

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Neurologia
Centro Multiusuário de Neuroeletrofisiologia
Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções

ANA CAROLINA MEDEIROS

Estudo do efeito do canabidiol e do envolvimento dos receptores CB₁ e 5-HT_{1A} na conexão córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal sobre os aspectos cognitivos e emocionais na dor neuropática crônica em ratos

Ribeirão Preto – SP

2021

ANA CAROLINA MEDEIROS

Estudo do efeito do canabidiol e do envolvimento dos receptores CB₁ e 5-HT_{1A} na conexão córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal sobre os aspectos cognitivos e emocionais na dor neuropática crônica em ratos

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Pós-graduação: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Renato Leonardo de Freitas

Coorientador: Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

MEDEIROS, AC.

Estudo do efeito do canabidiol e do envolvimento dos receptores CB₁ e 5-HT_{1A} na conexão córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal sobre os aspectos cognitivos e emocionais na dor neuropática crônica em ratos

122p. : il. ; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP –
Área de concentração: Neurologia

Orientador: Freitas, Renato Leonardo de

1. Dor neuropática crônica 2. Canabidiol 3. Hipocampo 4. Córtex pré-límbico
5. Depressão 7. Memória/atenção

Nome: MEDEIROS, AC.

Título: Estudo do efeito do canabidiol e do envolvimento dos receptores CB₁ e 5-HT_{1A} na conexão córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal sobre os aspectos cognitivos e emocionais na dor neuropática crônica em ratos

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra.

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra.

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Presidente da Banca

Prof. Dr. Renato Leonardo de Freitas FMRP-USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88882.328276/2019-01”

**Aos meus pais e irmã, meu tudo.
E a todos que acreditam na ciência e educação.**

Agradecimentos

É chegado à conclusão de uma das etapas em minha trajetória, a qual esteve repleta de apoio, atenção e carinho de familiares e amigos. Reconheço não ser o agradecimento suficiente embora sincero e profundo.

Agradeço imensamente aos meus pais, Vagner e Renata, pelo apoio ao longo de toda a vida. São meu exemplo e referência de honestidade, coragem e caráter. Nunca conseguirei expressar em palavras todo meu amor e gratidão. Aproveito para agradecer minha irmã Mariana, minha melhor amiga e companheira, que sempre esteve ao meu lado escutando e aconselhando. Amo vocês!

Agradeço a todos os familiares que me incentivaram, acreditam em mim e me ajudam a construir meu caminho e realizar sonhos. Vô Antônio e vó Lourdes, Tio Daniel e Keila, amo vocês, muito obrigada!

Aos amigos da grande Avaí, Nice, Rafael, Vânia e Deli, por sempre estarem presente ainda que distantes, por todo carinho, momentos de alegria que tornam a caminhada mais suave. Amo vocês, obrigada!

Aos amigos Jéferson e Levi, por sempre estarem presente, pelo companheirismo nestes anos, por compartilhar alegrias, problemas, loucuras e tantos momentos especiais. Também aos amigos Fernanda, Natan, Alan, Flávia, Kimberly, Marília, Leonardo, Bruna, por todos os momentos que vão além de dias na universidade.

Agradeço ao Prof. Renato pela orientação, oportunidade, paciência, ensinamentos, confiança e apoio durante estes anos. Meu respeito e admiração. Muito obrigada!

Ao professor Norberto Coimbra, pela co-orientação, ensinamentos e inspiração.

Aos colegas do LNDE, Sylmara, Thais e Renata. Em especial à Priscila, por toda ajuda, ensinamentos, atenção, amizade e carinho.

Aos colegas do LNN, Juliana, Luiz, Taylon e Yara. Em especial a Glauce, não apenas pelas técnicas e conhecimentos compartilhados, mas também pelas conversas e prontidão e dedicação.

Aos técnicos Maria Rossato e Daoud por todo suporte e conhecimento compartilhado.

Á Luci, secretária do PPG, sempre solícita e atenciosa. Gratidão!

Agradeço a todos meus professores de Ciências e Biologia que tive ao longo do período escolar, por mostrar a beleza da Biologia, deixando claro a mim minha grande paixão pela ciência. Muito obrigado!

Aos professores, que ao longo da pós-graduação, contribuíram para minha formação com ensinamentos e como exemplos, ressaltando em mim minha grande paixão especificamente pelas Neurociências. Gratidão!

Também os colegas da pós-graduação que além de bons momentos me proporcionaram crescimento profissional. José Luiz, Tamiris, Rafael e Rodrigo, muito obrigada!

À Capes e FAPESP, pelo apoio financeiro imprescindível para a realização desse trabalho.

Agradeço à USP e o programa de Pós Graduação em Neurologia que me proporcionaram uma Pós-Graduação incrível.

Gratidão!

Resumo

Medeiros, AC. Estudo do efeito do canabidiol e do envolvimento dos receptores CB₁ e 5-HT_{1A} na conexão córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal sobre os aspectos cognitivos e emocionais na dor neuropática crônica em ratos. 2021 122f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A dor é uma das maiores causas de incapacitação no mundo, e na maioria das vezes, está acompanhada de alterações emocionais, do humor e prejuízos cognitivos. Os tratamentos, muitas vezes não são eficazes no alívio dos sintomas sensoriais, assim como das comorbidades relacionadas a dor crônica e dor neuropática (DN). Neste contexto, a melhor compreensão dos mecanismos neurais e psicofarmacológicos, além da busca por novos tratamentos desta condição é necessária. O canabidiol (CBD) é um fármaco amplamente estudado para o tratamento de diversas patologias, considerando seu amplo espectro de ação. Neste trabalho buscamos investigar seu efeito na comorbidade entre dor neuropática crônica (DNC), depressão e prejuízo de memória. Para isso, ratos Wistar foram submetidos à injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático e tratados com CBD (15, 30, 60 pmol) na subdivisão CA₁ do hipocampo dorsal (Hd). Os limiares nociceptivos foram avaliados através dos testes de von Frey (alodinia mecânica) e de acetona (alodinia ao frio). Para avaliação das comorbidades, foram realizados o teste de nado forçado (TNF) (para avaliar comportamentos do tipo depressivo relacionados a desesperança), o teste spray de sacarose (TSS) (para avaliar apatia e anedonia), e os testes de reconhecimento de objetos (TRO) e teste de labirinto em Y (TLY) (para avaliar prejuízos na memória espacial e de trabalho). Estudo neuroanatômico foi realizado através da microinjeção do neurotraçador bidirecional BDA XX intra-PrL. Também foram realizadas análises anatômicas de ativação da proteína c-FOS após 2 horas do tratamento com CBD a 60 pmol, avaliando a ativação neural. A presença de astrócitos, através da marcação de GFAP e de processos neurogênicos, através da marcação por doublecortina (DCX), também foram analisados após 1 hora do tratamento com CBD (60 pmol) intra-CA₁. Outro estudo empregado foi a interação farmacológica, na qual o cloreto de cobalto (CoCl₂), um bloqueador de sinapses, o WAY-100635 (0,37 pmol), um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, e o AM251 (100 pmol), um antagonista de receptores CB₁, foram microinjetados na divisão pré-límbica (PrL) do córtex pré-frontal medial (CPFM), seguida pelo tratamento do CA₁ com CBD (60 pmol). Nossos resultados mostraram há

conexão recíproca entre o córtex PrL e CA₁. A CCI induziu a alodinia mecânica e alodinia ao frio, além de aumentar a expressão de c-FOS no córtex PrL e CA₁. Além disso, a neuropatia esteve associada ao aumento de número de astrócitos no PrL e CA₁ e redução do número de neuroblastos, relacionados a marcação de DCX, em processo de migração no CA₁. Em relação aos comportamentos, os animais CCI apresentaram aumento dos comportamentos do tipo depressivo nos TNF e TSS e prejuízo na memória, nos TRO e TLY. O tratamento com CBD (60 pmol) no CA₁ diminuiu a alodinia mecânica e ao frio, atenuou os comportamentos relacionados à depressão (TNF e TSS), além de melhorar o desempenho no TLY, mas não no TRO. A inibição das sinapses do PrL, através da microinjeção de CoCl₂ (1 nM), além da microinjeção dos antagonistas WAY-100635 (0,37 pmol) e AM251 (100 pmol) também no PrL, reverteram o efeito do CBD (60 pmol) intra-CA₁, tanto nos comportamentos nociceptivos quanto nos relacionados à depressão e aos prejuízos cognitivos. Neste contexto, mostramos que CBD é um composto promissor no tratamento da DCN e das comorbidades associadas a depressão e memória, e que pode provocar alterações neurofuncionais mesmo quando administrado agudamente. Além disso, mostramos que o efeito analgésico, antidepressivo e de melhora cognitiva mediante tratamento com CBD possivelmente se utiliza da via CA₁-PrL, induzindo a neuroplasticidade. Sendo assim, hipostenizamos que a ativação de CA₁ reforça a conexão com o CPFM, favorecendo a analgesia e as melhoras nas respostas emocionais e cognitivas em animais com dor neuropática crônica.

Palavras chave: Dor neuropática e crônica; depressão; memória; canabidiol; córtex pré-límbico; hipocampo dorsal.

Abstract

Medeiros, AC. Study of the effect of cannabidiol and the involvement of CB₁ and 5-HT_{1A} receptors in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus connection on cognitive and emotional aspects of neuropathic chronic pain in rats. 2021 122f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Pain is one of the significant causes of disability in the world, and in most cases, it is accompanied by emotional and mood changes and cognitive impairment. Treatments are often ineffective in relieving sensory symptoms and comorbidities related to chronic pain (CP) and neuropathic pain (NP). In this context, a better understanding of neural and psychopharmacological mechanisms, in addition to the search for new treatments for this condition, is necessary. Cannabidiol (CBD) is a molecule widely studied to treat various pathologies, considering its broad spectrum of action. This work investigates its effect on comorbidity between chronic neuropathic pain (CNP), depression, and memory impairment. For this, Wistar rats were submitted to chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve and treated with CBD (15, 30, 60 pmol) in the CA₁ subdivision of the dorsal hippocampus (Hd). Nociceptive thresholds were assessed using von Frey (mechanical allodynia) and acetone (cold allodynia) tests. Forced swim test (FST) (to assess depressive-like behaviors related to hopelessness), the sucrose spray test (SST) (to assess apathy and anhedonia), object recognition tests (ORT), and Y-maze test (YMT) (to assess impairments in spatial and working memory) were performed to evaluate comorbidities. Neuroanatomical investigation was made through bidirectional neurotracer BDA microinjection into the PrL cortex. Anatomical analyzes of c-FOS protein activation were also performed after 2 hours of treatment with CBD (60 pmol), evaluating neural activation. Through GFAP labeling and neurogenic processes, the presence of astrocytes through doublecortin (DCX) labeling was also analyzed 1 hour after treatment with CBD (60 pmol) intra-CA₁. Another study made was the pharmacological interaction, in which cobalt chloride (CoCl₂), a synapse blocker, WAY-100635 (0.37 pmol), a 5-HT_{1A} receptor antagonist, and AM251 (100 pmol), an antagonist of CB₁ receptors, were microinjected into the prelimbic division (PrL) of the medial prefrontal cortex (CPFM), followed by treatment of CA₁ with CBD (60 pmol). Our results showed that there are reciprocal connections between the PrL cortex Ca₁. The CCI induced mechanical allodynia and cold allodynia, increasing c-FOS expression in the PrL cortex and CA₁. Furthermore, neuropathy was associated with increasing the astrocytes numbers in PrL and CA₁ and reducing the number of

neuroblasts related to DCX labeling in the migration process in CA₁. Regarding behaviors, CCI animals showed increased depressive-like behaviors in FST and SST and memory impairment in ORT and YMT. Treatment with CBD (60 pmol) in CA₁ decreased mechanical and cold allodynia, attenuated behaviors related to depression (FST and SST), and improved performance in YMT, but not in ORT. Inhibition of PrL synapses through microinjection of CoCl₂ (1 mM), in addition to microinjection of antagonists WAY-100635 (0.37 pmol) and AM251 (100 pmol) also in PrL, reversed the effect of CBD (60 pmol) intra-CA₁, both in nociceptive behaviors and in those related to depression and cognitive impairments. In this context, we show that CBD is promising in treating DNC and comorbidities associated with depression and memory and can cause functional changes even when administered acutely. Moreover, we showed that the analgesic, antidepressant, and cognitive improvement effects of treatment with CBD possibly use the CA₁-PrL pathway, inducing neuroplasticity. Therefore, we hypothesize that CA₁ activation reinforces the connection with CPFM, favoring analgesia and improvements in emotional and cognitive responses in animals with chronic neuropathic pain.

Keywords: Chronic and neuropathic pain; depression; memory; cannabidiol; prelimbic cortex; dorsal hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do processamento da dor e modulação. Adaptado de WATKINS; MILLIGAN; MAIER, (2001).....	26
Figura 2: Esquema representativo do modelo animal de injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático direito (A) para o estudo da dor e as alterações de alodinia e hiperalgesia produzidas (B). Testes nociceptivos empregados na avaliação de limiares nociceptivos de alodinia mecânica (teste de von Frey) e de alodinia ao frio (teste de aceona) (C) em roedores.	28
Figura 3: Desenho experimental do estudo do efeito antinociceptivo do CBD intra-CA ₁	49
Figura 4: Desenho experimental do estudo do efeito antinociceptivo e interação farmacológica do CBD intra-CA ₁ e CoCl ₂ , WAY, AM251 ou veículo intra-PrL.....	50
Figura 5: Desenho experimental do estudo do efeito do CBD intra-CA ₁ sobre a comorbidade entre dor, depressão e prejuízo cognitivo, e a interação farmacológica, com CoCl ₂ , WAY, AM251 ou veículo intra-PrL.....	50
Figura 6: Desenho experimental do estudo do efeito do CBD intra-CA ₁ sobre a ativação neuronal a partir da imunomarcagem da proteína c-fos.	52
Figura 7: Desenho experimental do estudo do efeito do CBD intra-CA ₁ sobre o número de astrócitos e neurônios em processo migratório a partir da imunomarcagem de GFAP e DCX, respectivamente.	52
Figura 8: A. Representação esquemática dos sítios de microinjeção de drogas em CA ₁ . B. Fotomicrografia de campo claro do sítio de microinjeção. Coloração hematoxilina-eosina (HE). Aumento 5x. C. Representação dos sítios de microinjeção no CA ₁ de acordo com os grupos experimentais: (○) veículo (CCI), (□) veículo (sham), (▲) CBD 15 pmol, (■) CBD 30 pmol, (●) CBD 60pmol atlas esterotáxico de Paxinos e Watson (2017).....	55
Figura 9: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-CA ₁ de CBD nas concentrações 15, 30 e 60 pmol ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida pela injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático sobre os testes de	

von Frey (A) e acetona (B). Os dados são representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação aos demais grupos; ^xDiferença em relação aos grupos sham; + diferença em relação ao grupo tratado com veículo; # diferença em relação ao grupo tratado com CBD 30 pmol, de acordo com o pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia CCI ou Sham; LB2: após 21 a CCI foi medida nova linha de base; Seta B: microinjeção. (n=9)..... 57

Figura 10: A. Representação esquemática dos sítios de microinjecção de drogas no PrL. B. Fotomicrografia do sítio de microinjecção no PrL. C. Representação esquemática dos sítios de microinjecção de drogas no CA₁. D. Fotomicrografia do sítio de microinjecção Coloração HE. Aumento 5x. C. Representação dos sítios de acordo com os grupos experimentais: (○) veículo (CCI), (□) veículo (sham), (●) CBD 60pmol, (x) Veículo+CoCl₂, () WAY+Veículo, () AM251+Veículo, (◆) CoCl₂+ CBD, () WAY+CBD, (▲) CBD+AM251. atlas esteróxico de Paxinos e Watson (2017)..... 58

Figura 11: Gráfico representativo do efeito de microinjecções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e tratamentos no PrL com CocL₂ (1nM), WAY-100635 (0,37 pmol), AM251 (100 pmol) ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) sobre o teste de von Frey (A) e acetona (B). Os dados foram representados por média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação aos demais grupos;! diferença em relação aos grupos tratados com CoCl₂ no PrL; # diferença em relação aos grupos tratados com WAY no PrL; x diferença em relação aos grupos tratados com AM251 no PrL; + diferença em relação ao grupo AM251 + Ve (CCI), de acordo com o pós teste de Tukey (* $p < 0,05$). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia CCI ou Sham; BL2: após 21 a CCI foi medida nova linha de base; Seta B: microinjecção. (n=8). 60

Figura 12: Gráfico representativo do efeito de microinjecções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre o tempo e frequência do comportamento de mobilidade no teste de nado forçado. Os dados foram representados por média e erro padrão da média. * $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + veículo (PrL); # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + AEA 100pmol (PrL); + $P < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo (PrL) + AEA 200pmol (PrL), de acordo com o pós teste de Tukey ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$). (n=9)..... 62

Figura 13: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre o tempo (A) e frequência (B) do comportamento de **imobilidade** no teste de **nado forçado**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. & Diferença significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); #Diferença significativa em relação ao grupo tratado com CBD. + Diferença significativa em relação ao grupo CoCl₂+Veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$). (n=9) 63

Figura 14: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre o comportamento de **autolimpeza**, frequência (A), tempo (B) e latência (C) no teste de **spray de sacarose**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. & Diferença significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); # Diferença significativa em relação ao grupo CBD; x Diferença significativa em relação ao grupo WAY+Veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=9)..... 65

Figura 15: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre a **alteração espontânea** no teste **labirinto em Y**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. ** $p < 0,01$. & Difeça significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); #Diferença em relação ao CBD, de acordo com o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=9) 67

Figura 16: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre a **tarefa de reconhecimento de objetos** (A). B. Index. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. & Diferença significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); # Diferença significativa em relação ao CBD (60pmol), de acordo com o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=9)..... 69

Figura 17: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre a **locomoto**ção total no teste de **campo aberto**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média.; *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve), de acordo com o pós teste de Tukey ($*p<0,05$). (n=9) 70

Figura 18: Efeito do CBD 60 pmol sobre a ativação neuronal em CA₁. A. Gráfico representativo do número de células positivas para c-FOS. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($*p<0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (B-O). (n=5) 72

Figura 19: Efeito do CBD 60pmol sobre a ativação neuronal no córtex PrL. A. Gráfico representativo do número de células positivas para c-FOS. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($*p<0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (B-O). (n=5) 73

Figura 20: Efeito do CBD 60 pmol sobre o número de astrócitos em CA₁, a partir da marcação de GFAP. A. Gráfico representativo do número de células positivas para c-FOS. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($*p<0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (B-O). (n=5) 75

Figura 21: Efeito do CBD 60 pmol sobre o número de astrócitos no PrL, a partir da marcação de GFAP. A. Gráfico representativo do número de células positivas para c-FOS. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($*p<0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (B-Q). (n=5) 76

Figura 22: Efeito do CBD 60 pmol sobre a formação de novos neurônios em CA₁ a partir da imunomarcção de DCX. A. Gráfico representativo do número de células positivas para c-FOS. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. Pós teste de Tukey: $*p<0,05$. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; #

diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com pós teste de Tukey ($*p < 0,05$).

Figuras representativas da imunomarcção (B-O). (n=5) 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais	49
Tabela 2: Grupos experimentais do estudo de interação farmacológica.....	51
Tabela 3: Compilado dos resultados, onde ↑ corresponde a um aumento/melhora, ↓ diminuição/piora e — ausência do grupo.....	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT receptores serotoninérgicos

5-HT_{1A} receptor serotoninérgico do tipo 1A

AEA anandamida

AC teste de acetona

BDA biodextrana

BSA albumina de soro bovino

Ca₁ corno de amon 1

Ca₂ corno de amon 2

CAMg complexo amigdalóide

CB₁ receptor endocanabinóide 1

CBD canabidiol

CCI injúria por constrição crônica do nervo isquiático

Cg1 córtex cingulado anterior ou giro do cíngulo

CI córtex insular

CPFM córtex pré-frontal medial

DC dor crônica

DN dor neuropática

DNC dor neuropática crônica

NMDA *n-metil d- aspartato*

LTP potencial de longo prazo (*long term potentiation*)

LTD depressão de longo prazo (*long term depression*)

PAG substância cinzenta periaquedutal

PrL córtex pré-límbico

Hd hipocampo dorsal

TBS solução salina tamponada com Tris

GFAP proteína ácida fibrilar glial

PBS Tampão fosfato-salino (*Phosphate-buffered saline*)

PFA paraformaldeído

TCA teste de campo aberto

TLY teste de labirinto em Y

TNF teste de nado forçado

TRO teste de reconhecimento de objetos

TSS teste de spray de sacarose

vmPFC córtex pré-frontal ventromedial

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	23
1.1	Dor crônica e neuropática.....	23
1.2	Modelos animais para o estudo da dor neuropática e crônica.....	26
1.3	Vias Neurais e conexões entre o Córtex Pré-Frontal Medial e Hipocampo na Elaboração da Dor.....	28
1.4	Comorbidades: memória e depressão.....	31
1.5	Células da glia na dor crônica e comorbidades.....	33
1.6	Canabidiol (CBD).....	35
2.	Objetivos.....	39
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3.	Material e métodos.....	40
3.1	Animais.....	40
3.2	Estudo Neuroanatômico.....	40
3.3	Indução da mononeuropatia periférica.....	41
3.4	Cirurgia estereotáxica.....	41
3.5	Fármacos.....	42
3.6	Testes nociceptivos.....	42
3.6.1	Von Frey.....	42
3.6.2	Acetona.....	43
3.7	Testes comportamentais.....	43
3.7.1	Teste nado Forçado.....	43
3.7.2	Teste de spray de sacarose.....	44
3.7.3	Teste labirinto em Y.....	44
3.7.4	Teste de reconhecimento de objetos (TRO).....	45
3.7.5	Teste campo aberto.....	45
3.8	Processos histológicos.....	46
3.8.1	Perfusão.....	46
3.8.2	Coloração hematoxilina eosina.....	46
3.9	Imunofluorescência.....	46
3.9.1	Marcação da proteína c-fos por imunofluorescência.....	47
3.9.2	GFAP e NeuN.....	47
3.9.6	DCX.....	48

3.10	Análise dos dados.....	48
3.11	Procedimentos experimentais	49
	Investigação do efeito antinociceptivo do CBD	49
	Estudo da interação farmacológica com pré-tratamento no córtex PrL seguido da microinjeção de CBD intra-CA ₁	49
	Estudo do efeito do CBD sobre a comorbidade entre dor neuropática e cognição.	50
	Estudo do efeito do CBD sobre a ativação neuronal através da proteína c-fos.....	51
	Estudo do efeito do CBD sobre o número de astrócitos e neurônios em processo migratório	52
4.	Resultados.....	53
4.1	Estudo neuroanatômico	53
4.2	Efeito antinociceptivo do CBD no CA ₁ de animais com dor neuropática crônica.....	55
4.2	Estudo da interação farmacológica com pré-tratamento no córtex PrL seguido da microinjeção de CBD intra-CA ₁	58
4.3	Estudo do efeito do CBD sobre a comorbidade entre dor neuropática crônica e depressão	61
4.4	Estudo do efeito do CBD sobre a comorbidade entre dor neuropática e cognição	66
4.5	Efeito da CCI e dos tratamentos sobre a capacidade locomotora no teste de campo aberto.....	70
4.6	Estudo do efeito do CBD sobre a ativação neuronal através da proteína c-fos ...	71
4.8	Estudo do efeito do CBD sobre a formação de novos neurônios.....	77
5.	Discussão	80
6.	Conclusões.....	92
7.	Sugestões para trabalhos futuros.....	92
	Referências bibliográficas	93
	Apêndice 1 – Tabelas estatística.....	114
	Apêndice 2– Controle negativo do experimento de imuno-histoquímica por fluorescência.....	121
	Apêndice 3 – Certificado de aprovação do comitê de ética	122

1. Introdução

1.1 Dor crônica e neuropática

A dor é uma condição de saúde que, muitas vezes, está relacionada com sofrimento e incapacitação. É definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial” pela *International Association for the Study of Pain* (RAJA et al., 2020). Nesta definição fica claro que a dor não é apenas um sintoma ou uma questão sensorial, mas uma experiência que pode ser influenciada e influenciar aspectos emocionais, de humor e cognitivos, refletido assim, na antecipação de danos futuros e no manejo desta condição, que pode se tornar crônica e persistente. Quando a dor é persistente ou recorrente por mais de 3 meses, e se mantém mesmo após o desaparecimento das causas iniciais, esta é definida como crônica (TREEDE et al., 2019). Nestes casos, as formas de tratamento são inespecíficas e pouco eficazes, e associadas à dificuldades de diagnósticos causam ao Estado altos custos (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011; PAK et al., 2018).

Fisiologicamente, a dor é uma resposta adaptativa a uma situação ou perigo iminente. Frente a estas situações, as informações sobre o impacto prejudicial desses estímulos nos tecidos corporais são transduzidas e transmitidas por vias neurais através do sistema nervoso periférico para o sistema nervoso central e autônomo, cujo processo é denominado nociceção (GARLAND, 2012). Inicialmente há a ativação de nociceptores, que são terminações nervosas livres, responsáveis pela transdução do sinal. Este por sua vez, segue por fibras mielinizadas do tipo C e A δ até a medula espinal, onde fazem sinapse com o segundo neurônio da via e este se projeta para núcleo ventral posterior lateral e núcleo ventromedial do tálamo (GARLAND, 2012). A partir daí, o sinal é retransmitido para regiões corticais e subcorticais, dentre elas os córtices somatosensoriais primário (S1) e secundário (S2), que recebem aferências do tálamo dorsal estão envolvidos na qualidade da percepção sensorial da dor, em que se incluem localização, duração e intensidade da dor, o complexo amigdalóide (CAmg), hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleos da base, córtex pré-frontal medial (CPFM), córtex cingulado (Cg1) e córtex insular (CI) que estão envolvidos com os componentes afetivos e emocionais da dor (JULIUS, 2001; SERGE MARCHAND, 2012). A integração destas áreas formam o que Melzack (1999)

denominou “neuromatriz da dor” (MELZACK, 1999). Estas conexões permitem a integração de informações sensoriais, cognitivas, emocionais, respostas fisiológicas e componentes genéticos além de vias modulatórias intrínsecas (MELZACK, 1999). Neste sentido, as alterações fisiológicas desencadeadas pelo estímulo nociceptivo somadas as experiências prévias do indivíduo possibilitam a interpretação deste estímulo como doloroso ou não.

Uma vez que existe a lesão e a mesma está associada ao sistema somatossensorial, a dor decorrente deste processo é definida como dor neuropática (DN) (SCHOLZ et al., 2019). A DN pode ser consequência de uma lesão ou doença que afetam o sistema nervoso central ou periférico. Danos periféricos incluem a neuralgia pós-herpética, dor induzida por quimioterápicos, neuropatia dolorosa diabética entre outras (MEACHAM et al., 2017). Quando especificamente no sistema nervoso central, leva ao surgimento das síndromes de DN central, como a dor pós acidente vascular encefálico e esclerose múltipla (WATSON; SANDRONI, 2016).

Um estudo epidemiológico da população brasileira mostrou que a DC é um problema que acomete 39% da população no Brasil, sendo mais prevalente nas regiões sul (43%) e sudeste (40%) (SOUZA et al., 2017). No mesmo estudo, foi mostrado que, a DC afeta outros aspectos das pessoas, como trabalho (23,3%), vida social (16,7%) e o emocional (20,5%) (SOUZA et al., 2017). Outro estudo mostrou que 7-8% da população apresenta DC com características neuropáticas (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP), 2015).

A DN é caracterizada por uma reorganização de fibras e receptores, responsáveis pelo aumento da excitabilidade central e consequente persistência da sensação de dor. METZ e colaboradores (2009) sugeriram que o aumento do número de espinhos dendríticos e de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA provocados pela neuropatia, causa aumento da excitabilidade local e da excitotoxicidade glutamatérgica, com morte neuronal.

De fato, a DN se manifesta através de alterações neuroquímicas no SNC e SNP, afetando o nervo periférico, estruturas espinais e corticais (YAN et al., 2012). Na periferia, a DN está associada a alterações na excitabilidade dos nociceptores e, em nível de medula espinal, a potenciação excitatória de longo prazo (LTP) (YAN et al., 2012). Este aumento da excitabilidade é a causa de características importantes da DN associadas à dor persistente, à dor paroxística espontânea, a resposta a estímulos normalmente inócuos, caracterizando a alodinia, e o aumento da resposta evocada por

estímulos nocivos, caracterizando a hiperalgesia (LENG et al., 2012). Tais parâmetros são comumente observados em seres humanos e em modelos animais, e por tal motivo, serão testados e observados neste estudo.

Diversos mecanismos são relacionados a nocicepção, periféricamente, a alteração de atividade de canais iônicos leva a atividade ectópica (Figura 1). Centralmente, ocorre facilitação sináptica e perda de inibição no neuroeixo, resultando na amplificação da informação. Além disso, morte celular e conectividade anormal são as bases estruturais para o processamento persistentemente alterado da entrada aferente nociceptiva e inócua (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A DC do tipo neuropática pode ainda interferir em áreas cerebrais específicas envolvidas em processos neuropsicológicos como cognição, memória e tomada de decisão (WALKER et al., 2013). O aumento a excitabilidade de neurônios glutamatérgicos foi descrita em ratos, tanto em áreas límbicas e corticais, como a divisão pré-límbica (PrL) do CPFM (GIORDANO et al., 2012; MAIONE et al., 2011; MALVESTIO et al., 2021). Esta área apresenta, dentre outras funções, o processamento da dor, e então, sua organização sináptica e morfológica se alteram (APKARIAN et al., 2005).

Sendo assim, o presente trabalho pretende investigar a circuitaria neural entre a área CA₁ do hipocampo dorsal (Hd) com outras regiões associadas as respostas emocionais e cognitivas, tais como o CPFM. Também investigaremos os aspectos psicofarmacológicos, bem como os efeitos do tratamento com canabidiol (CBD), que pode nos trazer novas evidências e elucidar os possíveis mecanismos da manutenção e intensificação da dor neuropática e crônica.

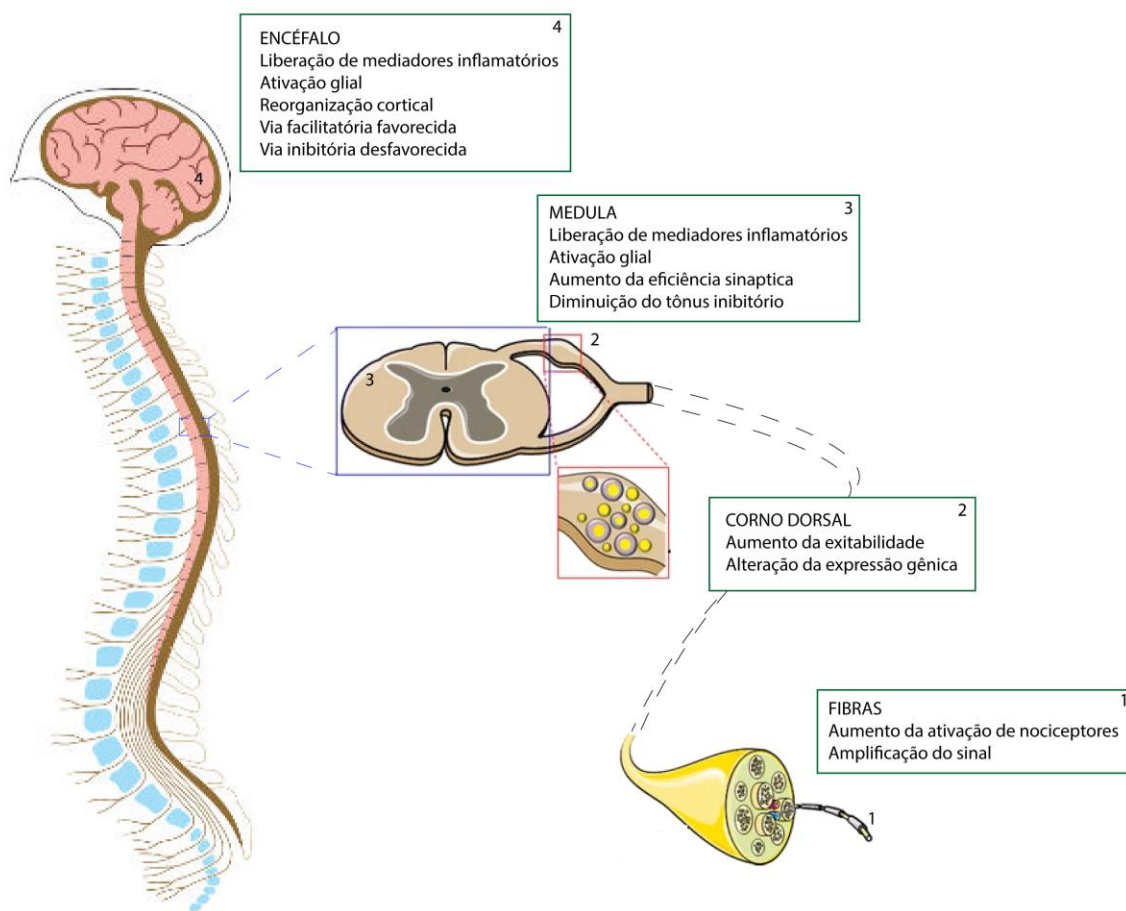


Figura 1: Esquema do processamento, sensibilização, facilitação e modulação da dor. Adaptado de WATKINS; MILLIGAN; MAIER, (2001).

1.2 Modelos animais para o estudo da dor neuropática e crônica

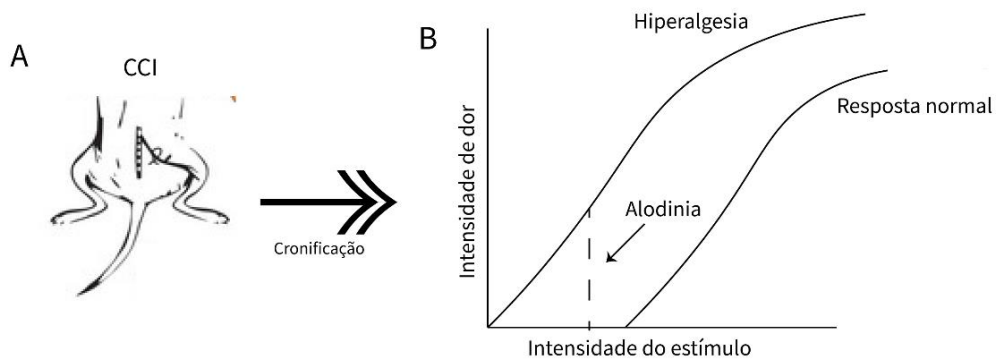
A pesquisa em modelos animais há muito tem mostrado seu papel fundamental para a ciência e desenvolvimento. A partir destes modelos, é possível a investigação de mecanismos que levam ao desenvolvimento de patologias além de contribuir na busca por melhores condições de vida, manejo e tratamento. Considerando a DN, em roedores, o experimento mais comum é a indução da neuropatia periférica através da lesão do nervo isquiático. Sendo esta lesão (total ou parcial) causada por ligadura, transecção ou compressão do nervo periférico (MOGIL, 2009). A premissa dos modelos é que a lesão tecidual e nervosa ocasiona uma inflamação e desencadeia processos de reparo, sensibilização periférica, caracterizada por hiperexcitabilidade (SEWELL, 2018). Em decorrência destes processos, é possível observar prejuízos sensoriais reproduzíveis por um período sustentado, como alodinia, hiperalgesia e dor espontânea (Figura 2).

