

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS
DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PSICOBIOLOGIA

**Canabidiol em modelo pré-clínico de dor neuropática: uma
avaliação dos aspectos sensoriais, emocionais e inflamatórios
relacionados com a modulação da sensibilidade dolorosa**

GLEICE KELLI RIBEIRO DA
SILVA-CARDOSO

TESE



Gleice Kelli Ribeiro da Silva-Cardoso

Canabidiol em modelo pré-clínico de dor neuropática: uma avaliação dos aspectos sensoriais, emocionais e inflamatórios relacionados com a modulação da sensibilidade dolorosa

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Orientadora: Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Ribeirão Preto

2022

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 A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva-Cardoso, G.K.R.

Canabidiol em modelo pré-clínico de dor neuropática: uma avaliação dos aspectos sensoriais, emocionais e inflamatórios relacionados com a modulação da sensibilidade dolorosa. 181 p.; 30 cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi.

1. Aversão a Dor 2. Canabidiol 3. Dor crônica 4. Marcadores inflamatórios 5. Receptores CB1 e TRPV1 6. proteína FosB

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gleice Kelli Ribeiro da Silva-Cardoso

Canabidiol em modelo pré-clínico de dor neuropática: uma avaliação dos aspectos sensoriais, emocionais e inflamatórios relacionados com a modulação da sensibilidade dolorosa

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Instituição: FFCLRP – USP

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/06877-5 pela concessão da bolsa de doutorado no país e o processo nº 2019/12439-3 pela concessão da bolsa BEPE no exterior. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001 pelo financiamento inicial da minha pesquisa de doutorado.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, ao Departamento de Psicologia e à PPG de Psicobiologia por se manterem firmes nestes momentos sombrios para a ciência e educação, em garantir excelência e estrutura aos seus alunos.

À Renata (secretária da PPG em Psicobiologia) por todo suporte aos longos destes anos e aos bons cafés compartilhados na cozinha do Bloco 6.

Gostaria de agradecer especialmente a professora Christie Leite-Panissi (carinhosamente Chris), por toda orientação e amizade ao longo desta jornada e por toda confiança depositada em minhas ideias e aspirações. À técnica de laboratório Aline pela troca de conhecimentos nos últimos meses e aos colegas do Laboratório de Neurofisiologia da Dor e do Comportamento, antigos e atuais (não irei me ater a nomes para não esquecer ninguém) pelos cafés e discussões científicas no dia a dia no laboratório.

Ao meu irmão Alan, por ser minha fortaleza nos momentos sombrios e por me lembrar que não importa a distância para se fazer presente e que ser a irmã mais velha não significa abraçar o mundo sempre. Aos meus pais Luiz e Angelina por nunca duvidarem de mim quando eu mesma já não acreditava. E ao meu companheiro de vida Willian por estar comigo ao longo desta jornada tanto no pessoal como no profissional.

E por fim a todas as cientistas mulheres que sempre me inspiraram a continuar neste caminho, meu muito obrigado por mostrar que o lugar de mulher é onde ela quiser estar presente!!!

RESUMO

Silva-Cardoso. G.K.R. **Canabidiol em modelo pré-clínico de dor neuropática: uma avaliação dos aspectos sensoriais, emocionais e inflamatórios relacionados com a modulação da sensibilidade dolorosa** 2022. 181 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2022.

Na população geral a incidência de dor crônica é de 6% a 8%, e afeta a qualidade de vida do paciente. O canabidiol (CBD) é considerado uma estratégia promissora para o tratamento da dor neuropática. Nosso objetivo foi avaliar o tratamento sistêmico com CBD (3 dias) em ratos submetidos à constrição do nervo ciático (CCI), em testes nociceptivos - von Frey, acetona e placa quente - (TN), teste de campo aberto (TCA), teste de rotarod, e de preferência de lugar condicionada (CPP), e a possível modulação do efeito do CBD na expressão dos receptores CB1 e TRPV1, além da proteína FosB, NeuN, marcadores inflamatórios IBA-1 e GFAP e as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. Foram utilizados 140 ratos Wistar (220 g, CEUA-USP: 208.1.103.58.5) submetidos a dois diferentes protocolos. Protocolo I: foi realizado a linha de base dos TN seguido de procedimento cirúrgico (CCI ou SHAM) no dia zero, o desenvolvimento de neuropatia foi acompanhado por três semanas (i-von Frey, ii-placa quente e iii - acetona). O teste do TCA foi realizado no 23º dia e o teste final de TN no 24º dia com 1 h de tratamento, e em seguida foi realizado o procedimento de perfusão. Com material encefálico, foi realizada a imunofluorescência para receptores CB1 e TRPV1 nas regiões do córtex cingulado anterior (ACC), córtex insular (AIC), complexo basolateral da amígdala (BLA) e hipocampo dorsal (HD) e ventral (HV). Protocolo II: foi realizado a linha de base dos TN e o treinamento de rotarod, seguido do procedimento cirúrgico no dia zero, o desenvolvimento de neuropatia foi acompanhado por três semanas pelos TN (i-von Frey, ii-placa quente e iii-acetona). O teste do rotarod foi realizado no 18º dia após a lesão e em seguida foi realizado a linha de base do CPP. Lidocaína (i.m. pata lesionada) foi usada como controle positivo e pareado no contexto de maior permanência na linha de base e o CBD (i.p.) foi usado no contexto menos preferido pelo animal na linha de base. O teste de TCA foi realizado no 23º dia após 4

horas do tratamento. No 25º dia (24 horas após o último condicionamento), os ratos foram expostos ao teste CPP sem aplicação da droga para o teste. E foi realizado a imunofluorescência para NeuN, IBA-1 e GFAP nas regiões do ACC, BLA e HD. Além disso, a imuno-histoquímica foi realizada para marcar a expressão da proteína FosB, as regiões ACC, BLA e HD. Foi utilizado o teste ANOVA de dois fatores, seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$. Nos resultados do Protocolo I: O tratamento com CBD por três dias em diferentes doses (0,3, 3, 10 e 30 mg/kg i.p.) mostrou efeito antialodínico em ratos CCI nos três testes de TN, bem como efeito ansiolítico no TCA. Ademais o CBD potencializou o aumento na expressão de receptores CB1 em regiões do circuito corticolímbico, e a cirurgia de CCI promoveu aumento de receptores TRPV1 nos animais e o tratamento com CBD potencializou este aumento de receptores. No protocolo II: os resultados demonstraram que o tratamento com CBD promoveu reversão do CCP nos animais CCI, além do efeito ansiolítico no TCA. Ademais houve aumento da expressão de IBA- 1, de GFAP e FosB+ nos animais CCI. Enquanto a expressão NeuN reduziu nestes animais. O tratamento com CBD 3 mg/kg foi capaz de normalizar estes resultados quando comparados aos animais controle. Podemos concluir, que o tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou a expressão dos receptores CB1 e TRPV1 e aumentou a expressão IBA-1 e GFAP nas regiões estudadas demonstrando que os efeitos do CBD estão ligados a marcadores inflamatórios, e pela participação do TRPV1 na modulação dos efeitos do CBD na dor crônica. Além disso, o tratamento com CBD reverteu a marcação crônica da ativação neuronal e aumentou a expressão de NeuN nas regiões que a cirurgia de CCI promoveu redução da densidade neuronal. Por fim observamos que o CBD modula a aversão a dor e induz efeitos do tipo ansiolítico nos animais, resultados estes que são promissores, quando lembramos da relação entre dor crônica e comorbidades. Os resultados observados neste estudo podem explicar os efeitos da modulação do CBD nas áreas envolvidas de regulação emocional e na percepção da dor crônica.

Palavras chaves: Aversão a Dor, Canabidiol, Dor crônica, CB1 e TRPV1, marcadores inflamatórios, proteína FosB,

ABSTRACT

Silva-Cardoso. G.K.R. **Cannabidiol in a preclinical model of neuropathic pain: an assessment of sensory, emotional and inflammatory aspects related to the modulation of pain sensitivity** 2022. 185 f. Thesis (Doctorate). University of São Paulo, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, 2022.

In the general population, chronic pain is 6% to 8% and affects the patient's quality of life. Cannabidiol (CBD) is considered a promising strategy for treating neuropathic pain. Our objective was to evaluate the systemic treatment with CBD (3 days) in rats submitted to sciatic nerve constriction (CCI), in nociceptive tests - von Frey, acetone and hot plate - (NT), open field test (OFT), the test of rotarod, and conditioned place preference (CPP), and the possible modulation of the effect of CBD on the expression of CB1 and TRPV1 receptors, in addition to the protein FosB, NeuN, inflammatory markers IBA-1 and GFAP and the interleukins IL-1 β , IL-6 and IL-10. 140 Wistar rats (220 g) were used, CEUA-USP: 208.1.103.58.5. The animals were submitted to two different protocols: Protocol I: the baseline of the NT was performed followed by a surgical procedure (CCI or SHAM) on day zero, the development of neuropathy was followed for three weeks (i-von Frey, ii-hot plate and iii - acetone). The TCA tests were performed on the 23rd day and the final NT test on the 24th day with 1 hour of treatment, followed by the perfusion procedure. And immunofluorescence was performed for CB1 and TRPV1 receptors in the regions of the anterior cingulate cortex (ACC), insular cortex (AIC), basolateral amygdala complex (BLA), and dorsal (HD) and ventral (HV) hippocampus. Protocol II: NT baseline and rotarod training were performed, followed by the surgical procedure on day zero, and neuropathy development was followed for three weeks by NT (i-von Frey, ii-hot plate, and iii-acetone). The rotarod test was performed on the 18th day after the injury, and then the CPP baseline was conducted. Lidocaine (i.m. injured paw) was used as a positive and matched control in the context of longer permanence at baseline, and CBD (i.p.) was used in the context less preferred by the animal at baseline. The OFT test was performed on the 23rd day after 4 hours of treatment. On the 25th day (24 hours after the last conditioning), the rats were exposed to the CPP test without application of the drug for

the test. And immunofluorescence was performed for NeuN, IBA-1, and GFAP in the ACC, BLA, and HD regions. In addition, immunohistochemistry was performed to label the expression of the FosB protein, the ACC, BLA, and HD regions. The two-way ANOVA test was used, followed by the Tukey test, $P < 0.05$. The results of Protocol I: Treatment with CBD for three days at different doses (0.3, 3, 10, and 30 mg/kg ip.) showed an antiallodynic effect in CCI rats in the three NT tests, as well as an anxiolytic effect in the TCA. In addition, CBD potentiated the increase in the expression of CB1 receptors in regions of the corticolimbic circuit, and the CCI surgery promoted an increase in TRPV1 receptors in the animals, and the treatment with CBD potentiated this increase in receptors. In protocol II: The results showed that the treatment with CBD promoted reversal of PCC in CCI animals and the anxiolytic effect on OFT. Furthermore, there was an increase in the expression of IBA-1, GFAP, and FosB+ in CCI animals. In contrast, NeuN expression was reduced in these animals. Treatment with CBD 3 mg/kg was able to normalize these results compared to control animals. We can conclude that treatment with CBD 3 mg/kg increased the expression of CB1 and TRPV1 receptors and increased IBA-1 and GFAP expression in the regions studied, demonstrating that the effects of CBD are linked to inflammatory markers and the participation of TRPV1 in the modulation of the effects of CBD on chronic pain. In addition, CBD treatment reversed the chronic labeling of neuronal activation and increased NeuN expression in regions where CCI surgery reduced neuronal density. Finally, we observed that CBD modulates pain aversion and induces anxiolytic-like effects in animals, promising results when we remember the relationship between chronic pain and comorbidities. These results observed in this study may explain the effects of CBD modulation in the areas of emotional modulation and perception of chronic pain.

Keywords: Cannabidiol, Chronic Pain, CB1 and TRPV1, inflammatory markers, Pain Aversion, Receptors, FosB protein.

Lista de Abreviaturas

5-HT1A – receptor serotoninérgico do tipo 1A

ACC - anterior córtex cingulado

AIC - córtex insular agranular

AMG - amígdala

ANOVA - análise de variância

AO - osteoartrite

AP-1 - proteína ativadora 1

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo

BLA - complexo basolateral da amígdala

CA1 – região 1 do corno de Amon

CA3 - região 3 do corno de Amon

CB1- receptor canabinóides tipo 1

CB2 – receptor canabinóides tipo 2

CBC - canabicromeno

CBCA - ácido canabicromeno

CBD - canabidiol

CBDA - ácido canabidiólico

CBDV - cannabidivarina

CBG - cannabigerol

CBGA - ácido cannabigerólico

CBL - canabicitolol

CBN – canabinol

CCI - constrição crônica do nervo ciático

CFA - adjuvante Completo de Freund

CIPN - neuropatia periférica induzida por quimioterapia

CPP - preferência condicionado ao lugar

EM - esclerose múltipla

FosB – proteína proto-oncogene

GABA - ácido gama-aminobutírico

GFAP - proteína ácida fibrilar glial

GPCR - receptores acoplados a proteínas G

GrDG - camada granular do giro denteado

HD - hipocampo dorsal
HV – hipocampo ventral
i.c.v – intracerebroventricular
i.m. - intramuscular
i.p. – intraperitoneal
i.p.l. – intraplantar
IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBA-1 - proteína de ligação ao cálcio específica da micróglia
IL-10 - interleucina 10
IL-1 β - interleucina 1 beta
IL-6 - interleucina 6
IOD - Densidade Óptica Integrada
MIA - monoiodoacetato de sódio
MOG - peptídeo glicoproteico oligodendrócitos de mielina
NeuN - proteína nuclear neuronal
NF- κ B - nuclear fator κ B
NMDA - receptor de N-metil-DA aspartato
PB – Núcleo Parabraquial
PPARY- receptores ativadores da proliferação de peroxissomos do tipo gama.
pSNI - ligadura parcial do nervo ciático
pSNL - lesão poupada do nervo
sc. – subcutâneo
SCI - Spinal Cord Injury Model
SHAM - grupo controle falsamente operado
SNL - ligadura do nervo espinhal
STZ - estreptozotocina
TCA – teste de campo aberto
TCE - lesão cerebral leve
THC - tetrahydrocannabinol
THCA - ácido tetrahydrocannabinólico
TN - testes de nocicepção
TRVP1- receptor transitório endovanilóide tipo 1
VEI - veículo

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema simplificado da Via ascendente da Dor e da Modulação descendente da Dor. 25

Figura 2. Esquema simplificado da biossíntese do Canabidiol e outros fitocanabinoides derivados da Cannabis Sativa. Abreviaturas: CBGA - ácido canabigerólico; CBDA - ácido canabidiólico; CBCA - ácido canabicromeno; CBG - Cannabigerol; CBD - canabidiol; CBC - canabicromeno; CBL - canabiciolol; CBDV - Cannabidivarina; THCA - ácido tetrahidrocanabinólico; THC - tetrahidrocanabinol; CBN – canabinol. 27

Figura 3. Modelos experimentais de dor neuropática em ratos. A ilustração está baseada em danos mecânicos às estruturas nervosas periféricas sendo: (1) Transecção do nervo ciático (**Wall et al., 1979**). (2) Lesão por constrição crônica (**Bennett e Xie, 1988**). (3) Ligadura parcial do nervo ciático (**Seltzer et al., 1990**). (4) Modelo de lesão do nervo poupada (**Decosterd e Woolf, 2000**). (5) Ligadura dos nervos espinais L5/L6 (**Kim e Chung, 1992**). (6) Constrição da raiz dorsal (**Tabo et al., 1999**). (7) Rizotomia dorsal (**Lombard et al., 1979**). (8) Rizotomia Ventral (**Li et al., 2002**). Adaptado de (**Klusáková e Dubový, 2009**) 30

Figura 4. Testes experimentais de avaliação da nocicepção na dor neuropática em ratos e testes comportamentais de ansiedade, locomoção e comportamento emocional. 34

Figura 5. Esquema simplificado de alvos moleculares de CBD na dor crônica. 48
1- Como ativador de receptores endocanabinóides, o CBD pode modular o receptor GABA; 2 e 3 - Como mostrado, o CBD influencia os receptores de endocanabinóides pré-sinápticos (CB1, CB2) e melhora a atividade pós-sináptica do GABA. Abreviaturas: GABA - Ácido gama-aminobutírico; CBD - Canabidiol; CB1- receptor canabinoide tipo 1; CB2 – receptor canabinoide tipo 2; TRVP1- receptor transitório endovanilóide tipo 1; 5-HT1A – receptor

serotoninérgico do tipo 1A; PPAR γ - receptores ativadores da proliferação de peroxissomos do tipo gama.

Figura 6. Desenho experimental. Os animais foram submetidos mensuração **58**
das linhas de base TN (Acetona, von Frey e Placa quente). Em seguida, os
animais foram submetidos à cirurgia CCI ou SHAM. TN foram realizadas 6, 12
e 18 dias após a cirurgia. O TCA foi realizado no 23º dia 1 hora após o
tratamento. A sessão de teste foi realizada no 24º dia. O tecido foi coletado para
imuno-histoquímica. Abreviaturas: TN - teste de nocicepção, CCI - lesão por
constricção crônica, VEI - veículo, CBD - canabidiol, TCA – teste de campo
aberto, BLA - complexo basolateral da amígdala, CA1 - região 1 do corno de
Amon, ACC - anterior córtex cingulado, AIC - córtex insular agranular; GrDG
- camada granular do giro dentado, CA3 - região 3 do corno de Amon.

Figura 7. O tratamento subcrônico CBD reverteu o limiar de retirada mecânica, **65**
reduz a alodínia térmica e hiperalgesia induzida pelo CCI. Sensibilidade
mecânica avaliada pelo teste de von Frey (A), e sensibilidade térmica avaliada
nos testes de acetona (C) e placa quente (E). Os limiares mecânicos ou térmicos
foram avaliados na linha de base (Basal), após CCI ou SHAM, dias 6, 12 e 18,
e após o tratamento com CBD (nas doses 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg/dia, ip, por três
dias, a partir do 22º dia experimental) ou VEI no dia 24. (B, D e F) representam
as análises complementares sobre o Δ da porcentagem de recuperação nos
testes de von Frey, acetona e placa quente. *P < 0,05 teste de Tukey comparado
ao grupo CCI-VEI; #P < 0,05 O teste de Tukey comparou o CCI-CBD 3 com
outros grupos de CCI-CBD; & P < 0,05 teste de Tukey comparado com sua
respectiva linha de base. Os dados representam médias \pm erros padrão. N = 6
para cada grupo experimental. Δ representa o limiar no 24º - o limiar no
18º/limiar basal. Abreviaturas: TN: testes nociceptivos; TCA: teste de campo
aberto.

Figura 8. Tratamento subcrônico com CBD preveniu o comportamento **67**
ansio gênico induzido pelo CCI, avaliada no TCA. O as medidas analisadas
foram porcentagem (%) de tempo gasto no centro (A), o número total de

cruzamentos (B), tempo (s) de congelamento (C), auto-limpeza, (D), ou comportamento de elevação (E). O TCA foi realizado durante 5 min, 23 dias após lesão de CCI ou SHAM e após dois dias de tratamento com CBD (nas doses 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg/dia, i.p., a partir do 22º dia experimental) ou VEI. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI; #P < 0,05 teste de Tukey em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. & P < 0,05 teste T-Student comparado ao SHAM-VEI. Os dados representam médias ± erros padrão. N = 6-8 para cada experimental

Figura 9. Fotomicrografias representativas mostram áreas analisadas do córtex 70
cingulado anterior (ACC, A e D), córtex insular agranular (AIC, A e D) e complexo basolateral da amígdala (BLA, B e E), e CA1, CA3 e giro dentado do hipocampo dorsal (B e E) e ventral (C e F) corados para o receptor endocanabinóide 1 (CB1, AC, verde) ou receptor endovanilóide 1 (TRPV1, DF, vermelho). Barras de escala = 1mm.

Figura 10. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor 72
endocanabinóide 1 (CB1R, verde) no ACC, AIC e BLA no 24º dia experimental. (B) CB1R é mais expresso após tratamento subcrônico (três dias, começando no 22º dia experimental) com CBD (3 mg/kg, i.p.) em ratos com dor crônica induzida por CCI ou SHAM, quando comparados aos grupos tratados com VEI. *P < 0,05 teste de Tukey em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. N = 6 por grupo. Barras de escala = 200 µm.

Figura 11. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor 73
endocanabinóide 1 (CB1R, verde) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HD no 24º dia experimental. (B) CB1 tem uma expressão aumentada após tratamento subcrônico (três dias, iniciando no 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) em ratos com dor crônica induzida por CCI ou SHAM, quando comparados com grupos tratados com VEI. * P < 0,05 teste de Tukey comparado ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. # P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. N = 6 por grupo. Barras de escala = 200 µm.

Figura 12. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endocanabinóide 1 (CB1R, verde) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HV no 24º dia experimental. (B) CB1 tem uma expressão aumentada após tratamento subcrônico (três dias, iniciando no 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) em ratos com dor crônica induzida por CCI ou SHAM, quando comparados aos grupos tratados com VEI. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. N = 6 por grupo. Barras de escala = 200 µm. 74

Figura 13. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endovanilóide 1 (TRPV1R, vermelho) no ACC, AIC e BLA no 24º dia experimental. (B) O tratamento subcrônico (três dias, a partir do 22º dia experimental) com CBD (3 mg/kg, ip) e a dor crônica induzida por CCI promoveram aumento da expressão do receptor TRPV1, quando comparado ao tratamento com VEI e SHAM. *P < 0,05 teste de Tukey em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. N = 6 por grupo. Barras de escala = 200 µm. 76

Figura 14. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endovanilóide 1 (TRPV1R, vermelho) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HD no 24º dia experimental. (B) O tratamento subcrônico (três dias, a partir do 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) e a dor crônica induzida por CCI promoveram aumento do TRPV1 expressão do receptor, quando comparado ao tratamento com VEI e animais SHAM. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. N = 6 por grupo. Barras de escala = 200 µm. 77

Figura 15. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endovanilóide 1 (TRPV1R, vermelho) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HV no 24º dia experimental. (B) O tratamento subcrônico (três dias, a partir do 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) e a dor crônica induzida por CCI promoveram aumento do receptor TRPV1 expressão, quando comparado ao 78

tratamento com VEI e SHAM. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. N = 6 por grupo. Barras de escala = 200 µm.

Figura 16. Desenho experimental. Os animais foram submetidos a sessões de **89** treinamento de rotarod e mensuração das linhas de base TN (Acetona, von Frey e placa quente). Em seguida, os animais foram submetidos à cirurgia CCI ou SHAM. TN foram realizadas 6, 12 e 18 dias após a cirurgia. No 18º dia, foi realizado o teste do rotarod e a sessão de linha de base do CPP. O TCA foi realizado no 23º dia 4 horas após o tratamento com CBD ou VEI. Os animais foram condicionados no CPP entre os dias 22 e 24, e a sessão de teste foi realizada no dia 25. O tecido foi coletado para imuno-histoquímica e para imunoenaios enzimáticos. Abreviaturas: TN - teste de nocicepção, CPP - lugar de preferência condicionado, CCI - lesão por constrição crônica, VEI - veículo, CBD - canabidiol, TCA - campo aberto, BLA - complexo basolateral da amígdala, CA1 - região 1 do corno de Amon, ACC - anterior córtex cingulado, GrDG - camada granular do giro denteado, AMG - amígdala, HD - hipocampo dorsal.

Figura 17. Avaliação do limiar de retirada mecânica, alodínia térmica e **96** hiperalgesia induzida por CCI. Sensibilidade mecânica avaliada pelo teste de von Frey (A), e sensibilidade térmica avaliada pelos testes de acetona (B) e placa quente. (C) Limiares mecânicos ou térmicos foram avaliados na linha de base, e após a cirurgia CCI ou SHAM (dias 6, 12 e 18). Os dados representam médias ± erros padrão. &P < 0,05 Teste de Tukey contra sua respectiva linha de base. N = 7 para cada grupo experimental.

Figura 18. (A) Latência de tempo que os animais permaneceram na haste nas **97** sessões de treinamento em três diferentes velocidades de rotação (4, 10 e 40 rpm). (B) Tempo de permanência do teste na faixa de velocidades de rotação da haste com aceleração suave de 0 a 40-rpm em no dia do teste composto por 2 sessões de 2 minutos e 30 segundos com intervalo de 3 minutos entre cada sessão. Os dados representam médias ± erros padrão. N = 14 para cada grupo

experimental.

Figura 19. O tratamento subcrônico com CBD reverteu o local preferido dos animais com dor crônica induzida por CCI avaliada no teste de aversão à dor. (A) Δ de preferência do teste CPP. (B) latência à primeira entrada no compartimento condicionado com seu respectivo tratamento. ****P < 0,0001 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI; *P = 0,0328 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI; #P < 0,001 Teste de Tukey comparou CCI - VEI com SHAM - VEI. Os dados representam a média \pm erros padrão. N = 7/grupo. Abreviatura: Δ representa o limiar no teste – a linha de base, CPP – preferência condicionada aversão à dor, CCI – lesão por constrição crônica, VEI – Veículo, CBD – canabidiol. **98**

Figura 20. O CBD induziu efeitos ansiolíticos em ratos CCI no TCA. (A) % de tempo gasto no centro, (B) número total de cruzamentos, (C) Frequência de elevações, (D) Tempo de elevação, (E) Frequência de auto-limpeza, (F) Tempo de auto-limpeza, (G) Frequência de congelamento, (H) Tempo de congelamento. O TCA foi realizado por 5 minutos, 23 dias após a cirurgia CCI ou SHAM, 4 h após o segundo tratamento com VEI ou CBD (0,3, 3, 10 mg/kg/dia, ip.). Os dados representam a média \pm erros padrão. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. # P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 7/grupo. **101**

Figura 21. Efeitos do CBD na hiperatividade neuronal crônica. (A) Imunocoloração para neurônios FosB+, representados por pontos escuros, no ACC, BLA, GrDG e CA1 do HD, onde foi observado aumento de células FosB+ nos animais CCI. (B, C, D, E) O tratamento subcrônico (três dias a partir do 22º dia experimental) com CBD 3 mg/kg reduziu o número de neurônios FosB+ observados em animais CCI quando comparados ao tratamento CCI-VEI e grupos SHAM. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou CCI-CBD. N = 6/grupo Barras de escala = 200 μ m. **103**

Figura 22. Imunofluorescência para neurônios NeuN+. (A) Imagens representativas de neurônios NeuN + (vermelho) e a coloração nuclear DAPI (azul) no ACC, BLA, GrDG e CA1 do HD. (B) O tratamento subcrônico (3 dias a partir do 21º dia experimental) com canabidiol (CBD, 3 mg/kg) aumentou a densidade neuronal em animais CCI em comparação ao tratamento com VEI e SHAM. (C e E) O modelo CCI reduziu a densidade neuronal (neurônios NeuN+) e o tratamento com CBD recuperou essa alteração quando comparado ao SHAM-VEI. (D) O modelo CCI e o tratamento com CBD não produziram diferenças significativas. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. As setas brancas indicam exemplos de neurônios que foram considerados para análise. N = 6/grupo. Barras de escala de ACC e BLA = 50 µm; GrDG = 200 µm e CA1 = 100 µm. **16**

Figura 23. Imunofluorescência para GFAP. (A) Imagens representativas da expressão de GFAP (vermelho) no ACC, BLA, CA1 e GrDG do HD, demonstram aumento da expressão de GFAP nos animais CCI (B, C D e E) O tratamento subcrônico (3 dias a partir do 22º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) reduziu a expressão de GFAP em animais CCI em comparação ao tratamento com VEI e grupos SHAM. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 4-6/grupo. Barras de escala do ACC= 100 µm; BLA, GrDG e CA1= 50 µm. **108**

Figura 24. Coloração de imunofluorescência para expressão de IBA-1. (A) Imagens representativas da expressão de IBA-1 (vermelho) no ACC, BLA e CA1 e GrDG do HD, demonstram aumento da expressão de IBA-1 em animais CCI. (B, C e E) O tratamento subcrônico (três dias a partir do 21º dia experimental) com canabidiol (CBD, 3 mg/kg) reduziu a expressão de IBA-1 que foi observada em animais CCI em comparação ao tratamento com CBD. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 4-6/grupo. Barras de escala do ACC= 100 µm; BLA, GrDG e CA1= 50 µm. **110**

Figura 25. Avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 no HD e AMG. (A, E) **113**
Esquemas representativos das estruturas centrais analisadas. (B, C) Avaliação das citocinas IL-1 β e IL-6 no AMG; o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (D) Avaliação da citocina IL-10 no AMG; O tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (F, G) Avaliação das citocinas IL-1 β e IL-6 no HD; O tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (H) medição de IL-10 no HD; O tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em relação ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 5-6/grupo.

Figura 26. Avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. (A, B) Dados da análise **116**
de IL-1 β da AMG, respectivamente direita e esquerda, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (C, D) Dados da análise de IL-6 da AMG, respectivamente direita e esquerda, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas comparado ao controle CCI-VEI em AMG direita. (E, F) Dados da análise IL-10 da AMG, respectivamente direita e esquerda, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (G, H) Dados da análise de IL-1 β do HD, respectivamente direito e esquerdo, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI no HD. (I, J) Dados da análise de IL-6 do HD, respectivamente direito e esquerdo, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI no HD direito. (K, L) Dados da análise IL-10 do HD, respectivamente direito e esquerdo, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI no HD esquerdo. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em relação ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 5 - 6 por grupo.

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Dados originais dos testes nociceptivos (von Frey, Acetona e Placa quente) submetidos a ANOVA de duas vias (tratamento e condição), e dados $\Delta\%$ de recuperação submetidos a ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. **63**
- Tabela 2.** Dados originais do TCA submetidos à ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. **66**
- Tabela 3.** Dados originais de Imunofluorescência para receptores CB1 e TRPV1 submetidos a ANOVA duas vias, seguido do teste de Tukey, para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs. condição), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. **69**
- Tabela 4.** Resultados obtidos a partir dos dados originais dos testes nociceptivos (von Frey, Acetona e Placa quente) submetidos à ANOVA de duas vias (tempo e condição). Seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. **95**
- Tabela 5.** Resultados obtidos a partir dos dados originais do TCA submetidos à ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs. fator de condição). Seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. **99**
- Tabela 6.** Resultados obtidos a partir dos dados originais de imunohistoquímica **104**

para neurônios FosB+ e Imunofluorescência para neurônios NeuN+, GFAP e IBA-1. Os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento e condição cirurgica). O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises.

Tabela 7. Resultados obtidos a partir dos dados originais do imunoensaio enzimático específico para-IL-1 β , IL-6 e IL-10. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs condição). O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. **111**

Tabela 8. Resultados obtidos a partir dos dados originais dos imunoensaios enzimáticos específicos para-IL-1 β , IL-6 e IL-10 submetidos à ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs condição). Seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. **114**

Tabela 9. Médias dos resultados obtidos a partir dos dados originais do imunoensaio enzimático específico para IL-1 β , IL-6 e IL-10. Os dados foram representados pela média dos grupos experimentais. **115**

Tabela S1. Canabidiol e seus efeitos em modelos animais de dor crônica. **130**

Tabela S2. Translacional clínico: CBD e seus efeitos em pacientes com dor crônica **133**

Sumário

Introdução	24
Objetivos	37
Capítulo I - Revisão da literatura: Dor crônica e Canabidiol em modelos animais: farmacologia comportamental e perspectivas futuras	39
1. Contextualização	40
2. Métodos	41
2.1 Estratégia de pesquisa e critérios de elegibilidade	41
2.2 Os critérios de exclusão específicos incluíram o seguinte	41
2.3 Os critérios de inclusão específicos incluíram o seguinte	41
3. Resultados	42
3.1 Efeitos do CBD na dor crônica em modelos animais: lesões periféricas e centrais	42
3.2 Efeitos do CBD na dor crônica e modelos de neuropatia periférica induzida por quimioterapia	43
3.3 Efeitos do CBD na dor crônica e modelos de neuropatia periférica induzida por diabetes tipo I	44
3.4 Efeitos do CBD na dor crônica e modelos de osteoartrite e neuropatia periférica induzida por artrite	44
3.5. Efeitos do CBD na dor crônica e esclerose múltipla	45
3.6. Efeitos do CBD na dor inflamatória persistente	46
4. Mecanismos moleculares de ação e alvos bioquímicos do CBD na dor crônica	47
5. Limitações de modelos animais de dor crônica	50
6.. Translacional clínico: CBD e seus efeitos em pacientes com dor crônica	51
7. Conclusão e perspectivas futuras	52
Capítulo II - O Canabidiol reverte efetivamente a alodínia mecânica e térmica, hiperalgesia e comportamentos ansiosos em um modelo de dor neuropática: possível papel dos receptores CB1 e TRPV1	54
1. Contextualização	55
2. Materiais e Métodos	57
2.1. Animais	57

2.2. Lesão por constrição crônica do nervo ciático (CCI)	57
2.3. Tratamento com CBD	58
2.4 Avaliação da sensibilidade mecânica	59
2.5 Sensibilidade térmica ao frio	59
2.6. Sensibilidade térmica ao calor	60
2.7. Avaliação da atividade locomotora e comportamento ansioso	60
2.8. Imunofluorescência para CB1R e TRPV1R	61
2.9. Análise de imagem	61
2.10. Análise estatística	61
3. Resultados	63
3.1. Efeitos antialodínicos e anti-hiperalgésicos do tratamento subcrônico com CBD	63
3.2. O tratamento subcrônico com CBD promove efeitos ansiolíticos em um modelo de dor CCI	66
3.3. O tratamento com CBD aumenta os receptores CB1 e TRPV1 em regiões envolvidas na modulação da dor crônica	68
3.4. Imunorreatividade do receptor CB1	70
3.5. Expressão do receptor TRPV1	75
4. Discussão	79
Capítulo III - Canabidiol na dor neuropática: modulação do comportamento de aversão à dor, atenuação de marcadores de neuroinflamação e atividade neuronal crônica no circuito corticolímbico	104
1.Contextualização	86
2. Material e métodos	88
2.1. Animais	88
2.2. Lesão por constrição crônica (CCI) do nervo ciático	88
2.3. Tratamento com CBD	89
2.4. Avaliação da atividade locomotora e equilíbrio motor	90
2.5. Avaliação de sensibilidade mecânica	90
2.6 Avaliação da sensibilidade térmica ao frio	90
2.7. Avaliação da sensibilidade térmica ao calor	90
2.8. Avaliação da atividade locomotora e comportamentos ansiogênicos	90
2.9. Teste de Aversão à Dor	91

2.10 Avaliação dos níveis de citocinas em AMG e HD	92
2.11. Processamento histológico	92
2.12. Imunofluorescência para NeuN, GFAP e IBA-1	93
2.13. Imuno-histoquímica para neurônios FosB+	93
2.14. Análise de imagem	94
2.15. Análise estatística	94
3. Resultados	95
3.1. Avaliação da nocicepção no modelo de constrição do nervo ciático	95
3.2. Avaliação da atividade locomotora e equilíbrio motor em animais com dor crônica no teste de desempenho do rotarod.	96
3.3. Efeitos do canabidiol no teste de aversão à dor: um potencial modulador do comportamento afetivo-motivacional da dor neuropática	97
3.4. Avaliação da atividade motora e comportamentos semelhantes à ansiedade	99
3.5. Imuno-histoquímica para neurônios FosB+	102
3.6. Avaliação da densidade neuronal (neurônios NeuN+)	105
3.7. Avaliação de imunorreatividade de GFAP	107
3.8 Avaliação de imunorreatividade do IBA-1	109
3.9 Avaliação das citocinas IL-1 β , IL-10 e IL-6	111
4. Discussão	117
Considerações Finais	126
Apêndices	128
Apendice A - Tabela S1. Canabidiol e seus efeitos em modelos animais de dor crônica.	129
Apendice B - Tabela S2. Translacional clínico: CBD e seus efeitos em pacientes com dor crônica	132
Apendice C – Certificado CEUA – USP/RP	133
Apendice D - Circuito amígdala-parabraquial e a regulação da dor: controle da transmissão sináptica e excitabilidade neuronal no núcleo parabraquial	134
Referências Bibliográficas	154

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton

Introdução

1. Via ascendente da dor e a modulação descendente da dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos" (Scholz et al., 2019). Esta classificação afirma que a dor é subjetiva e ao mesmo tempo, é desagradável e, portanto, também uma experiência emocional.

Com relação aos mecanismos fisiológicos de percepção da dor, esta sensibilidade somatovisceral é percebida na periferia por meio de receptores especializados (os nociceptores), os quais por meio de vias ascendentes transmitem os sinais nociceptivos até áreas do sistema nervoso central, responsáveis pelo processamento e modulação deste estímulo. De forma resumida, os estímulos nociceptivos são transduzidos pelos nociceptores (receptores de alto limiar, para estímulos mecânicos, térmicos ou polimodais – englobam estímulos mecânicos, térmicos e químicos), e conduzidos por fibras de pequeno calibre mielinizadas (A delta) ou desmielinizadas (fibras C). As fibras A-delta conduzem sensações dolorosas agudas imediatas e bem localizadas, enquanto as fibras C, de condução mais lenta, estão associadas com a dor mais tardia e difusa (Brandão, 2001). As vias ascendentes nociceptivas são constituídas por numerosos tratos (espinotalâmico, espinorreticular, espinomesencefálico, via pós-sináptica da coluna dorsal, espinocervical, sistema trigeminal e sistema proprioespinal). O trato espinotalâmico é considerado como a principal via ascendente (Millan, 1999), o qual se localiza anterolateralmente na substância branca da medula espinal e projeta as suas fibras para o tálamo, formação reticular, núcleo magno do rafe e substância cinzenta periaquedutal. O trato espinotalâmico, pode dividir-se em (i) trato ascendente lateral (neoespinotalâmico), sendo este responsável pelos aspetos discriminativos da dor e (ii) trato ascendente medial (paleoespinotalâmico), associado aos aspectos autonômicos e emocionais desagradáveis da dor. Algumas fibras espinotalâmicas projetam-se na substância cinzenta periaquedutal constituindo importante ligação entre as vias ascendentes e descendentes (Millan et al., 1999).

A sensibilidade dolorosa possui como característica única, vias descendentes associadas à modulação dos estímulos nociceptivos. O primeiro mecanismo de

modulação da dor ocorre ao longo da entrada das fibras nociceptivas no corno posterior da medula espinal (inibição segmentar), mecanismo este que conta com a participação de fibras mielinizadas grossas responsáveis pela percepção de estímulos mecânicos não nociceptivos (Brandão, 2001). Particularmente, os neurônios de segunda ordem localizados na medula espinal, recebem sinapses de interneurônios adjacentes ativados por fibras grossas que conduzem sensações não dolorosas. Estes influxos quando prevalecem sobre o influxo nociceptivo inibem a transmissão sináptica constituindo uma forma de controle da dor. Este mecanismo é conhecido como “teoria da comporta espinal”, tendo sido descrito no início da década de 70 (Millan et al., 1999).

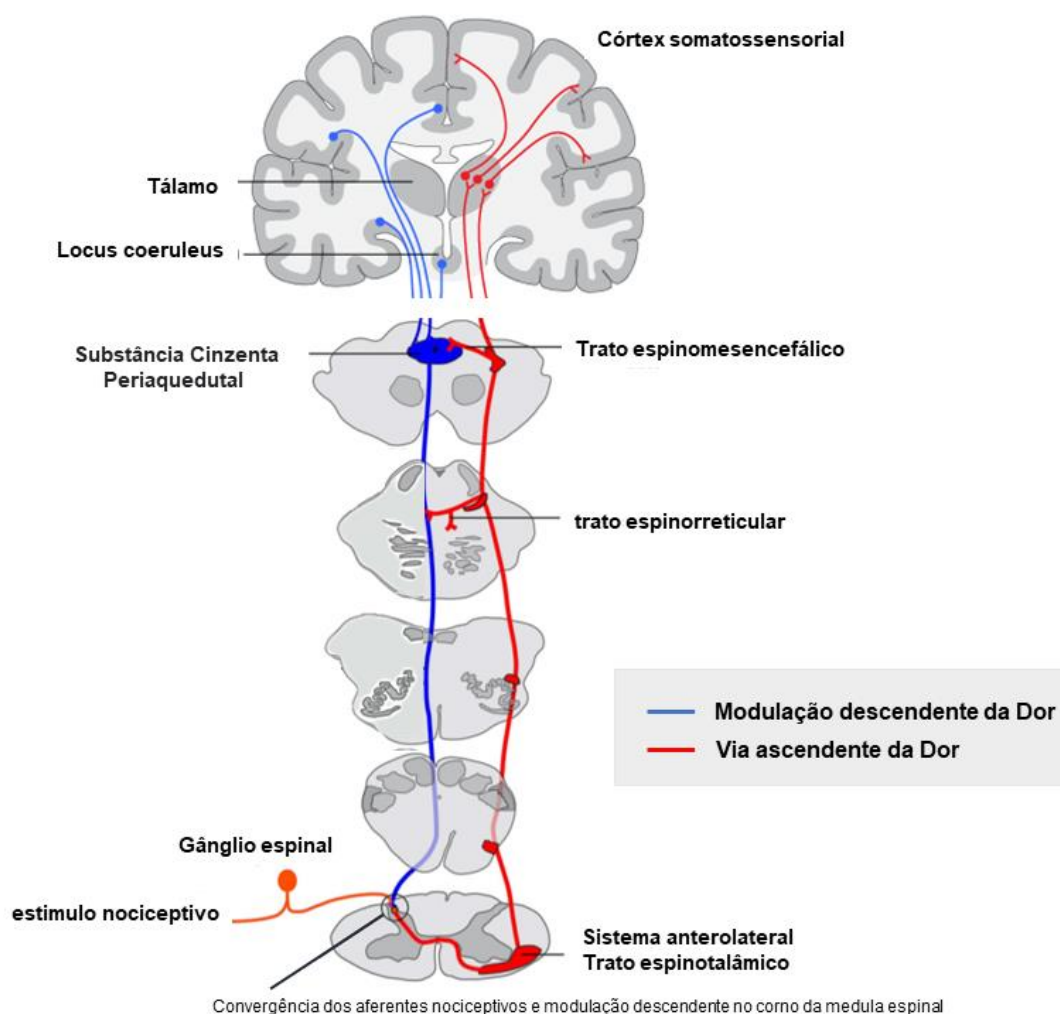


Figura 1. Esquema simplificado da Via ascendente da Dor e da Modulação descendente da Dor.
Fonte: Autoria própria.

Com relação às vias de modulação descendente, estas têm origem em núcleos encefálicos (substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe e formação

reticular adjacente), as quais se projetam para o bulbo e para a medula espinal, podendo ser ativados em diversas circunstâncias tais como o estresse, as doenças crônicas sistêmicas, o comportamento cognitivo ou mesmo pela própria dor (**Brandão, 2001**). Estruturas como a amígdala ou o córtex límbico, também participam na modulação descendente inibitória (**Millan, 2002**). Os mecanismos envolvidos na modulação nociceptiva são complexos, incluindo diferentes estruturas ao longo do eixo encefálico e com participação de diversos sistemas de neurotransmissores, entre eles, opioidérgico, serotoninérgico, gabaérgico, adrenérgico e colinérgico (**Millan, 2002**).

A sensibilidade dolorosa é classificada em duas grandes categorias: dor fisiológica e patológica. A dor fisiológica (ou aguda) é um sinal de alerta precoce essencial que, geralmente, inicia um reflexo de retirada e, desse modo, aumenta as chances de sobrevivência, protegendo o organismo de maiores lesões. Em contraste, a dor patológica (persistente ou crônica, por exemplo, a dor neuropática) é resultado do processamento inadequado do sistema nervoso (**Woolf et al., 2004**).

Considerando em particular a dor neuropática, esta se desenvolve como consequência de uma lesão ou doença que acomete as vias somatossensíveis no sistema nervoso periférico ou central, e pode acompanhar muitas doenças sistêmicas (por exemplo, neuropatia diabética periférica, radiculopatia, lesão medular, acidente vascular cerebral e esclerose múltipla) (**Max, 2002**). Na população global a incidência da dor neuropática é de 6% a 8% e seu impacto na qualidade de vida, humor e sono excede o fardo de sua patologia causal (**Magrinelli et al., 2013**). Uma característica peculiar da dor neuropática é a coexistência de sintomas e sinais negativos e positivos, refletindo perda e ganho de função do sistema somatossensorial, respectivamente. Os sintomas principais da dor neuropática incluem característica lancinante, em tiro ou queimação espontânea, hiperalgesia e/ou alodínia (**Baron, 2006; Baron et al., 2010**).

A dor neuropática tem sido considerada um problema clínico de difícil manejo devido à falta de padrão ouro de diagnóstico e da resposta insatisfatória ao tratamento (**Magrinelli et al., 2013**). Além disso a dor crônica é frequentemente associada ao domínio somatossensorial, mas essa conceituação é problemática porque, diferentemente da maioria das outras sensações que geralmente são afetivamente neutras, a dor tem seus componentes aversivos. Sob esse estado aversivo, a resposta comportamental à dor geralmente envolve uma motivação para buscar alívio da dor e o retorno ao equilíbrio homeostático é uma recompensa (**Holroyd et al., 1996; Navratilova et al., 2013**). E infelizmente estudos com avaliação de dor espontânea

ainda são escassos (ver detalhes no Capítulo 1), entretanto o CBD se propõem ser uma boa opção como modulador emocional (**Genaro et al., 2017**), e este é um desafio que propomos no Capítulo III desta tese.

Com ênfase entre os sistemas neuroquímicos de modulação da dor, o sistema endocanabinóide é um importante sistema endógeno que participa desta circuitaria, funcionando em conjunto ao sistema opioide, e desempenhando papéis cruciais no desenvolvimento e resolução dos estados da dor, considerando, principalmente, os aspectos afetivos e cognitivos. A respeito de sua distribuição, os endocanabinóides são encontrados em todo o sistema nervoso central e periférico e modulam diversos processos comportamentais incluindo cognição, emoção, processamento sensorial e nocicepção (**Matsuda et al., 1992**).

2. Canabidiol e Dor

Historicamente, o sistema endocanabinóide foi investigado a partir da análise dos efeitos da *Canabis sativa* em alvos específicos no sistema nervoso. Diversas tentativas foram realizadas a fim de se conseguir o isolamento e a elucidação das estruturas químicas dos compostos responsáveis pelos efeitos farmacológicos e fisiológicos da *Cannabis sativa*, mas devido à natureza química dos endocanabinóides, isso só foi possível com o desenvolvimento tecnológico alcançado a partir da década de 40. Após o isolamento dos compostos, suas estruturas químicas foram elucidadas nas décadas seguintes, e atualmente, sabe-se que a *Cannabis* contém mais de 400 substâncias, dentre as quais podemos destacar os fitocanabinóides, como o Canabidiol (CBD) e o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (**Turner et al., 1980, 2017**). O THC é o principal composto responsável pelos efeitos psicoativos da *Cannabis*, tendo sido devidamente isolado por **Gaoni e Mechoulam (1964)** e sua estrutura química elucidada em 1967 (**Mechoulam e Hanus, 2000**). Por sua vez, o CBD foi isolado na década de 1940 por dois grupos independentes (**Adams et al., 1940**), e sua estrutura química elucidada anos mais tarde, na década de 60 (**Mechoulam e Shvo, 1963**). Ainda, as proporções destas duas moléculas na *Cannabis* e de seus óleos e extratos essenciais podem alterar os seus efeitos, por esse motivo, diferentes fontes e preparações da planta podem apresentar efeitos fisiológicos, farmacológicos, e psicológicos variáveis (**Cook et al., 2015**). É importante destacar que o CBD é um constituinte fitocanabinóide de *Cannabis sativa* que não possui os efeitos psicoativos do THC, e apresenta propriedades

terapêuticas amplas em distúrbios neuropsiquiátricos, com diversas ações do sistema nervoso central e periférico (Blessing et al., 2015).

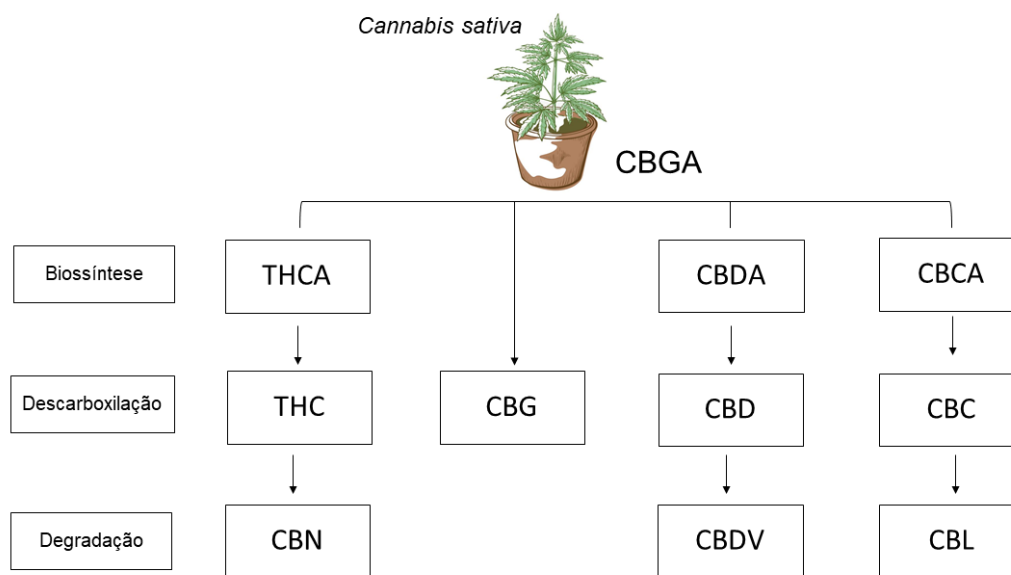


Figura 2. Esquema simplificado da biossíntese do Canabidiol e outros fitocanabinoides derivados da *Cannabis Sativa*. Abreviaturas: CBGA - ácido canabigerólico; CBDA - ácido canabidiólico; CBCA - ácido canabicromeno; CBG - Cannabigerol; CBD - canabidiol; CBC - canabicromeno; CBL - canabiciclol; CBDV - Cannabidivarina; THCA - ácido tetrahydrocanabinólico; THC - tetrahydrocanabinol; CBN – canabinol. Fonte: Autoria própria.

Nesse sentido, o CBD tem recebido grande destaque devido às suas propriedades antipsicóticas (Zuardi et al., 1991), hipnóticas e anticonvulsivas (Carlini e Cunha, 1981; Monti, 1977; Pickens, 1981), antioxidantes e antiinflamatórias (Campos et al., 2016; Costa et al., 2007) e, principalmente, por apresentar baixa toxicidade e alta tolerabilidade na ausência de efeitos psicoativos (Bergamaschi et al., 2011; Carlini e Cunha, 1981). Dentro desta perspectiva, o CBD é considerado uma estratégia promissora para o tratamento de doenças inflamatórias persistentes (Carrier et al., 2006) e da dor neuropática (De Gregorio et al., 2019; Silva-Cardoso et al., 2021). Além disso, os efeitos ansiolíticos do CBD já foram demonstrados tanto em animais de laboratório, (Campos et al., 2013; Guimarães et al., 1990; Moreira et al., 2006), quanto em humanos com transtorno de ansiedade social (Bergamaschi et al., 2011; Crippa et al., 2011).

