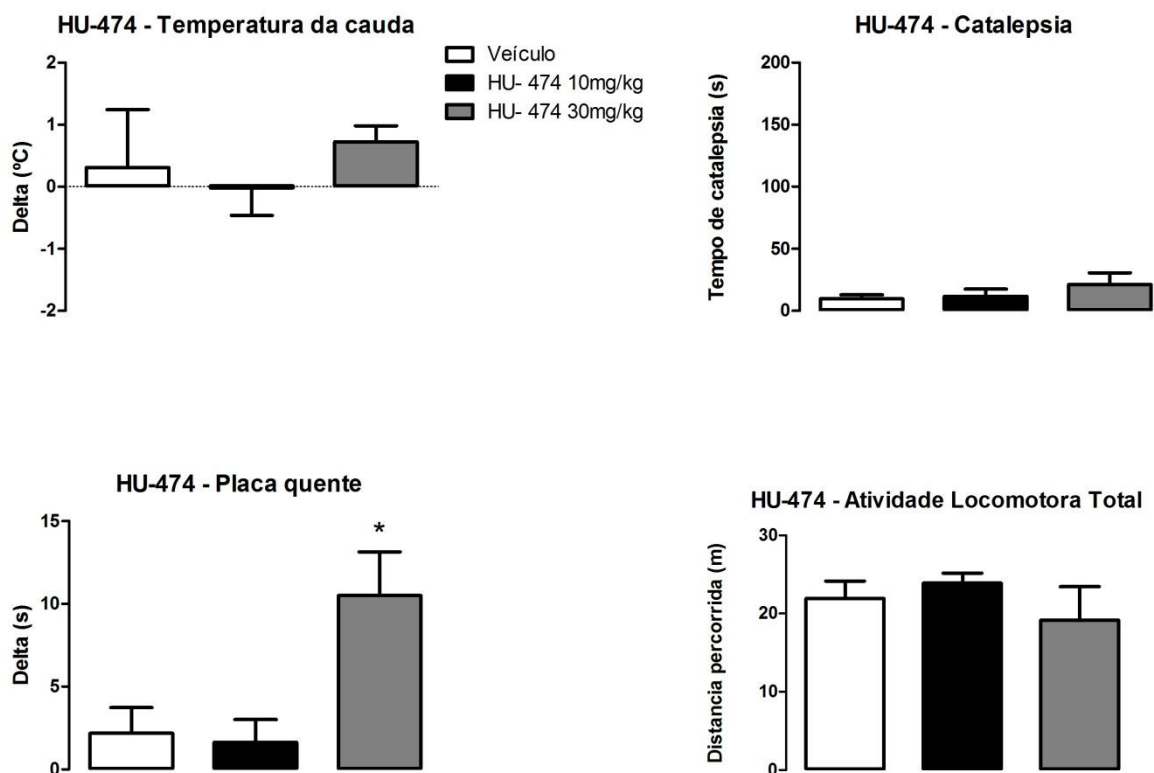


Figura 8: Efeitos do tratamento com HU-474 (10 e 30mg/kg) na tétrede canabinóide. Camundongos foram tratados com veículo ou HU-474 (10 ou 30mg/kg) e 30 min após iniciou-se a avaliação da tétrede (n= 5/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo, pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett.

4.7. Experimento 7: Efeito do tratamento com WIN55,212-2, CBD e HU-474 na placa quente.

Foi observado um efeito antinociceptivo do WIN55,212-2 na dose de 5mg/kg ($F_{3,24}= 6,9$; $p<0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett) e HU-474 na dose de 30mg/kg ($F_{3,28}= 8,3$; $p<0,05$, ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett) no teste da placa quente. Não houve diferença significativa em nenhuma das doses de CBD testadas (10, 30 e 90mg/kg; $F_{3,24}= 0,14$; $p>0,05$, Figura 9).

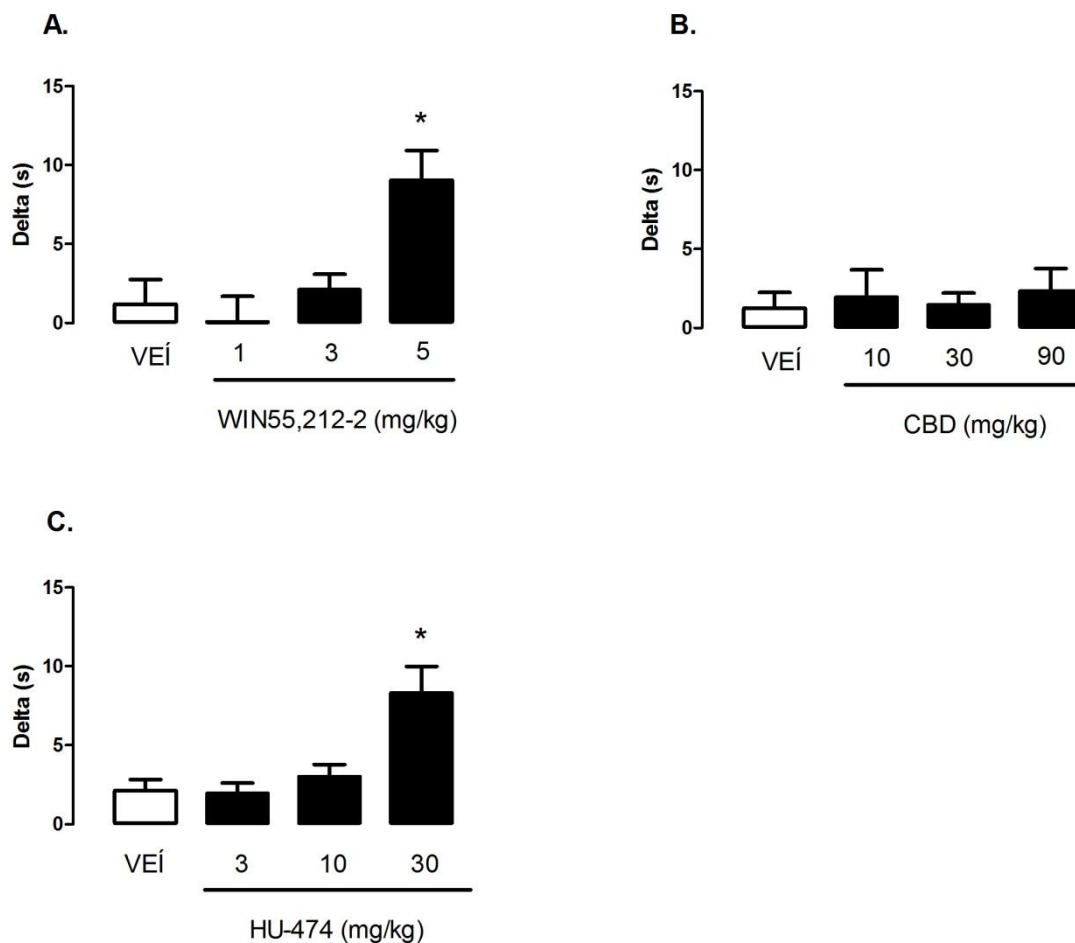


Figura 9: Efeitos do tratamento com WIN55,212-2 (1, 3 e 5mg/kg), CBD (10, 30 e 90mg/kg) e HU-474 (3, 10 e 30mg/kg) no teste da placa quente. A. Camundongos receberam uma injeção (i.p) de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (1, 3 e 5mg/kg; n=7/grupo) ou **(B)** CBD (10, 30, 90mg/kg, n=7/grupo), ou **(C)** HU-474 (1, 3, 10mg/kg, n=8/grupo) 45 min antes do teste da placa quente. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ, pelo teste ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

4.8. Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1 e 3mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo WIN55,212-2 e HU-474 na placa quente.

O pré-tratamento com AM251 (1 e 3mg/kg) foi capaz de bloquear o efeito do WIN55,212-2 (Interação entre os tratamentos: $F_{2,42} = 12,6$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$) assim como do HU-474 (Interação entre

os tratamentos: $F_{2,34} = 7,5$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-HU-474, Figura 10).

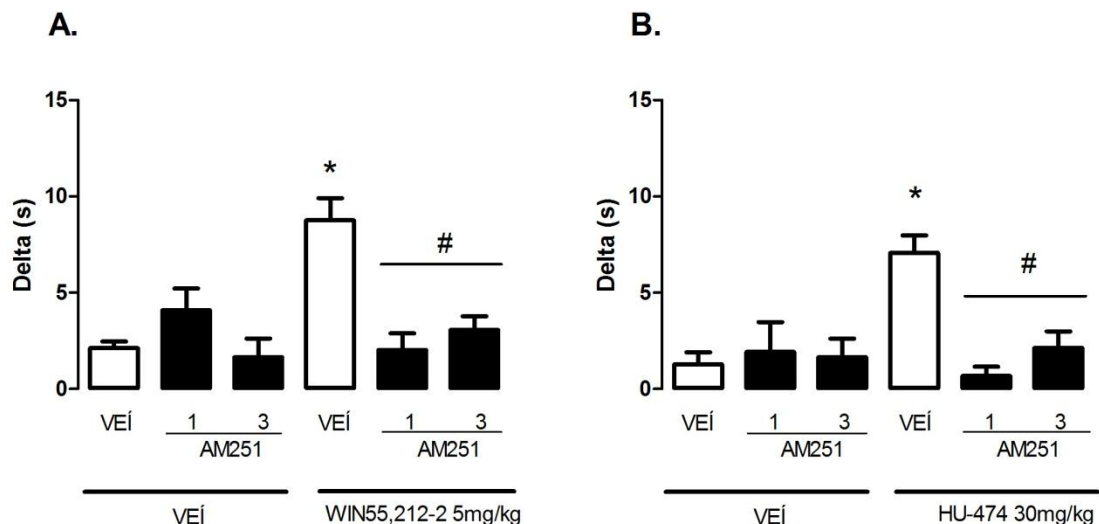


Figura 10: AM251 (1 e 3mg/kg) bloqueia o efeito do WIN55,212-2 (5mg/kg) e HU-474 (30mg/kg) no teste da placa quente. **A.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251 (1 ou 3mg/kg) 75 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (5mg/kg) 45 min antes do teste da placa quente (n=6-10/grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251 (1 ou 3mg/kg) 75 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (30mg/kg) 45 min antes do teste da placa quente (n=6-7/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ. # $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-WIN55,212-2 ou VEÍ-HU-474, pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de S-N-K.

4.9. Experimento 9: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 e 3mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo WIN55,212-2 e HU-474 na placa quente.

O pré-tratamento com AM630 na dose 3mg/kg não foi capaz de bloquear/atenuar o efeito do WIN55,212-2. Já na dose de 1mg/kg, o AM630 foi capaz de atenuar o efeito desse composto (Interação entre os tratamentos: $F_{2,34} = 1,0$; $p > 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$), sendo observado apenas efeito significativo para a segunda injeção ($F_{1,34} = 24,0$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias). Para o HU-474, a dose de 1mg/kg de AM630 foi capaz de

atenuar o efeito do HU-474 e a dose de 3mg/kg capaz de bloquear o efeito desse composto (Interação entre os tratamentos: $F_{2,39} = 2,6$; $p > 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$), sendo observado apenas o efeito da segunda injeção ($F_{1,39} = 5,2$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias, Figura 11).