As lesões do nervo podem ser totais ou parciais, e estão associadas a efeitos particulares. A injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático, por exemplo, desenvolvida por Bennett & Xie, é caracterizada por quatro ligaduras em volta do nervo. Esta lesão produz mononeuropatia periférica unilateral, correspondente a causalgia ou síndrome de dor regional complexa em pacientes e é amplamente empregada em estudos de DN (BENNETT; XIE, 1988). Considerando os efeitos intensos provocados nos animais após a realização das ligaduras, Medeiros e colaboradores desenvolveram um modelo adaptado no qual é feito apenas uma ligadura no nervo isquiático. Neste modelo, o animal desenvolve alodinia e hiperalgesia bem como alterações cognitivas e emocionais, contudo, não ocasiona prejuízos motores e autotomia em roedores (MEDEIROS et al., 2019a, b, 2020a,b, 2021; MALVESTION et al., 2021) (Figura 2).

Uma vez presente a patologia, métodos para avaliação e quantificação de comportamentos relacionados à dor ou nocicepção são essenciais. Estes métodos são pautados em comportamentos espontâneos de retirada frente a um estímulo (resposta evocada) ou ainda medidas não espontâneas, como escalas de alterações faciais, escavação, sustentação de peso e análise da marcha (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; MEDEIROS et al., 2020a, 2021). Dentre os métodos mais utilizados estão o teste de von Frey (VF) e o teste de acetona (AC). O primeiro corresponde a um conjunto de filamentos com espessuras diferentes que exercem pressões diferentes na pata do animal, aquele em que o animal expressar o comportamento de retirada representa, em gramas, é o limiar de retirada ou nociceptivo (Figura 2C). Neste teste é possível avaliar a alodinia mecânica dos animais (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). Já o teste de acetona, o estímulo aplicado é um determinado volume de acetona que provoca uma redução da temperatura local, correspondendo a um estímulo térmico (Figura 2D). Da mesma forma que o von Frey, no teste de acetona é quantificado o comportamento de retirada da pata, permitindo avaliar o limiar nociceptivo em uma situação de alodinia térmica (RUAN et al., 2018).

De fato, estudos em modelos animais são fundamentais para construção do conhecimento e a utilização de ferramentas apropriadas para avaliação dos comportamentos é essencial. Neste trabalho, a utilização do modelo adaptado de CCI, junto aos testes nociceptivos possibilitou a investigação de mecanismos envolvidos na dor neuropática e crônica, das comorbidades relacionadas a transtornos da depressão e

prejuízos cognitivos, além de possibilitar o estudo de uma terapia para o tratamento da dor, como o canabidiol.



Testes nociceptivos

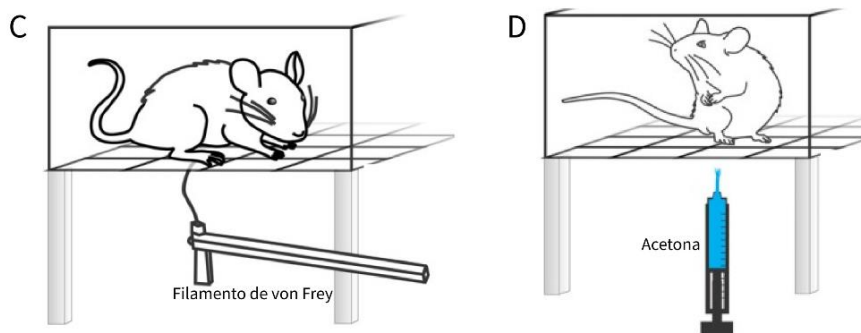


Figura 2: Esquema representativo do modelo animal de injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático direito (A) para o estudo da dor neuropática e as alterações relacionadas a alodinia e hiperalgesia produzidas (B). Testes nociceptivos empregados na avaliação de limiares nociceptivos de alodinia mecânica (teste de von Frey) e de alodinia ao frio (teste de acetona) (C) em roedores.

1.3 Vias Neurais e conexões entre o Córtex Pré-Frontal Medial e Hipocampo na Elaboração da Dor

No que se refere às estruturas supra-espinais, o córtex pré-frontal medial (CPF_{FM}) é uma região que está associada à contingência e controlabilidade da dor, estabelecendo comunicação com outros núcleos, como o hipocampo dorsal (Hd). Essa conexão entre CPF_{FM} e Hd é mediada por neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos e noradrenérgicos (LIM et al., 2010; WANG; YUAN, 2009). Através de estudos com camundongos *knockout* para o receptor endocanabinoide do tipo CB₁, verificou-se seu envolvimento na elaboração da antinocicepção (ELPHICK; EGERTOVÁ, 2001). Somado a isso, o receptor CB₁ é altamente expresso em algumas áreas do sistema nervoso central, como porção ventral do CPF_{FM},

especialmente rica neste tipo de receptor canabinoide (HERKENHAM et al., 1991; TSOU et al., 1998).

Em adição, o CPFM também regula atividades relacionadas ao planejamento, bem como controle comportamental e emocional (LURIA, 1981). Por meio do estabelecimento de circuitos córtico-subcorticais, também atua na elaboração dos estados de alerta, estresse e humor (BENSON et al., 2015; JOHN A. ROBBINS, LIHONG QI, LORENA GARCIA, JARRED W. YOUNGER, 2000). Esta estrutura cortical apresenta importância crucial tanto nos componentes afetivos como sensoriais inerentes ao fenômeno nociceptivo. Alterações nessa área do neocórtex foram relatadas em muitas condições de dor crônica, bem como em comorbidades relacionadas à ela, tais como ansiedade, depressão e cognição (KRISHNAN et al., 1985; MASSART et al., 2016). De fato, há evidências da existência de *déficits* cognitivos e emocionais após a lesão de nervo de roedores e o CPFM parece estar envolvido nestas respostas comportamentais (LOW et al., 2012; SEMINOWICZ et al., 2009; TAJERIAN et al., 2013).

Outra estrutura envolvida em aspectos da dor é o Hd, uma estrutura límbica do paleocórtex que está envolvida em processos de aprendizagem e memória (AMELIA A. MUTSO, DANIEL RADZICKI, MARWAN N. BALIKI, LEJIAN HUANG, GHAZAL BANISADR, MARIA VIRGINIA CENTENO, JELENA RADULOVIC, MARCO MARTINA, RICHARD J. MILLER, 2012). Estudos mostram que o processo de dor crônica ocasiona alterações na estrutura hipocampal, o que pode ser traduzido na clínica em *déficits* de memória, ansiedade e depressão (BARKUS et al., 2010). Também é observada expressão anormal de citocinina, *déficits* no potencial de longa duração e comprometimento do processo de neurogênese (AL-AMIN et al., 2011; REN et al., 2011; TERADA et al., 2008). Este declínio da neurogênese tem sido associado aos transtornos comportamentais, como ansiedade, depressão e estresse (DRANOVSKY; HEN, 2006; REVEST et al., 2009; SAHAY; HEN, 2007).

A conexão entre as estruturas PrL e Hd já foi descrita na literatura, em modelos animais, através de estudos neuroanatômico e de eletrofisiologia (CARDOSO-CRUZ et al., 2019; NAKAMURA; KATAYAMA; KAWAKAMI, 2010; YE et al., 2017). Ambas as estruturas são funcionalmente relacionadas, principalmente no que diz respeito a processos relacionados à memória. A conexão CPFM-Hd é recíproca, sendo o pré-frontal atuando como um elo intermediário entre o hipocampo e áreas neocorticais de associação (THIERRY et al., 2000). Registros extracelulares unicelulares de neurônios

pré-frontais e estimulação elétrica da região CA₁/subicular ventral foram descritos para determinar a influência da formação hipocampal sobre o córtex pré-frontal em ratos anestesiados (JAY et al., 1992; LAROCHE; JAY; THIERRY, 1990; MULDER; ARTS; DA SILVA, 1997).

Na literatura é proposto que a conexão CPFM/Hd está estritamente relacionada com processos mnemônicos. Neste sentido, o hipocampo apresenta papel crítico na codificação rápida enquanto o CPFM e suas interações com o hipocampo, é essencial para a organização, consolidação e recuperação flexível de memórias. O hipocampo é visto como formador e recuperador de memórias específicas, enquanto o CPFM acumula características de memórias relacionadas que compõem o "contexto" de um conjunto de experiências conectadas. Quando subsequentemente dirigido a um contexto, o CPFM é visto influenciando a recuperação de memórias apropriadas ao contexto no hipocampo, bem como em outras áreas do cérebro (PRESTON; EICHENBAUM, 2013).

Um fenômeno fundamental na formação de memórias é a plasticidade. Sinapses hipocampais e no CPFM exibem atividades neuroplásticas dependentes, incluindo a potenciação de longo prazo (LTP), depressão a longo prazo (LTD) e despotação (BURETTE; JAY; LAROCHE, 1997; JAY; BURETTE; LAROCHE, 1996; LAROCHE; JAY; THIERRY, 1990; TAKITA et al., 1999). Estas formas de plasticidade são dependentes do receptor NMDA, e envolvem a ativação de cinases como CaMKII, PKC e PKA (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; BURETTE; JAY; LAROCHE, 1997; DUDEK; BEAR, 1992; TAKITA et al., 1999).

Muitas formas de plasticidade sináptica foram observadas no córtex cerebral, estendendo as investigações iniciais de LTP e LTD do hipocampo ao neocórtex. Os estudos de Jay, Burette and Laroche (1996) sugerem que um mecanismo do tipo LTP na via Hd/CPFM pode ser envolvido em um processo de consolidação tardia pelo qual o hipocampo pode ajudar na estabilização de uma cortical representação da associação aprendida. A transmissão sináptica dopaminérgica mediada por receptores tipo D1, um regulador chave da plasticidade na via (GURDEN; TAKITA; JAY, 2000), enquanto serotoninérgico, noradrenérgico, e sistemas neurotransmissores colinérgicos também estão envolvidos (LIM et al., 2010; OHASHI et al., 2003).

Como já mencionado, processos como a LTP e LTD são dependentes de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, estes receptores participam da sinapse glutamatérgica a qual pode ser modulada pelo sistema endocanabinóide, mediado por receptores do tipo CB₁ e CB₂. No hipocampo os receptores endocanabinóide estão

localizados basicamente em terminais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos (KATONA et al., 2006; TSOU et al., 1998; WILSON; NICOLL, 2002a), entretanto já foi demonstrada a presença destes receptores em terminais de neurônios piramidais glutamatérgicos, em uma concentração superior a encontrada em neurônios inibitórios (KAWAMURA et al., 2006; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006). Neste sentido, está clara a participação do sistema endocanabinóide em processos neuroplásticos.

Considerando a já estabelecida conexão CPFM/Hd e o envolvimento de sistemas serotoninérgicos e endocanabinóide, via neurônios glutamatérgicos, em processos cognitivos e emocionais, o estudo do efeito do tratamento de animais neuropáticos com CBD se mostra promissor. Além disso, o esclarecimento de mecanismos de ação do composto sobre esta via e o envolvimento de processos neuroplásticos no estabelecimento de prejuízos cognitivos e emocionais associado às alterações neurológicas decorrentes da DN são necessárias.

A presente investigação multidisciplinar pretende avaliar as bases neuroanatômicas da conexão CPFM/Hd, as bases moleculares, através da análise de proteína c-FOS, e mecanismos celulares através da avaliação de células da glia e migração, além da base psicofarmacológica, estudando o efeito do canabidiol (CBD), utilizando o modelo de dor neuropática e crônica que pode nos trazer novos conhecimentos acerca desta fisiopatologia e suas consequências. Além disso, a comunicação entre o CPFM e o Hd pode ser a chave para o entendimento da dor crônica e neuropática, em relação as suas características fisiopatológicas e as comorbidades, como depressão e prejuízos cognitivos.

1.4 Comorbidades: memória e depressão

É sabido que a DC está ligada a alterações fisiológicas e moleculares no neocórtex, levando assim, a alterações cognitivas e comportamentais como ansiedade e depressão (GORE et al., 2012; MUTSO et al., 2012). A depressão está associada a dor neuropática crônica (DNC) em 16,7% da população brasileira que sofre com a neuropatia. De fato, a prevalência da depressão varia entre 22% e 78% em quadros clínicos de DC. Não obstante, queixas dolorosas persistentes ocorrem entre 30% e 100% dos doentes deprimidos. Em algumas populações gerais, estudos epidemiológicos mostraram que a DC aumenta o risco de depressão entre 2,5 e 4,1 vezes (BAUER et al., 2016). Da mesma forma, pacientes que sofrem com a depressão são três vezes mais

propensos a sofrerem de dor não neuropática e seis vezes mais propensa a sofrerem de DN (OHAYON; STINGL, 2012).

Klaunberg e colaboradores (2008) mostraram que em pacientes sem dor, sinais de hiperexcitabilidade central aumentada são ainda mais pronunciados do que os geralmente encontrados em pacientes com DC. Tais resultados indicam mecanismos comuns no transtorno depressivo e DC, de acordo com a suposição de mecanismos não associados à dor no transtorno depressivo, como por exemplo, pela função serotoninérgica inibida.

No que compreende a anatomia encefálica, uma estrutura envolvida no estabelecimento da comorbidade entre DN e DC e depressão é o CPFM. Esta região é de importância crucial tanto nos componentes afetivos, cognitivos como sensoriais, inerentes ao fenômeno nociceptivo. Alterações nessa área do neocórtex são relatadas em muitas condições de DNC, bem como em comorbidades relacionadas à dor, tais como ansiedade, depressão e prejuízos na cognição (EAGLE; MAZEI-ROBISON; ROBISON, 2016). Como já mencionado, o CPFM apresenta neurônios essenciais na regulação da plasticidade sináptica, afetando processos básicos de humor, cognição, aprendizagem e recompensa em condições de desequilíbrio (MURROUGH; ABDALLAH; MATHEW, 2017).

Outra estrutura na qual foi evidenciada alterações decorrentes da DNC é o Hd (AMELIA A. MUTSO, DANIEL RADZICKI, MARWAN N. BALIKI, LEJIAN HUANG, GHAZAL BANISADR, MARIA VIRGINIA CENTENO, JELENA RADULOVIC, MARCO MARTINA, RICHARD J. MILLER, 2012; APKARIAN et al., 2016). Em casos de depressão também já foi demonstrado alterações hipocampais, como a neurogênese no giro denteado reduzida, a diminuição da potenciação sináptica a longo prazo (LTP), e a facilitação da depressão sináptica de longo prazo (LTD), no modelo animal de estresse crônico de depressão leve (HOLDERBACH et al., 2007).

As alterações da formação hipocampal estão envolvidas com transtornos psiquiátricos e declínios cognitivos, influenciando processos como a memória. Dentre os tipos de memória está a de trabalho e a episódica. A memória de trabalho designa o processo que mantém ativada a representação de uma informação que é usada com frequência, por um breve período, caracterizando um processo cognitivo complexo, pois promove o processamento rápido de eventos contínuos (BADDELEY, 2010). A segunda memória, a episódica, é uma forma da chamada memória de longo-prazo e designa uma memória individual para eventos experienciados, lembrando o que

aconteceu, quando e onde (TULVING, 1985, 2002). A recordação se baseia em fatos e conceitos, qualquer evento constitui um episódio que é registrado por objetos, tempo e espaço, e elas também podem ser testadas através de modelos animais (BARAK; TSODYKS, 2014).

Neste sentido, o projeto visa esclarecer o papel da via córtex PrL/Hd sobre as alterações moleculares e psicofarmacológicas e os possíveis efeitos do CBD sobre estes aspectos, dando enfoque também no mecanismo de ação do composto. Considerando que a DCN se torna uma condição frequente, e também desafiadora, no que se diz respeito à origem e tratamento, assim como nas comorbidades desencadeadas por esta patologia, há necessidade de novos estudos que abordam as bases fisiopatológicas e psicofarmacológicas para o melhor entendimento da comorbidade entre DC e depressão, além da atenção e memória. O CBD, atualmente vem sendo muito investigado para avaliar seus efeitos no tratamento de diversas patologias neurológicas, tais como epilepsia, Parkinson e esquizofrenia (IBEAS BIH et al., 2015b). Modelos animais apontam eficácia do CBD em atenuar comportamento relacionado à ansiedade e pânico. Sendo assim, avaliaremos o efeito do CBD e se seu possível efeito em modelos animais que avaliam *déficits* de atenção e memória e depressão em animais com DNC.

1.5 Células da glia na dor crônica e comorbidades

Como anteriormente mencionado, a DC é resultado de um processo de alterações no sistema nervoso central e periférico. Estas alterações incluem reorganização cortical e neuroplasticidade mal adaptativa, aumento da atividade em áreas nociceptivas primárias, recrutamento de novas áreas corticais, modulação endógena modificada da dor, mudança neuroquímica e mudanças estruturais do córtex (SATOR-KATZENSCHLAGER, 2014).

Como elemento importante nestas alterações, os astrócitos são células da glia que se conectam formando um sincício funcional e também enviam projeções para neurônios, formando uma complexa rede de comunicação e modulação (REN; DUBNER, 2008). Um exemplo já demonstrado na literatura é seu papel na sinapse glutamatérgica, favorecendo uma produção neural amplificada e à evocação da hipersensibilidade a dor (REN; DUBNER, 2008).

De fato, as entradas aferentes primárias associadas à ativação do nociceptor após a lesão são necessárias para a ativação glial central, na qual pode ser mantida por sinais que são independentes. Não obstante, as glias podem contribuir para o processamento

da DN ao liberar diversas moléculas de sinalização. Dentre estes, a interleucina (IL) 1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α , prostaglandina E (PGe) e óxido nítrico (NO), que levam a respostas pró-inflamatórias com efeitos patológicos, como hiperexcitabilidade neuronal, neurotoxicidade e inflamação crônica (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Além disso, neurotransmissores e moduladores do glutamato, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), substância P e ATP liberado de terminais pré-sinápticos atuam não apenas nos receptores neuronais pós-sinápticos e podem interagir com receptores nos astrócitos e desencadear ativação glial (REN; DUBNER, 2008).

Neste contexto, as células da glia não apenas liberam substâncias como também responde a uma variedade delas. Em uma situação em que há lesão, células hematogênicas e mediadores inflamatórios circulantes podem penetrar na barreira hematoencefálica para participar das respostas gliais centrais à lesão. As citocinas inflamatórias como a IL-1 liberadas da glia, podem facilitar a transmissão da dor por meio de seu acoplamento aos receptores neuronais de glutamato. Essa sinalização neurônio-glia bidirecional desempenha um papel fundamental na ativação glial, na produção de citocinas e no início e manutenção da hiperalgesia (REN; DUBNER, 2008). Outra forma de sinalização neurônio-glia é através de íons. O aumento do K⁺ extracelular pode forçar um aumento da captação de K⁺ pelos astrócitos circundantes e levar a uma mudança na atividade; de fato, alterações iônicas decorrentes da atividade neuronal estão diretamente relacionadas a ativação glial (HANSSON, 2006).

Considerando também, condição fisiológica não patológica, os astrócitos são células fundamentais na manutenção do equilíbrio químico e eliminação de resíduos (sistema glifático) além ser parte integrante da sinapse. No que se refere diretamente a sinapse, participa da formação, maturação e manutenção de novas sinapses (JI; DONNELLY; NEDERGAARD, 2019). Neste contexto, estudos avaliando o papel dos astrócitos na transmissão da informação nociceptiva mostraram que estas células participam da modulação das respostas à dor em condições homeostáticas não patológicas (FOLEY; MCIVER; HAYDON, 2011).

Estudos que avaliaram a ativação de astrócitos corticais mostraram que no córtex cingulado anterior (Cg₁), a ativação pode contribuir para o desenvolvimento de um estado semelhante à dor crônica após a ligadura do nervo ciático em camundongos (KUZUMAKI et al., 2007). Yamashita e colaboradores (2014) propuseram que a ativação astrocítica está relacionada com a diminuição da concentração extracelular de

GABA por meio de um aumento na liberação de glutamato (YAMASHITA et al., 2014). Em outro estudo, o bloqueio da via de sinalização astrocítica mGluR5-Ca²⁺-TSP-1-1 suprimiu a alodinia mecânica, enquanto ativava esta via na ausência de qualquer alodinia de longa duração induzida por lesão periférica (KIM; KIM; NABEKURA, 2017).

Os astrócitos e citocinas pró-inflamatórias também estão associados ao processamento da aversão relacionada à dor e podem ser fatores cruciais na dimensão afetiva da dor em ratos (LU; ZHU; GAO, 2011). Apesar disso, mesmo desordens psiquiátricas, como a depressão, e a dor tendo componentes semelhantes, Burke e colaboradores (2013), demonstraram que podem envolver vias diferentes. Neste estudo, o modelo de depressão induzida por bulbectomia olfatória exibiu níveis aumentados de CD11b (marcador de macrófago/microglia), GFAP (proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócitos) e IL-1 β no CAMg, o que não ocorreu quando a DN foi induzida por ligadura do nervo espinal sozinha ou combinada com a bulectomia olfatória (BURKE et al., 2013).

Tomadas em conjunto, é possível concluir que as alterações da atividade neuronal resultante de uma lesão somadas as alterações astrogliais podem favorecer o processo de cronificação da dor. De fato, diversos mecanismos gliais podem contribuir para a cronificação da dor, e neste sentido, é importante ressaltar que as moléculas de sinalização envolvidas na ativação dos astrócitos também estão associadas ao desenvolvimento da dor crônica (KOYAMA, 2014). Neste sentido, o presente trabalho buscou entender o papel destas células na dor crônica e na comorbidade com desordens psiquiátricas, além do seu papel no efeito do canabidiol sobre esta comorbidade e na neuroplasticidade assim como na neurogênese hipocampal.

1.6 Canabidiol (CBD)

O CBD é um fitocanabinoide encontrado na planta *Cannabis sativa*, (MECHOULAM; HANUŠ, 2002) que vem sendo amplamente estudado e sua propriedade antinociceptiva evidenciada. No que se refere a dor, diversos estudos apontam que o tratamento com CBD em roedores submetidos a uma experiência dolorosa diminui a experiência nociceptiva (MLOST; BRYK; STAROWICZ, 2020). No estudo de De Gregorio e colaboradores (2019), foi demonstrado que o tratamento com baixa dose de CBD é capaz de prevenir a alodinia mecânica e aliviar o comportamento semelhante à ansiedade em um modelo SNI.

Os mecanismos de ação do CBD não estão totalmente esclarecidos, apresentando amplo espectro de atuações no sistema nervoso, incluindo receptores acoplados a proteína G, receptores ionotrópicos e transportadores (MLOST; BRYK; STAROWICZ, 2020). Dentre estes alvos, destaca-se o sistema endocanabinóide, o qual é composto por receptores do tipo CB (1 e 2), ligantes endógenos como a anandamida (AEA) além de enzimas (RAHN; HOHMANN, 2009). Os receptores CB₁ diminui a condutância do cálcio, diminuindo a excitabilidade neuronal, enquanto que os receptores do tipo CB₂ estimulam a atividade de MAP Quinase (GUINDON; HOHMANN, 2008). Em adição, o CBD também atua em outros receptores, como os opioides (KATHMANN et al., 2006), receptores de glicina (AHRENS et al., 2009), nicotínicos (MAHGOUB et al., 2013), além dos receptores serotoninérgicos (RUSSO et al., 2005; ZANELATI et al., 2010) e outras moléculas como algumas enzimas (IBEAS BIH et al., 2015a).

No que se refere ao sistema endocanabinóide, os receptores que o compõe são denominados CB₁ e CB₂, os quais estão envolvidos no processo nociceptivo (RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002). Neste contexto, outros estudos também mostraram o papel antinociceptivo do CBD, como o estudo de (ELPHICK e colaboradores (2001), no qual serão utilizados camundongos *knockout* para o receptor CB₁. Foi mostrado que, no teste de placa quente e no teste de formalina, animais *knockout* para o receptor CB₁ produzem hiperalgesia quando comparados com os animais selvagens (ZIMMER et al., 1999). Há relatos na literatura de que a ativação do sistema endocanabinoide atua via proteína Gi, inibindo, portanto, a adenilato-ciclase e canais de Ca⁺², o que reduz a excitabilidade neuronal e, por consequência, a liberação de neurotransmissores, como o GABA e o glutamato (FELDER et al., 1993; MACKIE; HILLE, 1992).

O receptor CB₁ é altamente expresso em algumas áreas do sistema nervoso central, sendo a porção ventral do CPFM uma região na qual se encontram este tipo de receptor canabinoide (HERKENHAM et al., 1991; TSOU et al., 1998). O agonista dos receptores CB₁, AEA, em altas concentrações também pode ativar receptores endovaniloides de potencial transitório do tipo 1 (TRPV₁) (DOS ANJOS-GARCIA et al., 2017), ligados a um canal iônico permeável ao cálcio que, ao contrário do CB₁, pode facilitar a liberação de glutamato (XING; LI, 2007). O mesmo agonista, quando administrado na medula espinal, pode reduzir ou aumentar a dor neuropática, por meio da ativação de receptor CB₁ ou TRPV₁, (STAROWICZ et al., 2007; STAROWICZ;

PRZEWLOCKA, 2012). Medeiros e colaboradores (2021), sugerem ainda que a divisão PrL está envolvido na potenciação e manutenção da alodinia mecânica por meio da ativação de receptores NMDA e TRPV₁ enquanto a atenuação desta alodinia depende da ativação do receptor CB₁ durante a NP (MEDEIROS et al., 2021).

Os receptores CB₁ também são expressos em células da glia, como os astrócitos (STELLA, 2010). Sua função está relacionada a regulação do metabolismo energético (BLÁZQUEZ et al., 1999) e sua ativação se relaciona com a redução de mediadores inflamatórios liberados por estas células (SHENG et al., 2005). Neste contexto, estes receptores podem ter papel regulatório importante em patologias do sistema nervoso.

Outro alvo do CBD são os receptores serotoninérgicos (5-HT), principalmente o do tipo 5-HT_{1A} (IBEAS BIH et al., 2015a). Este receptor está acoplado a proteína G, sendo mediador da neurotransmissão inibitória (SAIGAL et al., 2013). Tais receptores estão envolvidos na modulação de respostas estressantes e são alvos de estudos na busca de novos antidepressivos (PATERSON et al., 2013).

Estudos como o de Sigal (2013), sugerem que o CBD é um agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}. Em adição, o estudo de Sales e colaboradores (2018) mostrou a dependência dos níveis de monoaminas no tratamento de desordens psiquiátricas como a depressão. Foi demonstrado por Sales que o efeito do CBD é possivelmente via ativação de 5HT_{1A}, havendo uma facilitação mediada pelo endocanabinóide dos níveis locais de serotonina. Além disso, fora demonstrado que a administração sistêmica aguda de CBD aumentou os níveis extracelulares de 5-HT no córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC).

Nosso grupo de pesquisa tradicionalmente estuda o efeito do CBD, seja em modelos de analgesia induzida por comportamentos de ansiedade e pânico (DE FREITAS et al., 2013), por modelos de neuroplasticidade e neuroinflamação induzidas por lesão e hemorragia encefálica (ABRANTES DE LACERDA ALMEIDA et al., 2019), ou por modelos de DNC induzida por CCI (MALVESTIO et al., 2021). Acerca do estudo de dor e comorbidades, MALVESTIO e colaboradores (2021), evidenciou que o CBD no córtex PrL de animais CCI atenua a DNC e possui efeito antidepressivo via ativação de receptores do tipo CB₁ e 5-HT_{1A}.

Considerando os mecanismos de ação do CBD já propostos, a hipótese do estudo foi investigar a atuação positiva deste composto sobre a DN crônica e comorbidades com depressão e prejuízos na atenção/memória através da execução de modelos animais relacionados a prejuízos cognitivos e a depressão em animais com dor neuropática

crônica. Sendo assim, foi avaliado o seu efeito sobre os aspectos sensitivos e emocionais da dor considerando seu tratamento intra-hipocampal de animais com dor neuropática e crônica.

2. Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

Estudar as alterações morfológicas e moleculares na divisão pré-límbica (PrL) do córtex pré-frontal medial (CPFM) e na região CA₁ do hipocampo dorsal (Hd) decorrentes da neuropatia induzida pela CCI e o papel desta conectividade entre estas áreas nas respostas de comorbidade relacionadas com depressão e *déficits* cognitivos em animais com dor crônica de origem neuropática (DNC). Investigar também o efeito do canabidiol (CBD) tanto na DNC quanto nas comorbidades e seus possíveis mecanismos moleculares e farmacológicos de ação.

2.2 *Objetivos específicos*

- Investigar a possível conexão entre a subdivisão PrL do CPFM com o CA₁ do Hd, através de microinjeção do neurotraçador bidirecional não fluorescente biodextrana (BDA) na divisão pré-límbica (PrL) do CPFM;
- Investigar o efeito do CBD (15, 30 e 60 pmol) microinjetado no CA₁ sobre a resposta de alodinia mecânica (teste de von Frey) e alodinia ao frio (teste de acetona), em animais com DNC induzida por CCI;
- Investigar o efeito do CBD (15, 30 e 60 pmol) microinjetado no CA₁ sobre a comorbidade relacionada à depressão e sobre a comorbidade de DNC associada a prejuízos na memória em animais com DNC induzida por CCI;
- Avaliar o efeito do tratamento com CBD no CA₁ e o possível envolvimento de receptores endocanabinoides CB₁ e serotoninérgicos 5-HT_{1A} do córtex PrL, através do pré-tratamento com o antagonista WAY-100635 (0,37 nmol) e AM251 (100 nmol) no PrL/CPFM sobre as respostas de alodinia mecânica e ao frio, bem como sobre os aspectos cognitivos e emocionais animais com DNC induzida por CCI.
- Avaliar a alteração da ativação neuronal, através da expressão da proteína protooncogene c-FOS frente a estímulos térmico e mecânico em animais CCI, tratados com veículo ou CBD (60 pmol) no CA₁;
- Avaliar a neuroplasticidade neocortical e hipocampal através das alterações neuroanatômica a partir da presença de astrócitos frente a estímulos térmico e mecânico de animais CCI, tratados com veículo ou CBD (60 pmol) no CA₁;

➤ Avaliar os processos neurogênicos através da alteração da ativação da expressão de DCX (doublecortina) frente a estímulos térmico e mecânico de animais CCI, tratados com veículo ou CBD (60 pmol) no CA₁.

3. Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar Hannover machos, pesando aproximadamente 150 g (~40 dias), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto. Estes foram alojados no Biotério do Departamento de Neurociências e Ciência do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob um ciclo claro/escuro de 12/12 h, em temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (55%) controladas, com livre acesso à água e ração, disponibilizadas *ad libitum*. A manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (protocolo 215/2019). Os experimentos também foram realizados segundo as diretrizes da IASP para pesquisa com estímulos nociceptivos em animais (Zimmermann, 1983) e todos os esforços foram feitos para minimizar o desconforto dos animais.

3.2 Estudo Neuroanatômico

No estudo da anatomia conectiva entre PrL- Hd foi realizado a microinjeção de um neurotraçador bidirecional na região PrL. Para isso, os roedores (grupos independentes; n=6) foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1ml de cetamina a 10% (Agener, na dose de 90 mg/kg, i.p.) para 0,2ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10mg/kg, i.p.), e fixados no aparelho estereotáxico (David Kopf, USA) para microinjeção do neurotraçador não fluorescente biodextrana (BDA) de peso molecular 3.000 na divisão PrL do CPFM, segundo as coordenadas AP= 3,2mm, ML=0,2mm e DV= 2,2mm. O traçador foi injetado por via intracérebro (i.c.), diretamente na estrutura estudada, utilizando um sistema constituído de uma agulha gengival (30 G) acoplada a um fio de polietileno que, por sua vez, será acoplado a uma microseringa (Hamilton 10µL, EUA) movida por uma bomba de infusão com fluxo de 0,2 µL/min. A incisão foi então suturada e após 7 dias os animais foram perfundidos e seguidos os procedimentos de revelação por histoquímica.

A marcação por biodextrana foi visualizada usando-se o método da avidina-biotina (ABC standart Elite kit; Vector Labohamsterries) com reação 3-3'- diaminobenzidina (DAB; Sigma) peroxidase intensificada com níquel. As secções foram completamente lavadas em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4) após a incubação, montadas em lâminas de vidro revestidas com gelatina, contrastadas usando o método Nissl cresil violeta, e vistas sob um fotomicroscópio (AxioImager Z1, Zeiss). As áreas encefálicas analisadas incluíram o CPFM e o Hd.

3.3 *Indução da mononeuropatia periférica*

Para indução da neuropatia experimental foi adotado o modelo de constrição crônica do nervo isquiático (CCI), desenvolvido por Bennett and Xie (1988) adaptado para uma ligadura por Medeiros e colaboradores (2020a, 2021). Para isso, os animais foram anestesiados por via intramuscular (i.m) com uma solução de 0,1 mL de cetamina a 92 mg/kg para 0,2 mL de xilasina a 9,2 mg/kg. Foi realizada tricotomia da pata direita e a desinfecção com iodopolvidina. Em seguida, realizamos uma incisão longitudinal de 15 mm na altura da coxa, região dorso-lateral, em nível de trocanter/fêmur, no membro posterior direito. O nervo isquiático foi então exposto dissecando o músculo grande glúteo e bíceps femoral, realizando uma ligadura com o fio *Cat-gut* 4-0 na sua metade, na pata direita. Para os animais que passaram pela cirurgia CCI, foi feita uma única amarradura ao redor do nervo. As incisões na pele foram suturadas com o fio mononylon 5-0. O grupo controle (*Sham*) foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos, exceto a ligadura no nervo isquiático.

3.4 *Cirurgia estereotáxica*

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia na região CA₁ do Hd, seguindo as coordenadas estereotáxica (AP -3,6 mm; ML +2,8 mm; DV -2,0 mm) do atlas de Paxinos & Watson (1998) e outra cânula na subdivisão pré-límbica do córtex pré-frontal (AP 3,2 mm; ML +0,5 mm; DV -2.2 mm). Para isso, os animais foram anestesiados por via intramuscular (i.m) com uma solução de 0,1 mL de cetamina a 92 mg/kg para 0,2 mL de xilasina a 9,2 mg/kg. Em seguida o animal foi posicionado no estereotáxico e o crânio exposto. Em seguida a medição e perfuração do crânio, a cânula foi posicionada de acordo com as coordenadas de interesse. Para a fixação da cânula foi utilizado acrílico.

3.5 Fármacos

Os compostos utilizados foram injetados diretamente nas estruturas de interesse (PrL e Hd), utilizando um sistema constituído de uma agulha gengival (30 G) acoplada a um fio de polietileno que, por sua vez, será acoplado a uma microsseringa (Hamilton 10µL, EUA) movida por uma bomba de infusão com fluxo de 0,2 µL/min. No estudo neuroanatômico foi utilizado um traçador bidirecional do trato neural, a dextranamina biotinizada não fluorescente a 10% (BDA: 3.000 MW; Molecular Probes ; EUA), o qual foi microinjetado no córtex PrL de quatro animais. No estudo farmacológico foram utilizadas as concentrações de CBD 15, 30 e 60 nmol/200nL (~99.9 % pure;c5.0 µg/0.2 µl; THC-Pharm, Frankfurt, Germany, and STI Pharmaceuti-cals, Brentwood, UK), microinjetados na região CA₁ do Hd ou veículo (óleo de uva). Para o estudo de interação farmacológica, dos antagonistas WAY-100635 (0,37 pmol; Sigma/Aldrich, USA) e AM251 (100 pmol; (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) além de CoCl₂ (1nM; Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, USA) ou veículo, administrados no PrL. A concentrações foram definidas a partir da literatura (CBD: SONEGO et al., 2016; MALVESTIO et al., 2021; CoCl₂: DE FREITAS et al., 2014; MALVESTIO et al., 2021; WAY-100365: MARINHO et al., 2015; AM251: MEDEIROS et al., 2020c).