É importante destacar que os receptores endocanabinóides (CB1 e CB2), bem como os endovanilóides são expressos em várias regiões encefálicas intimamente relacionadas com a modulação do comportamento emocional e da sensibilidade

dolorosa (**Cristino et al., 2006; Mezey et al., 2000**). Em particular, um estudo de Cristino e cols. (2006) realizado em camundongos evidenciou a co-expressão dos receptores CB1 e TRPV1 nas regiões do hipocampo, nos gânglios da base, no tálamo, no hipotálamo, na substância cinzenta periaquedutal e no cerebelo. Os autores sugerem que estas colocalizações podem resultar em relação funcional entre estes dois sistemas de receptores. Ainda, estudos de Mezey e cols. (2000) verificou a imunorreatividade em ratos para receptores TRPV1 em diferentes estruturas que compõem o neuroeixo, com destaque para todas as áreas corticais (nas camadas 3 e 5), em estruturas do sistema límbico (hipocampo, amígdala e habenula), no estriado, hipotálamo, tálamo, na substância negra, no locus coeruleus e cerebelo. Estes autores sugerem que estes receptores podem estar envolvidos em diferentes sistemas de modulação, particularmente envolvidos na modulação da emoção e da dor. Além disso, estudos demonstraram que lesões neuropáticas específicas e doenças inflamatórias induzem aumento na expressão de receptores TRPV1 na medula espinal, fato que colabora para a sensibilização dos neurônios aferentes primários, contribuindo com o desenvolvimento de hiperalgesia e alodínia (**Hudson et al., 2001**). É importante destacar que a modulação dos receptores TRPV1 realizada por endocanabinóides pode ser explicitamente importante uma vez que esses receptores não só influenciam a sensação de dor, mas também podem modular a resposta inflamatória (**Lowin e Straub, 2015; Straub, 2014**), bem como os efeitos da sinalização de receptores CB1 na periferia e no sistema nervoso central (**Carrier et al., 2006**).

Sabemos também da importância do papel da micróglia nas mudanças na remodelação sináptica, conectividade, e da função de rede subjacente à dor crônica que está associada a regiões cerebrais importantes para os aspectos emocionais da dor crônica (**Inoue e Tsuda, 2018; Ji et al., 2018, 2013**). Ademais são considerados uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas na facilitação da dor (**Guo et al., 2018, 2017**). A reatividade microglial é essencial para o início da hipersensibilidade induzida por lesão de nervo periférico (**Raghavendra et al., 2003; Romero-Sandoval et al., 2008**), mas também está envolvida na manutenção a longo prazo da dor neuropática (**Tawfik et al., 2007**). A micróglia pode ser ativada por receptores AMPA/cainato, com a consequente produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (**Noda et al., 2000**), enquanto os astrócitos parecem ser os grandes responsáveis pela manutenção ou cronicidade da hipersensibilidade após lesão do nervo periférico (**Ledeboer et al., 2005; Raghavendra et al., 2003**).

3. Modelo de constrição crônica do nervo ciático e dor crônica

Dentre os modelos de dor neuropática, os modelos cirúrgicos são de fundamental importância na indução de estados dolorosos. Nesse contexto, existem vários modelos, dentre eles: dor crônica induzida por constrição crônica do nervo ciático (CCI), ligadura parcial do nervo ciático (pSNI), ligadura do nervo espinhal (SNL) e lesão poupada do nervo (pSNL). A maioria desses modelos induz respostas semelhantes às encontradas na causalgia; uma doença neurológica crônica, normalmente associada ao trauma, onde sua sintomatologia é caracterizada por dor espontânea em queimação, hiperalgesia, edema, alteração da função motora e anormalidades autonômicas; frequentemente observada na extremidade distal após lesão parcial do nervo periférico em humanos (Challa, 2015).

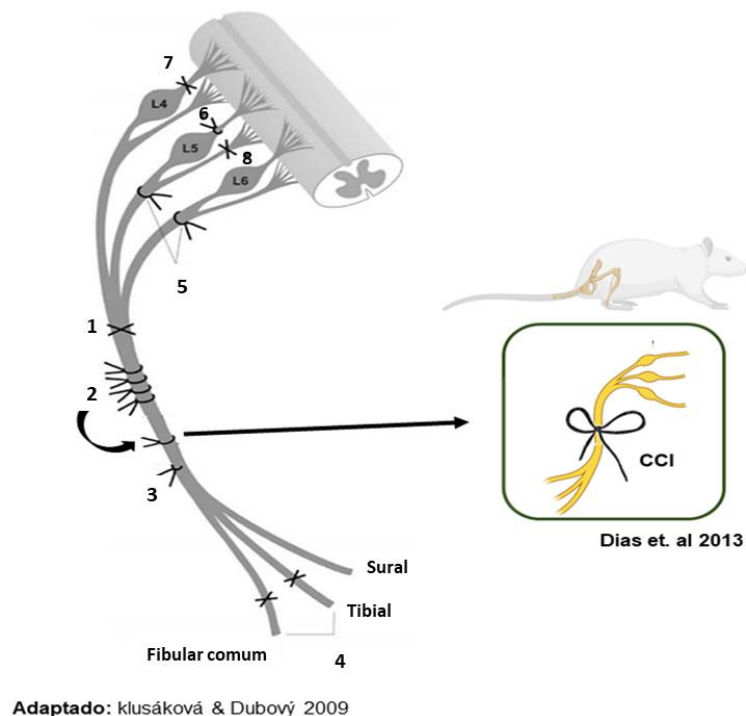


Figura 3. Modelos experimentais de dor neuropática em ratos. A ilustração está baseada em danos mecânicos às estruturas nervosas periféricas sendo: (1) Transecção do nervo ciático (Wall et al., 1979). (2) Lesão por constrição crônica (Bennett e Xie, 1988). (3) Ligadura parcial do nervo ciático (Seltzer et al., 1990). (4) Modelo de lesão do nervo poupada (Decosterd e Woolf, 2000). (5) Ligadura dos nervos espinais L5/L6 (Kim e Chung, 1992). (6) Constrição da raiz dorsal (Tabo et al., 1999). (7) Rizotomia dorsal (Lombard et al., 1979). (8) Rizotomia Ventral (Li et al., 2002). Adaptado de (Klusáková e Dubový, 2009).

O modelo de CCI é um modelo utilizado, principalmente para estudos comportamentais, pois resulta em edema intramural, que estrangula o nervo, axotomizando efetivamente muitos axônios, mas não todos os axônios, além de simular neuropatia periférica pós-traumática em humanos (**Austin et al., 2012; Boogaard et al., 2015**). A denervação parcial preserva algumas respostas comportamentais a estímulos periféricos e mostra sinais comportamentais de dor espontânea. Este modelo produz redução de quase todas as fibras A β e da maioria das fibras A δ , que são axiotomizadas, enquanto grande número de fibras C permanecem intactas (**Lewinter et al., 2004**). Por envolver os componentes inflamatórios e o componente neuropático, este é um dos poucos modelos que se torna adequado para avaliação da alodínia ao frio (teste de acetona) quando comparado à pSNI e a pSNL (**Austin et al., 2012; Challa, 2015**). Um dos deméritos característicos do modelo de CCI a ser considerado é a autotomia que leva a danos nos dedos posteriores e torna o animal impróprio para estudo. Neste estudo optamos por utilizar o modelo de CCI modificado (Fig. 3) para uma amarradura para minimizar danos como a autotomia (**Dias et al., 2013**).

Ressaltamos que no modelo CCI ocorre hiperalgesia, embora não seja um aspecto convencional no espectro da dor neuropática, é um fator importante a ser avaliado laboratorialmente. Em nosso estudo, utilizamos o teste da placa quente, que utiliza como estímulo uma temperatura fixa, capaz de ativar receptores térmicos nociceptivos. Em particular, usamos este teste para avaliar o envolvimento dos receptores TRPV1 e sua participação em nosso estudo. Considerando que este modelo utiliza a temperatura como estímulo nociceptivo, os nociceptores (principalmente fibras C e A-delta) foram estimulados com a ativação dos receptores endovanilóides, especificamente os receptores TRPV1 que possuem ativação a 43°C (**Lewinter et al. 2004**). Cabe destacar que esta última é importante na avaliação da resposta a estímulos térmicos (teste da placa quente), uma vez que são responsáveis pela resposta ao aumento da temperatura (**Julius e Basbaum, 2001**).

4. Testes de nocicepção térmicos e mecânicos

O termo nocicepção é utilizado para descrever a resposta neuronal periférica a estímulos nocivos, que engloba quaisquer estímulos, sejam mecânicos, térmicos, elétricos ou químicos, que tenham potencial para causar danos aos tecidos (**Dubin e Patapoutian, 2010; Dubner, 1983**). Normalmente, os estímulos nocivos ativam os nociceptores, um subconjunto de neurônios sensoriais periféricos, que possuem uma

variedade de canais iônicos especializados e receptores que transformam estímulos nocivos em sinais elétricos (Deuis et al., 2017). Os sinais nociceptivos são então enviados para a medula espinhal e para o encéfalo para serem processados como a sensação de dor (Millan, 1999). Assim, a dor é uma experiência que engloba componentes sensoriais e emocionais; portanto, o termo dor não é intercambiável com nocicepção (Deuis et al., 2017). Assim, como a dor não pode ser medida diretamente em roedores, foi necessário desenvolver métodos indiretos para quantificar e avaliar comportamentos semelhantes à dor em animais não anestesiados que sejam confiáveis, reprodutíveis, sensíveis e específicos (Mogil, 2009).

Os testes manuais de von Frey permitem a quantificação de limiares mecânicos em animais sem contenção, o que elimina o risco de estresse induzido pelo manuseio. No entanto, isso também exige que os animais sejam aclimatados às gaiolas, para garantir que os comportamentos de deambulação e exploração, que podem ser mal interpretados como uma resposta positiva, sejam reduzidos ao mínimo (Deuis et al., 2017). Em geral ratos tendem a se habituar rapidamente (<10 min) (Chaplan et al., 1994). O sistema eletrônico do von Frey (Fig. 4) opera sob princípios semelhantes como von Frey manual, exceto que um único filamento não dobrado é aplicado com força crescente até que a retirada da pata resposta é observada (Minett et al., 2014). A força com que essa resposta ocorre é registrado automaticamente pelo aparelho e é designado como o limiar de retirada da pata. A principal vantagem de von Frey eletrônico comparado ao von Frey manual é a força crescente é aplicada por um único filamento (Deuis et al., 2017). Isso, portanto, fornece uma medida do limiar de retirada da pata em uma escala contínua, pois a força é aplicada continuamente e não em etapas. Apesar dessas vantagens da automação, os experimentadores ainda precisam ser treinados para distinguir respostas verdadeiras de respostas “tocando” e deambulação. Sob a orientação do pesquisador, o aparelho aplica um filamento de von Frey (0,5 mm) na superfície plantar, aumentando a força de forma incremental até atingir o limiar de retirada da pata. O dispositivo registra automaticamente a força na qual ocorre a retirada da pata (Deuis et al., 2017). No entanto, independentemente do método utilizado, o desfecho é a retirada da pata a um estímulo que normalmente não é aversivo e, portanto, ambos os métodos podem medir a alodínia mecânica.

O teste da placa quente, descrito pela primeira vez em 1944, pode ser usado para determinar os limiares de temperatura em camundongos e ratos (Deuis et al., 2017; Woolfe e MacDonald, 1944). Diferentemente do teste de retirada de cauda, o teste da

placa quente e outros testes que aplicam estímulos térmicos nas patas traseiras são considerados como integrando as vias supraespinhais, pois ratos com transecção espinhal não retiram os membros posteriores no teste da placa quente (**Giglio et al., 2006**). No teste convencional da placa quente (Fig. 4), o rato é colocado em uma superfície metálica mantida a uma temperatura constante, geralmente entre 50°C e 51°C, e a latência de resposta, que é o tempo necessário para observar um comportamento nocifensivo, é registrada pelo investigador. Comportamentos nocifensivos incluem retirada ou lambida da pata dianteira, retirada ou lambida da pata traseira, pisar no chão, postura inclinada e pular (**Deuis et al., 2017; Espejo e Mir, 1993**). Enquanto a retirada da pata dianteira geralmente ocorre primeiro, a retirada ou lambida da pata traseira é considerada um indicador mais confiável de nocicepção, pois as patas dianteiras são frequentemente usadas na limpeza e higiene (**Minett et al., 2014; Woolfe e Macdonald, 1944**). Se não forem observados comportamentos nocifensivos, o animal deve ser retirado da placa quente após um tempo de corte pré-determinado para evitar danos nos tecidos, embora a temperatura e o tempo de corte do teste não sejam capazes de promover dano tecidual ou comportamento nocifensivo nos animais.

Um fator adicional importante no teste da placa quente é a tendência para respostas comportamentais aprendidas, que levam a tempos de reação diminuídos durante exposições subsequentes à placa quente (**Deuis et al., 2017; Gamble e Milne, 1989; Plone et al., 1996**). Assim, o teste de placa quente pode produzir dados muito variáveis, mesmo dentro de laboratórios. Uma desvantagem adicional do teste da placa quente é que todas as quatro patas e a cauda são expostas ao estímulo de calor. Embora isso geralmente não seja um problema ao testar os efeitos antinociceptivos de compostos administrados sistematicamente (**Menéndez et al., 2002**).

O teste de evaporação de acetona (Fig. 4), descrito pela primeira vez em 1994, é uma técnica usada para medir comportamentos aversivos desencadeados pelo resfriamento evaporativo e é tipicamente considerado como uma medida de alodínia ao frio (**Choi et al., 1994; Vissers e Meert, 2005**). O teste é realizado em piso de tela e acetona é instilada na superfície plantar da pata traseira, provocando resfriamento da pele a temperaturas inócuas de aproximadamente 10°C (**Colburn et al., 2007; Leith et al., 2010**), embora a temperatura real varie com a temperatura ambiente e a temperatura da pele. A exposição da pata traseira à acetona não evocar a retirada da pata em animais levemente anestesiados (ao contrário o teste de retirada de pata) (**Leith et al., 2010**). A sensibilidade ao frio é registrada pela quantificação do número ou duração de respostas

nocifensivas, ou pontuação da gravidade da resposta, por exemplo, 0, sem resposta; 1, retirada rápida ou movimento da pata; 2, sacudidas repetidas da pata; 3, repetido sacudir a pata traseira e lamber a pata (Deuis et al., 2017; Xing et al., 2007). O teste de evaporação de acetona foi validado em vários modelos de dor inflamatória e neuropática em camundongos e ratos (Choi et al., 1994; Colburn et al., 2007; Yamamoto et al., 2016). A vantagem adicional do teste de acetona é a aplicação do estímulo térmico, permitindo a comparação com o lado contralateral em modelos unilaterais.

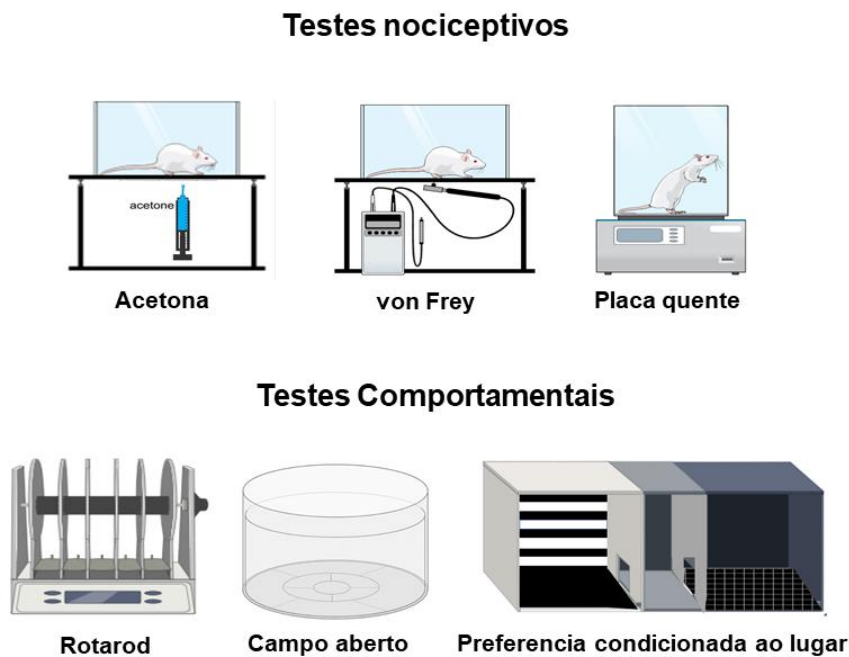


Figura 4. Testes experimentais de avaliação da nocicepção na dor neuropática em ratos e testes comportamentais de ansiedade, locomoção e comportamento emocional. Fonte: Autoria própria.

5. Testes de ansiedade e locomoção: Campo aberto e Rotarod

Apesar das técnicas modernas atualmente utilizadas na pesquisa em neurociência, a análise comportamental adequada está, sem dúvida, vinculada à neurociência comportamental e é uma ferramenta essencial para estudar o encéfalo normal e patológico (Krakauer et al., 2017). Nesse cenário, o teste de campo aberto (TCA) consiste em uma arena circular (Fig. 4) cercada por paredes elevadas onde os animais são colocados individualmente para explorar livremente o aparato (Perals et al., 2017; Walsh e Cummins, 1976). O TCA foi inicialmente projetado para estudar o

“comportamento emocional” em ratos e; ao longo de décadas, esse teste foi validado para medir ansiedade e exploração em várias espécies, incluindo roedores, pássaros, peixes, coelhos, macacos e humanos (**Perals et al., 2017; Prut e Belzung, 2003**). Neste teste, o comportamento de ansiedade é especialmente desencadeado pela agorafobia; portanto, o aumento do tempo gasto no centro da arena indica comportamento ansiolítico em roedores e humanos. Além disso, locomoção horizontal, levantamento e limpeza são outros comportamentos comuns medidos no aparelho de TCA (**Prut e Belzung, 2003**). Além disso, a tigmotaxia parece ser de extrema importância para os comportamentos exibidos pelos roedores, uma vez que os comportamentos exploratórios ocorrem com mais frequência em espaços cercados por paredes em uma arena (**Lamprea et al., 2008**).

O teste do rotarod é um dos testes mais antigos que tem sido amplamente utilizado para avaliar a habilidade motora inata em roedores desde a década de 1950 (Fig. 4) (**Dunham e Miya, 1957; Eltokhi et al., 2021**). Para realização do teste é definido uma velocidade inicial de 4 rpm, com taxa de aceleração de 20 rpm/min (**Shiotsuki et al., 2010**). No entanto, quedas antes de 5 segundos devido à má colocação do experimentador não devem ser registradas (**Shiotsuki et al., 2010**).

6. Preferência condicionada ao lugar e o Teste de Aversão a Dor

Muitas abordagens para estudar a dor em animais podem ser encontradas na literatura, a maioria das quais se baseia em processos nociceptivos (por exemplo, hipersensibilidade de áreas lesadas). A nocicepção geralmente resulta em respostas inelásticas (ou seja, reflexo de retirada), enquanto o componente afetivo da dor contribui e pode ser afetado pelo aprendizado. Assim, paradigmas experimentais baseados em respostas aprendidas (como testes de preferência, motivação e aversão) fornecem uma base mais forte para investigar o componente afetivo (**Navratilova et al., 2013, 2012, Porreca e Navratilova, 2017**).

A preferência condicionada ao lugar (CPP)/aversão condicionada ao lugar (CPA) (ver Figura 4) é um paradigma comportamental amplamente baseado nos princípios do condicionamento clássico (pavloviano) (**Silva-Cardoso e Nobre, 2021**). Para o condicionamento, um conjunto distinto de pistas ambientais é explicitamente emparelhado com um tratamento específico com ou sem drogas, e um conjunto distintamente diferente de pistas ambientais é emparelhado com um tratamento de controle (**Genaro et al., 2017; King et al., 2009; Wu et al., 2017**). Mais comumente,

os pares de tratamento e controle são repetidos várias vezes, geralmente uma vez por dia. Ao longo do condicionamento, os efeitos recompensadores ou aversivos do tratamento se tornarão associados ao conjunto particular de pistas pareadas com o tratamento, de modo que em um teste de teste de pós-condicionamento, essas pistas provocarão aproximação (quando o tratamento teve efeitos recompensadores) ou evitação (quando o tratamento teve efeitos aversivos), resultando em uma preferência ou aversão condicionada pelo ambiente pareado ao tratamento (ou “lugar”) (**King et al., 2009; Wu et al., 2017**).

Neste sentido os circuitos neuronais que modulam a dor podem aumentar ou diminuir a sensibilidade dolorosa com base em vários fatores, incluindo contexto, estresse, expectativa e outros. No entanto, o papel desses circuitos em circunstâncias de motivações concorrentes, como recompensa e ameaça, levou à formulação do modelo de decisão motivacional da dor (**Fields, 2000; Melzack e Casey, 2015; Melzack e Wall, 1965; Millan, 2002, 1999**). A presença de dor crônica em animais sem a necessidade de um estímulo evocado do experimentador foi demonstrada usando o paradigma de aprendizado de CPP que se baseia nas qualidades afetivas e motivacionais da dor (**Genaro et al., 2017; King et al., 2009; Navratilova et al., 2013; Wu et al., 2017**). Como a dor crônica fornece um impulso motivacional constante para buscar alívio, a preferência por um contexto associado ao alívio da dor pode ser usada como medida de aversão à dor (**Navratilova et al., 2013**). Portanto, o alívio da aversão à dor foi considerado um reforço negativo que pode ser avaliado pelo paradigma CPP (**King et al., 2009; Navratilova et al., 2013, 2012**). Além disso, os tratamentos clinicamente eficazes contra a dor contínua em humanos são eficazes no paradigma CPP e o inverso também é verdadeiro, fornecendo suporte para essa abordagem experimental (**King et al., 2009; Porreca e Navratilova, 2017**).

Objetivos

Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento sistêmico com CBD é capaz de reduzir a alodínia e hiperalgesia em modelo de dor neuropática. Em particular, foi avaliado se a administração de CBD altera de maneira específica a resposta comportamental frente a estímulos nocivos agudos (térmicos e mecânico) e se ele modula a aversão a dor crônica, ou seja, do componente discriminativo da dor, e/ou do componente afetivo-motivacional da dor. Em uma segunda etapa, foi avaliado a expressão de receptores TRPV1 e CB1, bem como da proteína FosB e NeuN e marcadores inflamatórios IBA-1, GFAP e interleucinas IL-1b, IL-6 e IL-10 em áreas encefálicas envolvidas na modulação do componente afetivo-motivacional da dor.

Objetivos Específicos

Capítulo I:

1. Revisar a literatura sobre “Dor crônica e CBD em modelos animais” e analisar lacunas na literatura disponível até o momento.

Capítulo II:

2. Avaliar a sensibilidade mecânica com utilização do teste de von Frey e térmica (calor e frio) pelos testes da placa quente e da acetona, respectivamente, em ratos com dor neuropática induzida por CCI e submetidos ao tratamento sistêmico (por 3 dias) com CBD.

3. Avaliar se o tratamento sistêmico com CBD altera a expressão de receptores CB1 e TRPV1 em ratos submetidos à CCI no córtex insular (AIC), no córtex anterior do giro do cíngulo (ACC), no complexo basolateral da amígdala (BLA) e no hipocampo ventral (HV) e dorsal (HD).

Capítulo III

4. Avaliar o efeito do tratamento sistêmico com CBD em ratos com dor neuropática induzida por CCI e submetidos ao teste de aversão à dor (teste de preferência ao local, CCP).

5. Avaliar a expressão da proteína FosB e NeuN em áreas encefálicas (ACC, BLA e HD) relacionadas com o componente afetivo-motivacional da dor em ratos com dor neuropática, tratados ou não com CBD sistemicamente (3 dias) e submetidos ao teste de aversão à dor (teste de preferência ao local, CCP).

6. Avaliar a expressão GFAP e IBA-1 em áreas encefálicas (ACC, BLA e HD) relacionadas com o componente afetivo-motivacional da dor em ratos com dor neuropática, tratados ou não com CBD sistemicamente (3 dias) e submetidos ao teste de aversão à dor (teste de preferência ao local, CCP).

7. Avaliar a expressão de citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 em áreas encefálicas como a amígdala (AMG) e no HD relacionadas com o componente afetivo-motivacional da dor em ratos com dor neuropática, tratados ou não com CBD sistemicamente (3 dias) e submetidos ao teste de aversão à dor (teste de preferência ao local, CCP).

Considerando estes objetivos, pretendemos compreender os mecanismos que estariam envolvidos na modulação da dor neuropática e relacionados com a neurotransmissão canabinóide nas áreas encefálicas abordadas neste estudo, e como os efeitos do CBD modulam estes componentes em áreas do circuito corticolimbico.

Capítulo I

Revisão da literatura: “Dor crônica e Canabidiol em modelos animais: farmacologia comportamental e perspectivas futuras”



Este capítulo é uma adaptação da revisão intitulada “*Chronic pain and Cannabidiol in animal models: behavioral pharmacology and future perspectives*”, atualmente submetida a Edição especial sobre Canabidiol (CBD) da *Cannabis and Cannabinoid Research*.

1. Contextualização

O CBD possui amplas propriedades terapêuticas em distúrbios neuropsiquiátricos, com diversas ações do sistema nervoso central e periférico (**Blessing et al., 2015**). Dentro dessa perspectiva, o CBD é considerado uma estratégia promissora para o tratamento de doenças inflamatórias persistentes (**Carrier et al., 2006**) e dor neuropática (**Costa et al., 2007; Silva-Cardoso et al., 2021**). Em relação à dor, os componentes do sistema endocanabinóide são expressos ao longo das vias nociceptivas e, por meio do aumento da sinalização endógena ou de ligantes endocanabinóides exógenos, pode haver regulação da sinalização nociceptiva nos níveis periférico e central (**Starowicz et al., 2013; Starowicz e Finn, 2017**). Os endocanabinóides são gerados sob demanda em resposta à dor e produzem efeitos antinociceptivos, desempenhando um papel fundamental na resolução de estados de dor aguda e mediando a analgesia induzida pelo estresse (**Blessing et al., 2015; Julius e Basbaum, 2001; Kendall e Yudowski, 2017; Lötsch et al., 2018**). Seus níveis já se mostraram elevados em várias regiões das vias nociceptivas em estados de dor crônica, sugerindo um papel como analgésico endógeno (**Fine e Rosenfeld, 2013; McCarberg e Peppin, 2019; Schnitzler e Ploner, 2000; Woodhams et al., 2017**).

No entanto, apesar do crescente corpo de evidências ligando a eficácia do CBD para o controle da dor em pesquisas clínicas e básicas, há uma falta de revisões sobre o assunto. Revisamos estudos que avaliam a sensibilidade à dor em modelos de indução de dor crônica ou modelos de doença onde uma das consequências é o aparecimento de dor neuropática associada a alguns dos modelos animais mais prevalentes: lesões mecânicas periféricas e centrais, modelos genéticos ou indução química de dor crônica periférica e central, dor crônica e neoplasia (câncer), dor crônica e diabetes tipo I, dor crônica e osteoartrite, dor crônica e esclerose múltipla e dor inflamatória persistente. Nossa revisão incluiu apenas estudos que usaram testes de nocicepção para avaliar o limiar mecânico ou térmico em pelo menos um dos testes mais comumente usados (por exemplo, von Frey, placa quente, acetona, Hargreaves, retirada de cauda, Randall & Selitto e outros).

2. Métodos

2.1 Estratégia de pesquisa e critérios de elegibilidade

Pesquisamos a literatura publicada na base de dados PubMed (até janeiro de 2022) usando as seguintes palavras-chave e sinônimos: “dor crônica ou dor neuropática” AND “canabidiol” AND “modelo animal”.

2.2 Os critérios de exclusão específicos incluíram:

(1) Estudos em humanos; (2) Revisão, revisão sistemática, meta-análise, relato de caso, comentário, editorial; (3) Não uso de modelos de indução de dor crônica, (4) Uso de agonistas seletivos de CB2 ou agonista de CB1 (5) Uso de enzimas inibidoras que hidrolisam endocanabinóides (ou seja, FAAH ou MAGL ou similar) (6) Não uso testes de nocicepção (von Frey , Hargreaves, placa quente, retirada de cauda, Randall & Selitto, ou outros), (7) Falta de apresentação de grupos controle adequados; (4) Falta de detalhamento da metodologia aplicada.

2.3 Os critérios de inclusão específicos incluíram:

(1) idioma inglês; (2) publicações originais (3) uso de tratamento com canabidiol; (4) utilizar pelo menos um modelo de indução de dor crônica (14 dias ou mais); (5) Estudos em modelos pré-clínicos; (6) dor somática, (7) Avaliar pelo menos um dos testes de nocicepção (von Frey, Hargreaves, placa quente, retirada de cauda, Randall & Selitto, ou outros).

De acordo com os critérios acima, 22 artigos foram investigados para elegibilidade. Incluímos 10 estudos que investigaram modelos de lesões neuropáticas periféricas e centrais de dor crônica, 4 de dor crônica e modelos de neuropatia periférica induzida por quimioterapia, 2 de dor crônica e neuropatia periférica induzida por diabetes tipo I, 2 de dor crônica e neuropatia periférica induzida por osteoartrite e artrite, 1 dor crônica e esclerose múltipla, 3 de dor inflamatória persistente. Nenhum estudo foi descartado antes da análise do resumo, assim como foram incluídos estudos que não foram encontrados na busca anterior por palavras-chave, mas que atendiam aos critérios de inclusão na revisão.

3. Resultados

Nesta revisão, focamos em estudos com modelos de dor crônica, um problema complexo e multifacetado. Os principais resultados revisados estão resumidos na Tabela S1 (Apêndice A).

3.1 Efeitos do CBD na dor crônica em modelos animais: lesões periféricas e centrais

A neuropatia periférica surge de danos nos nervos periféricos e pode ser recorrente ou persistente, enquanto a neuropatia central é causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial central. Pode estar relacionado à medula espinhal ou lesão cerebral, acidente vascular cerebral ou esclerose múltipla (Szok et al., 2019). Dentre os estudos que avaliam os tratamentos e mecanismos da dor crônica, são os modelos animais mais utilizados e apresentam algumas variações.

Em modelos de dor crônica que usam lesões mecânicas periféricas, como lesão por CCI, o tratamento com CBD por via subcutânea usando doses de 5 mg/kg (De Gregorio et al., 2019), 20 mg/kg intraperitoneal (i.p.) (Comelli et al., 2008) ou 20 mg/kg por via oral (Mitchell et al., 2021) mostraram efeitos em testes nociceptivos com os bons resultados em avaliações mecânicas ou térmicas. Recentemente, um estudo demonstrou que o CBD tem um comportamento de curva em U invertido no tratamento com doses de 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg i.p. por três dias no modelo CCI, os autores observaram que a dose de 3 mg/kg foi capaz de reverter a alodínia mecânica e térmica em ratos sem efeitos motores (Silva-Cardoso et al., 2021). Da mesma forma, Abraham e cols. (Abraham et al., 2020), usando um modelo de pSNL, demonstraram resultados positivos no limiar mecânico dos camundongos durante um tratamento com consumo voluntário de gelatina com CBD a 20 mg/ml. Em um estudo que investigou o modelo de dor miofascial em ratos relatou que o CBD apenas aumentou o limiar mecânico no teste de von Frey na dose de 5 mg/kg entre 10 e 30 min após o consumo (Wong e Cairns, 2019).

Em modelos de dor crônica usando lesões centrais, como a SCI, um estudo não encontrou efeitos usando um tratamento com CBD na dose de 1,5 mg/kg (Li et al., 2018); no entanto, em um novo modelo de lesão cerebral traumática para indução de lesão cerebral leve (TCE) em ratos, foi demonstrado que o tratamento com CBD (30 ml, 10% de óleo, administração oral) entre os dias 1 e 14 e no intervalo do dia 50 ao 60, reduziram a alodínia tátil nos camundongos (Belardo et al., 2019).

O CBD também pode aumentar a antinocicepção induzida pela morfina. Em um modelo animal que usa NMDA (hiperatividade do receptor de N-metil-DA aspartato) para induzir uma síndrome convulsiva associada a um acidente vascular cerebral isquêmico, o tratamento com CBD na injeção intracerebroventricular (i.c.v.) intensificou os efeitos da morfina na antinocicepção supraespinal e reduziu o tamanho do infarto causado por oclusão unilateral permanente da artéria cerebral média (**Rodríguez-Muñoz et al., 2018**).

3.2 Efeitos do CBD na dor crônica e modelos de neuropatia periférica induzida por quimioterapia

A neuropatia periférica induzida por quimioterapia (CIPN) é um efeito colateral incapacitante de muitos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer, é conhecido por prejudicar a função diária e diminuir a qualidade de vida. Em alguns pacientes, isso persistirá, e em outros pacientes será desenvolvido os sintomas somente após o término do tratamento. Uma neuropatia sensorial distal crônica muitas vezes dolorosa está presente em 33% dos pacientes um ano após o término do tratamento (**Seretny et al., 2014**). Os modelos animais de CIPN são usados para investigar a fisiopatologia e testar terapias potenciais (**Höke e Ray, 2014**). Assim como a semelhança entre o modelo CPIN induzido por paclitaxel e os modelos de neuropatia traumática de curto prazo também foi demonstrada (**Costa-Pereira et al., 2019**).

Um dos taxanos mais usados é o Paclitaxel, um dos “Big Five” (cisplatina, oxaliplatina, vincristina e Bortezomibe) – os modelos animais mais eficazes de polineuropatia induzida por quimioterapia (**Gadgil et al., 2019**). O paclitaxel interfere na interação de proteínas associadas aos microtúbulos (**Black, 1987**), e embora essa atividade antitumoral o torne um bom agente quimioterápico, também é tóxico para os neurônios e causa neuropatia periférica (**Höke e Ray, 2014b; Rowinsky et al., 1993**). Apesar do crescente conhecimento da etiologia da dor neuropática, esse tipo de dor crônica é resistente aos analgésicos disponíveis em aproximadamente 50% dos pacientes. É, portanto, continuamente um assunto de considerável interesse para fisiologistas, neurologistas, químicos medicinais, farmacologistas e outros que buscam opções de tratamento mais eficazes para essa condição debilitante.

Em estudos de modelo animal, Ward e cols. (**Ward et al., 2011**) demonstraram que camundongos tratados com CBD (5,0 ou 10,0 mg/kg i.p..) uma vez ao dia nos dias 1 a 14, impediram completamente o desenvolvimento de alodínia mecânica induzida pelo

frio pelo Paclitaxel, sem neuropatia latente emergente após a interrupção do tratamento com CBD. O mesmo grupo mostrou (**Ward et al., 2014**) que em camundongos tratados com CBD (2,5 e 5,0 mg/kg) há redução da alteração da sensibilidade mecânica induzida por paclitaxel e sugeriram que o CBD tem efeitos protetores quanto a neurotoxicidade induzida pelo paclitaxel. Esse efeito foi, em parte, mediado pelo receptor 5-HT1A (**King et al., 2017; Ward et al., 2014**). Ademais outros resultados reforçam que a injeção de CBD (0,625 - 20 mg/kg), 15 minutos antes da injeção de Paclitaxel, pode aumentar o limiar mecânico dos animais no teste de von Frey. Em outro modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterapia, que utilizou cisplatina para induzir alodínia tátil, o tratamento com CBD (nas doses 0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg) atenuou a neuropatia no teste de von Frey, mas infelizmente o tratamento preventivo não apresentou resultados significativos (**Harris et al., 2016**).

3.3 Efeitos do CBD na dor crônica e modelos de neuropatia periférica induzida por diabetes tipo I

A dor neuropática é uma condição frequente causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial central ou periférico. Uma causa frequente de dor neuropática periférica é a neuropatia diabética. A neuropatia diabética dolorosa afeta aproximadamente 25% dos pacientes com diabetes (**Shillo et al., 2019**), e sua fisiopatologia complexa não está totalmente elucidada, o que contribui para subavaliação e subtratamento (**Rosenberger et al., 2020**). Entre os modelos de diabetes de roedores usados para estudar neuropatia e avaliar terapias potenciais, o mais comum é o modelo de estreptozotocina (STZ) (**Jolivalt et al., 2016**).

Em um estudo utilizando o modelo STZ em camundongos, o tratamento com CBD (i.p. ou intranasal), promoveu redução no desenvolvimento de hipersensibilidade térmica e alodínia tátil, sugerindo efeito positivo dessa intervenção (**Toth et al., 2010**). Da mesma forma, em um estudo mais recente, foi demonstrado que o tratamento com CBD (3 mg/kg, i.p.), aumentou os limiares de von Frey em ratos diabéticos (**Jesus et al., 2019**).

3.4 Efeitos do CBD na dor crônica e modelos de osteoartrite e neuropatia periférica induzida por artrite

A osteoartrite (OA) é uma doença articular degenerativa que afeta principalmente pessoas com mais de 60 anos de idade. Há evidências crescentes de que

aproximadamente 30% dos pacientes com OA experimentam dor neuropática (Neogi, 2013). Um modelo animal estabelecido de dor da OA envolve a injeção intra-articular do inibidor da glicólise monoiodoacetato de sódio (MIA), que interrompe o metabolismo da cartilagem, levando à morte dos condrócitos, com lesões ósseas subcondrais consistentes com as alterações patológicas observadas na condição humana (Pitcher et al., 2016).

Estudos pré-clínicos revelaram que o sistema endocanabinóide desempenha papel crucial na patogênese da OA, na neuropatia articular e no controle da dor, pois está presente nas articulações dos ratos, onde foi observado seu papel na regulação da dor e na inflamação nas articulações (O'Brien e McDougall, 2018). Philpott e cols. (2017) demonstraram que a sensibilidade mecânica foi avaliada por 15 minutos após a infusão de CBD (nas doses de 100, 200 ou 300 mg em 100 ml, intra-articular) aumentou o limiar no teste de von Frey em ratos com MIA. Além disso, na OA em estágio final, a injeção intra-articular de 300 µg de CBD melhorou o suporte irrestrito do peso dos membros posteriores e o limiar de retirada da pata traseira. Este estudo fornece a primeira evidência científica de que o CBD é anti-inflamatório e analgésico em um modelo de AO, e estabelece que o tratamento precoce com CBD também previne a neuropatia associada à OA (Philpott et al., 2017).

Em um outro modelo animal de artrite induzida por injeção intra-articular com o Adjuvante Completo de Freund (CFA), na articulação do joelho, foi utilizado um tratamento com géis de CBD (0,6, 3,1, 6,2 ou 62,3 mg/dia por 4 dias), e os autores observaram redução na pontuação do teste de dor espontânea e recuperação dos limiares térmicos nos animais quando comparados aos animais controle (Hammell et al., 2016).

3.5 Efeitos do CBD na dor crônica e esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica e incapacitante do sistema nervoso central, caracterizada por neuroinflamação que leva à desmielinização dos neurônios (Huang et al., 2017). Em pacientes com EM, a dor é um sintoma frequente e incapacitante, e sua prevalência está na faixa de 29-86%, dependendo dos protocolos de avaliação utilizados e da definição de dor aplicada. A dor neuropática que se desenvolve secundariamente à desmielinização, neuroinflamação e dano axonal no sistema nervoso central é o tipo de dor mais angustiante e desafiador para tratar (Aicher et al., 2004; Jones e Vlachou, 2020). Os modelos animais ainda precisam esclarecer os mecanismos imunopatológicos subjacentes e para testar novas abordagens terapêuticas e reparadoras.

Entretanto, estudo de Giacoppo e cols. (2015) é um dos poucos em que se avaliou o modelo de peptídeo glicoproteico oligodendrócitos de mielina (MOG), e promoveu um tratamento tópico dos membros inferiores usando um creme com 1% de CBD e aplicado a cada 24 horas nos animais. Esses camundongos tratados topicamente com CBD demonstraram resposta aumentada à estimulação mecânica desde as primeiras medições. Além disso, os camundongos não responderam ao estímulo mecânico aplicado na pata plantar, enquanto os animais controles sempre responderam retraíndo a pata (Giacoppo et al., 2015).

Infelizmente, poucos estudos na literatura utilizam o tratamento com CBD e avaliam a sensibilidade em testes de nocicepção; a maioria demonstra efeitos significativos, mas não avalia a sensibilidade à dor mecânica ou térmica nos animais. Elliot e cols. (Elliott et al., 2018) foram pioneiros em mostrar que o tratamento com CBD poderia melhorar a EM, mas este estudo não avaliou a sensibilidade à dor. Adicionalmente, Al-Ghezi e cols. (2019) sugeriram que o CBD suprime a neuroinflamação e atenua o desenvolvimento clínico da EM, mas também não avaliaram o quadro de alterações na sensibilidade à dor.

3.6 Efeitos do CBD na dor inflamatória persistente

A dor inflamatória é causada por estímulos nocivos que ocorrem durante a resposta inflamatória ou imune. Em condições normais, a inflamação é um mecanismo protetor crucial que desempenha papel vital na cicatrização de feridas. Geralmente é acompanhada por inflamação, calor, inchaço, dor/hipersensibilidade e perda de função. No entanto, em condições patológicas, a inflamação pode causar dor duradoura ao ativar os neurônios sensoriais (Mlost et al., 2020).

Em um estudo em que a dor inflamatória induzida por injeção de carragenina, o efeito do tratamento com CBD (10,000 µg/kg, oral por gavagem) foi avaliado, e os resultados mostraram que o CBD, na mesma dose correspondente, não reduziu a hiperalgesia induzida por carragenina, neste modelo (Rock et al., 2018).

Nos modelos de injeção intraplantar de CFA, estudos que utilizaram ratos e camundongos mostraram que, independentemente da via de administração (i.p. ou intratecal), o CBD tem efeitos antialódinicos (Britch et al., 2020). Em outro estudo usando CFA, a administração de CBD na dose de 50 mg/kg i.p. ou intratecal, promoveu aumento significativo no limiar térmico no teste de Hargreaves, com efeito máximo observado na primeira hora, que persistiu por 2 horas. Além disso, um ponto

interessante deste estudo é que a analgesia induzida por CBD foi totalmente replicada em vários momentos no mesmo dia ou no dia seguinte, sugerindo que não há tolerância aparente com analgesia induzida por CBD (Xiong et al., 2012).

4. Mecanismos moleculares de ação e alvos bioquímicos do CBD na dor crônica

Nesta seção, nosso objetivo é discutir os alvos bioquímicos do CBD, juntamente com uma discussão de seus possíveis mecanismos de ação na dor crônica, principalmente no sistema nervoso central (Morgan et al., 2010) e a relação com as ações antinociceptivas (Robson, 2014). Os efeitos primários dos endocanabinóides dependem da ativação dos receptores acoplados a proteínas G (GPCR) e do tipo de subunidade α acoplada ao receptor. Os receptores CB1 e CB2 são pares primários com a subunidade $G_{\alpha i/o}$, que inibe a atividade da adenilato ciclase e, portanto, reduz a concentração intracelular de Ca^{2+} . Apesar da especificidade do mecanismo de ação dos endocanabinóides e canabinóides, as interações metabólicas complexas entre o sistema endocanabinóide e mediadores inflamatórios também precisam ser levadas em consideração ao estudar os efeitos de vários medicamentos à base de canabinóides (Mlost et al., 2020; Ożarowski et al., 2021). Ademais estudos já demonstraram que o CBD diminui os níveis dos fatores pró-inflamatórios das interleucinas IL-6 e $TNF\alpha$ e aumenta os níveis da interleucina anti-inflamatória IL-10 (Verrico et al., 2020).

No entanto, a farmacodinâmica do CBD tem sido difícil de elucidar. Os estudos iniciais mostraram que o CBD compete mal com os ligantes endocanabinóides no local ortostérico dos receptores endocanabinóides (Thomas et al., 1998). De fato, o CBD interage diretamente com vários receptores, enzimas e canais iônicos; no entanto, também demonstrou interagir direta e indiretamente com o sistema endocanabinóide (Tham et al., 2019). O estado atual do conhecimento expõe o mecanismo de ação do CBD para efeitos antinociceptivos distinto do sistema endocanabinóide, pois já foi demonstrado que o efeito anti-hiperalgésico do CBD é impedido pela capsazepina (o antagonista do receptor endovanilóide TRPV1), mas não pelo rimonabant ou SR144528 (antagonistas dos receptores CB1 e CB2, respectivamente) (Costa et al., 2007, 2005).

O CBD também possui a alta atividade de receptores ionotrópicos, como os canais de potencial receptor transitório (TRP) - canais iônicos catiônicos localizados principalmente na membrana plasmática de vários tipos de células animais -, entre eles TRPA1, TRPV1, TRPV2 e TRPV4 são ativados por CBD, além de atuar como

antagonista do TRPM8 (**De Petrocellis et al., 2011, 2008; Kocot-Kępska et al., 2021; Qin et al., 2008**). Um exemplo disso é que o efeito antinociceptivo do CBD pode não ser necessariamente inteiramente devido à ativação dos receptores CB1 e CB2, mas sim pela modulação do receptor TRPV1 (**Costa et al., 2004; Maayah et al., 2020**).

Atualmente, os estudos frequentemente apresentam os efeitos do CBD mediados pelo receptor serotoninérgico 5HT1A, que, semelhante aos receptores endocanabinóides, é acoplado à proteína Gi (**Mlost et al., 2020; Russo et al., 2005**). Já foi demonstrado que ocorre a modulação da transmissão serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe, onde a administração subcutânea repetida de CBD por 7 dias, aumenta o disparo de 5-HT pela dessensibilização dos receptores 5HT1A em ratos saudáveis. Este efeito foi bloqueado com o antagonismo dos receptores 5HT1A e TRPV1, assim como foi demonstrado que este bloqueio de 5HT1A previne os efeitos antinociceptivos do CBD (**De Gregorio et al., 2019**). Além disso, a administração aguda de CBD i.p. produziu um efeito antialodínico no teste de von Frey, e os autores demonstraram que esse efeito foi mediado pela ativação do sistema serotoninérgico através de receptores 5HT1A, uma vez que um antagonista seletivo do receptor 5HT1A, mas não o de CB1, ou os antagonistas de CB2 ou glicina, impediram o efeito antialodínico observado no teste de von Frey (**Jesus et al., 2019**).

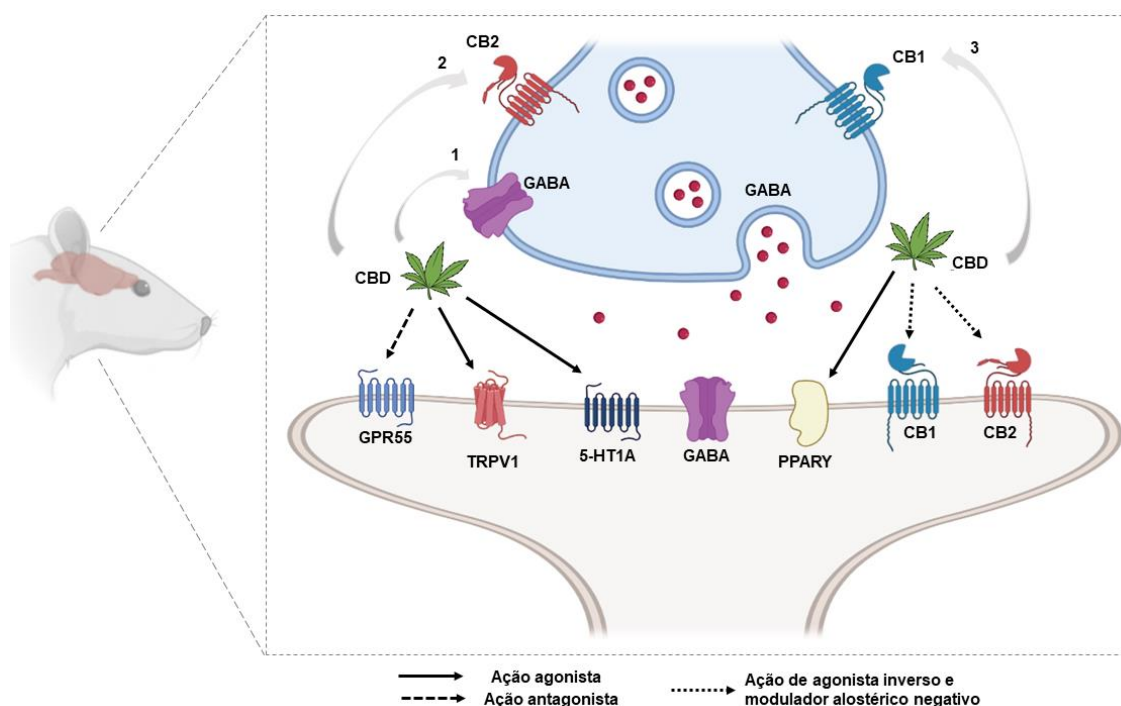


Figura 5. Esquema simplificado de alvos moleculares de CBD na dor crônica. 1- Como ativador de receptores endocanabinóides, o CBD pode modular o receptor GABA; 2 e 3 - Como mostrado, o CBD influencia os receptores de endocanabinóides pré-sinápticos (CB1, CB2) e facilita a atividade pós-sináptica do GABA. Abreviaturas: GABA - Ácido gama-aminobutírico; CBD - Canabidiol; CB1- receptor canabinoide tipo 1; CB2 – receptor canabinoide tipo 2; TRPV1- receptor transitório endovanilóide tipo 1; 5-HT1A – receptor serotoninérgico do tipo 1A; PPARγ-. receptores ativadores da proliferação de peroxissomos do tipo gama. Fonte: Autoria própria.

Além disso, há evidências de que o CBD inibe a captação sinaptossômica de dopamina, noradrenalina, GABA, serotonina, além da captação celular de anandamida (Bisogno et al., 2001; De Petrocellis et al., 2011). A modulação desses neurotransmissores pode explicar os efeitos neuroprotetores e antinociceptivos do CBD. Bem como o CBD pode inibir a produção de metabólitos de ácido araquidônico, prostaglandinas, sugerindo efeitos anti-inflamatórios (Maayah et al., 2020; Mlost et al., 2020; Nagarkatti et al., 2009). Em resumo, a ação do CBD pode ocorrer por diferentes vias sendo responsáveis pela supressão da excitabilidade neuronal e percepção da dor (Guindon e Hohmann, 2009; Xiong et al., 2012).

5. Limitações de modelos animais de dor crônica

Em nossa revisão, nos concentramos em estudos de diferentes modelos animais de dor crônica que investigaram o CBD como tratamento, avaliando a nocicepção com base em resultados relacionados a alterações neurofisiológicas de alodínia/hiperalgesia na função nervosa. Primeiro, é importante discutir a questão das limitações dos modelos animais em replicar todos os sintomas observados nos pacientes, mas isso ainda é muito desafiador. Por exemplo, muitos pacientes relatam sintomas como dormência ou formigamento (**Gadgil et al., 2019**), e essas características são mensuradas pelo relato verbal do paciente; este aspecto é difícil de replicar em modelos animais. Outro aspecto interessante, que já imaginávamos, é que estudos com foco na avaliação da dor espontânea ainda são raros na literatura, mas felizmente encontramos um estudo que avaliou a dor espontânea, onde os autores (**Hammell et al., 2016**) avaliaram os efeitos do CBD no modelo de artrite e observaram que ele foi capaz de reduzir os escores de dor no teste de dor espontânea.