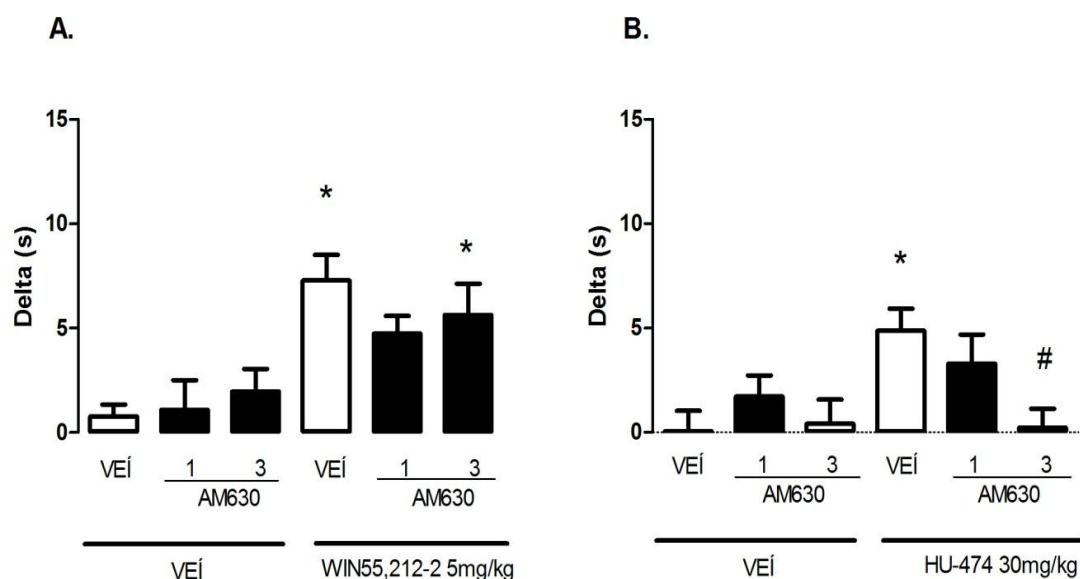


Figura 11: AM630 (1mg/kg) atenua o efeito do WIN55,212-2 (5mg/kg) e HU-474 (30mg/kg) e bloqueia o efeito do HU-474 (30mg/kg) na dose de 3mg/kg no teste da placa quente. A. Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 75 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (5mg/kg) 45 min antes do teste da placa quente (n=6-8/grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 75 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (30mg/kg) 45 min antes do teste da placa quente (n=7-8/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ. # $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-HU-474, pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de S-N-K.

4.10. Experimento 10: Efeito do tratamento com WIN55,212-2, CBD e HU-474 no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético.

O WIN55,212-2 nas doses de 3 e 5mg/kg reduziu o número de contorções abdominais em comparação ao grupo controle ($F_{3,19} = 18,4$; $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett). De mesmo modo, os tratamentos com CBD nas doses de 30 e 90mg/kg ($F_{3,20} = 16,3$; $p < 0,05$; ANOVA

de uma via seguido do teste de Dunnett) e HU-474 na dose de 30mg/kg ($F_{3,21}=6,4$; $p<0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett) reduziram o número de contorções (Figura 12).

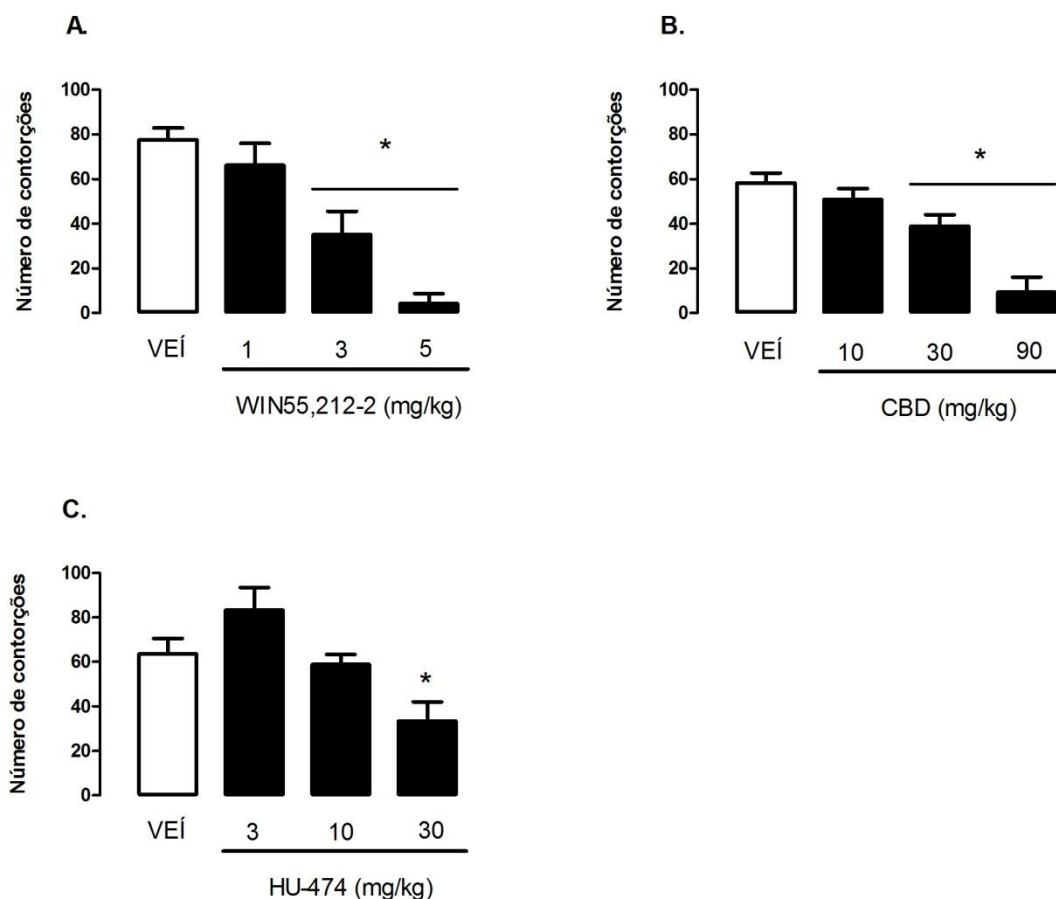


Figura 12: Efeito antinociceptivo do WIN55,212-2 (3 e 5mg/kg), CBD (30 e 90mg/kg) e HU-474 (30mg/kg) no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. A. Camundongos receberam uma injeção (i.p) de veículo (VEÍ, n=6) ou WIN55,212-2 (1, 3 e 5mg/kg, n=5-6/grupo); ou **(B)** CBD (10, 30, 90mg/kg, n=6/grupo); ou **(C)** HU-474 (3, 10, 30mg/kg, n=5-6/grupo) 30 min antes do teste de contorção abdominal. Dados apresentados como média ± EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo VEÍ, pelo teste ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

4.11. Experimento 11: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1 e 3mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético.

O pré-tratamento com AM251 nas doses de 1 e 3mg/kg bloqueou o efeito antinociceptivo do WIN55,212-2 (Interação entre os tratamentos: $F_{2,36}=4,0$; $p<0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p<0,05$). Em relação ao CBD e HU-474, nenhuma das doses de AM251 testadas conseguiu atenuar ou bloquear o efeito antinociceptivo de ambos compostos no teste de contorção abdominal. Houve apenas efeito da segunda injeção, CBD ($F_{1,33}=111,9$; $p<0,05$, ANOVA de duas vias) e HU-474 ($F_{1,34}=109,1$; $p<0,05$, ANOVA de duas vias, Figura 13).

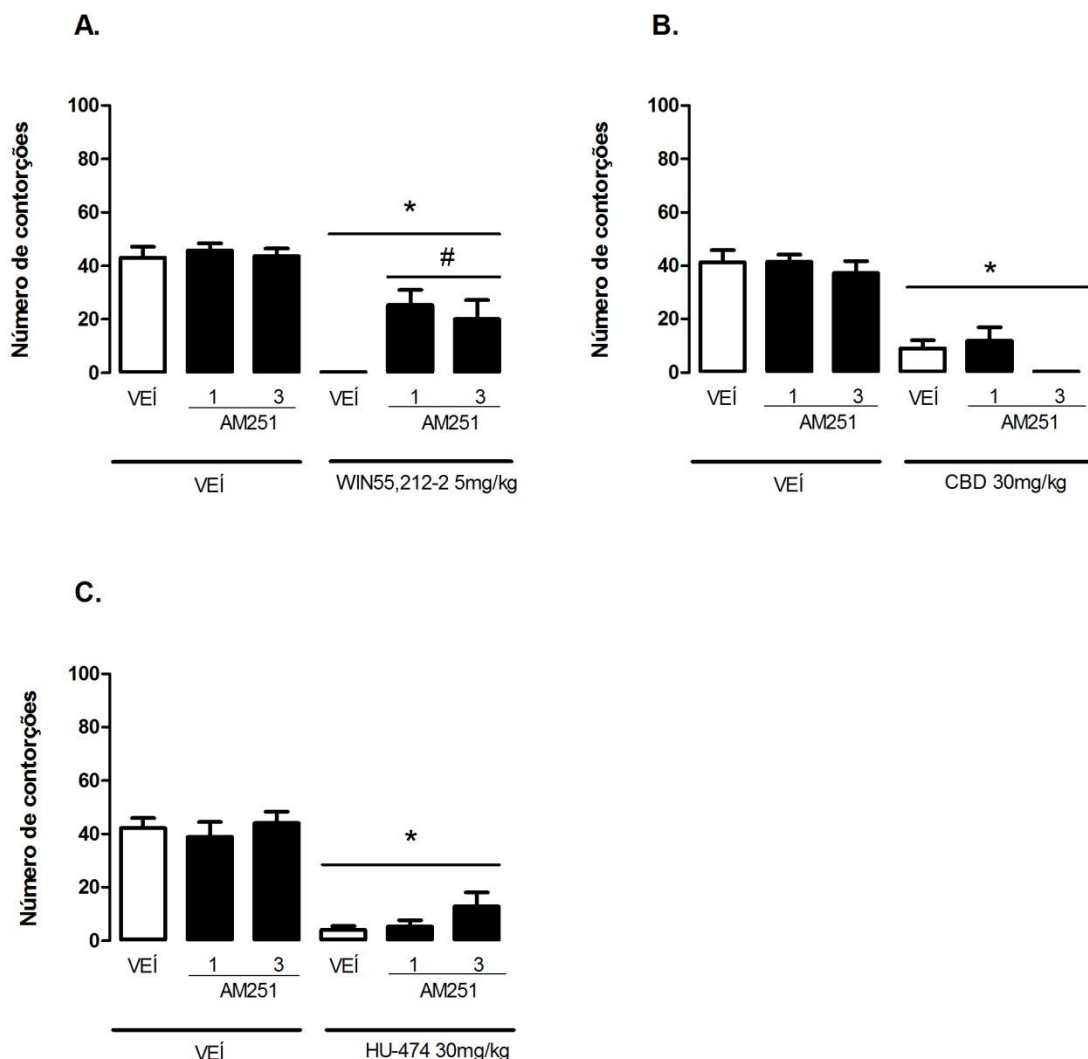


Figura 13: AM251 (1 e 3mg/kg) bloqueia o efeito antinociceptivo do WIN55,212-2, mas não do CBD e HU-474 no teste de contorção abdominal. **A.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (5mg/kg) 30 min antes do teste de contorção abdominal (n= 6-8/grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou CBD (30mg/kg) 30 min antes do teste de contorção abdominal (n= 5-7/grupo). **C.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (30mg/kg) 30 min antes do teste de contorção abdominal (n= 6-7/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ. # $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-WIN, pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de S-N-K.