3.6 Testes nociceptivos

3.6.1 Von Frey

Para análise da alodinia mecânica foi utilizado o teste de von Frey (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) para avaliar o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico. Esse teste consiste em um conjunto de monofilamentos de nylon (Exacta™) de várias espessuras que exercem diferentes graus de força quando aplicados sobre a área glabra da pata. Neste sentido, o teste permite avaliar a magnitude de força necessária para evocar o comportamento de retirada da pata (CHAPLAN et al., 1994). Os animais foram individualmente colocados em caixas acrílicas, medindo 23x20x18 cm, dispostas sobre uma mesa com assoalho de grade de aço não maleável, com 5 mm² de espaço entre as malhas. Os filamentos do teste de von Frey foram então aplicados em ordem crescente de 2 a 100 g para a superfície plantar no centro da pata ou a base do terceiro ou quarto dedos da pata lesada ou controle através assoalho de grade por cerca

de 3-4 s para induzir o reflexo de retirada. O intervalo de tempo antes da aplicação do próximo filamento foi de pelo menos 10 s. Os dados foram expressos como limiar de alodinia mecânica em gramas (g). O limiar de von Frey foi avaliado antes do CCI ou procedimento Sham (linha de base 1: LB1) e antes e depois dos tratamentos farmacológicos LB2. Antes da cirurgia, foi confirmado que não houve diferenças nas respostas basais das patas direita e esquerda (von Frey, 1896, Vivancos et al., 2004), procedimento nomeado de LB1.

3.6.2 Acetona

Para a avaliação da alodinia ao frio foi empregado o teste de acetona (AC). No teste os ratos foram posicionados sobre uma plataforma (a mesma utilizada no teste de von Frey) na qual se tem acesso a superfície inferior da pata do animal. Para o teste, 0,5 mL de acetona a 100% foi ministrada na superfície plantar da pata traseira do rato, a partir de baixo da grelha. A aferência da nocicepção é dada por um *score* que consiste em 3 classes: 0 - nenhum movimento; 1 - movimento rápido e brusco da pata; 2 - movimento repetido de levantamento da pata; 3 - movimentação da pata seguida por lambida (FLATTERS; BENNETT, 2004). Se o animal esboçar algum comportamento no período de 20 segundos observa-se por mais 20s soma dos comportamentos esboçados em 40 segundo, repetidos em três tempos corresponde a medida nociceptiva do teste. Caso o *score* em 20s seja 0 não é necessário mais 20s.

3.7 Testes comportamentais

3.7.1 Teste nado forçado

Para a avaliação do comportamento do tipo depressivo, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF), descrito inicialmente por PORSOLT; LE PICHON; JALFRE (1977). Para isso, os animais foram colocados em uma câmara em forma de cilindro vertical cheia com água a 25 ° C e com uma profundidade de 20 cm (HU et al., 2009). O teste consiste em duas sessões, um pré-teste de 15 minutos seguido, após 24h, por um teste de 5 min. Imediatamente após cada sessão, os ratos são secos com uma toalha limpa e ambas as sessões são gravadas com uma câmera de vídeo (*Sony Handcam*), de forma que os vídeos possam ser analisados em um segundo momento utilizando o *software* XPLORAT. A análise envolve a pontuação de mobilidade (nadar, escalar, mergulhar) ou imobilidade. A imobilidade representa o enfiletamento passivo,

incluindo comportamento flutuante (rato flutuando na água sem se esforçar e fazendo apenas movimentos com a cauda e as patas necessárias para manter sua cabeça acima da água) e comportamento de congelamento (operacionalmente definido como ausência do corpo mova pelo menos 5 segundos, exceto o necessário para a respiração mantendo a cabeça acima da água). A mobilidade representa o enfrentamento ativo, e inclui comportamentos de (i) natação (com movimentos horizontais em toda a câmara de natação), (ii) comportamento de escalada (movimentos verticais das patas dianteiras) e (iii) comportamento de imersão (tentativas de escape, em que o mouse mergulha na parte inferior do cilindro) (MALVESTIO et al., 2021).

3.7.2 Teste de spray de sacarose

Para avaliação de outros componentes do comportamento do tipo depressivo, a apatia e anedonia, foi utilizado o teste de spray de sacarose. Este é baseado na frequência e tempo do comportamento de *grooming* após a vaporização de uma solução de sacarose a 10% na camada dorsal do animal. As sessões de higiene foram registradas, incluindo cuidados com o focinho (movimentos ao longo do focinho), lavagem da cabeça (movimentos semicirculares no topo da cabeça e atrás das orelhas) e higiene corporal durante 5 min (Kalueff e Tuohimaa, 2004).

3.7.3 Teste labirinto em Y

Para avaliação do componente cognitivo (memória de trabalho), um dos testes adotados foi o labirinto em Y. Este por sua vez consiste em três braços fechados convergindo em um centro triangular equilátero. Para o experimento, o animal foi posicionado no centro do aparato e o número de alternâncias espontâneas (definido como um número de entradas sucessivas de trigêmeos em cada um dos três braços sem qualquer entrada repetida) foi monitorado em uma sessão de teste de 5 min. Foi então calculada a porcentagem de alternância como a razão do número de alternâncias / (número total de entradas no braço -2) (MEDEIROS et al., 2020a).

3.7.4 Teste de reconhecimento de objetos (TRO)

O outro teste utilizado para avaliação da alteração cognitiva associada a dor neuropática crônica foi utilizado o teste de reconhecimento de objetos (TRO). Este teste comportamental fundamenta-se no comportamento exploratório espontâneo do roedor sendo possível avaliar memórias de trabalho e episódica. O teste consiste em três etapas: habituação, familiarização (aquisição) e escolha (evocação). Os animais são inseridos em uma caixa seguindo o seguinte protocolo: 1º dia, habituação por 20 minutos; 2º dia, habituação por 10 minutos seguido por exposição do animal ao aparato com os objetos idênticos A e A' por 5 min, retira-se o animal por 20 min e em seguida, reexposição do animal ao aparato com os objetos A e B por 5 min; 3º dia, exposição do animal ao objeto A e C por 5 min (BARBIERI et al., 2016) (Figura 3).

Os procedimentos do TRO foram filmados e gravados por uma câmera digital, e somente comportamentos como cheirar e tocar com as patas dianteiras definiram a exploração. Os dados foram apresentados na forma de index, resultante da fórmula: objeto A menos o objeto novo, dividido pela soma deles.

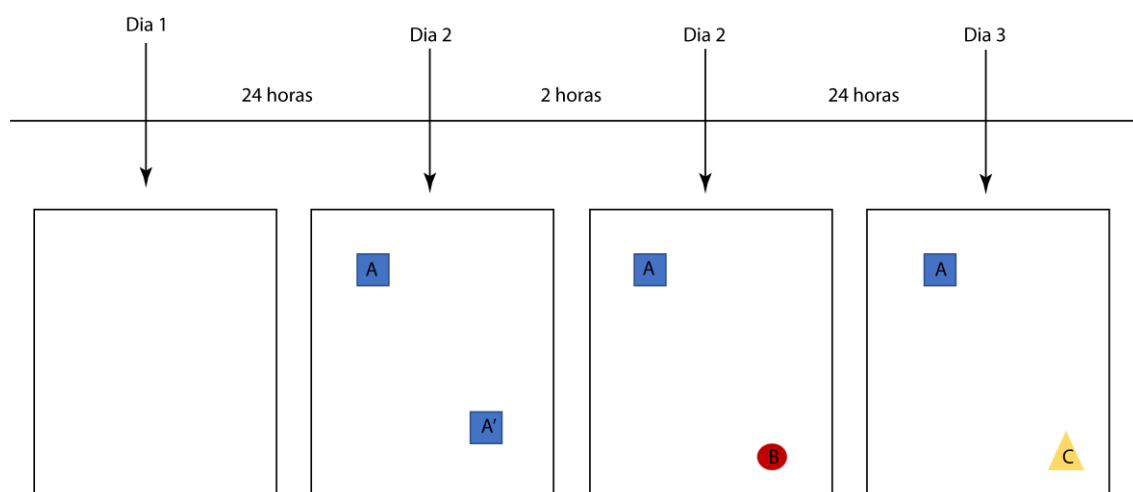


Figura 3: Esquema do protocolo adotado para o teste de reconhecimento de objetos.

3.7.5 Teste campo aberto

Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto para avaliação da capacidade motora do animal. Para isto, o animal foi posicionado em uma superfície rodeada por acrílico medindo 60 cm de diâmetro e com seu piso dividido em quadrantes, separando centro e borda. Durante 5 minutos foram avaliados o número de cruzamentos e número de levantamentos (MEDEIROS et al., 2021).

3.8 Processos histológicos

3.8.1 Perfusão

Para a fixação os animais, previamente anestesiados com uretano 25% foram submetidos a perfusão, utilizando PBS seguido por PFA a 4%, os quais foram administrados intracardiovascular com auxílio de uma bomba. Em seguida, os encéfalos foram retirados e pós-fixados em PFA a 4%, por 18 horas. Em seguida, os mesmos foram imersos em solução de sacarose a 30% e mantidos a 4°C por 96 horas, quando então foram incluídos em meio de congelamento (*Tissue-Tek; Jung, Alemanha*) e congelados em gelo seco e mantidos a -80°C. Posteriormente os encéfalos foram fatiados, com auxílio do criostato (*Leica*).

3.8.2 Coloração hematoxilina eosina

Para confirmação do sítio de microinjeção, os encéfalos foram cortados a uma espessura de 40 µm e posicionados em lâmina gelatinizadas. Em seguida, os mesmos foram submetidos a uma bateria de lavagens em álcoois em diferentes concentrações, bem como xilol, além dos corantes hematoxilina e eosina. As lâminas então foram observadas em microscópio (*AxioImager Z1, Zeiss, Oberkochen, Alemanha*) e fotografadas com auxílio do programa *ZEISS ZEN lite*.

3.9 Imunofluorescência

Para todas as marcações por imunofluorescência realizadas no presente trabalho, foram obtidas 8 lâminas de cada encéfalo contendo cortes seriados com espessura de 20 µm obtidas no criostato (*CM 1950 Leica, Wetzlar, Germany*). Em cada marcação as lâminas foram lavadas com tampão (*TBS 0,1M*) e em seguida incubadas em glicina (*0,2M*). Em sequência, após a lavagem as lâminas foram incubadas em *BSA 2%* para bloqueio de ligações inespecíficas. Após o bloqueio foi aplicado o anticorpo primário (*overnight*) e após as lavagens, o anticorpo secundário. Ao final as lâminas foram lavadas e cobertas com uma lamela de *Prolong com 4', 6-Diamidino-2 dicloridrato de -fenilindol (DAPI)* (*Life Technologies, Camarillo, CA, EUA*). As lâminas então foram observadas em microscópio (*AxioImager Z1, Zeiss, Oberkochen, Alemanha*) e fotografadas com auxílio do programa *ZEISS ZEN lite* para análise qualitativa e

quantitativa em aumentos de 10, 20 e 40x. As células marcadas positivamente foram contadas com o auxílio do programa ImageJ.

3.9.1 Marcação da proteína c-fos por imunofluorescência

Para a avaliação da atividade neuronal em resposta ao tratamento com CBD, foi realizado a coleta de material e análise da marcação de proteína c-FOS. Para isso, foi seguindo o procedimento experimental anteriormente descrito. Os animais passaram pela cirurgia de CCI, e após 14 dias pela cirurgia estereotáxica para implementação da cânula guia no Hd. Após os 7 dias de recuperação desta última cirurgia os animais foram tratados com CBD 60 pmol ou veículo e então realizados os testes nociceptivos de von Frey e acetona. Após 2 horas do tratamento os animais foram então anestesiados e perfundidos. Os encéfalos então foram removidos, processados para a obtenção de cortes congelados, como descritos acima. As seções foram incubadas em anticorpo primário anti c-fos (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) overnight e anticorpo secundário Alexa Fluor 594 (1:400, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA). Para a análise quantitativa do material, foram fotografados 5 campos no aumento de 20x em cada uma das áreas e adotado a soma como parâmetro.

3.9.2 GFAP e NeuN

As células da glia apresentam papel importante na gênese da dor. Dentre elas, os astrócitos são células que mostram importante papel em processos neuroplásticos relacionados a dor. Neste sentido, foi realizado a marcação por imunofluorescência destas células nas áreas do PrL e sub-área CA₁ do Hd. Neste estudo foi marcado a proteína fibrilar acídica glial (GFAP), encontrada em estruturas celulares de astrócitos, foi marcada com o anticorpo primário anti-GFAP (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA), seguido do anticorpo secundário Alexa Fluor 594 (1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). No mesmo material, a proteína *Neuronal Nuclei* (NeuN) presente em núcleos de neurônios e na região perinuclear (GUSEL'NIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015), foi marcada com o objetivo de confirmar a diferença entre células neuroniais e gliais. Para isso foi utilizado o anticorpo primário anti-NeuN (1:200; Abcam, Cambridge, Reino unido) e o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:400; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Por fim, as lâminas foram cobertas com uma

lamela de Prolong com 4', 6-Diamidino-2 dicloridrato de -fenilindol (DAPI) (Life Technologies, Camarillo, CA, EUA). Para a análise quantitativa do material, foram fotografados 5 campos no aumento de 20x em cada uma das áreas e adotado a soma como parâmetro.

3.9.6 DCX

O estudo da neuroplasticidade foi realizado a partir da marcação por imunofluorescência da proteína doublecortina (DCX). Para a avaliação da neurogênese em animais neuropáticos e a resposta ao tratamento com CBD, foi seguindo o procedimento experimental anteriormente descrito de imunofluorescência. Os animais passaram pela cirurgia de CCI, e após 14 dias pela cirurgia estereotáxica para implementação da cânula guia no Hd. Após os 7 dias de recuperação desta última cirurgia os animais foram tratados com CBD 60 pmol ou veículo e então realizados os testes nociceptivos de von Frey e acetona. Após 1 hora do tratamento os animais foram então anestesiados e perfundidos. Os encéfalos então foram removidos, processados para a obtenção de cortes congelados, como descrito acima. As seções foram incubadas em anticorpo primário anti DCX (1:1000; Abcam, Cambrige, Reino unido) overnight e anticorpo secundário Alexa Fluor 680 (1:2000; Abcam, Cambrige, Reino unido). Para a análise quantitativa do material, foram fotografados 5 campos no aumento de 20x em cada uma das áreas e adotado a soma como parâmetro.

3.10 Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média nos estudos comportamentais de alodinia mecânica. Os resultados da avaliação da alodinia mecânica e sensibilidade ao frio foram analisados através da análise de variância (*split-plot ANOVA*) para medidas repetidas, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de Tukey. O procedimento (microinjeção dos diferentes fármacos) foi considerado como fator independente, e as medidas do limiar de *von Frey*, tomadas em diferentes tempos, foram consideradas medidas repetidas. Os comportamentos relacionados a depressão e memória evocados pelos roedores com neuropatia foram analisados através do teste de análise de variância de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. O resultado obtido da contagem de células positivas para as imunomarcações foram analisadas

através do teste de análise de variância de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. As análises e gráficos foram obtidos no programa *Graph Pad Prism 8*.

3.11 Procedimentos experimentais

Investigação do efeito antinociceptivo do CBD

Animais foram tratados com CBD nas concentrações 15, 30 ou 60 pmol ou veículo (óleo de uva) diretamente no CA₁ do Hd 21 dias após a cirurgia CCI. Foram avaliados comportamentos relacionados a alodinia mecânica e alodinia ao frio através dos testes de von Frey e acetona, respectivamente.

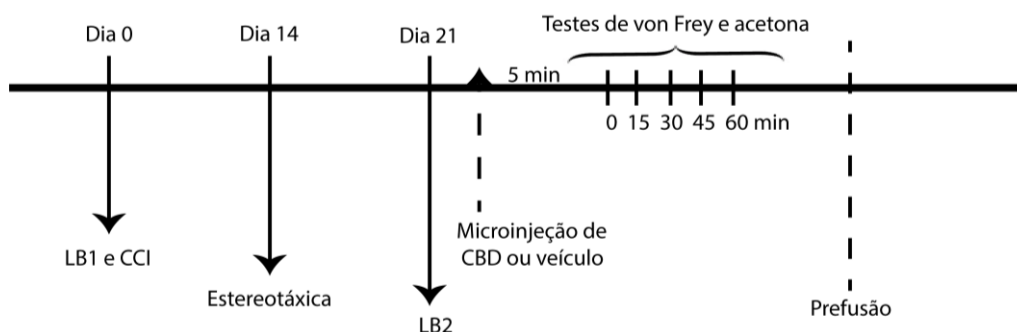


Figura 4: Desenho experimental do estudo do efeito antinociceptivo do CBD intra-CA₁.

Tabela 1: Grupos experimentais

GRUPO	TESTE	HD
VEÍCULO (SHAM)	VF/AC	Veículo
VEÍCULO (CCI)	VF/AC	Veículo
CBD (SHAM)	VF/AC	CBD
CBD [60PMOL] (CCI)	VF/AC	Veículo
CBD [15NPMOL] (CCI)	VF/AC	CBD
CBD [30PMOL] (CCI)	VF/AC	CBD
CBD [60PMOL] (CCI)	VF/AC	CBD

Estudo da interação farmacológica com pré-tratamento no córtex PrL seguido da microinjeção de CBD intra-CA₁

Animais foram tratados com CBD na concentração 60 pmol ou veículo (óleo de uva) diretamente no CA₁ e CoCl₂, WAY100635, AM251 ou veículo (salina) no PrL. Tal procedimento foi realizado 21 dias após a cirurgia CCI. Foram avaliados

comportamentos relacionados a alodinia mecânica e alodinia ao frio através dos testes de von Frey e acetona, respectivamente.

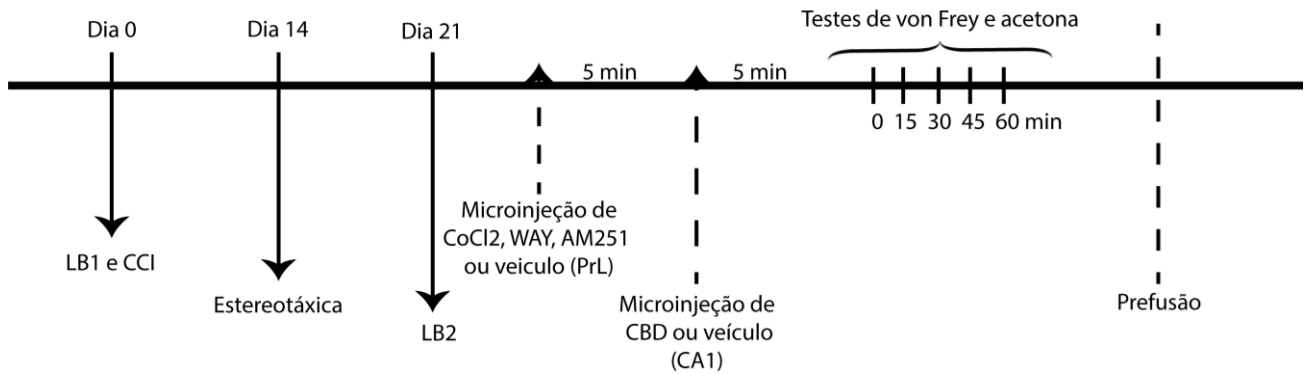


Figura 5: Desenho experimental do estudo do efeito antinociceptivo e interação farmacológica do CBD intra-CA₁ e CoCl₂, WAY, AM251 ou veículo intra-PrL.

Estudo do efeito do CBD sobre a comorbidade entre dor neuropática e cognição

Animais foram tratados com CBD na concentração 60 pmol ou veículo (óleo de uva) diretamente no CA₁ e CoCl₂, WAY100635, AM251 ou veículo (salina) no PrL. Tal procedimento foi realizado 21 dias após a cirurgia CCI. Foram avaliados comportamentos relacionados a depressão no teste de nado forçado (TNF) e teste de spray de sacarose (TSS); também o desempenho em tarefas mnemônicas a partir do teste de reconhecimento de objetos (TRO) e teste do labirinto em Y (TLY).

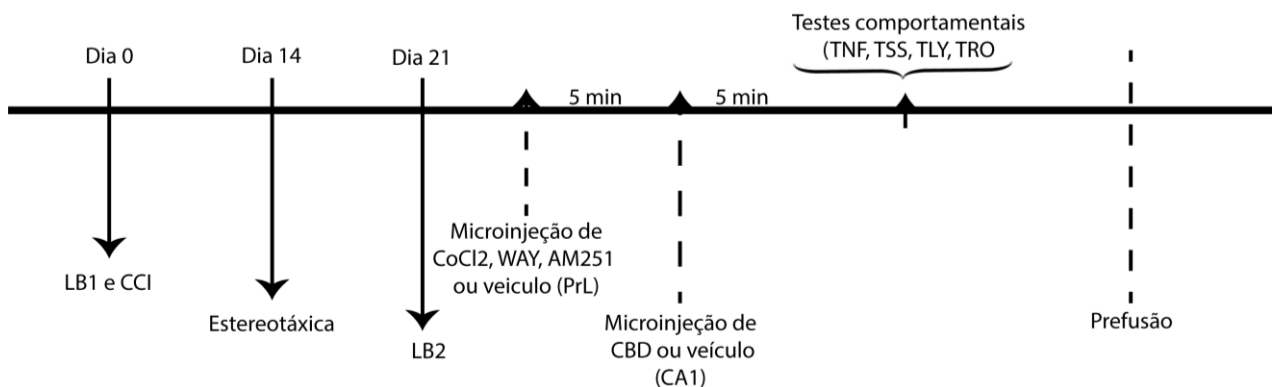


Figura 6: Desenho experimental do estudo do efeito do CBD intra-CA₁ sobre a comorbidade entre dor, depressão e prejuízo cognitivo, e a interação farmacológica, com CoCl₂, WAY, AM251 ou veículo intra-PrL.

Tabela 2: Grupos experimentais do estudo de interação farmacológica.

GRUPO	TESTE	HD	PRL
VEÍCULO (SHAM)	VF/AC	Veículo	Veículo
	TRO/TLY	Veículo	Veículo
	NF/SS/CA	Veículo	Veículo
VEÍCULO (CCI)	VF/AC	Veículo	Veículo
	TRO/TLY	Veículo	Veículo
	NF/SS/CA	Veículo	Veículo
CBD 60 (CCI)	VF/AC	CBD	Veículo
	TRO/YM	CBD	Veículo
	NF/SS/CA	CBD	Veículo
COCL2 [0,2 NL]/VE	VF/AC	Veículo	CoCl ₂
	TRO/YM	Veículo	CoCl ₂
	NF/SS/CA	Veículo	CoCl ₂
COCL2 [0,2 NL]/CBD60	NF/SS/CA	CBD	CoCl ₂
	VF/AC	CBD	CoCl ₂
	TRO/YM	CBD	CoCl ₂
WAY-100635 [0,37 PMOL]/VE	NF/SS/CA	CBD	CoCl ₂
	VF/AC	Veículo	WAY-100635
	TRO/YM	Veículo	WAY-100635
WAY-100635 [0,37 NMOL]/CBD60	NF/SS/CA	Veículo	WAY-100635
	VF/AC	CBD	WAY-100635
	TRO/YM	CBD	WAY-100635
AM251 [100 PMOL]/VE	NF/SS/CA	CBD	WAY-100635
	VF/AC	Veículo	WAY-100635
	TRO/YM	Veículo	WAY-100635
AM251 [100 PMOL]/CBD60	NF/SS/CA	Veículo	WAY-100635
	VF/AC	CBD	AM251
	TRO/YM	CBD	AM251
	NF/SS/CA	CBD	AM251

Estudo do efeito do CBD sobre a ativação neuronal através da proteína c-fos

Animais foram tratados com CBD na concentração de 60 pmol ou veículo (óleo de uva) diretamente no CA₁ do Hd 21 dias após a cirurgia CCI. Foram avaliados comportamentos relacionados a alodinia mecânica e alodinia ao frio através dos testes de von Frey e acetona, respectivamente. Após 2 hora do tratamento os animais foram perfundidos e o encéfalo coletado. O material então foi processado e realizado o procedimento de imunomarcagem por fluorescência da proteína c-fos.

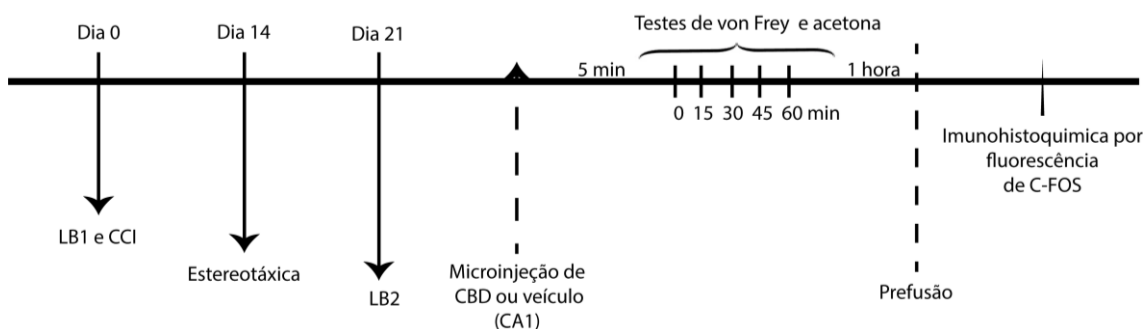


Figura 7: Desenho experimental do estudo do efeito do CBD intra-CA₁ sobre a ativação neuronal a partir da imunomarcagem da proteína c-fos.

Estudo do efeito do CBD sobre o número de astrócitos e neurônios em processo migratório

Animais foram tratados com CBD na concentração de 60 pmol ou veículo (óleo de uva) diretamente no CA₁ do Hd 21 dias após a cirurgia CCI. Foram avaliados comportamentos relacionados a alodinia mecânica e alodinia ao frio através dos testes de von Frey e acetona, respectivamente. Após 1 hora do tratamento os animais foram perfundidos e o encéfalo coletado. O material então foi processado e realizado o procedimento de imunomarcagem por fluorescência de GFAP e NeuN, além de DCX.

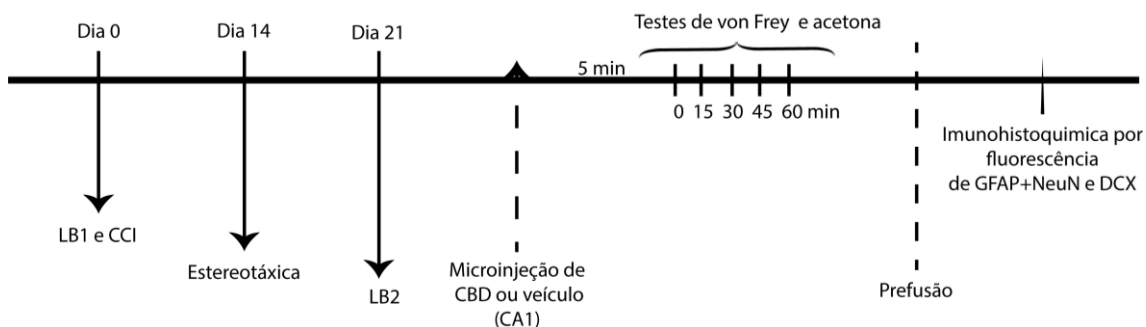


Figura 8: Desenho experimental do estudo do efeito do CBD intra-CA₁ sobre o número de astrócitos e neurônios em processo migratório a partir da imunomarcagem de GFAP e DCX, respectivamente.

4. Resultados

4.1 Estudo neuroanatômico

O uso da técnica de neurotraçamento, utilizando BDA 3.000 bidirecional, teve como objetivo a elucidação da conexão neural entre a divisão PrL do CPFM e a região CA₁ do Hd. As microinjeções de BDA não fluorescente na formação hipocampal foram restritas à divisão PrL do CPFM, conforme mostrado na 9A. Foi possível observar a marcação de corpos celulares e varicosidades na camada piramidal da região CA₁ do Hd, além de corpos celulares e fibras na camada de origens da mesma região (Figura 9B-C) indicando a reciprocidade da conexão entre córtex PrL e CA₁.

Além disso, encontramos neurônios positivos para o neurotraçador BDA nas regiões molecular e polimórfica do giro denteado (Figura 9D), além da região CA₂ e nas camadas molecular e piramidal (Figura 9E) do Hd. Ambas estruturas estão envolvidas na elaboração das emoções e no processamento de aspectos sensoriais, cognitivos e emocionais da dor crônica.

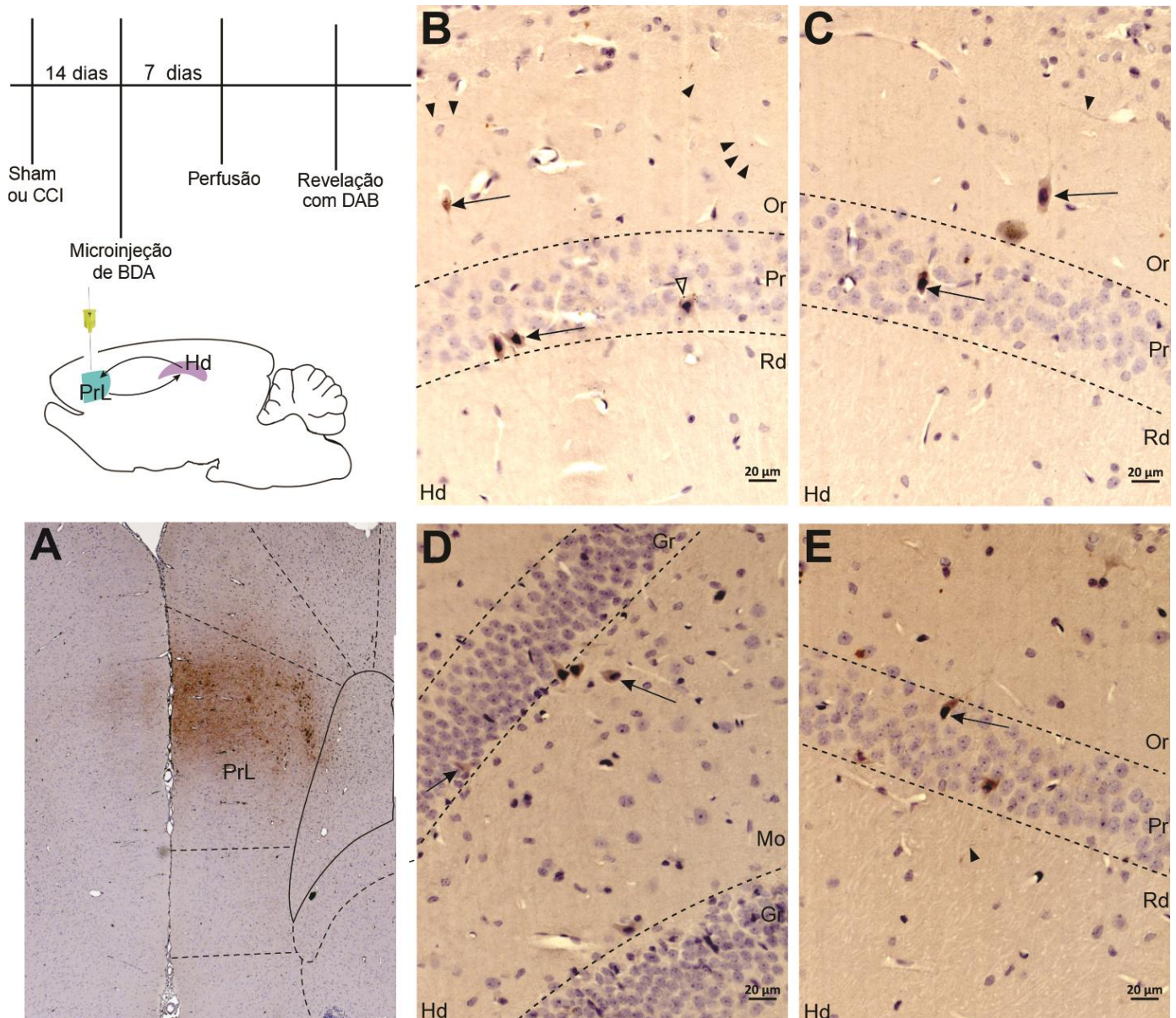


Figura 9: Fotomicrografias de seções transversais de córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal de *Rattus norvegicus*. (A) O prosencéfalo de rato Wistar em uma seção transversal, mostrando um local representativo de microinjeção de BDA em PrL. Fotomicrografia de um corte coronal representativo do CA₁(B e C), giro denteado (D) e CA₂ (E) em aumento de 40x, especificado em camadas, mostrando botões terminais (pontos pretos), fibras axonais (pontas de seta pretas) e corpos celulares (seta). (D) Fotomicrografia de um corte coronal representativo do giro denteado, em aumento de 40x, especificado em camadas, mostrando fibras axonais (pontas de seta pretas) e corpos celulares (seta).

4.2 Efeito antinociceptivo do CBD no CA₁ de animais com dor neuropática crônica

Inicialmente foi realizada a investigação do efeito do CBD sobre a alodinia mecânica e ao frio a partir da microinjeção de CBD (15, 30 ou 60 pmol) em CA₁. Foram considerados para análise apenas os animais cujos sítios de microinjeção correspondiam a área de interesse (CA₁) (Figura 10).

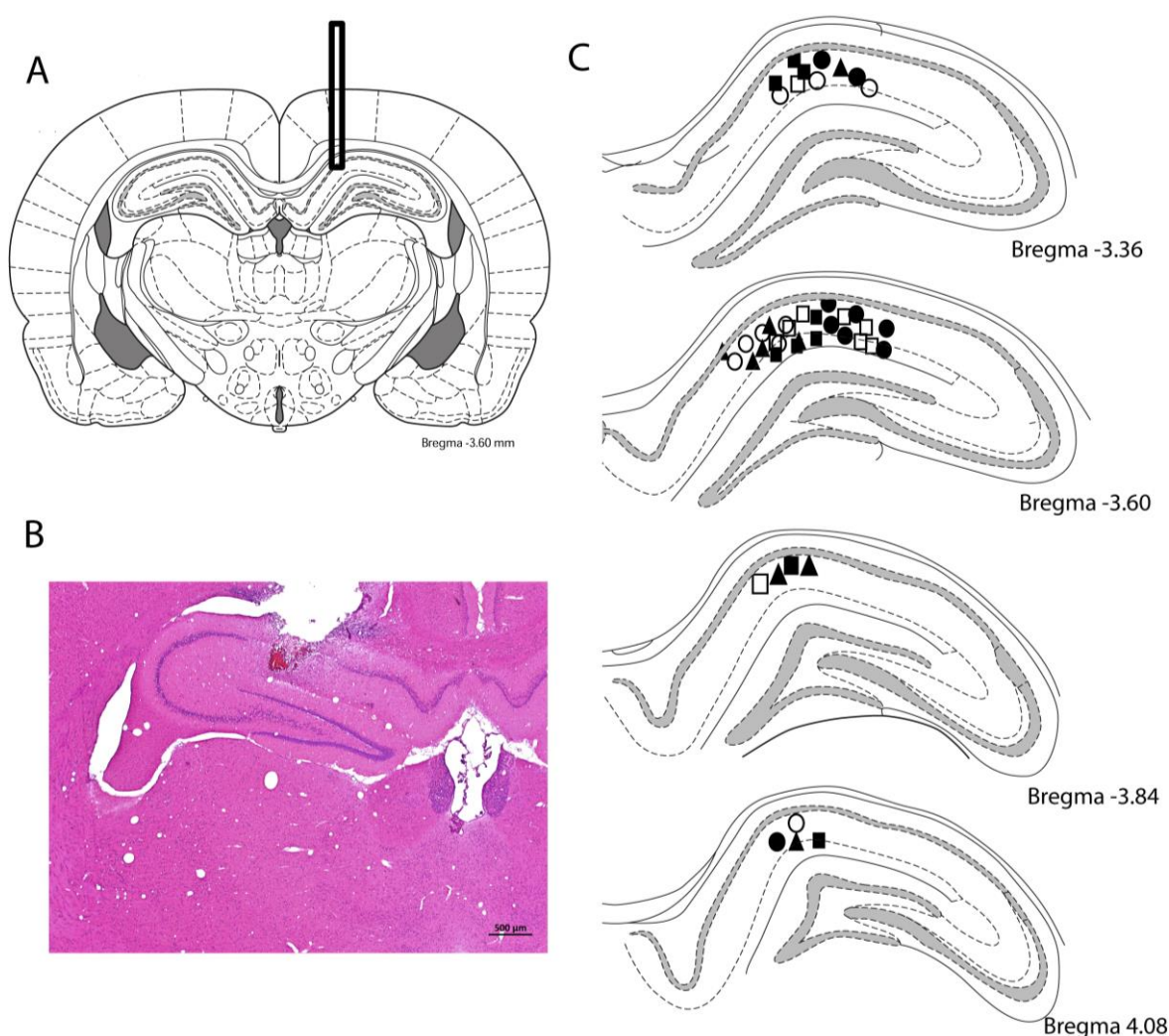


Figura 10: A. Representação esquemática dos sítios de microinjeção de drogas em CA₁. B. Fotomicrografia de campo claro do sítio de microinjeção. Coloração hematoxilina-eosina (HE). Aumento 5x. C. Representação dos sítios de microinjeção no CA₁ de acordo com os grupos experimentais: (○) veículo (CCI), (□) veículo (sham), (▲) CBD 15 pmol, (■) CBD 30 pmol, (●) CBD 60pmol atlas esterotáxico de Paxinos e Watson (2017).