Observamos uma série de limitações a serem superadas pelos modelos animais e, apesar de toda a importância dos estudos pré-clínicos, esses aspectos não devem ser ignorados na interpretação dos resultados obtidos. Encontramos diversos protocolos de tratamentos agudos e crônicos, com diferentes abordagens quanto à via de administração do CBD, e é importante mencionar que a maioria dos autores não discute essas diferenças em suas discussões, tanto em resultados positivos quanto negativos.

E apesar dos crescentes incentivos das agências de financiamento para estudos com ambos os sexos, dos 22 estudos revisados: 15 estudos usaram apenas animais machos, 3 estudos usaram apenas fêmeas e apenas 3 estudos usaram machos e fêmeas. No entanto, esses estudos não apresentam dados referentes aos ciclos estrais de ratas, nem informações se esse critério foi utilizado de forma relevante em seus resultados no teste de nocicepção ou em outros testes comportamentais, nem se discutiu como isso influenciaria seus resultados.

A falta de análise adequada para medir a atividade motora é outro ponto crítico, aproximadamente 90% dos estudos não realizaram nenhuma avaliação direta ou indireta da atividade motora dos animais, isso é uma falha principalmente quando queremos evitar resultados falso-positivos induzidos por compostos capazes de gerar efeitos motores. Portanto, devemos destacar os estudos de Belardo e cols. (**Belardo et al., 2019**), De Gregorio e cols. (**De Gregorio et al., 2019**), Jesus e cols. (**Jesus et al., 2019**), Silva-Cardoso e cols. (**Silva-Cardoso et al., 2021**) e Xiong e cols. (**Xiong et al., 2012**),

que realizaram testes como rotarod ou campo aberto como medida complementar da atividade motora em seus estudos pré-clínicos com CBD, principalmente para analisar possíveis efeitos sedativos ou efeitos de “euforia” motora em seus animais. Curiosamente, em muitos estudos, não está claro se houve possíveis efeitos colaterais adversos (sedativos ou outros). Quanto ao monitoramento do peso dos animais, observamos que nenhum dos estudos realizou monitoramento do peso corporal desses animais ao longo de seu protocolo experimental.

Finalmente, outro ponto extremamente importante negligenciado por uma ampla gama de estudos foram os testes comportamentais (por exemplo, para ansiedade, depressão ou memória). Devemos destacar os estudos que utilizaram alguma medida de avaliação do comportamento emocional em seus protocolos, como para avaliar ansiedade ou depressão, como Abraham e cols. (2020), Belardo e cols. (2019), De Gregorio e cols. (2019), e Silva-Cardoso e cols. (2021).

Em resumo, em estudos pré-clínicos, é imprescindível a inserção de grupos controle (tratamento), grupos sham (modelo de indução), ou mesmo a inclusão de um grupo controle farmacológico positivo, para que se tenha os melhores parâmetros possíveis na pesquisa. Além de ter muito cuidado com a aplicação de testes de nocicepção ou emocionais, como priorizar protocolos duplo-cegos, tanto na coleta quanto na análise dos dados. Além de respeitar as limitações dos testes, para não cair em falhas de aplicação, como repetições excessivas dos testes nos mesmos animais, a fim de evitar possíveis adaptações e conseqüentemente enviesar os resultados e estes não refletirem o verdadeiro estado da condição ou tratamento. Felizmente, a investigação de novas medidas de dor contínua em roedores é uma área emergente, além disso, o desenvolvimento de modelos animais de dor crônica que reproduzam todos os sintomas relatados pelos pacientes continua sendo um grande desafio, assim como a avaliação da dor espontânea em animais.

6. Translacional clínico: CBD e seus efeitos em pacientes com dor crônica

Clinicamente, as síndromes de dor neuropática são caracterizadas por uma combinação de fenômenos positivos e negativos (Attal et al., 2008; Baron et al., 2010; Bouhassira, 2019). Infelizmente, muitos pacientes não respondem adequadamente aos tratamentos convencionais e apresentam perda de qualidade de vida. Nesta seção, queremos discutir a escassez de ensaios clínicos usando apenas CBD para dor crônica e possíveis falhas nos protocolos dos estudos publicados até agora, por isso não

discutiremos estudos que avaliaram o tratamento com a combinação de THC + CBD em pacientes.

Desde o início dos anos 2000, os ensaios clínicos envolvendo o CBD mostraram efeitos que variam de placebo a altamente eficaz para dor crônica (**Navarrete et al., 2021; Russo, 2008**). Em nossas pesquisas, encontramos apenas 5 estudos publicados com tratamento apenas com CBD (Tabela S2 em Apêndice B). Desses estudos em 2 não encontramos os resultados dos tratamentos em bancos de dados; no entanto, podemos destacar que eles apresentaram uma grande disparidade na dosagem utilizada e nos tempos de tratamento, de 10-20 mg/kg (12 semanas) a 50-600 mg/kg (28 dias), respectivamente para pacientes com artrite reumatoide ou espondilite anquilosante (**Hendricks et al., 2019**) e pacientes em diagnóstico de câncer avançado histologicamente comprovado (metastático ou localmente avançado) (**Good et al., 2019**).

O ensaio clínico mais antigo, publicado em 2018, foi realizado com pacientes entre 58 e 75 anos com dor crônica (transplantados renais), utilizando 50-150 mg/kg de CBD duas vezes ao dia por 3 semanas. O estudo aponta efeitos positivos na dor crônica, porém, sua amostra é restrita a 7 pacientes, trata-se de um ensaio não randomizado, sem controle placebo, e os efeitos adversos foram relatados foram náuseas, boca seca, tontura, sonolência e intermitência a episódios de calor (**Cuñetti et al., 2018**).

Recentemente, a eficácia do óleo de CBD tópico no alívio sintomático da neuropatia periférica através da aplicação transdérmica de óleo de CBD demonstrou melhorar a dor em pacientes com neuropatia periférica (**Xu et al., 2020**). Em outro ensaio clínico, eles avaliaram os efeitos do extrato de CBD no uso concomitante de opioides e demonstraram que o CBD pode reduzir significativamente o uso de opioides e melhorar a dor crônica, além disso, não foram relatados eventos adversos significativos (**Capano et al., 2020**). Deve-se notar que ambos os ensaios não atendem a todos os requisitos padrão-ouro para ensaios clínicos, por exemplo, Capano e cols. (**Capano et al., 2020**) é um estudo não randomizado sem controle placebo, e Xu e cols. (**Xu et al., 2020**) não é duplo-cego.

Um ponto crítico é o fato de que muitos não possuem estudos preliminares para estabelecer a dose utilizada nos pacientes (independente da doença ou lesão tratada), permitem que o sujeito experimental use outros medicamentos (analgésicos ou não), e muitos não realizam qualquer avaliação com testes de ansiedade, depressão ou qualquer outra comorbidade nos pacientes. Além disso, não há estudos publicados que tenham

investigado completamente essas interações entre o CBD e outros analgésicos (**Bonini et al., 2018; Booth et al., 2017; Gonçalves et al., 2020**). No entanto, muitos ensaios clínicos avaliam a analgesia do CBD em pacientes que já são mantidos com outros analgésicos, o que pode ignorar o efeito teto, além de ignorar os efeitos do CBD como "modulador" do humor (**Genaro et al., 2017**). A dor está altamente associada à ansiedade e à depressão (**Calvo et al., 2019; Goesling et al., 2018; Kremer et al., 2020**), e essa relação bidirecional deve ser avaliada em ensaios clínicos, pois em modelos animais o CBD demonstrou ter efeitos ansiolíticos (**Campos et al., 2013; Guimarães et al., 1990; Silva-Cardoso et al., 2021**), e isso somado aos efeitos analgésicos ou anti-inflamatórios pode trazer muitos benefícios terapêuticos para pacientes que não só têm dor crônica, mas também na ansiedade ou depressão.

Apesar disso, não há estudos sobre administração crônica de CBD em pessoas saudáveis, algo fundamental para refletir o uso em pessoas com doenças crônicas que infelizmente fazem uso de medicação a longo prazo (por anos ou a vida toda). Estudos em animais com tratamento crônico com CBD duram várias semanas, até vários meses, o que pode refletir o uso a longo prazo em pessoas, mas as diferenças não podem ser excluídas. Pesquisas mais detalhadas são necessárias para esclarecer esses efeitos.

Em resumo, esses ensaios clínicos já adicionaram evidências para apoiar pesquisas futuras sobre a eficácia do CBD na dor neuropática. Obviamente, são necessários mais estudos para examinar diretamente o efeito do alívio da dor crônica do CBD. Assim como mais estudos que abordem todos os critérios para que um ensaio clínico seja considerado do tipo "padrão ouro".

7. Conclusão e perspectivas futuras

Em resumo, o CBD é um composto natural bem tolerado e seguro que exerce efeitos analgésicos em vários modelos animais de dor crônica, bem como em estudos clínicos. O tratamento crônico com CBD permite que efeitos terapêuticos de longo prazo sejam alcançados sem efeitos colaterais significativos ou o desenvolvimento de tolerância. Na maioria dos estudos em animais, eles demonstraram exercer efeitos analgésicos, diminuindo a hiperalgesia e a alodínia mecânica/térmica através de várias vias de administração. No entanto, o tratamento agudo com CBD pode não ser suficiente para combater a causa da dor e proporcionar um efeito que dura várias horas (dependendo do modelo da doença, dose e via de administração). Infelizmente, não encontramos uma

ampla gama de ensaios clínicos, porém, os poucos encontrados apresentaram bons resultados iniciais.

Embora muitos estudos pré-clínicos tenham mostrado avanços notáveis e respostas favoráveis ao uso do CBD para dor crônica, ainda são necessários cuidados, quanto a desenhos experimentais, principalmente devido à característica multifatorial do estabelecimento da cronicidade e seus múltiplos eliciadores. Estudos pré-clínicos que foquem em desvendar os mecanismos do CBD ainda são necessários para fornecer mais suportes dos efeitos analgésicos na dor crônica, e aumentar nossa compreensão dos mecanismos dessa molécula. Em conclusão, o uso de CBD parece ser uma estratégia promissora para o tratamento da dor crônica e uma opção para pacientes não responsivos aos tratamentos convencionais para dor crônica, felizmente, nos últimos anos, estamos testemunhando uma onda constante de países que estão legalizando o uso medicinal da *Cannabis* que favorece o desenvolvimento de mais pesquisas clínicas com esses compostos como o CBD em estudos pré-clínicos e nos ensaios clínicos.

Capítulo II

O Canabidiol reverte efetivamente a alodínia mecânica e térmica, hiperalgesia e comportamentos ansiosos em um modelo de dor neuropática: possível papel dos receptores CB1 e TRPV1



Este capítulo da tese é uma adaptação do manuscrito publicado na *Neuropharmacology*, na edição de outubro de 2021 (doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108712), intitulado “*Cannabidiol effectively reverses mechanical allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: evidence of the role of CB1 and TRPV1 receptors*”.

1. Contextualização

As propriedades farmacológicas e terapêuticas do CBD são amplamente demonstradas e seu mecanismo de ação é complexo, envolvendo vários sistemas, incluindo sua atividade no endocanabinóide (receptores CB1 e CB2) e no sistema endovanilóide (TRPV1R). Atualmente, sabe-se que o CBD está associado a diferentes alvos, que incluem, além dos receptores acoplados à proteína G, como os receptores endocanabinóides (CB1R e CB2R) e TRPV1R, respectivamente, e o receptor serotoninérgico 5-HT1A. Acredita-se que os dois últimos receptores sejam os principais alvos do CBD (Almeida e Devi, 2020). Além disso, estudos anteriores demonstraram que o CBD atua como agonista do TRPV1 e causa rápida dessensibilização do receptor. De fato, esses mecanismos podem ser a base para a dessensibilização do nociceptor e para o efeito terapêutico do CBD em modelos animais e pacientes com dor crônica (Anand et al., 2020; Britch et al., 2020).

O CB1R e TRPV1R, são expressos em várias regiões cerebrais intimamente relacionadas com a modulação do comportamento emocional e sensibilidade à dor (Cristino et al., 2006; Mezey et al., 2000), incluindo o córtex cingulado anterior (ACC) (Lomazzo et al., 2017, Okine et al., 2016), córtex insular agranular (AIC) (Moldrich e Wenger, 2000; Roberts et al., 2004), complexo basolateral da amígdala (BLA) (Becker e Carrasquillo, 2019; LeDoux, 2003; Wilson et al., 2019) e hipocampo dorsal (HD) e ventral (HV) (Fiore e Austin, 2019; Pourreza et al., 2018). Dessa forma, estruturas corticais como o ACC são ativadas por estímulos nocivos e contextuais e estão envolvidas no processamento da dor, principalmente na dor afetiva (Bliss et al., 2016; Gungor e Johansen, 2019; Xiao e Zhang, 2018). Da mesma forma, o AIC é ativado em resposta a estímulos nocivos, processamento de dor física ou psicológica (Benarroch, 2019; Lu et al., 2016; Salimi e Tamaddonfard, 2019). Além disso, estruturas límbicas como o BLA também estão envolvidas na modulação da dor neuropática, integrando o neurocircuito que processa o componente afetivo-motivacional da dor (Becker e Carrasquillo, 2019; Butler et al., 2017; Seno et al.,

2018; Wilson et al., 2019). O hipocampo está envolvido com a modulação da percepção da dor, uma vez que as alterações sinápticas no HD - inibem a potenciação a longo prazo nas sinapses em CA3 e CA1, estão subjacentes os déficits cognitivos que acompanham a dor crônica. Por outro lado, o HV tem um papel nas dimensões perceptivas e afetivas da dor (Cardoso-Cruz et al., 2013; Fiore e Austin, 2019; Liu et al., 2017; Ma et al., 2019; Pourreza et al., 2018; Zheng et al., 2017).

Considerando que o envolvimento do CBD na modulação nociceptiva não é totalmente compreendido, este estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento subcrônico sistêmico com CBD pode alterar a sensibilidade mecânica e térmica e o componente afetivo-motivacional no modelo de dor neuropática induzida por CCI em ratos. Além disso, avaliamos a imunorreatividade de CB1R e TRPV1R no ACC, AIC, BLA, HD e HV desses animais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Os experimentos foram realizados em 60 ratos *Wistar* machos (± 250 g com 8 semanas de idade) oriundos do biotério da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Todos os animais foram mantidos em caixas coletivas (densidade populacional de 4 ratos) de polipropileno 35 x 19 x 25 cm forradas com maravalha, em ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), com água e ração *ad libitum*. O mesmo experimentador realizou os testes de nocicepção e a avaliação comportamental. Os grupos foram organizados aleatoriamente e foi realizado a análises as “cegas” pelo experimentador (no tratamento ou na condição) por meio de um sistema de marcação de cores e números na cauda dos animais (código individual). Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil e receberam a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto, protocolo número 2018.1.103.58.5 (Apêndice C). Todos os cuidados foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e utilizar o menor número de animais possível.

2.2. Lesão por constrição crônica do nervo ciático (CCI)

A neuropatia periférica foi induzida pela constrição do nervo ciático (**Dias et al., 2013**), de acordo com um método previamente descrito por Bennett & Xie (**Bennett e Xie, 1988**). Para isso, os ratos foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina 10% (75 mg/kg, Cetamin, SYNTEC, Barueri – SP/Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg, Xilazin, SYNTEC, Barueri – SP/ Brasil) administrado por via intramuscular no membro posterior. Em seguida, os animais foram colocados em mesa cirúrgica (posição dorsal), foi realizada tricotomia interna nos membros pélvicos e a área foi desinfetada com iodopolvidina (Rioquímica, São José do Rio Preto – SP/ Brasil). A incisão de 1,5 cm foi feita na face interna da coxa, atingindo a fáscia muscular para separar os músculos glúteos e o músculo bíceps femoral com exposição do nervo ciático. A dissecação foi realizada na altura do pequeno trocânter do fêmur em comprimento, medindo cerca de 8 mm a partir do nervo ciático proximal. A constrição foi realizada com fio Catgut cromado 4-0 (Bioline - fios/cirúrgico, Anápolis – GO Brasil) e transfixado com o mesmo fio com miniagulha 3/8. O nervo ciático foi transfixado em 3/4 de seu diâmetro e constringido em um local. Ao final, os músculos foram liberados e a pele suturada com fio de algodão foi devolvida ao seu local de origem. No grupo controle falsamente operado (SHAM), o nervo ciático não foi exposto ou estirado. Logo após a ligadura do nervo, o tecido epitelial foi suturado com fios de seda 2.0. A linha de base dos animais nos testes nociceptivos foi realizada antes da cirurgia CCI ou SHAM. As cirurgias foram realizadas entre 9h e 15h, sendo utilizado álcool 70% para limpeza da mesa e o GermeRio (Rioquímica, São José do Rio Preto – SP/Brasil) para desinfecção do instrumental cirúrgico a cada cirurgia.

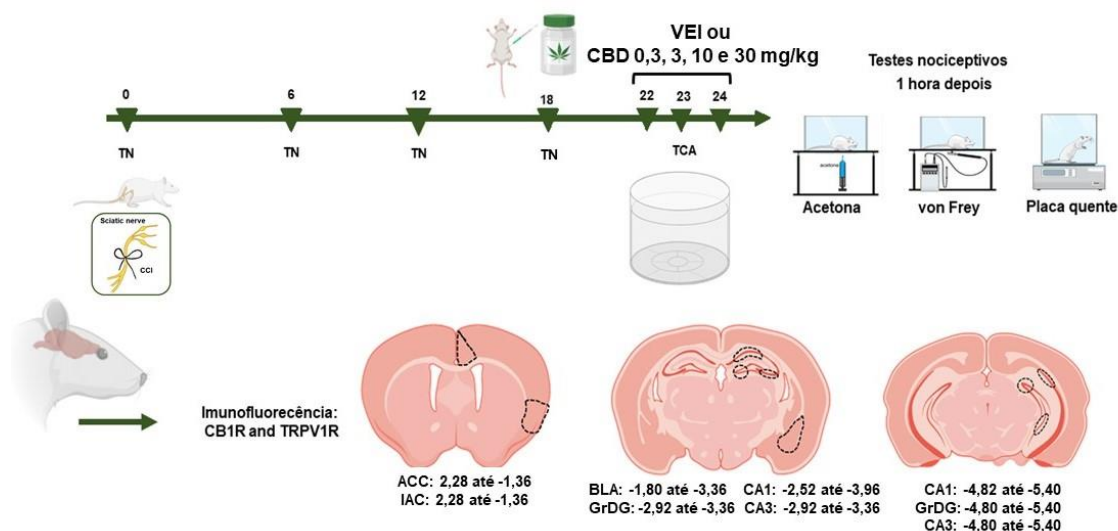


Figura 6. Desenho experimental. Os animais foram submetidos a mensuração das linhas de base TN (Acetona, von Frey e Placa quente). Em seguida, os animais foram submetidos à cirurgia CCI ou SHAM. TN foram realizadas 6, 12 e 18 dias após a cirurgia. O TCA foi realizado no 23º dia 1 hora após o tratamento. A sessão de teste foi realizada no 24º dia e em seguida o tecido foi coletado para imuno-histoquímica. Abreviaturas: TN - testes de nocicepção, CCI - lesão por constrição crônica, VEI - veículo, CBD - canabidiol, TCA – teste de campo aberto, BLA - complexo basolateral da amígdala, CA1 - região 1 do corno de Amon (dorsal e ventral), ACC – córtex cingulado anterior, AIC - córtex insular agranular; GrDG - camada granular do giro denteado do hipocampo (dorsal e ventral), CA3 - região 3 do corno de Amon (dorsal e ventral). Fonte: Autoria própria.

2.3. Tratamento com CBD

O CBD (99,6% de pureza; BSPG-Pharm, Sandwich, UK) foi diluído em solução de veículo (VEI, 98% de solução salina, 2% de Tween 80). VEI ou CBD foi administrado diariamente (1ml/kg; intraperitonealmente) por três dias em doses de 0,3, 3, 10 ou 30 mg/kg. Foi administrada uma injeção diária, considerando a eliminação do tempo e meia-vida do CBD para promover a manutenção da droga no organismo (Deiana et al., 2012). Cada administração foi realizada 60 minutos antes dos testes nociceptivos, intervalo de tempo baseado no tempo de absorção plasmática do CBD (Britch et al., 2020). No presente estudo foram realizados sete grupos experimentais (n = 6-8 para cada grupo), dois grupos SHAM (os animais foram tratados com VEI ou CBD na dose de 3 mg/kg) e cinco grupos CCI (os animais foram tratados com VEI ou com CBD nas doses de 0,3, 3, 10 ou 30 mg/kg). O tratamento com CBD foi iniciado no 22º dia após a cirurgia (CCI ou SHAM). Veja o desenho experimental na Figura 6 e 7.

2.4 Avaliação da sensibilidade mecânica

A sensibilidade mecânica foi avaliada pelo aumento da pressão na pata dos animais (von Frey eletrônico, Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), aplicada por um analgesímetro eletrônico (Deuis et al., 2017). No primeiro dia experimental, antes da cirurgia da lesão por constrição crônica, todos os animais foram colocados na caixa de teste por 10 min (período de habituação). Após esse tempo, forças progressivas crescentes do filamento de um analgesímetro eletrônico de von Frey foram aplicadas na superfície plantar da pata traseira até a retirada da pata. O limiar de retirada mecânica foi avaliado nas patas contralateral e ipsilateral à cirurgia. O limiar mecânico da pata (em gramas) foi calculado como a média de três valores obtidos em cada sessão (Deuis et al., 2017; Wu et al., 2008). As sessões foram realizadas após 6, 12 e 18 dias da cirurgia e a sessão teste no 24º dia (3º dia de tratamento com CBD ou VEI). Os animais foram subdivididos em coortes para respeitar a faixa de melhor efeito da droga, para que todos os testes fossem realizados seguindo o mesmo critério. Os testes de von Frey foram realizados entre 9h e 13h, com habituação de 60 minutos na sala antes do teste, com iluminação da sala na faixa de 60 lux e limpeza do aparelho com álcool 20% e papel toalha.

2.5 Sensibilidade térmica ao frio

Foi utilizado o teste de instilação plantar de acetona, que mede a alodínia ao frio induzida pela constrição do nervo ciático (Deuis et al., 2017). Durante o procedimento, os ratos foram colocados em caixas de acrílico com piso de 5 mm² correspondente a uma rede de malha de arame não maleável de 1 mm, e após o tempo de habituação (10 min), instilou-se um jato de 100 µl de acetona no patas traseiras esquerda e direita com seringa de insulina, a uma distância de aproximadamente 5 mm da pata através da malha da caixa de observação. Após a aplicação do estímulo, o comportamento foi avaliado durante 2 minutos utilizando a seguinte pontuação: 0 (sem estímulo-resposta), 1 (retirada rápida ou movimento da pata), 2 (movimento repetido da pata) e 3 (movimentos repetidos de a pata traseira e lamber a pata) (Deuis et al., 2017; Flatters e Bennett, 2004). A resposta foi considerada a pontuação a um estímulo frio, e o aumento ou redução dos valores encontrados foi interpretado como alodínia ou hipoalgesia fria, respectivamente. As sessões foram realizadas após 6, 12 e 18 dias da cirurgia de lesão por constrição crônica e a sessão teste no 24º dia (3º dia de tratamento com CBD ou VEI). Os animais foram subdivididos em coortes para respeitar a faixa de melhor efeito

da droga, para que todos os testes fossem realizados seguindo o mesmo critério. Para tanto, os animais foram avaliados no teste de von Frey e no teste da acetona após o intervalo de 10 min. O teste de instilação plantar foi realizado entre 9h e 13h, com iluminação da sala na faixa de 60 lux e limpeza do aparelho com álcool 20% e papel toalha.

2.6. Sensibilidade térmica ao calor

O teste da placa quente avalia o tempo que os animais permanecem em uma superfície metálica aquecida ($50 \pm 1^\circ\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico (**Deuis et al., 2017**). Inicialmente, os animais são colocados na placa aquecida, e a resposta à estimulação térmica (salto, retirada ou lambida das patas traseiras ou dianteiras) foi registrada. Foi adotado um tempo de corte de 30 segundos para evitar possíveis lesões na exposição da pata do animal a um estímulo térmico nocivo de longa duração (**Deuis et al., 2017**). As sessões foram realizadas após 6, 12 e 18 dias da cirurgia de lesão por constrição crônica e a sessão teste no 24º dia (3º dia de tratamento com CBD ou VEI). Os animais foram subdivididos em coortes para respeitar a faixa de melhor efeito da droga, para que todos os testes fossem realizados seguindo o mesmo critério; portanto, os animais foram testados no teste de von Frey, seguido do teste da acetona após o intervalo de 10 min e o teste da placa quente após o intervalo de 10 min. O teste da placa quente foi realizado entre 9h e 13h, com iluminação da sala na faixa de 60 lux e limpeza do aparelho com álcool 20% e papel toalha.

2.7. Avaliação da atividade locomotora e comportamento ansioso

O padrão de locomoção e comportamento ansioso foram avaliados no teste de campo aberto (TCA) no 23º dia experimental, após 2 dias de tratamento com CBD ou VEI. Os animais foram colocados no centro do aparato e o comportamento exploratório foi registrado por 5 minutos para análise comportamental (**Prut e Belzung, 2003**). Os parâmetros utilizados para avaliar o padrão de locomoção do animal no TCA foram o tempo gasto no centro e na borda do aparato. Por fim, foram contados os números de cruzamentos entre os quadrantes para investigar possíveis alterações na atividade locomotora e possíveis efeitos sedativos, que podem interferir na avaliação dos testes nociceptivos, uma vez que os índices de avaliação dependem das respostas motoras. Medidas complementares no TCA, como elevação, autolimpeza e congelamento também foram avaliadas. Os animais foram subdivididos em coortes para respeitar a

faixa de melhor efeito da droga para que todos os testes fossem realizados seguindo o mesmo critério. Os testes de TCA foram realizados entre 11h e 13h, com habituação de 60 minutos na sala antes do teste. A intensidade da luz foi medida no centro do aparelho (60 luxes). Os testes foram registrados, armazenados e analisados, e o aparelho foi limpo com álcool 20% e papel toalha.

2.8. Imunofluorescência para CB1R e TRPV1R

Após os procedimentos comportamentais, os animais foram anestesiados com xilazina 4% (30 mg/kg) e cetamina 10% (225 mg/kg), e em seguida, foram submetidos à perfusão transcardial com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M a 20°C, seguida de solução de Somogyi (paraformaldeído 8% em solução de fosfato 0,1 M + 4 mL de glutaraldeído 25% + 300 mL de ácido pícrico). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e fixados em solução de Somogyi por 4 horas, seguido de crioproteção tecidual em solução de sacarose a 30%. Os encéfalos fixados foram congelados em isopentano e armazenados a -80°C para as técnicas imuno-histoquímicas. Os cortes coronais foram cortados em série com 40 µm de espessura (seções flutuantes) e foram obtidos cortes das regiões do ACC, AIC, BLA, HD e HV para análise imuno-histoquímica (**Paxinos, 2008**) e os cortes flutuantes foram armazenados em solução anticongelante (50% PBS, 30% etilenoglicol, 20% glicerol) a -20°C.

Para imunocoloração, a mesma seção foi pré-incubada por 1 h em 10% de soro de cabra normal (NDS, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) em PBS, pH 7,4 contendo 0,3% de Triton X-100. As seções foram então incubadas por 16 horas em mistura dos mesmos anticorpos primários (anti-CB1R e anti-TRPV1R, diluídos 1:1000 em soro normal de cabra, respectivamente) a 4°C sob agitação contínua com um anticorpo policlonal anti-coelho que reconhece o receptor C-terminal de CB1 (Abcam, AB23703) diluído 1:1000 em soro de cabra normal. Após três lavagens, as seções foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 h em IgG de cabra anti-coelho H & L Alexa fluor 488 (Ab 150077) diluído 1:1000 em soro normal de cabra. O mesmo procedimento foi seguido para imunocoloração de TRPV1R usando um anticorpo policlonal de camundongo que reconhece o C-terminal do receptor de TRPV1R (Abcam, ab203103) diluído 1:1000 e IgG anti-camundongo Rodamina B de camundongo (AP192R). A seção de controle negativo foi incubada da mesma forma descrita, mas sem o anticorpo primário. As lâminas foram montadas em meio de

montagem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e armazenadas em geladeira.

2.9. Análise de imagem

As imagens de imunofluorescência foram capturadas em um microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados (Olympus BX61VS). Os sinais imunorreativos de CB1R e TRPV1R foram analisados em aumento de 400x conforme descrito anteriormente (**Silva-Cardoso et al., 2021**). Para analisar as imagens de imunofluorescência, foi utilizado o método Integrated Optical Density (IOD). Foram analisadas seis fatias por animal para cada estrutura de interesse, com uma amostra de 6 animais selecionados aleatoriamente por grupo. A intensidade foi analisada usando o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) e o valor médio da densidade integrada (o produto da área e o valor médio de cinza) foi calculado usando o valor médio de 3 regiões de interesse (ROI) selecionados aleatoriamente dentro de cada estrutura de cada animal. Em áreas menores, como CA1, CA3 e GrDG, foram utilizadas 3 ROIs com 2.500 μm^2 , enquanto em BLA, ACC e AIC foram utilizadas 3 ROIs com 10.000 μm^2 .

2.10. Análise estatística

Os dados são representados como média \pm erros padrão. O delta de recuperação obtido nos testes nociceptivos e os resultados do teste de campo aberto foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento). Os resultados dos testes nociceptivos (von Frey, acetona e placa quente) e imunofluorescências foram analisados por ANOVA de duas vias (tratamento e condição), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. As figuras e estatísticas foram preparadas usando o software Prism (versão 8.0, GraphPad Software).

3. Resultados

3.1. Efeitos antialodínicos e anti-hiperalgésicos do tratamento subcrônico com CBD

A sensibilidade somática foi examinada em ratos SHAM e CCI, foi avaliado o limiar mecânico e térmico antes da cirurgia (linha de base), e nos dias 6, 12, 18 após a cirurgia e no dia 24 após três dias de tratamento com CBD ou VEI (Figura 5). ANOVA

bidirecional para medidas repetidas foi aplicada aos dados, e o fator de condição (SHAM vs. CCI), fator de tratamento (VEI vs. CBD) e o fator de interação (condição vs. tratamento) são descritos na Tabela 1.

Teste de nocicepção	Fator Condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs tratamento)	Δ % de recuperação
von Frey	$F_{4, 20} = 776,9$, $P < 0,0001$	$F_{6, 30} = 347,8$, $P < 0,0001$	$F_{24, 120} = 52,21$, $P < 0,0001$	$F_{6, 43} = 54,49$, $P < 0,0001$
Acetona	$F_{4, 20} = 135,2$, $P < 0,0001$	$F_{6, 30} = 150,5$, $P = 0,0191$	$F_{24, 120} = 22,79$, $P < 0,0001$	$F_{6, 45} = 36,82$, $P < 0,0001$
Placa quente	$F_{4, 20} = 215,5$, $P < 0,0001$	$F_{6, 30} = 284$, $P < 0,0001$	$F_{24, 120} = 39,88$, $P < 0,0001$	$F_{6, 45} = 57,51$, $P < 0,0001$

Tabela 1. Dados originais dos testes nociceptivos (von Frey, Acetona e Placa quente) submetidos a ANOVA de duas vias (tratamento e condição), e dados $\Delta\%$ de recuperação submetidos a ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

O tratamento com CBD reverteu a alodínia induzida pelo CCI após três dias de tratamento. Nos animais SHAM, o limiar mecânico não foi modificado durante todo o protocolo (Figura 7A). A análise estatística (Tabela 1) do limiar mecânico para os grupos SHAM e CCI mostrou uma diferença na condição, tratamento e interação entre condição e tratamento. O pós-teste de Tukey revelou uma diferença significativa ($P < 0,05$) nos grupos CCI-CBD (VEI, 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg) comparando o limiar mecânico na linha de base com o limiar mecânico nos dias 6, 12, e 18 (Figura 7A). Após o tratamento com CBD subcrônico (24º dia experimental), o grupo tratado com a dose de CBD 3 mg/kg não apresentou diferença no limiar mecânico quando comparado com sua respectiva linha de base ($P < 0,05$, teste de Tukey), enquanto nos outros grupos, o CBD não restaurou o limiar mecânico à linha de base e a diferença permaneceu (Figura 7A). No entanto, no 24º dia experimental, houve diferença significativa no limiar mecânico dos grupos tratados com CBD quando comparados ao grupo CCI-VEI, sendo que o grupo com 3 mg/kg de CBD diferiu dos demais grupos CCI-CBD (0,3, 10 e 30 mg/kg).

Para a análise do limiar térmico foram utilizados dois testes distintos, o teste da acetona para avaliação da sensibilidade ao frio e o teste da placa quente para avaliação da sensibilidade ao calor. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (Tabela 1)

mostrou uma diferença na condição, tratamento e interação entre o tratamento e condição para os dois testes. A pontuação ou latência nos grupos SHAM não se alterou ao longo do tempo experimental em ambos os testes. O pós-teste de Tukey mostrou que houve redução no escore do teste de acetona em todos os grupos após o CCI em relação ao basal ($P < 0,05$) com os dias 6, 12 e 18 (Figura 7B). A cirurgia também reduziu a latência no teste da placa quente em todos os grupos experimentais em comparação com a linha de base ($P < 0,05$, Figura 7C). No entanto, no 24º dia após o tratamento com CBD, apenas o grupo CCI-VEI apresentou diferença na pontuação ou latência em relação ao seu valor basal ($P < 0,05$, teste de Tukey). Além disso, no 24º dia, todos os grupos CCI-CBD (todas as doses de CBD, 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg) apresentaram pontuações e latências semelhantes às suas respectivas linhas de base, mas diferiram do grupo CCI -VEI ($P < 0,05$, teste de Tukey, Figura 7B, e Figura 7C).

Como análise complementar, avaliamos a porcentagem de recuperação do limiar após tratamento sistêmico subcrônico com CBD (Figura 7 D, E e F) usando os seguintes parâmetros: Δ % de recuperação = (valor do limiar mecânico ou térmico no dia 24 dia experimental – o valor do limiar mecânico ou térmico na linha de base) /100. Esta análise adicional revelou que a dose de 3 mg/kg de CBD apresenta o melhor efeito no teste de von Frey, apresentando a melhor recuperação no limiar mecânico (Figura 7D). A ANOVA uma via mostrou diferenças significativas no Δ % de recuperação no teste de von Frey (Tabela 1). O pós-teste de Tukey evidenciou diferença ($P < 0,05$) quando comparado ao Δ % de recuperação dos grupos CCI-CBD com o grupo CCI-VEI (Figura 7D). O grupo CCI-CBD 3 mg/kg foi diferente dos grupos CCI-CBD 0,3, 10 e 30 mg/kg. No limiar térmico avaliado no teste de acetona e teste da placa quente, a análise estatística indicou diferença significativa (ANOVA uma via), e o pós-teste de Tukey revelou que os grupos CCI-CBD foram diferentes quando comparados ao grupo CCI-VEI ($P < 0,05$, Figura 7E e F).

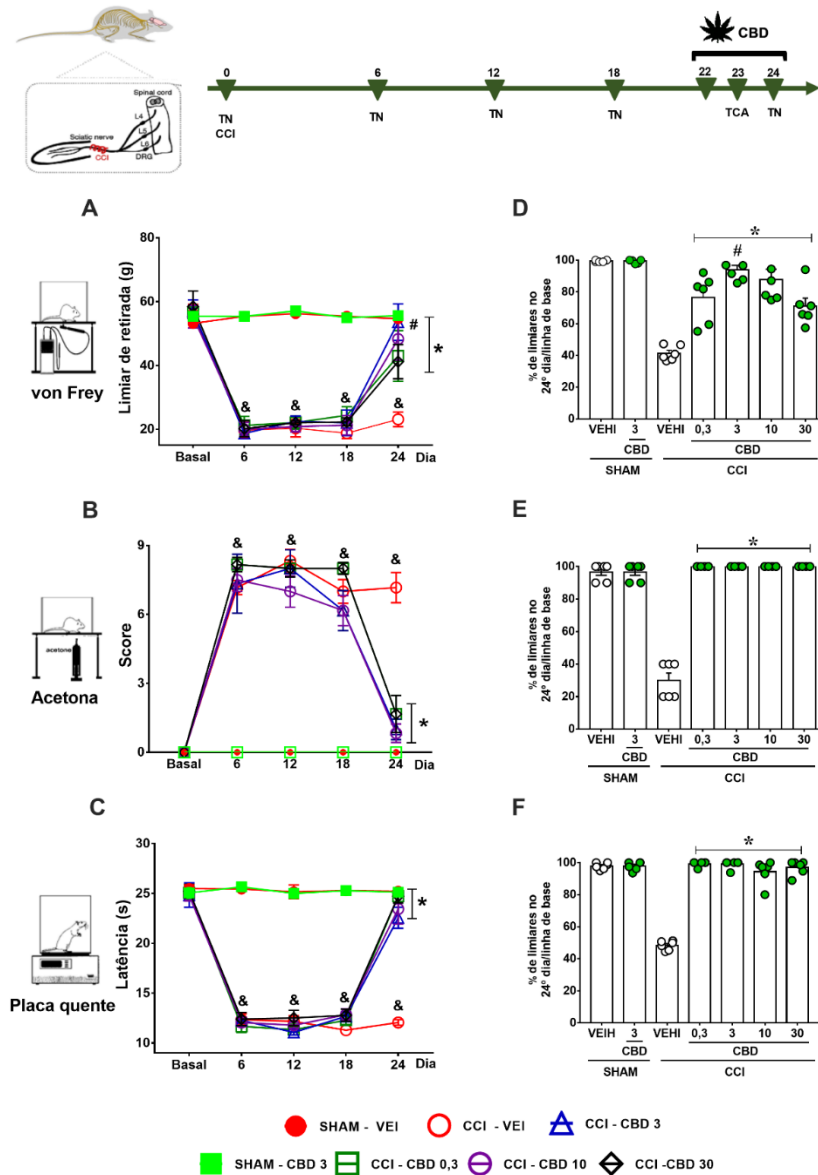


Figura 7. O tratamento subcrônico CBD reverteu o limiar de retirada mecânica, reduz a alodínia térmica e hiperalgesia induzida pelo CCI. Sensibilidade mecânica avaliada pelo teste de von Frey (A), e sensibilidade térmica avaliada nos testes de acetona (C) e placa quente (E). Os limiares mecânicos ou térmicos foram avaliados na linha de base (Basal), após CCI ou SHAM, dias 6, 12 e 18, e após o tratamento com CBD (nas doses 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg/dia, i.p., por três dias, a partir do 22º dia experimental) ou VEI no dia 24. (B, D e F) representam as análises complementares sobre o Δ da porcentagem de recuperação nos testes de von Frey, acetona e placa quente. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao grupo CCI-VEI; # $P < 0,05$ O teste de Tukey comparou o CCI-CBD 3 com outros grupos de CCI-CBD; & $P < 0,05$ teste de Tukey comparado com sua respectiva linha de base. Os dados representam médias \pm erros padrão. $N = 6$ para cada grupo experimental. Δ representa o limiar no 24º - o limiar no 18º/limiar basal. Abreviaturas: TN: testes nociceptivos; TCA: teste de campo aberto; CCI: cirurgia de constrição crônica. Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

3.2. O tratamento subcrônico com CBD promove efeitos ansiolíticos em um modelo de dor CCI

O TCA foi realizado para avaliar os efeitos do CBD no comportamento emocional e na atividade locomotora (Figura 8). Os resultados estatísticos da ANOVA unidirecional são descritos na Tabela 2. Antes de considerar nossos dados de tratamento com CBD, analisamos se nosso modelo de indução de dor crônica modificou a porcentagem (%) de tempo gasto no centro e o número de cruzamentos no TCA. O teste T-Student aplicado mostrou redução da % de tempo gasto no centro no grupo CCI-VEI, quando comparado ao grupo SHAM-VEI ($P < 0,0001$, Figura 6A). Não foram observadas diferenças no número de cruzamentos (Figura 8B).

TCA	
% de tempo no centro	$F_{6,49} = 29,73, P < 0,0001$
Número de cruzamentos	$F_{6,49} = 3,074, P=0,0124$
congelamento	$F_{6,43} = 9,248, P < 0,0001$
Auto-limpeza	$F_{6,43} = 12,56, P < 0,0001$
elevação	$F_{6,44} = 5,352, P = 0,0003$

Tabela 2. Dados originais do TCA submetidos à ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

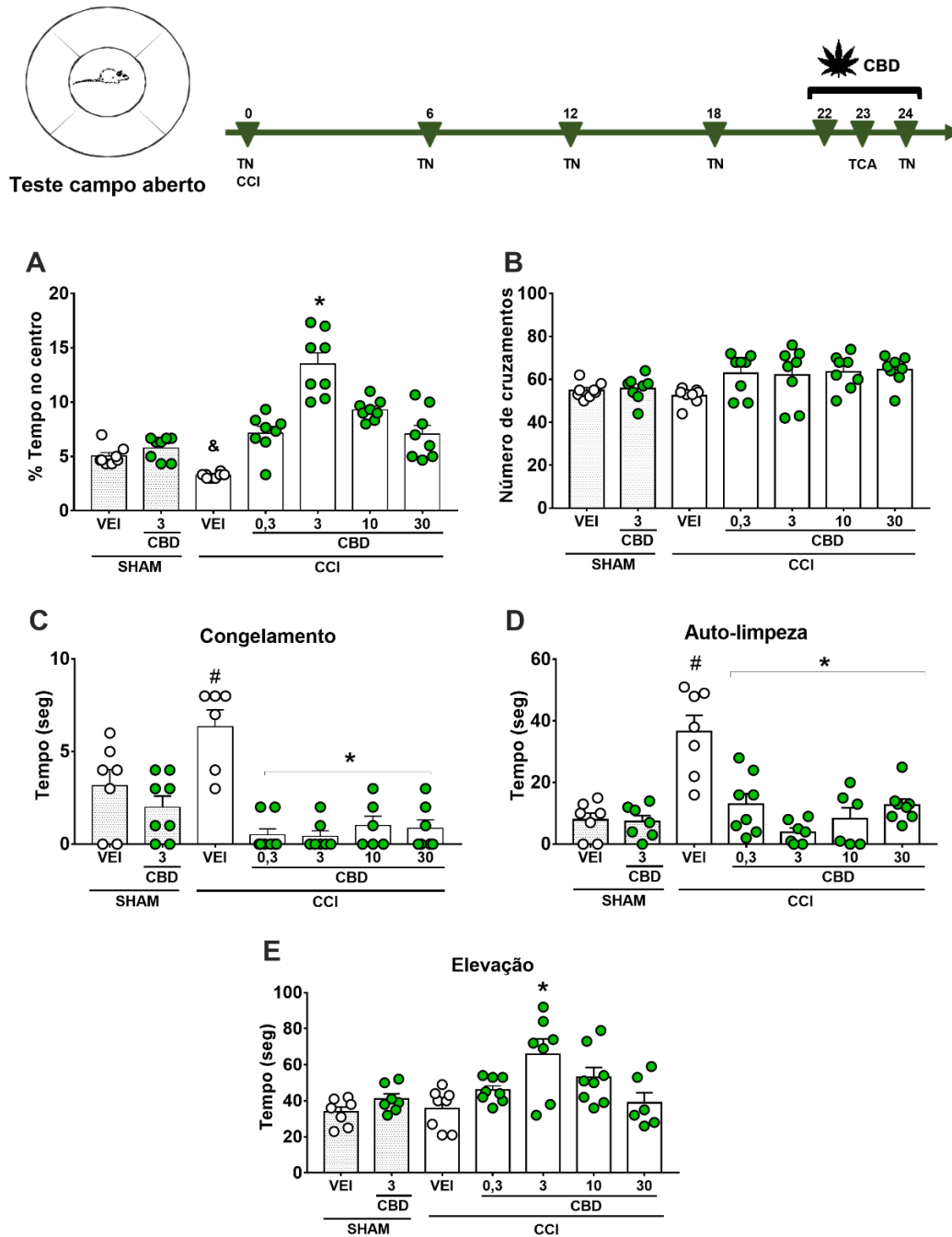


Figura 8. Tratamento subcrônico com CBD preveniu o comportamento ansiosgênico induzido pelo CCI, avaliada no TCA. O as medidas analisadas foram porcentagem (%) de tempo gasto no centro (A), o número total de cruzamentos (B), tempo (s) de congelamento (C), autolimpeza, (D), ou comportamento de elevação (E). O TCA foi realizado durante 5 min, 23 dias após lesão de CCI ou SHAM e após dois dias de tratamento com CBD (nas doses 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg/dia, i.p., a partir do 22º dia experimental) ou VEI. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI; #P < 0,05 teste de Tukey em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. & P < 0,05 teste T-Student comparado ao SHAM-VEI. Os dados representam médias ± erros padrão. N = 6-8 para cada experimental. Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021.**

Em relação aos grupos CCI e SHAM tratados com CBD em diferentes doses ou VEI, a ANOVA de uma via aplicada mostrou diferença na % de tempo gasto no centro TCA. O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI-CBD 3 mg/kg difere dos outros grupos ($P < 0,05$, Figura 8A). O grupo CCI-CBD 10 mg/kg também é diferente quando comparado ao grupo CCI-VEI ($P < 0,05$). Além disso, o número de cruzamentos no TCA não mudou em termos de condição (SHAM ou CCI) ou tratamento (VEI ou CBD) (Figura 8B).

Em relação às medidas complementares (Tabela 2), os resultados evidenciaram que O CCI produziu um aumento no comportamento de congelamento e autolimpeza (grupo CCI-VEI, Figura 8C e D) que foram prevenidos pelo tratamento com CBD em todas as doses. Além disso, o tratamento com CBD reduziu o comportamento de congelamento no grupo SHAM (Figura 8C). A ANOVA de uma via (Tabela 2) evidenciou diferença no comportamento de congelamento. O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI-VEI é diferente dos demais grupos CCI ($P < 0,05$, Figura 8C). Em relação ao comportamento de autolimpeza, ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Tukey mostraram diferenças entre os grupos CCI-VEI e CCI-CBD (0,3, 3, 10 e 30 mg/kg), bem como quando o CCI-VEI foi comparado com SHAM-VEI (Figura 8D). Além disso, não foi observada diferença nos grupos SHAM tratados com VEI ou CBD 3 mg/kg (Figura 8D). Por fim, a ANOVA de uma via aplicada ao comportamento de elevação mostrou diferença entre os grupos (Figura 8E). O pós-teste de Tukey evidenciou aumento do comportamento de elevação no grupo CCI-CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$), quando comparado a todos os grupos experimentais (grupos SHAM e CBD, Figura 8E).

3.3. O tratamento com CBD aumenta os receptores CB1 e TRPV1 em regiões envolvidas na modulação da dor crônica

Neste conjunto de resultados, avaliamos a imunofluorescência de CB1R e receptores TRPV1R no ACC, AIC, BLA, HD e HV no 24º dia experimental nos grupos CCI ou SHAM após CBD tratamento subcrônico (durante três dias, começando no 22º dia experimental) utilizando a dose de 3 mg/kg CBD ou VEI. A Figura 9 mostra as regiões encefálicas analisadas neste protocolo. Descrições estatísticas de ANOVA de duas vias são apresentadas na Tabela 3.

Expressão do receptor CB1			
Região	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs tratamento)
ACC	$F_{1,68} = 355,7, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 1012,0, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 284,2, P < 0,0001$
IAC	$F_{1,68} = 282,2, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 430,9, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 69,85, P < 0,0001$
BLA	$F_{1,68} = 100,5, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 145,3, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 0,754, P = 0,3883$
HD			
CA1	$F_{1,68} = 8,412, P = 0,005$	$F_{1,68} = 296,1, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 0,4129, P = 0,5227$
CA3	$F_{1,68} = 86,3, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 163,1, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 91,17, P < 0,0001$
GrDG	$F_{1,68} = 165,9, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 257,1, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 150,4, P < 0,0001$
HV			
CA1	$F_{1,68} = 381,7, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 66,60, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 44,84, P < 0,0001$
CA3	$F_{1,68} = 86,3, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 163,1, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 91,17, P < 0,0001$
GrDG	$F_{1,68} = 165,9, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 257,1, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 150,4, P < 0,0001$
Expressão do receptor TRPV1			
Região	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs tratamento)
ACC	$F_{1,68} = 1151, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 156,1, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 0,6195, P = 0,4340$
IAC	$F_{1,68} = 1615, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 285,9, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 49,58, P < 0,0001$
BLA	$F_{1,68} = 68,23, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 60,03, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 0,9717, P = 0,3277$
HD			
CA1	$F_{1,68} = 381,7, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 66,6, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 44,84, P < 0,0001$
CA3	$F_{1,68} = 324,5, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 298,4, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 195,8, P < 0,0001$
GrDG	$F_{1,68} = 184,7, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 233,6, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 6,59, P = 0,0125$
HV			
CA1	$F_{1,68} = 38,67, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 115, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 3,618, P = 0,0614$
CA3	$F_{1,68} = 25,97, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 1,222, P = 0,2731$	$F_{1,68} = 0,0037, P = 0,9516$
GrDG	$F_{1,68} = 147,7, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 124,4, P < 0,0001$	$F_{1,68} = 95,97, P < 0,0001$

Tabela 3. Dados originais de Imunofluorescência para receptores CB1 e TRPV1 submetidos a ANOVA duas vias, seguido do teste de Tukey, para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs. condição), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021.**

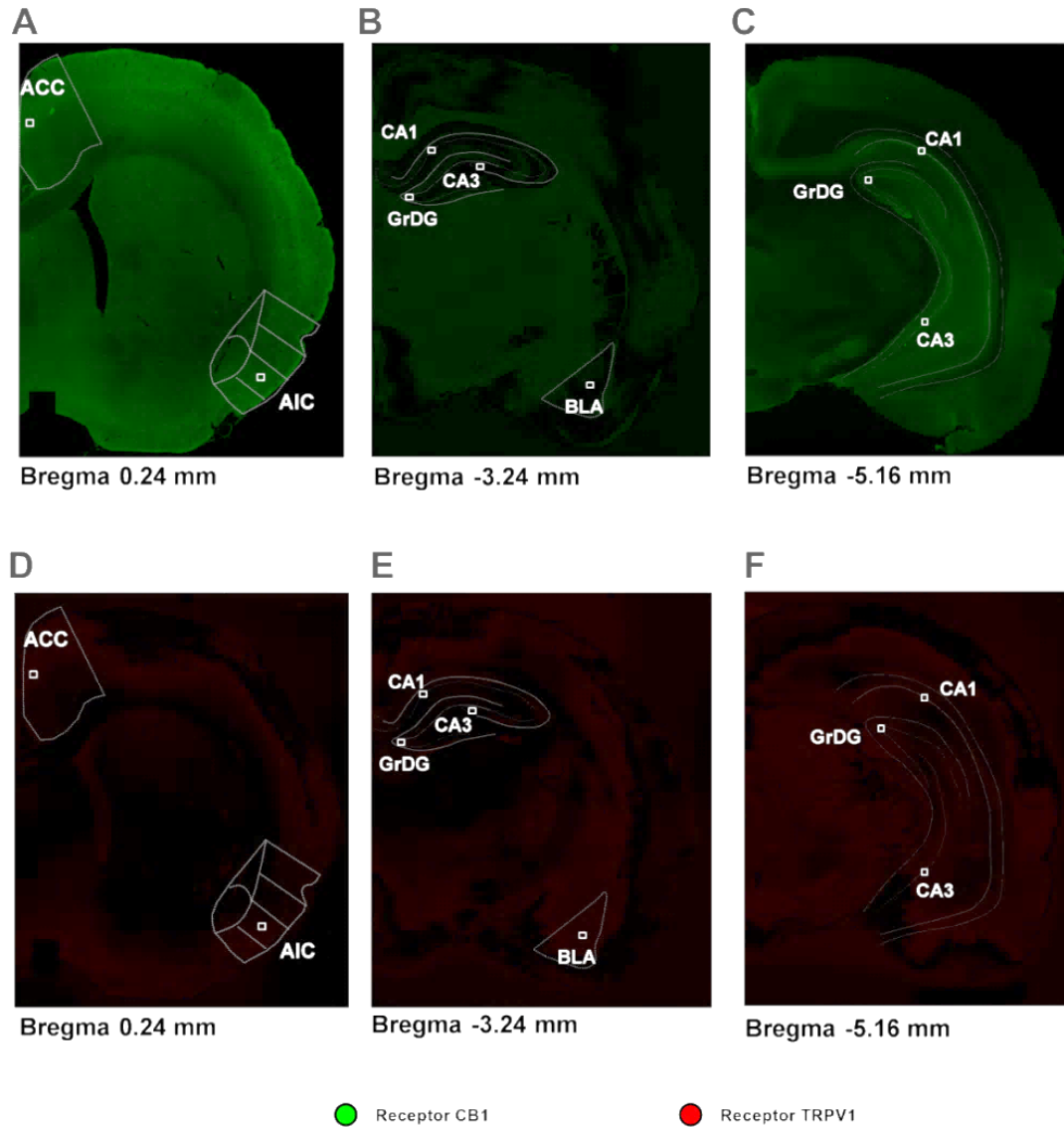


Figura 9. Fotomicrografias representativas mostram áreas analisadas do córtex cingulado anterior (ACC, A e D), córtex insular agranular (AIC, A e D) e amígdala basolateral (BLA, B e E), e CA1, CA3 e giro dentado do dorso (B e E) e hipocampo ventral (C e F) corados para o receptor endocanabinóide 1 (CB1R, AC, verde) ou receptor endovanilóide 1 (TRPV1R, DF, vermelho). Barras de escala = 1mm. Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

3.3.1. Imunorreatividade do receptor CB1

Os ensaios imuno-histoquímicos mostraram que o tratamento com CBD em ratos com dor crônica aumentou a expressão do receptor CB1 no ACC, AIC, BLA, HD e HV (Figura 10, 11 e 12). Além disso, encontramos expressão aumentada de CB1R associada ao fator de dor crônica no AIC, BLA (Figura 10) e no giro denteado do HD (GrDG, Figura 11). Considerando a imunofluorescência do CB1R no ACC e IAC regiões, há diferenças significativas na condição, tratamento e fator de interação ($P < 0,05$). Em relação ao BLA, a ANOVA duas vias mostrou diferença tanto no fator de condição quanto no tratamento; no entanto, não houve evidência de interação entre condição e tratamento (ver Tabela 3).