4.12. Experimento 12: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 e 3mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético.

O pré-tratamento com AM630 (1 e 3mg/kg) não foi capaz de bloquear ou atenuar o efeito antinociceptivo dos três compostos testados. Houve apenas efeito da segunda injeção no teste com WIN55,212-2 ($F_{1,30} = 94,3$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias), CBD ($F_{1,30} = 52,7$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias) e HU-474 ($F_{1,25} = 32,2$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias, Figura 14).

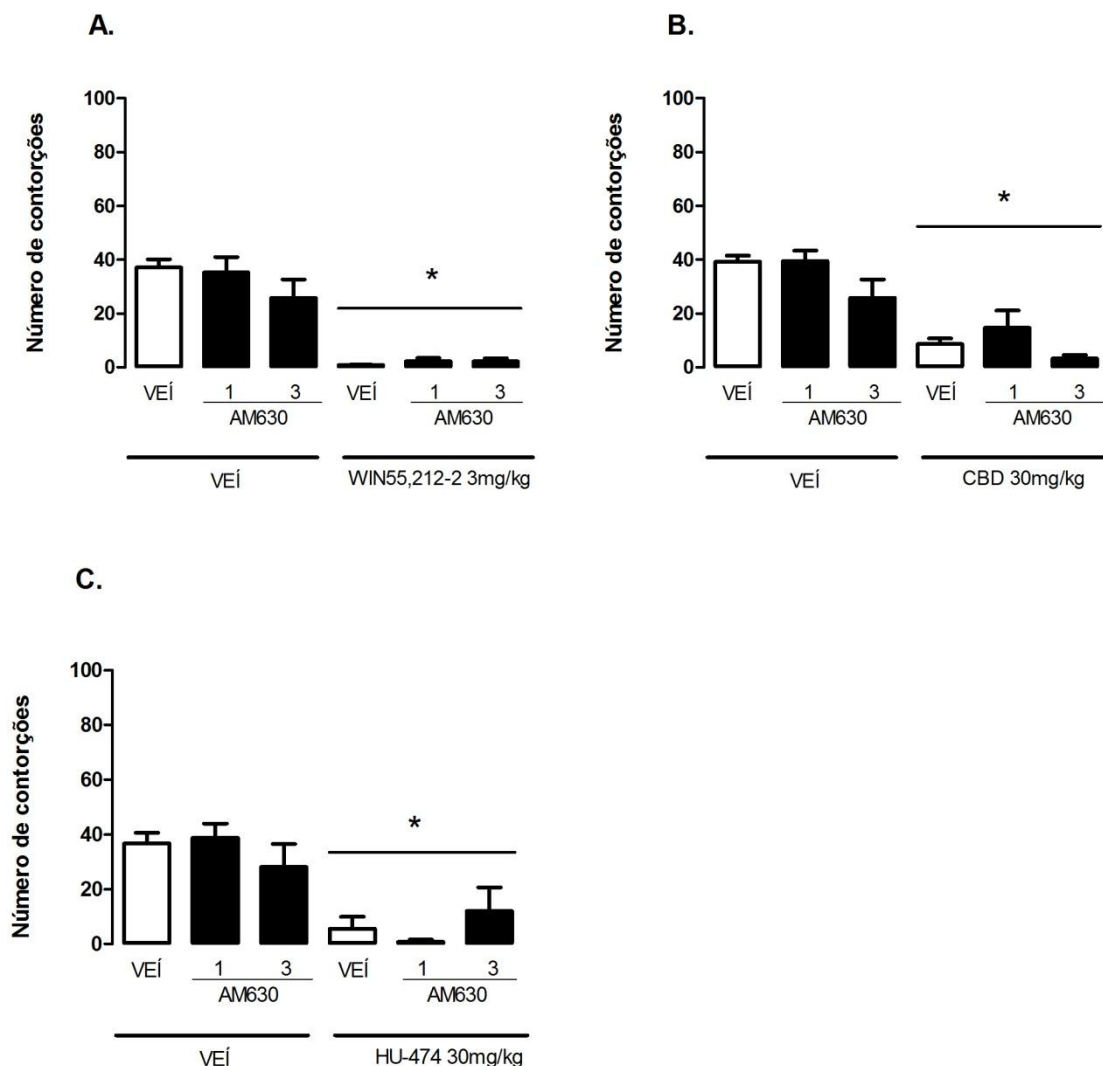


Figura 14: AM630 (1 e 3mg/kg) não bloqueia ou atenua o efeito antinociceptivo do WIN55,212-2, CBD e HU-474 no teste de contorção abdominal. **A.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (5mg/kg) 30 min antes do teste de contorção abdominal (n= 6/grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou CBD (30mg/kg) 30 min antes do teste de contorção abdominal (n= 6/grupo). **C.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (30mg/kg) 30 min antes do teste de contorção abdominal (n= 6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ, pelo teste ANOVA de uma via seguido de S-N-K.

4.13. Experimento 13: Efeito do tratamento com WIN55,212-2, CBD e HU-474 sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina - avaliada pelo método de von Frey eletrônico.

O tratamento com WIN55,212-2, na dose de 1mg/kg, reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina ($F_{3,27} = 4,8$; $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett). De mesmo modo, o CBD nas doses de 30 e 90mg/kg ($F_{3,24} = 26,5$; $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguido de Dunnett) e HU-474 nas doses de 3, 10 e 30mg/kg ($F_{3,24} = 17,2$; $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett) também apresentaram atividade antinociceptiva (Figura 15).

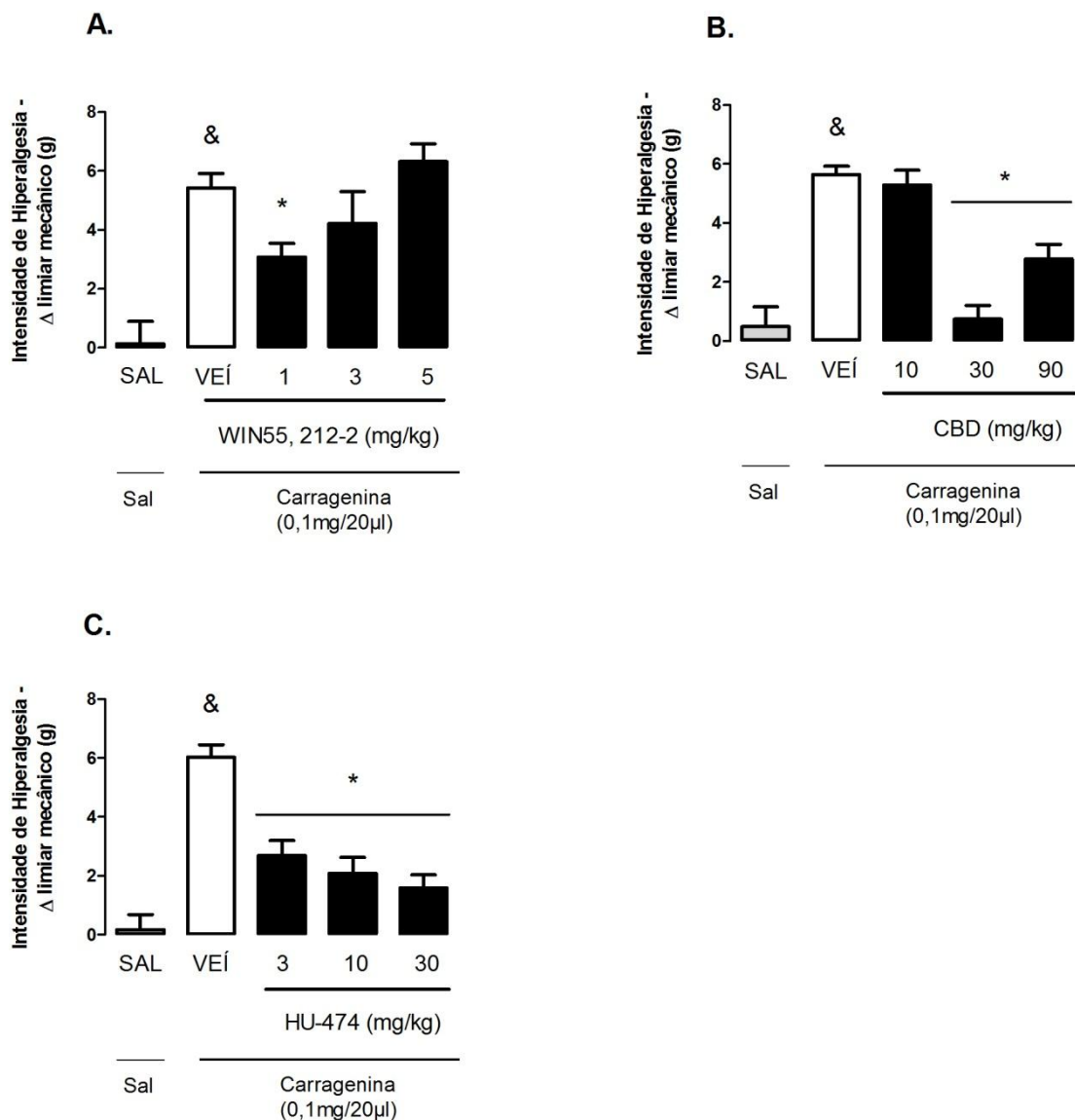


Figura 15: Efeito antinociceptivo do WIN55,212-2 (1 mg/kg), CBD (30 e 90mg/kg) e HU-474 (3, 10 e 30mg/kg) sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina. **A.** Camundongos receberam uma injeção (i.p) de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (1, 3 e 5mg/kg, n=6-10/grupo), ou **(B)** CBD (10, 30 e 90mg/kg, n=7/grupo); ou **(C)** HU-474 (3, 10 e 30mg/kg, n=7/grupo) 30 min antes da administração intraplantar de carragenina e 180 min após foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ, pelo teste ANOVA de uma via seguido de Dunnett. & $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (SAL, n=7), pelo teste *t student*.

4.14. Experimento 14: Efeito do pré-tratamento com AM251 (1 e 3mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina - avaliada pelo método de von Frey eletrônico.