De acordo com o teste ANOVA de duas vias, no teste de von Frey, a interação entre os fatores tempo e tratamento foi significativa ($F_{30, 240} = 13,54$; $p < 0,01$). O tratamento apresentou efeito significativo ($F_{5,40} = 70,059$; $p < 0,01$), bem como o tempo de tratamento ($F_{3,080, 123,2} = 7,445$; $p < 0,01$) (Figura 11A).

Por meio da análise do pós-teste Tukey é possível identificar que os limiares de alodinia mecânica dos animais CCI tratados com veículo no CA₁ foram significativamente maiores do que o limiar do grupo sham tratado com veículo intra-CA₁ ($p < 0,01$). Após o tratamento com CBD 60 pmol houve o aumento do limiar de alodinia mecânica quando comparado com o grupo CCI tratado com veículo nos tempos 5 a 30 minutos e 60 min (teste *post hoc* Tukey; $p < 0,001$). Contudo, nas concentrações 15 e 30 pmol, o CBD não alterou o limiar quando comparado com o grupo veículo (CCI) (teste *post hoc* Tukey; $p > 0,001$). O grupo sham tratado com CBD 60 pmol intra-CA₁ não apresentou diferença significativa em relação ao grupo sham tratado com veículo na mesma região.

Em relação ao teste de acetona, de acordo com o teste ANOVA de duas vias, a interação entre os fatores tempo e tratamento foi significativa ($F_{30, 204} = 7,904$; $p < 0,001$). O tratamento apresentou efeito significativo ($F_{5,34} = 33,38$; $p < 0,001$), bem como o tempo de tratamento ($F_{3,721, 126,5} = 37,94$; $p < 0,01$) (Figura 11B). Por meio da análise do pós-teste Tukey é possível observar que limiares alodinia ao frio aumentaram nos animais CCI tratados com veículo intra-CA₁ quando comparado ao grupo sham tratado veículo intra-CA₁ ($p < 0,01$). Em adição, é possível identificar aumento do limiar de alodinia ao frio após o tratamento com CBD 60 pmol, mas não 15 ou 30 pmol, intra-CA₁, de 0 a 60 minutos (Figura 10B) (teste *post hoc* Tukey; $p < 0,001$).

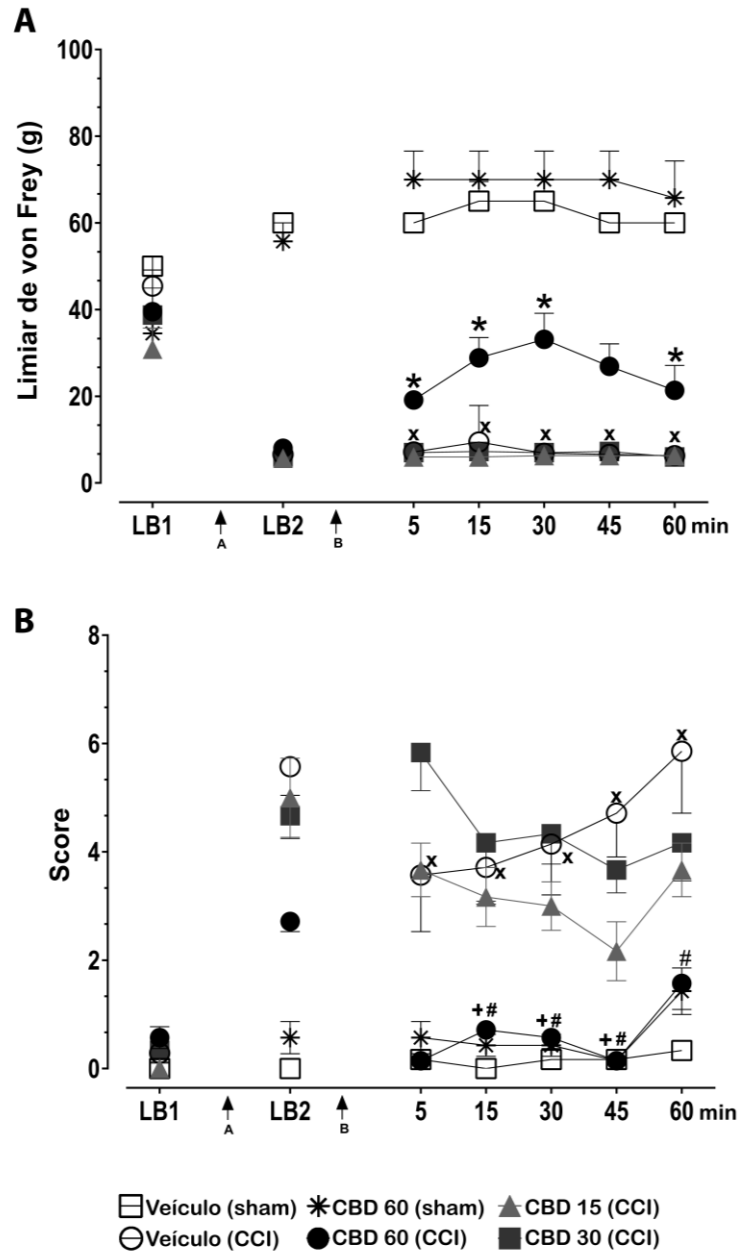
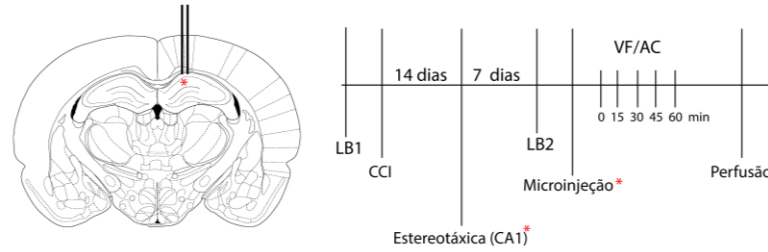


Figura 11: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-CA₁ de CBD nas concentrações 15, 30 e 60 pmol ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida pela injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático sobre os testes de von Frey (A) e acetona (B). Os dados são representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação aos demais grupos; [^]Diferença em relação aos grupos sham; + diferença em relação ao grupo tratado com veículo; # diferença em relação ao grupo tratado com CBD 30 pmol, de acordo com o pós-teste de Tukey (*p<0,05). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia CCI ou Sham; LB2: após 21 a CCI foi medida nova linha de base; Seta B: microinjeção. (n=9).

4.2 Estudo da interação farmacológica com pré-tratamento no córtex PrL seguido da microinjeção de CBD intra-CA₁

A partir do conhecimento da dose efetiva do CBD (60 pmol) em aumentar o limiar de alodinia mecânica e ao frio em animais CCI, foi realizado o estudo de interação farmacológica. Neste contexto, foi investigado a participação dos receptores 5-HT_{1A} e CB₁ do córtex PrL mediante o efeito do CBD microinjetado no CA₁ do hipocampo dorsal. Foram considerados para análise apenas os animais cujos sítios de microinjeção correspondiam a área de interesse (CA₁ e PrL) (Figura 12).

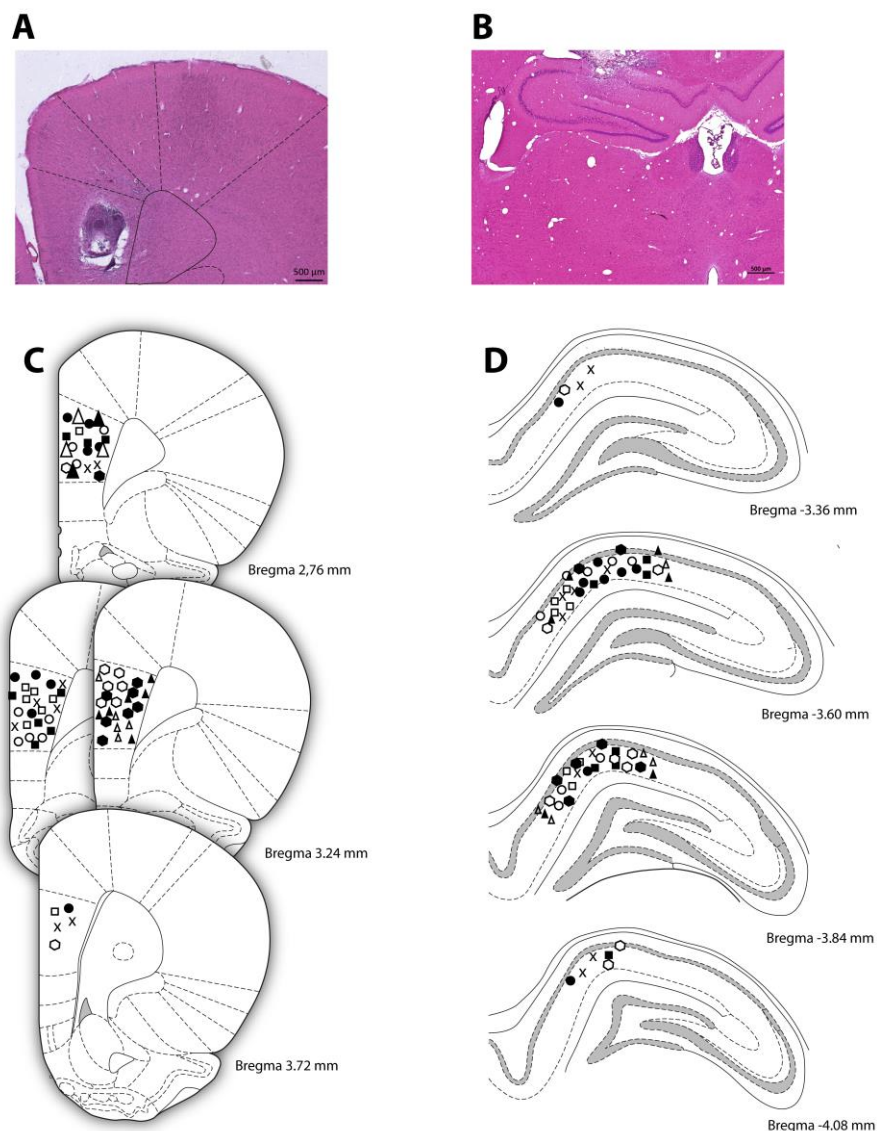


Figura 12: A. Representação esquemática dos sítios de microinjeção de drogas no PrL. B. Fotomicrografia do sítio de microinjeção no PrL. C. Representação esquemática dos sítios de microinjeção de drogas no CA₁. D. Fotomicrografia do sítio de microinjeção Coloração HE. Aumento 5x. C. Representação dos sítios de acordo com os grupos experimentais: (○) veículo (CCI), (□) veículo (sham), (●) CBD 60pmol, (x) Veículo+CoCl₂, (◐) WAY+Veículo, (△) AM251+Veículo, (◑) CoCl₂+CBD, (◒) WAY+CBD, (▲) CBD+AM251. atlas esteróxico de Paxinos e Watson (2017).

De acordo com o teste ANOVA de duas vias, no teste de von Frey, a interação entre os fatores tempo e tratamento foi significativa ($F_{48, 348} = 10,54$ $p < 0,01$). O tratamento apresentou efeito significativo ($F_{8,58} = 190,4$; $p < 0,01$), bem como o tempo de tratamento ($F_{2,733, 158,5} = 40,68$; $p < 0,01$) (Figura 13A).

Ainda sobre o teste de von Frey, por meio da análise do pós-teste de Tukey, os animais CCI tratados com veículo (PrL) + CBD (CA₁) tiveram o limiar de alodinia mecânica aumentado em relação ao grupo CCI tratado com veículo (PrL) + veículo (CA₁). O pré-tratamento com o bloqueador de sinapse, cloreto de cobalto (CoCl₂; 1nM) + CBD (CA₁) reduziu o limiar de alodinia mecânica em relação ao grupo tratado com veículo (PrL) + CBD (CA₁) ($p < 0,01$). Além disso, o pré-tratamento com antagonistas serotoninérgico (WAY-100635; 0,37 pmol) e endocanabinóide (AM251; 100 pmol) no PrL + CBD (CA₁) atenuou o limiar de alodinia mecânica em relação ao grupo tratado com veículo (PrL) + CBD (CA₁) ($p < 0,01$). O tratamento no PrL com CoCl₂, WAY ou AM251 mais veículo (CA₁) não apresentaram diferença em relação ao grupo veículo (PrL) + veículo (CA₁) (teste *post hoc* Tukey; $p > 0,05$). (Figura 13A).

Em relação ao teste de acetona, de acordo com o teste ANOVA de duas vias, a interação entre os fatores tempo e tratamento foi significativa ($F_{48, 294} = 7,176$; $p < 0,001$). O tratamento apresentou efeito significativo ($F_{8,49} = 19,16$; $p < 0,001$), bem como o tempo de tratamento ($F_{4,159, 203} = 106,4$; $p < 0,01$) (Figura 13B). Da mesma forma que descrito no teste anterior, os animais CCI tratados com veículo (PrL) + CBD (CA₁) tiveram o limiar de alodinia mecânica aumentado em relação ao grupo CCI tratado com veículo (PrL) + veículo (CA₁). O pré-tratamento com o bloqueador de sinapse, cloreto de cobalto (CoCl₂; 1nM) + CBD (CA₁) reduziu o limiar de alodinia mecânica em relação ao grupo tratado com veículo (PrL) + CBD (CA₁) ($p < 0,01$). Além disso, o pré-tratamento com antagonistas serotoninérgico (WAY-100635; 0,37 pmol) e endocanabinóide (AM251; 100 pmol) no PrL + CBD (CA₁) atenuou o limiar de alodinia mecânica em relação ao grupo tratado com veículo (PrL) + CBD (CA₁) ($p < 0,01$). O tratamento no PrL com CoCl₂, WAY ou AM251 mais veículo (CA₁) não apresentaram diferença em relação ao grupo veículo (PrL) + veículo (CA₁) (teste *post hoc* Tukey; $p > 0,05$). (Figura 13B).

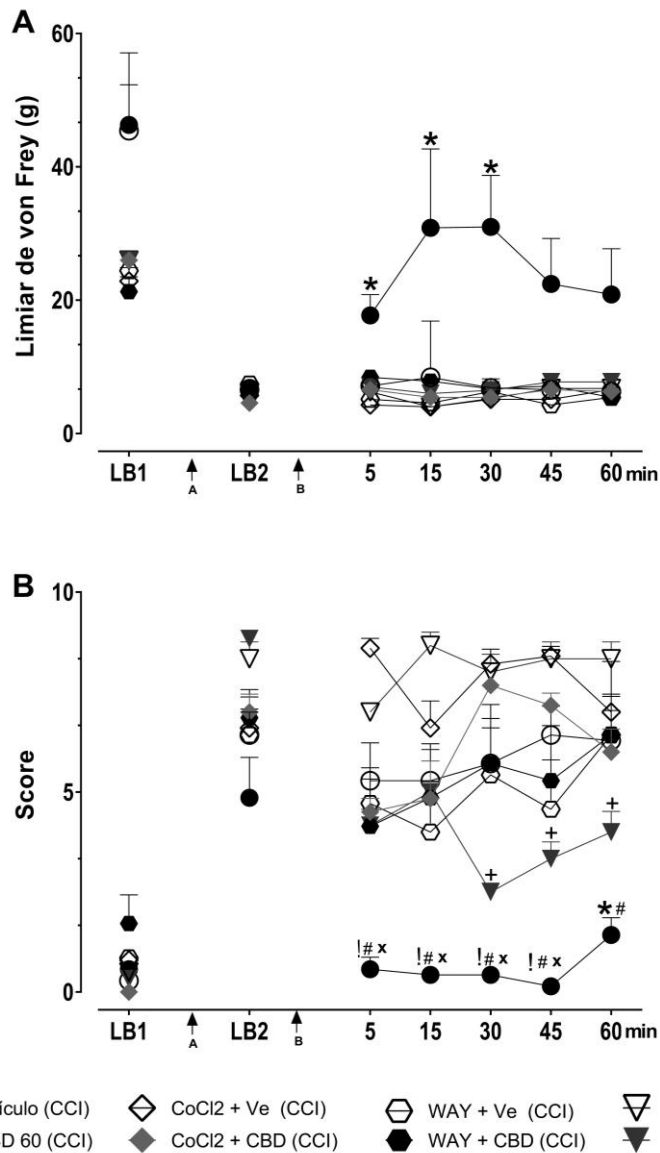
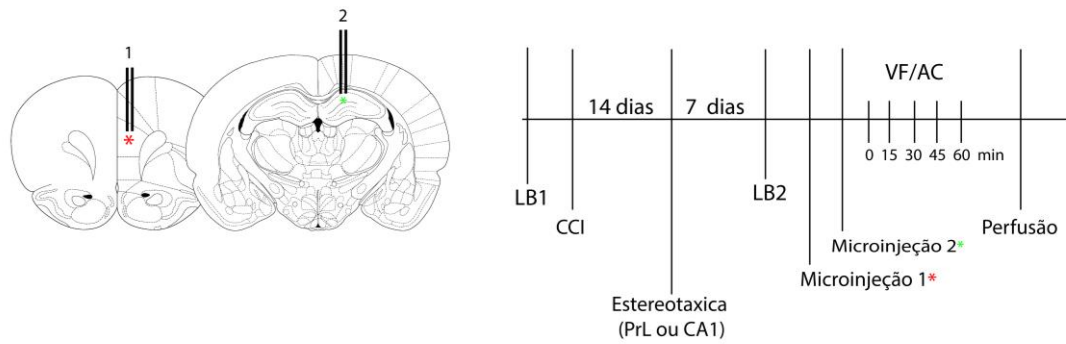


Figura 13: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e tratamentos no PrL com CoCl₂ (1nM), WAY-100635 (0,37 pmol), AM251 (100 pmol) ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) sobre o teste de von Frey (A) e acetona (B). Os dados foram representados por média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação aos demais grupos; ! diferença em relação aos grupos tratados com CoCl₂ no PrL; # diferença em relação aos grupos tratados com WAY no PrL; x diferença em relação aos grupos tratados com AM251 no PrL; + diferença em relação ao grupo AM251 + Ve (CCI), de acordo com o pós teste de Tukey (* $p < 0,05$). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia CCI ou Sham; LB2: após 21 a CCI foi medida nova linha de base; Seta B: microinjeção. (n=8).

4.3 Estudo do efeito do CBD sobre a comorbidade entre dor neuropática crônica e depressão

Além da avaliação dos componentes nociceptivos, foram avaliados comportamentos do tipo depressivo dos animais que passaram pela cirurgia CCI. Um dos testes utilizados foi o teste de nado forçado, no qual foi avaliado o enfrentamento ativo (mobilidade) e passivo (imobilidade) frente a uma situação de desespero, em animais com mononeuropatia periférica induzida pela CCI. Neste teste, a análise de variância de uma via mostrou que tanto em relação a frequência ($F_{8,72} = 19,07$; $p < 0,001$) quanto ao tempo ($F_{8,72} = 10,31$; $p < 0,001$) de natação houveram diferenças significativas entre os grupos (Figura 14A-B). Em relação ao comportamento de escalar, houve diferença significativa entre os grupos no que se refere ao tempo ($F_{8,76} = 7,29$; $p < 0,001$) e a frequência ($F_{8,72} = 8,34$; $p < 0,001$) (Figura 14C-D). Da mesma forma, a frequência ($F_{8,72} = 22,95$; $p < 0,001$) total dos comportamentos de mobilidade e o tempo ($F_{8,74} = 14,57$; $p < 0,001$) que os animais realizaram este comportamento (Figura 14E-F). Em animais CCI tratados com veículo o tempo de mobilidade foi menor em relação ao grupo sham que recebeu o mesmo tratamento (teste *post hoc* Tukey $p < 0,01$). Após o tratamento com CBD o tempo de mobilidade destes animais (CCI) foi maior em relação ao grupo veículo (CCI) (teste *post hoc* Tukey $p < 0,01$).

Ainda sobre o teste de nado forçado, mas em relação aos comportamentos de imobilidade, tanto a frequência ($F_{8,74} = 15,12$; $p < 0,001$) quanto o tempo ($F_{8,69} = 36,43$; $p < 0,001$) foram significativamente diferentes entre os grupos (Figura 15). Os animais que passaram pela cirurgia CCI e foram tratados com veículo no CA₁, apresentaram um aumento da imobilidade tanto em frequência (teste *post hoc* Tukey $p < 0,01$) quanto tempo (teste *post hoc* Tukey $p < 0,01$), caracterizando o comportamento do tipo depressivo associado a dor neuropática crônica. Tal efeito foi atenuado após o tratamento com CBD em CA₁ (60pmol), diminuindo a frequência (teste *post hoc* Tukey $p < 0,01$) e o tempo (teste *post hoc* Tukey $p < 0,01$) do comportamento de imobilidade. Quando microinjetado CoCl₂, ou os antagonistas WAY-100635 e AM251 no PrL de animais CCI, há um aumento do tempo de imobilidade (teste *post hoc* Tukey $p < 0,01$), mas não na frequência (teste *post hoc* Tukey $p > 0,05$) em relação ao grupo veículo (PrL) + CBD (CA₁). Em relação aos antagonistas, não houve diferença em relação ao grupo veículo (PrL) + veículo (CA₁).

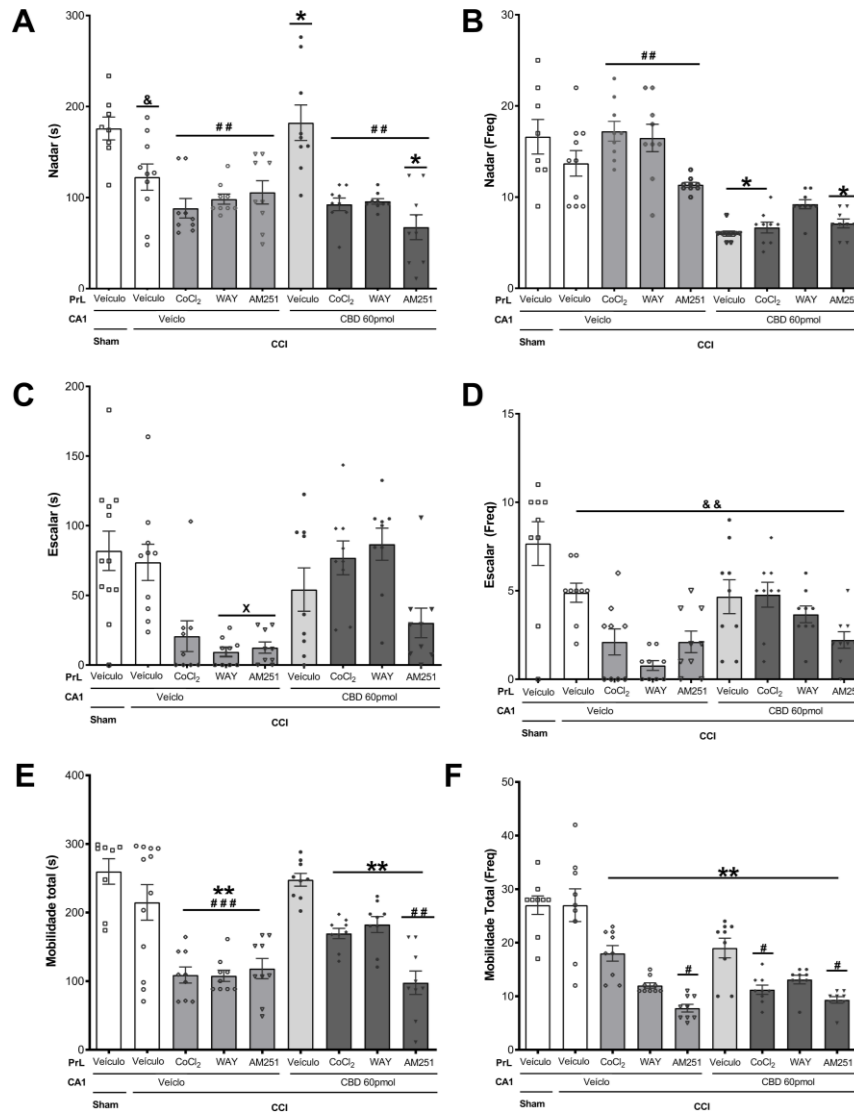
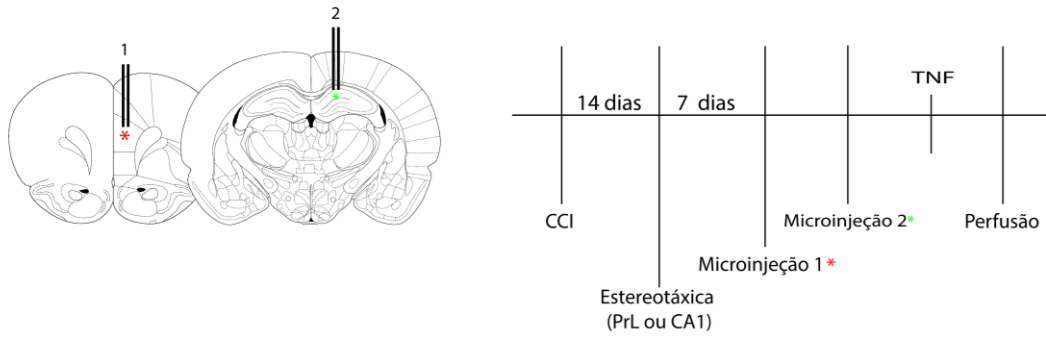


Figura 14: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre o tempo e frequência do comportamento de mobilidade no teste de nado forçado. Os dados foram representados por média e erro padrão da média. * P<0,05, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + veículo (PrL); #P<0,05, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + AEA 100pmol (PrL); + P<0,05 quando comparado com o grupo veículo (PrL) + AEA 200pmol (PrL), de acordo com o pós teste de Tukey (p<0,05; **p<0,01). (n=9)

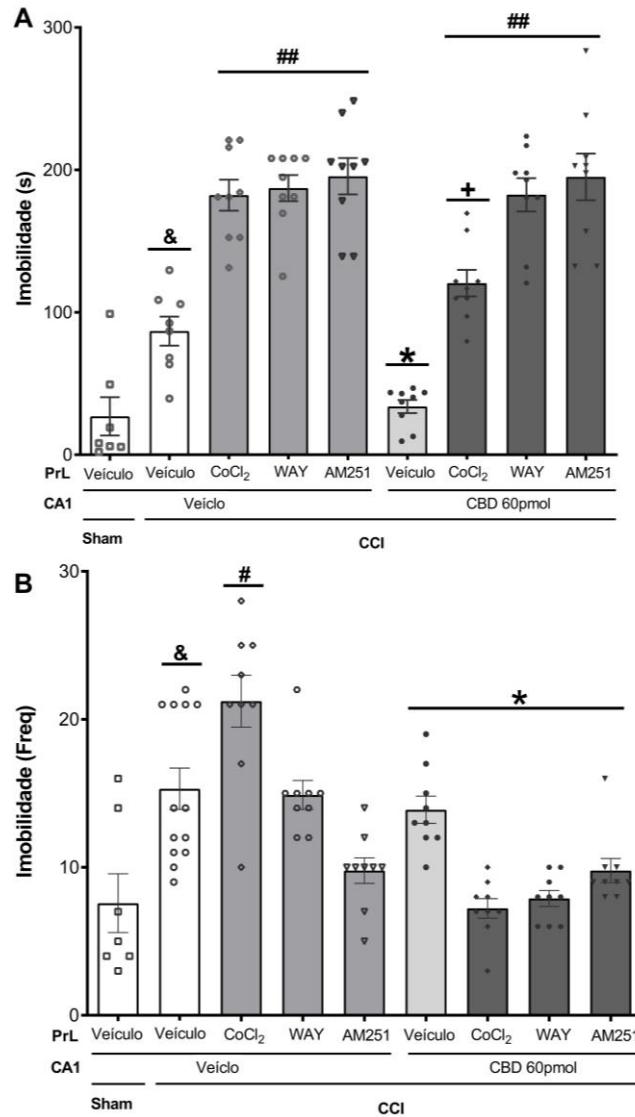
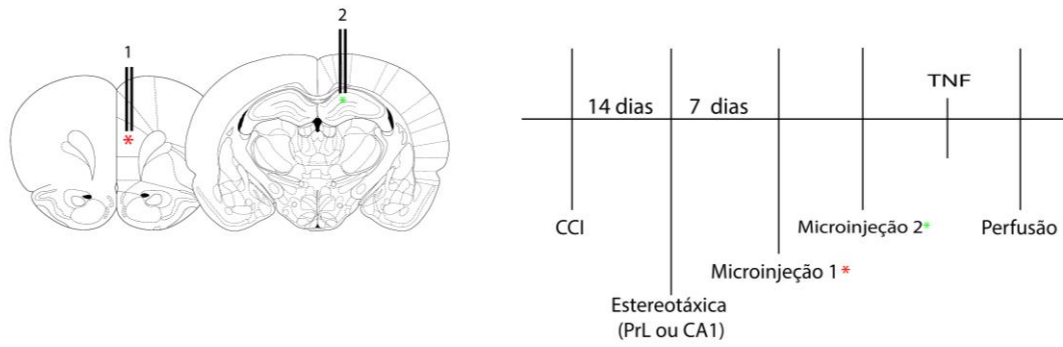


Figura 15: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre o tempo (A) e frequência (B) do comportamento de **imobildade no teste de nado forçado**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. & Diferença significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); #Diferença significativa em relação ao grupo tratado com CBD. + Diferença significativa em relação ao grupo CoCl₂+Veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($p < 0,05$; $**p < 0,01$). (n=9)

Outro teste utilizado para avaliação do comportamento do tipo depressivo foi o teste de spray de sacarose, aferindo comportamentos de apatia e anedonia. De acordo com o teste de análise de variância de uma via, a latência para o início da autolimpeza foi significativamente diferente entre os grupos ($F_{8, 72} = 7,440$; $p < 0,01$) (Figura 16A). Além disso, a frequência de autolimpeza dos animais no teste de spray de sacarose, foi significativa ($F_{8, 74} = 15,12$; $p < 0,01$), assim como o tempo ($F_{8, 69} = 36,43$; $p < 0,01$) (Figura 16B-C). Ainda neste teste, os animais que passaram pela cirurgia CCI e foram tratados com veículo em CA₁, apresentaram redução (teste *post hoc* Tukey $p < 0,001$) do comportamento de autolimpeza, caracterizando comportamento do tipo depressivo associado a dor neuropática crônica. Tal efeito foi atenuado após o tratamento com CDB na maior dose (60pmol) em CA₁, a partir do qual foi observado aumento do comportamento de autolimpeza em tempo, frequência bem como a redução da latência para início do comportamento (teste *post hoc* Tukey $p < 0,001$). A microinjeção de CoCl₂ ou dos antagonistas WAY-100635 e AM251 no PrL, enquanto veículo foi microinjetado no Hd, reduziu o tempo e a frequência dos comportamentos de autolimpeza (teste *post hoc* Tukey $p < 0,001$) bem como aumentou da latência (teste *post hoc* Tukey $p < 0,001$) quando comparado com o grupo veículo (PrL) + CBD (CA₁). A microinjeção de CoCl₂ no PrL seguido da microinjeção de CBD 60pmol no Hd aumentou o tempo de autolimpeza dos animais CCI em relação ao grupo CoCl₂ (PrL) + Veículo (CA₁) (teste *post hoc* Tukey $p < 0,001$) e reduziu a latência (teste *post hoc* Tukey $p < 0,001$). Em relação aos antagonistas, não houve diferença em relação ao grupo veículo (PrL) + veículo (CA₁).