O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI-CBD aumentou a expressão de CB1R e foi diferente de CCI-VEI e SHAM-CBD ($P < 0,05$, Figura 10B). Além disso, foi observado que o grupo SHAM-CBD apresentou um aumento significativo na expressão de CB1R, quando comparado ao seu respectivo grupo controle SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 10B). No teste post hoc, observou-se aumento da expressão de CB1R no grupo CCI-VEI, quando comparado ao grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 10B) em AIC e BLA. Além disso, a expressão de CB1R foi aumentada no BLA de SHAM-CBD, quando comparado a SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 10B).

Para entender melhor os resultados das regiões do hipocampo, HD e HV foram divididos em três sub-regiões: CA1, CA3 e giro denteado (GrDG). A análise da região CA1 do HD mostrou que o tratamento com CBD promoveu um aumento na imunorreatividade do CB1R. Esse aumento ocorreu em ambas as condições cirúrgicas, SHAM e CCI. No entanto, esse aumento não foi observado nos grupos VEI (Figura 11B). Os resultados da intensidade de imunofluorescência para CB1R em CA1 (do HD) mostraram uma diferença significativa na condição e no tratamento, mas não mostraram uma interação entre a condição e o tratamento (ver Tabela 3). O pós-teste de Tukey revelou que os grupos CCI-CBD e SHAM-CBD diferem de seus respectivos grupos controle CCI-VEI e SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 11B). Em relação à expressão de CB1R na região CA3 e GrDG de HD, a análise estatística mostrou diferença na interação condição, tratamento e condição-tratamento. O pós-teste de Tukey revelou que a expressão de CB1R no grupo CCI-CBD foi diferente quando comparada aos grupos CCI-VEI e SHAM-CBD ($P < 0,05$, Figura 11B). Em CA3 novamente, o grupo SHAM-CBD foi diferente em relação ao grupo SHAM-VEI (Figura 11B). Além disso, a

expressão de CB1R foi aumentada em GrDG no grupo CCI-VEI, quando comparado ao seu respectivo grupo controle SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 11B).

A análise da intensidade de imunofluorescência para CB1R no HV, a região CA1, CA3 e GrDG mostraram uma diferença na condição, tratamento e interação condição-tratamento (Tabela 3). O pós-teste de Tukey em CA1 revelou expressão aumentada de CB1R em CCI-CBD e SHAM-CBD, quando comparados aos seus respectivos grupos controle (CCI-VEI e SHAM-VEI, $P < 0,05$, teste de Tukey, Figura 12B). Além disso, o grupo CCI-CBD foi diferente do grupo SHAM-CBD ($P < 0,05$, teste de Tukey, Figura 12B). Na região CA3 (do HV), apesar do aumento da expressão de CB1R no grupo CCI-CBD, essa alteração não foi observada no SHAM-CBD (Figura 12B). O pós-teste de Tukey mostrou que a expressão de CB1R em CCI-CBD foi diferente, quando comparada a CCI-VEI e SHAM-CBD ($P < 0,05$, Figura 12B). Na região do GrDG, o tratamento com CBD também aumentou a expressão de CB1R no grupo CCI (Figura 12B). O pós-teste de Tukey revelou que a imunorreatividade CB1R no grupo CCI-CBD diferiu ($P < 0,05$) dos grupos CCI-VEI e SHAM-CBD (Figura 12B).

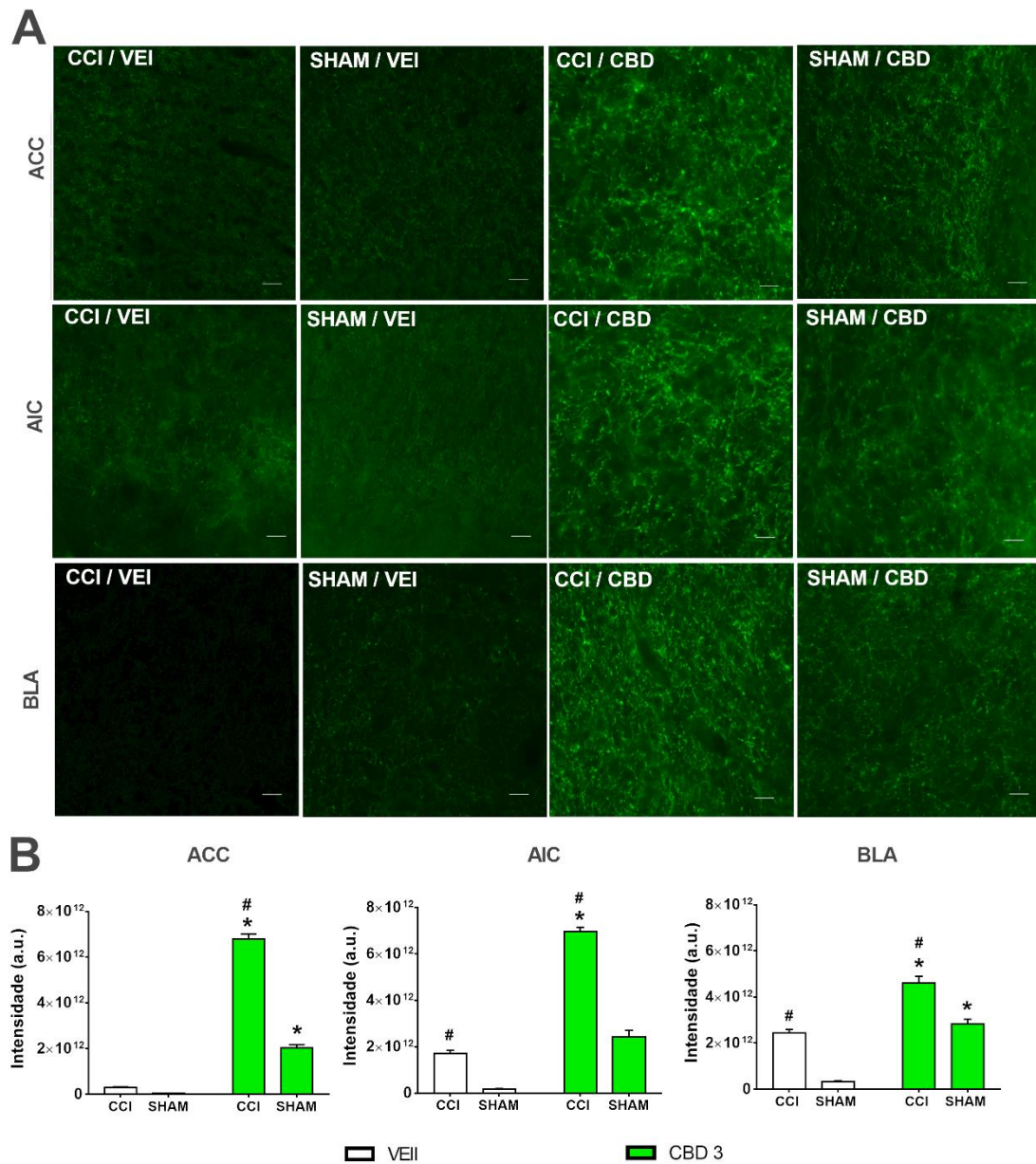


Figura 10. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endocanabinóide 1 (CB1R, verde) no ACC, AIC e BLA no 24º dia experimental. (B) CB1R é mais expresso após tratamento subcrônico (três dias, começando no 22º dia experimental) com CBD (3 mg/kg, i.p.) em ratos com dor crônica induzida por CCI ou SHAM, quando comparados aos grupos tratados com VEI. * $P < 0,05$ teste de Tukey em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. $N = 6$ por grupo. Barras de escala = 200 μm . Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

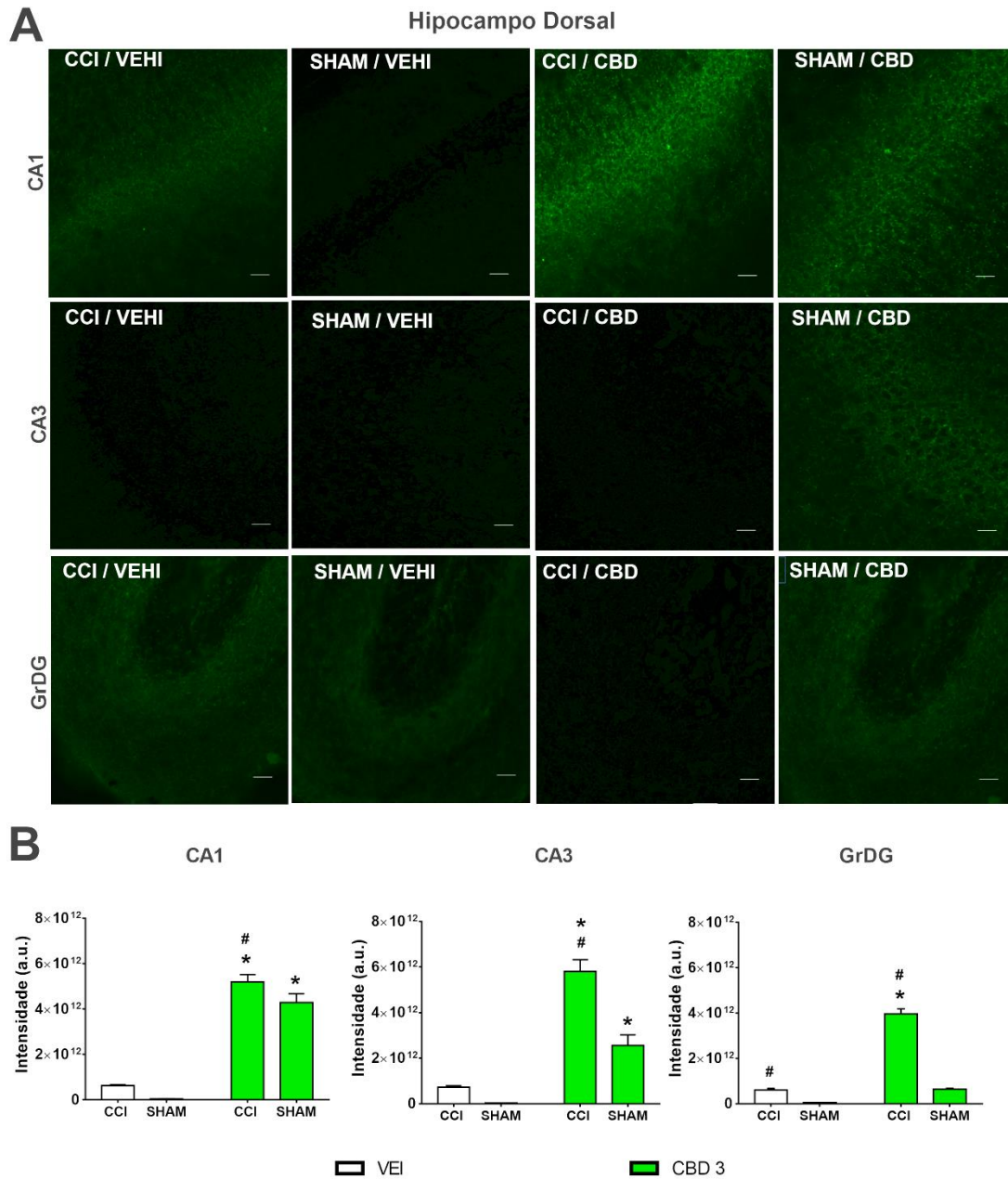


Figura 11. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endocanabinóide 1 (CB1R, verde) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HD no 24º dia experimental. (B) CB1 tem uma expressão aumentada após tratamento subcrônico (três dias, iniciando no 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) em ratos com dor crônica induzida por CCI ou SHAM, quando comparados com grupos tratados com VEH. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao SHAM-VEH ou CCI-VEH. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEH ou SHAM-CBD. $N = 6$ por grupo. Barras de escala = 200 μm . Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

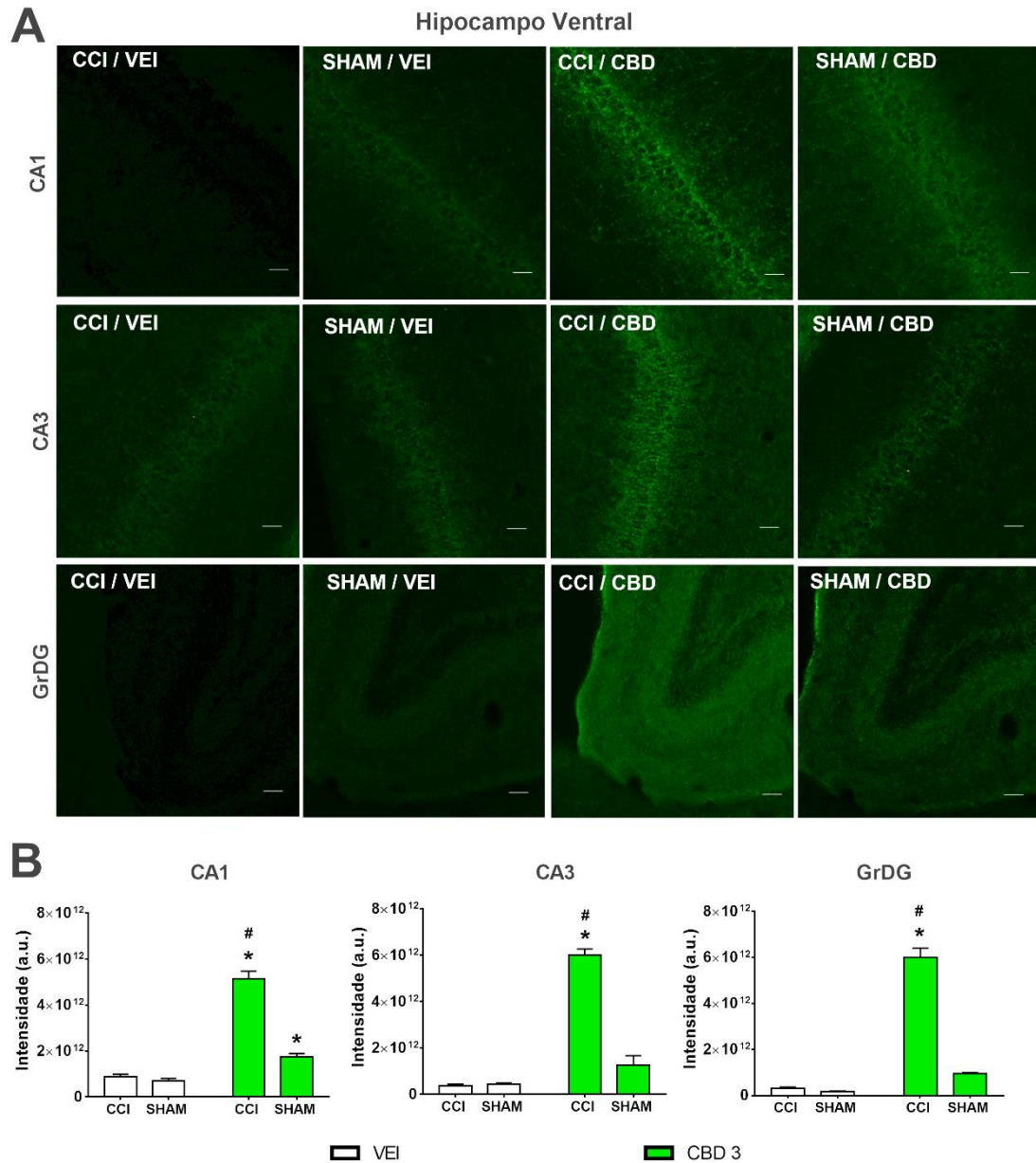


Figura 12. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endocanabinóide 1 (CB1R, verde) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HV no 24º dia experimental. (B) CB1R tem uma expressão aumentada após tratamento subcrônico (três dias, iniciando no 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) em ratos com dor crônica induzida por CCI ou SHAM, quando comparados aos grupos tratados com VEI. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. $N = 6$ por grupo. Barras de escala = 200 μm . Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

3.3.2. Expressão do receptor TRPV1

Ensaios imuno-histoquímicos mostraram que o tratamento com CBD em ratos com dor crônica aumenta a expressão dos receptores TRPV1 (TRPV1R) (grupos CCI) das regiões analisadas. A condição cirúrgica per se promoveu aumento do TRPV1R nas regiões ACC, AIC, BLA, HD e HV (Figura 11, 12 e 13).

Considerando o TRPV1R no ACC e no BLA, ANOVA de duas vias mostrou diferença na condição e tratamento, mas não houve interação entre condição e tratamento (ver Tabela 3). No AIC, a análise estatística mostrou uma diferença significativa na condição, tratamento e interação entre a condição e o tratamento. No entanto, nas três regiões, o grupo CCI-CBD diferiu dos grupos CCI-VEI e SHAM-CBD ($P < 0,05$, teste de Tukey, Figura 13B). Os grupos CCI-VEI e SHAM-CBD foram diferentes em comparação com o grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, teste de Tukey, Figura 13B).

Considerando as regiões HD, a aplicação da ANOVA de duas vias (Tabela 3) na análise da intensidade da imunofluorescência de TRPV1R em CA1, CA3 e GrDG mostrou uma diferença na condição, fator de tratamento e interação entre a condição e o tratamento. O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI-CBD foi diferente dos grupos CCI-VEI e SHAM-CBD ($P < 0,05$, Figura 14B). O grupo CCI-VEI diferiu do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 12B). Além disso, no GrDG, o grupo SHAM-CBD diferiu do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 14B).

Em relação à região HV, ANOVA de duas vias (Tabela 3) aplicada à intensidade da imunofluorescência do TRPV1R em CA1 e CA3 mostrou diferença tanto na condição quanto no tratamento; no entanto, não houve interação entre condição e tratamento. A ANOVA de duas vias aplicada à expressão de TRPV1R no GrDG mostrou diferença na condição, tratamento e interação entre condição e tratamento. O pós-teste de Tukey em CA1 e GrDG revelou que o grupo CCI-CBD era diferente dos grupos CCI-VEI e SHAM-CBD ($P < 0,05$, Figura 15B). No CA1, o grupo CCI-VEI também foi diferente do SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 15B). O pós-teste de Tukey em CA3 mostrou que os grupos CCI-CBD e CCI-VEI diferiram do respectivo controle.

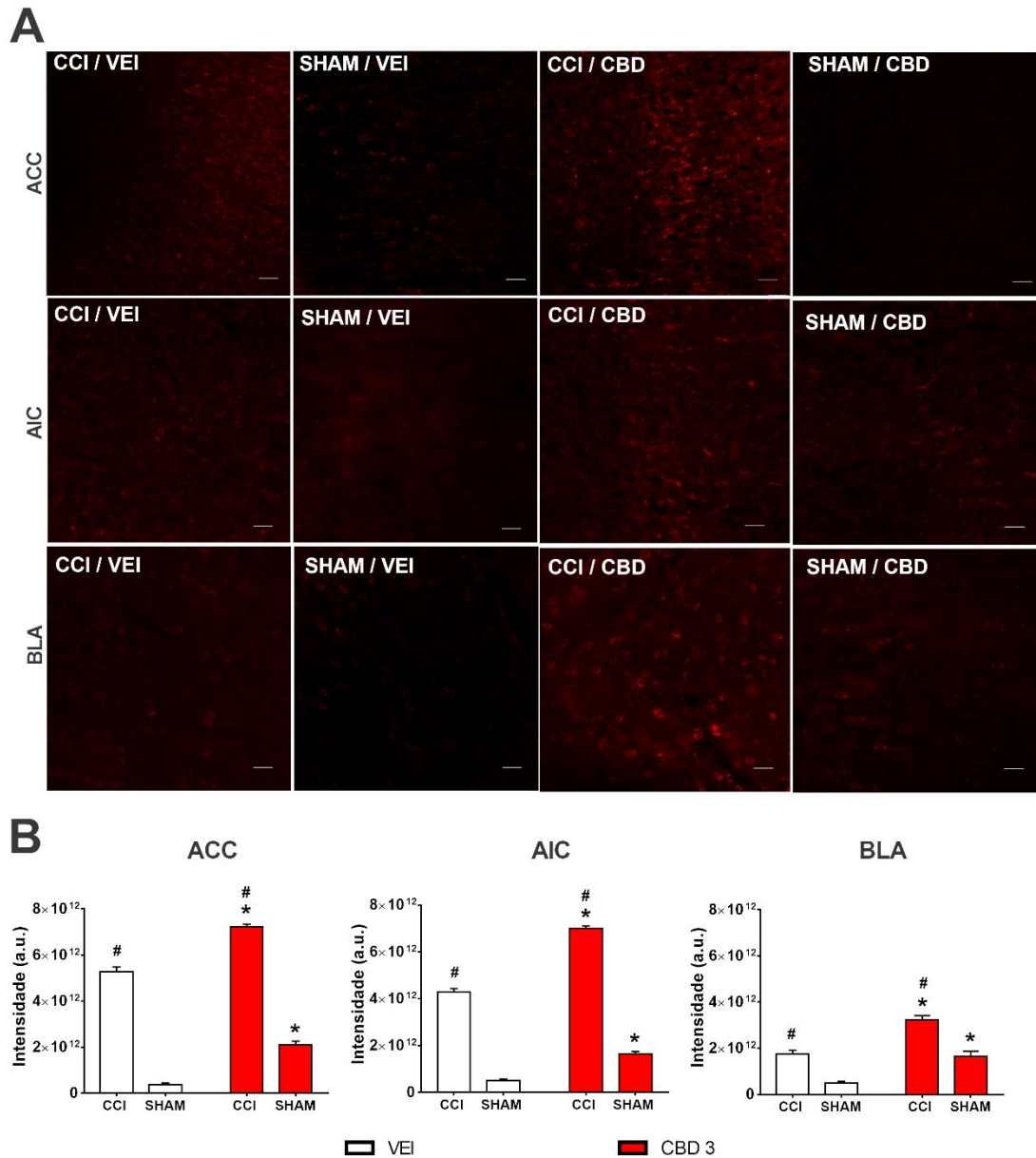


Figura 13. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endovanilóide 1 (TRPV1R, vermelho) no ACC, AIC e BLA no 24º dia experimental. (B) O tratamento subcrônico (três dias, a partir do 22º dia experimental) com CBD (3 mg/kg, i.p.) e a dor crônica induzida por CCI promoveram aumento da expressão do receptor TRPV1, quando comparado ao tratamento com VEI e SHAM. * $P < 0,05$ teste de Tukey em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. $N = 6$ por grupo. Barras de escala = 200 μm . Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

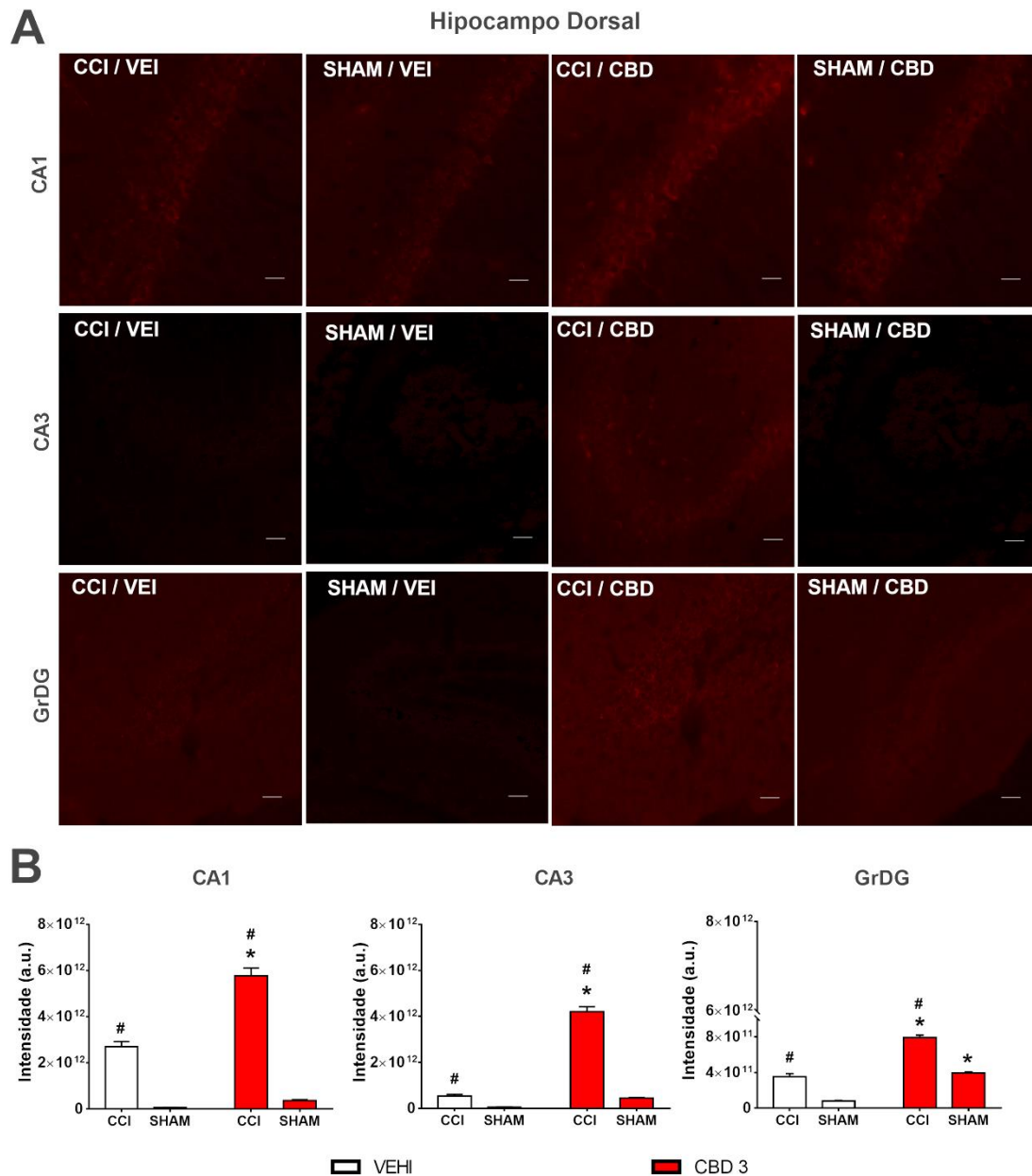


Figura 14. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endovanilóide 1 (TRPV1R, vermelho) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HD no 24º dia experimental. (B) O tratamento subcrônico (três dias, a partir do 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) e a dor crônica induzida por CCI promoveram aumento do TRPV1 expressão do receptor, quando comparado ao tratamento com VEH e animais SHAM. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. $N = 6$ por grupo. Barras de escala = 200 μm . Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

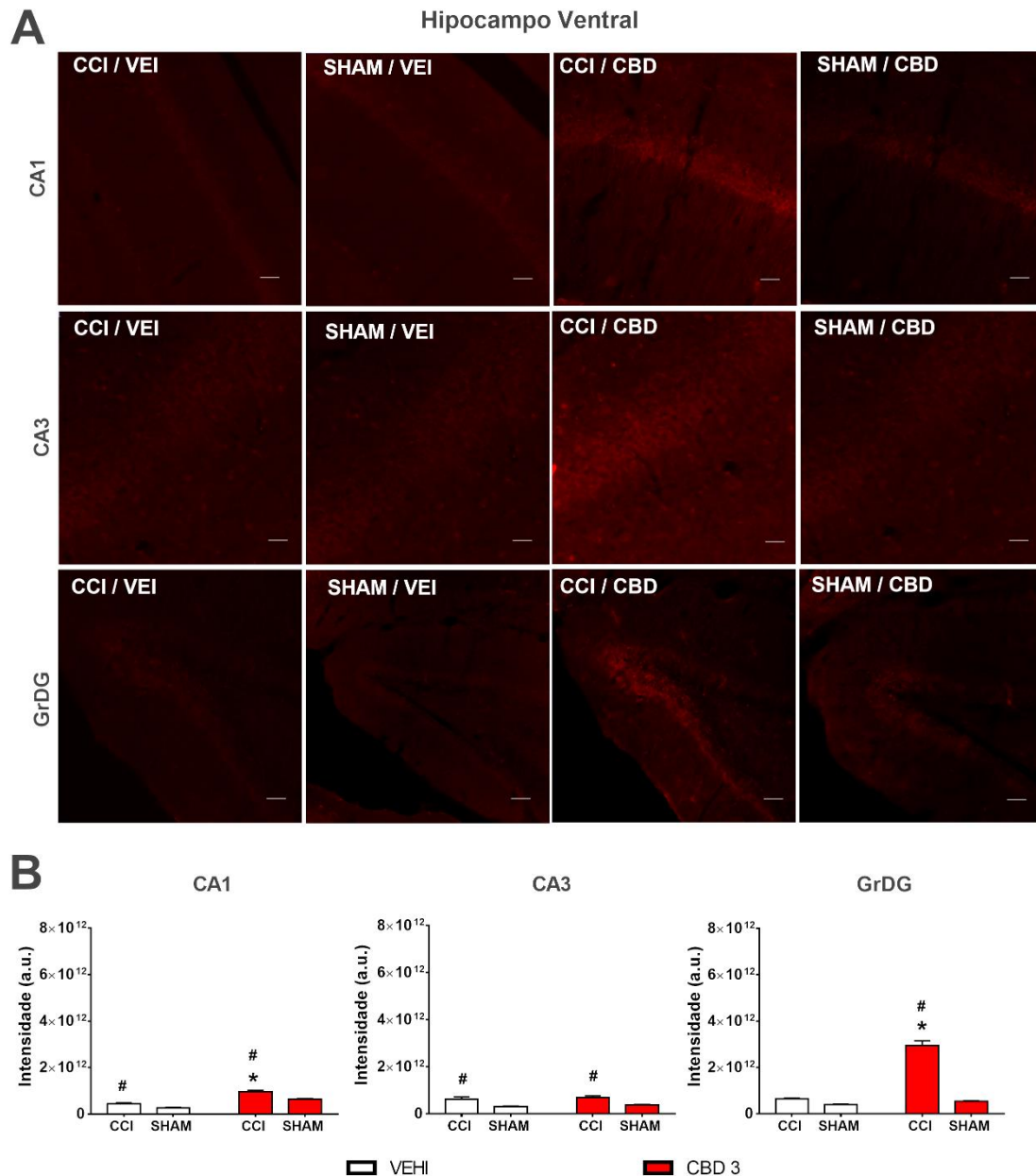


Figura 15. (A) Coloração de imunofluorescência para o receptor endovanilóide 1 (TRPV1R, vermelho) nas regiões CA1, CA3 e GrDG do HV no 24º dia experimental. (B) O tratamento subcrônico (três dias, a partir do 21º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) e a dor crônica induzida por CCI promoveram aumento do receptor TRPV1 expressão, quando comparado ao tratamento com VEH e SHAM. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou SHAM-CBD. $N = 6$ por grupo. Barras de escala = 200 μ m. Adaptado de **Silva-Cardoso et al., 2021**.

7. Discussão

Os resultados do presente estudo mostram que o tratamento subcrônico com CBD reverte a alodínia mecânica e térmica (frio), hiperalgesia e o efeito ansiogênico em um modelo de dor persistente induzida por constrição do nervo ciático em ratos. Embora a neuropatia periférica tenha promovido per se, em algumas regiões (ACC, AIC, BLA e HD), o aumento dos receptores CB1 e TRPV1, o tratamento com CBD potencializou esse efeito nas regiões ACC, AIC, BLA e HD e HV.

Em relação ao uso de CBD no tratamento da dor, estudos anteriores demonstraram a eficácia do tratamento crônico ou subcrônico em baixas doses de CBD em outros modelos de dor, como no modelo de dor pós-operatória, onde o tratamento reduziu a alodínia mecânica em ratos (**Genaro et al., 2017**). Assim como Costa e cols. (**2007**), utilizando um modelo animal de dor neuropática induzida por CCI, demonstrou que a administração oral diária de 20 mg/kg de CBD, por sete dias, reduziu a alteração do limiar mecânico e a hiperalgesia, quando comparada à administração aguda, que não apresentou eficácia. Além disso, um tratamento semelhante (7 dias, CBD 20 mg/kg, administração oral) proporcionou alívio duradouro da alodínia, em um modelo de camundongo com dor neuropática crônica (**Abraham et al., 2020**). No entanto, embora vários estudos descrevam suas doses como baixas, há uma variabilidade significativa, de 20 mg/kg a 5 mg/kg (**Costa et al., 2007; De Gregorio et al., 2019; Genaro et al., 2017; Jesus et al., 2019**). Aqui, realizamos uma curva dose-resposta, usando um intervalo baseado em um relatório anterior (**Costa et al., 2007; De Gregorio et al., 2019; Dias et al., 2013; Genaro et al., 2017; Guimarães et al. al., 1990**) em um modelo CCI.

Nossos resultados corroboram as evidências que demonstram o uso do CBD como ferramenta no tratamento da dor, destacando a dor persistente. Nossos resultados demonstram que a dose de 3 mg/kg de CBD apresenta o melhor efeito no limiar mecânico, com recuperação de 96% no teste de von Frey (Figura 7B). Ademais, o CBD tem efeito ansiolítico em ratos, com curva dose-resposta caracterizada como U ou sino invertido (**Guimaraes et al., 1990**). Esse efeito pode ser observado em nossos resultados considerando as doses de 0,3, 3, 10 e 30 mg/kg de CBD utilizadas.

Vale ressaltar que estudos anteriores que utilizaram tratamento agudo ou crônico (por 14 dias) com CBD demonstraram que o efeito antinociceptivo do CBD não foi alterado pelo pré-tratamento com antagonistas dos receptores CB1 ou CB2 (**Jesus et al.,**

2019); no entanto, o bloqueio do TRPV1R impediu o efeito antialodínico do CBD em um modelo de lesão nervosa poupada (De Gregorio et al., 2019). Devido a esses estudos anteriores com antagonistas de receptores CB1 e TRPV1, optamos por avaliar a expressão desses receptores em áreas límbicas e corticais para entender melhor os efeitos combinados do CBD em termos de efeitos antialodínicos e ansiolíticos.

É importante enfatizar que o CBD pode modular o comportamento emocional sem promover alterações na atividade motora (Britch et al., 2017; Casey et al., 2017; Komaki et al., 2015). No modelo de dor crônica induzida por CCI, não há déficits de atividade locomotora (Jesus et al., 2019; De Gregorio et al., 2019). Os presentes resultados mostram que os grupos CCI têm uma atividade locomotora semelhante aos grupos SHAM (tratados com CBD ou VEI) isso corrobora os resultados anteriores em um modelo de dor neuropática, onde não há alterações na atividade locomotora, nem alterações devido ao tratamento com CBD. Além disso, nossos resultados indicam que o tratamento com CBD nas doses de 3 e 10 mg/kg promoveu efeito ansiolítico em ratos com lesões neuropáticas e este efeito não foi observado em animais SHAM.

Nossos achados nas medidas complementares do TCA, como a redução do comportamento de autolimpeza e de congelamento, associado ao aumento do comportamento de elevação induzidos pelo tratamento com CBD, nos permite também inferir uma possível modulação da resposta nocifensiva e do comportamento exploratório nestes animais (Okamoto et al., 2004 e Han et al., 2015).

Algumas evidências (Almeida e Devi, 2020; Tham et al., 2019) sugerem que os efeitos do CBD podem ser por um mecanismo indireto (ou seja, não devido à interação direta com o local de ligação ao receptor CB1 ortostérico). Nesta hipótese, o CBD atua no CB1R e desencadeia uma modulação alostérica negativa, relatada em estudos in vitro (Britch et al., 2020; Laprairie et al., 2015). Nesse cenário, o tratamento sistêmico com AM251, agonista inverso do CB1R, bloqueou os efeitos do CBD na extinção e reconsolidação do medo condicionado e no comportamento de enterrar mármore (modelo de comportamento compulsivo) em ratos (Campos et al., 2016).

Estudos anteriores já discutem que a dor crônica atua como um estressor inescapável de longo prazo (Duric e McCarron, 2006). Além disso, a diminuição da plasticidade sináptica hipocampal e a neurogênese são observadas em modelos animais de dor crônica (Mutso et al., 2013), contribuindo para a diminuição da conectividade sináptica. Anatomicamente, o HD, o BLA e o ACC – integram um circuito neural envolvido na codificação e consolidação da memória, bem como uma rede que

desempenha um papel nos aspectos emocionais da dor (**LeDoux, 2003; Mutso et al., 2013, 2012**). Devido aos resultados positivos com a dose de 3 mg/kg em nosso estudo e seguindo o princípio da menor dose farmacológica administrada (**Sharma e McNeill, 2009**), realizamos estudos imuno-histoquímicos nessas estruturas, com foco nessa dose específica.

Nossos dados revelaram aumento na expressão de CB1R e TRPV1R (regiões ACC, AIC, BLA e HD e HV) nos grupos CCI tratados ou não com CBD, observamos que o tratamento com CBD potencializou esse aumento. É possível levantar a hipótese de que esses receptores podem estar associados ao estabelecimento da cronicidade da dor. Um estudo anterior sugeriu que a regulação positiva do TRPV1R contribui para a hipersensibilidade visceral, aumentando a excitação BLA (**Xiao et al., 2016**). Além disso, após a CCI, estímulos inócuos levam a alterações perceptivas disfuncionais associadas à dor neuropática, e um conjunto neural distinto foi identificado no BLA que codifica a valência afetiva negativa da dor (**Corder et al., 2019**). Nesse contexto, o BLA contribui com aspectos afetivo-motivacionais para as entradas sensoriais e transmite essas informações processadas para o núcleo central da amígdala e áreas corticais como ACC e AIC (**Thompson e Neugebauer, 2017**).

Vale ressaltar que o CB1R está majoritariamente localizado pré-sinápticamente (**Ghonghadze et al., 2020; Katona et al., 2001; Kendall e Yudowski, 2017; Cramer et al., 2021**), e quando ativado, este receptor inibe a via nociceptiva de entrada na BLA, reduzindo a excitabilidade nessa região. Além disso, a BLA possui projeções inibitórias para o núcleo central da amígdala, que por sua vez envia projeções para áreas corticais (**Seno et al., 2018**). Assim, é possível sugerir que o tratamento subcrônico sistêmico com baixas doses de CBD promoveu ativação do CB1R no BLA, alterando o tônus do circuito ACC-AIC-BLA, revertendo alodínia mecânica, hiperalgesia e comportamento ansioso.

É importante notar que a BLA tem conexão recíproca com o HV (**Canteras e Swanson, 1992; Herry et al., 2008**). Estudos funcionais sugeriram que o HV desempenha um papel significativo no processamento emocional, particularmente no medo e na ansiedade (**Bannerman et al., 2003; Pothuizen et al., 2004**), e atua como um fornecedor significativo de informações contextuais para o BLA, que interagem com regiões corticais (como ACC e AIC) durante a consolidação da memória (**Herry et al., 2008; Huff et al., 2016; Pothuizen et al., 2004**). Além disso, o BLA também regula a atividade neuronal do hipocampo, plasticidade sináptica e funções de memória (**Wang**

et al., 2017). Assim, a dor crônica pode ser vista como a persistência da memória da dor e/ou a incapacidade de extinguir as memórias dolorosas (**McCarberg e Peppin, 2019**).

Em relação ao hipocampo, observamos aumento na expressão de CB1R e TRPV1R nas regiões HD e HV em animais CCI tratados ou não com CBD (HD, grupo SHAM com menor intensidade). Curiosamente já foi observado que pacientes com dor crônica apresentam maior conectividade no hipocampo, o que tem sido associado ao aprendizado aversivo. Os autores argumentam que essa característica pode contribuir para o aumento da ansiedade observado nesses pacientes (**Gore et al., 2012; Phillips e LeDoux, 1992; Ryan et al., 2007**).

Na dor crônica, alterações estruturais e funcionais cerebrais e estados afetivos negativos estão associados a alterações em áreas centrais, como o circuito corticolímbico (**Yang e Chang, 2019**). A cronificação da dor pode ser conceituada como plasticidade induzida pela atividade do circuito límbico-cortical, resultando na reorganização do neocórtex (**McCarberg e Peppin, 2019**). Juntos, nossos resultados melhoram o conhecimento dos neurocircuitos envolvidos na modulação da dor persistente, incluindo alterações no CB1R e TRPV1R no ACC-AIC-BLA e no hipocampo (HV e HD), possivelmente desempenhando um papel no componente afetivo-motivacional da dor.

O presente estudo traz como novidade uma curva dose-resposta mostrando que o tratamento subcrônico (3 dias) com CBD promoveu efeitos antialodínicos, anti-hiperalgésicos e ansiolíticos em um modelo de dor neuropática e modulou a expressão de CB1R e TRPV1R em estruturas corticais e límbicas. Além disso, podemos sugerir que o tratamento com CBD promove diferentes modulações dependendo da condição patológica ou não dos animais. Embora nosso trabalho seja um dos primeiros a utilizar o modelo CCI e demonstrar essas alterações neuroplásticas dos receptores CB1 e TRPV1, ainda é complexo entender os efeitos do grupo CCI-CBD na relação desses receptores com a modulação da dor crônica. Acreditamos que mais estudos com manipulações farmacológicas diretas sejam necessários para entender melhor essa modulação.

Assim, o presente estudo destaca a importância de uma curva dose-resposta para entender melhor os efeitos de baixas doses (3 mg/kg), sobre os efeitos antialodínicos, anti-hiperalgésicos e ansiolíticos do CBD, em um tratamento subcrônico para dor crônica (modelo CCI). Em resumo, baixas doses de CBD foram capazes de (1) reverter alodínia mecânica e térmica (frio), hiperalgesia, (2) reverter comportamentos ansiosos induzidos por dor crônica e (3) adicionar evidências substanciais ao papel do

neurocircuito corticolímbico ACC- AIC-BLA, HV-BLA e HD-BLA para regulação da dor, por meio do rastreo da imunorreatividade de CB1R e TRPV1R em regiões corticais e límbicas, ligadas à percepção e processamento da dor. Esses resultados são clinicamente relevantes, pois contribuem para a evidência dos efeitos benéficos do CBD no tratamento da dor crônica e comorbidades associadas, como ansiedade.

Capítulo III

Canabidiol na dor neuropática: modulação do comportamento de aversão à dor, atenuação de marcadores de neuroinflamação e atividade neuronal crônica no circuito corticolímbico



Este capítulo da tese é uma adaptação do manuscrito em submissão na *Experimental Neurology*, intitulado “*Cannabidiol in neuropathic pain: modulation of pain aversion behavior, attenuation of neuroinflammation markers and chronic neuronal activity in the corticolimbic circuit*”.

1. Contextualização

Os circuitos neuronais que modulam a dor podem aumentar ou diminuir a sensibilidade dolorosa com base em vários fatores, incluindo contexto, estresse, expectativa e outros. O papel desses circuitos em circunstâncias de motivações concorrentes, como recompensa e ameaça, levou à formulação do modelo de decisão motivacional da dor (Fields, 2000; Melzack e Casey, 2015; Melzack e Wall, 1965). A presença de dor crônica em animais sem a necessidade de um estímulo evocado do experimentador foi demonstrada usando o paradigma de aprendizado de preferência condicionada por lugar (CPP) que se baseia nas qualidades afetivas e motivacionais da dor (Genaro et al., 2017; King et al., 2009; Wu et al., 2017). Como a dor crônica fornece um impulso motivacional constante para buscar alívio, a preferência por um contexto associado ao alívio da dor pode ser usada como medida de aversão à dor (Navratilova et al., 2013). Portanto, o alívio da aversão à dor foi considerado um reforço negativo que pode ser avaliado pelo paradigma de CPP (King et al., 2009; Navratilova et al., 2013, 2012). Além disso, os tratamentos clinicamente eficazes contra a dor contínua em humanos são eficazes no paradigma CPP e o inverso também é verdadeiro, fornecendo suporte para essa abordagem experimental (Porreca e Navratilova, 2017).

As emoções são processadas principalmente por áreas cerebrais como tálamo, amígdala (AMG) e ACC (Melzack e Katz, 2013; Tracey, 2010). O ACC se conecta ao circuito mesolímbico de avaliação/decisão, que integra múltiplas informações e seleciona a resposta comportamental que oferece maior benefício ao organismo (Cai et al., 2018; Thompson e Neugebauer, 2019). Ademais, a mudança motivacional tônica de longo prazo pode resultar em mudanças adaptativas dependentes do tempo nos circuitos motivacionais, contribuindo para a cronicidade da dor (Apkarian, 2011).

A sobreposição de circuitos neurais para dor e recompensa se estende em níveis anatômico e funcionalmente interconectados, como demonstrado por estudos de neuroimagem humana que identificaram várias regiões do encéfalo, incluindo ACC e AMG, implicadas na percepção da dor e no processamento de recompensa (Leknes et

al., 2008; Leknes e Tracey, 2008). O sistema corticolímbico, incluindo estruturas como AMG, HD e ACC, é um circuito chave associado a dor persistente, resposta ao estresse endócrino, ansiedade, aprendizado e modulação da aversão (Timmers et al., 2019). O ACC foi previamente implicado na codificação das características aversivas da dor (Vogt, 2005, 1996). Além disso, as atividades neurais do ACC foram correlacionadas com intensidades nocivas, e a modulação optogenética desses neurônios mostrou o controle bidirecional da resposta aversiva à dor aguda (Sikes e Vogt, 1992; Zhang et al., 2017).

A AMG desempenha um papel importante nos aspectos emocionais-afetivos dos comportamentos, incluindo vício, comportamentos do tipo ansiedade e depressão e modulação da dor (Neugebauer et al., 2020; Thompson e Neugebauer, 2019). Os circuitos relevantes para as funções relacionadas à dor incluem o BLA e o núcleo central (CeA) (Han e Neugebauer, 2004; Thompson e Neugebauer, 2017). A hiperatividade neuronal do BLA na dor resulta em inibição do *feedforward* (controle antecipatório) anormalmente aumentada das células piramidais corticais pré-frontais mediais, resultando em déficits cognitivos em uma tarefa de tomada de decisão (Neugebauer et al., 2020).

Nesse cenário, o CBD tem se mostrado uma opção para modular aspectos sensoriais e emocionais no tratamento da dor crônica (De Gregorio et al., 2019; Genaro et al., 2017; Silva-Cardoso et al., 2021). Notavelmente, as condições de dor persistente são frequentemente acompanhadas por distúrbios emocionais e cognitivos. Essas mudanças disfuncionais ou mal adaptativas nos circuitos aversivos/motivacionais provavelmente contribuem para os desafios do tratamento da dor crônica.

Atualmente, pouco se sabe sobre os mecanismos e circuitos neurais que medeiam a aversão à dor, e uma compreensão mais profunda da base neural da nocicepção e seu componente aversivo poderia não apenas ampliar nossa visão da dor, mas também abrir novas abordagens para o tratamento da dor crônica. Portanto, neste estudo, nosso objetivo foi investigar se o tratamento com diferentes doses de CBD (0,3, 3 e 10 mg/kg) em animais submetidos ao modelo CCI (Silva-Cardoso et al., 2021) poderia modular os componentes motivacionais e aversivos da dor crônica no teste CPP e no TCA. Adicionalmente, foi investigado as alterações neuroplásticas em regiões de interesse do circuito corticolímbico (ACC, BLA e HD). Também foi avaliado a atividade neuronal crônica (neurônios FosB+), a densidade neuronal (neurônios NeuN+), a expressão de

microglia ativada (GFAP e IBA-1), e as citocinas pró-inflamatórias (IL-1b e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10).

2. Material e métodos

2.1. Animais

Os experimentos foram realizados em 80 ratos *Wistar* machos (± 250 g com 8 semanas de idade) obtidos do biotério da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Todos os animais foram mantidos em gaiolas domiciliares (4 ratos/gaiola) de polipropileno 35 x 19 x 25 cm forradas com maravalha, em ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e água e ração ad libitum. O mesmo experimentador realizou a avaliação comportamental, os grupos foram organizados aleatoriamente e foi realizado o análises as “cegas” pelo experimentador (no tratamento ou na condição) por meio de um sistema de marcação de cores e números na cauda dos animais (código individual). Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil e receberam a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto, protocolo número 2018.1.103.58.5 (Apêndice C). Todos os cuidados foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e utilizar o menor número de animais possível.

Os animais foram divididos em coortes nos testes comportamentais, para respeitar a faixa de melhor efeito da droga, para que todos os testes fossem realizados seguindo o mesmo critério. Os testes de von Frey, acetona e placa quente foram realizados entre as 9h. e 13h, com intervalo de 10 minutos entre os testes. O teste TCA foi realizado entre 11h e 13h, com habituação de 60 minutos na sala antes do teste, a intensidade luminosa foi medida no centro do aparato (60 luxes) e os testes foram gravados, armazenados, para análise posterior. Em todas as sessões de teste, o aparato foi limpo com álcool 20% antes dos testes, e os animais realizaram habituação de 60 minutos na sala (60 luxes) antes de cada sessão de teste. Veja o desenho experimental na Figura 16.