Apesar de não haver efeito significativo da interação entre os tratamentos (Interação entre os tratamentos: $F_{2,29} = 1,8$; $p > 0,05$, ANOVA de duas vias), as doses de AM251 (1 e 3mg/kg) bloquearam o efeito do WIN55,212-2 (S-N-K, $p < 0,05$). Além disso, foi observado apenas o efeito da segunda injeção ($F_{1,29} = 20,0$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias). Já para o CBD e HU-474 houve interação entre os tratamentos e as duas doses de AM251 (1 e 3mg/kg) foram capazes de bloquear o efeito desses compostos (CBD; Interação entre os tratamentos: $F_{2,30} = 5,1$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$); (HU-474; Interação entre os tratamentos: $F_{2,30} = 5,2$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$, Figura 16).

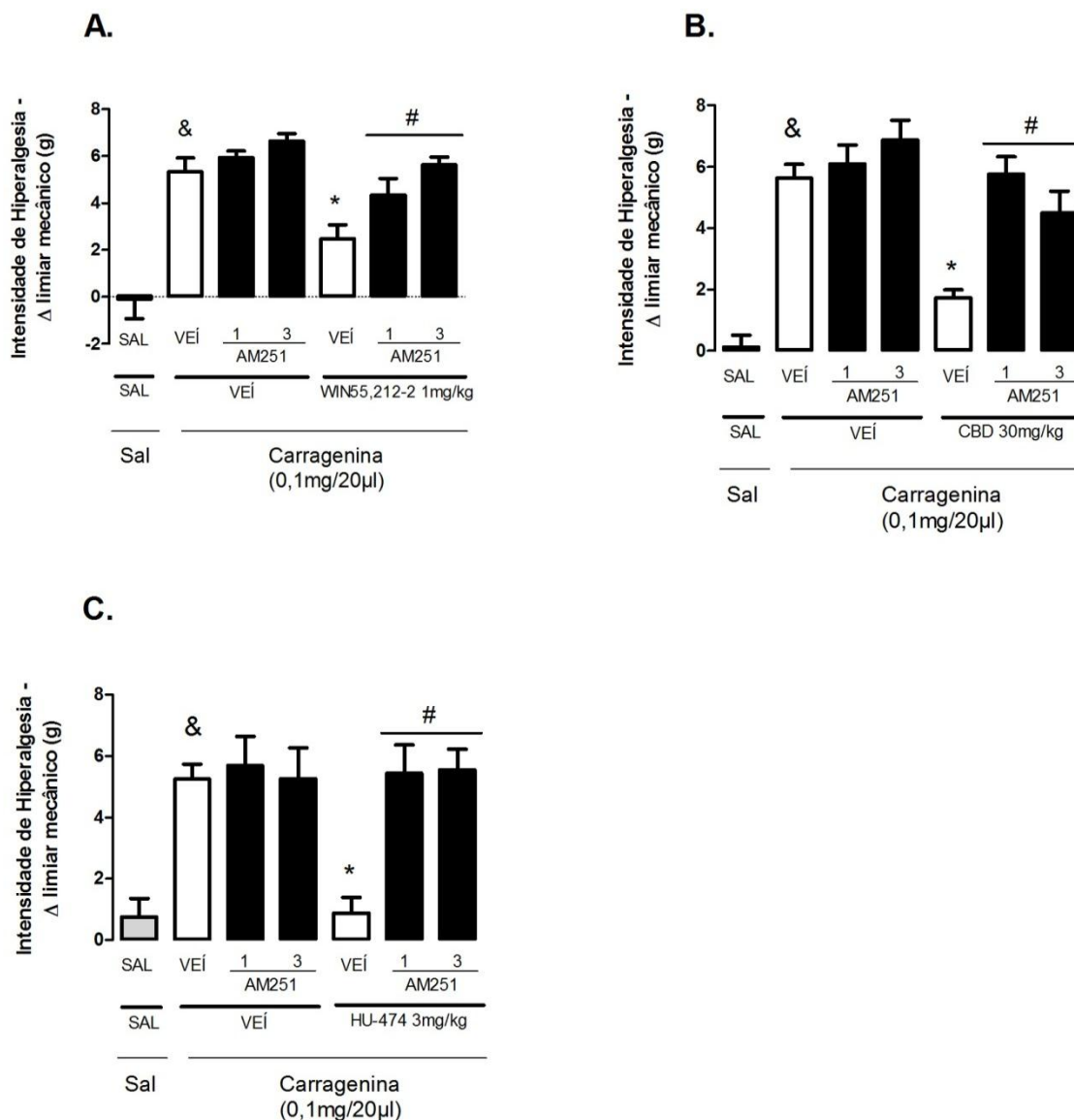


Figura 16: AM251 (1 e 3mg/kg) bloqueia o efeito antinociceptivo do WIN55,212-2, CBD e HU-474 após indução de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina. **A.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251(1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (1mg/kg) 30 min antes da administração intraplantar de carragenina e 180 min após foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico (n= 5-6/grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251(1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou CBD (30mg/kg) 30 min antes da administração intraplantar de carragenina e 180 min após foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico (n= 6/grupo). **C.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM251(1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (3mg/kg) 30 min antes da administração intraplantar de carragenina e 180 min após foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico (n= 6/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ, pelo teste ANOVA de uma via seguido de S-N-K. # $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-WIN55,212-2, VEÍ-CBD ou VEÍ-HU-474, pelo teste ANOVA de uma via seguido de S-N-K. & $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (SAL), pelo teste *t student*.

4.15. Experimento 15: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 e 3mg/kg) sobre as alterações produzidas pelo WIN55,212-2, CBD e HU-474 sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina - avaliada pelo método de von Frey eletrônico.

Apesar da ANOVA não mostra efeito significativo da interação entre os tratamentos (Interação entre tratamentos: $F_{2,29} = 2,5$; $p > 0,05$, ANOVA de duas vias), mas apenas da segunda injeção ($F_{1,29} = 10,1$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias), a dose de 3mg/kg de AM630 foi capaz de bloquear o efeito do WIN55,212-2 (S-N-K, $p < 0,05$). Já em relação ao CBD e HU-474 houve interação entre os tratamentos e ambas as doses do antagonista diminuíram seus efeitos (CBD; Interação entre tratamentos: $F_{2,28} = 7,7$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$); (HU-474; Interação entre tratamentos: $F_{2,30} = 10,0$; $p < 0,05$, ANOVA de duas vias; S-N-K, $p < 0,05$, Figura 17).

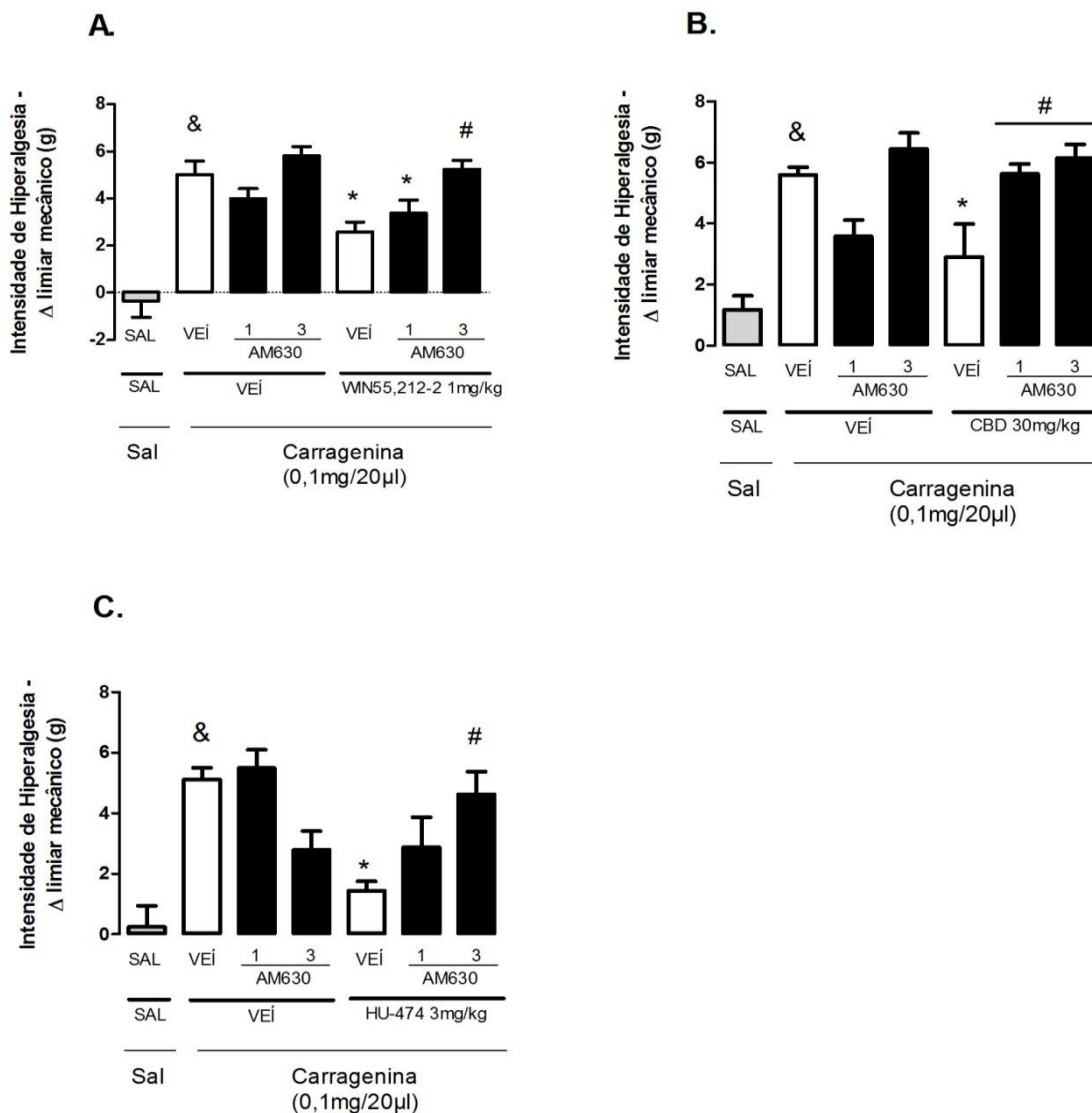


Figura 17: AM630 (3mg/kg) bloqueia o efeito antinociceptivo do WIN55,212-2, CBD e HU-474. Já na dose de 1mg/kg, o AM630 bloqueia o efeito do CBD e atenua o efeito do HU-474, após indução de hiperalgésia inflamatória induzida por carragenina. **A.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou WIN55,212-2 (1mg/kg) 30 min antes da administração intraplantar de carragenina e 180 min após foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico (n= 5-6/grupo). **B.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou CBD (30mg/kg) 30 min antes da administração intraplantar de carragenina e 180 min após foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico (n= 5-6/grupo). **C.** Camundongos receberam uma injeção de veículo (VEÍ) ou AM630 (1 ou 3mg/kg) 60 min antes do teste e uma segunda injeção de veículo (VEÍ) ou HU-474 (3mg/kg) 30 min antes da administração intraplantar de carragenina e 180 min após foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-VEÍ, pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste de S-N-K. # $p < 0,05$ em relação ao grupo VEÍ-WIN55,212-2, VEÍ-CBD ou VEÍ-HU-474, pelo teste ANOVA de uma via seguido de S-N-K. & $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (SAL), pelo teste *t student*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que o tratamento com CBD (30 e 60mg/kg), similar à fluoxetina (10mg/kg; utilizada como controle positivo), diminuiu o número de esferas enterradas, indicando um efeito tipo-anticompulsivo. Esses achados reproduzem os resultados de Cassaroto e colaboradores (2010). O mesmo efeito anticomulsivo foi observado com o uso do análogo fluorado do CBD, o HU-474 em uma dose três vezes menor.