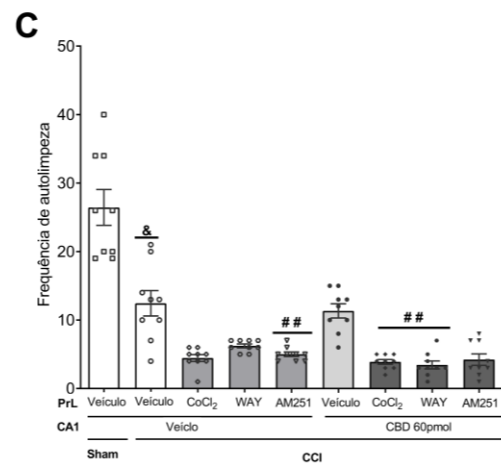
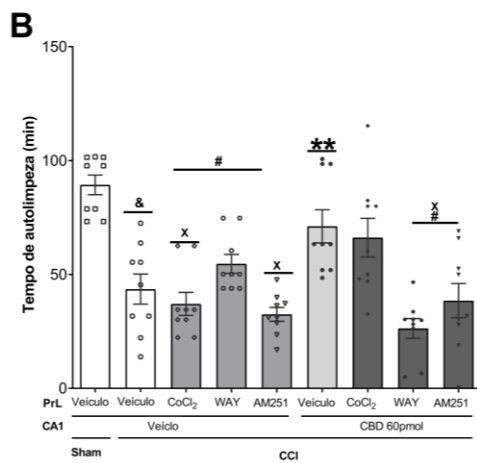
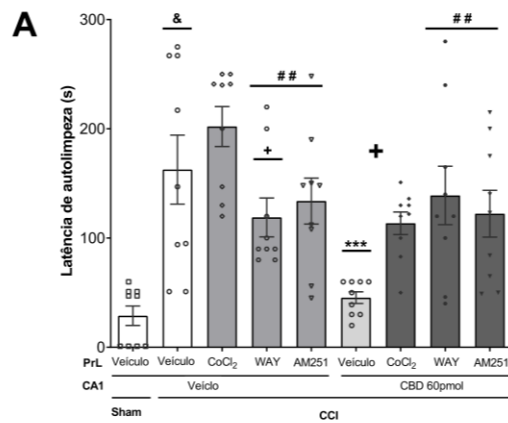
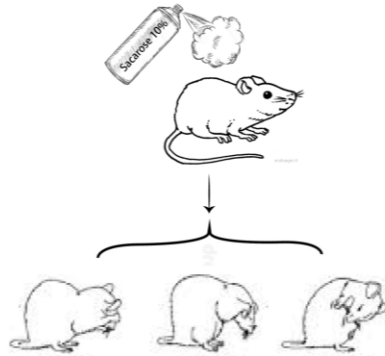
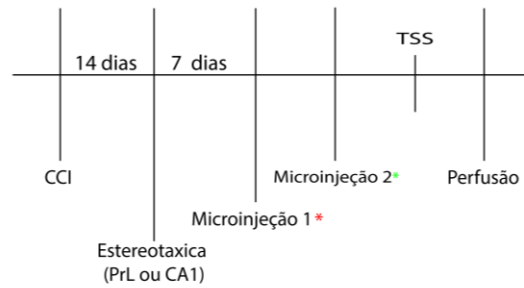
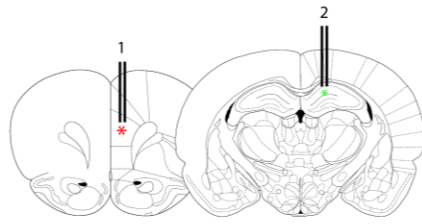


Figura 16: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre o comportamento de **autolimpeza**, frequência (A), tempo (B) e latência (C) no **teste de spray de sacarose**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. & Diferença significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); # Diferença significativa em relação ao grupo CBD; x Diferença significativa em relação ao grupo WAY+Veículo, de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=9)

4.4 Estudo do efeito do CBD sobre a comorbidade entre dor neuropática e cognição

De acordo com o teste de análise de variância de uma via, a alteração espontânea no teste de labirinto em Y foi significativamente diferente entre os grupos ($F(8, 54) = 7551$; $p < 0,001$) (Figura 17). Os animais que passaram pela cirurgia CCI e foram tratados com veículo em CA₁, apresentaram diminuição das alterações espontâneas (teste *post hoc* Tukey; $p < 0,001$). Tal efeito foi atenuado pelo tratamento com CBD na maior dose (60pmol) em CA₁, aumentando significativamente a porcentagem de alteração espontânea (teste *post hoc* Tukey; $p < 0,001$). A microinjeção de CoCl₂ assim como os antagonistas WAY-100635 e AM251 no PrL seguida pela microinjeção de veículo no Hd reduziu a alteração espontânea em relação ao grupo tratado com veículo no PrL e CBD (60pmol) no CA₁ (teste *post hoc* Tukey; $p < 0,001$). O tratamento prévio com estes antagonistas no PrL boqueou o efeito do CBD intra-Hd (teste *post hoc* Tukey; $p < 0,001$), o que não ocorreu quando o bloqueio das sinapses do PrL foi feito com CoCl₂ (teste *post hoc* Tukey; $p > 0,05$).

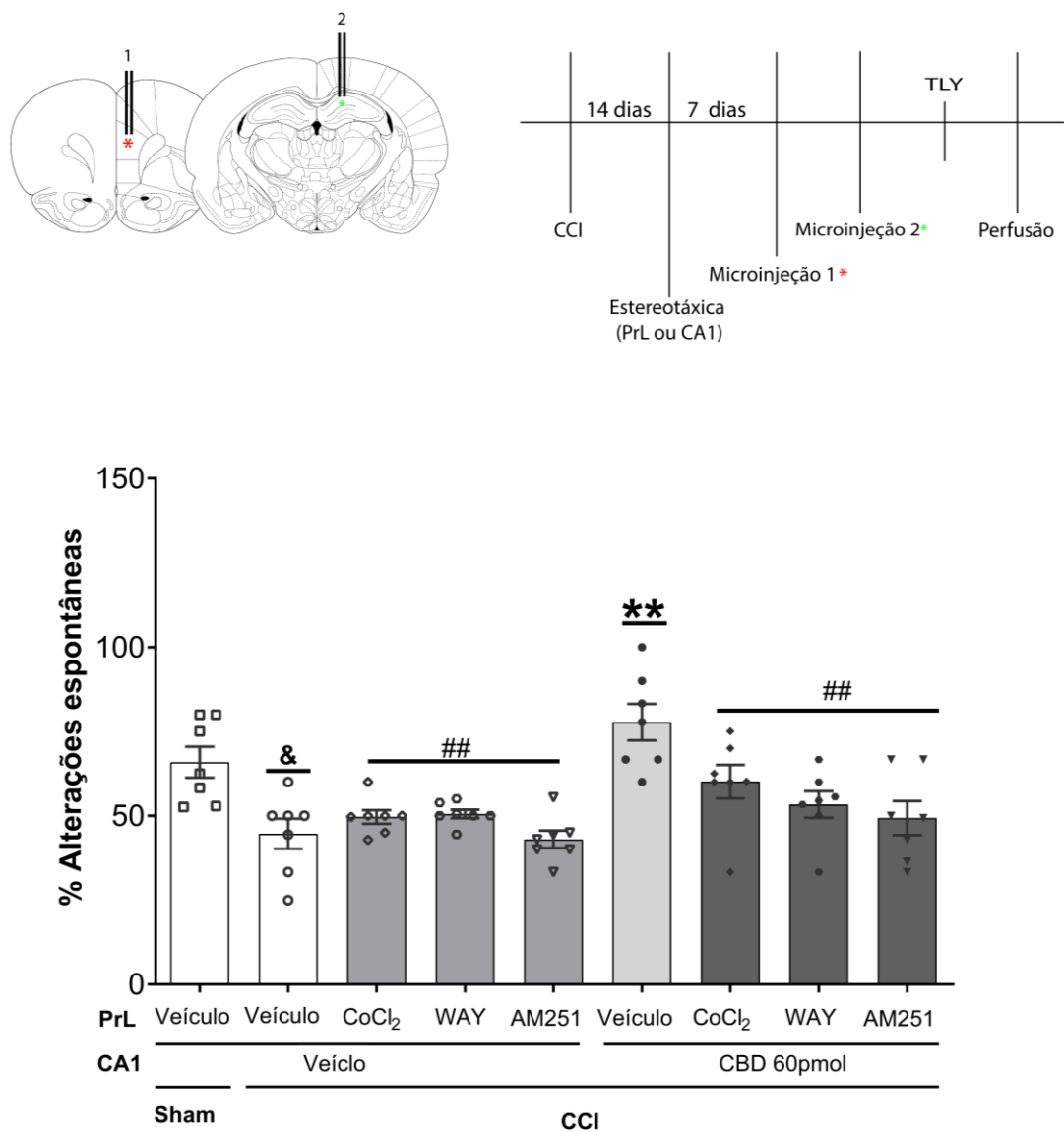


Figura 17: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre a **alteração espontânea** no teste **labirinto em Y**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. ** $p < 0,01$. & Diferença significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); #Diferença em relação ao CBD, de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=9)

Em relação a tarefa de reconhecimento de objetos, quando os animais foram expostos aos objetos A e B (objeto novo), não houve diferença entre os grupos sham e veículo ($t=0,9528$, $df=14$; $p > 0,05$) (Figura 18A). Tem isso em vista, o tratamento foi realizado antes da terceira etapa do teste, antes da exposição aos objetos A e C.

De acordo com o teste de análise de variância de uma via, a porcentagem de reconhecimento foi significativamente diferente entre os grupos ($F_{8,84} = 9,882$; $p < 0,01$) no que se refere ao reconhecimento do objeto C (terceira fase do teste) (Figura 18B). Os animais CCI exploraram de forma igual o objeto antigo (A) e o novo (C). De acordo com o pós-teste de Tukey, o índice dos animais CCI tratados com veículo foi significativamente menor em relação aos animais sham também tratados com veículo ($p < 0,01$). O tratamento com CBD não mostrou atenuar este resultado (teste *post hoc* Tukey; $p > 0,05$). O tratamento prévio no PrL com CoCl_2 bem como antagonistas WAY-100635 e AM251 no PrL e CBD no CA_1 , mantiveram o índice negativo, sem diferença em relação ao grupo veículo (PrL) + CBD (CA_1) e significativamente diferente do grupo sham. Em relação aos grupos CCI tratados com CoCl_2 ou antagonistas WAY-100635 e AM251 no PrL mais veículo no CA_1 não apresentaram diferença em relação ao grupo CCI tratados com veículo (PrL) + veículo (CA_1).

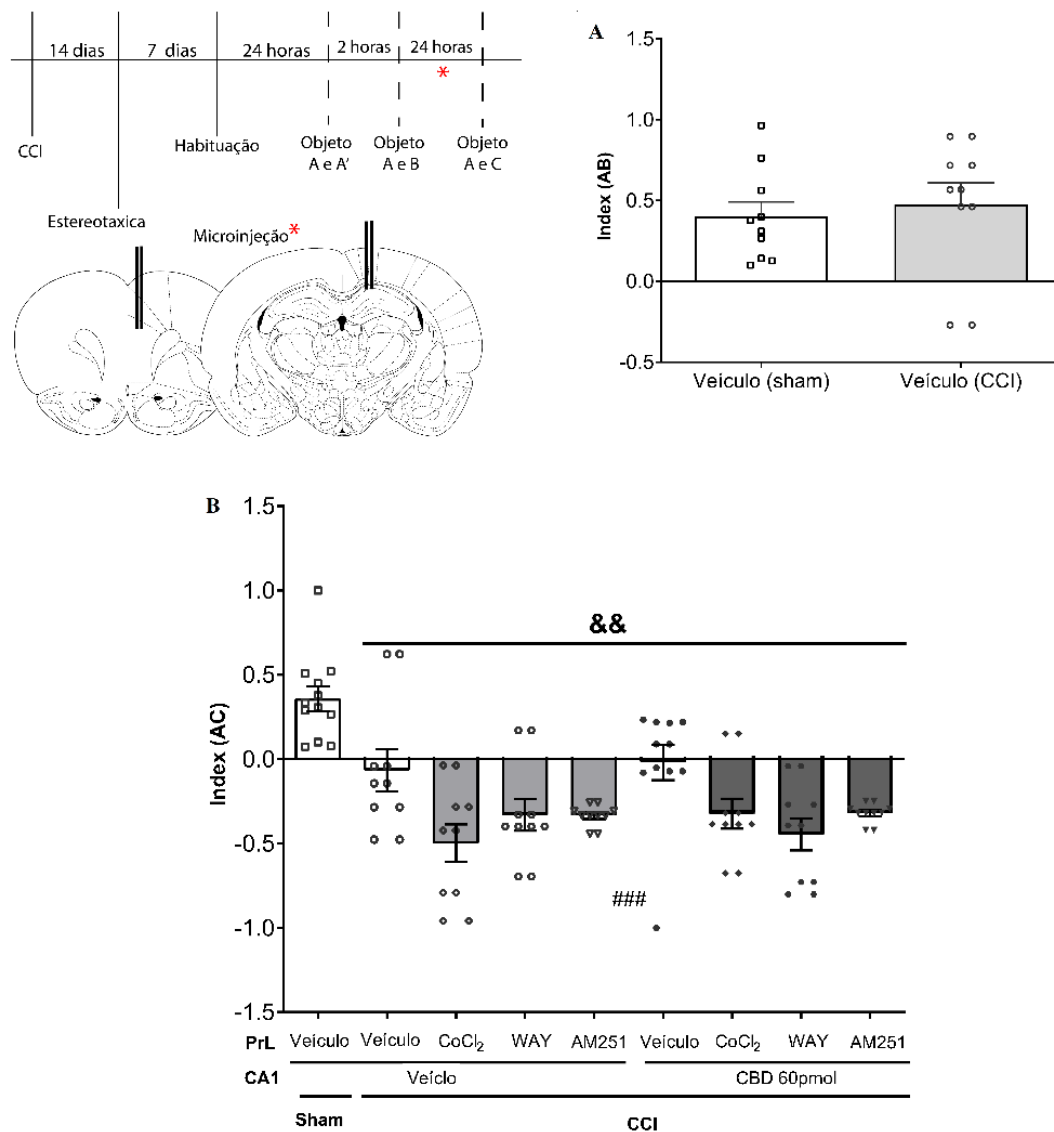


Figura 18: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl₂, WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre **a tarefa de reconhecimento de objetos** (A). B. Index. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. & Diferença significativa em relação ao grupo Sham (Sh); *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve); # Diferença significativa em relação ao CBD (60pmol), de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=9)

4.5 Efeito da CCI e dos tratamentos sobre a capacidade locomotora no teste de campo aberto

Para avaliação da capacidade locomotora dos animais foi utilizado o teste de campo aberto (Figura 19). De acordo com o teste de análise de variância de uma via, houve diferença na locomoção (levantamentos e cruzamentos) dos animais ($F_{4, 19} = 9,935$; $p < 0,05$). Foi possível identificar que a cirurgia CCI não altera a locomoção dos animais assim como o tratamento com CBD, isso porque não houve diferença entre estes grupos (teste *post hoc* Tukey; $p > 0,05$). Entretanto a locomoção dos animais tratados com CoCl_2 no PrL e veículo no Hd foi significativamente maior que o grupo que recebeu microinjeção de veículo em ambas regiões (teste *post hoc* Tukey; $p < 0,05$).

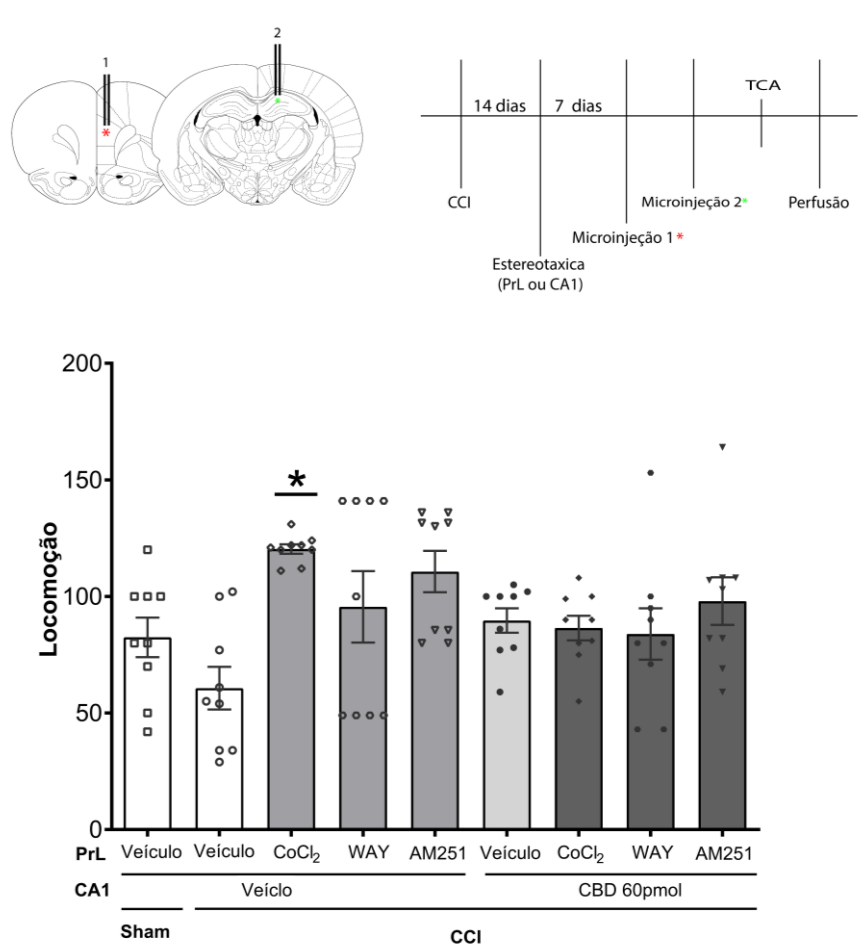


Figura 19: Gráfico representativo do efeito de microinjeções intra-Hd de CBD 60 pmol ou veículo e intra-PrL de CoCl_2 , WAY-100635 e AM251 ou veículo em ratos Wistar com dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo isquiático sobre a **locomoção** total no teste de **campo aberto**. Os dados foram representados pela média e erro padrão da média.; *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (Ve), de acordo com o pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$). (n=9)

4.6 Estudo do efeito do CBD sobre a ativação neuronal através da proteína c-fos

Uma vez conhecido o efeito do CBD sobre a dor, foi investigado o substrato neural que possivelmente são ativados na elaboração do efeito produzido pelo CBD. Para a avaliação da ativação neuronal decorrente do tratamento com CBD, foi quantificado o número de neurônios positivos para a marcação da proteína c-fos nas regiões CA₁ (Figura 20) e PrL (Figura 21).

De acordo com o teste de análise de variância de uma via, houve diferença entre os grupos em relação ao número de células imunomarcadas para a proteína c-fos tanto em CA₁ ($F_{3,16} = 41,18$; $p < 0,01$) quanto no córtex PrL ($F_{3,16} = 5,85$; $p < 0,01$).

No que se refere a área de microinjeção (CA₁) foi observado um aumento no número de células ativadas em animais CCI tratados com veículo em relação aos grupos sham tratados tanto com veículo quanto com CBD 60 pmol (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos sham tratados com veículo ou CBD 60 pmol. O tratamento com CBD 60 pmol no (CA₁) em animais neuropáticos aumentou o número de células marcadas com a proteína c-fos em comparação ao grupo de animais neuropáticos que receberam veículo (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$).

Em relação a ativação cortical, foi observado que os grupo sham tratados com veículo e sham tratado com CBD 60 pmol apresentaram aumento significativo no número de células marcadas em relação ao grupo naive (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$). Em relação aos grupos sham tratados com veículo ou CBD 60 pmol, não houve diferença. Os animais que passaram pela cirurgia CCI e foram tratados com veículo, apresentaram aumento significativo no número de neurônios marcados em relação ao grupo sham tratado com veículo (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$). O tratamento agudo com CBD 60 pmol em CA₁ foi capaz de reduzir o número de células marcadas no PrL de animais neuropáticos após uma hora e relação ao grupo CCI tratado com veículo (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$).

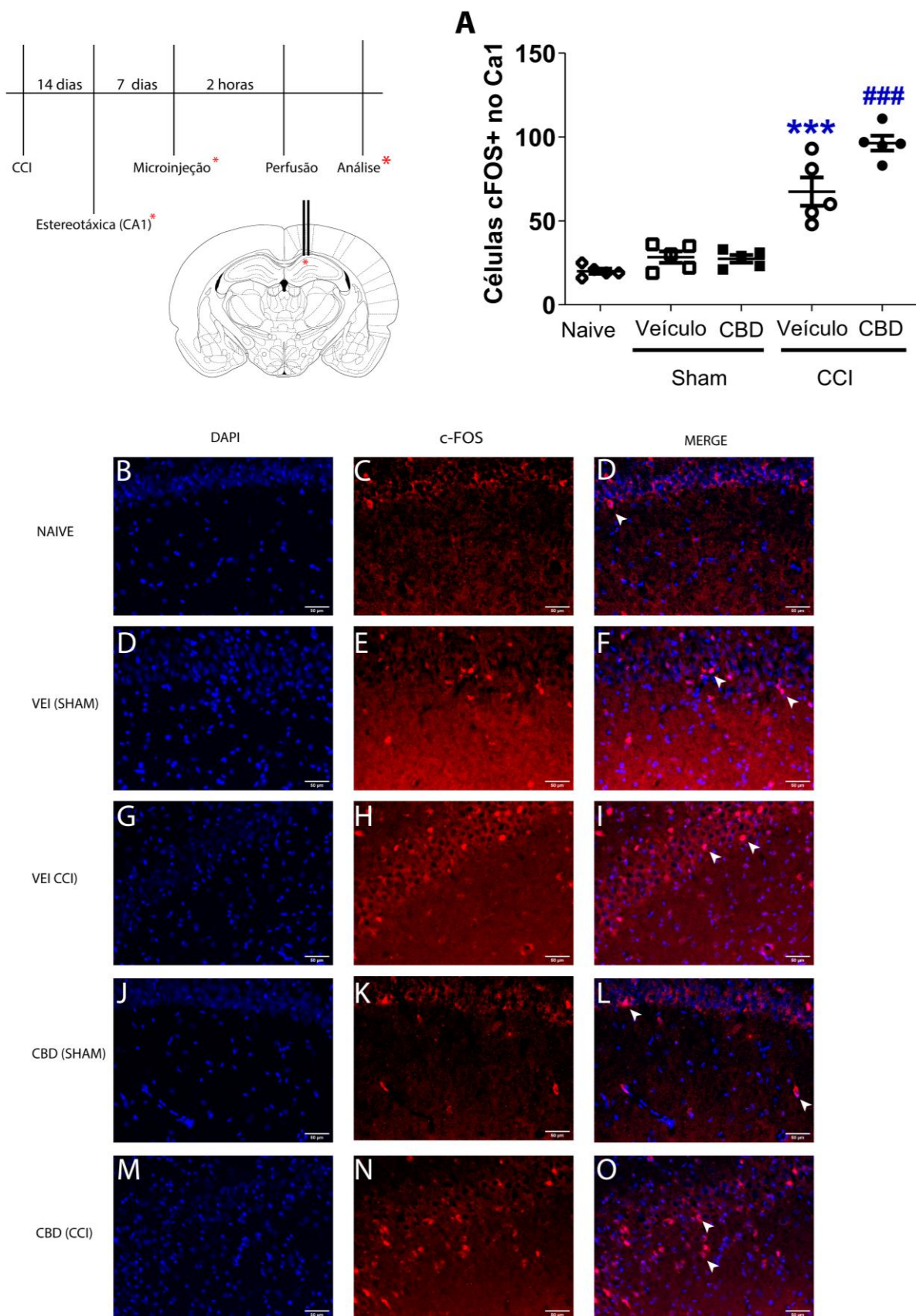


Figura 20: Efeito do CBD 60 pmol sobre a ativação neuronal em CA₁. A. Gráfico representativo do número de células positivas para c-FOS (setas). Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (B-O). (n=5)

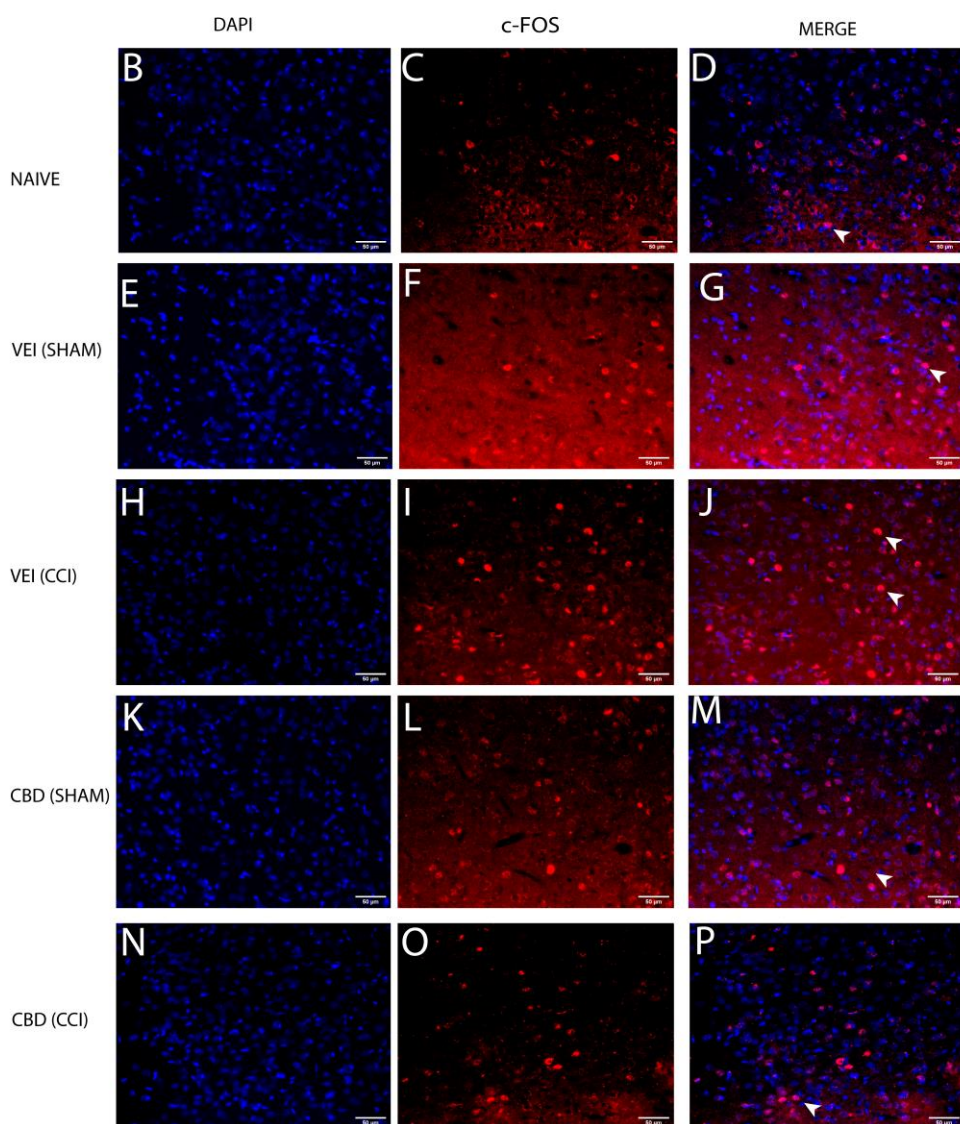
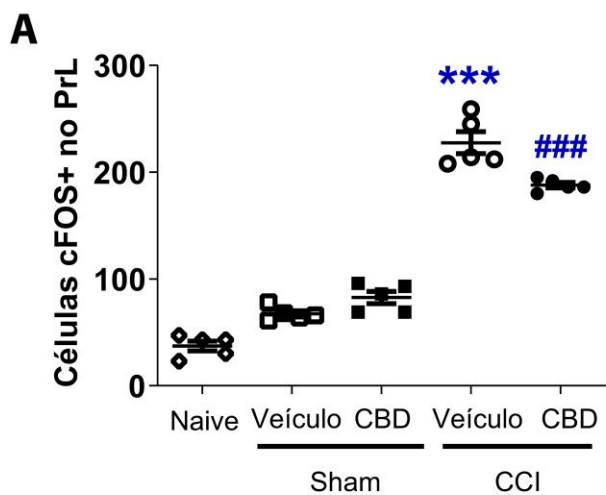
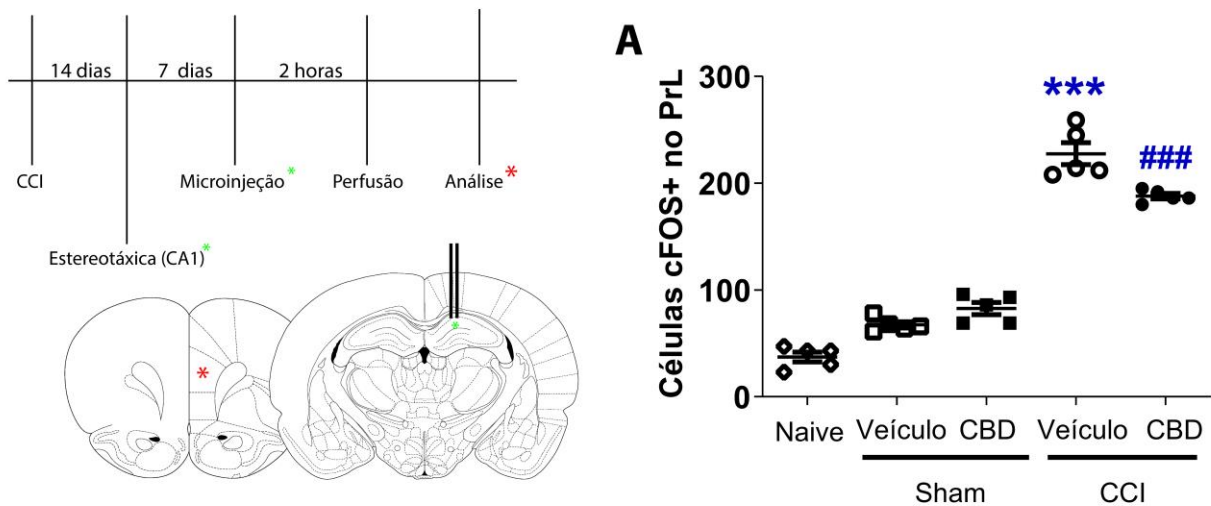


Figura 21: Efeito do CBD 60pmol sobre a ativação neuronal no córtex PrL. A. Gráfico representativo do número de células positivas para c-FOS (setas). Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (B-O). (n=5)

4.7 Estudo do efeito do CBD sobre o número de astrócitos

Considerando o papel dos astrócitos na manutenção da dor crônica e em processos de plasticidade neural, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica por fluorescência para marcação destas células. De acordo com o teste de análise de variância de uma via, houve diferença entre os grupos no que se refere as células positivas para GFAP tanto em CA₁ ($F_{3, 17} = 24,47$; $p < 0,01$) (Figura 21) quanto no PrL ($F_{3, 19} = 12,26$; $p < 0,01$) (Figura 23). Foi possível observar um aumento no número de astrócitos em animais CCI quando comparados com o grupo sham, quando ambos foram tratados com veículo (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$).

O tratamento agudo com o CBD na região CA₁ do Hd foi capaz de reduzir este número de células positivas para GFAP nesta região (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$). Em relação ao grupo sham tratado com CBD 60 pmol, não houve diferença significativa em relação ao grupo sham tratado com veículo.

Em relação à divisão PrL do córtex pré-frontal, foi possível observar uma redução no número de células positivas para GFAP nos animais CCI tratados com veículo em relação ao grupo *sham* tratado com veículo (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$). O tratamento com CBD aumentou o número de astrócitos em animais CCI (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$), mas não houve diferença entre os grupos sham.

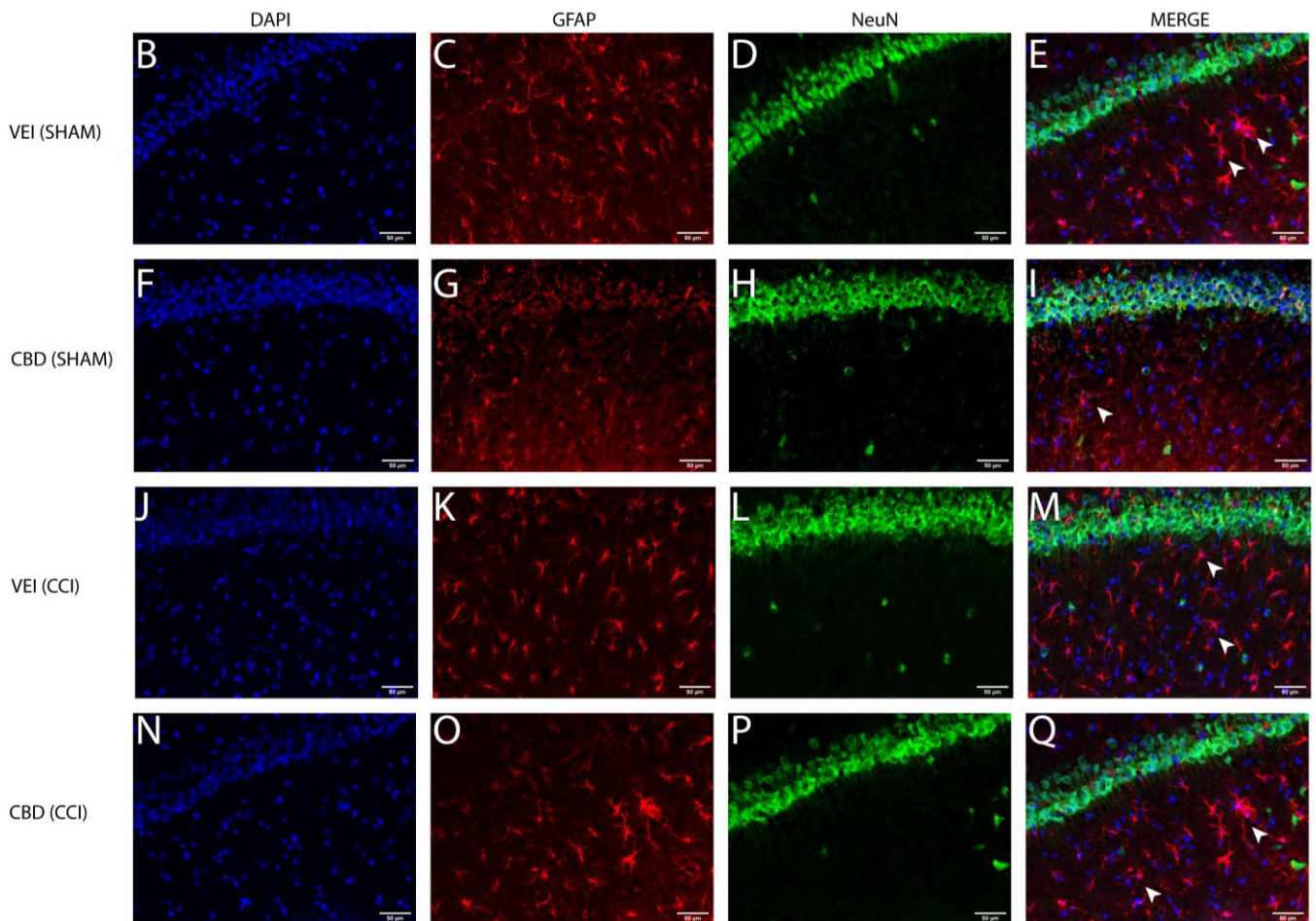
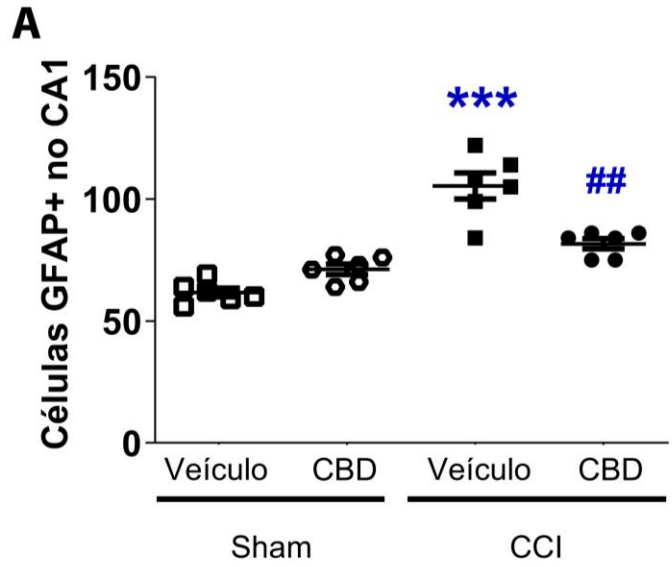
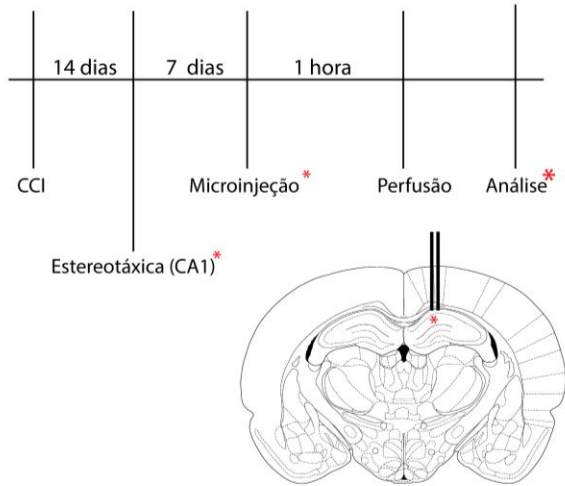