2.2. Lesão por constrição crônica (CCI) do nervo ciático

A neuropatia periférica foi induzida pela constrição do nervo ciático, segundo método previamente descrito (Bennett e Xie, 1988, Silva-Cardoso et al., 2021). Ver detalhes em Capítulo 2, item 2.2.

2.3. Tratamento com CBD

O CBD (pureza de 99,6%; BSPG-Pharm, Sandwich, UK) foi diluído em solução de veículo (VEI, solução salina a 98%, Tween 80 a 2%) (Deiana et al., 2012). Cada administração foi realizada 60 minutos antes dos testes nociceptivos, com base no tempo de absorção plasmática do CBD (Britch et al., 2020). No presente estudo, foram realizados oito grupos experimentais (n = 7 para cada grupo), quatro grupos SHAM e quatro grupos CCI, os animais foram tratados com VEI ou CBD na dose 0,3, 3 e 10 mg/kg (Silva-Cardoso et al., 2021).

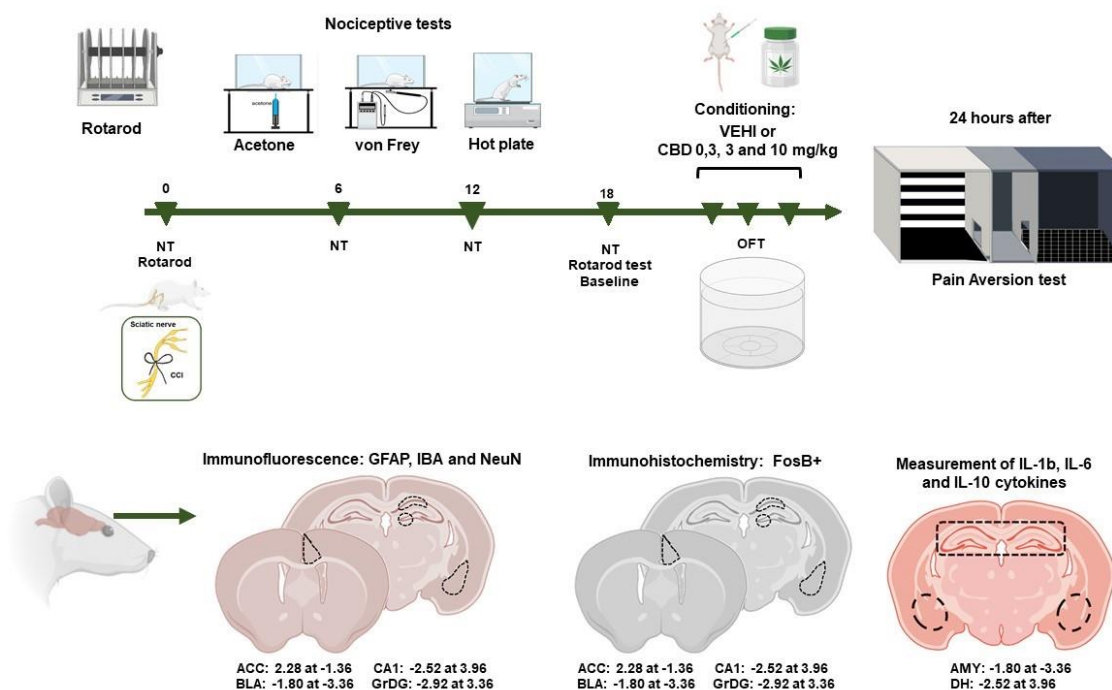


Figura 16. Desenho experimental. Os animais foram submetidos a sessões de treinamento de rotarod e mensuração das linhas de base NT (Acetona, von Frey e placa quente). Em seguida, os animais foram submetidos à cirurgia CCI ou SHAM. TN foram realizadas 6, 12 e 18 dias após a cirurgia. No 18º dia, foi realizado o teste do rotarod e a sessão de linha de base do CPP. O TCA foi realizado no 23º dia 4 horas após o tratamento com CBD ou VEI. Os animais foram condicionados no CPP entre os dias 22 e 24, e a sessão de teste foi realizada no dia 25. O tecido foi coletado para imuno-histoquímica e para imunoenaios enzimáticos. Abreviaturas: TN - teste de nocicepção, CPP - lugar de preferência condicionado, CCI - lesão por constrição crônica,

VEI - veículo, CBD - canabidiol, TCA - campo aberto, BLA – complexo basolateral da amígdala, CA1 - região 1 do corno de Amon -, ACC - anterior córtex cingulado, GrDG - camada granular do giro denteado, AMG - amígdala, HD - hipocampo dorsal. Fonte: Autoria própria.

2.4. Avaliação da atividade locomotora e equilíbrio motor

Os ratos foram submetidos a 1 sessão de treinamento em um rotarod acelerado - velocidade de 4 a 20 rpm (velocidade inicial é ajustada para 4 rpm, taxa de aceleração para 20 rpm/min), velocidade máxima é de 40 rpm. (Brooks e Dunnett, 2009; Shiotsuki et al., 2010). A sessão teve duração de 12 minutos, sendo dividida em três tentativas no aparelho, e intervalo de descanso de 3 minutos entre cada exposição. A cirurgia do CCI foi realizada em seguida ao treinamento. Quinze dias depois, os ratos foram colocados em um rotarod (velocidade de 4 a 20 rpm), completando 2 sessões de 2 minutos e 30 segundos com 3 minutos de descanso entre as sessões. Avaliamos a latência de queda, ou seja, o tempo que o rato levou para cair da haste e o tempo total de permanência do animal no teste. Essa variável é utilizada para identificar eventuais alterações na coordenação motora e no equilíbrio.

2.5. Avaliação de sensibilidade mecânica

A sensibilidade mecânica foi avaliada pelo aumento da pressão na pata dos animais (von Frey electronic, Insight Instruments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), aplicada por um analgesímetro eletrônico (Deuis et al., 2017, Silva-Cardoso 2021). Ver detalhes em Capítulo 2, item 2.4.

2.6 Avaliação da sensibilidade térmica ao frio

Foi utilizado o teste de instilação plantar de acetona, que mede a alodínia ao frio induzida pela constrição do nervo ciático (Deuis et al., 2017, Silva-Cardoso 2021). Ver detalhes em Capítulo 2, item 2.5.

2.7. Avaliação da sensibilidade térmica ao calor

O teste da placa quente avalia o tempo que os animais permanecem em uma superfície metálica aquecida ($50 \pm 1^\circ\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico (Deuis et al., 2017, Silva-Cardoso et al., 2021). Ver detalhes em Capítulo 2, item 2.6.

2.8. Avaliação da atividade locomotora e comportamentos ansiogênicos

O padrão de locomoção e comportamento ansioso foram avaliados no TCA no 23º dia experimental. Os animais foram colocados no centro do aparato e o comportamento exploratório foi registrado por 5 minutos para análise comportamental após 4 horas da aplicação do tratamento (CBD ou VEI) (Prut e Belzung, 2003). Avaliou-se também o tempo gasto no centro e na periferia do aparato, bem como se contabilizou o número de cruzamentos entre os quadrantes para investigar possíveis alterações na atividade locomotora e possíveis efeitos sedativos, que podem interferir na avaliação dos testes nociceptivos, uma vez que os índices de avaliação dependem das respostas motoras. Medidas complementares no TCA, como frequência e tempo dos comportamentos secundários também foi avaliado como elevação, autolimpeza e congelamento.

2.9. Teste de Aversão à Dor

O Teste de Aversão à Dor é uma adaptação do teste CPP tradicional (Genaro et al., 2017; King et al., 2009; Silva-Cardoso e Nobre, 2021; Wu et al., 2017). Foi realizado usando uma caixa de preferência personalizada de 3 compartimentos, consistindo em um par de compartimentos com pistas sensoriais distintas e um compartimento intermediária neutra. Para a realização deste protocolo, os animais foram habituados ao aparato de preferência condicionada do local no 17º dia do estudo. Durante a habituação, os ratos podem se mover livremente entre os 3 compartimentos por 30 minutos. No 18º dia, realizamos uma linha de base de preferência em que os ratos podiam se mover livremente entre os 3 compartimentos por 15 min e o tempo gasto em cada câmara foi registrado para determinar o contexto (A ou B) preferido de cada animal. Os animais foram monitorados na caixa do CPP por meio de gravações de vídeo, e o tempo gasto em cada compartimento foi avaliado por um pesquisador cego. Ratos que apresentaram tempo >720 s ou <180 s em qualquer um dos compartimentos foram excluídos do estudo para evitar resultados tendenciosos. No entanto, em nosso estudo, nenhum animal foi excluído por este critério. Após habituação (17º dia) e sessão de preferência ou linha de base (18º dia), os ratos foram submetidos a 3 dias de condicionamento (22º, 23º, 24º dias). Foram realizadas duas sessões por dia, com intervalo de 4 h entre cada uma. Para avaliar os efeitos do CBD, os ratos receberam uma administração i.p. de CBD e VEI por dia (nas diferentes doses utilizadas neste estudo). Uma hora depois, cada animal recebeu uma injeção de solução salina 0,9% (NaCl, 0,3

mL) na fossa poplítea direita e foi imediatamente colocado no compartimento de preferência durante a sessão de pré-condicionamento ou linha de base; 4 h depois, o animal recebeu injeção de lidocaína a 4% (0,3 mL) na pata e foi colocado no compartimento de condicionamento oposta por 30 min. A ordem de tratamento foi randomizada para cada rato em todos os dias experimentais. Um dia após a fase de condicionamento (25º dia), foi realizado o teste de preferência de local. Os ratos não receberam tratamento medicamentoso e tiveram acesso para se movimentar livremente entre os 3 compartimentos por 15 minutos. O tempo gasto em cada compartimento foi registrado para determinar o contexto preferido de cada animal após o protocolo de condicionamento aplicado.

2.10 Avaliação dos níveis de citocinas na AMG e HD

Quatro grupos experimentais adicionais (n= 6 animais/grupo) foram realizados para o ensaio imuno enzimático, dois grupos SHAM e dois grupos CCI. Os animais de cada grupo foram submetidos à mesma condição experimental descrita anteriormente e tratados aleatoriamente com VEI ou CBD 3 mg/kg (Ver desenho experimental na Figura 16). Para a análise das citocinas, os animais foram submetidos à decapitação e dissecação das regiões de interesse para coleta do material histológico, que foi armazenado em eppendorfs identificados por região/hemisfério e preservado a -80°C . O tecido foi sonicado e extraído a 4°C , 1300 rpm por 20 min na centrifuga refrigerada. O sobrenadante dos tecidos processados foi usado para quantificação de proteínas e citocinas. A concentração de proteína tecidual total foi medida pelo kit de ensaio de proteína BCA (Pierce) (Cazuza et al., 2020). Os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram determinados usando kits ELISA apropriados (R&D Systems, Minneapolis, Minn., EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os limites de detecção para IL-1 β , IL-6 e IL-10 foi de 10 pg/mL. As concentrações de citocinas foram determinadas usando curvas de diluição em série dos padrões. As amostras foram executadas em um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek Instruments, Inc.). É importante mencionar que os ensaios de IL-1 β , IL-6 e IL-10 não apresentam reatividade cruzada ou interferência (Oliveira-Pelegrin et al., 2013).

2.11. Processamento histológico

Ao final do protocolo, os animais dos outros grupos experimentais foram submetidos a eutanásia sob anestesia com cloridrato de cetamina 10% (225 mg/kg) e

cloridrato de xilazina 2% (30 mg/kg) e submetidos à perfusão intracardíaca com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M. a 20 °C, seguido de solução de Somogyi (paraformaldeído 8% em tampão fosfato 0,1M + 4 mL de glutaraldeído 25% + 300 mL de pícrico). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e mantidos em solução de Somogyi por 4 h para pós-tecido posteriormente, o tecido foi crioprottegido em uma solução de sacarose a 30%, os encéfalos foram congelados em gelo seco e isopentano e preservados a -80°C. Cortes coronais foram obtidos para análise imuno-histoquímica (40 µm) das regiões do ACC, BLA, GrDG e CA1 - HD (**Paxinos e Watson, 2006**) e os cortes flutuantes foram armazenados em solução anticongelante (50% PBS, 30% etilenoglicol, 20% glicerol) a -20°C.

2.12. Imunofluorescência para GFAP, IBA-1 e NeuN

Para a imunofluorescência, os tecidos foram lavados em PBS (5x, 5 min cada) e pré-incubados por 1 h em soro de cabra normal a 10% (NDS, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) em PBS, pH 7,4 contendo 0,3% de Triton X-100 e 0,05% de azida de sódio (Sigma). As seções foram então incubadas separadamente por 1 dia em uma mistura de anticorpos primários NeuN (Merck Millipore, ABN78, lote. 3065573), IBA-1 (Millipore, MABN92, lote. 3068442) e GFAP (Abcam ab190288, lote. GR3359366-7), todos diluídos 1:1000 em soro normal de cabra, em todos os cenários foi realizado a uma temperatura de 4°C sob agitação contínua. No segundo dia, após cinco lavagens em PBS, o tecido foi incubado por 2 h no Alexa Fluor 546 anticorpo anti-coelho de cabra (AB_2534093, Thermo Fisher Scientific, lote. 2387450), diluído 1:800, e IgG anti-rabbit de donkey Rodamina B (AP192R), diluída 1:500, respectivamente, em soro normal de cabra, e após cinco lavagens em PBS (5x, 5 min cada). A seção de controle negativo foi incubada da mesma forma descrita, mas sem o anticorpo primário. As lâminas foram montadas em meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e armazenadas em geladeira.

2.13. Imuno-histoquímica para neurônios FosB+

Conforme descrito anteriormente (**Lazarini-Lopes et al., 2021**), os tecidos foram lavados em PBS (5x, 5 min cada) e permeabilizados com Triton X-100 0,3% v/v (20 min). Em seguida, as peroxidases endógenas foram bloqueadas em solução de H₂O₂ a 2% por 30 min, em seguida, os tecidos foram incubados em solução de bloqueio de albumina de soro bovino (2% BSA e 0,05% Triton X-100) por 2 h. O

anticorpo primário policlonal anti-rabbit para FosB (1:1000; sc-48, Santa Cruz Biotechnology) foi diluído em 2% BSA (Amresco) e incubado overnight (~ 18 horas). Em seguida, os tecidos foram lavados em PBS (5x), incubados por 2 horas em anticorpo secundário biotilado IgG anti-rabbit (1:1.000; BA-1000, Vector), diluído em solução de 2% BSA. Os tecidos foram então incubados em complexo avidina-biotina-peroxidase (1:800, kit VectaStain ABC, Vector), lavados em PBS e Tris-HCl (0,05 M; pH 7,6). Os sítios imunorreativos foram visualizados usando um kit com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) peroxidase (HRP) com níquel (SK-4100, Vector). O níquel foi usado para intensificar a intensidade de marcação do DBA para evitar erros de análise associados a neurônios pequenos ou neurônios com baixa imunocoloração. Os controles negativos foram realizados em seções incubadas sem anticorpos primários e a imunorreatividade estava ausente nessas seções. Os cortes foram montados em lâminas de vidro e lamínulas com Permount (Sigma, EUA).

2.14. Análise de imagem

As imagens de imunofluorescência e imuno-histoquímica foram capturadas em microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados (Olympus BX61VS). Os sinais imunorreativos de GFAP, IBA-1 e NeuN foram analisados em aumento de 400x conforme descrito anteriormente (**Silva-Cardoso et al., 2021**). Para analisar as imagens de imunofluorescência, foi utilizado o método Integrated Optical Density (IOD) (Ver detalhes em item **2.9. Análise de imagem, Cap. II**). Em áreas menores, como CA1 e GrDG, foram utilizadas 3 ROIs com 2.500 μm^2 , enquanto em BLA e ACC foram utilizadas 3 ROIs com 10.000 μm^2 . Para a imunocoloração FosB e NeuN foram analisadas em ampliação de 400x como descrevemos anteriormente (**Lazarini-Lopes et al., 2022**), foram analisadas 3 fatias por animal para cada região de interesse, com uma amostra de 6 animais selecionados aleatoriamente por grupo. Para analisar o número de neurônios FosB+ e NeuN+, o método de contagem manual foi utilizado por um pesquisador cego. Para cada animal, foi utilizada a média do número total de neurônios FosB+ ou NeuN+ detectados em 3 ROIs (10.000 mm^2 cada) selecionados aleatoriamente dentro de cada estrutura.

2.15. Análise estatística

Os dados são representados como média \pm erros padrão. Os resultados do teste rotarod foram analisados por ANOVA uma via, seguido do teste de Tukey (CCI vs

SHAM). Os resultados dos TN foram analisados por ANOVA duas vias com medidas repetidas, seguido do teste de Sidak's (condição vs tempo). Os dados de TCA, teste de CPP, imunofluorescência para expressão de GFAP, IBA-1 e NeuN, imuno-histoquímica para expressão de FosB+ e análise das citocinas pró-inflamatórias IL-1b e IL-6 e anti-inflamatório IL-10 foram analisados por ANOVA de duas vias (CBD vs VEHI e CCI vs SHAM), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises. As figuras e estatísticas foram preparadas usando o software Prism (versão 8.0, GraphPad Software).

3. Resultados

3.1. Avaliação da nocicepção no modelo de constrição do nervo ciático

A sensibilidade somática foi examinada em ratos SHAM e CCI, medindo-se os limiares mecânicos e térmicos antes da cirurgia (linha de base), e nos dias 6, 12 e 18 (Figura 17). Aplicou-se aos dados a ANOVA de uma via para medidas repetidas (Tabela 4) e o fator de condição cirúrgica (SHAM vs CCI). A cirurgia de CCI reduziu o limiar mecânico no teste de von Frey. Nos animais SHAM, o limiar mecânico não foi modificado ao longo do protocolo (Figura 17A). A análise estatística do limiar mecânico para os grupos SHAM e CCI mostrou diferença na condição cirúrgica. O pós-teste de Tukey revelou uma diferença significativa ($P < 0,05$) nos grupos CCI em relação ao limiar mecânico inicial com o limiar mecânico nos dias 6, 12 e 18 (Figura 17A).

Para a análise do limiar térmico foram utilizados dois testes distintos, o teste da acetona para avaliar a sensibilidade ao frio e o teste da placa quente para avaliar a sensibilidade ao calor. A ANOVA de uma via para medidas repetidas (Tabela 4) mostrou uma diferença no status cirúrgico. Nos grupos SHAM, a pontuação ou latência não se alterou ao longo do tempo experimental em ambos os testes. O pós-teste de Tukey mostrou redução no score do teste de acetona em todos os grupos após CCI em comparação ao basal ($P < 0,05$) em 6, 12 e 18 dias após a cirurgia (Figura 17B). A cirurgia também reduziu a latência do teste da placa quente em todos os grupos experimentais em comparação com a linha de base ($P < 0,05$), em 6, 12 e 18 dias após a cirurgia (Figura 17C).

Teste de nociceção	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tempo (VEI vs CBD)	Interação (condição vs tempo)
von Frey	$F_{1,54} = 5302, P < 0,0001$	$F_{3,162} = 586,8, P < 0,0001$	$F_{3,162} = 545,8, P < 0,0001$
Acetona	$F_{1,54} = 1792, P < 0,0001$	$F_{3,162} = 379,8, P < 0,0001$	$F_{1,162} = 379,8, P < 0,0001$
Placa quente	$F_{1,54} = 1810, P < 0,0001$	$F_{3,16} = 369,4, P < 0,0001$	$F_{1,162} = 375,9, P < 0,0001$

Tabela 4. Resultados obtidos a partir dos dados originais dos testes nociceptivos (von Frey, Acetona e Placa quente) submetidos à ANOVA de duas vias (tempo e condição) com medidas repetidas. Seguido pelo teste de Sidak's para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises.

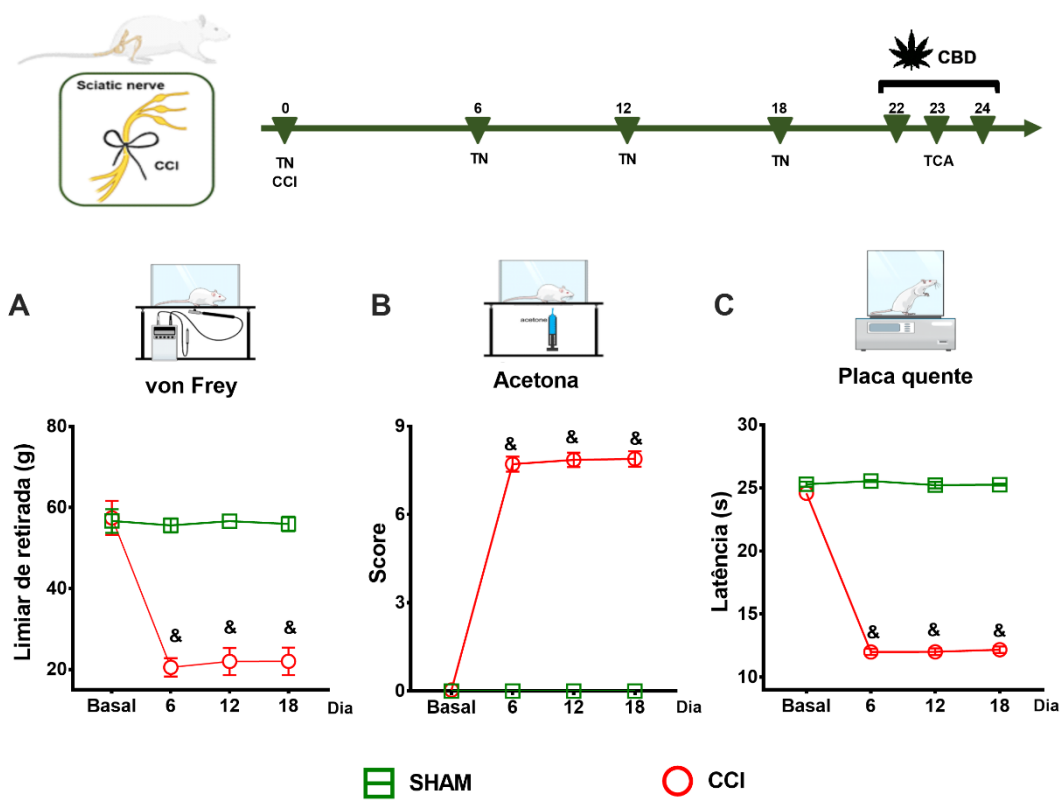


Figura 17. Avaliação do limiar de retirada mecânica, alodínia térmica e hiperalgesia induzida por CCI. Sensibilidade mecânica avaliada pelo teste de von Frey (A), e sensibilidade térmica avaliada pelos testes de acetona (B) e placa quente (C). Limiares mecânicos ou térmicos foram avaliados na linha de base, e após a cirurgia CCI ou SHAM (dias 6, 12 e 18). Os dados representam médias \pm erros padrão. & $P < 0,05$ Teste de Sidak's contra sua respectiva linha de base. $N = 28$ para cada grupo experimental.

3.2. Avaliação da atividade locomotora e equilíbrio motor em animais com dor crônica no teste de desempenho do rotarod.

O teste Rotarod foi realizado para avaliar os efeitos da cirurgia CCI na atividade motora forçada e no equilíbrio dos animais comparados aos animais SHAM (Figura 18). A ANOVA uma via não mostrou diferença entre os grupos CCI e SHAM nas sessões de treinamento e na sessão de teste no total de 5 minutos, independente da condição, SHAM ou CCI ($F_{1,2} = 4$, $P = 0,1835$), velocidade ($F_{2,2} = 3$, $P = 0,0312$) ou tempo ($F_{26,26} = 1,595$, $P = 0,1201$) (Figura 18).

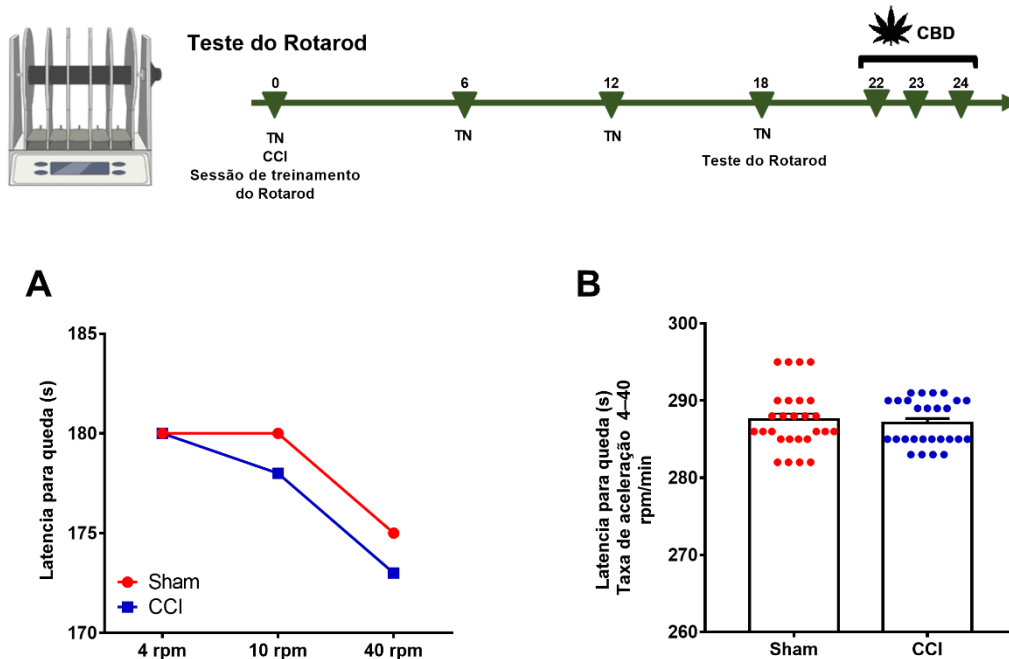


Figura 18. (A) Latência de tempo que os animais permaneceram na haste nas sessões de treinamento em três diferentes velocidades de rotação (4, 10 e 40 rpm). (B) Tempo de permanência do teste na faixa de velocidades de rotação da haste com aceleração suave de 0 a 40-rpm em no dia do teste composto por 2 sessões de 2 minutos e 30 segundos com intervalo de 3 minutos entre cada sessão. Os dados representam médias \pm erros padrão. $N = 28$ para cada grupo experimental.

3.3. Efeitos do canabidiol no teste de aversão à dor: um potencial modulador do comportamento afetivo-motivacional da dor neuropática

A modulação do componente afetivo-motivacional da dor foi mensurada pelo teste de aversão à dor. Ratos SHAM e CCI foram submetidos ao condicionamento para pareamento de estímulos (contexto vs. efeito de CBD ou VEI), e sua preferência foi testada 24 horas após a última aplicação do tratamento (Figura 19). A ANOVA de dois

fatores foi aplicada aos dados e mostrou diferenças no fator de condição (CCI ou SHAM), $F_{1,48} = 69,84$, $P < 0,0001$), no fator de tratamento (CBD ou Veículo), ($F_{3,48} = 14,46$, $P < 0,0001$) e no fator de interação entre condição vs. tratamento ($F_{3,48} = 12,02$, $P < 0,0001$). O teste post-hoc demonstrou que todos os grupos experimentais com a condição cirúrgica SHAM, tratados ou não com CBD, não apresentaram diferenças significativas em relação ao seu grupo controle. Os animais da condição cirúrgica CCI tratados com CBD 0,3, 3 e 10 mg/kg apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (CCI-VEI).

Além disso, quando analisamos as latências para a primeira entrada no contexto que foi pareado com o tratamento (CBD ou VEI), observamos que a ANOVA mostrou diferenças significativas no fator de condição ($F_{1,48} = 8,906$, $P = 0,0045$), fator de tratamento ($F_{3,48} = 26,59$, $P < 0,0001$), e na interação tratamento vs. condição ($F_{3,48} = 27,06$, $P < 0,0001$). O teste post hoc mostrou que o CCI-VEI é diferente do SHAM-VEI ($P < 0,05$) e dos grupos CCI tratados com CBD (0,3, 3 e 10 mg/kg, $P < 0,05$).

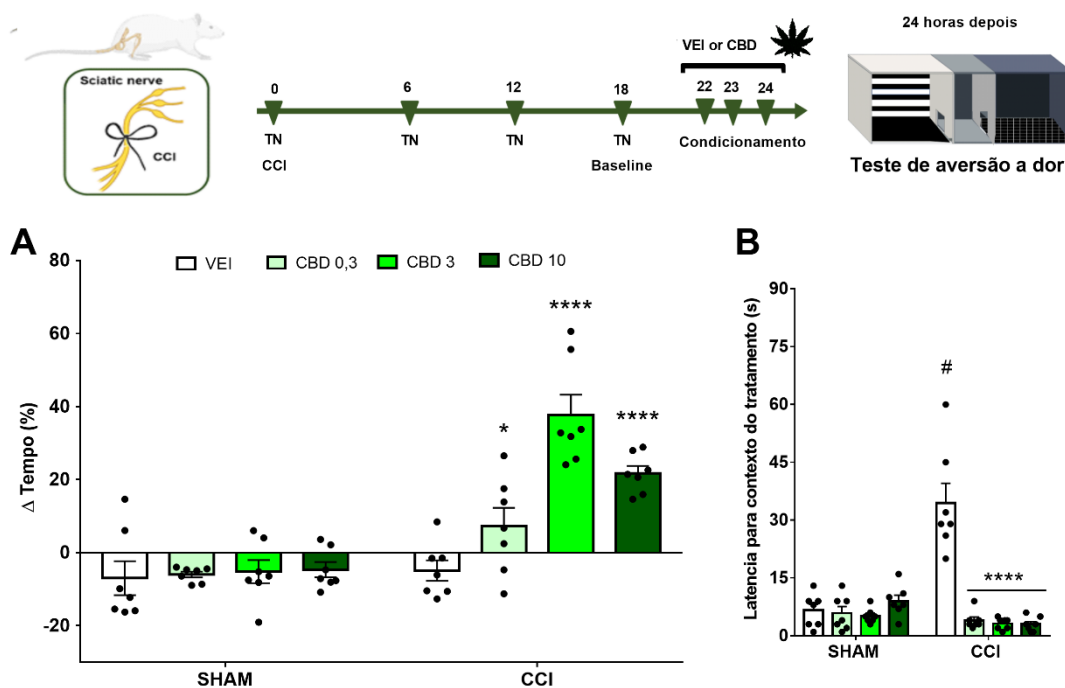


Figura 19. O tratamento subcrônico com CBD reverteu o local preferido dos animais com dor crônica induzida por CCI avaliada no teste de aversão à dor. (A) Δ de preferência do teste CPP. (B) latência à primeira entrada no compartimento condicionado com seu respectivo tratamento. **** $P < 0,0001$ teste de Tukey comparado ao CCI-VEI; * $P = 0,0328$ teste de Tukey comparado ao CCI-VEI; # $P < 0,001$ Teste de Tukey comparou CCI - VEI com SHAM - VEI. Os dados representam a média ± erros padrão. N = 7/grupo. Abreviatura: Δ representa o limiar no teste –

a linha de base, CPP – preferência condicionada aversão à dor, CCI – lesão por constrição crônica, VEI – Veículo, CBD – canabidiol.

3.4. Avaliação da atividade motora e comportamentos semelhantes à ansiedade

O TCA foi realizado para avaliar os efeitos do CBD no comportamento emocional e na atividade locomotora 4 h após a segunda administração do CBD (Figura 20). Os resultados estatísticos da ANOVA (ver Tabela 5) mostram que, considerando os grupos CCI e SHAM tratados com CBD em diferentes doses ou VEI, após 4 horas de aplicação do medicamento, há diferenças na % de tempo gasto no centro do campo aberto, no fator tratamento ($P = 0,0458$) e no fator condição cirúrgica ($P = 0,0009$), mas o fator de interação não foi significativo ($P = 0,3445$). Quanto ao número de cruzamentos em campo aberto, não se alterou em termos de condição (SHAM ou CCI, $P = 0,0668$) ou tratamento (VEI ou CBD, $P = 0,07934$) (Figura 20B).

TCA	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (SHAM vs CCI)	Fator interação (condição vs. tratamento)
% de tempo no centro	$F_{1,48} = 12,45, P = 0,0009$	$F_{3,48} = 2,874, P = 0,0458$	$F_{3,48} = 1,135, P = 0,3445$
Número de cruzamentos	$F_{1,48} = 3,515, P = 0,0668$	$F_{3,48} = 0,3442, P = 0,7934$	$F_{3,48} = 0,5935, P = 0,6222$
Frequência de congelamento	$F_{1,48} = 0,6512, P = 0,4235$	$F_{3,48} = 2,246, P = 0,0944$	$F_{3,48} = 0,2475, P = 0,8627$
Tempo de congelamento	$F_{1,48} = 0,5402, P = 0,4659$	$F_{3,48} = 3,743, P = 0,0170$	$F_{3,48} = 3,311, P = 0,0277$
Frequência de auto-limpeza	$F_{1,48} = 0,932, P = 0,3392$	$F_{3,48} = 3,02, P = 0,0387$	$F_{3,48} = 5,476, P = 0,0026$
Tempo de auto-limpeza	$F_{1,48} = 0,0282, P = 0,8674$	$F_{3,48} = 0,5681, P = 0,6387$	$F_{3,48} = 0,6501, P = 0,5868$
Frequência de elevação	$F_{1,48} = 1,465, P = 0,2320$	$F_{3,48} = 0,5619, P = 0,6428$	$F_{3,48} = 1,19, P = 0,3233$
Tempo de elevação	$F_{1,48} = 1,118, P = 0,2956$	$F_{3,48} = 1,582, P = 0,2060$	$F_{3,48} = 0,3996, P = 0,7539$

Tabela 5. Resultados obtidos a partir dos dados originais do TCA submetidos à ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs. fator de condição). Seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises.

Além disso, avaliamos comportamentos complementares do TCA, ANOVA de duas vias (Tabela 5) mostrou diferenças significativas na frequência de autolimpeza, mas não no tempo de duração ($P = 0,8674$). A ANOVA de duas vias mostrou que na avaliação da frequência de autolimpeza, o fator de condição não foi significativo ($P = 0,3392$), mas foi significativo no fator de tratamento ($P = 0,0387$) e no fator de condição ($P = 0,0026$). A análise post hoc mostrou que os grupos CCI tratados com doses de CBD de 0,3, 3 e 10 mg/kg foram diferentes em comparação com o grupo controle ($P < 0,05$, Figura 20E).

O teste estatístico (Tabela 5) mostrou que não houve diferenças significativas na frequência do comportamento de congelamento, independentemente do fator de condição ($P = 0,4235$), ou tratamento ($P = 0,0944$); mas foram detectadas diferenças estatísticas em relação ao tempo do comportamento de congelamento no fator de tratamento ($P = 0,0170$) e interação entre os fatores tratamento e condição cirúrgica ($P = 0,00277$). A análise post hoc mostrou que os grupos CCI tratados com doses de CBD de 0,3, 3 e 10 mg/kg foram diferentes quando comparados ao grupo controle ($P < 0,05$, Figura 20H).

Por fim, em relação ao comportamento de elevação, observamos que não houve diferença significativa na frequência do comportamento ($P = 0,2380$) e na condição cirúrgica ($P = 0,06428$) ou no tempo de elevação dos animais (tratamento ($P = 0,2956$) e condição ($P = 0,2060$), para maiores detalhes ver Tabela 5.

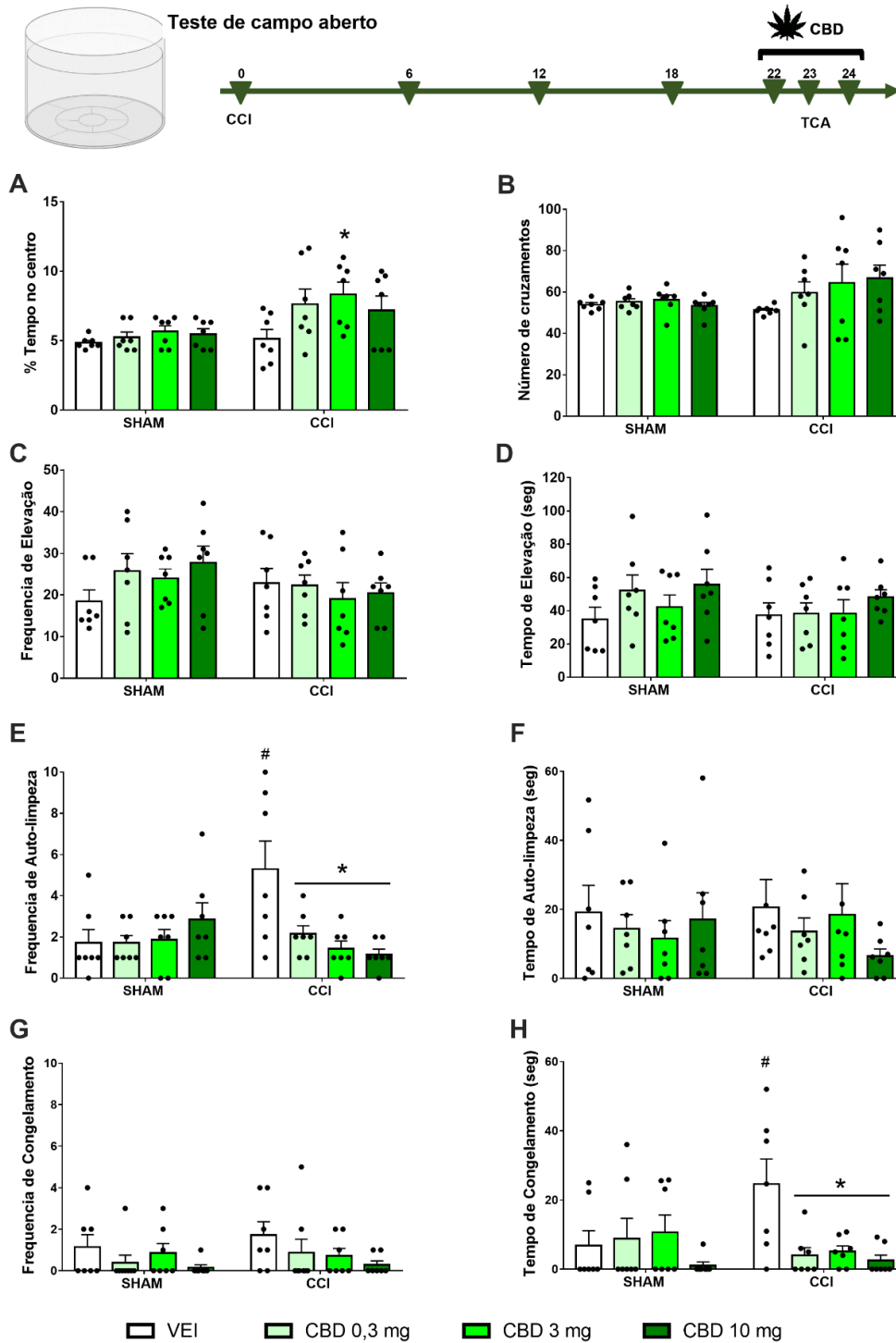


Figura 20. O CBD induziu efeitos ansiolíticos em ratos CCI no TCA. (A) % de tempo gasto no centro, (B) número total de cruzamentos, (C) Frequência de elevações, (D) Tempo de elevação, (E) Frequência de autolimpeza, (F) Tempo de autolimpeza, (G) Frequência de congelamento, (H) Tempo de congelamento. O TCA foi realizado por 5 minutos, 23 dias após a cirurgia CCI ou SHAM, 4 h após o segundo tratamento com VEI ou CBD (0,3, 3, 10 mg/kg/dia, i.p.). Os dados representam a média \pm erros padrão. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. $N = 7$ /grupo.

3.5. Imuno-histoquímica para neurônios FosB+

Neste conjunto de resultados, avaliamos a hiperatividade neuronal crônica avaliando o número de neurônios FosB+ no ACC (Figura 21B), BLA (Figura 21C), GrDG (Figura 21D) e CA1 (Figura 21E). O tecido foi coletado no 25º dia experimental em ratos CCI ou SHAM após tratamento subcrônico (por 3 dias, começando no 22º dia experimental).

Considerando a imunorreatividade para a proteína FosB, no ACC, a ANOVA duas vias (Tabela 6) mostrou diferença no fator de condição ($P < 0,0001$), no fator de tratamento ($P = 0,0021$) e na interação entre os fatores ($P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 28B).

Em relação ao BLA, a análise estatística (ver Tabela 6) mostrou diferença significativa no fator de condição ($P = 0,0003$), no fator de tratamento ($P = 0,0021$) e na interação entre os fatores ($P = 0,0011$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI e do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 21B).

Quanto às análises em relação à HD (Tabela 6), região GrDG a análise estatística mostrou diferença no fator condição ($P = 0,0003$), no fator tratamento ($P < 0,0001$) e na interação condição vs. tratamento ($P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 21D). E considerando a imunorreatividade para a proteína FosB em CA1, a aplicação da ANOVA duas vias mostrou diferença no fator de condição ($P < 0,0001$), no fator de tratamento ($P < 0,0001$) e na interação condição vs. tratamento ($P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 21E).

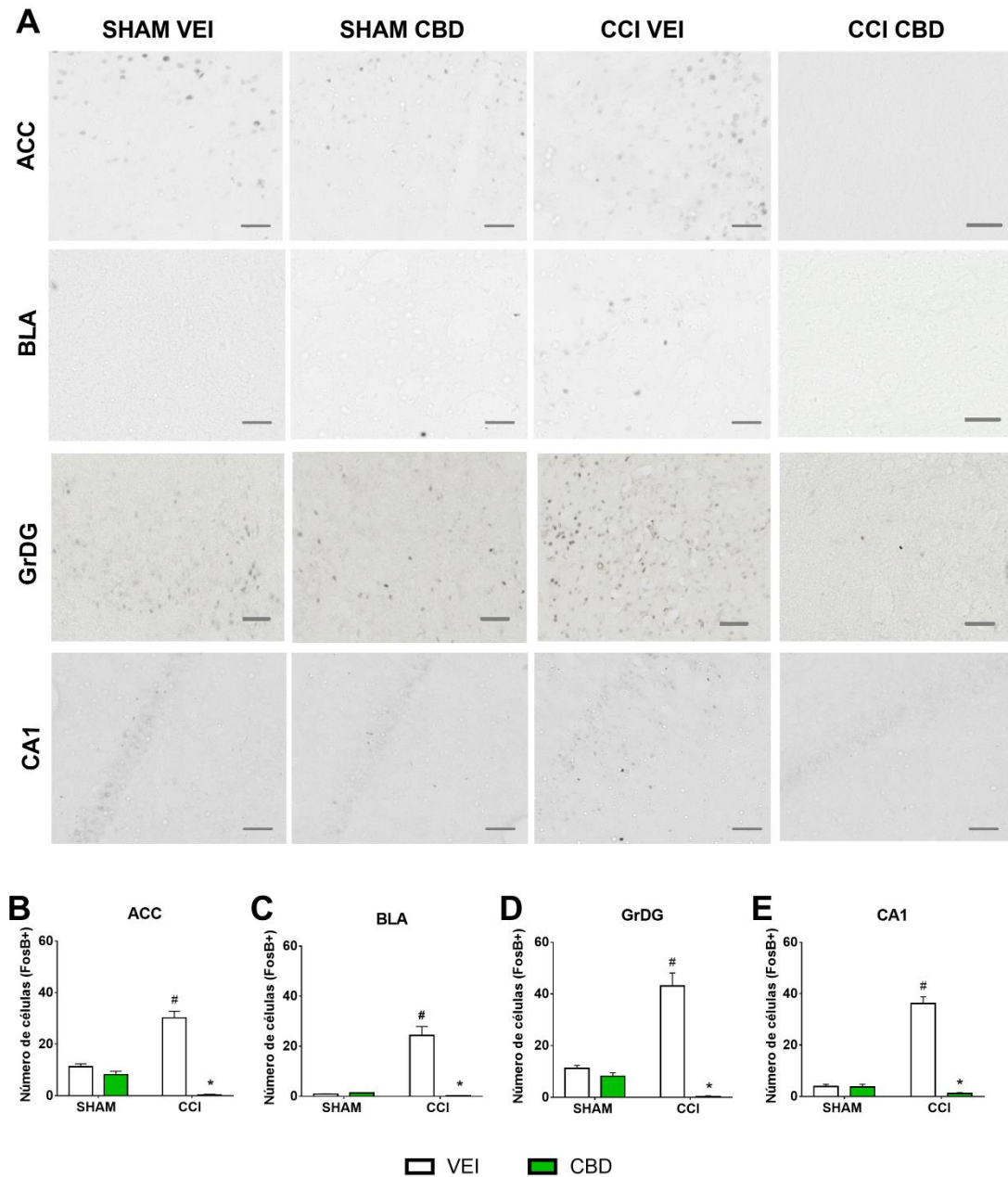


Figura 21. Efeitos do CBD na hiperatividade neuronal crônica. (A) Imunocoloração para neurônios FosB+, representados por pontos escuros, no ACC, BLA, GrDG e CA1 do HD, onde foi observado aumento de células FosB+ nos animais CCI. (B, C, D, E) O tratamento subcrônico (três dias a partir do 22º dia experimental) com CBD 3 mg/kg reduziu o número de neurônios FosB+ observados em animais CCI quando comparados ao tratamento CCI-VEI e grupos SHAM. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou CCI-CBD. $N = 6$ /grupo Barras de escala = 200 μm .

FosB+			
Região	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
ACC	$F_{1,20} = 13,07, P = 0,0017$	$F_{1,20} = 113,9, P < 0,0001$	$F_{1,20} = 75,53, P < 0,0001$
BLA	$F_{1,20} = 10,64, P = 0,0021$	$F_{1,20} = 12,22, P = 0,0011$	$F_{1,20} = 14,96, P = 0,0003$
HD			
CA1	$F_{1,20} = 100,4, P < 0,0001$	$F_{1,20} = 139,6, P < 0,0001$	$F_{1,20} = 136,9, P < 0,0001$
GrDG	$F_{1,20} = 19,36, P = 0,0003$	$F_{1,20} = 70,64, P < 0,0001$	$F_{1,20} = 52,99, P < 0,0001$
NeuN+			
Região	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
ACC	$F_{1,20} = 5,36, P = 0,0313$	$F_{1,20} = 10,18, P = 0,0046$	$F_{1,20} = 10,1, P = 0,0046$
BLA	$F_{1,20} = 4,825, P = 0,040$	$F_{1,20} = 13,4, P = 0,0016$	$F_{1,20} = 22,16, P = 0,0001$
HD			
CA1	$F_{1,20} = 13,09, P = 0,0017$	$F_{1,20} = 52,35, P < 0,0001$	$F_{1,20} = 62,5, P < 0,0001$
GrDG	$F_{1,20} = 0,572, P = 0,4580$	$F_{1,20} = 3,691, P = 0,0691$	$F_{1,20} = 0,114, P = 0,7391$
Expressão GFAP			
Região	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
ACC	$F_{1,36} = 31,15, P < 0,0001$	$F_{1,36} = 34,8, P < 0,0001$	$F_{1,36} = 20,64, P < 0,0001$
BLA	$F_{1,31} = 8,606, P = 0,0063$	$F_{1,31} = 10,32, P = 0,0031$	$F_{1,31} = 19,38, P = 0,0001$
HD			
CA1	$F_{1,33} = 4,326, P = 0,0454$	$F_{1,33} = 41,61, P < 0,0001$	$F_{1,33} = 41,88, P < 0,0001$
GrDG	$F_{1,29} = 0,9528, P = 0,3371$	$F_{1,29} = 33,11, P < 0,0001$	$F_{1,29} = 37,54, P < 0,0001$
Expressão IBA-1			
Região	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
ACC	$F_{1,36} = 23,09, P < 0,0001$	$F_{1,36} = 32,1, P < 0,0001$	$F_{1,36} = 8,662, P = 0,0057$
BLA	$F_{1,29} = 3,788, P = 0,0614$	$F_{1,29} = 7,27, P = 0,0116$	$F_{1,29} = 11,63, P = 0,0019$
HD			
CA1	$F_{1,35} = 20,48, P < 0,0001$	$F_{1,35} = 60,54, P < 0,0001$	$F_{1,35} = 60,36, P < 0,0001$
GrDG	$F_{1,35} = 6,123, P = 0,0183$	$F_{1,35} = 5,938, P = 0,0200$	$F_{1,35} = 0,00364, P = 0,9522$

Tabela 6. Resultados obtidos a partir dos dados originais de imunohistoquímica para neurônios FosB+ e Imunofluorescência para neurônios GFAP, IBA-1 e NeuN+. Os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento e condição cirurgica). O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises.

3.6. Avaliação da densidade neuronal (neurônios NeuN+)

Neste conjunto de resultados, avaliamos neurônios NeuN+, nas regiões ACC (Figura 22B), BLA (Figura 22C), GrDG (Figura 22D) e CA1 (Figura 22E). O tecido foi coletado no 25º dia experimental em ratos CCI e SHAM após tratamento subcrônico (por 3 dias, a partir do 22º dia experimental) com CBD na dose de 3 mg/kg ou veículo.

Considerando a imunofluorescência para neurônios NeuN+ no ACC, a ANOVA duas vias (Tabela 6) mostrou diferenças no fator de condição ($P = 0,0313$), no fator de tratamento ($P = 0,0046$) e na interação condição vs tratamento ($P = 0,0046$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 22B).

Em relação ao BLA, o CCI-VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 22C). A análise estatística (Tabela 6) mostrou diferença significativa no fator de condição ($P = 0,040$), no fator de tratamento ($P = 0,0016$) e na interação ($P = 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 22C).

No HD, especificamente na região DrDG, a ANOVA duas vias (Tabela 6) não mostrou diferença no fator condição ($P = 0,4580$) e no fator tratamento ($P = 0,0691$), e na interação condição vs. tratamento ($P = 0,791$). O pós-teste de Tukey não revelou diferenças entre os grupos. Finalmente, no CA1, a análise estatística (Tabela 6) mostrou diferença significativa no fator condição ($P = 0,0017$), no fator tratamento ($P < 0,0001$) e na condição versus tratamento interação ($P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI ($P < 0,05$, Figura 22E). Além disso, o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo CCI-VEI o grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 22E).