O teste de enterrar esferas foi originalmente sugerido como um teste para avaliar drogas com propriedades ansiolíticas. No entanto, a constatação de que o uso de inibidores da recaptação de serotonina, tratamento de primeira escolha para pacientes com TOC, diminuía o número de esferas enterradas, levantou a possibilidade de que este comportamento poderia estar relacionado com esse transtorno (Broekkamp et al., 1986). Esta proposta foi sugerida porque, mesmo com a exposição repetida dos animais frente às esferas, não há uma habituação do comportamento, o que ocorre na maioria dos testes de ansiedade baseados no comportamento exploratório. Sendo que, não há uma avaliação da ansiedade induzida por novidade ou medo, mas sim um comportamento natural, repetitivo que pode tornar-se compulsivo (Gyertyán, 1995). Além disso, estudos mostram que os animais não evitam as esferas quando essa situação é possível, sugerindo que não envolva situações aversivas ou provocadoras de medo (Njung'e e Handley, 1991).

Sabe-se que drogas ansiolíticas, como os benzodiazepínicos não são eficazes no tratamento terapêutico para pacientes com TOC (Argyropoulos et al., 2000). De mesmo modo, estudos com animais, como o de Cassaroto e colaboradores (2010), demonstrou que o tratamento repetido com diazepam,

um benzodiazepínico efetivo em modelos animais de ansiedade, como no labirinto em cruz elevado (Hazim et al., 2014; Chatterjee et al., 2013), não mostrou efeito no teste de enterrar esferas (Casarotto et al., 2010) reforçando a ideia que este modelo seria para avaliação de compulsão e não de ansiedade, já que a tolerância aos efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos não são comuns no tratamento ao longo prazo da ansiedade generalizada (Argyropoulos et al., 2000). É importante destacar que apenas o fenômeno da compulsão é avaliado nesse, e em qualquer outro modelo animal para o estudo do TOC, já que os fenômenos de obsessões, definidas como pensamentos ou ideias recorrentes, intrusivas, persistentes e indesejadas que podem provocar ansiedade e angústia acentuada, não podem ser avaliados em modelos animais (Alonso et al., 2015).

Tanto o efeito do CBD quando do HU-474 foram bloqueados pelo pré-tratamento com AM251 e atenuado com o pré-tratamento com AM630. Apesar da baixa afinidade do CBD pelos receptores CB1 e CB2, ele é capaz de inibir a FAAH, enzima que hidrolisa a AEA, aumentando os níveis disponíveis dessa molécula e assim, facilitando indiretamente a neurotransmissão endocanabinóide (Bisogno et al., 2001; de Filippis et al., 2008). Devido à semelhança entre à estrutura química do CBD e HU-474, acredita-se que o mesmo mecanismo de ação esteja envolvido no efeito desses dois compostos.

Corroborando com a proposta de que o aumento dos níveis de endocanabinóides estaria envolvido com a diminuição do comportamento compulsivo, o uso do URB597, inibidor da FAAH e AM404, inibidor da recaptção de AEA, apresentaram efeito tipo-anticompulsivo no mesmo modelo, como descrito anteriormente (Gomes et al., 2011).

Embora a fisiopatologia do TOC não seja completamente compreendida, os efeitos terapêuticos dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina também sugerem o envolvimento de vias serotoninérgicas nesse transtorno. No entanto, dados pré-clínicos e clínicos mostraram que a atenuação da neurotransmissão mediada por glutamato poderia ser útil no tratamento de pacientes com TOC indicando que, além de serotonina, alterações glutamatérgicas também poderiam estar envolvidas na fisiopatologia desse transtorno (Pittenger et al., 2006; Ting e Feng, 2008). De fato, vários estudos com humanos e animais mostram o envolvimento desse neurotransmissor nesse transtorno. Por exemplo, um trabalho utilizando imagem cerebral de pacientes com TOC demonstrou uma disfunção da neurotransmissão glutamatérgica no circuito CETC, além do aumento dos níveis de glutamato no líquido cérebro-espinhal em comparação com indivíduos saudáveis (Chakrabarty et al., 2005). Em outro estudo com humanos, o riluzole, droga que atua reduzindo a neurotransmissão glutamatérgica, através da inibição de canais de sódio voltagem dependente e da inibição de canais de cálcio, inibindo assim, a liberação sináptica de glutamato e estimulação da captação deste por astrócitos, foi efetivo em diminuir os sintomas de pacientes adultos e pediátricos com TOC (Wang et al., 2004). Já o trabalho de Egashira e colaboradores (2008) mostrou que a administração aguda dos antagonistas dos receptores NMDA, MK801, memantina e amantadina foram capazes de diminuir o comportamento anticomulsivo em camundongos no teste de enterrar esferas, sem causar alteração locomotora (Egashira et al., 2008).

O glutamato é o principal neurotransmissor no circuito CETC (Carlsson, 2000; Pittenger et al., 2006). Nesse circuito, além do glutamato, a dopamina e o

GABA são neurotransmissores responsáveis pelo equilíbrio do tônus neural. Esse circuito possui vias antagônicas que em conjunto geram um balanço apropriado do controle do movimento e do pensamento. No TOC sugere-se que a hiperatividade da via direta ou hipoatividade da via indireta levaria a desinibição desses circuitos, resultando em comportamentos tipo compulsivos e alterações cognitivas (obsessões). Assim, o desbalanço de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório da via direta, poderia levar ao desenvolvimento de sintomas relacionados ao TOC (Wu et al., 2012). Nesse sentido, é possível que substâncias que aumentam a sinalização canabinóide como CBD e possivelmente o HU-474 possam interferir nos testes realizados para estudo do TOC, como o teste de enterrar esferas, via facilitação de receptores CB1, levando a uma diminuição da liberação de glutamato nas vias neurais envolvidos no TOC (Casarotto et al., 2010).

Além da principal localização dos receptores CB2 descritos brevemente na introdução, existem evidências que esse receptor pode estar distribuído em neurônios do SNC e não apenas em células microgliais e astrócitos. No estudo de Gong e colaboradores (2006) com ratos, foi caracterizado que receptores CB2 podem compartilhar a mesma localização em estruturas cerebrais com receptores CB1, mesmos havendo possíveis diferenças nos padrões de distribuição nos elementos neuronais. Dentre essas regiões destacam-se aquelas envolvidas com o circuito CETC, como córtex cerebral, estriado, núcleos talâmicos e substância nigra. Nosso trabalho mostrou que o antagonista dos receptores CB2, AM630, atenuou o efeito do CBD e HU-474. Estudos envolvendo receptores CB2 e TOC são escassos, porém, já foi demonstrado que o β -carofileno, agonista seletivo dos receptores CB2 foi

efetivo no teste de enterrar esferas, efeito antagonizado pelo AM630 (Bahi et al., 2014).

Como descrito anteriormente, os efeitos do CBD e HU-474 no teste de enterrar esferas parece envolver os receptores CB1 e CB2. Sabe-se que a administração de agonistas dos receptores CB1, como o THC, induz quatro comportamentos típicos denominados de téttrade canabinóide (El-Alfya et al., 2010). Dentre esses efeitos estão a hipotermia, catalepsia, hipolocomoção e antinocicepção (Wileya et al., 2014). No entanto, apesar do possível envolvimento dos receptores CB1 nos efeitos do CBD e HU-474, apenas os animais tratados com o WIN55,212-2, apresentaram os efeitos típicos da téttrade como já descrito por outros trabalhos como o de Wileya e colaboradores (2014). Vale ressaltar que além das doses efetivas no teste de enterrar esferas, uma dose três vezes maior de CBD e HU-474 foi testada na téttrade para garantir que esses efeitos não surgiriam com doses mais elevadas. Como já relatado em estudos anteriores, o CBD não induz a téttrade canabinóide (El-Alfya et al., 2010), sendo uma característica positiva deste composto, bem como do HU-474, já que os efeitos tipo THC observados nos animais, poderiam representar efeitos adversos indesejados na clínica o que inviabilizaria o uso destes compostos. Esses resultados suportam as evidências que os efeitos do HU-474 e CBD não sejam pela ativação direta dos receptores CB1. Desse modo, drogas que exerçam seus efeitos através do aumento do tônus endógeno dos canabinóides, através da inibição da recaptção ou da metabolização da AEA ou 2-AG, como inibidores da FAAH, são promissores para a terapia farmacológica, devido aos baixos efeitos adversos (Elmas and Ulugol, 2013).

Os canabinóides de forma geral, também são promissoras drogas analgésicas, e está bem estabelecido na literatura a sua capacidade de inibir a nocicepção aguda e crônica. Apesar de não apresentar os quatro efeitos típicos da téttrade, o HU-474 (30mg/kg) mostrou-se efetivo no teste na placa quente, utilizado para avaliar antinocicepção térmica. O mesmo efeito foi observado com a administração de WIN-55,212-2 (5mg/kg), como já mostrado por Luszczki e Florek-Luszczki (2011). Ao contrário desses compostos, o CBD não se mostrou efetivo nesse modelo, assim como mostrado no estudo de Neelakantan e colaboradores (2015). Tanto o efeito do WIN55.212-2, quanto do HU-474 foram revertidos pela prévia administração de AM251. Em um trabalho utilizando o canabinóide sintético HU-210, um agonista dos receptores CB1, mostrou que este composto possui efeito antinociceptivo no teste da placa quente. Sendo que, esses efeitos também foram revertidos pela prévia administração do antagonista CB1, SR141716A (Ruggieri et al., 2010).

Regiões superiores do SNC são responsáveis pelo processamento e controle da dor, e dentre estas regiões a PAG, através de ligações com RVM contribui para o controle da transmissão da dor para o corno dorsal da medula espinal. Sabe-se que os receptores CB1 estão amplamente localizados nessas áreas. Dessa forma, o aumento dos níveis de endocanabinóides poderia estar envolvido neste processo, através da ativação dos receptores CB1, levando a modulação do disparo neuronal na via descendente da dor para a medula espinal, proporcionando um efeito antinociceptivo central desses compostos (Akerman et al., 2013).

Já o pré-tratamento com AM630 foi capaz de atenuar o efeito do WIN55,212-2 e bloquear o efeito do HU-474 no teste da placa quente. Diversos

outros trabalhos com animais evidenciam a participação dos receptores CB2 no modelo da placa quente. A administração (i.p) do agonista seletivo dos receptores CB2, GW405833, mostrou efeito antinociceptivo em diversos modelos de nocicepção, entre eles o da placa quente e o “tail flick” (Valenzano et al., 2005). Outro trabalho também usando agonista dos receptores CB2, o AM1241, mostrou que tanto a injeção sistêmica (i.p), quanto localizada na pata do animal, resulta em efeitos antinociceptivos no modelo da placa quente. Sendo que tanto os efeitos da injeção sistêmica quanto local, foram revertidas com o pré-tratamento (local) com AM630, sugerindo um efeito periférico dessa droga (Malan et al., 2001). Apesar de no presente trabalho não termos avaliado os possíveis efeitos locais, após a injeção de CBD e HU-474 nas patas dos animais, uma das hipóteses para os possíveis mecanismo de ação desses compostos seria uma ação periférica desses compostos via receptores CB2, por meio do aumento dos níveis de endocanabinóide. Dessa forma, AEA ativaria receptores CB2 nas terminações nervosas periféricas, diminuindo assim a sensibilidade dos neurônios aferentes primários que medeiam à resposta para via ascendente da dor (Malan et al., 2001).

O modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético caracteriza-se por um modelo de dor aguda típico para o estudo de novas drogas analgésicas. Os três compostos WIN55,212-2, CBD e HU-474 apresentaram efeito antinociceptivo e diminuíram o número de contorções abdominais. Indo ao encontro dos dados de Naidu e colaboradores (2009), onde o WIN55,212-2 também teve efeito antinociceptivo nesse mesmo modelo. No entanto, em relação ao CBD, dados contrários aos observados no presente trabalho são observados na literatura. O CBD, nas doses de 10-40mg/kg não

foi efetivo no mesmo modelo de nocicepção química no estudo realizado por Neelakantan e colaboradores (2015). Mesmo resultado foi observado por Booker e colaboradores (2009) nas doses de 20 e 50mg/kg e por Sanders e colaboradores (1979) na dose de 200mg/kg, onde o CBD não apresentou efeito antinociceptivo no modelo de contorção abdominal.

A dor visceral é uma das principais causas de visita de pacientes a gastroenterologistas e o principal sintoma de distúrbio intestinal funcional (Naidu et al., 2009). No que diz respeito a esse tipo de dor, as informações relacionadas com os efeitos dos canabinóides ainda são limitadas e um tanto controversas. Por exemplo, o sistema endocanabinóide tem sido envolvido em ambos os efeitos proalgésico (Dinis et al., 2004) e analgésicos (Farquhar-Smith et al., 2002) no trato urinário. Esse tipo de dor é resultado da ativação de nociceptores localizados no tórax, pelve ou vísceras abdominais, que são sensíveis à distensão, isquemia e inflamação (Camilleri, 2001).

No modelo de nocicepção química induzida por ácido acético, ocorre danos nos tecidos e liberação de substâncias que induzem nocicepção, incluindo prostaglandinas e liberação de uma cascata de fatores pró-inflamatórios, como citocinas nociceptivas, fator de necrose tumoral α , interleucina-1 (IL-1) e IL-8 que ativam nociceptores periféricos nos terminais nas fibras nervosas sensoriais. Estes estímulos dolorosos causados pelo ácido acético podem ativar regiões supraespinais por uma série de vias nervosas vindas da medula espinal (Thomazzi et al., 1997; Ribeiro et al., 2000; Ulugol et al., 2006). Portanto, pode-se sugerir que os efeitos nociceptivos dos canabinóides neste modelo poderiam envolver uma ação anti-inflamatória. De fato, existem estudos mostrando efeitos anti-inflamatórios do CBD e seus

derivados como HU-308 e HU-433 administrados isoladamente (Ruhaak et al., 2011; Smouma et al., 2015). Já a co-administração de cetorolac um anti-inflamatório não esteroide e o WIN55,212-2, provocou efeitos analgésicos aditivos no modelo de contorção abdominal (Ulugol et al., 2006). Dessa forma é possível que os efeitos antinociceptivos do CBD, bem como do HU-474, neste modelo poderiam decorrer de uma ação nos sistemas relacionados com a dor propriamente dita, bem como por diminuição da resposta inflamatória.

No que diz respeito ao envolvimento dos receptores CB1 e CB2 nesses efeitos observados no modelo de nocicepção química, o antagonista AM251 foi capaz de atenuar apenas o efeito do WIN55,212-2. Já o pré-tratamento com AM630, não foi capaz de bloquear e/ou atenuar o efeito de nenhum dos compostos testados. Esses dados são controversos quando comparados aos resultados já descritos na literatura, no qual estudos mostram que o inibidor da enzima FAAH, URB597, induz efeitos antinociceptivos nesse modelo, sendo a inibição dessa enzima um possível mecanismo proposto para os efeitos do CBD e HU-474. Porém, os efeitos do URB597 foram mediados pelos receptores CB1, o que não foi observado para o CBD e o HU-474 (Naidu et al., 2009; Clapper et al., 2010).

Diante dos resultados anteriormente discutidos no modelo de nocicepção térmica, mostrando o efeito central do WIN55,212-2, bem como do HU-474 na placa quente, era de se esperar que o antagonista dos receptores CB1, pelo menos em parte atenuaria o efeito desses compostos, já que no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético, parte do processamento da nocicepção se dá por ação central, e este pode ser mediado por receptores canabinóides (Ruggieri et al., 2010; Malan et al., 2001; Ulugol et

al., 2006). Em outro trabalho, Smith e colaboradores (2000) observaram que animais desafiados com lipopolissacarídeo (LPS), tiveram uma diminuição sérica de TNF- α , após o tratamento com os agonistas canabinóides WIN55212-2 e HU-210. Sendo que este efeito foi antagonizado pelo SR141716A (antagonista CB1), mas não por SR144528 (antagonista CB2), também indicando um possível papel do receptor CB1 na modulação de citocinas (Smith; Terminelli; Denhardt, 2000). Além disso, sabe-se que receptores CB2 estão amplamente localizados nas células do sistema imune, sendo responsáveis tanto no SNC como em outras estruturas, pela modulação na liberação de citocinas e pela migração de células do sistema imune, que são descritas por participarem da ativação de nociceptores periféricos nesse modelo. Trabalhos recentes indicam ainda que os receptores CB2 desempenham um papel importante em alguns processos chave (ex. proliferação de células da microglia e migração em locais de lesões neuroinflamatórias) envolvidos nas fases iniciais da ativação de micróglia em resposta a infecção, inflamação ou dano tecidual (Ikeda et al., 2013). Assim, esperava-se que o pré-tratamento com os antagonistas dos receptores CB1 e CB2 no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético pelo menos em parte atenuasse o efeito desses compostos.

Diante do envolvimento do sistema endocanabinóide com diversos outros sistemas e a diversidade de possíveis mecanismos de ação para canabinóides como o CBD, outros alvos devem ser testados a fim de demonstrar o mecanismo de ação dessas substâncias no teste de contorção abdominal. Nesse sentido, acredita-se que os componentes do sistema endocanabinóide possam interagir com outros sistemas importantes da dor.

Um estudo mostrou que a administração concomitante de AEA e inibidores da COX produziu efeitos antinociceptivos sinérgicos no teste de formalina em ratos (Guindon e Beaulieu, 2006). Além disso, o Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1 (TRPV1) que é um canal permeável a cátions, amplamente encontrado em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro (Di Marzo et al., 2002) pode ser uma alternativa por estar envolvido na modulação da dor em alguns modelos. Estudos sugerem que algumas funções mediadas pelos receptores TRPV1 opõem-se àquelas reguladas pelo CB1, como na dor periférica, principalmente em se tratando da hiperalgesia inflamatória (Caterina et al., 2000), onde a supressão e o aumento de nocicepção térmica podem ser prevenidos por meio de antagonistas CB1 e TRPV1, respectivamente (Maione et al., 2006). Sabe-se ainda que a AEA, ativa ambos receptores, sendo os efeitos mediados pelo TRPV1 observados em altas doses desse endocanabinóide (Guindon e Beaulieu, 2006).

Além de avaliar o efeito do HU-474 sobre a nocicepção induzida por substância química, foi utilizado o modelo de hiperalgesia inflamatória aguda induzida por carragenina. No presente trabalho, observamos que tanto o WIN55,212-2 (1mg/kg), CBD (30 e 90mg/kg) e HU-474 (3, 10 e 30mg/kg) tiveram efeito antinociceptivo. Destaca-se ainda que o HU-474, comparada ao CBD, foi efetivo em uma dose 10 vezes menor. Os efeitos dos três compostos foram bloqueados tanto pelo antagonista dos receptores CB1 quando pelo antagonista de receptores CB2. De fato, no estudo de Nackley e colaboradores (2003), animais que receberam injeções locais de WIN55,212-2, assim como de carragenina, mostraram uma menor frequência de retirada da pata, ao avaliar a hiperalgesia mecânica pelo método de filamentos de von Frey. Estes

efeitos também foram bloqueados pelos antagonistas de receptores CB1, SR141716A e CB2, SR144528. Em outros modelos de dor, como na hiperalgesia induzida pelo antitumoral paclitaxel, também foi possível observar o efeito analgésico do CBD. Dados mostraram que a administração (i.p) crônica de CBD nas doses de 5 e 10mg/kg em camundongos, apresentou efeito antinociceptivos e preveniu a alodinia mecânica induzida por paclitaxel, avaliada pelo método de von Frey filamento (Waer et al., 2011).

No entanto, esses resultados ainda permanecem controversos em relação aos nossos achados e aos já descritos na literatura. Por exemplo, em um estudo usando o método de calor radiante para avaliar o efeito antinociceptivo do CBD, após a administração de carragenina (na pata), esse canabinóide foi capaz de diminuir a hiperalgesia ao estímulo térmico, mas nem o antagonista CB1, SR141716, nem o CB2, SR144528, reverteram esse efeito. Nesse trabalho, apenas o antagonista dos receptores TRPV1, capsazepina, foi eficaz na reversão dos efeitos antinociceptivos do CBD (Costa et al., 2004a).

A inflamação induzida por carragenina ocorre devido a vários mediadores como a histamina, bradicinina, prostaglandinas e outros produtos da COX (DI Rosa e Willoughby, 2004) que atuam em paralelo para produzir esta resposta inflamatória. Mediadores inflamatórios, como citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF α) e espécies reativas de oxigênio (ERO) sensibilizam e/o ativam neurônios nociceptivos locais aumentando a nocicepção nessa região. Nas fases iniciais da inflamação aguda, estes mediadores são produzidos pelas células residentes (macrófagos e mastócitos) e por neutrófilos recrutados. Por exemplo, o TNF- α provoca a liberação de IL-1 β e IL-6, que, por sua vez,

conduz à produção de PGE₂ por ciclooxigenase (COX-2) durante a resposta inflamatória induzida pela carragenina (Pinho-Ribeiro et al., 2015).

Diversos estudos mostram a eficácia anti-inflamatória do CBD em diminuir níveis de citocinas em diferentes modelos animais para estudo de drogas com efeitos anti-inflamatórios (Ribeiro et al., 2012; Vuolo et al., 2015). Além disso, o CBD reduz a ativação da cascata mediada pela COX, que é induzida pela inflamação causada pela carragenina. Essa droga diminuiu, de forma dose-dependente, os níveis de PGE₂ no plasma e da atividade da COX nos tecidos da pata inflamada (Costa et al., 2004b). Vale ressaltar que os endocanabinóides não são metabolizados apenas pelas principais enzimas FAAH e MGL. AEA e principalmente 2-AG podem sofrer metabolismo das enzimas ciclooxigenas-2 (COX-2) e 5- lipoxigenase (LOX). Os níveis dessas enzimas encontram-se alterados nos estados de dor e inflamação, que poderiam causar um impacto importante sobre os níveis dessas substâncias nessas condições (Fowler et al., 2007; Kozak et al., 2002). Além disso, outros estudos mostram a eficácia anti-inflamatória do CBD em diminuir níveis de citocinas em diferentes modelos animais para estudo de drogas com efeitos anti-inflamatórios (Ribeiro et al., 2012; Vuolo et al., 2015).