Figura 22: Efeito do CBD 60 pmol sobre o número de astrócitos em CA₁, a partir da marcação de GFAP. A. Gráfico representativo do número de células positivas para GFAP (setas). Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (B-O). (n=5)

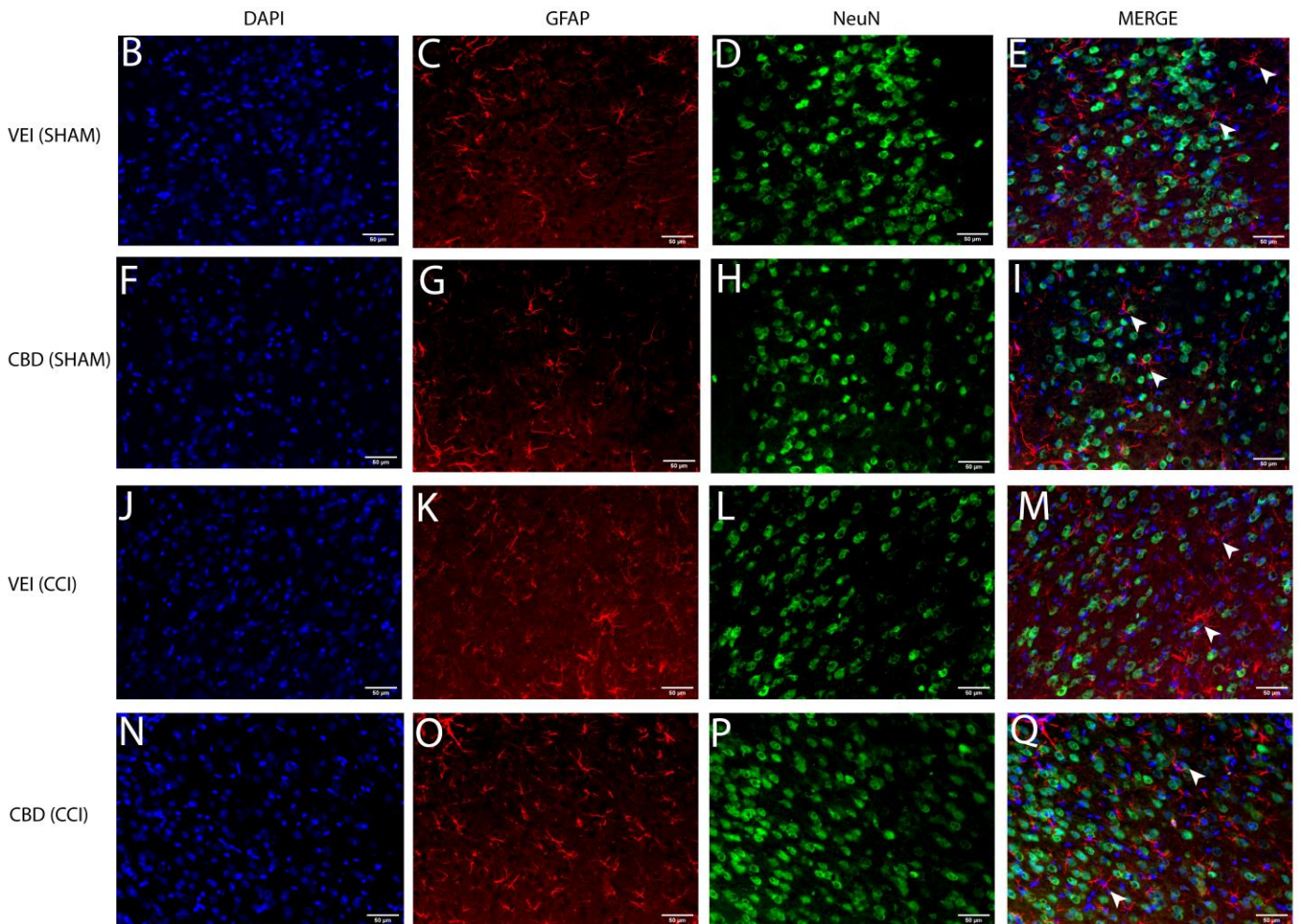
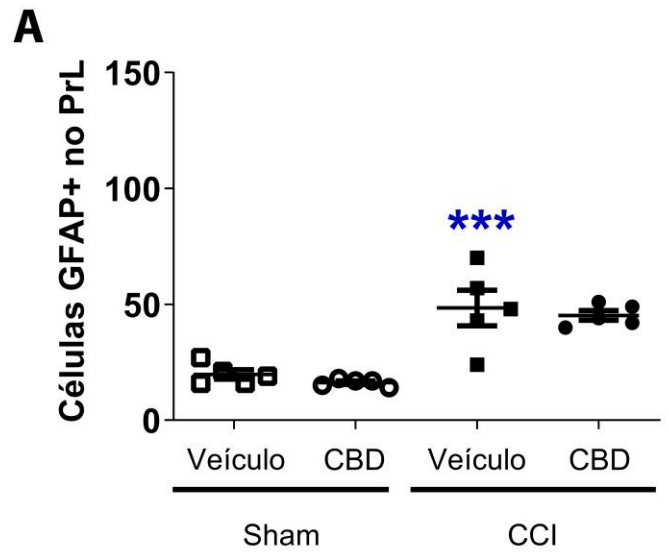
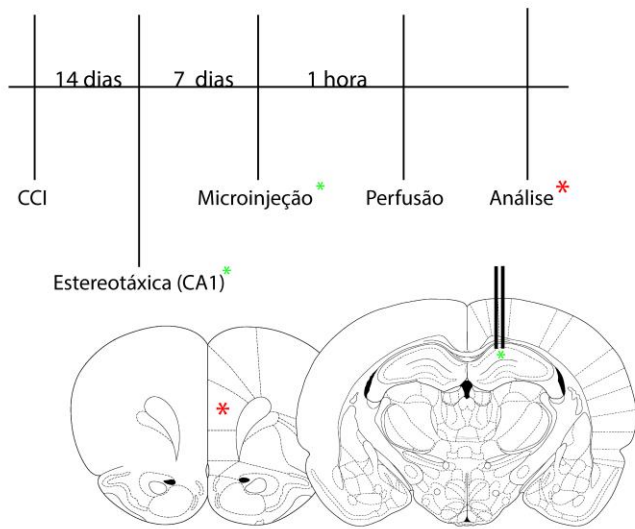


Figura 23: Efeito do CBD 60 pmol sobre o número de astrócitos no PrL, a partir da marcação de GFAP. **A.** Gráfico representativo do número de células positivas para GFAP (setas). Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com o pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$). Figuras representativas da imunomarcção (**B-Q**). (n=5)

4.8 Estudo do efeito do CBD sobre a formação de novos neurônios

Considerando que a dor crônica é resultado de alterações morfofisiológicas, foi investigado se a formação de novos neurônios está alterada nas áreas de interesse (CA₁ e PrL) e se o tratamento agudo com CBD pode influenciar este processo. Realizamos a marcação por imuno-histoquímica fluorescente de DCX em tecido cerebral de rato adulto para identificar com precisão as populações neuronais que expressam esta proteína. Nossas observações confirmam a presença de células imunorreativas DCX com morfologia característica de neuroblastos migrantes em CA₁, mas não no PrL.

Em relação a região CA₁, houve diferença significativa no número de células positivas para DCX entre os grupos ($F_{3, 10} = 73,81$; $p < 0,01$) (Figura 24). A cirurgia CCI reduziu significativamente a neurogênese ativa em relação ao grupo sham (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,01$).

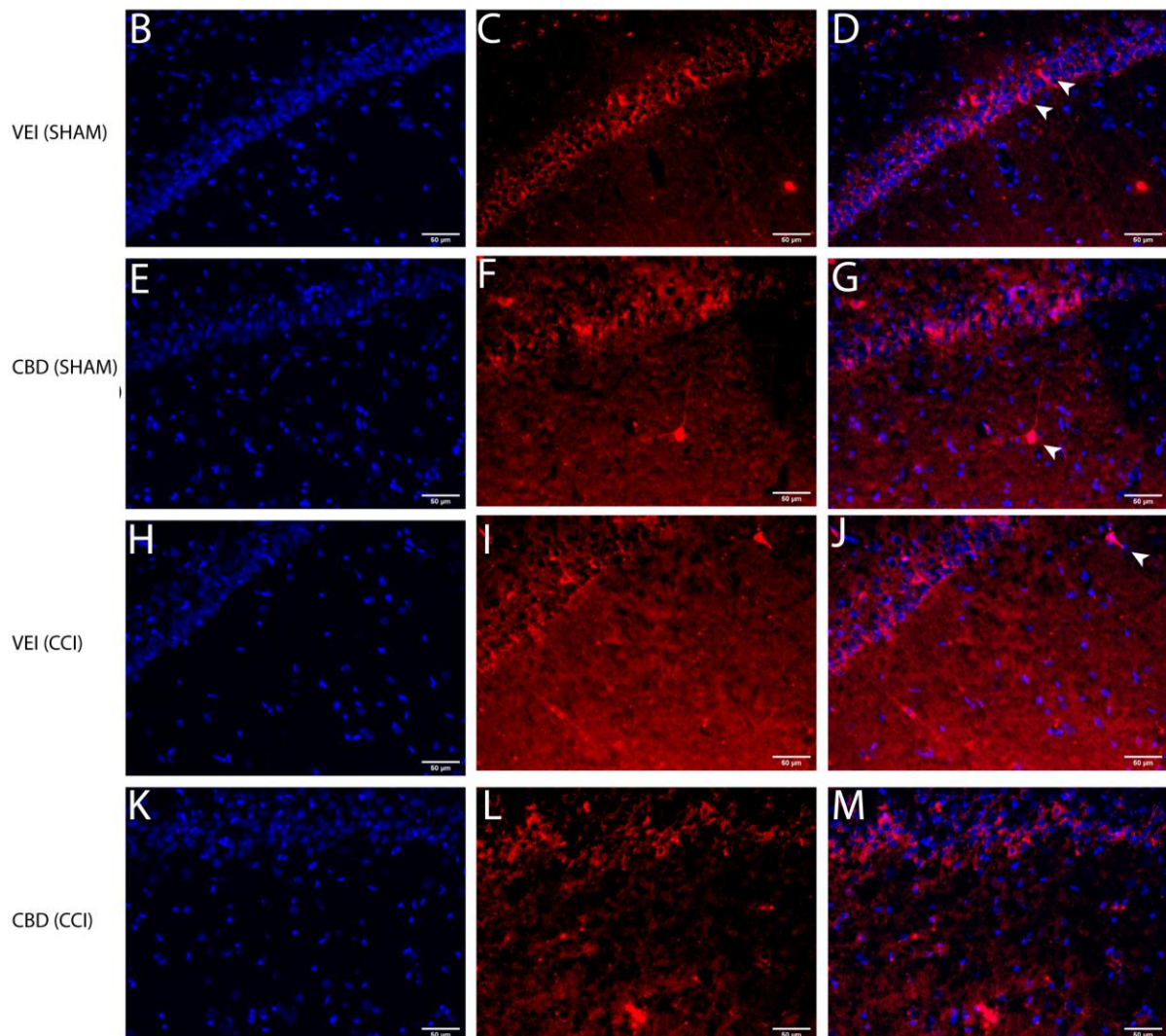
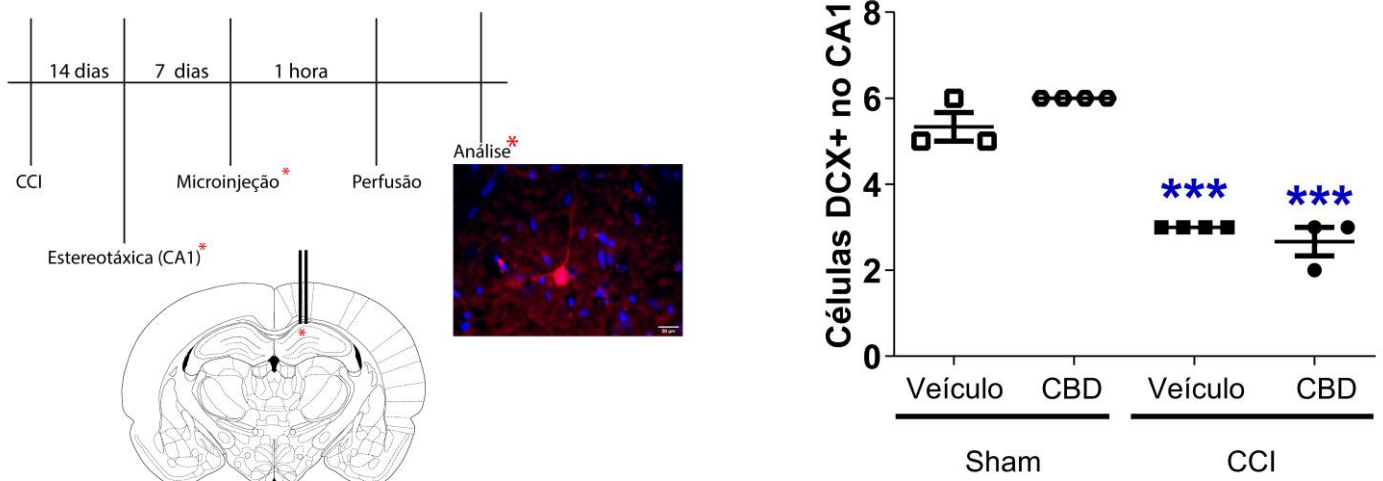


Figura 24: Efeito do CBD 60 pmol sobre a formação de novos neurônios em CA₁ a partir da imunomarcagem de DCX. A. Gráfico representativo do número de células positivas para DCX (setas). Os dados foram representados pela média e erro padrão da média. Pós teste de Tukey: * $p < 0,05$. *Diferença significativa em relação ao grupo sham; # diferença em relação ao grupo veículo, de acordo com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$). Figuras representativas da imunomarcagem (B-O). (n=5)

Tabela 3: Compilado dos resultados, onde ↑ corresponde a um aumento/melhora, ↓ diminuição/piora e — ausência do grupo.

	Alodinia mecânica	Alodinia ao frio	Imobilidade	Autolimpeza	Alteração espontânea	Index de reconhecimento	c-FOS	GFAP	DCX (CA₁)
Veículo (Sham)									
CBD 60 pmol (Sham)	Não alterou	Não alterou	—	—	—	—	Não alterou	Não alterou	Não alterou
Veículo (CCI)	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑ (CA ₁ e PrL)	↑	↓
CBD 15 pmol (CCI)	↑	↑	—	—	—	—	—	—	—
CBD 30 pmol (CCI)	↑	↑	—	—	—	—	—	—	—
CBD 60 pmol (CCI)	↓	↓	↓	↑	↑	Não alterou	↑↑(CA ₁) ↓(PrL)	↓(CA ₁)—(PrL)	Não alterou
CoCl₂+Veículo (CCI)	↑	↑	↑	↓	↓	↓↓	—	—	—
WAY100635+Veículo (CCI)	↑	↑	↑	↓	↓	↓↓	—	—	—
AM251+Veículo (CCI)	↑	↑	↑	↓	↓	↓↓	—	—	—
CoCl₂+CBD 60 (CCI)	↑	↑	↓	↓	↓	↓↓	—	—	—
WAY100635+CBD 60 (CCI)	↑	↑	↑	↓	↓	↓↓	—	—	—
AM251+CBD 60 (CCI)	↑	↑	↑	↓	↓	↓↓	—	—	—

5. Discussão

Como resumido na tabela 3, o presente trabalho mostrou que o canabidiol (CBD) apresentou efeito antinociceptivo quando microinjetado de forma aguda na região CA₁ do Hd de animais com dor neuropática crônica (DNC) submetidos a CCI. Além disso, o CBD atenuou os comportamentos do tipo depressivo e os prejuízos cognitivos associados a DNC. O efeito observado se mostrou dependente da ativação do PrL, especificamente por meio de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} e endocanabinóide do tipo CB₁.

A dor, enquanto objeto de estudo, foi induzida nos roedores a partir de uma cirurgia adaptada, a qual promove uma lesão periférica no nervo ciático. O modelo original, proposto por Bennett & Xie (1988) (BENNETT; XIE, 1988) de quatro ligaduras foi adaptado por Medeiros e colaboradores (2020a, 2021) a uma única ligadura (MEDEIROS et al., 2019a, 2019b, 2020a, 2020b, 2020c, 2021). A partir desta única ligadura foi demonstrado alterações de limiares nociceptivos bem como alterações comportamentais relacionadas a ansiedade, depressão e cognição, mas sem afetar a capacidade locomotora ou provocar comportamento de autotomia (MEDEIROS et al., 2021). Todas as alterações decorrentes da lesão são devido às mudanças celulares e moleculares complexas que levam ao aumento da atividade dos neurônios sensoriais primários e à transmissão aprimorada da entrada sensorial na medula espinhal. Há um processo de aumento da excitabilidade periférica, que por consequência, provoca mudanças de sensibilidade, conhecidos na clínica como alodinia e hiperalgesia (JULIUS, 2001). A alodinia térmica, avaliada neste estudo, é resultado desta hiperexcitabilidade.

Em relação a alodinia tátil, esta é decorrente do cruzamento de modalidades sensoriais anatomicamente e funcionalmente separadas (INQUIMBERT; SCHOLZ, 2012). O toque leve é detectado por fibras A β de baixo limiar que enviam projeções centrais para as lâminas mais profundas (III, IV e as margens adjacentes das lâminas II e V) do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios de projeção nessas lâminas, por sua vez, transmitem informações ao encéfalo por meio do funículo posterior da medula espinhal. Após a lesão do nervo, no entanto, as fibras A β , que terminam na lâmina III do corno dorsal, migram para lâminas mais superficiais da medula, ocupando os espaços anteriormente ocupados pelas fibras C lâminas (lâmina II). assim formam novas sinapses com neurônios de projeção que normalmente recebem entrada de fibras A δ (I e V) e C (II) (KUNER; FLOR, 2017). Estas fibras estão relacionadas a condução de

informação nociceptiva dessa forma, sendo assim, a informação é interpretada como dor.

Neste estudo, a alodinia mecânica e ao frio foram adotadas como parâmetros para a avaliação nociceptiva. O teste de von Frey é um teste derivado de um procedimento clínico para avaliação da dor (CHAPLAN et al., 1994) no qual é possível mensurar a alodinia mecânica. Medidas relativas a alodinia puderam ser obtidas a partir do teste de acetona, o qual parte da premissa que a evaporação da acetona reduz a temperatura local (10°C) (CASTEL; VACHON, 2013). Neste contexto, como demonstrado em nossos resultados, a cirurgia CCI diminuiu os limiares nociceptivos relacionados a temperatura (frio) e ao tato (mecânico) dos roedores após 21 dias, caracterizando o estabelecimento da neuropatia crônica.

De fato, este efeito observado, de redução dos limiares em animais CCI, é resultado de alterações no SNP e SNC. Considerando as estruturas supraespinhais, diversas regiões encefálicas compõem a circuitaria de processamento da dor, sendo passíveis de alterações estruturais e funcionais. Dentre elas, o hipocampo é uma estrutura límbica importante na dimensão motivacional da dor (R. MELZACK AND K.L. CASEY, 1968). O hipocampo é parte do arqueocórtex, cujas principais células estão localizadas no estrato piramidal. É uma estrutura dividida em sub-regiões que se comunicam, sendo elas CA₁, CA₂, CA₃ (sendo CA as iniciais de *Corno de Ammon*) e giro denteado. Diversos estudos mostraram a reatividade do hipocampo, especificamente da sub região CA₁, frente a estímulos nocivos como alterações na atividade hipocampal decorrente da estimulação nociva (KHANNA; SINCLAIR, 1989), na plasticidade (MUTSO et al., 2012) e conectividade (MUTSO et al., 2014).

Manipulações farmacológicas nesta região reforçam a importância de CA₁ na via nociceptiva. ZAKERI et al., (2020), por exemplo, demonstraram a importância do sistema dopaminérgico no CA₁ sobre a modulação de comportamentos nociceptivos. Outro alvo farmacológico estudado são as vias inflamatórias subjacentes a região CA₁ em resposta a lesão e estímulos nocivos (HE et al., 2019; KOOSHKI et al., 2018). Neste contexto, é reconhecido o papel desta região no processamento da informação dolorosa, e como visto neste trabalho, a microinjeção de CBD em CA₁ aumentou os limiares nociceptivos relacionados a alodinia mecânica e ao frio de animais submetidos a cirurgia CCI após 21 dias. O efeito mencionado é reflexo de extensas conexões do hipocampo com demais áreas envolvidas do processamento da dor. Dentre elas o

CPFM, cuja atividade exacerbada está diretamente relacionada a relatos de dor (APKARIAN; BALIKI; GEHA, 2009; MEDEIROS et al., 2019a).

De fato, mostramos que a conexão entre córtex PrL e CA₁ é recíproca. A divisão PrL recebe projeções do CA₁, evidenciado pela marcação de corpos celulares no hipocampo dorsal de animais que receberam o neurotraçador bidirecional BDA no PrL. Além do pericário, foi observado a presença de botões sinápticos e fibras em CA₁ oriundas do PrL. Resultado semelhante foi obtido por Almada, Coimbra e Brandão (2015), que ao microinjetar o traçador em CA₁ observaram fibras em camadas profundas e superficiais do PrL. Outras regiões do Hd apresentaram marcação como o CA₂ e o giro denteado, indicando que a comunicação PrL-CA₁ pode ser intermediada por estas outras regiões. Em adição, de Freitas e colaboradores (2013), mostrou conexões aferentes do Hd com o córtex somatossensorial, a área septal medial, a área septal lateral, a faixa diagonal de Broca e o giro dentado para o Hd; todas essas áreas sugeridas para modular a atividade convulsiva e os limiares nociceptivos. Eferências do Hd também foram identificadas a partir do núcleo linear da rafe, do núcleo mediano da rafe, do núcleo dorsal da rafe e do *locus coeruleus* (DE FREITAS et al., 2013). Todas essas estruturas foram postuladas e compreendem o sistema endógeno de modulação da dor e podem estar envolvidas na antinocicepção pós-ictal ou na antinocicepção comumente relatada por pacientes epiléticos (DE FREITAS et al., 2013).

No presente trabalho, quando o bloqueador inespecífico de sinapses CoCl₂ foi microinjetado no PrL enquanto veículo foi administrado no CA₁, não houve alteração do limiar nociceptivo em relação ao grupo tratado com veículo no PrL e veículo no CA₁. O bloqueio da sinapse no neocórtex com CoCl₂ se deve ao bloqueio do influxo neuronal de Ca²⁺, desta forma inibindo a atividade sináptica (KRETZ, 1984). Considerando CoCl₂ esta inespecificidade, diversos sistemas, como opioides, GABAérgico, colinérgicas, noradrenérgicas e mesmo serotoninérgicos podem ter sido bloqueados mantendo baixos os limiares de von Frey e de alodinia ao frio. De fato, alterações na neurotransmissão colinérgica decorrentes de processos nociceptivos contribuem para a disfunção no CPM relacionada à dor (THOMPSON; NEUGEBAUER, 2019). De forma semelhante, alterações na via ascendente noradrenérgicas podem contribuir para a disfunção do canal HCN e hiperexcitabilidade neuronal observada no CPM após lesão nervosa (CORDEIRO MATOS et al., 2018).

Em relação a interação com o tratamento com CBD, quando foi realizado o bloqueio inespecífico das sinapses da região do córtex PrL com cloreto de cobalto CoCl₂, ocorreu

o bloqueio do efeito do CBD intra-CA₁ sobre a dor, corroborando com a hipótese de que o efeito do CBD é dependente da ativação da via PrL-CA₁. Embora a microinjeção de CoCl₂ no PrL possa atenuar o processo de amplificação da dor mediado pelo sistema glutamatérgico via NMDA, como foi demonstrado por MEDEIROS et al., (2019a), a ação do CBD pode estar envolvido na ativação de modulação endógena da dor via PrL, sistemas que se contrapõem.

A divisão PrL recebe aferências não apenas hipocampais, mas também de áreas da via descendente modulatórias da dor, como o núcleo dorsal da rafe. Esta via especificamente é a principal fonte de heterorreceptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (GARCIA-GARCIA; NEWMAN-TANCREDI; LEONARDO, 2014). Em adição já foi demonstrado que a supressão destes heterorreceptores 5-HT_{1A} no CPFM resulta em um fenótipo semelhante à depressão (GARCIA-GARCIA et al., 2017), o que condiz com nossos resultados.

A microinjeção de WAY100635, um antagonista serotoninérgico 5-HT_{1A}, no PrL, enquanto veículo foi microinjetado no CA₁, não alterou os limiares nociceptivos em relação ao grupo CCI tratado com veículo (PrL) + veículo (CA₁). E quando o mesmo antagonista foi microinjetado no PrL em associação ao CBD no CA₁, houve diferença em relação ao grupo veículo (PrL) + CBD (CA₁) em animais CCI. Este resultado nos mostra que o efeito antinociceptivo do CBD pode ser, especificamente, via ativação serotoninérgica cortical. A ativação de 5HT_{1A} possivelmente exerce inibição tônica sobre a hiperexcitabilidade da divisão PrL, especificamente relacionada a manutenção da dor crônica e neuropática (MEDEIROS et al., 2019b). Neste contexto, quando o CBD é microinjetado no CA₁, ocorre o aumento da disponibilidade serotoninérgica no PrL, promovendo a analgesia observada uma vez que já fora demonstrado a importância dos receptores 5HT_{1A} no controle da excitabilidade de neurônios piramidais no cortex PrL (SANTANA; ARTIGAS, 2017). Além do NDR, outra possível via que pode estar envolvida neste efeito é circuito Hd-BLA-PrL, cujo papel na regulação emocional e cognitiva é evidente (THOMPSON; NEUGEBAUER, 2019b; YAMASHITA et al., 2019). De fato, em condições de dor crônica a comunicação entre estas áreas está alterada e sua importância no componente cognitivo e emocional é evidente.

Outro importante sistema envolvido na via PrL-CA₁ é o endocanabinóide, o qual exerce seu papel através da ativação dos receptores CB₁ e CB₂ (HOHMANN; SUPLITA, 2006). Quando o antagonista AM251 foi microinjetado na divisão PrL junto a veículo no CA₁, não foi observado alteração dos limiares de alodinia mecânica ou ao

frio. Medeiros e colaboradores (2021) observaram que na mesma concentração, o AM251 apresenta efeito hiperalgésico (MEDEIROS et al., 2021), o que não foi possível observar em nossos resultados uma vez que o limiar basal e do grupo veículo (PrL) + veículo (CA₁) estavam muito baixo impossibilitando a mensuração de valores ainda menores, uma vez que existia um limite já determinados entre 2-100g gramas dos filamentos.

Dentre as alterações associadas a neuropatia está a redução geral na expressão do receptor CB₁ no CPFM (HUANG et al., 2019). Neste contexto, a inativação destes receptores no PrL que já está alterada, favorece a ativação glutamatérgica e consequente hiperexcitabilidade, resultando na redução dos limiares nociceptivos observados. Agonistas do receptor endocanabinoide no CPFM, inibem a transmissão sináptica glutamatérgica entre as células aferentes da camada V e as células piramidais da camada V por meio de uma ação pré-sináptica e favorecem o LTD às custas do LTP nas mesmas sinapses (AUCLAIR et al., 2000). Neste sentido, quando o CBD é microinjetado em CA₁, a LTP da via PrL/CA₁ que está baixa em indivíduos com dor, é favorecida. Em CA₁, os receptores CB₁ podem estar localizados em neurônios glutamatérgicos, e deste modo, a ativação do receptor CB₁ pode regular a indução da LTP em CA₁, e também pode desempenhar um papel na prevenção da excitotoxicidade (TAKAHASHI; CASTILLO, 2006). Entretanto, sua localização pode ser em uma subpopulação de interneurônios GABAérgico, neste caso, a inibição do bloqueio geralmente promove a LTP nas sinapses excitatórias (WILSON; NICOLL, 2002b).

Considerando o teste de von Frey, quando os antagonistas WAY100635 e AM251, antagonistas de receptores 5-HT_{1A} e CB₁, respectivamente, são microinjetados no PrL, há o bloqueio do efeito do CBD intra-CA₁, mostrando a importância da via glutamatérgica entre CA₁-PrL, mas também da serotonina neste efeito. No teste de acetona um efeito semelhante é observado, a microinjeção de AM251 no PrL não altera o limiar de alodinia ao frio quando comparado com o grupo veículo (PrL) + veículo (CA₁). Além disso, quando microinjetado em associação com o tratamento com CBD intra-CA₁, inicialmente não há alteração do limiar. Curiosamente, neste teste, a partir do tempo 30 minutos é possível observar o efeito analgésico do CBD intra-CA₁, o que não ocorre com o bloqueio de 5HT_{1A}. Neste contexto, observamos que a resposta ao estímulo mecânico e a resposta ao frio utilizam vias diferentes, o que reflete no mecanismo de ação do CBD.

As alterações na via córtex PrL e CA₁ também se relacionam com as comorbidades psiquiátricas observadas na clínica. De fato, desde a década de 90 é proposto que estímulos nocivos, como a injeção de formalina, gera um sinal em CA₁ pode contribuir para o processamento nociceptivo nas regiões do sistema nervoso que compõem o circuito de Papez (KHANNA, 1997). Neste sentido, alterações nos circuitos hipocampais estão fortemente associados ao estabelecimento das comorbidades.

Considerando as duas áreas de interesse neste estudo, o córtex PrL e CA₁ do Hd, além da projeção glutamatérgica direta de CA₁ para o PrL, a comunicação entre estas áreas pode se dar de forma indireta. Neste caso, áreas como núcleo reuniens, complexo amigdalóide e cortex entorrinal, medeiam a comunicação PrL e CA₁, envolvendo sistemas glutamatérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos (SOLTANI ZANGBAR et al., 2020). A partir destas vias, direta e indiretas, o PrL e CA₁ se mostram regiões fundamentais no componente cognitivo, afetivo e motivacional da dor.

No que se refere ao comportamento emocional, assim como na via nociceptiva, o sistema serotoninérgico apresenta importante papel. Estudos em modelos animais, mostraram que a redução nos níveis de serotonina em CA₁ após indução da neuropatia provoca dor e ansiedade (SAFFARPOUR; NASIRINEZHAD, 2021), além de desenvolver um fenótipo depressivo (MORENO et al., 1999). Neste estudo, após 21 dias da cirurgia CCI, os animais apresentaram aumento da imobilidade no teste de nado forçado, bem como aumento da latência do grooming e redução dos comportamentos de autolimpeza. Estes comportamentos caracterizam comportamentos do tipo depressivo em animais e fazem analogia a sintomas observados na clínica. No teste de nado forçado, a imobilidade é um análogo teórico da desesperança no que diz respeito à possibilidade de fuga (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Em relação ao teste de spray de sacarose, o comportamento avaliado, a autolimpeza, corresponde a medida da anedonia e apatia (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019).

Uma vez demonstrado que a cirurgia CCI estava associada a comportamentos do tipo depressivo, foi realizado o tratamento com CBD na região CA₁ do Hd. Foi observado que os comportamentos relacionados a depressão foram atenuados. De forma semelhante, o tratamento agudo com CBD foi capaz de reduzir comportamentos relacionados a depressão em animais que passaram pela cirurgia CCI como demonstrou Malvestio e colaboradores (2021) ao realizar o tratamento intra-PrL. Neste mesmo trabalho, foi destacada a importância do sistema serotoninérgico e endocanabinóide do

PrL tanto sobre a resposta comportamental basal quanto no efeito do CBD (MALVESTIO et al., 2021).

O efeito antidepressivo de CBD quando administrado agudamente, foi relacionado ao aumento dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e sinaptogênese no CPFM, além de aumentar a neurogênese no hipocampo (SILOTE et al., 2019). Os seus níveis deste fator estão relacionados a ativação de uma cascata intracelular ativada por um receptor acoplado a proteína G como receptores serotoninérgicos ou endocanabinóide. A ligação do neurotransmissor ao receptor aumenta a concentração intracitosólica de cAMP e de diacilglicerol, segundos mensageiros estes que irão facilitar a fosforilação do fator de transcrição CREB e consequente regulação da expressão de BDNF (KRISHNAN; NESTLER, 2008). A facilitação da transmissão serotoninérgica estimulando receptor 5-HT_{1A} pós sináptico no CPFM ativa a via de sinalização mTOR possibilitando a neurogênese (FUKUMOTO et al., 2018; LI et al., 2010).

Os níveis de BDNF também influenciam o processamento de funções cognitivas, e foi demonstrado que animais com neuropatia apresentam redução dos níveis deste fator, o que foi relacionado com prejuízo cognitivo (HU et al., 2010). De fato, a dor crônica tem sido associada a prejuízos em tarefas mnemônicas principalmente pela inibição da LTP hipocampal (REN et al., 2011). Além disso, a expressão anormal de citocinas e redução do volume hipocampal mostram ser o elo entre alterações de aprendizado e emocionais relacionadas a dor (MUTSO, et al., 2012).

Não apenas o hipocampo, mas também o CPFM, região esta que apresenta papel importante na modulação da dor e processos cognitivos (METZ et al., 2009). O hipocampo é bem conhecido por seu papel no processamento de informações espaciais e CPM é considerado necessário para orientar a ação direcionada a objetivos, assim, CA₁ e o CPFM participam e interagem durante os processos de codificação e recuperação necessários para a navegação espacial (CHURCHWELL et al., 2010). De fato, a conexão CPFM/Hd é importante para a memória de trabalho espacial em ratos e humanos (BÄHNER et al., 2015).

A formação e codificação da memória se dá em três etapas: codificação refere-se à aquisição inicial da memória. Em seguida, através de fases de consolidação, a memória é preservada e armazenada para recuperação posterior. Finalmente, a recuperação é o processo pelo qual as memórias armazenadas anteriormente são reativadas. A memória de reconhecimento refere-se à capacidade de julgar um item encontrado anteriormente

como familiar e depende da integridade do lobo temporal medial (SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2007). Neste trabalho, considerando o teste de reconhecimento de objetos, os animais CCI não apresentaram prejuízo no reconhecimento em relação ao grupo falso operado quando o intervalo considerado foi de 2 horas, apenas na segunda etapa do teste, como intervalo de 24 horas. A partir disso, optou-se que o tratamento fosse realizado antes da exposição ao objeto C.

O prejuízo na memória observado é resultado da alteração das projeções funcionais diretas do Hd para o córtex PL, as quais são necessárias para o fortalecimento da memória, quando o hipocampo envia projeções diretas para o PrL envolvidas no processamento de memória mediada por recuperação de contexto e a ativação do Hd controla os mecanismos moleculares no PrL (YE et al., 2017). As interações entre o neocórtex e o hipocampo são suportadas por uma conexão direta Hd-CPFM, além de vias bidirecionais incluindo o tálamo e nos córtices perirrinal e entorrinal lateral (EICHENBAUM, 2017).

Chiba e colaboradores em 1994 já postulavam que o CPFM e o hipocampo codificam a ocorrência de cada evento ao longo do tempo, para que uma ordem cronológica de experiências possam ser recuperada em algum tempo depois (CHIBA; KESNER; REYNOLDS, 1994). Tradicionalmente, acredita-se que a informação "*o quê*" seja transmitida através do córtex perirrinal, enquanto a informação "*onde*" a informação é transmitida através dos córtices parahipocampal e entorrinal. É apenas no hipocampo que as informações "*o quê*" e "*onde*" estão associadas (EICHENBAUM; YONELINAS; RANGANATH, 2007).