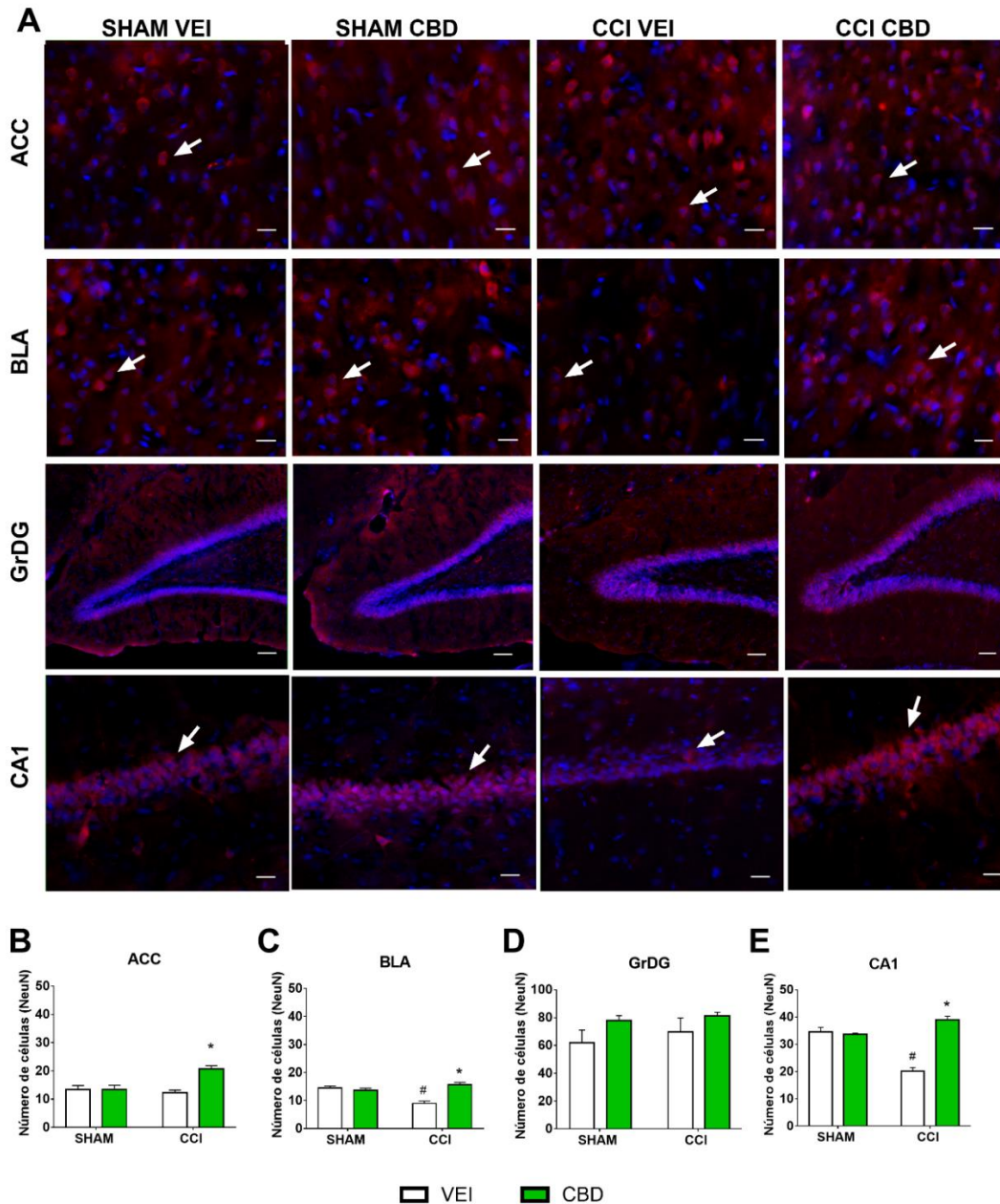


Figura 22. Imunofluorescência para neurônios NeuN+. (A) Imagens representativas de neurônios NeuN + (vermelho) e a coloração nuclear DAPI (azul) no ACC, BLA, GrDG e CA1 do HD. (B) O tratamento subcrônico (3 dias a partir do 21º dia experimental) com canabidiol (CBD, 3 mg/kg) aumentou a densidade neuronal em animais CCI em comparação ao tratamento com VEI e SHAM. (C e E) O modelo CCI reduziu a densidade neuronal (neurônios NeuN+) e o tratamento com CBD recuperou essa alteração quando comparado ao SHAM-VEI. (D) O modelo CCI e o tratamento com CBD não produziram diferenças significativas. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. As setas brancas indicam exemplos de neurônios que foram considerados para análise. N = 6/grupo. Barras de escala de ACC e BLA = 50 µm; GrDG = 200 µm e CA1 = 100 µm.

3.7. Avaliação de imunorreatividade de GFAP

Neste conjunto de resultados, avaliamos a expressão de GFAP, nas regiões ACC (Figura 23B), BLA (Figura 23C), GrDG (Figura 23D) e CA1 (Figura 23E) em ratos CCI e SHAM após tratamento subcrônico (por 3 dias, contando no 22º dia experimental) com CBD na dose de 3 mg/kg ou veículo.

Considerando a imunofluorescência do GFAP, no ACC, a aplicação da ANOVA duas vias (Tabela 6) mostrou diferença no fator de condição ($P < 0,0001$), no fator de tratamento ($P < 0,001$) e na interação condição vs tratamento ($P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 23B). Assim como o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 23B).

Em relação ao BLA, a análise estatística (Tabela 6) mostrou diferença significativa no fator de condição ($P = 0,0063$), no fator de tratamento ($P = 0,0031$) e na interação vs. tratamento ($P = 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 23C). Assim como o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 23C).

Quanto às análises em relação ao HD, especificamente a região DrDG, a aplicação da ANOVA duas vias (Tabela 6) não mostrou diferença no fator de condição ($P = 0,3371$), mas no fator de tratamento ($P < 0,0001$) e na condição vs. interação tratamento ($P < 0,0001$) teve diferença significativa. O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo do veículo CCI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 23D). Assim como o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 23D). E por fim, no CA1, a análise estatística mostrou diferença significativa no fator de condição ($P < 0,0001$), no fator de tratamento ($P = 0,0464$) e na interação vs. tratamento ($P < 0,001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, bem como do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 23E). Assim como o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 23E).

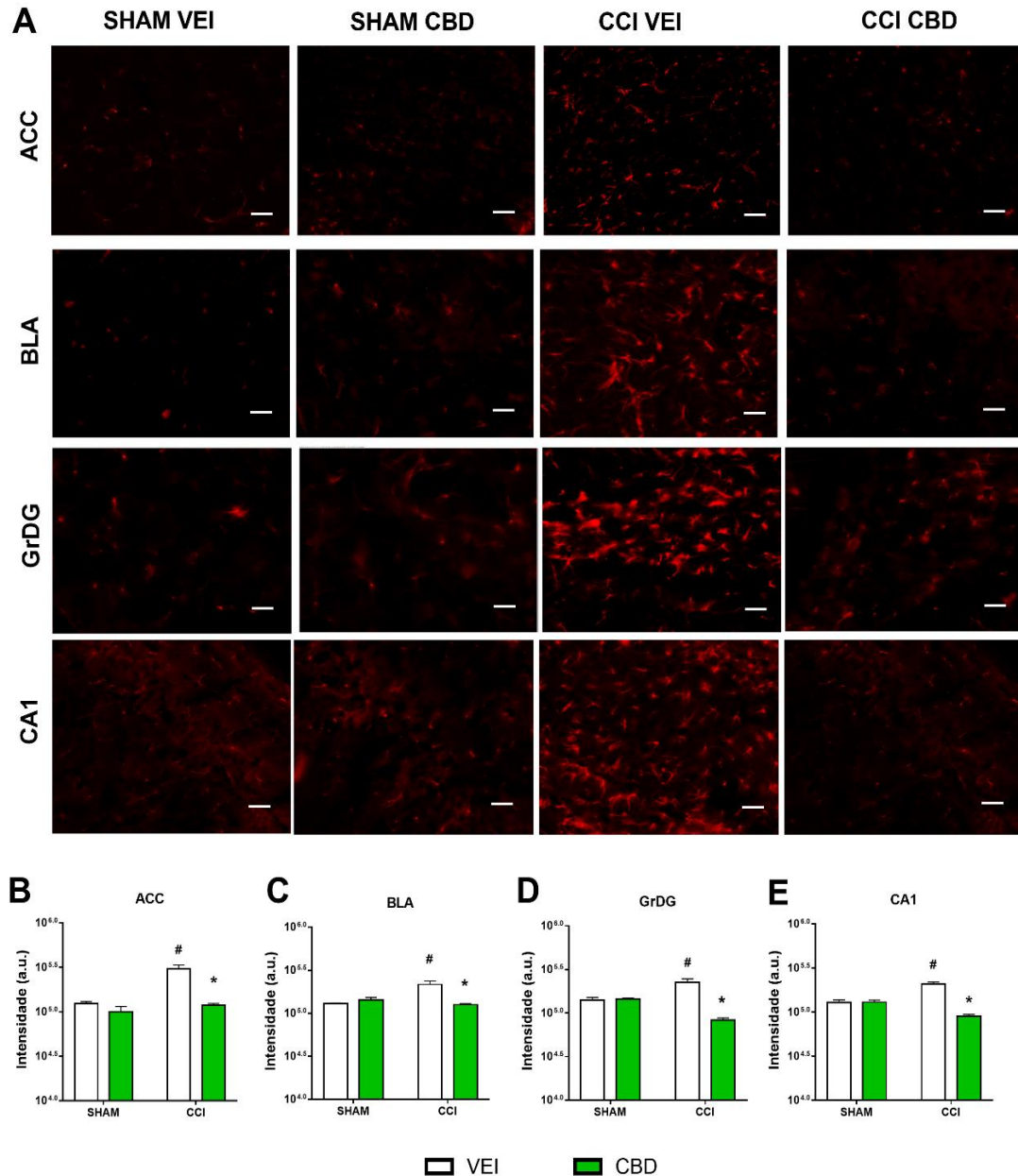


Figura 23. Imunofluorescência para GFAP. (A) Imagens representativas da expressão de GFAP (vermelho) no ACC, BLA, CA1 e GrDG do HD, demonstram aumento da expressão de GFAP nos animais CCI (B, C D e E). O tratamento subcrônico (3 dias a partir do 22º dia experimental) com CBD (3 mg/kg) reduziu a expressão de GFAP em animais CCI em comparação ao tratamento com VEI e grupos SHAM. * $P < 0,05$ teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. # $P < 0,05$ em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. $N = 4-6$ /grupo. Barras de escala do ACC= 100 μm ; BLA, GrDG e CA1= 50 μm .

3.8 Avaliação de imunorreatividade do IBA-1

Da mesma forma, avaliamos a expressão de IBA-1 nas regiões ACC (Figura 24B), BLA (Figura 24C), GrDG (Figura 24D) e CA1 (Figura 24E) em ratos CCI e SHAM após tratamento subcrônico (por 3 dias a partir do 22º dia experimental) com CBD na dose de 3 mg/kg ou VEI.

Considerando a imunofluorescência do IBA-1, no ACC, a ANOVA duas vias (Tabela 6) mostrou diferença no fator de condição ($P < 0,0001$), no fator de tratamento ($P < 0,001$) e na interação condição vs. tratamento ($P < 0,0057$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI, assim como o grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 24B). Além disso, o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 24B).

Em relação ao BLA, a análise estatística (Tabela 6) mostrou diferença significativa no fator condição ($P = 0,0614$), no fator tratamento ($P = 0,0116$) e na interação condição vs. tratamento ($P = 0,0019$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI e do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 24C). Além disso, o grupo CCI-VEI foi diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 24B).

Em relação ao HD, na região GrDG, a ANOVA duas vias (Tabela 6) mostrou diferença no fator de condição ($P = 0,0183$) e no fator de tratamento ($P = 0,0200$), mas não na interação condição vs. tratamento ($P = 0,9522$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI e do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 24E). Além disso, o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 24E). Especificamente, na região CA1, a análise estatística mostrou diferença no fator condição ($P < 0,0001$), no fator tratamento ($P < 0,0001$) e na interação condição vs. tratamento ($P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI e do grupo SHAM tratado com CBD 3 mg/kg ($P < 0,05$, Figura 24E). Finalmente, o grupo CCI tratado com VEI é diferente do grupo SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 24E).

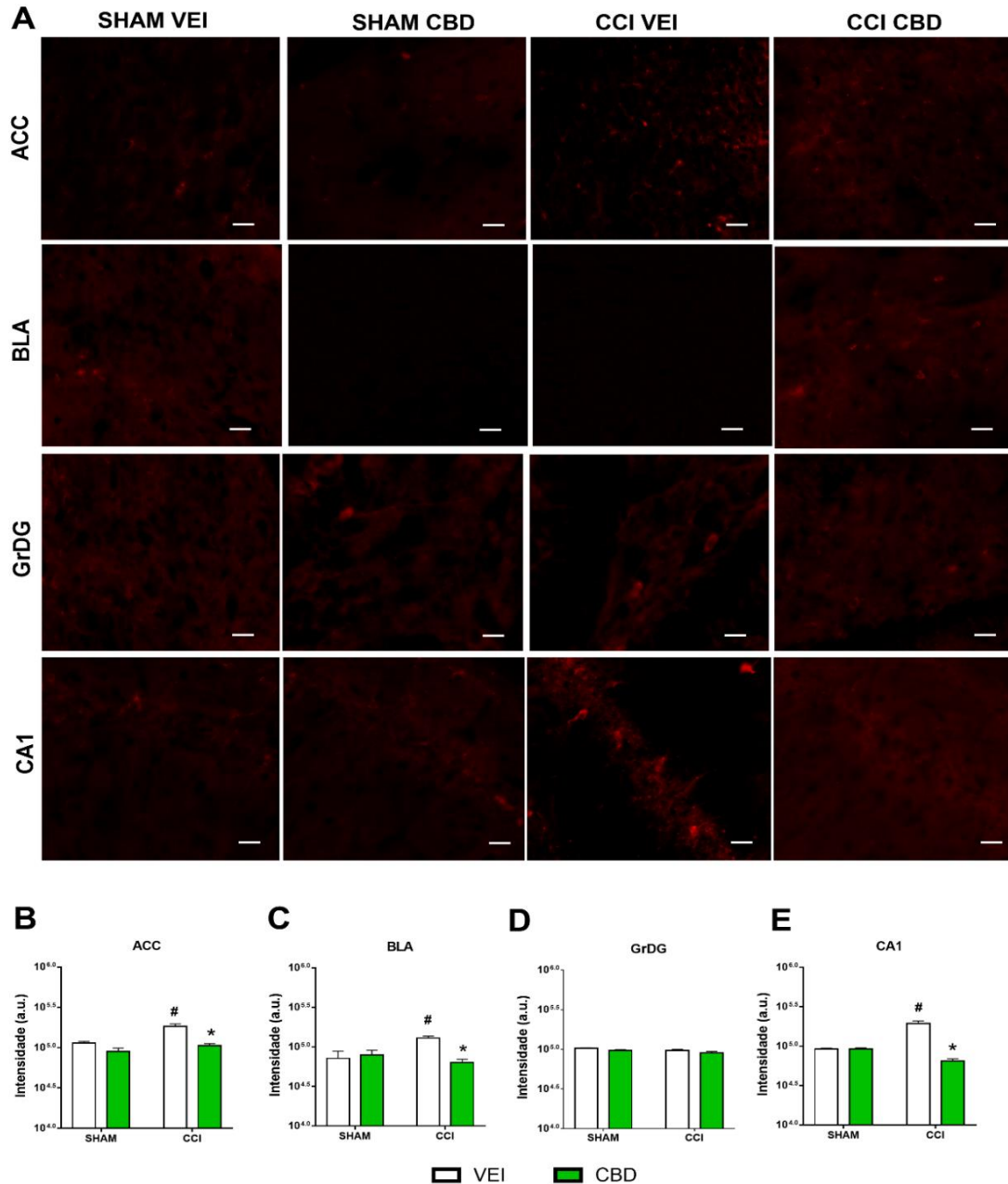


Figura 24. Coloração de imunofluorescência para expressão de IBA-1. (A) Imagens representativas da expressão de IBA-1 (vermelho) no ACC, BLA e CA1 e GrDG do HD, demonstram aumento da expressão de IBA-1 em animais CCI. (B, C e E) O tratamento subcrônico (três dias a partir do 21º dia experimental) com canabidiol (CBD, 3 mg/kg) reduziu a expressão de IBA-1 que foi observada em animais CCI em comparação ao tratamento com CBD. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em comparação com SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 4-6/grupo. Barras de escala do ACC= 100 µm; BLA, GrDG e CA1= 50 µm.

3.9 Avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10

Aqui, analisamos as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10, nas regiões AMG e HD em ratos CCI e SHAM após tratamento subcrônico (por 3 dias, iniciando no dia 22 dia) com CBD na dose de 3 mg/kg ou veículo (Figura 25 e 26).

Avaliação global das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10

Na avaliação da citocina IL-1 β no AMG, ANOVA duas vias (Tabela 7) mostrou diferença no fator de condição ($P = 0,0043$), no fator de tratamento ($P < 0,0001$) e na interação condição vs. tratamento ($P = 0,0087$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI e SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 25B). A segunda citocina avaliada foi a IL-6 no AMG, ANOVA duas vias (Tabela 7) não mostrou diferença no fator de condição ($P = 0,6819$) e na interação condição vs. tratamento ($P = 0,0874$) mas mostrou diferença no fator de tratamento ($P = 0,0088$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI ($P < 0,05$, Figura 25C).

AMG			
Citocina	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
IL-1β	$F_{1,40} = 9,189, P = 0,0043$	$F_{1,40} = 18,7, P < 0,0001$	$F_{1,40} = 7,602, P = 0,0087$
IL-6	$F_{1,40} = 0,1705, P = 0,6819$	$F_{1,40} = 7,59, P = 0,0088$	$F_{1,40} = 3,07, P = 0,0874$
IL-10	$F_{1,40} = 7,22, P = 0,0104$	$F_{1,40} = 16,1, P = 0,0003$	$F_{1,40} = 10,61, P = 0,0023$
HD			
Citocina	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
IL-1β	$F_{1,41} = 1,942, P = 0,1710$	$F_{1,41} = 10,7, P = 0,0021$	$F_{1,41} = 11,1, P = 0,0018$
IL-6	$F_{1,36} = 0,565, P = 0,4569$	$F_{1,36} = 7,50, P = 0,0095$	$F_{1,36} = 0,565, P = 0,4569$
IL-10	$F_{1,36} = 5,39, P = 0,0260$	$F_{1,36} = 26,1, P < 0,0001$	$F_{1,36} = 12,7, P = 0,0010$

Tabela 7. Resultados obtidos a partir dos dados originais do imunoensaio enzimático específico para-IL-1 β , IL-6 e IL-10. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs condição). O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises.

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10 na AMG, a análise estatística (Tabela 7) mostrou diferença no fator condição ($P = 0,0104$), no fator tratamento ($P <$

0,0001) e na interação condição vs tratamento ($P = 0,0087$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI ($P < 0,05$, Figura 25D).

Na análise de IL1 β em HD, ANOVA duas vias (Tabela 7) não mostrou diferença no fator condição ($P = 0,4199$), mas mostrou diferença significativa no fator tratamento ($P = 0,0021$) e na interação condição versus tratamento ($P = 0,0018$). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI e CCI-VEI é diferente de SHAM-VEI ($P < 0,05$, Figura 25F). Em relação à IL-6 em HD, a ANOVA duas vias (Tabela 8) não mostrou diferença no fator de condição ($P = 0,4569$), e na interação de condição vs. tratamento ($P = 0,4569$), mas observamos diferenças significativas no fator de tratamento ($P = 0,0095$). O pós-teste de Tukey não revelou diferença entre os grupos ($P < 0,05$, Figura 25G).

Na análise da citocina anti-inflamatória IL-10 na HD, a ANOVA duas vias (Tabela 8) mostrou diferença no fator de condição ($P = 0,0260$), no fator de tratamento ($P < 0,0001$) e na interação condição vs. tratamento ($P = 0,0010$) (Figura 25G). O pós-teste de Tukey revelou que o grupo CCI tratado com CBD 3 mg/kg é diferente do grupo CCI-VEI ($P < 0,05$, Figura 25H).

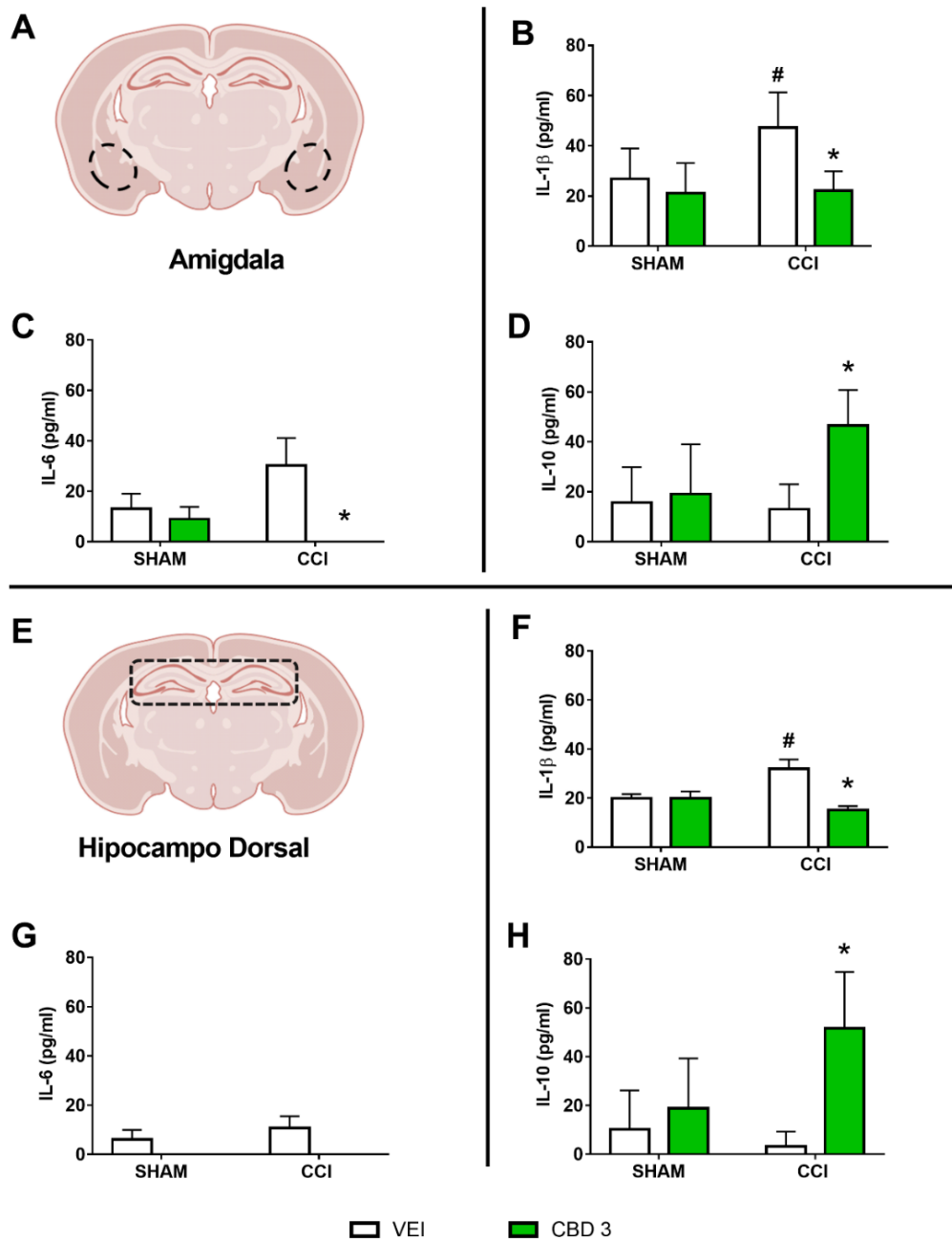


Figura 25. Avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 no HD e AMG. (A, E) Esquemas representativos das estruturas centrais analisadas. (B, C) Avaliação das citocinas IL-1 β e IL-6 na AMG; o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (D) Avaliação da citocina IL-10 na AMG; O tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (F, G) Avaliação das citocinas IL-1 β e IL-6 no HD; O tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (H) avaliação de IL-10 no HD; O tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em relação ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 5-6/grupo.

Avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 por hemisfério

Aqui, analisamos as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10, separando os dados por hemisfério esquerdo ou direito nas regiões AMG e HD (Figura 26). Quando organizamos os dados nesta nova conformação observamos que na avaliação da citocina IL-1 β no AMG, só encontramos aumento significativo na AMG esquerda ($P < 0,05$, Tabela 8). Enquanto o aumento significativo de IL-6 só foi observado na AMG direita ($P < 0,05$, Tabela 8). E o aumento de IL-10 foi em ambos os hemisférios ($P < 0,05$, Tabela 8). E quanto ao HD observamos que quando separamos os dados por hemisfério não encontramos aumento significativo de IL-1 β e IL-6 em nenhum dos hemisférios (Tabela 8). Entretanto o aumento de IL-10 foi observado nos dois hemisférios ($P < 0,05$, Tabela 8).

AMG			
Citocina	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
<i>Esquerdo</i>			
IL-1β	$F_{1,18} = 13,95, P = 0,0015$	$F_{1,18} = 7,500 P = 0,135$	$F_{1,18} = 2,642, P = 0,1215$
IL-6	$F_{1,18} = 0, P > 0,9999$	$F_{1,18} = 0, P > 0,9999$	$F_{1,18} = 0,033, P = 0,870$
IL-10	$F_{1,18} = 15,26, P = 0,0010$	$F_{1,18} = 6,78, P = 0,0179$	$F_{1,18} = 7,743, P = 0,0123$
<i>Direito</i>			
IL-1β	$F_{1,18} = 0,3781, P = 0,5463$	$F_{1,18} = 22,6, P = 0,002$	$F_{1,18} = 10,22, P = 0,005$
IL-6	$F_{1,18} = 1,387, P = 0,2542$	$F_{1,18} = 36,1, P < 0,0001$	$F_{1,18} = 17,77, P = 0,0005$
IL-10	$F_{1,18} = 0,3515, P = 0,5606$	$F_{1,18} = 18,8, P = 0,0004$	$F_{1,18} = 10,06, P = 0,0053$
HD			
Citocina	Fator condição (SHAM vs CCI)	Fator tratamento (VEI vs CBD)	Interação (condição vs. tratamento)
<i>Esquerdo</i>			
IL-1β	$F_{1,18} = 0,5836, P = 0,4548$	$F_{1,18} = 0,58, P = 0,0454$	$F_{1,18} = 2,59, P = 0,1250$
IL-6	$F_{1,18} = 0,5528, P = 0,4668$	$F_{1,18} = 0,14, P = 0,7046$	$F_{1,18} = 0,14, P = 0,7046$
IL-10	$F_{1,18} = 2,046, P = 0,1697$	$F_{1,18} = 15,3, P = 0,0010$	$F_{1,18} = 7,32, P = 0,0144$
<i>Direito</i>			
IL-1β	$F_{1,20} = 1,044, P = 0,3190$	$F_{1,20} = 4,40, P = 0,0488$	$F_{1,20} = 0,771, P = 0,0116$
IL-6	$F_{1,18} = 0,0096, P = 0,9227$	$F_{1,18} = 19,3, P = 0,0003$	$F_{1,18} = 0,009, P = 0,227$
IL-10	$F_{1,18} = 0,3493, P = 0,5619$	$F_{1,18} = 1,89, P = 0,1860$	$F_{1,18} = 2,105, P = 0,1640$

Tabela 8. Resultados obtidos a partir dos dados originais dos imunoenaios enzimáticos específicos para-IL-1 β , IL-6 e IL-10 submetidos à ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey para comparação dos grupos experimentais (fator de tratamento vs condição). Seguido

pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$ para todas as análises.

AMG				
	SHAM - VEHI	SHAM - CBD	CCI - VEHI	CCI - CBD
Citocinas	<i>Esquerdo</i>			
IL-1β	18,07	12,39	45,37	23,13
IL-6	0,0001548	0,0001667	0,0001667	0,0002
IL-10	5,814	4,896	11,63	39,5
	<i>Direito</i>			
IL-1β	35,43	30	48,72	21
IL-6	31,44	19,77	66,55	0
IL-10	27,42	33,33	14,4	52,33
HD				
	SHAM - VEHI	SHAM - CBD	CCI - VEHI	CCI - CBD
Citocinas	<i>Esquerdo</i>			
IL-1β	17,29	14,96	24,18	14,66
IL-6	0,0002	0,00044	0,0001429	0,00022
IL-10	11,44	13,55	0	59,6
	<i>Direito</i>			
IL-1β	29,82	25,16	37,06	15,72
IL-6	12,19	0	15,3	0
IL-10	8,25	24	7,25	43,65

Tabela 9. Média dos resultados obtidos a partir dos dados originais do imunoensaio enzimático específico para IL-1 β , IL-6 e IL-10. Os dados foram representados pela média dos grupos experimentais.

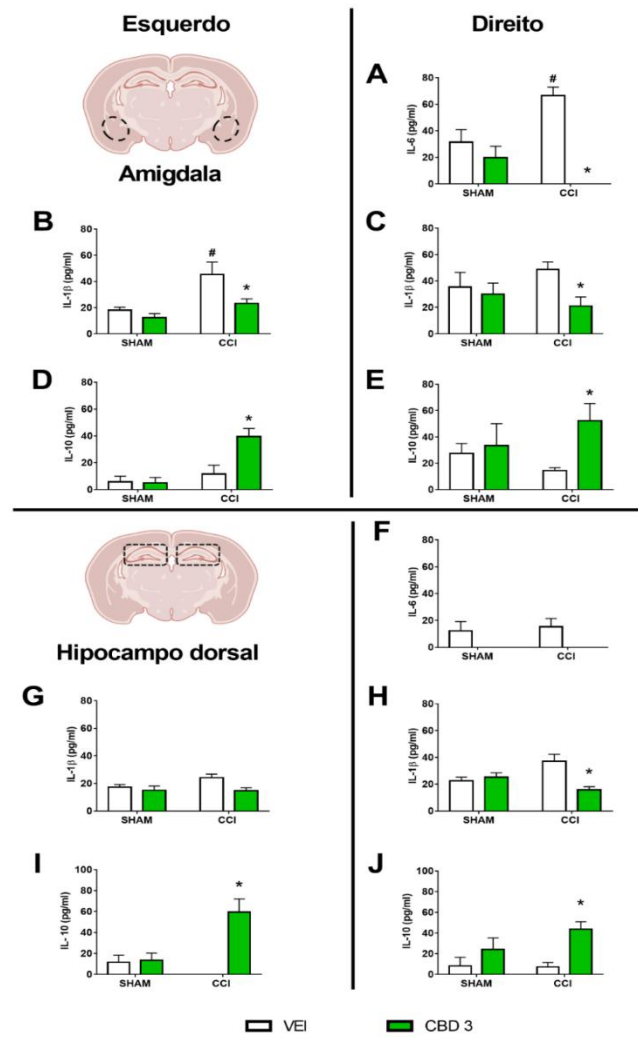


Figura 26. Avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. (A, B) Dados da análise de IL-1 β da AMG, respectivamente direita e esquerda, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (C, D) Dados da análise de IL-6 da AMG, respectivamente direita e esquerda, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas comparado ao controle CCI-VEI na AMG direita. (E, F) Dados da análise IL-10 da AMG, respectivamente direita e esquerda, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI. (G, H) Dados da análise de IL-1 β do HD, respectivamente direito e esquerdo, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI no HD. (I, J) Dados da análise de IL-6 do HD, respectivamente direito e esquerdo, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg reduziu os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI no HD direito. (K, L) Dados da análise IL-10 do HD, respectivamente direito e esquerdo, onde o tratamento com CBD 3 mg/kg aumentou os níveis de citocinas em comparação com o controle CCI-VEI no HD esquerdo. *P < 0,05 teste de Tukey comparado ao CCI-VEI ou CCI-CBD. #P < 0,05 em relação ao SHAM-VEI ou CCI-VEI. N = 5 - 6 /por grupos.

4. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstram o modelo de CCI foi capaz de induzir efeito ansiogênico no TCA, aumento do número de FosB+ (ACC, BLA e CA1 do HD) e redução da densidade neuronal mensurada por NeuN+ (BLA e CA1 do HD) em regiões do circuito corticolímbico. E que no tratamento subcrônico com CBD reverteu o CPP no teste de Aversão à Dor, reduziu o número de FosB+ (ACC, BLA e CA1 do HD), reverteu redução da densidade neuronal, o aumento promovido na expressão de GFAP e IBA-1 causado pelo modelo CCI. Essa modulação do CBD em astrócitos e micróglia ativada também atenuou as citocinas IL-1 β e IL-6 na AMG e HD e, promoveu aumento da citocina IL-10 nos animais CCI-CBD.

Observamos que o tratamento subcrônico com CBD (0,3, 3 e 10 mg/kg) reverteu o CCP no teste de aversão à dor em animais CCI. Assim, como o reforço positivo produzido pelo alívio contínuo da dor estabelecido pelo CCI foi evitado em ratos tratados sistemicamente com CBD, mesmo em doses que não alteram a nocicepção evocada por estímulos mecânicos (dose de 0,3 mg/kg, **Silva-Cardoso et al., 2021**). CPP para alívio da dor também foi demonstrado após axotomia do nervo ciático para provocar a desnervação completa da pata traseira (**Devor, 1991**), confirmando a presença de um estado aversivo que provavelmente reflete dor neuropática "espontânea" e fornece um controle importante que elimina preocupações de dor resultante da estimulação tátil durante a deambulação dentro do aparato de teste (**Qu et al., 2011**).

Além disso, nossos resultados reforçam que a dor crônica pode favorecer o aprendizado discriminativo e se encaixa facilmente em uma estrutura de aprendizado reforçando estímulos aversivos (**Genaro et al., 2017; King et al., 2009; Silva-Cardoso e Nobre, 2021**). Também é importante notar que o anestésico local (lidocaína) poderia ter atuado com efeito de paralisia induzida nas pernas, podendo atuar como punição positiva, apoiando a relação oposta excitatório-inibitória entre recompensas e punições (**Genaro et al., 2017**). Nesse caso, além do CBD não promover paralisia motora, que foi avaliada no TCA, ele pode reduzir o estado aversivo gerado pela dor do modelo CCI. Ademais, todas as doses de CBD usadas não evocaram CPP em ratos SHAM, apoiando resultados anteriores de outros modelos de dor que não produziram CPP em roedores SHAM (**Genaro et al., 2017, Parker et al., 2004, Vann et al., 2008**). Esses resultados sugerem que as três doses de CBD não são recompensadoras em ratos SHAM

e só se tornam recompensadoras em ratos CCI, devido ao alívio da dor e redução da aversão à dor gerada pelos efeitos do tratamento com CBD.

Nossos dados anteriores indicam que a cirurgia CCI pode promover comportamentos semelhantes à ansiedade em ratos (**Silva-Cardoso et.al, 2021**). Os resultados do presente estudo corroboram esse achado no TCA. Além disso, encontramos diferenças significativas entre os animais CCI tratados com CBD 3 mg/kg mesmo 4 h após a administração; os animais apresentaram comportamentos do tipo ansiolítico (aumento do tempo gasto no centro do aparato, redução da frequência de auto-limpeza e tempo de congelamento), quando comparados ao seu controle. Curiosamente, apesar da falta de efeitos ansiolíticos com CBD 0,3 e 10 mg/kg, essas doses demonstraram efeitos ansiolíticos em comportamentos complementares (frequência de auto-limpeza e tempo de congelamento) quando comparadas ao controle CCI-VEI. Esses resultados corroboram nossos dados anteriores sobre os efeitos ansiolíticos do CBD no modelo CCI (**Silva-Cardoso et al., 2021**) e são suportados pela meia-vida do CBD em ratos (**Deiana et al., 2012**). Devido aos resultados positivos com a dose de 3 mg/kg em nosso estudo e em estudos anteriores (**Silva-Cardoso et al., 2021**) e seguindo o princípio da menor dose farmacológica administrada (**Sharma e McNeill, 2009**), realizamos estudos imuno-histoquímicos nessas estruturas, com foco nessa dose específica.

O fator de transcrição da proteína FosB acumula-se de maneira específica na região do encéfalo durante a exposição crônica ao estresse, drogas de abuso ou outros estímulos crônicos (**Nestler, 2015, 2008**) e, uma vez induzido, FosB persiste no encéfalo por várias semanas após a cessação da estimulação crônica (**Carle et al., 2007**). Nossos resultados demonstram que o modelo CCI promove aumento na expressão da proteína FosB, que foi detectado pelo aumento do número de neurônios FosB+ no ACC, BLA e CA1 do HD. Esse aumento na expressão de FosB+ foi revertido nessas regiões pelo tratamento subcrônico com CBD na dose de 3 mg/kg. O acúmulo gradual de proteína FosB fortalece a formação e manutenção de memórias habituais e comportamentos compulsivos, talvez aumentando a eficácia dos circuitos neuronais (**Nestler, 2001**). Nossos achados demonstram que a diminuição da imunorreatividade FosB+ nessas regiões do circuito corticolímbico pode trazer nossos achados para elucidar o mecanismo de ação do CBD na modulação da dor crônica. Além disso, os produtos do gene FosB contribuem para a ativação excitotóxica da microglia (**Nomaru**

et al., 2014). Curiosamente, as mudanças na expressão da microglia também foram detectadas nesse estudo e serão discutidas mais adiante.

Embora várias estruturas encefálicas contribuam para o processamento da dor e da emoção, os circuitos que envolvem o ACC são consistentemente ativados em estudos de dor neuropática e estão envolvidos na dimensão afetiva da dor (**Han et al., 2015; Hoffbauer et al., 2001; Ong et al., 2019; Rainville et al., 1997**). Deve-se notar que, dada sua rica conectividade funcional, o ACC é uma complexa estrutura que regula o aumento da aversão à dor (**Porreca e Navratilova, 2017; Xiao e Zhang, 2018; Zhang et al., 2017**) além de ser um centro crítico para percepção nociceptiva e ansiedade relacionada à dor (**Gungor e Johansen, 2019; Guo et al., 2018; Liu et al., 2019; Rubino et al., 2008**). Isso corrobora nossos dados sobre o aumento da expressão de neurônios FosB+ no ACC que estão possivelmente associados aos comportamentos ansiogênicos observados nos animais CCI-VEI avaliados no TCA. No entanto, os neurônios do ACC projetam e recebem informações de várias regiões importantes para o processamento da dor, como a AMG (**Corder et al., 2019; Neugebauer, 2015; Wilson et al., 2019**). As projeções neuronais diretas do ACC para o BLA desempenham papel crítico na modulação das funções emocionais, como aprendizado, medo e aversão à dor (**Allsop et al., 2018; Jhang et al., 2018**). A AMG recebe informações multissensoriais das regiões corticais por meio do BLA e envia e recebe projeções diretas de informações nociceptivas do núcleo parabraquial (PB) (**Bianchi et al., 1998; Strobel et al., 2014**) e este está diretamente envolvido com a cronicidade da dor. O PB, por meio de suas conexões bidirecionais com o BLA, pode modular emoções negativas relacionadas à dor e ao medo, principalmente aquelas envolvidas com o circuito neural que processa o componente afetivo-motivacional da dor (**Seno et al., 2018**) e respostas emocionais positivas, como recompensa (**Cai et al., 2018**). Esses resultados, portanto, corroboram resultados prévios de aumento da excitabilidade neuronal encontrado no BLA de animais CCI-VEI (**Cramer et al., 2021**) (ver Apêndice D).

Ademais, corpos celulares imunorreativos CB1 já foram demonstrados em áreas corticais (ACC e córtex insular), BLA e HD (**Katona et al., 2001; Moldrich e Wenger, 2000; Silva-Cardoso et al., 2021; Tsou et al., 1998**). Além disso, foi demonstrado que a sinalização de endocanabinóides regula seletivamente a atividade pré-sináptica no PB (**Cramer et al., 2021**). Uma vez que a ativação dessa via é antinociceptiva, e a ativação do CB1 no PB pode suprimir a atividade pré-sináptica via sinalização retrógrada do neurônio pós-sináptico, o que reduz a probabilidade de liberação de glutamato e GABA,

evitando alterações na atividade tônica do CB1 pelo aumento da excitação do PB, que, conseqüentemente, modula diretamente a via PB-BLA (Raver et al., 2020; Uddin et al., 2018; Woodhams et al., 2017). Assim, a dor crônica pode ser vista como um estado de aprendizado emocional resistente à extinção (Apkarian, 2008) e há evidências anteriores de ativação de HD durante a dor neuropática, apoiando o controle de HD tanto da alodínia tátil, quanto das propriedades motivacionais/afetivas da dor neuropática. Além disso, esses dados reforçam nossos achados sobre o papel do hipocampo (GrDG e CA1) na ansiedade relacionada à dor. Finalmente, é importante notar que a dor crônica, como um forte estressor, é conhecida por causar transtornos emocionais negativos de comorbidade, incluindo ansiedade, estresse e depressão em pacientes com dor crônica (Cai et al., 2018; Li et al., 2021, 2017, 2019).

Para melhor compreensão de nossos achados sobre a expressão da proteína FosB, avaliamos também a densidade neuronal nas mesmas estruturas. Observamos que no modelo CCI promoveu redução da densidade neuronal no BLA e CA1 dos animais e o tratamento com CBD 3 mg/kg foi capaz de reverter essa redução, mas não promoveu efeitos no GrDG. Além disso, o CBD promoveu aumento na densidade neuronal no ACC dos animais CCI-VEI. Embora não tenhamos usado marcadores específicos para medir a neurogênese, é importante mencionar que ela desempenha papel importante na resposta ao estresse, ativando o controle negativo induzido pelo hipocampo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e influenciando a formação da memória e o aprendizado (Ehninger e Kempermann, 2006; Schoenfeld e Gould, 2012; Snyder et al., 2011). Alterações neuroplásticas, como redução da densidade da coluna e retração dendrítica, foram mostradas em modelos animais com dor persistente, mas o comprometimento da neurogênese que ocorre no desenvolvimento da dor neuropática é específico nas regiões do hipocampo (Dellarole et al., 2014). Da mesma forma, em um modelo de dor inflamatória (modelo de CFA), a lesão na pata direita induziu neurodegeneração bilateral no hipocampo (Duric e Mccarson, 2006). Curiosamente, embora o CBD promova a neurogênese hipocampal (Campos et al., 2016, 2013; Luján et al., 2020; Luján e Valverde, 2020; Razavi et al., 2021), em um modelo de dor persistente, nenhuma mudança foi observada no GrDG (Duric e Mccarson, 2006), o que corrobora nossos achados.

A efeito pró-neurogênese do CBD mostra grande consistência entre as doses; os achados da literatura relatam aumentos na proliferação e diferenciação neuronal após doses de CBD variando de 3 a 30 mg/kg (Luján et al., 2020; Luján e Valverde, 2020).

Vale ressaltar que a interação protetora envolvendo processos de neuroinflamação já foi observada e CBD pode modular este efeito via receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ) - é um fator de transcrição modulado por ligante amplamente expresso que governa a expressão de genes envolvidos na inflamação (Cai et al., 2018) - a ativação está associada ao aumento da atividade neurogênica, bem como à redução da gliose reativa hipocampal (Esposito et al., 2011), o que corrobora nossos dados sobre a expressão de GFAP nas estruturas ACC, BLA, GrDG e CA1.

Os astrócitos desempenham papel importante na manutenção da função neuronal normal, participando de processos responsáveis pela captação de neurotransmissores, manutenção da homeostase dos íons, migração neuronal durante o desenvolvimento e síntese, depuração e liberação de aminoácidos neuroativos (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011, Sidoryk-Wegrzynowicz e Strużyńska, 2021; Siracusa et al., 2019). Além disso, os astrócitos são as principais células que regulam os níveis sinápticos de glutamato, e a citotoxicidade do glutamato é uma das principais causas de dano neuronal (Kozela et al., 2017). Em relação à microglia, avaliamos as alterações na expressão da proteína IBA-1, a proteína de ligação ao cálcio expressa especificamente neste tipo de célula (Aguzzi et al., 2013; Gogoleva et al., 2019; Su et al., 2016). Nossos resultados demonstram que no modelo CCI promoveu aumento na expressão de GFAP no ACC, BLA, GrDG e CA1 do HD. Tal aumento foi prevenido pelo tratamento subcrônico com CBD 3 mg/kg. O CCI também promoveu aumento da expressão de IBA-1 no ACC, BLA e CA1 do HD; esse aumento também foi revertido pelo tratamento subcrônico com CBD 3 mg/kg.

A ativação de microglia e astrócitos já foi observada em modelos de dor neuropática central, como lesão medular, e modelos de dor neuropática periférica, como CCI (Cao e Zhang, 2008; Gwak et al., 2017; Miranpuri et al., 2021). Além disso, os astrócitos estão intimamente associados à dor crônica e às alterações na atividade das sinapses. Durante o desenvolvimento da dor, as respostas da microglia são tipicamente precoces e transitórias, enquanto a ativação dos astrócitos é mais tardia e dura mais do que a microglia (Gao e Ji, 2010; Li et al., 2019). Nossos resultados concordam com a literatura e, curiosamente, também demonstramos que essas alterações persistiram por pelo menos 25 dias após a lesão do CCI, o que reforça as alterações neuroplásticas que a dor crônica promove nas estruturas do circuito corticolímbico, como o ACC, BLA e HD.

Ademais, os astrócitos corticais também desempenham papel importante na dor crônica; estudos mostraram que astrócitos ativados em regiões cerebrais relacionadas à regulação emocional (ACC e HD) estão associados à disfunção emocional em estados de dor crônica (Apkarian, 2011, 2011; Apkarian et al., 2005; Eto et al., 2011), o que foi evidenciado pelos resultados comportamentais e imuno-histoquímicos do presente estudo. Aliás, estudos usando uma variedade de modelos de dor crônica mostraram que a expressão de GFAP no ACC aumenta sob dor crônica (Ikeda et al., 2013), e está envolvida na regulação da experiência da dor e das emoções negativas associadas à dor (Narita et al., 2006). Vale ressaltar que os astrócitos desempenham papel fundamental na regulação do equilíbrio entre GABA e glutamato, e um desequilíbrio entre esses neurotransmissores pode ser o mecanismo subjacente da dor crônica (Li et al., 2019). Evidências indicam que alterações adaptativas nos astrócitos hipocâmpais estão associadas a transtornos de humor em estados de dor persistente. Por exemplo, o número de astrócitos hipocâmpais GFAP-positivos foram aumentados em ratos submetidos a CCI em comparação com ratos SHAM (Panigada e Gosselin, 2011), o que corrobora nossos achados neste estudo. Além disso, a expressão de astrócitos ativados no hipocampo pode indicar que eles estão envolvidos na dor persistente e nos transtornos de humor (Fiore e Austin, 2019, 2018, 2016), o que pode explicar nossos resultados de aumento dos neurônios GFAP e FosB+ nas mesmas regiões, sugerindo que a atividade dos astrócitos pode estar subjacente ao aumento do disparo neuronal nestas regiões, provavelmente pelo aumento da neurotransmissão glutamatérgica (ACC, BLA, GrDG e CA1 de HD).

Em geral, as citocinas supraespinais atuam como neuromoduladores, compartilhando semelhanças com neuropeptídeos e operando sob condições fisiológicas normais dentro de uma "rede de citocinas" de neurônios, microglia e astrócitos que podem regular a produção de citocinas (Fiore e Austin, 2016). Nossos dados apontam para um aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 β na AMG e HD de animais CCI; este aumento foi revertido pelo CBD 3 mg/kg. Não encontramos diferenças significativas na avaliação de IL-6 em ambas as estruturas. Em contraste, observamos aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 em animais CCI tratados com CBD 3 mg/kg.

Em particular, os astrócitos modulam os fenótipos microglial e a fagocitose por meio de crosstalk astrócitos-microglia e regulam a transmissão sináptica excitatória por meio de interações astrócitos-neurônios (Jha et al., 2019; Li et al., 2019). As moléculas

sinalizadoras envolvidas incluem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6), fatores de transcrição gênica, quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), proteínas (GFAP, conexinas e aquaporina 4), entre outros fatores (**Koyama, 2014**). As citocinas não estão apenas envolvidas no crosstalk astrócitos-microglia, mas também na dor inflamatória e na dor neuropática (**Cao e Zhang, 2008; Ji et al., 2013; Li et al., 2019**).

Evidências indicam que a IL-1 β está envolvida na sensibilização da dor e é regulada positivamente na microglia espinhal e astrócitos após lesão de nervo periférico (**Cao e Zhang, 2008; Kiguchi et al., 2012**). O modelo CCI aumenta as citocinas IL-6 e IL-1 β na medula rostral ventromedial (**Austin et al., 2015**) e induz adaptações neuronais de citocinas gliais no hipocampo (**Fiore e Austin, 2018**). Esta informação corrobora nossos achados de GFAP, IBA-1 e IL-1 β aumentados em animais CCI-VEI. Além disso, as citocinas sensibilizam diretamente os canais de cátions sensíveis ao calor no canal de cátions do receptor transiente V subfamília 1 (TRPV1) (**Kiguchi et al., 2012**), o que corrobora nossos achados que compõe parte desta tese (Capítulo II), onde observamos aumento da expressão de TRPV1 em animais submetidos a CCI (**Silva-Cardoso et al., 2021**).

A IL-1 β reduz as correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas nos neurônios do hipocampo, mas aumenta as correntes mediadas por NMDA que promovem aumento da neurotoxicidade (**Viviani et al., 2003**) e reduz a produção de BDNF, o que prejudica a neurogênese (**Fiore e Austin, 2016**). Isso corrobora nossos achados quanto à redução da densidade neuronal em CA1 do HD. Além disso, a literatura demonstra que o modelo CCI aumenta a expressão de IL-1 β e IL-6 no ACC e reduz a expressão de BDNF, enquanto a ativação de receptores NMDA no ACC pode modular a aversão condicionada ao lugar (**Gungor e Johansen, 2019; Johansen e Fields, 2004; King et al., 2009**). Acreditamos que o tratamento com CBD possa estar modulando esta atividade no ACC em nosso estudo, em relação à atenuação dessas citocinas, bem como um efeito pró-neurogênico, visto em nossos resultados de NeuN+, em que os animais CCI-CBD tiveram aumento na densidade neuronal e reverção das alterações na densidade neuronal na região BLA e CA1 do HD. Além disso, a pode ter ocorrido modulação do ACC pela administração de CBD, resultando na reverção da aversão à dor no teste CPP e indução dos efeitos ansiolíticos observados no TCA.

A atividade glial está ligada à sinalização do glutamato e modulação de comportamentos afetivos, através da ativação de astrócitos (**Narita et al., 2006**) e aumento de comportamentos de fuga/evitação em animais (**LaGraize et al., 2004**). A

supressão específica de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 induzida pelo tratamento com CBD pode proporcionar alívio anti-inflamatório para os animais, pois a IL-6 também é um potente mediador pró-inflamatório envolvido na indução da fase aguda de respostas pró-inflamatórias (Nagarkatti et al., 2009; Suryavanshi et al., 2021). Uma das funções mais amplamente caracterizadas da IL-6 é seu papel influente na estimulação da produção de proteínas envolvidas com a fase aguda pró-inflamatória (Gabay, 2006; Gabay e Kushner, 1999). Acreditamos que por isso não observamos diferenças significativas de IL-6 em nossos animais CCI-VEI. Além disso, o papel que a IL-1 β desempenha na regulação da transcrição de IL-6 também é de particular importância, pois não apenas induz a atividade do promotor de IL-6 no nível transcricional, mas também aumenta a secreção da proteína IL-6 de maneira dependente da atividade nuclear fator κ B (NF- κ B) e proteína ativadora 1 (AP-1) - principais fatores de transcrição que orquestram a expressão de muitos genes envolvidos na inflamação (Fujioka et al., 2004; Szabo-Fresnais et al., 2008). Assim, é possível que a supressão da IL-1 β pela administração de CBD (Esposito et al., 2007), possa estar mediando indiretamente a produção de IL-6, contribuindo para a supressão da expressão de IL-6 (Sermet et al., 2021) como observado no presente estudo. O aumento da liberação de IL-10 induzida por endocanabinóides pela microglia é um fenômeno compartilhado com outras áreas do sistema nervoso central (Correa et al., 2010; van den Hoogen et al., 2022; Wu et al., 2019), o que corrobora nossos achados. Podemos inferir que a redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias pela microglia estão associados à redução do comportamento da dor observada nos animais (Silva-Cardoso et al., 2021).