Assim, como já discutido no modelo da placa quente e da contorção abdominal os efeitos observados pelo CBD e HU-474, podem ser mediados tanto por uma diminuição do processo inflamatório, pela ação em outras vias (ex. COX), quanto por efeitos locais ou supraespinais, tendo a participação dos receptores CB1 e CB2, bem como de outros receptores relacionados aos efeitos dos endocanabinóides que podem atuar na nocicepção, como o TRPV1.

No conjunto, nossos resultados sugerem que os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do CBD podem ser similares aos do HU-474, sendo necessários mais estudos para verificar os diversos outros possíveis mecanismos de ação desses canabinóides. Além disso, parece que a adição do átomo de flúor na molécula do CBD, com intenção de aumentar sua biodisponibilidade e melhorar os seus parâmetros farmacológicos, parece ter sido capaz de aumentar sua potência, visto que o HU-474 foi efetivo em uma dose três vezes menor no teste de enterrar esferas, bem como em uma dose dez vezes menor no modelo de hiperalgia inflamatória aguda induzida por carragenina. Além disso, esse análogo fluorado do CBD foi efetivo na mesma dose no modelo de hiperalgia induzida por ácido acético, além de ser efetivo no teste de nocicepção térmica da placa quente, o que não foi observado para o CBD.

Vale ressaltar que até os anos 1970 compostos fluorados eram raros na química medicinal. Porém, isso mudou consideravelmente ao longo dos últimos 20 anos, e compostos fluorados são hoje rotineiramente sintetizadas na pesquisa e no desenvolvimento de novos fármacos. De acordo com a “World Drug Index” (WDI), existem 128 compostos fluorados com nomes comerciais nos EUA, sendo que dos 31 novos compostos químicos aprovados em 2002, 9 contêm flúor (Bohm et al., 2004; Park et al., 2001). Fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos podem explicar os efeitos positivos da adição do flúor à molécula do CBD. Dentre os possíveis efeitos causados por essa adição está o aumento da estabilidade metabólica, que é um dos fatores determinantes na biodisponibilidade de um composto, visto que essa é limitada pelo rápido metabolismo oxidativo das enzimas do citocromo P450. O flúor pode ainda

alterar o carácter básico de um composto, atenuando uma característica que dificulta a permeabilidade do composto nas membranas celulares. Por fim, o flúor pode aumentar a afinidade do composto pelos seus sítios de ligações (Park et al., 2001). Estudos adicionais são necessários para tentar elucidar os possíveis mecanismos pelos quais ocorrem os efeitos descritos no presente trabalho.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que a modificação química realizada na molécula do CBD resultou em um composto, HU-474, com melhores propriedades farmacológicas. Esse análogo fluorado induziu efeitos tipo-anticompulsivos semelhante ao CBD, mas em doses mais baixas. Enquanto o CBD induziu efeito antinociceptivo apenas no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e na hiperalgesia inflamatória causada pela carragenina, o HU-474 apresentou propriedades antinociceptivas em todos os testes avaliados em doses semelhantes ou menores que o CBD. Nossos resultados sugerem ainda que apenas no teste da contorção abdominal, os efeitos desses compostos não são mediados por receptores endocanabinóides. Além disso, a adição do flúor não favoreceu o aparecimento da tétrede canabinóide, indicando que, semelhante ao CBD, o HU-474 não atua como agonista de receptores CB1. Desse modo, este novo composto poderia ser uma alternativa terapêutica para situações clínicas nas quais o CBD seja útil, como no tratamento da dor e no transtorno obsessivo-compulsivo.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABUDY, A.; JUVEN-WETZLER, A.; ZOHAR, J. Pharmacological management of treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. **CNS Drugs**, v. 25, n. 7, p. 585–96, 2011.

AGURELL, S. et al. Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabinol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinol and cannabidiol by mass fragmentography. **Experientia**, v. 37, p. 1090–1092, 1981.

AKERMAN, S. et al. Endocannabinoids in the brainstem modulate dural trigeminovascular nociceptive traffic via CB1 and “triptan” receptors: implications in migraine. **J neurosci**, v. 33, n. 37, p. 14869–77, 2013.

ALBELDA, N.; JOEL, D. Animal models of obsessive-compulsive disorder: exploring pharmacology and neural substrates. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 1, p. 47–63, 2011.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1-2, p. 40–56, 2004.

ALONSO, P.; LÓPEZ-SOLÀ, C.; MENCHÓN, J. M. Animal models of obsessive-compulsive disorder: utility and limitations Cinto Segalàs. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 11, p. 1939–1955, 2015.

American Psychiatric Association, DSM-5 Task Force. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5**. Washington DC; London, England, 2013. Seção12. p. 235-264.

ARGYROPOULOS, S. V.; SANDFORD, J. J.; NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacol Ther**, v. 88, n. 3, p. 213-27, 2000.

ATAKAN, Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. **Ther Adv Psychopharmacol**, v. 2, n. 6, p. 241-254, 2012.

BAHI, A. et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology and Behavior**, v. 135, p. 119–124, 2014.

BEAULIEU, P. et al. Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 396, n. 2-3, p. 85–92, 2000.

BISOGNO, T. et al. 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**, v. 134, n. 4, p. 845-852, 2001.

BISOGNO, T. et al. Development of a potent inhibitor of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis with antinociceptive activity in vivo. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, p. 53-60, 2009.

BÖHM, H.-J. et al. Fluorine in Medicinal Chemistry. **ChemBioChem**, v. 5, p. 637–643, 2004.

BOOKER, L. et al. Evaluation of prevalent phytocannabinoids in the acetic acid model of visceral nociception. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 105, p. 42-7, 2009.

BROEKKAMP, C. L. et al. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 126, n. 3, p. 223-9, 1986.

CAMILLERI, M. et al. Management of the irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 120, n. 3, p. 652-68, 2001.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1517-21, 2009.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1607, p. 3364–3378, 2012.

CARLSSON, M. L. On the role of cortical glutamate in obsessive-compulsive disorder and attention-deficit hyperactivity disorder, two phenomenologically antithetical conditions. **Acta Psychiatr Scand**, v. 102, n. 6, p. 401-13, 2000.

CASAROTTO, P. C. et al. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. **Behav Pharmacol**, v. 21, p. 353-358, 2010.

CASAROTTO, P. C.; GOMES, F.V.; GUIMARÃES, F. S. Cannabinoids and obsessive-compulsive disorder. In: FATTORE, L. **Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease**. London: Elsevier, 2015. Cap.15, p. 365-387.

CATERINA, M.J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**. v. 288, p. 306-13, 2000.

CHAKRABARTY, K. et al. Glutamatergic dysfunction in OCD. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 9, p. 1735-1740, 2005.

CHATTERJEE, M. et al. Anxiolytic effects of *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poiret) L. flower extracts in the elevated plus-maze model of anxiety in mice. **Asian J Psychiatr**, v. 6, n. 2, p. 113–8, 2013.

CHEVALEYRE, V.; TAKAHASHI, K. A.; CASTILLO, P. E. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 37-76, 2006.

CLAPPER, J. R. et al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1265–70, 2010.

COLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COSTA, B. C. et al. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 556, p. 75-83, 2007.

COSTA, B. et al. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 143, p. 247-50, 2004a.

COSTA, B. et al. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. v. 369, p. 294-99, 2004b.

CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 401-07, 2004.

DE FILIPPIS, D. et al. Effect of cannabidiol on sepsis-induced motility disturbances in mice: involvement of CB1 receptors and fatty acid amide hydrolase. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, n. 8, p. 919-927, 2008.

DENG, L. et al. The maintenance of cisplatin- and paclitaxel-induced mechanical and cold allodynia is suppressed by cannabinoid CB2 receptor activation and independent of CXCR4 signaling in models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 8, n. 71, p. 1-12, 2012.

DESROCHES, J. et al. Modulation of the anti-nociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 6, p. 913–924, 2008.

DI MARZO, V.; BLUMBERG, P. M.; SZALLASI, A. Endovanilloid signaling in pain. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, n. 4, p. 372-9, 2002.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 23, n. 4, p. 297-8, 2004.

DINH, T. P. et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. **PNAS**, v. 99, n. 16, p. 10819-24, 2002.

DINIS, P. et al. Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. **J Neurosci**, v. 24, n. 50, p. 11253-63, 2004.

EGASHIRA, K. et al. Effects of glutamate-related drugs on marble-burying behavior in mice: Implications for obsessive–compulsive disorder. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, p. 164-170, 2008.

EGERTOVÁ, M. et al. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. **Proc Biol Sci**, v. 265, p. 2081-5, 1998.

EL-ALFYA, A. T. et al. Antidepressant-like effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 95, n. 4, p. 434-442, 2010.

ELMAS, P.; ULUGOL, A. Involvement of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive effect of dipyrone. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, p. 1533–1538, 2013.

FARQUHAR-SMITH, W. P.; JAGGAR, S. I.; RICE, A. S. Attenuation of nerve growth factor-induced visceral hyperalgesia via cannabinoid CB(1) and CB(2)-like receptors. **Pain**, v. 97, p. 11-21, 2002.

FEIN, A. **Nociceptors and the perception of pain**. Farmington. 2012. p. 1-145.

FELIÚ, A. et al. A Sativex®-like combination of phytocannabinoids as a disease-modifying therapy in a viral model of multiple sclerosis. **Br J Pharmacol**, v. 172, p. 3579-95, 2015.

FICHNA, J. et al. Endocannabinoid and cannabinoid-like fatty acid amide levels correlate with pain-related symptoms in patients with IBS-D and IBS-C: a pilot study. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. 1-8, 2013.

FINEBERG, N. A.; REGHUNANDANAN, S.; BROWN, A.; PAMPALONI, I. Pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder: evidence-based treatment and beyond. **Aust. N. Z. J. Psychiatry**, v. 47, n. 2, p. 121–141, 2013.

FONSECA, M. D. et al. NOSH-aspirin (NBS-1120), a dual nitric oxide and hydrogen sulfide-releasing hybrid, reduces inflammatory pain. **Pharmacol Res Perspect**, v. 3, p. 1-12, 2015.

FOWLER, C. J. The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. **Br. J. Pharmacol**, v. 152, n. 5, p. 594-601, 2007.

GOBIRA, P. H. et al. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **NeuroToxicology**, v. 50, p. 116–121, 2015.

GOMES, F. V.; CASAROTTO, P. C.; RESSTEL, L. B. M.; GUIMARÃES, F. S. Facilitation of CB1 receptor-mediated neurotransmission decreases marble burying behavior in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, p. 434-38, 2011.

GOMES, F. V.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol attenuates catalepsy induced by distinct pharmacological mechanisms via 5-HT_{1A} receptor activation in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 43–47, 2013.