Segundo Barker 2015, o circuito neural HPC-CPFM estão envolvidos na codificação e recuperação (BARKER; WARBURTON, 2015). Esse resultado é consistente com a visão de que a recuperação depende da ativação dos mesmos circuitos neurais e, de fato, dos mesmos neurônios individuais envolvidos na codificação da informação original. Após a microinjeção do CBD em CA₁, houve o fortalecimento desta via e a melhora observada no desempenho dos animais na tarefa de reconhecimento.

A premissa no teste do labirinto em Y é semelhante a anterior. Prejuízos na atenção e na memória de trabalho foram encontrados não apenas em modelos animais, mas também em pacientes que sofrem de dor crônica (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2016). A plasticidade sináptica desempenha um papel crucial na dor e na cognição,

portanto, as alterações neuroplásticas induzidas pela dor que ocorrem em áreas como o hipocampo e o CPFM, afetam reciprocamente a cognição.

Da mesma forma que nos testes nociceptivos, nos testes comportamentais, quando a via PrL-CA₁ é manipulada (microinjeção de antagonistas WAY e AM251) o favorecimento da transmissão glutamatérgica provoca não apenas a redução de limiares nociceptivos, como previamente discutido, mas também aumento dos comportamentos do tipo depressivo e falha nas tarefas cognitivas. Não obstante, mesmo com tratamento com CBD em CA₁ não é capaz de reverter estes comportamentos, reafirmando a importância desta via no efeito do CBD. Isso porque tanto a inibição das aferências serotoninérgicas oriundas do NDR quanto a LTP entre PrL-CA₁ são importantes no efeito do CBD sobre a comorbidade entre dor e depressão além de prejuízo na memória.

A hipótese de que o tratamento com CBD promove aumento da atividade hipocampal e favorece a LTP via atenuação do sistema GABAérgico, pela ativação de receptores CB₁ presentes no terminal pré-sináptico destes interneurônios, é corroborada com os dados obtidos a partir da marcação da proteína c-fos. Esta é um membro da família dos reguladores transcricionais de zíper de leucina (PENICAUD et al., 2013). O protooncogene *C - fos* é expresso em alguns neurônios após a despolarização e pode ser usada como um marcador para a atividade neuronal em todo o neuro-eixo após estimulação periférica (BULLITT, 1990). Já é sabido que o tratamento com agonistas do sistema endocanabinoide aumentam a expressão desta proteína a nível medular, frente a um estímulo nocivo (HOHMANN; KANG; WALKER, 1999; NACKLEY; SUPLITA; HOHMANN, 2003; TSOU et al., 1996).

No que se refere ao efeito da cirurgia CCI sobre a ativação das áreas de interesse neste trabalho (CA₁ e PrL), mostramos que há um aumento no número de células c-fos positivas em ambas as estruturas. Resultados semelhantes foram encontrados em modelos animais de dor inflamatória (CARTER et al., 2011; FAN et al., 2018), dor neuropática por ligação parcial do nervo (NARITA et al., 2003) e pós-operatória (ZHAO et al., 2021). Além disso, estudos eletrofisiológicos, mostraram aumento da atividade excitatória no PrL de animais neuropáticos e diminuição da atividade inibitória medida por registro eletrofisiológico in vivo (MEDEIROS et al., 2020b). Nesta área, após a microinjeção de CBD intra-CA₁, é observado redução do número de células c-fos positivas. O que corrobora com a nossa hipótese de que a hiperatividade pré-límbica favorece a dor. Em relação a área de microinjeção, após o tratamento com CBD, ocorre um aumento no número de células c-fos imunomarcadas, indicando o

aumento da atividade desta área. De fato, o aumento da excitabilidade do hipocampo dorsal, seja farmacológica ou por quimiogenética, pode aliviar comportamentos de dor neuropática (XUHONG et al., 2018).

Finalmente, também foi avaliado a possível participação dos astrócitos no estabelecimento da neuropatia e no efeito do CBD. É sabido que as células da glia apresentam papel importante na cronificação da dor. Seu papel na medula já está bem estabelecido, em modelos animais de dor inflamatória realmente ocorre a ativação de células da gliais na medula espinhal (aumento da expressão de CD11b, IBA-1 e GFAP) (HUA XY et al., 2005; FU KY et al., 2000).

Como anteriormente discutido, a complexidade da conectividade sináptica excitatória e a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) são reduzidas no hipocampo na dor neuropática e as alterações opostas dependem do fator de necrose tumoral alfa/receptor do fator de necrose tumoral 1 sinalização e ativação glial. (LIU et al., 2017). Da mesma forma, diferentes modelos de dor neuropática mostraram proliferação de células da glia, micróglia, oligodendrócitos e astrócitos (ECHEVERRY; SHI; ZHANG, 2008; LIU; RUDIN; KOZLOVA, 2000; NARITA et al., 2006).

No que se refere aos astrócitos, estes formam redes mediadas por junções comunicantes, que, entre outras funções, facilitam a transmissão intercelular da sinalização de Ca^{2+} , além de mediar troca de conteúdo citosólicos e oscilações de exibição na permeabilidade de íons através de redes astrocíticas. A densidade de coloração de GFAP é dependente da atividade do receptor NMDA, o que, pelo menos em parte, colabora para o aumento de GFAP observado após lesão de nervo periférico (GARRISON; DOUGHERTY; CARLTON, 1994). De fato, o desequilíbrio entre o glutamato e o GABA devido à ativação dos astrócitos nessas regiões pode ser um mecanismo subjacente à dor crônica (LI et al., 2019a). Outro sistema que pode estar envolvido é o sistema serotoninérgico. Zhu e colaboradores (2009) postularam que a ativaram glial aumentaram as citocinas pró-inflamatórias no hipocampo podem estar envolvidos no desenvolvimento de hiperalgesia após a transecção do nervo espinhal L5 via sistema serotoninérgico (ZHU et al., 2009).

Há uma hipótese de que a capacidade de captação do glutamato astroglial esteja prejudicada devido à produção de substâncias neuroativas, principalmente agentes pró-inflamatórios. Este estado disfuncional, ao longo do tempo, leva a um aumento nos níveis de glutamato extracelular. Por sua vez, esse aumento leva, a longo prazo, a uma

menor precisão na transmissão do glutamato, mantendo altos os níveis deste neurotransmissor extracelular e aumentando a excitabilidade (HANSSON; RÖNNBÄCK, 2004). Neste contexto, nossos achados de relação entre o aumento do número destas células e menores limiares nociceptivos corroboram com a literatura.

Neste contexto, os resultados apresentados se integram, na condição de dor crônica há plasticidade mal adaptativa relacionado ao aumento da excitabilidade do PrL somado a uma redução na comunicação entre esta estrutura e o Hd, além do desbalanço excitatório inibitório. O aumento no número de astrócitos em ambas as regiões favorece este quadro. Desta forma observamos não apenas alteração sensória, mas também emocional e cognitiva. A microinjeção de CBD intra-CA₁ reduziu o número de astrócitos nesta mesma região. Considerando a ação do CBD sobre os receptores CB₁, a comunicação bidirecional neurônio-astrócito-neurônio mediada por receptores CB₁ deve ser considerada ao interpretar os efeitos dos canabinoides no processamento da dor (HEGYI et al., 2018). Ao serem ativados, regulam a sintonia tônica da excitabilidade neural, na precisão do tempo de pico dos neurônios e, eventualmente, na modulação de funções de rede complexas (HEGYI et al., 2018). A redução no número de astrócitos em animais CCI tratados com CBD em relação aos tratados com veículo, possivelmente, se deve justamente pela alteração da comunicação entre neurônios e estas células da glia. Outro fato que deve ser levado em consideração é a presença de receptores CB₁ gliais presentes no hipocampo (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018), este pode ser outro alvo do CBD ao promover analgesia quando microinjetado nesta região.

Outra importante função dos astrócitos no sistema nervoso é o suporte em processos neurogênicos como diferenciação celular, favorecendo ou inibindo este processo (BARKHO et al., 2006), além de auxiliar o processo migratório de novos neurônios (KANEKO; SAWADA; SAWAMOTO, 2017; YATES, 2020). De fato, o aumento patológico da atividade glial está relacionado com supressão da neurogênese observada na dor neuropática crônica (EGOROVA et al., 2019). Aqui também avaliamos a presença de neuroblastos em processo de migração a partir da marcação da proteína DCX. As células imunorreativas DCX com a morfologia característica de neurônios diferenciados também foram descritas, sugerindo que DCX pode não apenas desempenhar um papel na migração neuronal no cérebro adulto, mas também pode participar em alguns outros eventos plásticos, como crescimento de neurite ou sinaptogênese (NACHER; CRESPO; MCEWEN, 2001).

O início da expressão de DCX corresponde aos estágios iniciais da neurogênese, quando neurônios neocorticais destinados ao córtex em desenvolvimento são gerados e começam seu processo de migração (COUILLARD-DESPRES et al., 2005), sendo um bom marcador de neuroblastos (RAO; SHETTY, 2004).

No encéfalo adulto há duas fontes de novos neurônios, os chamados nichos neurogênicos: zona ventricular-subventricular e a zona subgranular do giro denteado (GONÇALVES et al., 2016). Estudos então mostram a redução da formação de novos neurônios no giro denteado em decorrência da dor crônica (APKARIAN et al., 2016; DIMITROV et al., 2014). Considerando regiões não hipocampais, a lesão de constrição crônica do nervo ciático resulta na remodelação do rombencéfalo em grande escala por meio da neurogênese adulta, sendo possível identificação a partir da imunomarcagem da proteína DCX (RUSANESCU; MAO, 2017).

Não foram encontradas células DCX⁺ no córtex PrL, o que corrobora com os achados de Liu e colaboradores (2020), onde também não foi encontrado DCX no córtex de primatas (LIU et al., 2020). Entretanto, em relação a região CA₁, foi observado redução no número de neuroblastos migratórios nessa região de animais neuropáticos em relação ao grupo sham. Estes dados são suportados por estudos que mostram redução do volume hipocampal associado a redução da neurogênese em pacientes e modelos animais com dor (APKARIAN et al., 2016). Esta redução está diretamente relacionada às comorbidades observadas. De acordo com a teoria da plasticidade na depressão, os sintomas associados a esta condição são reflexo, dentre outras alterações, da redução da neurogênese (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011; JACOBS; VAN PRAAG; GAGE, 2000).

Em relação a ausência de efeito do tratamento, possivelmente foi em decorrência do tempo. No presente trabalho, a análise foi realizada 1 hora após o tratamento (tempo de avaliação no estudo farmacológico), tempo insuficiente. De fato, o período de migração envolve diversos processos que levam semanas (TIAGO GONÇALVES et al., 2016).

Em resumo, como um circuito integrado, o CPFM, hipocampo e outras áreas que compõem o sistema límbico, estão envolvidos na regulação do humor, além de participar de processos de aprendizagem e memória contextual. A dor crônica altera estas conectividades, o que resulta em uma atividade límbica comprometida que por sua vez leva a desregulação neuroendócrina e hiperatividade de algumas regiões (MALETIC et al., 2007). Alterações morfológicas (por exemplo, hipertrofia), proliferação, alterações de expressão gênica alterações moleculares significativas e alterações funcionais (LI et

al., 2019b), podem ser observadas no quadro de dor e comorbidades. Mostramos que o tratamento agudo de CBD pode atenuar estes sintomas, mostrando novas perspectivas de tratamento.

6. Conclusões

No estudo foi observado que o CBD intra-CA₁ apresenta efeito antinociceptivo sobre a resposta de alodinia mecânica e alodinia ao frio, em animais após 21 dias de neuropatia induzida por CCI. Além disso, o CBD no CA₁ de animais CCI melhora os comportamentos relacionadas à depressão e o desempenho em testes de memória. Evidenciamos conexão recíproca entre o córtex PrL e o CA₁. Foi apresentado, ainda, o envolvimento de receptores endocanabinoides CB₁ e serotoninérgicos 5-HT_{1A} do PrL/CPFM sobre os aspectos cognitivos e emocionais em animais com dor neuropática crônica e sua importância no efeito antinociceptivo do CBD intra-CA₁, considerando a via entre estas estruturas. Não obstante, foi demonstrado que alterações neuroanatômicas induzidas pela CCI, tais como a ativação neuronal, presença de astrócitos, mas não na formação de novos neurônios, podem ser revertidas com o tratamento agudo de CBD no CA₁ de animais com dor neuropática crônica.

7. Sugestões para trabalhos futuros

O presente trabalho fornece informações que complementam os conhecimentos sobre mecanismos neurais, moleculares e psicofarmacológicos que envolvem a neuropatia crônica e também aqueles pelos quais o CBD mostra efeito antinociceptivo, antidepressivo e melhora do *déficit* de memória. Trabalhos futuros podem investigar novas conexões que atuem em conjunto a via CA₁-PrL, com as demais regiões límbicas e com núcleos do sistema descendente endógeno de modulação da dor.

No que se refere ao desenvolvimento da dor neuropática crônica, novos estudos abordando o papel das demais células da glia, e demais mecanismos neuroplásticos, no desenvolvimento da patologia se fazem importantes e necessários. Também podem ser aprofundadas as investigações dos fenômenos neurogênicos associados a dor crônica e neuropatias.

Em relação ao CBD, a investigação de outros sistemas neurais, farmacológicos e moleculares são importantes para melhor compreensão de seus mecanismos de ação. Da

mesma forma, aprofundar em possíveis mecanismos pelos quais se dá sua interação com as células da glia, assim como na relação em processos neurogênicos.

Referências bibliográficas

ABRANTES DE LACERDA ALMEIDA, T. et al. **Intraperitoneal cannabidiol attenuates neonatal germinal matrix hemorrhage-induced neuroinflammation and perilesional apoptosis.** *Neurological Research*, v. 41, n. 11, p. 980–990, 2 nov. 2019.

AHRENS, J. et al. **The Nonpsychotropic Cannabinoid Cannabidiol Modulates and Directly Activates Alpha-1 and Alpha-1-Beta Glycine Receptor Function.** *Pharmacology*, v. 83, n. 4, p. 217–222, 2009.

AL-AMIN, H. et al. **Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: Effects on brain cytokines and neurotrophins.** *Experimental Neurology*, v. 228, n. 1, p. 30–40, mar. 2011.

ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. **Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: Intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions.** *Neuroscience*, v. 284, p. 988–997, 2 jan. 2015.

AMELIA A. MUTSO, DANIEL RADZICKI, MARWAN N. BALIKI, LEJIAN HUANG, GHAZAL BANISADR, MARIA VIRGINIA CENTENO, JELENA RADULOVIC, MARCO MARTINA, RICHARD J. MILLER, AND A. V. A. **Abnormalities in Hippocampal Functioning with Persistent Pain.** *Amelia*. v. 8, n. 9, p. 1385–1395, 2012.

APKARIAN, A. V. et al. **Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease.** *European Journal of Pain*, v. 9, n. 4, p. 463–484, 2005.

APKARIAN, A. V. et al. **Role of adult hippocampal neurogenesis in persistent pain.** *Pain*, v. 157, n. 2, p. 418–28, fev. 2016.

APKARIAN, A. V.; BALIKI, M. N.; GEHA, P. Y. **Towards a theory of chronic pain.** *Progress in neurobiology*, v. 87, n. 2, p. 81–97, fev. 2009.

AUCLAIR, N. et al. **Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons.** *Journal of Neurophysiology*, v. 83, n. 6, p. 3287–3293, 2000.

BADDELEY, A. **Working memory.** *Current biology : CB*, v. 20, n. 4, p. R136-40, 23 fev. 2010.

BÄHNER, F. et al. **Hippocampal-dorsolateral prefrontal coupling as a species-conserved cognitive mechanism: A human translational imaging study.** *Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 7, p. 1674–1681, 14 jun. 2015.

BARAK, O.; TSODYKS, M. **Working models of working memory.** *Current Opinion in Neurobiology*, v. 25, p. 20–24, abr. 2014.

BARBIERI, M. et al. **Synthetic cannabinoid JWH-018 and its halogenated derivatives JWH-018-Cl and JWH-018-Br impair Novel Object Recognition in mice: Behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence.** *Neuropharmacology*, v. 109, p. 254–269, 1 out. 2016.

BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. **Object-in-Place Associative Recognition Memory Depends on Glutamate Receptor Neurotransmission Within Two Defined Hippocampal-Cortical Circuits: A Critical Role for AMPA and NMDA Receptors in the Hippocampus, Perirhinal, and Prefrontal Cortices.** *Cerebral Cortex*, v. 25, n. 2, p. 472–481, fev. 2015.

BARKHO, B. Z. et al. **Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation.** *Stem Cells and Development*, v. 15, n. 3, p. 407–421, 17 jun. 2006.

BARKUS, C. et al. **Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion.** *European Journal of Pharmacology*, v. 626, n. 1, p. 49–56, 10 jan. 2010.

BAUER, H. et al. **Resilience moderates the association between chronic pain and depressive symptoms in the elderly.** *European Journal of Pain*, v. 20, n. 8, p. 1253–1265, 2016.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. **A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.** *Pain*, v. 33, p. 87–107, 1988.

BENSON, C. et al. **Biogenic amines and the amino acids GABA and glutamate: Relationships with pain and depression.** *Modern Trends in Pharmacopsychiatry*, v. 30, p. 67–79, 2015.

BIAGIONI, A. F. et al. **5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception.** *European Neuropsychopharmacology*, v. 26, n. 3, p. 532–545, mar. 2016.

BLÁZQUEZ, C. et al. **The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme.** *Journal of Neurochemistry*, v. 72, n. 4, p. 1759–1768, 1999.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. **A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.** *Nature*, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 7 jan. 1993.

BULLITT, E. **Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat.** *Journal of Comparative Neurology*, v. 296, n. 4, p. 517–530, 22 jun. 1990.

BURETTE, F.; JAY, T. M.; LAROCHE, S. **Reversal of LTP in the Hippocampal Afferent Fiber System to the Prefrontal Cortex In Vivo With Low-Frequency Patterns of Stimulation That Do Not Produce LTD.** *Journal of Neurophysiology*, v. 78, n. 2, p. 1155–1160, ago. 1997.

BURKE, N. N. et al. **Altered neuropathic pain behaviour in a rat model of depression is associated with changes in inflammatory gene expression in the amygdala.** *Genes, Brain and Behavior*, v. 12, n. 7, p. 705–713, 1 out. 2013.

CARDOSO-CRUZ, H. et al. **Bidirectional optogenetic modulation of prefrontal-hippocampal connectivity in pain-related working memory deficits.** *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2019.

CARTER, J. L. et al. **Adjuvant-induced arthritis induces c-Fos chronically in neurons in the hippocampus.** *Journal of Neuroimmunology*, v. 230, n. 1–2, p. 85–94, 1 jan. 2011.

CASTEL, A.; VACHON, P. **Gabapentin reverses central pain sensitization following a collagenase-induced intrathalamic hemorrhage in rats.** *Journal of Pain Research*, v. 7, p. 5–12, 17 dez. 2013.

CHAPLAN, S. R. et al. **Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.** *Journal of Neuroscience Methods*, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.

CHIBA, A. A.; KESNER, R. P.; REYNOLDS, A. M. **Memory for spatial location as a function of temporal lag in rats: Role of hippocampus and medial prefrontal cortex.** *Behavioral and Neural Biology*, v. 61, n. 2, p. 123–131, 1994.

CHURCHWELL, J. C. et al. **Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory.** *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 93, n. 3, p. 415–421, mar. 2010.

CORDEIRO MATOS, S. et al. **Noradrenergic fiber sprouting and altered transduction in neuropathic prefrontal cortex.** *Brain Structure and Function*, v. 223, n. 3, p. 1149–1164, 1 abr. 2018.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. **Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage.** *Annual Review of Neuroscience*, jun. 2009.

COUILLARD-DESPRES, S. et al. **Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.** *European Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 1, p. 1–14, jan. 2005.

DE FREITAS, R. L. et al. **Neuroanatomical and neuropharmacological approaches to postictal antinociception-related prosencephalic neurons: The role of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors.** *Brain and Behavior*, v. 3, n. 3, p. 286–301, maio 2013.

DE FREITAS, R. L. et al. **NMDA and AMPA/kainate glutamatergic receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex modulate the elaborated defensive behavior and innate fear-induced antinociception elicited by GABA_A receptor blockade in the medial hypothalamus.** *Cerebral Cortex*, v. 24, n. 6, p. 1518–1528, 2014.

DE FREITAS, R. L. et al. **μ 1-Opioid receptors in the dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal grey matter are critical for the enhancement of post-ictal antinociception.** *Synapse*, v. 70, n. 12, p. 519–530, 1 dez. 2016.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. **Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents.** v. 10, n. September, p. 1–17, 2017.

DIMITROV, E. L. et al. **Anxiety- and depression-like behavior and impaired neurogenesis evoked by peripheral neuropathy persist following resolution of prolonged tactile hypersensitivity.** Journal of Neuroscience, v. 34, n. 37, p. 12304–12312, 10 set. 2014.

DOS ANJOS-GARCIA, T. et al. **CB 1 cannabinoid receptor-mediated anandamide signalling reduces the defensive behaviour evoked through GABA A receptor blockade in the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus.** Neuropharmacology, v. 113, n. Pt A, p. 156–166, fev. 2017.

DOS SANTOS FERREIRA, K. et al. **Cognitive deficits in chronic pain patients, in a brief screening test, are independent of comorbidities and medication use.** Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 74, n. 5, p. 361–366, 1 maio 2016.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. **Hippocampal Neurogenesis: Regulation by Stress and Antidepressants.** Biological Psychiatry, v. 59, n. 12, p. 1136–1143, 15 jun. 2006.

DUDEK, S. M.; BEAR, M. F. **Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, n. 10, p. 4363–7, 15 maio 1992.

EAGLE, A.; MAZEI-ROBISON, M.; ROBISON, A. **Sucrose Preference Test to Measure Stress-induced Anhedonia.** Bio-Protocol, v. 6, n. 11, p. 1–7, 2016.

ECHEVERRY, S.; SHI, X. Q.; ZHANG, J. **Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain.** Pain, v. 135, n. 1–2, p. 37–47, mar. 2008.

EGOROVA, E. et al. **Hippocampal Neurogenesis in Conditions of Chronic Stress Induced by Sciatic Nerve Injury in the Rat.** Cells Tissues Organs, v. 207, n. 1, p. 58–68, 2019.

EICHENBAUM, H. **Prefrontal-hippocampal interactions in episodic memory.** Nature Reviews Neuroscience, Nature Publishing Group, 21 ago. 2017.

EICHENBAUM, H.; YONELINAS, A. P.; RANGANATH, C. **The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory.** Annual Review of Neuroscience, v. 30, n. 1, p. 123–152, jul. 2007.

ELPHICK, M. R.; EGERTOVÁ, M. **The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling.** Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, v. 356, n. 1407, p. 381–408, 29 mar. 2001.

FAN, X. C. et al. **Hypersensitivity of prelimbic cortex neurons contributes to aggravated nociceptive responses in rats with experience of chronic inflammatory pain.** Frontiers in Molecular Neuroscience, v. 11, p. 85, 22 mar. 2018.

FELDER, C. C. et al. **Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 16, p. 7656–60, 15 ago. 1993.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. **Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy.** Pain, v. 109, n. 1–2, p. 150–161, 2004.

FOLEY, J. C.; MCIVER, S. R.; HAYDON, P. G. **Gliotransmission modulates baseline mechanical nociception.** Molecular Pain, v. 7, 2 dez. 2011.

FUKUMOTO, K. et al. **Role of 5-HT 1A Receptor Stimulation in the Medial Prefrontal Cortex in the Sustained Antidepressant Effects of Ketamine.** International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 21, n. 4, p. 371–381, 1 abr. 2018.

GARCIA-GARCIA, A. L. et al. **Serotonin Signaling through Prefrontal Cortex 5-HT1A Receptors during Adolescence Can Determine Baseline Mood-Related Behaviors.** Cell Reports, v. 18, n. 5, p. 1144–1156, 31 jan. 2017.

GARCIA-GARCIA, A. L.; NEWMAN-TANCREDI, A.; LEONARDO, E. D. **P5-HT1A receptors in mood and anxiety: Recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function**Psychopharmacology. Springer Verlag, 2014.

GARLAND, E. L. **Pain Processing in the Human Nervous System. A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathways.** Primary Care - Clinics in Office Practice, set. 2012.

GARRISON, C. J.; DOUGHERTY, P. M.; CARLTON, S. M. **GFAP Expression in Lumbar Spinal Cord of Naive and Neuropathic Rats Treated with MK-801.** Experimental Neurology, v. 129, n. 2, p. 237–243, 1994.

GIORDANO, C. et al. **TRPV1-dependent and-independent alterations in the limbic cortex of neuropathic mice: Impact on glial caspases and pain perception.** Cerebral Cortex, v. 22, n. 11, p. 2495–2518, 2012.

GORE, M. et al. **The Burden of Chronic Low Back Pain.** Spine, v. 37, n. 11, p. E668–E677, 15 maio 2012.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. **Cannabinoid CB 2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain.** British Journal of Pharmacology, v. 153, n. 2, p. 319–334, jan. 2008.

GURDEN, H.; TAKITA, M.; JAY, T. M. **Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo.** The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, v. 20, n. 22, p. RC106, 15 nov. 2000.

GUSEL'NIKOVA, V. V.; KORZHEVSKIY, D. E. **NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker.** Acta Naturae Russian Federation Agency for Science and Innovation, 2015.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, A. et al. **Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus.** GLIA, v. 66, n. 7, p. 1417–1431, 1 jul. 2018.

HANSON, N. D.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. **Depression, antidepressants, and neurogenesis: A critical reappraisal.** Neuropsychopharmacology Nature Publishing Group, dez. 2011.

HANSSON, E. **Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation?** Acta Physiologica. Anais...Acta Physiol (Oxf), maio 2006.

HANSSON, E.; RÖNNBÄCK, L. **Altered neuronal-glia signaling in glutamatergic transmission as a unifying mechanism in chronic pain and mental fatigue.** Neurochemical Research Springer, maio 2004.

HE, L. et al. **Intra-CA1 Administration of Minocycline Alters the Expression of Inflammation-Related Genes in Hippocampus of CCI Rats.** Frontiers in Molecular Neuroscience, v. 12, p. 248, 24 out. 2019.

HEGYI, Z. et al. **CB1 receptor activation induces intracellular Ca²⁺ mobilization and 2-arachidonoylglycerol release in rodent spinal cord astrocytes.** Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 1–16, 1 dez. 2018.

HERKENHAM, M. et al. **Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study.** The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, v. 11, n. 2, p. 563–83, fev. 1991.

HOHMANN, A. G.; KANG, T.; WALKER, J. M. **Intrathecal cannabinoid administration suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord: Comparison with morphine.** Acta Pharmacologica Sinica, v. 20, n. 12, p. 1132–1136, 1 dez. 1999.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L. **Endocannabinoid mechanisms of pain modulation.** The AAPS journal, v. 8, n. 4, p. E693-708, 17 nov. 2006.

HOLDERBACH, R. et al. **Enhanced Long-Term Synaptic Depression in an Animal Model of Depression.** Biological Psychiatry, v. 62, n. 1, p. 92–100, 1 jul. 2007.

HU, B. et al. **Depression-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the CB2-selective agonist GW405833.** Pain, v. 143, n. 3, p. 206–212, jun. 2009.

HU, Y. et al. **Amitriptyline rather than lornoxicam ameliorates neuropathic pain-induced deficits in abilities of spatial learning and memory.** European Journal of Anaesthesiology, v. 27, n. 2, p. 162–168, fev. 2010.

HUANG, J. et al. **A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain.** Nature Neuroscience, v. 22, n. 10, p. 1659–1668, 1 out. 2019.

IBEAS BIH, C. et al. **Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders.** Neurotherapeutics, v. 12, n. 4, p. 699–730, 2015a.

IBEAS BIH, C. et al. **Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders.** *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 12, n. 4, p. 699–730, out. 2015b.

INQUIMBERT, P.; SCHOLZ, J. **Pain.** In: *Basic Neurochemistry*. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 928–941.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). **Epidemiology of Neuropathic Pain: How Common is Neuropathic Pain, and What Is Its Impact?** *Neuropathic Pain*. 2015.

JACOBS, B. L.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F. H. **Adult brain neurogenesis and psychiatry: A novel theory of depression.** *Molecular Psychiatry* Nature Publishing Group, 28 jun. 2000.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** v. 25, p. 1–28, 2011.

JAY, T. M. et al. **Excitatory Amino Acid Pathway from the Hippocampus to the Prefrontal Cortex. Contribution of AMPA Receptors in Hippocampo-prefrontal Cortex Transmission.** *The European journal of neuroscience*, v. 4, n. 12, p. 1285–1295, 1992.

JAY, T. M.; BURETTE, F.; LAROCHE, S. **Plasticity of the hippocampal-prefrontal.** 1996.

JI, R. R.; DONNELLY, C. R.; NEDERGAARD, M. **Astrocytes in chronic pain and itch.** *Nature Reviews Neuroscience* Nature Publishing Group, 1 nov. 2019.

JOHN A. ROBBINS, LIHONG QI, LORENA GARCIA, JARRED W. YOUNGER, AND M. F. S. **Relationship of Pain and Ancestry in African American Women.** *European Journal of Pain* v. 70, n. 12, p. 773–779, 2000.

JULIUS, D. **Molecular mechanisms of nociception.** *Nature*, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KANEKO, N.; SAWADA, M.; SAWAMOTO, K. **Mechanisms of neuronal migration in the adult brain.** *Journal of Neurochemistry*, v. 141, n. 6, p. 835–847, 1 jun. 2017.

KATHMANN, M. et al. **Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 372, n. 5, p. 354–361, 18 fev. 2006.

KATONA, I. et al. **“Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons”:** Correction. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 47, p. No Pagination Specified, 2006.

KAWAMURA, Y. et al. **The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum.** *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26, n. 11, p. 2991–3001, 15 mar. 2006.

KHANNA, S. **Dorsal hippocampus field CA1 pyramidal cell responses to a persistent versus an acute nociceptive stimulus and their septal modulation.** *Neuroscience*, v. 77, n. 3, p. 713–721, 3 fev. 1997.

KHANNA, S.; SINCLAIR, J. G. **Noxious stimuli produce prolonged changes in the CA1 region of the rat hippocampus.** *Pain*, v. 39, n. 3, p. 337–343, 1 dez. 1989.

KIM, W.; KIM, S. K.; NABEKURA, J. **Functional and structural plasticity in the primary somatosensory cortex associated with chronic pain.** *Journal of Neurochemistry*, Blackwell Publishing Ltd, 1 maio 2017.

KLAUENBERG, S. et al. **Depression and changed pain perception: Hints for a central disinhibition mechanism.** *Pain*, v. 140, n. 2, p. 332–343, 2008.

KOOSHKI, R. et al. **The effect of ca1 administration of orexin-a on hippocampal expression of COX-2 and BDNF in a rat model of orofacial pain.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 76, n. 9, p. 603–608, 1 set. 2018.

KOYAMA, Y. **Signaling molecules regulating phenotypic conversions of astrocytes and glial scar formation in damaged nerve tissues.** *Neurochemistry International*, Elsevier Ltd, 2014.

KRETZ, R. **Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity.** *Journal of Neuroscience Methods*, v. 11, n. 2, p. 129–135, 1984.

KRISHNAN, K. R. et al. **Chronic pain and depression. II. Symptoms of anxiety in chronic low back pain patients and their relationship to subtypes of depression.** Pain, v. 22, n. 3, p. 289–94, jul. 1985.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. **The molecular neurobiology of depression.** Nature, Nature Publishing Group, out. 2008.

KUNER, R.; FLOR, H. **Structural plasticity and reorganisation in chronic pain.** Nature Reviews Neuroscience, v. 18, n. 1, p. 20–30, 1 jan. 2017.

KUZUMAKI, N. et al. **Chronic pain-induced astrocyte activation in the cingulate cortex with no change in neural or glial differentiation from neural stem cells in mice.** Neuroscience Letters, v. 415, n. 1, p. 22–27, 19 mar. 2007.

LAROCHE, S.; JAY, T. M.; THIERRY, A.-M. **Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region.** Neuroscience Letters, v. 114, n. 2, p. 184–190, 3 jul. 1990.

LENG, Y. F. et al. **Effects of tetramethylpyrazine on neuronal apoptosis in the superficial dorsal horn in a rat model of neuropathic pain.** Am J Chin Med, v. 40, n. 6, p. 1229–1239, 2012.

LI, N. et al. **mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists.** Science, v. 329, n. 5994, p. 959–964, 20 ago. 2010.

LI, T. et al. **An update on reactive astrocytes in chronic pain.** Journal of Neuroinflammation, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2019a.

LI, T. et al. **An update on reactive astrocytes in chronic pain.** Journal of Neuroinflammation, BioMed Central Ltd., 9 jul. 2019b.

LIM, E. P. et al. **Locus coeruleus stimulation and noradrenergic modulation of hippocampo-prefrontal cortex long-term potentiation.** International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 13, n. 9, p. 1219–1231, out. 2010.

LIU, L.; RUDIN, M.; KOZLOVA, E. N. **Glial cell proliferation in the spinal cord after dorsal rhizotomy or sciatic nerve transection in the adult rat.** Experimental Brain Research, v. 131, n. 1, p. 64–73, 2000.

- LIU, R. X. et al. **No DCX-positive neurogenesis in the cerebral cortex of the adult primate.** *Neural Regeneration Research*, v. 15, n. 7, p. 1290–1299, 1 jul. 2020.
- LIU, Y. et al. **TNF- α differentially regulates synaptic plasticity in the hippocampus and spinal cord by microglia-dependent mechanisms after peripheral nerve injury.** *Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 4, p. 871–881, 25 jan. 2017.
- LOW, L. A. et al. **Nerve injury causes long-term attentional deficits in rats.** *Neuroscience Letters*, v. 529, n. 2, p. 103–107, 7 nov. 2012.
- LU, Y.; ZHU, L.; GAO, Y. J. **Pain-related aversion induces astrocytic reaction and proinflammatory cytokine expression in the anterior cingulate cortex in rats.** *Brain Research Bulletin*, v. 84, n. 2, p. 178–182, 1 fev. 2011.
- LURIA, A. R. **Fundamentos de neuropsicologia.** São Paulo: Edusp, p. 347, 1981.
- MACKIE, K.; HILLE, B. **Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 9, p. 3825–9, 1 maio 1992.
- MAHGOUB, M. et al. **Effects of cannabidiol on the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors.** *European Journal of Pharmacology*, v. 720, n. 1–3, p. 310–319, 15 nov. 2013.
- MAIONE, S. et al. **Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action.** *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 3, p. 584–596, 2011.
- MALETIC, V. et al. **Neurobiology of depression: An integrated view of key findings.** *International Journal of Clinical Practice*, Wiley-Blackwell, dez. 2007.
- MALVESTIO, R. B. et al. **Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT_{1A} and CB₁ receptors.** *Brain Research Bulletin*, 27 jun. 2021.
- MARINHO, A. L. Z. et al. **Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: Contribution of 5HT_{1A} receptors and stressful experiences.** *Behavioural Brain Research*, v. 286, p. 49–56, 2015.

MASSART, R. et al. **Overlapping signatures of chronic pain in the DNA methylation landscape of prefrontal cortex and peripheral T cells.** Scientific reports, v. 6, p. 19615, 28 jan. 2016.

MEACHAM, K. et al. **Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms.** Current Pain and Headache Reports, Current Medicine Group LLC 1, 1 jun. 2017.

MECHOULAM, R.; HANUŠ, L. **Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 121, n. 1–2, p. 35–43, 31 dez. 2002.

MEDEIROS, P. et al. **N-methyl-d-aspartate Receptors in the Prelimbic Cortex are Critical for the Maintenance of Neuropathic Pain.** Neurochemical Research, p. 1–13, 17 jul. 2019a.