O CBD produziu neuroproteção (Do Val-da Silva et al., 2017; Mori et al., 2017) e reduziu a reação glial (Napimoga et al., 2009; Perez et al., 2013) em nossos resultados. Portanto, demonstramos que o tratamento com CBD atenua a produção de citocinas inflamatórias e a ativação das células microglial na dor crônica. Além disso, os produtos da transcrição de FosB também podem contribuir para a atividade excitotóxica exibida pela micróglia (Nomaru et al., 2014), o que pode ajudar a estabelecer a relação entre a ativação da microglia e o aumento da atividade neuronal (neurônios FosB+) que foi observado no grupo CCI-VEI.

A AMG desempenha papel fundamental no processamento emocional e no componente emocional-afetivo da dor (Andreoli et al., 2017; Becker e Carrasquillo, 2019; Carrasquillo e Gereau, 2008; Ji et al., 2018; Neugebauer et al., 2020). Além

disso, é importante mencionar que a informação nociceptiva detectada no lado esquerdo do corpo é amplamente processada pelo hemisfério direito do encéfalo e vice-versa (Allen et al., 2021; LeDoux, 2003; Phillips e LeDoux, 1992). Nossos dados indicam que, embora o tratamento com CBD tenha atenuado a citocina IL-1 β e IL-6, esse aumento significativo na citocina foi observado apenas na AMG esquerda (contralateral) nos animais CCI-VEI (ver Tabela 7 e Figura 26). As AMG esquerda e direita levam a hiperalgesia mecânica e térmica após lesão poupada do nervo ciático do lado direito (Allen et al., 2021; Cooper et al., 2018) e os neurônios da AMG direita têm conexões cerebrais bilaterais, enquanto os neurônios da AMG esquerda são predominantemente restritos à periferia contralateral (Ji et al., 2007, 2018). No entanto, Cooper et al (2019) propõem que a lateralização funcional da AMG é alterada durante a dor crônica: onde a AMG direita, mas não a esquerda, é pronociceptiva durante os estados iniciais de dor, enquanto a atividade do lado esquerdo e/ou direito a AMG pode estar associada à hipersensibilidade mecânica e térmica durante a cronificação da dor neuropática. Isso corrobora nossos dados sobre a medida de IL-1 β e IL-6 na AMG de diferentes hemisférios e reforça a importância de avaliar as alterações neuroplásticas bilaterais geradas pela dor crônica em estruturas do circuito cortilímbico.

Podemos concluir que as medidas de dor no modelo CPP podem melhorar nossa compreensão dos mecanismos e circuitos cerebrais subjacentes ao componente afetivo da dor e à recompensa do alívio da dor. A manifestação de CPP em ratos CCI, juntamente com a falta de CPP em ratos SHAM, podem ser usadas para medir a eficácia do tratamento para aliviar a dor crônica. Muitas das alterações cerebrais observadas em pacientes com dor crônica envolvem regiões que codificam contextos afetivos, emocionais e motivacionais (Baliki e Apkarian, 2015). Nossos achados demonstram que o tratamento com CBD (3 mg/kg) modula efetivamente essas mudanças principalmente nos circuitos de recompensa/motivação e aprendizado que podem prevenir os distúrbios de comorbidade emocional frequentemente observados em pacientes com dor crônica, como ansiedade. Além disso, observamos que o CBD reduz a ativação neuronal no ACC, BLA e HD e reverteu a expressão de micróglia e astrócitos ativados, além de promover a atenuação de citocinas pró-inflamatórias, e o aumento de citocinas anti-inflamatórias. Assim, o CBD pode atuar em substratos encefálicos que contribuem para a supressão e modulação da dor crônica, como os locais encefálicos envolvidos com o circuito corticolímbico. O comportamento motivado e os circuitos neurais que medeiam aversão e recompensa são altamente conservados entre as espécies

(Navratilova et al., 2013), e a tradução desses achados pode ajudar a compreender melhor as alterações encefálicas durante a dor crônica e beneficiar o desenvolvimento de terapias para dor crônica em humanos.

Considerações finais

Em nosso levantamento inicial da literatura (Capítulo I), concluímos que o CBD é um composto natural bem tolerado e seguro de que exercia efeitos analgésicos em vários modelos animais de dor crônica, bem como em estudos clínicos. Entretanto o tratamento crônico com CBD apesar demonstrar efeitos terapêuticos de longo prazo sem efeitos colaterais significativos ou o desenvolvimento de tolerância, ainda havia a discussão de uma falta de padronização de doses ou o estabelecimento de uma curva dose-resposta para um modelo de dor crônica, além da carência de estudos com dor espontânea e avaliação do componente afetivo-motivacional nos modelos animais.

Em Silva-Cardoso et al., 2021 (Capítulo II), demonstramos como novidade uma curva dose-resposta utilizando um tratamento subcrônico (3 dias) com CBD e este promoveu efeitos antialodínicos, anti-hiperalgésicos e ansiolíticos em um modelo de dor neuropática e ademais foi capaz de modular a expressão de CB1R e TRPV1R em estruturas corticais e límbicas, adicionando evidências substanciais ao papel do neurocircuito corticolímbico ACC- AIC-BLA, HV-BLA e HD-BLA para regulação da dor (dependendo da condição patológica ou não dos animais).

Com intuito de investigar o CBD em um teste de dor espontânea usamos o CPP e observamos que a manifestação de CPP em ratos CCI, juntamente com a falta de CPP em ratos SHAM, podem ser usadas para medir a eficácia do tratamento para aliviar a dor crônica. Nossos achados demonstram que o tratamento com CBD (3 mg/kg) modula efetivamente essas mudanças principalmente nos circuitos de recompensa/motivação e aprendizado que podem prevenir os distúrbios de comorbidade emocional frequentemente observados em pacientes com dor crônica, como ansiedade. Além disso, observamos que o CBD reduz a ativação neuronal no ACC, BLA e HD e reverteu a expressão de micróglia e astrócitos ativados, além de promover a atenuação de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, o aumento de citocinas anti-inflamatórias (Capítulo III).

Embora nosso trabalho seja um dos primeiros a utilizar o modelo CCI e demonstrar essas alterações neuroplásticas dos receptores CB1 e TRPV1, ainda é complexo entender os efeitos do grupo CCI-CBD na relação desses receptores com a

modulação da dor crônica. Acreditamos que mais estudos com manipulações farmacológicas diretas sejam necessários para entender melhor essa modulação.

Assim, podemos concluir que o CBD pode atuar em substratos encefálicos que contribuem para a supressão e modulação da dor crônica, como regiões do circuito corticolímbico. O comportamento motivado e os circuitos neurais que medeiam aversão e recompensa são altamente conservados entre as espécies (Navratilova et al., 2013), e a tradução desses achados pode ajudar a compreender melhor as alterações cerebrais durante a dor crônica e beneficiar o desenvolvimento de terapias para dor crônica em humanos esses resultados são clinicamente relevantes, pois contribuem para a evidência dos efeitos benéficos do CBD no tratamento da dor crônica e comorbidades associadas, como ansiedade. Por fim acreditamos que o uso de CBD parece ser uma estratégia promissora para o tratamento da dor crônica e uma opção para pacientes não responsivos aos tratamentos convencionais para dor crônica, felizmente, nos últimos anos, estamos testemunhando uma onda constante de países que estão legalizando o uso medicinal da *Cannabis* que favorece o desenvolvimento de mais pesquisas clínicas com o CBD, estudos pré-clínicos e ensaios clínicos.

Apêndices

Apêndice A

References	Preclinical Model Specie/ Strain	Treatments	Main findings for pain management
Peripheral and Central injuries			
Abraham et al. 2020	pSNL in male and female mice C57/bl6	Repeated treatment: Voluntary consumption in 20 mg/ml CBD gelatin	↑ von Frey's threshold
Belardo et al., 2019	TBI in male C57BL/6 mice	Repeated treatment: CBD (30 ml, oil 10%) was administered via gavage from day 1 to day 14 and from day 50 to day 60	↓ von Frey's threshold
Comelli et al. 2008	CCI in male <i>Wistar</i> rats	Repeated treatment: CBD 10 mg orally, once a day for 7 days	↑ the thermal thresholds in the Hargreaves test ↑ mechanical thresholds in the von Frey
Costa et al. 2007	CCI in male <i>Wistar</i> rats	Repeated treatment: CBD (2.5–20 mg/kg, ip), once daily, for seven days, starting one week after CCI	↑ the thermal thresholds in the Hargreaves test ↑ mechanical thresholds in the von Frey
De Gregorio et al. 2019	SNI in male <i>Wistar</i> rats	Repeated treatment: 5 mg/kg/day for a sc administration for 7 days	↑ von Frey's threshold
Li et al. 2018	SCI in female C57BL/6 mice	Repeated treatment: 1.5 mg/kg ip CBD (injections 1 h and 24 h post injury, and on day 3 and then twice a week	--
Mitchell et al. 2021	CCI in male C57BL/6 mice	Repeated treatment: CBD administered by oral gavage (20g oral feeding needle, volume = 0.01 ml)	↓ the scores on the acetone test
Rodríguez-Muñoz et al. 2018	Seizures (NMDA (0.3 and 1 nmol/mouse icv, in a volume of 4 µL sterile saline) in male albino CD-1 mice and homozygous ($\sigma 1R^{-/-}$)	CBD 10 nmol icv	--
Silva-Cardoso et al. 2021	CCI in male <i>Wistar</i> rats	Repeated treatment: 0.3, 3, 10 and 30 mg/kg/day for a ip administration for 3 days	↑ von Frey's threshold ↓ the scores on the acetone test ↓ the thermal thresholds in the hot plate test
Wong et al. 2019	Rat model of myofascial pain (injection of NGF (25 µg/ml, 10 µL) in female <i>Sprague-Dawley</i> rats	Acute treatment: CBD (1 and 5 mg/ml) 10 µL was injected intramuscularly	↑ the von Frey threshold at the 5mg dose between 10 and 30 min after injection

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy			
Harris et al. 2016	Cisplatin-induced in male C57BL/6 mice	Repeated treatment: CBD (0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/kg i.p.)	--
King et al. 2017	Paclitaxel solution in male C57Bl6 mice	Acute treatment: CBD (0.625–20 mg/kg i.p.) 15 min before paclitaxel injection	↑ von Frey's threshold in days 9 and 14.
Ward et al. 2011	Paclitaxel solution in male and female C57Bl/6 mice	Repeated treatment: CBD (5.0 or 10.0 mg/kg i.p.) injected once daily on days 1 to 14	↑ the thresholds in the von Frey ↓ the scores on the acetone test
Ward et al. 2014	Paclitaxel solution in female C57Bl mice	Repeated pretreatment: CBD (2.5 and 5.0 mg/kg i.p.) for 10 weeks	↑ the thresholds in the von Frey *demonstrates a protective effect against the neurotoxicity induced by the model
Type I diabetes-induced peripheral neuropathy			
Jesus et al. 2019	Streptozotocin (60 mg/kg) in male <i>Wistar</i> rats	Repeated pretreatment: CBD (0, 0.1, 0.3 or 3 mg/kg, ip) for 14 days	↑ the thresholds in the von Frey test at the dose of 3 mg/kg
Toth et al. 2010	Streptozotocin (60 mg/kg) in male CD1 mice	Repeated pretreatment: Intranasal CBD (24 µL - drops of 6 µL each through an eppendorf pipettor over alternating nostrils every 1 min) for 3 months	↑ the thermal thresholds in the Hargreaves test ↑ von Frey's threshold
Osteoarthritis and Arthritis induced peripheral neuropathy			
Hammel et al., 2016	100 µL Complete Freund's adjuvant injected in knee joint in male <i>Sprague-Dawley</i> rats	Subchronic treatment: CBD gels (0.6, 3.1, 6.2 or 62.3 mg/day) for 4 days	↓ in Spontaneous pain rating scores at the doses 6.2 and 62.3 mg de CBD por 4 days ↑ the thermal thresholds in the Hot plate test
Philpott et al. 2017	Sodium monoiodoacetate model of osteoarthritis in male <i>Wistar</i> rats	Acute treatment: CBD (100, 200, or 300 mg in 100 mL s.c.), joint mechanosensitivity was assessed for an additional 15 minutes	↑ von Frey's threshold
Sclerosis Multiple			
Giacoppo et al. 2015	Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide - 300 µL s.c. + Complete Freund's Adjuvant (300 µg <i>Tuberculosis</i> H37Ra) + <i>B. Pertussis</i> (100 µL) ipl in male	Acute treatment: Topical lower limb CBD with 1% cream every 24 hours.	↑ the threshold to the mechanical stimulus in Needle test

C57BL			
Inflammatory persistent pain			
Brinch 2020	Complete Freund's Adjuvant (0.1 ml ipl) in male and female <i>Sprague-Dawley</i> rats	Repeated pretreatment: CBD (1,25, 2,5, 5,0 or 10 mg/kg. ip) twice day drug for 3 days	↑ von Frey's threshold in dose of 2.5 mg/kg *no sex-related variation
Rock et al. 2018	Carrageenan (0.1 ml ipl) in male <i>Sprague-Dawley</i> rats	Acute pretreatment: CBDA (10, 1000 µg/kg, ip) or CBD (100, 10,000 µg/kg, oral gavage), Acute pós-treatment: CBDA (10, 1000 µg/kg, i.p.)	Acute pretreatment CBD: ↑ threshold in the Hargreves test dose of 10,000 µg/kg, oral gavage Acute pós-treatment: --
Xiong et al. 2012	Complete Freund's Adjuvant (suspended in an oil/saline 1:1 emulsion ipl) in male C57BL/6 mice	Acute treatment: CBD (50 mg/kg i.p.) and intrathecal (50 µg)	↑ threshold in the Hargreves test

Abbreviations: i.p. – Intraperitoneal; i.cv. - intracerebroventricular; ipl. – Intraplantar; sc. – subcutaneously; WT – wild type; CBD – Canabidiol, pSNL - Partial spared nerve lesion, CCI - chronic constriction injury, SNI - Spared nerve injury, SCI - Spinal cord injury, TBI - Traumatic Brain Injury, CFA - Complete Freund's Adjuvant, -- no significant differences,

Tabela S1. Canabidiol e seus efeitos em modelos animais de dor crônica.

Apêndice B

Clinical translation: CBD and their effects on chronic pain patients			
References	Treatments	Profile of patients/Origin of chronic pain	Results/Conclusion
Capano et al 2020	Full hemp extract cannabidiol (CBD) on opioid use soft gel contained 30 mg CBD for 8 weeks	Total 97 patients, between 30 and 65 years old with chronic pain who have been on opioids for at least 1 year	Reduction pain, and reduced or eliminated their opioids
Cuñetti et al 2018	CBD 50 to 150 mg twice a day for 3 weeks for chronic pain	Total 7 patients between 58 and 75 years old with chronic pain (kidney transplant patients)	Reduction pain
Good et al 2019	CBD oil solution (100 mg/mL formulation, dose range 50 mg to 600 mg per day) for 28 days	Total de 144 Patients in advanced histologically proven cancer diagnosis (metastatic or locally advanced)	*Data not yet released
Hendricks et al 2019	CBD 10 mg oral and increases after 2 weeks to 10 mg two times per day, for 12 weeks	Total de 180 patients with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis	*Data not yet released
Xu et al 2020	CBD transdermal application of oil (250 mg) for 4 weeks	Total de 29 patients with symptomatic peripheral neuropathy population included 62.1% males and 37.9% females with a mean age of 68 years	Reduction pain, cold and itchy sensations

Abbreviations: CBD – Cannabidiol

Tabela S2. Translacional clínico: CBD e seus efeitos em pacientes com dor crônica

Apêndice C

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO CEUA – FORP/USP**

Certificamos que o projeto intitulado **“Tratamento sistêmico com canabidiol em modelo de dor neuropática: avaliação dos componentes sensorial-discriminativo e emocional-motivacional da sensibilidade dolorosa”**, Protocolo nº 2018.1.103.58.5, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 18/04/2018.

Vigência do Projeto	01/05/2018 a 31/11/2021
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo / Wistar Hannover
Nº de animais	240
Peso/Idade	220 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 18 de abril de 2018.


Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Apêndice D

Circuito amígdala-parabraquial e a regulação da dor: controle da transmissão sináptica e excitabilidade neuronal no núcleo parabraquial

Este apêndice da tese é uma adaptação do manuscrito publicado na *Neurobiology of Pain* em 14 de dezembro de 2020; Edição de Janeiro-Julho 2021. (doi: 10.1016/j.ynpai.2020.100057), intitulado “*Control of synaptic transmission and neuronal excitability in the parabrachial nucleus*”.

1. Contextualização

Um foco recente no núcleo parabraquial (PB) na última década, levantou a questão de ele hoje ser reconhecido como o principal transmissor de informações nociceptivas para os circuitos moduladores da dor, e de plasticidade neste circuito amígdala-parabraquial. As influências de cima para baixo das estruturas superiores, incluindo o hipotálamo, a amígdala e as áreas pré-frontais mediais, também são consideradas componentes deste circuito. O desafio é desvendar os mecanismos pelos quais um contexto comportamental específico envolve circuitos distintos para melhorar ou suprimir a dor e entender como esses mecanismos contribuem para a dor crônica (**Chen e Heinricher, 2019**). O PB é uma estrutura funcional e anatomicamente complexa envolvida em uma série de funções homeostáticas e sensoriais (**Davern, 2014; Han et al., 2015; Kaur et al., 2013; Meek et al., 2016; Sakai e Yamamoto, 1998; Yokota et al., 2015**), incluindo a nociceção (**Gauriau e Bernard, 2002; Neugebauer, 2015**). Recebe estímulos nociceptivos através do trato espinoparabraquial. Neurônios nociceptivos foram identificados no PB, com maior densidade na região lateral (**Bernard et al., 1994; Bourgeais et al., 2001; Hermanson e Blomqvist, 1996**). Um subconjunto de neurônios nociceptivos no PB são implicados no recrutamento de circuitos da amígdala, e são importantes para a dimensão afetiva da dor (**Neugebauer, 2015**), modulando as funções sensoriais, homeostáticas e aversivas (**Palmiter, 2018; Chiang et al., 2019, 2020**). Seu papel no processamento da dor é destacado por suas conexões recíprocas com regiões cerebrais associadas aos aspectos sensoriais e afetivos da dor (**Fulwiler e Saper, 1984; Jasmin et al., 1997; Chen et al., 2017**), bem como com regiões de controle modulatório descendente da nociceção (**Roeder et al., 2016; Chen et al., 2017; Chen e Heinricher, 2019**).

Além da nocicepção normal, o PB também contribui para condições patológicas de dor. Usando uma combinação de modelos de ratos e camundongos, já foi demonstrado que a dor crônica está causalmente relacionada à amplificação das respostas no PB e à inibição reduzida de neurônios no PB pela amígdala central (Uddin et al., 2018; Raver et al., 2020). Esses achados sugerem que os mecanismos que regulam a eficácia da transmissão sináptica dentro do PB, bem como a excitabilidade intrínseca dos neurônios do PB, contribuem significativamente para a nocicepção normal e desregulada. A forma como essa regulação ocorre, no entanto, ainda não foi determinada. Este estudo teve como foco avaliar vários receptores de neurotransmissores comumente associados à nocicepção, bem como à modulação da transmissão sináptica, que são expressos no PB, incluindo aqueles ativados por GABAB e endocanabinóides tipo 1 (CB1). Embora a presença dessas vias de sinalização seja conhecida, seu impacto funcional nos neurônios PB não está bem estabelecido. Em particular, pouco se sabe sobre como esses receptores são distribuídos entre aferentes inibitórios e excitatórios ou se seus efeitos são tendenciosos para a regulação pré ou pós-sináptica. Nossa capacidade de entender como o PB contribui para a dor crônica requer entender como esses neuromoduladores afetam a liberação sináptica e a excitabilidade neuronal em condições normais.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Todos os procedimentos com animais foram revisados e aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da University of Maryland e seguiram o guia do National Institutes of Health para o cuidado e uso de animais de laboratório. Usamos camundongos adultos machos e fêmeas (~ 7 a 13 semanas) C57Bl6/J (n = 64, Jackson Laboratory) de nossa colônia interna. Como a frequência de eventos sinápticos nesses animais era indistinguível daquela em camundongos C57Bl6/J ($p \geq 0,34$, Mann-Whitney U), combinamos os dados dessas cepas. Da mesma forma, como a frequência de eventos sinápticos em machos e fêmeas era indistinguível ($p = 0,68$, Mann-Whitney U), combinamos os dados de ambos os sexos.

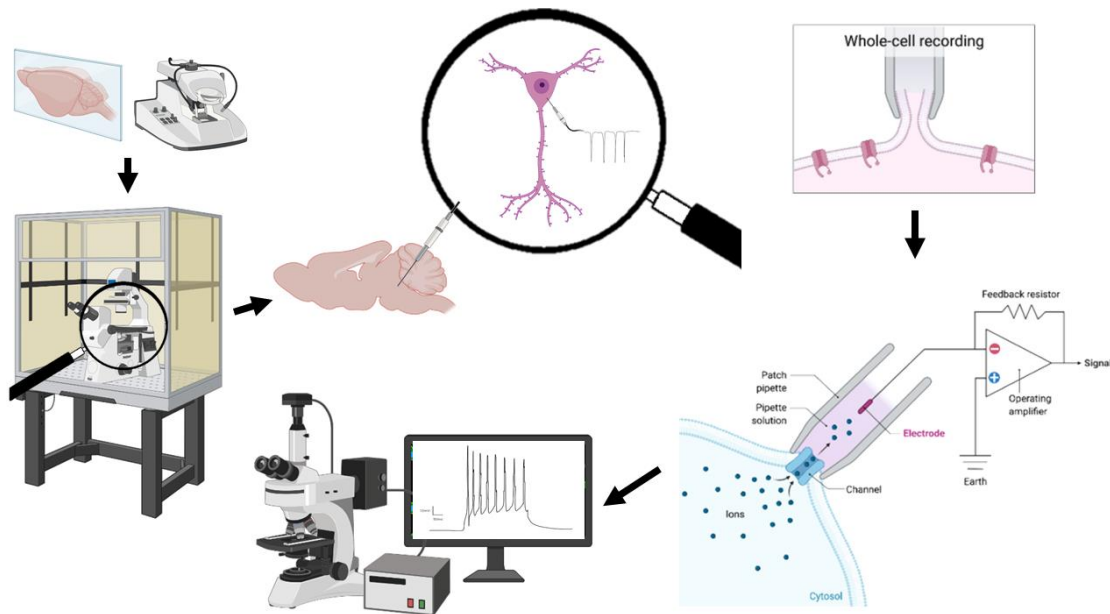


Figura 1. Desenho experimental. Os animais foram submetidos a perfusão intracardíaca e retirada do encéfalo para cortes sagitais nas coordenadas do núcleo parabrachial no microtomo com oxigenação para preservação do tecido. Após estabilização dos slices estes foram colocados no set up de eletrofisiologia em ciclo de oxigenação. Após a escolha da célula foi realizado a técnica de whole cell recording com micropipetas com as soluções internas adequadas para cada condição experimental. As gravações foram realizadas nas condições basais (3 minutos), cada condição experimental (3 minutos) e na lavagem (3 minutos).

2.2. Preparação do slice

Os animais foram profundamente anestesiados com cetamina (180 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), e os encéfalos foram rapidamente removidos após a decapitação. Slices sagitais do PB, com 300 μm de espessura, foram cortadas em líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) com corte a frio usando um microtomo Leica VT1200s (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) e transferidos para recuperação quente (32-34°C) ACSF por 10-15 min. As fatias foram então transferidas para ACSF normal à temperatura ambiente por pelo menos 45 min antes de iniciar os experimentos. Todas as soluções foram continuamente borbulhadas com uma mistura de 95% de oxigênio e 5% de CO₂.

2.3. Soluções e drogas.

As composições ACSF foram baseadas nos métodos de Ting et al (Ting et al., 2014) e consistiram (em mM): ACSF preparação dos slices: 92 NMDG, 30 NAHCO₃, 20 HEPES, 25 glicose, 5 Na-ascorbato, 2 tioureia, 1,25 NaH₂PO₄, 2,5 KCl, 3 Na-

piruvato, 0,5 CaCl₂ e 10 MgSO₄; ACSF normal: 119 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 12,5 glicose, 2 CaCl₂ e 2 mM MgSO₄. O pH e osmolaridades de cada um foram ajustados para 7,35–7,45 e 300–310 mOsm, respectivamente. As soluções foram continuamente saturadas com carbogênio (95% O₂, 5% CO₂) durante todo o uso. Para experimentos direcionados a correntes sinápticas excitatórias, usamos uma solução de micropipeta que consiste em (em mM): 130 Cs-metanossulfonato, 10 HEPES, 0,5 EGTA, 1 MgCl₂, 2,5 Mg-ATP e 0,2 GTP-Tris. Para direcionar correntes inibitórias e pós-sinápticas, usamos uma solução de micropipeta que consiste em (em mM): 70 K-Gluconato, 60 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 0,5 EGTA, 2,5 Mg-ATP, 0,2 GTP-Tris. Ambas as soluções de pipeta foram ajustadas para um pH de 7,3 e 285 mOsm. Informações sobre agonistas e antagonistas de receptores são fornecidas na Tabela 1.

Drug	Solvent	Supplier	Catalog Number	Concentration
Tetrodotoxin citrate	dHD ₂ O	abcam	ab120055	0.5 to 1 μM
CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)	dHD ₂ O	Sigma-Aldrich	C239	20 μM
APV (DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid)	ddH ₂ O	Sigma-Aldrich	A5282	50 μM
Gabazine	ddH ₂ O			10 μM
Baclofen	0.1 N NaOH	Tocris Bioscience	0417	0.1 – 300 μM
WIN-55212-2	DMSO	Axxora	BML-CR105	1 – 10 μM
AM251	DMSO	Sigma-Aldrich	A6226	0.1 – 10 nM
CGP55845	DMSO	Tocris Bioscience	1248	1 μM

Tabela 1. Agonistas e antagonistas de receptores usados para análise de dose-resposta.

2.4. Eletrofisiologia in vitro

As gravações de patch-clamp de células inteiras foram obtidas de neurônios no PB lateral com um amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices) filtrado em 1,8 kHz com um filtro Bessel de quatro pólos e digitalizado com Digidata 1550B (Molecular Devices). O PB lateral é facilmente identificado nestes cortes pela proximidade com o pedúnculo cerebral superior. Os locais de gravação foram identificados visualmente em baixa ampliação (aumento de 5x) antes e depois de cada gravação para todos os

neurônios e verificados com imuno-histoquímica de biocitina. A impedância dos eletrodos do patch foi de 4–8 M Ω . Uma vez que um selo G Ω foi obtido, o potencial de retenção foi ajustado para -65 mV e foi mantido durante todo o experimento. Todas as gravações foram obtidas à temperatura ambiente.

Correntes pré-sinápticas inibitórias em miniatura (mIPSCs) foram registradas na presença de 0,5 a 1 μ M de TTX e 10,0 μ M de gabazina, enquanto correntes pré-sinápticas excitatórias em miniatura (mEPSCs) foram registradas na presença de 0,5 a 1 μ M de TTX, 20 μ M de CNQX e 50 μ M de APV, respectivamente. Geramos perfis de dose-resposta por aplicação de banho em série do respectivo agonista ou antagonista, com um tempo mínimo de lavagem de 3 minutos por concentração e coletamos apenas um único neurônio por fatia. Todas as drogas e respectivas concentrações são fornecidas na Tabela 4. A resistência em série foi monitorada ao longo dos registros com pulsos hiperpolarizantes de -5 mV e descartamos registros em que a resistência mudou em mais de 20% dentro de um registro.

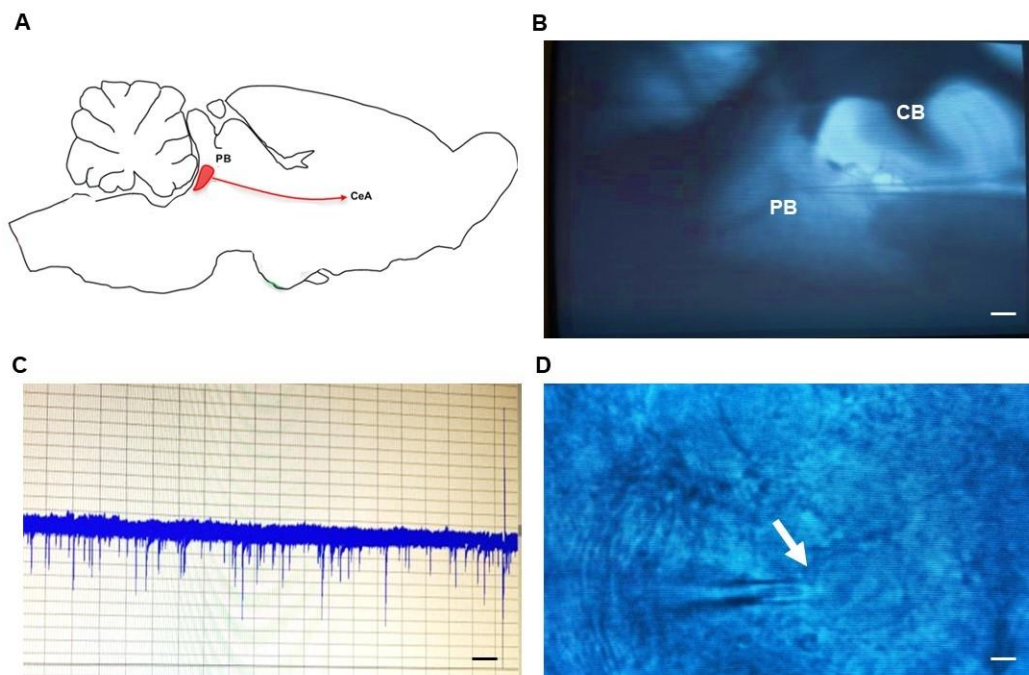


Figura 2. (A) Esquema representativo da projeção Núcleo Parabraquial (PB) para central da Amígdala (CeA). (B) Imagem representativa de uma micropipeta na região do PB para confirmação de sitio pós gravação. (C) Imagem representativa de uma gravação (baseline) de uma célula localizado no PB. (D) Imagem representativa de uma célula durante a gravação experimental (3 minutos). Barras de escala: B = aumento de 5 vezes, C = 9 segundos e D = aumento de 100 vezes. A seta destaca a técnica de whole-cell para gravação das células.

2.5. Imuno-histoquímica para Biotina

Após a conclusão da gravação, a micropipeta foi cuidadosamente retraída do neurônio e a fatia de tecido transferida para formalina a 10% a 4°C durante a noite. As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos à temperatura ambiente em 1X PBS antes de serem incubadas durante a noite em uma solução de 1:1000 Streptavidin - Cy3 conjugado, 3% de soro fetal bovino e 0,3% de Triton X-100 a 4°C. As fatias foram cobertas com um meio de montagem aquoso e visualizadas em um microscópio confocal Leica SP8 para verificar a localização de recodificação dentro do PB lateral. Rejeitamos dados de 2 neurônios que estavam fora desse núcleo.

2.3. Análise de dados e estatísticas

Correntes pós-sinápticas inibitórias e excitatórias em miniatura foram isoladas offline usando miniAnalysis (Synaptosoft). Usamos Clampfit (Molecular Devices) ou o Neuromatic XOP for Igor (Wavemetrics) desenvolvido por Jason Rothman (Rothman e Silver, 2018) para calcular a resistência da membrana com base na corrente de estado estacionário evocada por uma etapa de hiperpolarização de -5 mV. Como as frequências e amplitudes de mIPSC e mEPSC não estavam normalmente distribuídas, usamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar os efeitos de diferentes concentrações de agonistas/antagonistas dentro de cada neurônio. Incluímos apenas os neurônios que tiveram uma resposta significativa (definida como $P < 0,05$) na análise dos dados do grupo. A fração de neurônios que responderam significativamente é indicada na seção Resultados correspondente. Os dados do grupo para cada droga e parâmetro foram ajustados com um modelo de três parâmetros [inibidor] vs resposta no GraphPad Prism e, quando o ajuste foi bem-sucedido, o IC50 com intervalos de confiança de 95% é relatado.

3. Resultados

3.1. A ativação do receptor GABAB inibe a liberação sináptica

Já foi demonstrado que as entradas GABAérgicas para o PB regulam a expressão de comportamentos de dor. Aqui, investigamos o papel dos receptores GABAB registrando mIPSCs e mEPSCs farmacologicamente isolados antes e depois da aplicação do banho de concentrações crescentes de baclofen (0,1 a 300 μ M). Conforme mostrado nas gravações representativas de mIPSC na Figura 18A, 100 μ M de baclofen reduziu a

frequência de eventos sinápticos. Obtivemos um perfil de dose-resposta normalizando a frequência mediana de mIPSC em cada concentração de baclofen para o valor basal de cada neurônio. Apenas os neurônios que tiveram uma resposta significativa ao agonista – determinado pelo teste de Kruskal-Wallis com $P < 0,05$ – foram incluídos (mIPSCs: $n = 8$ de 9, mEPSCs: $n = 5$ de 5 neurônios); frequências de eventos (CV: $270 \pm 80\%$, $n = 11$) e amplitudes (CV: $60 \pm 20\%$, $n = 11$) em cada neurônio é refletida na variabilidade de dados do grupo de resposta à dose normalizada em cada concentração. Apesar da variabilidade inerente desses parâmetros, esta análise (Figura 18B) revelou um IC₅₀ de $1 \mu\text{M}$ (95% CI: 0,3 a $4 \mu\text{M}$) e uma inibição máxima de 23% (95% CI: 11 a 34%) da linha de base atividade.

As amplitudes de mIPSCs foram significativamente alteradas pelo baclofen em 6 de 9 neurônios (definidos como acima para cada célula com um teste de Kruskal-Wallis (K-W) com $P < 0,05$, mas a direção da mudança não foi consistente entre os neurônios. As amplitudes medianas registradas de alguns neurônios diminuíram em função da concentração de baclofen, enquanto eventos de amplitude menores foram suprimidos em outros neurônios, resultando em um aumento geral na amplitude mediana. Como resultado, quando examinado como uma população, não houve efeito consistente de baclofen na amplitude de mIPSC (Figura 3C; teste KW, teste KW, $H(4) = 2$, $P = 0,73$), apesar de uma diminuição dependente da dose na membrana resistência (Figura 3D; teste KW, $H(4) = 17$, $P = 0,0019$; IC₅₀ = $1,5 \mu\text{M}$; 95% CI: 0,9 a $23 \mu\text{M}$), com uma diminuição máxima para 56% (95% CI: 44 a 65 %) na concentração mais alta de baclofen de $300 \mu\text{M}$. O baclofen teve um impacto inibitório semelhante na frequência de mEPSC em todos os 7 neurônios registrados (Figura 3E). A análise dos dados do grupo de frequência de mEPSC normalizado (Figura 3F) revelou um efeito significativo de baclofen (teste KW, teste KW, $H(4) = 17,38$, $P = 0,006$) com um IC₅₀ de $3,5 \mu\text{M}$ (IC 95%: 1 a $10 \mu\text{M}$) e supressão máxima para 22% (IC 95%: 3 a 36%) da linha de base. Não analisamos a amplitude do mEPSC nessas gravações porque a solução de micropipeta à base de cério bloqueia os canais de potássio e altera a resistência da membrana. Juntos, esses dados demonstram que os receptores GABAB têm efeitos pré e pós-sinápticos no PB, inibindo a transmissão GABAérgica e glutamatérgica e ativando uma condutância pós-sináptica.

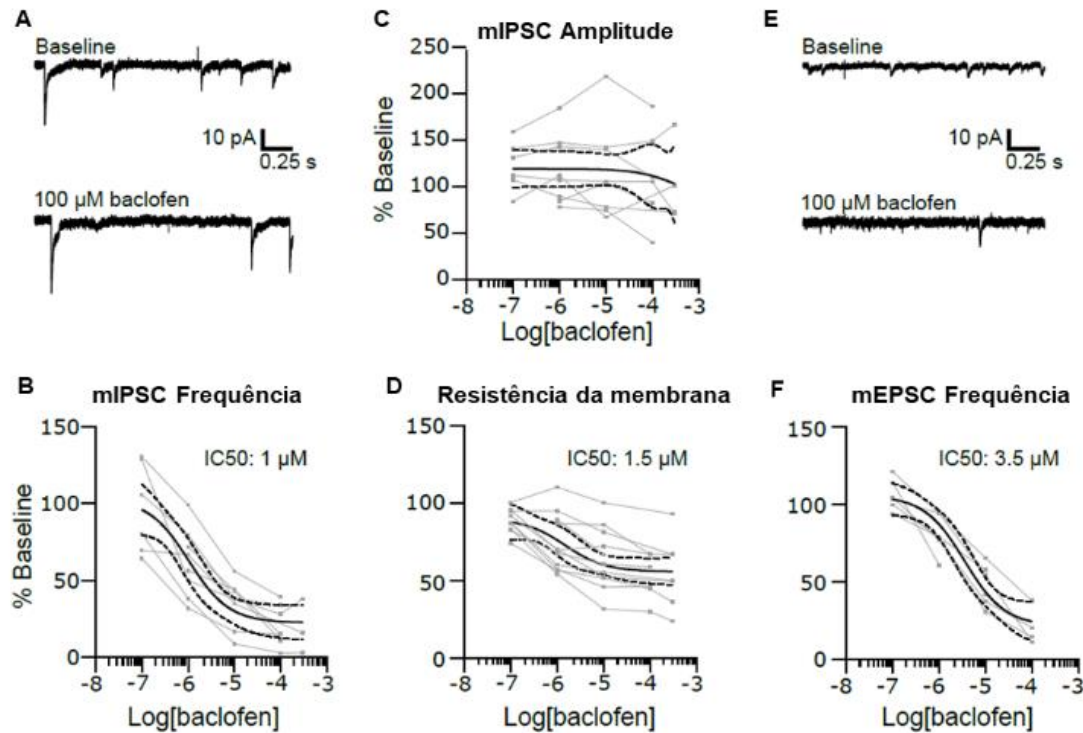


Figura 3. Os receptores GABAB suprimem a entrada sináptica e a resistência da membrana no PB lateral. (A) Gravações representativas de mIPSCs em condições basais e na presença de 100 mM de baclofen. A supressão da frequência de mIPSC foi dose-dependente (B). As amplitudes de mIPSC não foram afetadas de forma semelhante (C), apesar de uma redução dependente da dose nos neurônios PB (D). O baclofen também reduziu a frequência de mEPSCs. Registros representativos são mostrados em (E) com dados de grupo para frequência de mEPSC em (F). Os dados do grupo são ajustados com uma curva de log(dose) vs resposta \pm 95% CIs. Adaptado de (Cramer et al., 2021).

3.2 Os endocanabinóides modulam a liberação sináptica excitatória e inibitória.

Os receptores endocanabinóides tipo 1 (CB1) são amplamente expressos no encéfalo, incluindo núcleos envolvidos na nocicepção, como o PB (Herkenham et al., 1991). Investigamos o papel da sinalização de endocanabinóides registrando mIPSCs e mEPSCs farmacologicamente isolados antes e depois do banho aplicando concentrações crescentes de WIN 55.212-2 (WIN: 0,1 a 50 μ M), um agonista do receptor CB1. Conforme observado nas gravações representativas de mIPSCs na Figura 4A, 50 μ M de WIN diminuiu a frequência de eventos sinápticos (teste K-W, $H(5) = 19,7$, $P = 0,0015$). A análise de dose-resposta para os 13 dos 16 neurônios afetados produziu um IC50 de 400 nM (Figura 4B, 95% CI: 60 nM a 1,4 μ M). Como população, as amplitudes

medianas de mIPSC não foram consistentemente alteradas por WIN (Figura 21C, teste KW, $H(5) = 4,63$, $P = 0,46$), e não observamos uma mudança consistente na resistência da membrana (Figura 21D, KW teste, $H(4) = 0,77$, $P = 0,94$). Houve um efeito inibitório semelhante de WIN na frequência de mEPSC em 8 de 9 neurônios PB. Traços representativos são mostrados na Figura 4E. A análise dos dados do grupo de frequência de mEPSC normalizado para esses 8 neurônios produziu um IC₅₀ de 1,4 μM (Figura 4F, 95% CI: 0,1 a 10 μM , teste K-W, $H(4) = 15,3$, $P = 0,0042$). Juntos, esses dados suportam um papel dos receptores CB1 na regulação da liberação sináptica, sem um efeito pós-sináptico direto.

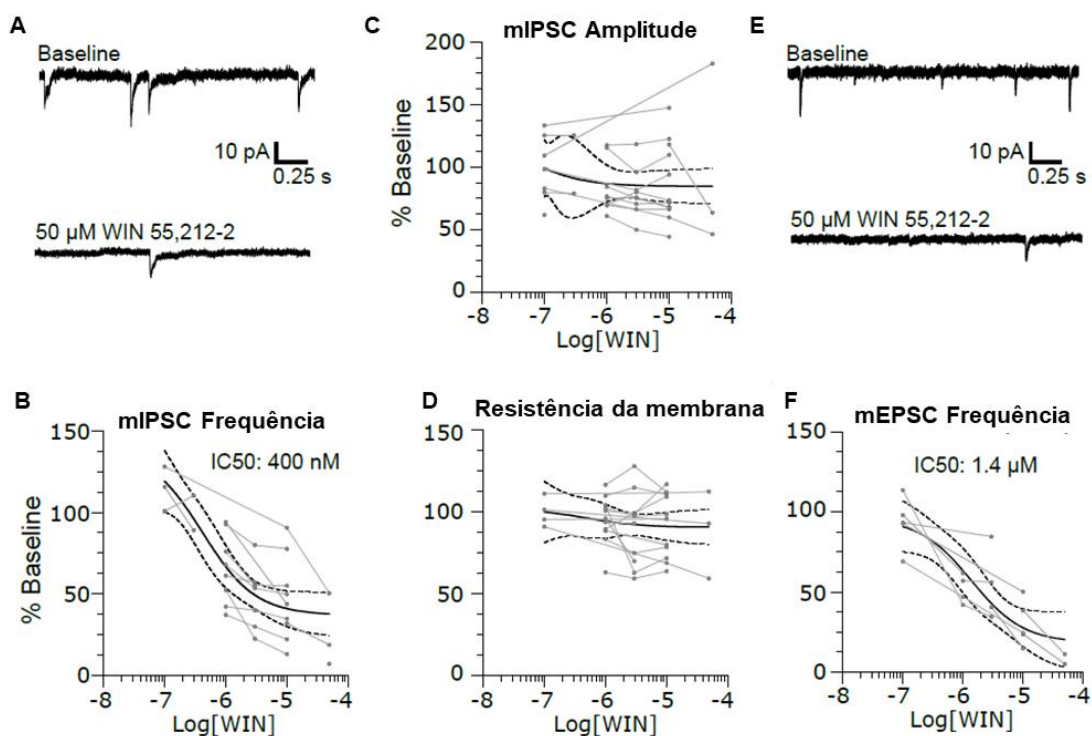


Figura 4. Os receptores endocanabinóides modulam no PB lateral. (A) Gravações representativas de mIPSC na linha de base (topo) e na presença de 50 μM WIN 55.212-2. O agonista CB1R causou uma diminuição significativa dependente da dose na frequência de mIPSC (C) sem afetar consistentemente as amplitudes do evento (D) ou a resistência da membrana pós-sináptica (D) Registros representativos de mEPSC na linha de base e na presença de 50 μM WIN 55.212-2 mostram uma redução na frequência de eventos excitatórios (E) com uma dependência de dose (F) Os dados do grupo são ajustados com uma curva de log(dose) vs resposta \pm 95% CIs. Adaptado de (Cramer et al., 2021).

3.3 Os receptores endocanabinóides são tonicamente ativos no núcleo parabraquial lateral

A atividade endocanabinóide tônica é frequentemente observada nos receptores CB1, e alterações no nível dessa atividade tônica foram relatadas em modelos de dor crônica (Dogrul et al., 2002). Usando o antagonista específico do receptor CB1 o AM251, testamos se atividade tônica semelhante está presente no PB. Nas sinapses inibitórias, a aplicação de concentrações crescentes de AM251 (0,1 a 10 nM) levou a um aumento dependente da dose em eventos em 13 de 14 neurônios (Figura 5A) com um EC50 de 1,4 nM (95% CIs: 0,04 a 70 nM, teste KW, $H(3) = 9$, $P = 0,03$). Em contraste com o efeito em mIPSCs, e surpreendentemente, AM251 levou a uma diminuição dependente da dose das frequências de mEPSC, com um IC50 semelhante de 1,6 nM (IC de 95%: 0,2 a 30 nM, Figura 5B, teste KW, $H(3) = 12,9$, $P = 0,0048$). Como essa redução ocorre durante um aumento impulsionado por AM251 na liberação de mIPSC, levantamos a hipótese de que a ativação de receptores GABAB nas sinapses glutamatérgicas pode levar a esse resultado contra-intuitivo. Testamos essa hipótese bloqueando os receptores GABAB com 1 μ M de CGP55845, um antagonista seletivo do receptor GABAB, antes de aplicar 3 nM de AM251. Isso resultou em um aumento na frequência de mEPSC, semelhante ao observado para sinapses GABAérgicas (Figura 5C). O efeito inibitório líquido de AM251 na frequência de mEPSC foi restaurado após a eliminação de CGP55845 (teste de Wilcoxon pareado, $p = 0,03$, $n = 6$ neurônios). Esse achado sugere que a eficácia da sinalização tônica do CB1 nas sinapses glutamatérgicas no PB é regulada pelos receptores GABAB.

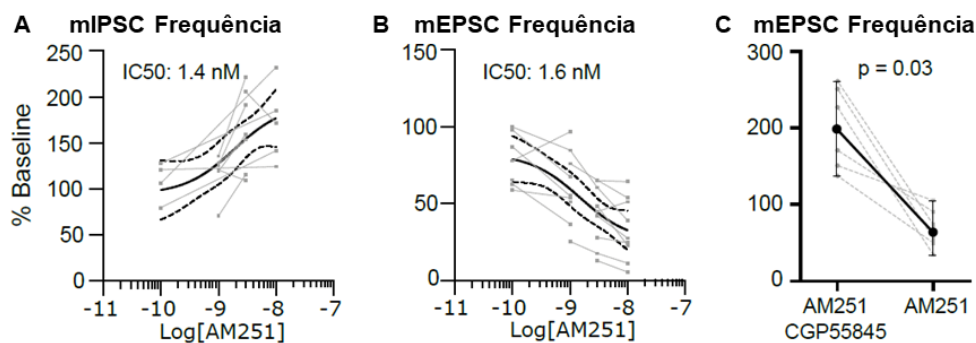


Figura 5. Os receptores endocanabinóides são tonicamente ativos no PB lateral. (A) AM251 causou um aumento significativo dependente da dose na frequência de mIPSC, mas teve o efeito oposto na frequência de mEPSC (B). Este efeito na frequência de mEPSC foi revertido pela co-aplicação de 1 μ M CGP55845, um antagonista do receptor GABAB (C). Os dados de dose-resposta são ajustados com uma curva de log(dose) vs resposta \pm 95% CIs. Adaptado de (Cramer et al., 2021).

Discussão

Testamos a hipótese de que vias de sinalização associadas ao processamento nociceptivo modulariam a atividade sináptica no núcleo parabraquial. Focamos no sistema GABAérgico, que já foi demonstrado estar desregulado no PB em um modelo de dor crônica (**Uddin et al., 2018; Raver et al., 2020**), e em duas vias intimamente associadas à antinocicepção. Descobrimos que as sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas neste núcleo estão sob supressão tônica mediada pelo CB1R, mas que o impacto da sinalização do CB1R nas sinapses excitatórias é regulado pelos receptores GABAB. Além disso, descobrimos que IC50s para entradas inibitórias tendem a ser mais baixas do que aquelas para excitatórias, sugerindo que essas vias são tendenciosas para a regulação de sinapses inibitórias. Essas diferenças oferecem insights sobre o significado funcional que essas vias têm na regulação da excitabilidade no PB e na nocicepção.

Os receptores GABAB diminuem a excitabilidade pré e pós-sináptica

Mostramos que os receptores GABAB regulam a liberação pré-sináptica de glutamato e GABA a partir de sinapses dos neurônios no PB. Os receptores pré-sinápticos tinham afinidades semelhantes ao baclofen. Como o GABA liberado sinapticamente normalmente tem que se difundir por distâncias mais longas para afetar as sinapses glutamatérgicas - em comparação com as distâncias mais curtas para afetar os auto-receptores GABAB - é provável que o GABA tenha um efeito mais potente nas sinapses inibitórias do que nas excitatórias no PB. De acordo com relatórios anteriores (**Christie e North, 1988**), demonstramos que a ativação desses receptores também reduziu a resistência de entrada dos neurônios PB, consistente com um efeito pós-sináptico. Assim, a sinalização mediada por GABAB provavelmente suprime a transmissão nociceptiva em PB em condições normais. Na dor patológica, entretanto, esse papel pode estar comprometido.

Recentemente, mostramos que o PB recebe densa inervação GABAérgica do núcleo central da amígdala (CeLC, a “amígdala nociceptiva”) e que, em um modelo animal de dor crônica, essa via inibitória é suprimida (**Raver et al., 2020**). Também demonstramos que essa supressão está causalmente relacionada à dor crônica (**Raver et al., 2020**). A liberação suprimida de GABA pode levar à atividade amplificada dos neurônios no PB, observada em condições de dor crônica (**Uddin et al., 2018; Raver et al., 2020**) através de pelo menos dois mecanismos. A liberação reduzida de GABA pode

levar à ativação reduzida dos receptores GABAB pós-sinápticos, resultando na desinibição dos neurônios no PB e amplificando as respostas às entradas nociceptivas (Uddin et al., 2018; Raver et al., 2020).

A ativação reduzida de GABAB também pode levar a mudanças pós-sinápticas mais profundas. Por exemplo, na medula espinhal, os receptores GABAB são essenciais para modular as pós-descargas (Russo et al., 1998). As pós-descargas são respostas neuronais prolongadas que duram mais que um estímulo sensorial (Woolf e King, 1987; Herrero et al., 2000). A duração das pós-descargas e a proporção de neurônios que as expressam é dramaticamente aumentada na dor crônica (Palecek et al., 1992; Laird e Bennett, 1993). Sabe-se que, em PB de ratos e camundongos com dor crônica, a incidência e a duração das pós-altas aumentam acentuadamente (Uddin et al., 2018; Raver et al., 2020). As pós-altas podem estar causalmente relacionadas à expressão da dor crônica (Laird e Bennett, 1993; Asada et al., 1996). Por exemplo, a incidência e a duração de pós-descargas em neurônios espinhais aumenta significativamente em animais com dor neuropática crônica, e que suprimir pós-descargas diminui significativamente a hiperalgesia em animais experimentais (Okubo et al., 2013). Assim, a liberação suprimida de GABA no PB durante a dor crônica provavelmente resulta em ativação reduzida de receptores GABAB pós-sinápticos, resultando na geração de pós-descargas e dor crônica.