GONG, J.-P. et al. Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain research**, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.

GOODMAN, W. K.; GRICE, D. E.; LAPIDUS, K. A. B.; COFFEY, B. J. Obsessive-Compulsive Disorder. **The Psychiatric Clinics North America**, v. 37, n. 3, p. 257-267, 2014.

GUINDON, J. et al. Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: a role for endogenous fatty-acid ethanolamides? **Eur J Pharmacol**, v. 550, p. 68–770, 2006.

GUINDON, J.; BEAULIEU, P. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 7, p. 814–23, 2006.

GUINDON, J.; DESROCHES, J.; BEAULIEU, P. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB₂ receptors. **Br. J. Pharmacol**, v. 150, n. 6, p. 693–701, 2007.

Guyton, A. C. & Hall, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

GYERTYÁN I. Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. **Behav Pharmacol**, v. 6, p. 24-31, 1995.

HAZIM, A. I. et al. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. **J Physiol Sci**, v. 64, n. 3, p. 161–169, 2014.

HERKENHAM, M. et. al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Neurobiology**, v. 87, n. 5, p. 1932-6, 1990.

HUSTED, D. S.; SHAPIRA, N. A. GOODMAN, W. K. The neurocircuitry of obsessive compulsive disorder and disgust. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 389–99, 2006.

IKEDA, H. et.al. Activation of spinal cannabinoid CB₂ receptors inhibits neuropathic pain in streptozotocin- induced diabetic mice. **Neuroscience**, v. 250, p. 446–54, 2013.

JULIUS, D; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

KARNIOL, I. G. et al. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in man. **Eur J Pharmacol**, v. 28, p. 172-177, 1974.

KHASABOVA, I. A et al. Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. **Pharmacol Res.** v. 64, n. 1, p. 60–67, 2011.

KEHL, L. J. et al. A cannabinoid agonist differentially attenuates deep tissue hyperalgesia in animal models of cancer and inflammatory muscle pain. **Pain**, v. 103, p. 175-86, 2003.

KINSEY, S. G. et al. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 244-51, 2011a.

KINSEY, S. G. et al. Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 98, n. 1, p. 21–27, 2011b.

KOZAK, K. R. et al. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonoylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. **J. Biol. Chem**, v. 277, n. 26, p. 23278-86, 2002.

LEDENT, C. et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. **Science**, v. 283, p. 401-04, 1999.

LICHTMAN, A. H.; MARTIN, B. R. The selective cannabinoid antagonist SR 141716A blocks cannabinoid-induced antinociception in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 57, p. 7-12, 1997.

LUONGO, L.; MAIONE, S.; DI MARZO, V. Endocannabinoids and neuropathic pain: focus on neuron-glia and endocannabinoid-neurotrophin interactions. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 401–408, 2014.

LUSZCZKI, J. J.; FLOREK-LUSZCZKI, M. Synergistic interaction of pregabalin with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 mesylate in the hot-plate test in mice: an isobolographic analysis. **Pharmacol Rep**, v. 63, n. 3, p. 723-32, 2011.

MAA, E.; FIGI, P. The case for medical marijuana in epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 783-786, 2014.

MAIONE, S. et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 316, n. 3, p. 969-82, 2006.

MALAN, T. P. et al. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. **Pain**, v. 93, n. 3, p. 239-45, 2001.

MECHOULAM, R. Marijuana chemistry. **Science**, v. 168, p.1159-66, 1970.

MECHOULAM, R.; PETERS, M.; MURILLO-RODRIGUEZ, E.; HANUS, L. O.; Cannabidiol – Recent Advances. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 1678-1692, 2007.

NACKLEY, A. G.; SUPLITA, R. L.; HOHMANN, A. G. A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. **Neuroscience**, v. 117, n. 3, p. 659-670, 2003.

NADAL, X. et al. Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: New insights from knockout studies. **Eur J Pharmacol**, v. 716, n. 1-3, p. 142–157, 2013.

NAIDU, P. S. et al. Synergy between Enzyme Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase and Cyclooxygenase in Visceral Nociception. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 329, p. 48-56, 2009.

NARDO, M. et al. Cannabidiol reverses the mCPP-induced increase in marble-burying behavior. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 28, p. 544-50, 2014.

NEELAKANTAN, H. et al. Distinct interactions of cannabidiol and morphine in three nociceptive behavioral models in mice. **Behav Pharmacol**, v. 26, n. 3, p. 304-14, 2015.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 38, p. 63-67, 1991.

OLATUNJI, B. O.; DAVIS, M. L.; POWERS, M. B. Cognitive-behavioral therapy for obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis of treatment outcome and moderators. **J Psychiatr Res**, v. 47, p. 33-41, 2013.

PARK, B. K.; KITTERINGHAM, N. R.; O'NEILL, P. M. Metabolism of Fluorine - Containing Drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 41, p. 443-470, 2001.

PAZOS, M.R., et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 282-91, 2013.

PETROSINO, S. et al. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 415-22, 2007.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, v. 228, p. 88-99, 2015.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873–884, 2003.

PIOMELLI, D. The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 6, n. 7, p. 672-9, 2005.

PITTENGER, C.; KRYSTAL, J. H.; CORIC, V. Glutamate-modulating drugs as novel pharmacotherapeutic agents in the treatment of obsessive-compulsive disorder. **NeuroRx**, v. 3, n. 1, p. 69-81, 2006.

QUARTILHO, A. et al. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 955-60, 2003.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RIBEIRO, A. et al. Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: Role for the adenosine A2A receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 678, n. 1-3, p. 78-85, 2012.

ROSS, A. R. et al. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 2, p. 221-32, 2001.

RUGGIERI, V. et al. The antinociceptive effect of acetylsalicylic acid is differently affected by a CB1 agonist or antagonist and involves the serotonergic system in rats. **Life Sciences**, v. 86, p. 510-17, 2010.

RUHAAK, L. R. et al. Evaluation of the Cyclooxygenase Inhibiting Effects of Six Major Cannabinoids Isolated from Cannabis sativa. **Biol. Pharm. Bull**, v. 34, n. 5, p. 774-8, 2011.

SAGAR, D. R. et al. Endocannabinoid regulation of spinal nociceptive processing in a model of neuropathic pain. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 1414-1422, 2010a.

SAGAR, D. R. et al. Tonic modulation of spinal hyperexcitability by the endocannabinoid receptor system in a rat model of osteoarthritis pain. **Arthritis and rheumatism**, v. 62, n. 12, p. 3666-76, 2010b.

SAIN, N. M. H. et al. Antinociceptive effects of the non-selective cannabinoid receptor agonist CP 55,940 are absent in CB1^{-/-} and not CB2^{-/-} mice in models of acute and persistent pain. **Neuropharmacology**, v. 57, p. 235-41, 2009.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão?. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 32, p. S7-14, 2010.

SALLUM, A. M. C.; GARCIA, D. M.; SANCHES, M. Dor aguda e crônica: revisão narrativa da literatura. **Acta Paul Enferm**, v. 25, n. 1, p. 150-154, 2012.

SANBERG, P. R. et al. The catalepsy test: its ups and downs. **Behav Neurosci**, v. 102, n. 5, p. 748-759, 1988.

SANDERS, J.; JACKSON, D. M.; STARMER, G. A. Interactions among the cannabinoids in the antagonism of the abdominal constriction response in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 61, n. 3, p. 281-5, 1979.

SAXENA, S.; RAUCH, S. L. Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. **Psychiatr Clin North Am**, v. 23, n. 3, p. 563-86, 2000.

SCHINDLER, F.; ANGHELESCU, I.; REGEN, F.; JOCKERS-SCHERUBL, M. Improvement in refractory obsessive compulsive disorder with dronabinol. **Am J Psychiatry**, v. 165, n. 4, p. 536-7, 2008.

SIMPSON, H. B. Pharmacological treatment of obsessive-compulsive disorder. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 2, p. 527-43, 2010.

SMITH, S. R.; TERMINELLI, C.; DENHARDT, G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 293, n. 1, p. 136–50, 2000.

SMOUMA, R. et al. CB2 cannabinoid receptor agonist enantiomers HU-433 and HU-308: An inverse relationship between binding affinity and biological potency. **PNAS**, v. 112, n. 28, p. 8774–79, 2015.

STORCH, E. A. et al. Psychometric analysis of the Yale-Brown Obsessive–Compulsive Scale Second Edition Symptom Checklist. **J Anxiety Disord**, v. 24, n. 6, p. 650-656, 2010.

SUPLITA, R. L. et al. Cross-sensitization and cross-tolerance between exogenous cannabinoid antinociception and endocannabinoid-mediated stress-induced analgesia. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 161-171, 2008.

THOMAZZI, S. M. et al. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages. **Mediators Inflamm**, v. 6, n. 3, p. 195-200, 1997.

THORS, L. et al. Biochanin A, a naturally occurring inhibitor of fatty acid amide hydrolase. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 3, p. 549-60, 2010.

TING, J. T.; FENG, G. Glutamatergic Synaptic Dysfunction and Obsessive-Compulsive Disorder. **Curr Chem Genomics**, v. 1, n. 2, p. 62-75, 2008.

TSOU, K. et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 393-411, 1998.

ULUGOL, A. et al. The additive antinociceptive interaction between WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, and ketorolac. **Anesth Analg**, v. 102, n. 2, p. 443-7, 2006.

UMATHE, S. N.; MANNA, S. S. S.; JAIN, N. S. Endocannabinoid analogues exacerbate marble-burying behavior in mice via TRPV1 receptor. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 5-6, p. 2024-2033, 2012.

VALENZANO, K. J. et al. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 5, p. 658-672, 2005.

VAN SICKLE, M. D. et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 Receptors. **Science**, v. 310, p. 329-332, 2005.

VISCOMI, M. T. et al. Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. **J Neurosci**, v. 29, n. 14, p. 4564–4570, 2009.

VUOLO, F. et al. Evaluation of Serum Cytokines Levels and the Role of Cannabidiol Treatment in Animal Model of Asthma. **Mediators Inflamm**, v. 2015, 2015.

WAER, S. J. et al. Cannabidiol Prevents the Development of Cold and Mechanical Allodynia in Paclitaxel-Treated Female C57Bl6 Mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Anesth Analg**. v. 113, n. 4, p. 947-50, 2011.

WANG, S. J.; WANG, K. Y.; WANG, W. C. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals(synaptosomes). **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 191-201, 2004.

WILEYA, J. L.; MARUSICHA, A. J.; HUFFMANB, J. W. Moving around the molecule: Relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. **Life Sci**, v. 97, n. 1, p. 55-63, 2014.

WOODHAMS, S. G. et al. Spinal administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 produces robust inhibitory effects on nociceptive processing and the development of central sensitization in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 167, n. 8, p. 1609-1619, 2012.

WOODHAMS, S. G. et al. The role of the endocannabinoid system in pain. In: H.-G. SCHAIBLE (ed.). **Pain Control, Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 227, 2015.

WU, K. et al. The Role of Glutamate Signalling in the Pathogenesis and Treatment of Obsessive-Compulsive Disorder. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 726-35, 2012.

ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E.; KARNIOL, I. G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 245-250, 1982.