MEDEIROS, P. et al. **The Primary Motor Cortex Stimulation Attenuates Cold Allodynia in a Chronic Peripheral Neuropathic Pain Condition in Rattus norvegicus.** World Journal of Neuroscience, v. 09, n. 03, p. 138–152, 1 ago. 2019b.

MEDEIROS, P. et al. **Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice.** Journal of Neuroscience Research, v. 98, n. 2, p. 338–352, 1 fev. 2020a.

MEDEIROS, P. et al. **Indomethacin attenuates mechanical allodynia during the organization but not the maintenance of the peripheral neuropathic pain induced by nervus ischiadicus chronic constriction injury.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 53, n. 5, 27 abr. 2020b.

MEDEIROS, P. et al. **CB1-cannabinoid-, TRPV1-vanilloid- and NMDA-glutamatergic-receptor-signalling systems interact in the prelimbic cerebral cortex to control neuropathic pain symptoms.** Brain Research Bulletin, v. 165, p. 118–128, 1 dez. 2020c.

MEDEIROS, P. et al. **An Adapted Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve Produces Sensory, Affective, and Cognitive Impairments: A Peripheral Mononeuropathy Model for the Study of Comorbid Neuropsychiatric Disorders Associated with Neuropathic Pain in Rats.** Pain medicine (Malden, Mass.), v. 22, n. 2, p. 338–351, 23 fev. 2021.

- MELZACK, R. **From the gate to the neuromatrix**. Pain, v. 82, n. SUPPL.1, 1999.
- METZ, A. E. et al. **Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 7, p. 2423–2428, 17 fev. 2009.
- MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. **Pathological and protective roles of glia in chronic pain**. Nature Reviews Neuroscience. v. 10, n. 1, p. 23-36. jan. 2009.
- MLOST, J.; BRYK, M.; STAROWICZ, K. **Cannabidiol for pain treatment: Focus on pharmacology and mechanism of action**. International Journal of Molecular Sciences, MDPI AG. V.21, n 22. nov. 2020.
- MORENO, F. A. et al. **Tryptophan depletion and depressive vulnerability**. Biological Psychiatry, v. 46, n. 4, p. 498–505, 15 ago. 1999.
- MULDER, A. B.; ARTS, M. P. M.; DA SILVA, F. H. L. **Short- and Long-term Plasticity of the Hippocampus to Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex Pathways in the Rat, In Vivo**. European Journal of Neuroscience, v. 9, n. 8, p. 1603–1611, 1 ago. 1997.
- MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. **Targeting glutamate signalling in depression: Progress and prospects**. Nature Reviews Drug Discovery, v. 16, n. 7, p. 472–486, 2017.
- MUTSO, A. A. et al. **Reorganization of hippocampal functional connectivity with transition to chronic back pain**. Journal of Neurophysiology, v. 111, n. 5, p. 1065–1076, 1 mar. 2014.
- NACHER, J.; CRESPO, C.; MCEWEN, B. S. **Doublecortin expression in the adult rat telencephalon**. European Journal of Neuroscience, v. 14, n. 4, p. 629–644, 1 ago. 2001.
- 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, 31 mar. 2003.
- NAKAMURA, H.; KATAYAMA, Y.; KAWAKAMI, Y. **Hippocampal CA1/subiculum-prefrontal cortical pathways induce plastic changes of nociceptive responses in cingulate and prelimbic areas**. BMC Neuroscience, v. 11, p. 1–9, 2010.

NARITA, M. et al. **Change in the expression of c-fos in the rat brain following sciatic nerve ligation.** Neuroscience Letters, v. 352, n. 3, p. 231–233, 11 dez. 2003.

NARITA, M. et al. **Direct evidence for spinal cord microglia in the development of a neuropathic pain-like state in mice.** Journal of Neurochemistry, v. 97, n. 5, p. 1337–1348, jun. 2006.

OHASHI, S. et al. **The serotonergic modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway.** Neuroscience letters, v. 342, n. 3, p. 179–82, 22 maio 2003.

OHAYON, M. M.; STINGL, J. C. **Prevalence and comorbidity of chronic pain in the German general population.** Journal of Psychiatric Research, v. 46, n. 4, p. 444–450, 2012.

PAK, D. J. et al. **Chronification of Pain: Mechanisms, Current Understanding, and Clinical Implications.** Current Pain and Headache ReportsCurrent Medicine Group LLC 1, fev. 2018.

PATERSON, L. M. et al. **5-HT radioligands for human brain imaging with PET and SPECT.** Medicinal research reviews, v. 33, n. 1, p. 54–111, jan. 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** Academic Press, n. 1, p. 1–474, 1998.

PENICAUD, L. et al. **Animal Models and Methods to Study the Relationships Between Brain and Tissues in Metabolic Regulation. In: Animal Models for the Study of Human Disease.** Elsevier Inc., 2013. p. 569–593.

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. **Animal models of major depression: drawbacks and challenges.** Journal of Neural Transmission, Springer-Verlag Wien, 1 nov. 2019.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. **Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.** Nature, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1977.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. **Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory.** Current Biology, v. 23, n. 17, p. 1–21, 2013.

- R. MELZACK AND K.L. CASEY. **Sensory, motivational, and central control determinants of pain.** International Symposium on the Skin Senses, Springfield, 1968.
- RAHN, E. J.; HOHMANN, A. G. **Cannabinoids as Pharmacotherapies for Neuropathic Pain: From the Bench to the Bedside.** Neurotherapeutics, v. 6, n. 4, p. 713–737, 2009.
- RAJA, S. N. et al. **The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises.** Pain, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, set. 2020.
- RAO, M. S.; SHETTY, A. K. **Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus.** European Journal of Neuroscience, v. 19, n. 2, p. 234–246, 1 jan. 2004.
- REN, K.; DUBNER, R. **Neuron-glia crosstalk gets serious: Role in pain hypersensitivity.** Current Opinion in Anaesthesiology. out. 2008.
- REN, W.-J. et al. **Peripheral Nerve Injury Leads to Working Memory Deficits and Dysfunction of the Hippocampus by Upregulation of TNF- α in Rodents.** Neuropsychopharmacology, v. 36, n. 5, p. 979–992, 2 abr. 2011.
- REVEST, J.-M. et al. **Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors.** Molecular Psychiatry, v. 14, n. 10, p. 959–967, 3 out. 2009.
- RICE, A. S. C.; FARQUHAR-SMITH, W. P.; NAGY, I. **Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy.** Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), v. 66, n. 2–3, p. 243–256, fev. 2002.
- RUAN, Y. et al. **An effective and concise device for detecting cold allodynia in mice.** Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2018.
- RUSANESCU, G.; MAO, J. **Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodelling.** Journal of Cellular and Molecular Medicine, v. 21, n. 2, p. 299–314, 1 fev. 2017.
- RUSSO, E. B. et al. **Agonistic Properties of Cannabidiol at 5-HT $1a$ Receptors.** Neurochemical Research, v. 30, n. 8, p. 1037–1043, ago. 2005.

SAFFARPOUR, S.; NASIRINEZHAD, F. **The CA1 hippocampal serotonin alterations involved in anxiety-like behavior induced by sciatic nerve injury in rats.** Scandinavian Journal of Pain, v. 21, n. 1, p. 135–144, 1 jan. 2021.

SAHAY, A.; HEN, R. **Adult hippocampal neurogenesis in depression.** Nature Neuroscience, v. 10, n. 9, p. 1110–1115, 28 set. 2007.

SAIGAL, N. et al. **Evaluation of serotonin 5-HT(1A) receptors in rodent models using [18F]mefway PET.** Synapse (New York, N.Y.), v. 67, n. 9, p. 596–608, set. 2013.

SALES, A. J. et al. **Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, v. 86, p. 255–261, 2018.

SANTANA, N.; ARTIGAS, F. **Laminar and cellular distribution of monoamine receptors in rat medial prefrontal cortex.** Frontiers in Neuroanatomy, Frontiers Media S.A., , 28 set. 2017.

SATOR-KATZENSCHLAGER, S. **Pain and neuroplasticity.** Revista Médica Clínica Las Condes, v. 25, n. 4, p. 699–706, 1 jul. 2014.

SCHOLZ, J. et al. **The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain.** Pain, v. 160, n. 1, p. 53–59, 2019.

SEMINOWICZ, D. A. et al. **MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain.** NeuroImage, v. 47, n. 3, p. 1007–14, set. 2009.

SERGE MARCHAND. **The Phenomenon of Pain.** IASP Press, 2012.

SEWELL, R. D. E. **Neuropathic pain models and outcome measures: a dual translational challenge.** Annals of Translational Medicine, v. 6, n. S1, p. S42–S42, nov. 2018.

SHENG, W. S. et al. **Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1 β -stimulated human astrocytes.** GLIA, v. 49, n. 2, p. 211–219, 15 jan. 2005.

SILOTE, G. P. et al. **Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms.** Journal of Chemical Neuroanatomy, Elsevier B.V. v. 98, p. 104-116, 1 jul. 2019.

SOLTANI ZANGBAR, H. et al. **Theta Oscillations through Hippocampal/Prefrontal Pathway: Importance in Cognitive Performances.** Brain Connectivity, Mary Ann Liebert Inc. v. 10, n. 4, p. 157-169 , 1 maio 2020.

SOUZA, J. B. DE et al. **Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey.** Pain Research and Management, v. 2017, 2017.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T.; CLARK, R. E. **Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective.** Nature Reviews Neuroscience. V. 8, n. 11, p. 872-883. nov. 2007.

STAROWICZ, K. et al. **Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways.** The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, v. 27, n. 50, p. 13739–49, 12 dez. 2007.

STAROWICZ, K.; PRZEWLOCKA, B. **Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 367, n. 1607, p. 3286–3299, 5 dez. 2012.

STELLA, N. **Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas.** Glia. v. 58, n. 9, p. 1017–1030. Jul 2010.

TAJERIAN, M. et al. **Peripheral Nerve Injury Is Associated with Chronic, Reversible Changes in Global DNA Methylation in the Mouse Prefrontal Cortex.** PLoS ONE, v. 8, n. 1, p. e55259, 28 jan. 2013.

TAKAHASHI, K. A.; CASTILLO, P. E. **The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus.** Neuroscience, v. 139, n. 3, p. 795–802, 1 jan. 2006.

TAKITA, M. et al. **Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway.** The European journal of neuroscience, v. 11, n. 11, p. 4145–8, nov. 1999.

- TERADA, M. et al. **Suppression of enriched environment-induced neurogenesis in a rodent model of neuropathic pain.** *Neuroscience Letters*, v. 440, n. 3, p. 314–318, 8 ago. 2008.
- THIERRY, A. M. et al. **Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics.** *Hippocampus*, v. 10, n. 4, p. 411–419, 2000.
- THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. **Cortico-limbic pain mechanisms.** *Neuroscience Letters*, Elsevier Ireland Ltd. v. 702, p. 15-23. mai 2019.
- TIAGO GONÇ ALVES, J. et al. **Leading-Edge Review Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior.** *Cell*, v. 167, p. 897–914, 2016.
- TREEDE, R.-D. et al. **Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11).** *Pain*, v. 160, n. 1, p. 19–27, 1 jan. 2019.
- TSOU, K. et al. **Suppression of noxious stimulus-evoked expression of fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord by a selective cannabinoid agonist.** *Neuroscience*, v. 70, n. 3, p. 791–798, 1 fev. 1996.
- TSOU, K. et al. **Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system.** *Neuroscience*, v. 83, n. 2, p. 393–411, mar. 1998.
- TULVING, E. **Elements of episodic memory.** Clarendon, 1985.
- TULVING, E. **Episodic Memory: From Mind to Brain.** *Annual Review of Psychology*, v. 53, n. 1, p. 1–25, fev. 2002.
- WALKER, A. K. et al. **Neuroinflammation and Comorbidity of Pain and Depression.** *Pharmacological Reviews*, v. 66, n. 1, p. 80–101, 2013.
- WANG, L.; YUAN, L.-L. **Activation of M2 muscarinic receptors leads to sustained suppression of hippocampal transmission in the medial prefrontal cortex.** *The Journal of Physiology*, v. 587, n. 21, p. 5139–5147, 1 nov. 2009.
- WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. **Glial activation: A driving force for pathological pain.** *Trends in Neurosciences*, Elsevier Current Trends. v.24, n. 8, p. 450-5, ago. 2001.

- WATSON, J. C.; SANDRONI, P. **Central Neuropathic Pain Syndromes**. Mayo Clinic Proceedings. Anais...Elsevier Ltd, 1 mar. 2016
- WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. **Endocannabinoid signaling in the brain**. Science (New York, N.Y.), v. 296, n. 5568, p. 678–82, 26 abr. 2002a.
- WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. **Endocannabinoid signaling in the brain**. Science (New York, N.Y.), v. 296, n. 5568, p. 678–82, 26 abr. 2002b.
- XING, J.; LI, J. **TRPV1 Receptor Mediates Glutamatergic Synaptic Input to Dorsolateral Periaqueductal Gray (dl-PAG) Neurons**. Journal of Neurophysiology, v. 97, n. 1, p. 503–511, jan. 2007.
- XUHONG, W. et al. **Dorsal Hippocampal Activation Suppresses Neuropathic Pain Behaviors: Chronic pain as extinction-resistant pain-related memory traces**. bioRxiv. p. 1–41, 2018.
- YAMASHITA, A. et al. **Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain**. Synapse, v. 68, n. 6, p. 235–247, 2014.
- YAMASHITA, P. S. et al. **Serotonin actions within the prelimbic cortex induce anxiolysis mediated by serotonin 1a receptors**. Journal of Psychopharmacology, v. 33, n. 1, p. 3–11, 19 jan. 2019.
- YAN, N. et al. **Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex mediates the affective component of visceral pain memory in rats**. Neurobiology of Learning and Memory, v. 97, n. 1, p. 156–164, 2012.
- YATES, D. **Astrocytic cueing of neuronal migration**. Nature Reviews Neuroscience, v. 21, n. 3, p. 120, 1 mar. 2020.
- YE, X. et al. **Direct dorsal hippocampal-prelimbic cortex connections strengthen fear memories**. Nature Neuroscience, v. 20, n. 1, p. 52–61, 2017.
- ZAKERI, M. et al. **Modulatory role of hippocampal dopamine receptors in antinociceptive responses induced by chemical stimulation of the lateral hypothalamus in an animal model of persistent inflammatory pain**. Brain Research Bulletin, v. 162, p. 253–260, 1 set. 2020.

ZANELATI, T. et al. **Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors.** British Journal of Pharmacology, v. 159, n. 1, p. 122–128, jan. 2010.

ZHAO, Y. FAN et al. **TNF- α - mediated peripheral and central inflammation are associated with increased incidence of PND in acute postoperative pain.** BMC Anesthesiology, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

ZHU, J. et al. **Interaction of Glia Activation and Neurotransmission in Hippocampus of Neuropathic Rats Treated With Mirtazapine.** Experimental and Clinical Psychopharmacology, v. 17, n. 3, p. 198–203, jun. 2009.

ZIMMER, A. et al. **Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 10, p. 5780–5, 11 maio 1999.

Apêndice 1 – Tabelas estatística

Tabela A1: Efeito do tratamento intra-CA₁ de CBD e intra-PrL de antagonistas, sobre a alodinia mecânica. Dados de média e \pm SEM. Dados obtidos antes da cirurgia (LB1), antes da microinjeção (LB2) e após o tratamento (5, 15, 30, 45 e 60 min).

TESTE DE VON FREY

	LB1	LB2	5	15	30	45	60
VEÍCULO(SHAM)	26 \pm 0	60 \pm 0	60 \pm 0	70 \pm 6,5	65 \pm 0	60 \pm 0	60 \pm 0
VEÍCULO (CCI)	38,75 \pm 6,22	6 \pm 0,37	7 \pm 0,37	7,25 \pm 0,36	7 \pm 0,37	7,25 \pm 0,36	6 \pm 0,53
CBD 15 PMOL (CCI)	45,42 \pm 6,86	6,57 \pm 0,57	7,14 \pm 0,59	15,42 \pm 8,4	6,85 \pm 0,40	6,57 \pm 0,57	6,28 \pm 0,52
CBD 30 PMOL (CCI)	39,5 \pm 9,61	8 \pm 0	19,12 \pm 2,01	28,87 \pm 4,6	33,12 \pm 6,01	26,87 \pm 5,22	21,37 \pm 5,74
CBD 60 PMOL (CCI)	30,85 \pm 4,85	5,71 \pm 0,52	6 \pm 0	6 \pm 0	6,28 \pm 0,68	6,28 \pm 0,52	6,28 \pm 0,28
CBD 60 PMOL (SHAM)	26 \pm 0	55,75 \pm 4,25	70 \pm 6,54	70 \pm 6,54	70 \pm 6,54	70 \pm 6,54	65,75 \pm 8,54
COCL2 + VEÍCULO (CCI)	22,85 \pm 2,02	4,57 \pm 0,36	6,57 \pm 0,84	5,42 \pm 0,36	5,42 \pm 0,94	6,57 \pm 0,36	6,28 \pm 0,68
WAY + VEÍCULO (CCI)	21,28 \pm 2,22	5,71 \pm 0,52	4,28 \pm 0,52	4 \pm 0,43	5,14 \pm ,40	5,14 \pm 0,40	6,57 \pm 0,36
AM251 + VEÍCULO (CCI)	24,42 \pm 1,57	5,71 \pm 0,68	8,42 \pm 1,15	7,85 \pm 1,24	6,71 \pm 1,49	7,14 \pm 0,59	5,42 \pm 0,94
CBD + COCL2 (CCI)	34,5 \pm 5,56	7,42 \pm 0,36	5,14 \pm 0,85	4,57 \pm 0,36	6,28 \pm 0,52	4,28 \pm 0,28	5,42 \pm 0,36
CBD + WAY (CCI)	26 \pm 0	5,25 \pm 0,36	7 \pm 0,37	6 \pm 0,32	6,5 \pm 0,32	7,75 \pm 0,45	7,75 \pm 0,59
CBD + AM251 (CCI)	26 \pm 0	6 \pm 0	6,25 \pm 0,70	4 \pm 0	5,25 \pm 0,36	6,75 \pm 0,52	6,75 \pm 0,52

Tabela A2: Efeito do tratamento intra-CA₁ de CBD e intra-PrL de antagonistas, sobre a alodinia ao frio. Dados de média e \pm SEM. Dados obtidos antes da cirurgia (LB1), antes da microinjeção (LB2) e após o tratamento (5, 15, 30, 45 e 60 min).

TESTE DE ACETONA

	LB1	LB2	5	15	30	45	60
VEÍCULO(SHAM)	0 \pm 0	0,14 \pm 0,1	0,42 \pm 0,29	0 \pm 0	0,14 \pm 0,1	0,14 \pm 0,1	0,28 \pm 0,2
VEÍCULO (CCI)	0,28 \pm 0,18	6,42 \pm 0,64	5,28 \pm 0,94	5,28 \pm 0,77	5,71 \pm 0,89	6,42 \pm 0,71	6,28 \pm 1,1
CBD 15 PMOL (CCI)	0 \pm 0	5 \pm 0,7	3,6 \pm 0,49	3,16 \pm 0,54	3 \pm 0,44	2,16 \pm 0,54	3,66 \pm 0,49
CBD 30 PMOL (CCI)	0,33 \pm 0,21	5,33 \pm 0,66	5,83 \pm 0,7	4,16 \pm 1	4,33 \pm 0,55	3,66 \pm 0,42	4,16 \pm 0,7
CBD 60 PMOL (CCI)	0,57 \pm 0,2	4,85 \pm 1,1	0,57 \pm 0,2	0,42 \pm 0,2	0,42 \pm 0,2	0,14 \pm 0,1	1,42 \pm 0,4
CBD 60 PMOL (SHAM)	0,57 \pm 0,20	0,57 \pm 0,20	0,57 \pm 0,29	0,57 \pm 0,29	0,42 \pm 0,20	0,42 \pm 0,20	0,14 \pm 0,14
COCL2 + VEÍCULO (CCI)	0,8 \pm 0,2	6,6 \pm 0,4	8,6 \pm 0,24	6,6 \pm 0,67	8,2 \pm 0,37	8,4 \pm 0,24	7 \pm 1,26
WAY + VEÍCULO (CCI)	0,85 \pm 0,14	6,42 \pm 0,94	4,71 \pm 0,89	4 \pm 1,27	5,42 \pm 1,41	4,57 \pm 1,23	6,42 \pm 0,61
AM251 + VEÍCULO (CCI)	0,5 \pm 0,22	8,33 \pm 0,42	7 \pm 0	8,66 \pm 0,33	8 \pm 0,44	8,33 \pm 0,42	8,33 \pm 0,42
CBD + COCL2 (CCI)	0 \pm 0	7 \pm 0,44	4,5 \pm 0,34	4,83 \pm 0,94	7,66 \pm 0,21	7,16 \pm 0,30	6 \pm 0,57
CBD + WAY (CCI)	1,71 \pm 0,71	6,85 \pm 0,7	4,14 \pm 1,18	4,85 \pm 1,35	5,71 \pm 1,47	5,28 \pm 1,37	6,42 \pm 1,02
CBD + AM251 (CCI)	0,33 \pm 0,21	8,83 \pm 0,16	4,16 \pm 0,40	5 \pm 0,25	2,5 \pm 0,22	3,33 \pm 0,42	4 \pm 0,51

Tabela A3: Efeito do tratamento intra-CA₁ de CBD e intra-PrL de antagonistas, sobre comportamentos de mobilidade no teste de nado forçado. Dados obtidos 15 minutos após o tratamento.

	Veículo (sham)	Veículo (CCI)	CBD 60 pmol	CoCl ₂ + veí	WAY + veí	AM251 + veí	CoCl ₂ + CBD	WAY + CBD	AM251 + CBD
NADAR (Freq)									
Mínimo	9	9	13	8	10	5	4	6	5
Máximo	25	22	23	22	13	8	10	11	9
Range	16	13	10	14	3	3	6	5	4
Média	17	14	17	16	11	6	6,7	9,2	7,1
SD	5,4	4,4	3,3	4,5	0,82	0,87	1,8	1,5	1,5
SEM	1,9	1,4	1,1	1,5	0,27	0,29	0,6	0,49	0,48
CI da média (95%)	12, 21	11, 17	15, 20	13,2	11, 12	5,3, 6,7	5,3, 8,1	8,1, 10	6,0, 8,2
NADAR (Tempo)									
Mínimo	114	48	102	61	80	49	45	82	11
Máximo	234	188	276	143	135	148	114	114	124
Range	120	140	174	82	54	99	69	33	113
Média	176	122	182	88	98	106	93	96	67
SD	35	46	59	32	17	38	21	9,1	41
SEM	13	14	20	11	5,6	13	7	3	14
CI da média (95%)	146, 206	90, 155	137, 227	64, 113	85, 111	76, 135	77, 109	89, 103	36, 99
ESCALAR (Freq)									
Mínimo	0	2	1	0	0	0	1	1	0
Máximo	11	7	9	6	2	5	8	6	5
Range	11	5	8	6	2	5	7	5	5
Média	7,7	4,9	4,7	2,1	0,78	2,1	4,8	3,7	2,2
SD	3,7	1,6	2,9	2,2	0,83	1,8	2,1	1,4	1,4
SEM	1,2	0,54	0,96	0,73	0,28	0,61	0,7	0,47	0,46
CI da média (95%)	4,8; 11	3,6; 6,1	2,5; 6,9	0,42; 3,8	0,14; 1,4	0,7; 3,5	3,2; 6,4	2,6; 4,8	1,2; 3,3
ESCALAR (Tempo)									
Mínimo	0	24	0	0	0	0	25	16	0
Máximo	183	164	123	103	27	29	144	133	106
Range	183	140	123	103	27	29	118	117	106
Média	82	74	54	21	9,4	13	77	87	30
SD	49	41	47	33	10	12	36	35	32

SEM	14	13	16	11	3,3	4	12	12	11
CI da média (95%)	51; 113	44; 103	18; 90	4,7; 46	1,8; 17	3,2; 22	49; 105	60; 113	5,8; 55

Tabela A4: Efeito do tratamento intra-CA₁ de CBD e intra-PrL de antagonistas, sobre comportamentos de mobilidade no teste de nado forçado. Dados obtidos 15 minutos após o tratamento.

	Veículo (sham)	Veículo (CCI)	CBD 60 pmol	CoCl₂ + vei	WAY + vei	AM251 + vei	CoCl₂ + CBD	WAY + CBD	AM251 + CBD
IMOBILIDADE (Freq)									
Mínimo	3	9	10	10	12	5	3	6	8
Máximo	16	22	19	28	22	14	10	10	16
Range	13	13	9	18	10	9	7	4	8
Média	7,6	15	14	21	15	9,8	7,2	7,9	9,8
SD	5,3	5	2,8	5,3	2,9	2,6	2	1,6	2,4
SEM	2	1,4	0,92	1,8	0,98	0,86	0,66	0,54	0,81
CI da média (95%)	2,7; 12	12; 18	12; 16	17; 25	13; 17	7,8; 12	5,7; 8,7	6,6; 9,1	7,9; 12
IMOBILIDADE (Tempo)									
Mínimo	2	39	9,5	131	125	139	80	121	132
Máximo	99	130	47	221	208	248	170	224	283
Range	97	90	37	90	83	109	90	103	151
Média	27	87	34	182	187	196	120	183	195
SD	36	29	14	33	27	38	28	35	49
SEM	13	10	4,7	11	9,1	13	9,3	12	16
CI da média (95%)	5,9; 60	63; 111	23; 45	157; 207	166; 208	166; 225	99; 142	156; 210	157; 233

Tabela A5: Efeito do tratamento intra-CA₁ de CBD e intra-PrL de antagonistas, sobre comportamentos de autolimpeza no teste de spray de sacarose. Dados obtidos 15 minutos após o tratamento.

	Veículo (sham)	Veículo (CCI)	CBD 60 pmol	CoCl2 + veí	WAY + veí	AM251 + veí	CoCl2 + CBD	WAY + CBD	AM251 + CBD
Freq. auto-limpeza									
Mínimo	19	4	6	1	5	4	2	1	1
Máximo	40	21	15	6	7	7	5	7	8
Range	21	17	9	5	2	3	3	6	7
Média	26	12	11	4,4	6,2	5	3,9	3,4	4,2
SD	7,8	5,5	3,1	1,5	0,83	1	1,1	1,7	2,5
SEM	2,6	1,8	1	0,5	0,28	0,33	0,35	0,58	0,83
CI da média (95%)	20; 32	8,2; 17	9; 14	3,3; 5,6	5,6; 6,9	4,2; 5,8	3,1; 4,7	2,1; 4,8	2,3; 6,1
Tempo auto-limpeza									
Mínimo	73	14	48	22	44	17	33	5	0,29
Máximo	102	72	101	63	75	48	115	47	69
Range	28	59	52	40	31	31	83	42	69
Média	89	44	71	37	55	32	66	26	39
SD	13	20	22	15	12	9,1	25	13	23
SEM	4,3	6,6	7,3	5,1	4,2	3	8,5	4,3	7,5
CI da média (95%)	79; 99	28; 59	54; 88	25; 49	45; 64	26; 39	47; 86	16; 36	21; 56
Latência									
Mínimo	1	51	20	120	80	45	50	40	49
Máximo	60	275	60	250	220	248	151	280	215
Range	59	224	40	130	140	203	101	240	166
Média	29	163	45	202	119	134	114	139	122
SD	27	95	16	55	53	63	31	80	64
SEM	8,9	32	5,3	18	18	21	10	27	21
CI da média (95%)	8,3; 49	90; 235	33; 58	160; 244	78; 160	85; 182	90; 137	77; 201	73; 172

Tabela A6: Efeito do tratamento intra-CA₁ de CBD e intra-PrL de antagonistas, sobre desempenho nas tarefas mnemônicas. Dados obtidos 15 minutos após o tratamento.

	Veículo (sham)	Veículo (CCI)	CBD 60 pmol	CoCl2 + vei	WAY + vei	AM251 + vei	CoCl2 + CBD	WAY + CBD	AM251 + CBD
%Alteração espontânea									
Mínimo	53	25	60	43	44	33	33	33	33
Máximo	80	60	100	60	55	56	75	67	67
Range	27	35	40	17	11	22	42	33	33
Média	66	45	78	50	51	43	60	53	49
SD	12	12	14	5,4	3,4	6,8	13	10	13
SEM	4,6	4,5	5,4	2	1,3	2,6	5	3,9	5
CI da média (95%)	55; 77	34; 56	65; 91	45; 55	47; 54	37; 49	48; 72	44; 63	37; 62
Index									
Mínimo	0,073	-0,48	-1	-0,7	-0,96	-0,44	-0,68	-0,8	-0,42
Máximo	1	0,62	0,23	0,17	-0,036	-0,26	0,15	-0,042	-0,25
Range	0,93	1,1	1,2	0,87	0,92	0,19	0,83	0,76	0,17
Média	0,36	-0,065	-0,019	-0,33	-0,5	-0,33	-0,32	-0,45	-0,32
SD	0,25	0,39	0,35	0,3	0,35	0,064	0,28	0,3	0,06
SEM	0,073	0,12	0,11	0,093	0,11	0,02	0,089	0,095	0,019
CI da média (95%)	0,2; 0,52	-0,35; 0,22	-0,25; 0,22	-0,54; -0,12	-0,75; -0,25	-0,38; -0,29	-0,52; -0,12	-0,66; -0,23	-0,36; -0,28

Tabela A7: Efeito do tratamento intra-CA₁ de CBD e intra-PrL de antagonistas, sobre a locomoção no teste de campo aberto. Dados obtidos 15 minutos após o tratamento.

	Veículo (sham)	Veículo (CCI)	CBD 60 pmol	CoCl2 + vei	WAY + vei	AM251 + vei	CoCl2 + CBD	WAY + CBD	AM251 + CBD
Locomoção									
Mínimo	42	29	59	111	49	80	55	43	59
Máximo	120	102	105	131	141	136	108	153	164
Range	78	73	46	20	92	56	53	110	105
Média	82	61	90	120	96	111	86	84	98
SD	25	27	16	6	46	27	16	33	31
SEM	8,5	9,1	5,2	2	15	8,9	5,3	11	10
CI da média (95%)	63; 102	40; 82	78; 102	116; 125	60; 131	90; 131	74; 99	58; 109	74; 122

Apêndice 2– Controle negativo do experimento de imuno-histoquímica por fluorescência.

A fim de avaliar a especificidade dos anticorpos secundários no estudo anatômico por imunofluorescência, foi realizado o procedimento de revelação seguindo o protocolo descrito em cada uma das marcações, mas utilizando apenas o BSA a 1% sem o anticorpo primário. Como demonstrado na figura X, não houve marcação inespecífica.

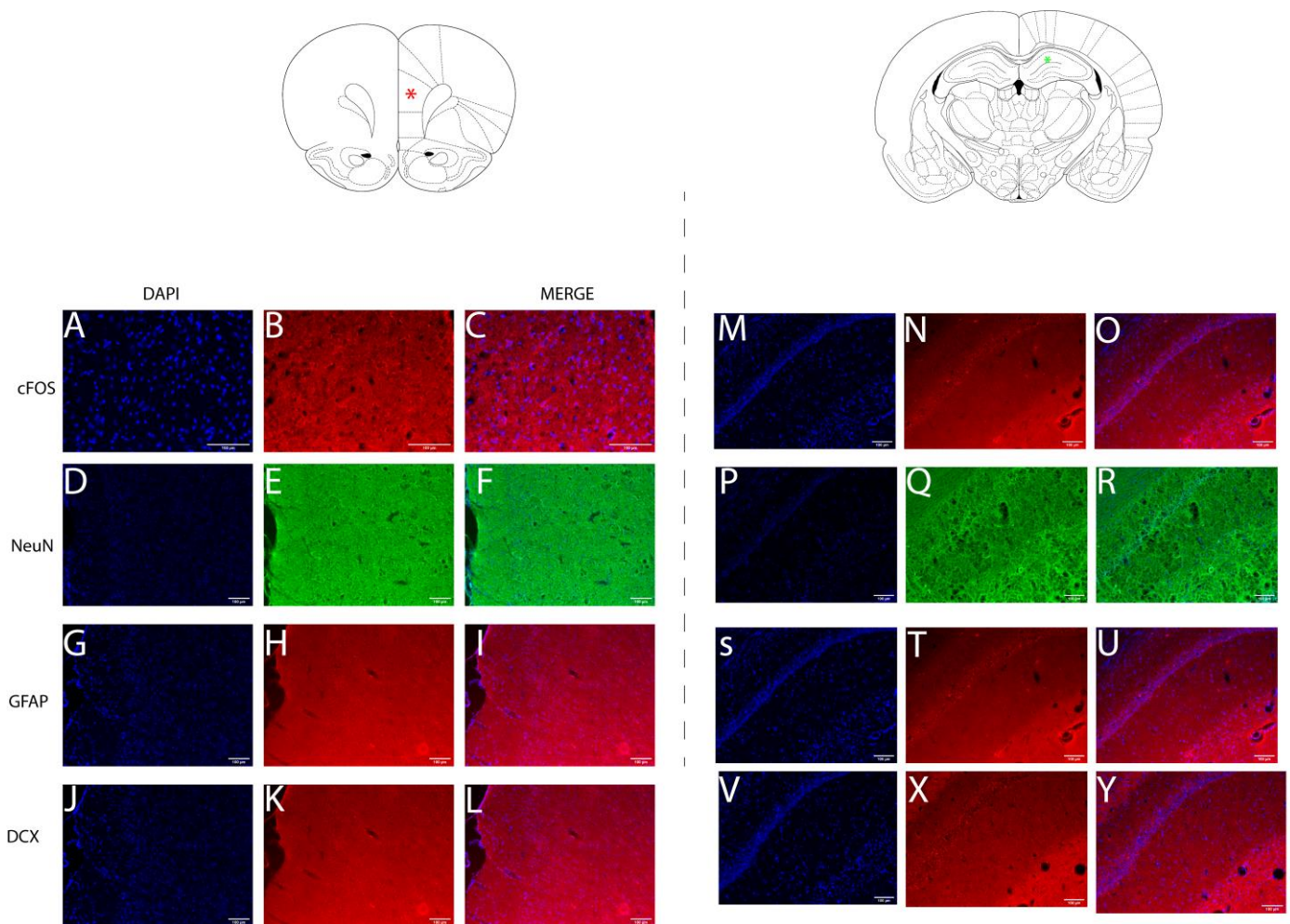


Figura A3: Fotomicrografias de secções transversais representativas dos controles negativos dos anticorpos utilizados. Anticorpo Alexa fluor 594 anti-rabbit Abcam no PrL (A-C) e em CA₁ (M-O). Anticorpo Alexa fluor 588 anti-rabbit Invitrogen no PrL (D-F) e em CA₁ (P-R). Anticorpo Alexa fluor 594 anti-mouse Invitrogen no PrL (G-I) e em CA₁ (S-U). Anticorpo Alexa fluor 680 anti-chicken Abcam no PrL (J-L) e em CA₁ (V-Y).

Apêndice 3 – Certificado de aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: “*Estudo do efeito do canabidiol e do envolvimento dos receptores CB1 e 5-HT1A na conexão córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal sobre os aspectos cognitivos e emocionais na dor neuropática crônica em ratos*”, registrado com o número do protocolo 215/2019, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *fillo Chordata, subfillo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 26 de outubro de 2020.

Colaboradores: Ana Carolina Medeiros
Renato Leonardo de Freitas

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/10/2020 a 30/07/2021
Espécie/Linhagem	Rato / Wistar-OLD
Nº de animais	240
Peso/Idade	100g / 28 dias
Sexo	Macho
Origem	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2020

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

Apêndice 4 – Manuscrito em fase final de elaboração