A sinalização endocanabinóide regula seletivamente a atividade pré-sináptica no PB.

Os receptores endocanabinóides tipo 1 (CB1R) são receptores acoplados à proteína G (GPCRs) amplamente expressos no encéfalo, incluindo o PB (Herkenham et al., 1991). A ativação dessa via é antinociceptiva, consistente com sua capacidade de suprimir a atividade pré-sináptica via sinalização retrógrada do neurônio pós-sináptico (Alger, 2002; Manzanares et al., 2006; Woodhams et al., 2017; Vuckovic et al., 2018). No PB encontramos que a ativação do CB1R com o agonista WIN 55.212-2 reduz a probabilidade de liberação tanto nas sinapses glutamatérgicas quanto GABAérgicas, sem impacto significativo na excitabilidade intrínseca dos neurônios no PB. Tal como acontece com os outros agonistas investigados aqui, a regulação da atividade sináptica pelo CB1R é tendenciosa para a supressão da inibição, sugerindo que a expressão pode ser maior em sinapses inibitórias, como relatado em outras regiões do encéfalo (Kano et al., 2009).

A atividade tônica do CB1R medeia a antinocicepção na medula espinhal, e sua perda resulta em diminuição dos limiares de dor (**Dogrul et al., 2002**). Descobrimos que CB1R no PB são tonicamente ativos, pois a aplicação do antagonista de CB1R (AM251) produziu um aumento dependente da dose na liberação sináptica nas sinapses GABAérgicas. Em contraste, AM251 teve o efeito oposto nas sinapses excitatórias e reduziu a frequência de mEPSCs, um efeito que foi revertido pelo bloqueio dos receptores GABAB. Assim, os receptores CB1 no PB são tonicamente ativos nas sinapses inibitórias e excitatórias, mas o impacto líquido sobre o último é modulado pelo GABA. Isso sugere que, em circunstâncias normais, a sinalização GABAB impede que as mudanças na atividade tônica do CB1R aumentem a excitação no PB. Investigações futuras examinarão se a redução na sinalização GABAérgica observada na dor crônica remove esse freio e permite que a atividade tônica do CB1 mude para aumentar a transmissão excitatória de maneira pronociceptiva.

Considerações finais

Elucidei em minha BEPE também o papel de CB1R na via amigaloparabraquial (Cramer et al., 2021), pois a ativação dessa via tem efeito antinociceptivo. Demonstramos que no PB a regulação da atividade sináptica pelo CB1R é tendenciosa para a supressão da inibição, sugerindo que a expressão pode ser maior em sinapses inibitórias, como relatado em outras regiões do encéfalo. Descobrimos que CB1R no PB são tonicamente ativos, e que um antagonista de CB1R teve o efeito oposto nas sinapses excitatórias e reduziu a frequência de mEPSCs, um efeito que foi revertido pelo bloqueio dos receptores GABAB. Isso sugere que, em circunstâncias normais, a sinalização GABAB impede que as mudanças na atividade tônica do CB1R aumentem a excitação no PB. Investigações futuras são necessárias para elucidar se a redução na sinalização GABAérgica observada na dor crônica remove esse freio e permite que a atividade tônica do CB1 mude para aumentar a transmissão excitatória de maneira pronociceptiva participando da estipulação da cronicidade e da aversão a dor.

Referências bibliográficas

Abraham, A.D., Leung, E.J.Y., Wong, B.A., Rivera, Z.M.G., Kruse, L.C., Clark, J.J., Land, B.B., 2020. Orally consumed cannabinoids provide long-lasting relief of allodynia in a mouse model of chronic neuropathic pain. *Neuropsychopharmacology* 45, 1105–1114. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0585-3>

Adams, R., Hunt, M., Clark, J.H., 1940. Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of minnesota wild hemp. I. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 196–200. <https://doi.org/10.1021/ja01858a058>

Aguzzi, A., Barres, B.A., Bennett, M.L., 2013. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339, 156–161. <https://doi.org/10.1126/science.1227901>

Aicher, S.A., Silverman, M.B., Winkler, C.W., Bebo, B.F., 2004. Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. *Pain* 110, 560–570. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.03.025>

Al-Ghezi, Z.Z., Miranda, K., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., 2019. Combination of Cannabinoids, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol, Ameliorates Experimental Multiple Sclerosis by Suppressing Neuroinflammation Through Regulation of miRNA-Mediated Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 10, 1921. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01921>

Alger, B.E., 2002. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.* 68, 247–286.

Allen, H.N., Bobnar, H.J., Kolber, B.J., 2021. Left and right hemispheric lateralization of the amygdala in pain. *Prog. Neurobiol.* 196, 101891. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101891>

Allsop, S.A., Wichmann, R., Mills, F., Burgos-Robles, A., Chang, C.-J., Felix-Ortiz, A.C., Vienne, A., Beyeler, A., Izadmehr, E.M., Glober, G., Cum, M.I., Stergiadou, J., Anandalingam, K.K., Farris, K., Namburi, P., Leppla, C.A., Weddington, J.C., Nieh, E.H., Smith, A.C., Ba, D., Brown, E.N., Tye, K.M., 2018. Corticoamygdala transfer of socially derived information gates observational learning. *Cell* 173, 1329–1342.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.004>

Almeida, D.L., Devi, L.A., 2020. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacol. Res. Perspect.* 8. <https://doi.org/10.1002/prp2.682>

Amin, M.R., Ali, D.W., 2019. Pharmacology of medical Cannabis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1162, 151–165. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8

Anand, U., Jones, B., Korchev, Y., Bloom, S.R., Pacchetti, B., Anand, P., Sodergren, M.H., 2020. CBD effects on TRPV1 signaling pathways in cultured DRG neurons. *J. Pain Res.* 13: 2269–2278. <https://doi.org/10.2147/JPR.S258433>.

Andreoli, M., Marketkar, T., Dimitrov, E., 2017. Contribution of amygdala CRF neurons to chronic pain. *Exp. Neurol.* 298, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.08.010>

Apkarian, A.V., 2008. Pain perception in relation to emotional learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.09.012>

Apkarian, A.V., 2011. The brain in chronic pain: clinical implications. *Pain Manag.* 1, 577–586. <https://doi.org/10.2217/pmt.11.53>

Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.-D., Zubieta, J.-K., 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 9, 463–484. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>

Asada, H., Yamaguchi, Y., Tsunoda, S., Fukuda, Y., 1996. Relation of abnormal burst activity of spinal neurons to the recurrence of autotomy in rats. *Neurosci. Lett.* 213, 99–102.

Attal, N., Fermanian, C., Fermanian, J., Lanteri-Minet, M., Alchaar, H., Bouhassira, D., 2008. Neuropathic pain: Are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion? *PAIN* 138, 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.01.006>

Austin, P.J., Berglund, A.M., Siu, S., Fiore, N.T., Gerke-Duncan, M.B., Ollerenshaw, S.L., Leigh, S.-J., Kunjan, P.A., Kang, J.W., Keay, K.A., 2015. Evidence for a distinct neuro-immune signature in rats that develop behavioural disability after nerve injury. *J. Neuroinflammation* 12, 96. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0318-4>

Baliki, M.N., Apkarian, A.V., 2015. Nociception, pain, negative moods and behavior selection. *Neuron* 87, 474–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.005>

Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M.J., Yee, B.K., Feldon, J., Rawlins, J.N.P., 2003. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav. Brain Res.* 139, 197–213. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00268-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00268-1)

Baron, R., 2006. Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 95–106. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0113>

Baron, R., Binder, A., Wasner, G., 2010. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.* 9, 807–819. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70143-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70143-5)

Becker, J.J., Carrasquillo, Y., 2019. Projections, where art thou: the state and future of the central amygdala. *J. Physiol.* 597, 365–366. <https://doi.org/10.1113/JP277196>

Belardo, C., Iannotta, M., Boccella, S., Rubino, R.C., Ricciardi, F., Infantino, R., Pieretti, G., Stella, L., Paino, S., Marabese, I., Maisto, R., Luongo, L., Maione, S., Guida, F., 2019. Oral Cannabidiol Prevents Allodynia and Neurological Dysfunctions in

a Mouse Model of Mild Traumatic Brain Injury. *Front. Pharmacol.* 10, 352. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00352>

Benarroch, E.E., 2019. Insular cortex: Functional complexity and clinical correlations. *Neurology* 93, 932–938. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008525>

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

Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., 2011. Safety and side effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent. *Curr. Drug Saf.* 6, 237–249.

BIANCHI, R., CORSETTI, G., RODELLA, L., TREDICI, G., GIOIA, M., 1998. Supraspinal connections and termination patterns of the parabrachial complex determined by the biocytin anterograde tract-tracing technique in the rat. *J. Anat.* 193, 417–430. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19330417.x>

Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V., 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* 134, 845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>

Black, M.M., 1987. Taxol interferes with the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules in cultured neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 7, 3695–3702.

Blessing, E.M., Steenkamp, M.M., Manzanares, J., Marmar, C.R., 2015. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 12, 825–836. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0387-1>

Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L., Kaang, B.-K., Zhuo, M., 2016. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 485–496. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.68>

Bonini, S.A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., Mastinu, A., 2018. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J. Ethnopharmacol.* 227, 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>

Booth, J.K., Page, J.E., Bohlmann, J., 2017. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *PloS One* 12, e0173911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173911>

Boogaard, S., Heymans, M.W., de Vet, H.C.W., Peters, M.L., Loer, S.A., Zuurmond, W.W.A., Perez, R.S.G.M., 2015. Predictors of Persistent Neuropathic Pain--A Systematic Review. *Pain Physician* 18, 433–457.

Bouhassira, D., 2019. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Rev. Neurol. (Paris)* 175, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016>

Brandao, M.L., 2001. *Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento*. Atheneu.

Britch, S.C., Babalonis, S., Walsh, S.L., 2020. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology (Berl.)*. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05712-8>

Britch, S.C., Goodman, A.G., Wiley, J.L., Pondelick, A.M., Craft, R.M., 2020. Antinociceptive and Immune Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol or Cannabidiol in Male Versus Female Rats with Persistent Inflammatory Pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 373, 416–428. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.263319>

Britch, S.C., Wiley, J.L., Yu, Z., Clowers, B.H., Craft, R.M., 2017. Cannabidiol- Δ 9-tetrahydrocannabinol interactions on acute pain and locomotor activity. *Drug Alcohol Depend* 175, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.01.046>

Brooks, S.P., Dunnett, S.B., 2009. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrn2652>

Butler, R.K., Ehling, S., Barbar, M., Thomas, J., Hughes, M.A., Smith, C.E., Pogorelov, V.M., Aryal, D.K., Wetsel, W.C., Lascelles, B.D.X., 2017. Distinct neuronal populations in the basolateral and central amygdala are activated with acute pain, conditioned fear, and fear-conditioned analgesia. *Neurosci. Lett.* 661, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.025>

Cahill CM, Taylor AMW, Cook C, Ong E, Mor~A3n JA, Evans CJ (2014) Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion. *Frontiers in Pharmacology*, 5: 253.

Cai, Y.-Q., Wang, W., Paulucci-Holthauzen, A., Pan, Z.Z., 2018a. Brain circuits mediating opposing effects on emotion and pain. *J. Neurosci.* 38, 6340–6349. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2780-17.2018>

Calvo, M., Davies, A.J., Hébert, H.L., Weir, G.A., Chesler, E.J., Finnerup, N.B., Levitt, R.C., Smith, B.H., Neely, G.G., Costigan, M., Bennett, D.L., 2019. The Genetics of Neuropathic Pain from Model Organisms to Clinical Application. *Neuron* 104, 637–653. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.018>

Campos, A.C., Fogaça, M.V., Sonogo, A.B., Guimarães, F.S., 2016. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Res.* 112, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033>

Campos, A.C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaça, M.V., Aguiar, D.C., Díaz-Alonso, J., Ortega-Gutiérrez, S., Vázquez-Villa, H., Moreira, F.A., Guzmán, M., Galve-Roperh, I.,

Guimarães, F.S., 2013. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1407–1419. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001502>

Canteras, N.S., Swanson, L.W., 1992. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324, 180–194. <https://doi.org/10.1002/cne.903240204>

Cao, H., Zhang, Y.-Q., 2008. Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 972–983. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.009>

Capano, A., Weaver, R., Burkman, E., 2020. Evaluation of the effects of CBD hemp extract on opioid use and quality of life indicators in chronic pain patients: a prospective cohort study. *Postgrad. Med.* 132, 56–61. <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1685298>

Cardoso-Cruz, H., Lima, D., Galhardo, V., 2013. Impaired spatial memory performance in a rat model of neuropathic pain is associated with reduced hippocampus-prefrontal cortex connectivity. *J. Neurosci.* 33, 2465–2480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5197-12.2013>

Carle, T.L., Ohnishi, Y.N., Ohnishi, Y.H., Alibhai, I.N., Wilkinson, M.B., Kumar, A., Nestler, E.J., 2007. Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for Δ FosB stability. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3009–3019. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05575.x>

Carlini, E.A., Cunha, J.M., 1981. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J. Clin. Pharmacol.* 21, 417S-427S.

Carrasquillo, Y., Gereau, R.W., 2008. Hemispheric lateralization of a molecular signal for pain modulation in the amygdala. *Mol. Pain* 4, 24. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-24>

Carrier, E.J., Auchampach, J.A., Hillard, C.J., 2006. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7895–7900. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511232103>

Casey, S.L., Atwal, N., Vaughan, C.W., 2017. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model. *Pain* 158, 2452–2460. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001051>

Cazuza, R.A., Santos-Júnior, N.N., da Costa, L.H.A., Catalão, C.H.R., Mendes-Gomes, J., da Rocha, M.J.A., Leite-Panissi, C.R.A., 2020. Sepsis-induced encephalopathy impairs descending nociceptive pathways in rats. *J. Neuroimmunol.* 342, 577198. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577198>

Challa, S.R., 2015. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int. J. Neurosci.* 125, 170–174. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.922559>

Chamberlin, N.L., Mansour, A., Watson, S.J., Saper, C.B., 1999. Localization of mu-opioid receptors on amygdaloid projection neurons in the parabrachial nucleus of the rat. *Brain Res.* 827, 198–204.

Chen Q, Heinricher MM (2019) Plasticity in the Link between Pain-Transmitting and Pain-Modulating Systems in Acute and Persistent Inflammation. *J Neurosci*, 39: 2065–2079.

Chen Q, Roeder Z, Li MH, Zhang Y, Ingram SL, Heinricher MM (2017) Optogenetic Evidence for a Direct Circuit Linking Nociceptive Transmission through the Parabrachial Complex with Pain-Modulating Neurons of the Rostral Ventromedial Medulla (RVM). *eNeuro*, 4.

Chiang, M.C., Bowen, A., Schier, L.A., Tupone, D., Uddin, O., Heinricher, M.M., 2019. Parabrachial complex: a hub for pain and aversion. *J. Neurosci.* 39, 8225–8230.

Chiang, M.C., Nguyen, E.K., Canto-Bustos, M., Papale, A.E., Oswald, A.M., Ross, S.E., 2020. Divergent neural pathways emanating from the lateral parabrachial nucleus mediate distinct components of the pain response. *Neuron* 106, 927–939.e5.

Christie, M.J., North, R.A., 1988. Agonists at mu-opioid, M2-muscarinic and GABA_B receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurones. *Br. J. Pharmacol.* 95, 896–902.

Cohen, K., Weizman, A., Weinstein, A., 2019. Modulatory effects of cannabinoids on brain neurotransmission. *Eur. J. Neurosci.* 50, 2322–2345.

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D.L., Dworkin, R.H., Raja, S.N., 2017. Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>

Comelli, F., Giagnoni, G., Bettoni, I., Colleoni, M., Costa, B., 2008. Antihyperalgesic effect of a *Cannabis sativa* extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phytother. Res.* 22, 1017–1024. <https://doi.org/10.1002/ptr.2401>

Cook, J., Lloyd-Jones, D.M., Ogden, E., Bonomo, Y., 2015. Medical use of cannabis: an addiction medicine perspective. *Intern. Med. J.* 45, 677–680. <https://doi.org/10.1111/imj.12761>

Cooper, A.H., Brightwell, J.J., Hedden, N.S., Taylor, B.K., 2018. The left central nucleus of the amygdala contributes to mechanical allodynia and hyperalgesia following right-sided peripheral nerve injury. *Neurosci. Lett.* 684, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.013>

Corder, G., Ahanonu, B., Grewe, B.F., Wang, D., Schnitzer, M.J., Scherrer, G., 2019. An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain. *Science* 363, 276–281. <https://doi.org/10.1126/science.aap8586>

Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Loría, F., Spagnolo, A., Docagne, F., Di Marzo, V., Guaza, C., 2010. Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB2 receptors: Roles of ERK1/2, JNK, and NF- κ B. *Glia* 58, 135–147. <https://doi.org/10.1002/glia.20907>

Costa-Pereira, J.T., Ribeiro, J., Martins, I., Tavares, I., 2019. Role of Spinal Cord α 2-Adrenoreceptors in Noradrenergic Inhibition of Nociceptive Transmission During Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front. Neurosci.* 13, 1413. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01413>

Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A.E., Colleoni, M., 2004. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 143, 247–250. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705920>

Costa, B., Trovato, A.E., Colleoni, M., Giagnoni, G., Zarini, E., Croci, T., 2005. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR141716, on nociceptive response and nerve demyelination in rodents with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain* 116, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.03.043>

Costa, B., Trovato, A.E., Comelli, F., Giagnoni, G., Colleoni, M., 2007. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 556, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.006>

Cramer, N., Silva-Cardoso, G., Masri, R., Keller, A., 2021. Control of synaptic transmission and neuronal excitability in the parabrachial nucleus. *Neurobiol. Pain Camb. Mass* 9, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2020.100057>

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V., 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405–1415. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.074>

Crippa, J.A.S., Derenusson, G.N., Ferrari, T.B., Wichert-Ana, L., Duran, F.L.S., Martin-Santos, R., Simões, M.V., Bhattacharyya, S., Fusar-Poli, P., Atakan, Z., Santos Filho, A., Freitas-Ferrari, M.C., McGuire, P.K., Zuardi, A.W., Busatto, G.F., Hallak, J.E.C., 2011. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 25, 121–130. <https://doi.org/10.1177/0269881110379283>

Cuñetti, L., Manzo, L., Peyraube, R., Arnaiz, J., Curi, L., Orihuela, S., 2018. Chronic Pain Treatment With Cannabidiol in Kidney Transplant Patients in Uruguay. *Transplant. Proc.* 50, 461–464. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.12.042>

De Gregorio, D., McLaughlin, R.J., Posa, L., Ochoa-Sanchez, R., Enns, J., Lopez-Canul, M., Aboud, M., Maione, S., Comai, S., Gobbi, G., 2019. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain* 160, 136–150. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001386>

De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., Di Marzo, V., 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1479–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x>

De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini, P.C., Orlando, P., Di Marzo, V., 2008. Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 1007–1015. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134809>

Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., Woodcock, H., Dorward, P., Pigliacampo, B., Close, S., Platt, B., Riedel, G., 2012. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology (Berl.)* 219, 859–873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>

Dellarole, A., Morton, P., Brambilla, R., Walters, W., Summers, S., Bernardes, D., Grilli, M., Bethea, J.R., 2014. Neuropathic pain-induced depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis and plasticity are dependent on TNFR1 signaling. *Brain. Behav. Immun.* 41, 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.003>

Deuis, J.R., Dvorakova, L.S., Vetter, I., 2017. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front. Mol. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>

Devor, M., 1991. Sensory basis of autotomy in rats. *Pain* 45, 109–110. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(91\)90174-V](https://doi.org/10.1016/0304-3959(91)90174-V)

Dias, Q.M., Rossaneis, A.C., Fais, R.S., Prado, W.A., 2013. An improved experimental model for peripheral neuropathy in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 253–256. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20122462>

Do Val-da Silva, R.A., Peixoto-Santos, J.E., Kandratavicius, L., De Ross, J.B., Esteves, I., De Martinis, B.S., Alves, M.N.R., Scanduzzi, R.C., Hallak, J.E.C., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Leite, J.P., 2017. Protective effects of cannabidiol against seizures and neuronal death in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00131>

Dogrul, A., Gardell, L.R., Ma, S., Ossipov, M.H., Porreca, F., Lai, J., 2002. ‘Knock-down’ of spinal CB1 receptors produces abnormal pain and elevates spinal dynorphin content in mice. *Pain* 100, 203–209.

Duric, V., Mccarson, K., 2006. Persistent pain produces stress-like alterations in hippocampal neurogenesis and gene expression. *J. Pain* 7, 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.01.458>

Ehninger, D., Kempermann, G., 2006. Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity. *Genes Brain Behav.* 5, 29–39. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00129.x>

Elliott, D.M., Singh, N., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., 2018. Cannabidiol Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis Through Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Front. Immunol.* 9, 1782. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01782>

Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo, L., De Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., Steardo, L., 2007. Cannabidiol in vivo blunts β -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *Br. J. Pharmacol.* 151, 1272–1279. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707337>

Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G.I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M.R., Iuvone, T., Steardo, L., 2011. Cannabidiol reduces A β -Induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through ppar γ involvement. *PLoS ONE* 6, e28668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028668>

Eto, K., Wake, H., Watanabe, M., Ishibashi, H., Noda, M., Yanagawa, Y., Nabekura, J., 2011. Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 7631–7636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0946-11.2011>

Fanselow, M.S., Dong, H.-W., 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>

Feigin, V.L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M.S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W.J., Dorsey, E.R., Elbaz, A., Ellenbogen, R.G., Fisher, J.L., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S.L., Johnson, C.O., Kassebaum, N.J., Logroscino, G., Marin, B., Mountjoy-Venning, W.C., Nguyen, M., Ofori-Asenso, R., Patel, A.P., PCClininni, M., Roth, G.A., Steiner, T.J., Stovner, L.J., Szoeki, C.E.I., Theadom, A., Vollset, S.E., Wallin, M.T., Wright, C., Zunt, J.R., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Aboyans, V., Abraha, H.N., Acharya, D., Adamu, A.A., Adebayo, O.M., Adeoye, A.M., Adsuar, J.C., Afarideh, M., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmed, M.B., Aichour, A.N., Aichour, I., Aichour, M.T.E., Akinyemi, R.O., Akseer, N., Al-Eyadhy, A., Salman, R.A.-S., Alahdab, F., Alene, K.A., Aljunid, S.M., Altirkawi, K., Alvis-Guzman, N., Anber, N.H., Antonio, C.A.T., Arabloo, J., Aremu, O., Ärnlöv, J., Asayesh, H., Asghar, R.J., Atalay, H.T., Awasthi, A., Quintanilla, B.P.A., Ayuk, T.B., Badawi, A., Banach, M., Banoub, J.A.M., Barboza, M.A., Barker-Collo, S.L., Bärnighausen, T.W., Baune, B.T., Bedi, N., Behzadifar, Masoud, Behzadifar, Meysam, Béjot, Y., Bekele, B.B., Belachew, A.B., Bennett, D.A., Bensenor, I.M., Berhane, A., Beuran, M., Bhattacharyya, K., Bhutta, Z.A., Biadgo, B., Bijani, A., Bililign, N., Sayeed, M.S.B., Blazes, C.K., Brayne, C., Butt, Z.A., Campos-Nonato, I.R., Cantu-Brito, C., Car, M., Cárdenas, R., Carrero, J.J., Carvalho, F., Castañeda-Orjuela, C.A., Castro, F., Catalá-López, F., Cerin, E., Chaiah, Y., Chang, J.-C., Chatziralli, I., Chiang, P.P.-C., Christensen, H., Christopher, D.J., Cooper, C., Cortesi, P.A., Costa, V.M., Criqui, M.H., Crowe, C.S., Damasceno, A.A.M., Daryani, A., Cruz-Góngora, V.D. la Hoz, F.P.D. la, Leo, D.D., Demoz, G.T., Deribe, K., Dharmaratne, S.D., Diaz, D., Dinberu, M.T., Djalalinia, S., Doku, D.T., Dubey, M., Dubljanin, E., Duken, E.E., Edvardsson, D., El-Khatib, Z., Endres, M., Endries, A.Y., Eskandarieh, S., Esteghamati, A., Esteghamati, S., Farhadi, F., Faro, A., Farzadfar, F., Farzaei, M.H., Fatima, B., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, E., Feyissa, G.T., Filip, I., Fischer, F., Fukumoto, T., Ganji, M., Gankpe, F.G., Garcia-Gordillo, M.A., Gebre, A.K., Gebremichael, T.G., Gelaw, B.K., Geleijnse, J.M., Geremew, D., Gezae, K.E., Ghasemi-Kasman, M., Gidey, M.Y., Gill, P.S., Gill, T.K., Girma, E.T., Gnedovskaya, E.V., Goulart, A.C., Grada, A., Grosso, G., Guo, Y., Gupta, Rahul, Gupta, Rajeev, Haagsma, J.A., Hagos, T.B., Haj-Mirzaian, Arvin, Haj-Mirzaian, Arya, Hamadeh, R.R., Hamidi, S., Hankey, G.J., Hao, Y., Haro, J.M., Hassankhani, H., Hassen, H.Y., Havmoeller, R., Hay, S.I., Hegazy, M.I., Heidari, B., Henok, A., Heydarpour, F., Hoang, C.L., Hole, M.K., Rad, E.H., Hosseini, S.M., Hu, G., Igumbor, E.U., Ilesanmi, O.S., Irvani, S.S.N., Islam, S.M.S., Jakovljevic, M., Javanbakht, M., Jha, R.P., Jobanputra, Y.B., Jonas, J.B., Jozwiak, J.J., Jürisson, M., Kahsay, A., Kalani, R., Kalkonde, Y., Kamil, T.A., Kanchan, T., Karami, M., Karch, A., Karimi, N., Kasaeian, A., Kassa, T.D., Kassa, Z.Y., Kaul, A., Kefale, A.T., Keiyoro, P.N., Khader, Y.S., Khafaie, M.A., Khalil, I.A., Khan, E.A., Khang, Y.-H., Khazaie, H., Kiadaliri, A.A., Kiirithio, D.N., Kim, A.S., Kim, D., Kim, Y.-E., Kim, Y.J., Kisa, A., Kokubo, Y., Koyanagi, A., Krishnamurthi, R.V., Defo, B.K., Bicer, B.K., Kumar, M.,

Lacey, B., Lafranconi, A., Lansingh, V.C., Latifi, A., Leshargie, C.T., Li, S., Liao, Y., Linn, S., Lo, W.D., Lopez, J.C.F., Lorkowski, S., Lotufo, P.A., Lucas, R.M., Lunevicius, R., Mackay, M.T., Mahotra, N.B., Majdan, M., Majdzadeh, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Manafi, N., Mansournia, M.A., Mantovani, L.G., März, W., Mashamba-Thompson, T.P., Massenbourg, B.B., Mate, K.K.V., McAlinden, C., McGrath, J.J., Mehta, V., Meier, T., Meles, H.G., Melese, A., Memiah, P.T.N., Memish, Z.A., Mendoza, W., Mengistu, D.T., Mengistu, G., Meretoja, A., Meretoja, T.J., Mestrovic, T., Miazgowski, B., Miazgowski, T., Miller, T.R., Mini, G.K., Mirrakhimov, E.M., Moazen, B., Mohajer, B., Mezerji, N.M.G., Mohammadi, M., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Mohammadibakhsh, R., Mohammadnia-Afrouzi, M., Mohammed, S., Mohebi, F., Mokdad, A.H., Monasta, L., Mondello, S., Moodley, Y., Moosazadeh, M., Moradi, G., Moradi-Lakeh, M., Moradinazar, M., Moraga, P., Velásquez, I.M., Morrison, S.D., Mousavi, S.M., Muhammed, O.S., Muruet, W., Musa, K.I., Mustafa, G., Naderi, M., Nagel, G., Naheed, A., Naik, G., Najafi, F., Nangia, V., Negoï, I., Negoï, R.I., Newton, C.R.J., Ngunjiri, J.W., Nguyen, C.T., Nguyen, L.H., Ningrum, D.N.A., Nirayo, Y.L., Nixon, M.R., Norrving, B., Noubiap, J.J., Shiadeh, M.N., Nyasulu, P.S., Ogah, O.S., Oh, I.-H., Olagunju, A.T., Olagunju, T.O., Olivares, P.R., Onwujekwe, O.E., Oren, E., Owolabi, M.O., Pa, M., Pakpour, A.H., Pan, W.-H., Panda-Jonas, S., Pandian, J.D., Patel, S.K., Pereira, D.M., Petzold, M., Pillay, J.D., Piradov, M.A., Polanczyk, G.V., Polinder, S., Postma, M.J., Poulton, R., Poustchi, H., Prakash, S., Prakash, V., Qorbani, M., Radfar, A., Rafay, A., Rafiei, A., Rahim, F., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M.H.U., Rahman, M.A., Rajati, F., Ram, U., Ranta, A., Rawaf, D.L., Rawaf, S., Reinig, N., Reis, C., Renzaho, A.M.N., Resnikoff, S., Rezaeian, S., Rezai, M.S., González, C.M.R., Roberts, N.L.S., Roeber, L., Ronfani, L., Roro, E.M., Roshandel, G., Rostami, A., Sabbagh, P., Sacco, R.L., Sachdev, P.S., Saddik, B., Safari, H., Safari-Faramani, R., Safi, S., Safiri, S., Sagar, R., Sahathevan, R., Sahebkar, A., Sahraian, M.A., Salamati, P., Zahabi, S.S., Salimi, Y., Samy, A.M., Sanabria, J., Santos, I.S., Milicevic, M.M.S., Sarrafzadegan, N., Sartorius, B., Sarvi, S., Sathian, B., Satpathy, M., Sawant, A.R., Sawhney, M., Schneider, I.J.C., Schöttker, B., Schwebel, D.C., Seedat, S., Sepanlou, S.G., Shabaninejad, H., Shafieesabet, A., Shaikh, M.A., Shakir, R.A., Shams-Beyranvand, M., Shamsizadeh, M., Sharif, M., Sharif-Alhoseini, M., She, J., Sheikh, A., Sheth, K.N., Shigematsu, M., Shiri, R., Shirkoohi, R., Shiue, I., Siabani, S., Siddiqi, T.J., Sigfusdottir, I.D., Sigurvinsdottir, R., Silberberg, D.H., Silva, J.P., Silveira, D.G.A., Singh, J.A., Sinha, D.N., Skiadaresi, E., Smith, M., Sobaih, B.H., Sobhani, S., Soofi, M., Soyiri, I.N., Sposato, L.A., Stein, D.J., Stein, M.B., Stokes, M.A., Sufiyan, M.B., Sykes, B.L., Sylaja, P.N., Tabarés-Seisdedos, R., Ao, B.J.T., Tehrani-Banihashemi, A., Temsah, M.-H., Temsah, O., Thakur, J.S., Thrift, A.G., Topor-Madry, R., Tortajada-Girbés, M., Tovani-Palone, M.R., Tran, B.X., Tran, K.B., Truelsen, T.C., Tsadik, A.G., Car, L.T., Ukwaja, K.N., Ullah, I., Usman, M.S., Uthman, O.A., Valdez, P.R., Vasankari, T.J., Vasanthan, R., Veisani, Y., Venketasubramanian, N., Violante, F.S., Vlassov, V., Vosoughi, K., Vu, G.T., Vujcic, I.S., Wagnew, F.S., Waheed, Y., Wang, Y.-P., Weiderpass, E., Weiss, J., Whiteford, H.A., Wijeratne, T., Winkler, A.S., Wiysonge, C.S., Wolfe, C.D.A., Xu, G., Yadollahpour, A., Yamada, T., Yano, Y., Yaseri, M., Yatsuya, H., Yimer, E.M., Yip, P.,

Yisma, E., Yonemoto, N., Yousefifard, M., Yu, C., Zaidi, Z., Zaman, S.B., Zamani, M., Zandian, H., Zare, Z., Zhang, Y., Zodpey, S., Naghavi, M., Murray, C.J.L., Vos, T., 2019. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)

Fields, H.L., 2000. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Prog. Brain Res.* 122, 245–253. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62143-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62143-3)

Fine, P.G., Rosenfeld, M.J., 2013. The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. *Rambam Maimonides Med. J.* 4. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10129>

Finn, D.P., Beckett, S.R.G., Roe, C.H., Madjd, A., Fone, K.C.F., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Chapman, V., 2004. Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur. J. Neurosci.* 19, 678–686.

Fiore, N.T., Austin, P.J., 2016. Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? *Brain. Behav. Immun.* 56, 397–411. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.012>

Fiore, N.T., Austin, P.J., 2018. Glial-cytokine-neuronal adaptations in the ventral hippocampus of rats with affective behavioral changes following peripheral nerve injury. *Neuroscience* 390, 119–140. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.010>

Fiore, N.T., Austin, P.J., 2019. Peripheral nerve injury triggers neuroinflammation in the medial prefrontal cortex and ventral hippocampus in a subgroup of rats with coincident affective behavioural changes. *Neuroscience* 416, 147–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.005>

Flatters, S.J.L., Bennett, G.J., 2004. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy: *Pain* 109, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.01.029>

Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G.M., Peng, B., Uwagawa, T., Li, Z., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Chiao, P.J., 2004. NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7806–7819. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7806-7819.2004>

Fulwiler, C.E., Saper, C.B., 1984. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.* 319, 229–259.

Gabay, C., 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 8 Suppl 2, S3. <https://doi.org/10.1186/ar1917>

Gabay, C., Kushner, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448–454. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>

Gadgil, S., Ergün, M., van den Heuvel, S.A., van der Wal, S.E., Scheffer, G.J., Hooijmans, C.R., 2019. A systematic summary and comparison of animal models for chemotherapy induced (peripheral) neuropathy (CIPN). *PLoS ONE* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221787>

Gao, Y.-J., Ji, R.-R., 2010. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.016>

Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646–1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>

Gauriau, C., Bernard, J.F., 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* 87, 251–258.

Genaro, K., Fabris, D., Arantes, A.L.F., Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., Prado, W.A., 2017. Cannabidiol Is a Potential Therapeutic for the Affective-Motivational Dimension of Incision Pain in Rats. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00391>

Ghonghadze, M., Pachkoria, K., Okujava, M., Antelava, N., Gongadze, N., 2020. Endocannabinoids receptors mediated central and peripheral effects (review). *Georgian Med. News* 137–143.

Giacoppo, S., Galuppo, M., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., Mazzon, E., 2015. A new formulation of cannabidiol in cream shows therapeutic effects in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *DARU J. Pharm. Sci.* 23, 48. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0131-8>

Goesling, J., Lin, L.A., Clauw, D.J., 2018. Psychiatry and Pain Management: at the Intersection of Chronic Pain and Mental Health. *Curr. Psychiatry Rep.* 20, 12. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0872-4>

Gogoleva, V.S., Drutskaya, M.S., Atretkhany, K.S.-N., 2019. The role of microglia in the homeostasis of the central nervous system and neuroinflammation. *Mol. Biol. (Mosk.)* 53, 790–798. <https://doi.org/10.1134/S0026898419050057>

Gonçalves, E.C.D., Baldasso, G.M., Bicca, M.A., Paes, R.S., Capasso, R., Dutra, R.C., 2020. Terpenoids, Cannabimimetic Ligands, beyond the Cannabis Plant. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25071567>

Good, P., Haywood, A., Gogna, G., Martin, J., Yates, P., Greer, R., Hardy, J., 2019. Oral medicinal cannabinoids to relieve symptom burden in the palliative care of patients

with advanced cancer: a double-blind, placebo controlled, randomised clinical trial of efficacy and safety of cannabidiol (CBD). *BMC Palliat. Care* 18, 110. <https://doi.org/10.1186/s12904-019-0494-6>

Gore, M., Sadosky, A., Stacey, B.R., Tai, K.-S., Leslie, D., 2012. The burden of chronic low back pain: clinical comorbidities, treatment patterns, and health care costs in usual care settings. *Spine* 37, E668-677. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318241e5de>

Guimaraes, F.S., Chiaretti, T.M., Graeff, F.G., Zuardi, A.W., 1990. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacol. Berl* 100, 558–9.

Guindon, J., Hohmann, A.G., 2009. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 8, 403–421. <https://doi.org/10.2174/187152709789824660>

Gungor, N.Z., Johansen, J., 2019. A chronic pain in the ACC. *Neuron* 102, 903–905. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.021>

Gungor, N.Z., Johansen, J., 2019. A chronic pain in the ACC. *Neuron* 102, 903–905. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.021>

Guo, B., Wang, J., Yao, H., Ren, K., Chen, J., Yang, J., Cai, G., Liu, H., Fan, Y., Wang, W., Wu, S., 2018. Chronic inflammatory pain impairs mglur5-mediated depolarization-induced suppression of excitation in the anterior cingulate cortex. *Cereb. Cortex* 28, 2118–2130. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx117>

Guo, J.-R., Wang, H., Jin, X.-J., Jia, D.-L., Zhou, X., Tao, Q., 2017. Effect and mechanism of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signal pathway on chronic neuropathic pain and spinal microglia in a rat model of chronic constriction injury. *Oncotarget* 8, 52923–52934. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17629>

Guo, B., Wang, J., Yao, H., Ren, K., Chen, J., Yang, J., Cai, G., Liu, H., Fan, Y., Wang, W., Wu, S., 2018. Chronic Inflammatory Pain Impairs mGluR5-Mediated Depolarization-Induced Suppression of Excitation in the Anterior Cingulate Cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 28, 2118–2130. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx117>

Gwak, Y.S., Hulsebosch, C.E., Leem, J.W., 2017. Neuronal-Glial interactions maintain chronic neuropathic pain after spinal cord injury. *Neural Plast.* 2017, 2480689. <https://doi.org/10.1155/2017/2480689>

Hammell, D.C., Zhang, L.P., Ma, F., Abshire, S.M., McIlwrath, S.L., Stinchcomb, A.L., Westlund, K.N., 2016. Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 20, 936–948. <https://doi.org/10.1002/ejp.818>

Han, J.S., Neugebauer, V., 2004. Synaptic plasticity in the amygdala in a visceral pain model in rats. *Neurosci. Lett.* 361, 254–257. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.027>

Han, S., Soleiman, M.T., Soden, M.E., Zweifel, L.S., Palmiter, R.D., 2015. Elucidating an affective pain circuit that creates a threat memory. *Cell* 162, 363–374.

Hanuš, L.O., Meyer, S.M., Muñoz, E., Tagliatalata-Scafati, O., Appendino, G., 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1357–1392. <https://doi.org/10.1039/C6NP00074F>

Harris, H.M., Sufka, K.J., Gul, W., ElSohly, M.A., 2016. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. *Planta Med.* 82, 1169–1172. <https://doi.org/10.1055/s-0042-106303>

Hendricks, O., Andersen, T.E., Christiansen, A.A., Primdahl, J., Hauge, E.M., Ellingsen, T., Horsted, T.I., Bachmann, A.G., Loft, A.G., Bojesen, A.B., Østergaard, M., Lund Hetland, M., Krogh, N.S., Roessler, K.K., Petersen, K.H., 2019. Efficacy and safety of cannabidiol followed by an open label add-on of tetrahydrocannabinol for the treatment of chronic pain in patients with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis: protocol for a multicentre, randomised, placebo-controlled study. *BMJ Open* 9, e028197. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-028197>

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.

Herrero, J.F., Laird, J.M., López-García, J.A., 2000. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something. *Prog. Neurobiol.* 61, 169–203.

Herry, C., Ciocchi, S., Senn, V., Demmou, L., Muller, C., Luthi, A., 2008. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454, 600–6.

Hofbauer, R.K., Rainville, P., Duncan, G.H., Bushnell, M.C., 2001. Cortical representation of the sensory dimension of pain. *J. Neurophysiol.* 86, 402–411. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.402>

Höke, A., Ray, M., 2014a. Rodent Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *ILAR J.* 54, 273–281. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt053>

Holroyd, K.A., Talbot, F., Holm, J.E., Pingel, J.D., Lake, A.E., Saper, J.R., 1996. Assessing the dimensions of pain: a multitrait-multimethod evaluation of seven measures. *Pain* 67, 259–265. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(96\)03129-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(96)03129-6)

Howlett, A.C., Abood, M.E., 2017. CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp. 169–206. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.007>

Huang, W.-J., Chen, W.-W., Zhang, X., 2017. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp. Ther. Med.* 13, 3163–3166. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4410>

Hudson, L.J., Bevan, S., Wotherspoon, G., Gentry, C., Fox, A., Winter, J., 2001. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2105–2114.

Huff, M.L., Emmons, E.B., Narayanan, N.S., LaLumiere, R.T., 2016. Basolateral amygdala projections to ventral hippocampus modulate the consolidation of footshock, but not contextual, learning in rats. *Learn. Mem.* 23, 51–60. <https://doi.org/10.1101/lm.039909.115>

Ikeda, H., Mochizuki, K., Murase, K., 2013. Astrocytes are involved in long-term facilitation of neuronal excitation in the anterior cingulate cortex of mice with inflammatory pain. *Pain* 154, 2836–2843. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.08.023>

Inoue, K., Tsuda, M., 2018. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 138–152. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.2>

Izzo, A.A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., Mechoulam, R., 2009. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.006>

Jasmin, L., Burkey, A.R., Card, J.P., Basbaum, A.I., 1997. Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the Spino-(Trigemino-)Parabrachio-Amygdaloid, in the Rat. *J. Neurosci.* 17, 3751–3765.

Jesus, C.H.A., Redivo, D.D.B., Gasparin, A.T., Sotomaior, B.B., de Carvalho, M.C., Genaro, K., Zuardi, A.W., Hallak, J.E.C., Crippa, J.A., Zanoveli, J.M., da Cunha, J.M., 2019. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. *Brain Res.* 1715, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.014>

Jha, M.K., Jo, M., Kim, J.-H., Suk, K., 2019. Microglia-Astrocyte crosstalk: an intimate molecular conversation. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 25, 227–240. <https://doi.org/10.1177/1073858418783959>

Jhang, J., Lee, H., Kang, M.S., Lee, H.-S., Park, H., Han, J.-H., 2018. Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response. *Nat. Commun.* 9, 2744. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05090-y>

Ji, G., Fu, Y., Ruppert, K.A., Neugebauer, V., 2007. Pain-related anxiety-like behavior requires CRF1 receptors in the amygdala. *Mol. Pain* 3, 1744-8069-3-13. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-13>

Ji, R.-R., Berta, T., Nedergaard, M., 2013. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl 1, S10–S28. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.022>

Ji, R.-R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., Maixner, W., 2018. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology* 129, 343–366. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>

Johansen, J.P., Fields, H.L., 2004. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. *Nat. Neurosci.* 7, 398–403. <https://doi.org/10.1038/nn1207>

Jolival, C.G., Frizzi, K.E., Guernsey, L., Marquez, A., Ochoa, J., Rodriguez, M., Calcutt, N.A., 2016. Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 6, 223–255. <https://doi.org/10.1002/cpmo.11>

Jones, É., Vlachou, S., 2020. A Critical Review of the Role of the Cannabinoid Compounds Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) and Cannabidiol (CBD) and their Combination in Multiple Sclerosis Treatment. *Mol. Basel Switz.* 25, E4930. <https://doi.org/10.3390/molecules25214930>

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203. <https://doi.org/10.1038/35093019>

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., Watanabe, M., 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380.

Katona, I., Rancz, E.A., Acsády, L., Ledent, C., Mackie, K., Hájos, N., Freund, T.F., 2001. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J. Neurosci.* 21, 9506–9518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-23-09506.2001>

Kawasaki, Y., Xu, Z.-Z., Wang, X., Park, J.Y., Zhuang, Z.-Y., Tan, P.-H., Gao, Y.-J., Roy, K., Corfas, G., Lo, E.H., Ji, R.-R., 2008. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat. Med.* 14, 331–336. <https://doi.org/10.1038/nm1723>

Kendall, D.A., Yudowski, G.A., 2017. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00294>

Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Kishioka, S., 2012. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.10.007>

King, K.M., Myers, A.M., Soroka-Monzo, A.J., Tuma, R.F., Tallarida, R.J., Walker, E.A., Ward, S.J., 2017. Single and combined effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain: THC and CBD synergistically attenuate neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* 174, 2832–2841. <https://doi.org/10.1111/bph.13887>

King, T., Vera-Portocarrero, L., Gutierrez, T., Vanderah, T.W., Dussor, G., Lai, J., Fields, H.L., Porreca, F., 2009. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 12, 1364–1366. <https://doi.org/10.1038/nn.2407>

Kocot-Kępska, M., Zajączkowska, R., Mika, J., Kopsky, D.J., Wordliczek, J., Dobrogowski, J., Przeklasa-Muszyńska, A., 2021. Topical Treatments and Their Molecular/Cellular Mechanisms in Patients with Peripheral Neuropathic Pain—Narrative Review. *Pharmaceutics* 13, 450. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040450>

Komaki, A., Hashemi-Firouzi, N., Shojaei, S., Souri, Z., Heidari, S., Shahidi, S., 2015. Study the effect of endocannabinoid system on rat behavior in elevated plus-maze. *Basic Clin. Neurosci.* 6, 147–153.

Koyama, Y., 2014. Signaling molecules regulating phenotypic conversions of astrocytes and glial scar formation in damaged nerve tissues. *Neurochem. Int.* 78, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.08.005>

Kozela, E., Juknat, A., Vogel, Z., 2017. Modulation of astrocyte activity by cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1669. <https://doi.org/10.3390/ijms18081669>

Kremer, M., Becker, L.J., Barrot, M., Yalcin, I., 2020. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *Eur. J. Neurosci.* ejn.14686. <https://doi.org/10.1111/ejn.14686>

LaGraize, S.C., Labuda, C.J., Rutledge, M.A., Jackson, R.L., Fuchs, P.N., 2004. Differential effect of anterior cingulate cortex lesion on mechanical hypersensitivity and escape/avoidance behavior in an animal model of neuropathic pain. *Exp. Neurol.* 188, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.04.003>

Laird, J.M., Bennett, G.J., 1993. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. *J. Neurophysiol.* 69, 2072–2085.

Laprairie, R.B., Bagher, A.M., Kelly, M.E.M., Denovan-Wright, E.M., 2015. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4790–4805. <https://doi.org/10.1111/bph.13250>

Lazarini-Lopes, W., Do Val-da Silva, R.A., da Silva-Júnior, R.M.P., Silva-Cardoso, G.K., Leite-Panissi, C.R.A., Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N., 2021. Chronic cannabidiol (CBD) administration induces anticonvulsant and antiepileptogenic effects in a genetic model of epilepsy. *Epilepsy Behav.* EB 119, 107962. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107962>

Lazarini-Lopes, W., Silva-Cardoso, G.K., Leite-Panissi, C.R.A., Garcia-Cairasco, N., 2022. Increased TRPV1 Channels and FosB Protein Expression Are Associated with Chronic Epileptic Seizures and Anxiogenic-like Behaviors in a Preclinical Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Biomedicines* 10, 416. <https://doi.org/10.3390/biomedicines100>

Ledeboer, A., Sloane, E.M., Milligan, E.D., Frank, M.G., Mahony, J.H., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2005. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.02.009>

LeDoux, J., 2003. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23, 727–738. <https://doi.org/10.1023/A:1025048802629>

Leknes, S., Brooks, J.C.W., Wiech, K., Tracey, I., 2008. Pain relief as an opponent process: a psychophysical investigation. *Eur. J. Neurosci.* 28, 794–801. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06380.x>

Lewinter, R.D., Skinner, K., Julius, D., Basbaum, A.I., 2004. Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 470, 400–408. <https://doi.org/10.1002/cne.20024>

Li, A., Liu, Y., Zhang, Q., Friesner, I., Jee, H.J., Chen, Z.S., Wang, J., 2021. Disrupted population coding in the prefrontal cortex underlies pain aversion. *Cell Rep.* 37, 109978. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109978>

Li, H., Kong, W., Chambers, C.R., Yu, D., Ganea, D., Tuma, R.F., Ward, S.J., 2018. The non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol (CBD) attenuates pro-inflammatory mediators, T cell infiltration, and thermal sensitivity following spinal cord injury in mice. *Cell. Immunol.* 329, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.016>

Li, M.-J., Liu, L.-Y., Chen, L., Cai, J., Wan, Y., Xing, G.-G., 2017. Chronic stress exacerbates neuropathic pain via the integration of stress-affect-related information with nociceptive information in the central nucleus of the amygdala. *Pain* 158, 717–739. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000827>

Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y., Yao, W., 2019. An update on reactive astrocytes in chronic pain. *J. Neuroinflammation* 16, 140. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1524-2>

Liu, L.-Y., Zhang, R.-L., Chen, L., Zhao, H.-Y., Cai, J., Wang, J.-K., Guo, D.-Q., Cui, Y.-J., Xing, G.-G., 2019. Chronic stress increases pain sensitivity via activation of the rACC-BLA pathway in rats. *Exp. Neurol.* 313, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.12.009>

Liu, Y., Zhou, L.-J., Wang, J., Li, D., Ren, W.-J., Peng, J., Wei, X., Xu, T., Xin, W.-J., Pang, R.-P., Li, Y.-Y., Qin, Z.-H., Murugan, M., Mattson, M.P., Wu, L.-J., Liu, X.-G., 2017. TNF- α differentially regulates synaptic plasticity in the hippocampus and spinal cord by microglia-dependent mechanisms after peripheral nerve injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 871–881. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016>

Lomazzo, E., König, F., Abassi, L., Jelinek, R., Lutz, B., 2017. Chronic stress leads to epigenetic dysregulation in the neuropeptide-Y and cannabinoid CB1 receptor genes in the mouse cingulate cortex. *Neuropharmacology* 113, 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.008>

Lötsch, J., Weyer-Menkhoff, I., Tegeder, I., 2018. Current evidence of cannabinoid-based analgesia obtained in preclinical and human experimental settings. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 22, 471–484. <https://doi.org/10.1002/ejp.1148>

Lowin, T., Straub, R.H., 2015. Cannabinoid-based drugs targeting CB1 and TRPV1, the sympathetic nervous system, and arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 17, 226. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0743-x>

Lu, C., Yang, T., Zhao, H., Zhang, M., Meng, F., Fu, H., Xie, Y., Xu, H., 2016. Insular cortex is critical for the perception, modulation, and chronification of pain. *Neurosci. Bull.* 32, 191–201. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0016-y>

Lu, H.C., Mackie, K., 2016. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry* 79, 516–525.

Luján, M.Á., Cantacorps, L., Valverde, O., 2020. The pharmacological reduction of hippocampal neurogenesis attenuates the protective effects of cannabidiol on cocaine voluntary intake. *Addict. Biol.* 25, e12778. <https://doi.org/10.1111/adb.12778>

Luján, M.Á., Valverde, O., 2020. The pro-neurogenic effects of cannabidiol and its potential therapeutic implications in psychiatric disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 14, 109. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00109>

Ma, L., Yue, L., Zhang, Y., Wang, Y., Han, B., Cui, S., Liu, F.-Y., Wan, Y., Yi, M., 2019. Spontaneous pain disrupts ventral hippocampal cal1-infralimbic cortex

connectivity and modulates pain progression in rats with peripheral inflammation. *Cell Rep.* 29, 1579-1593.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.002>

Maayah, Z.H., Takahara, S., Ferdaoussi, M., Dyck, J.R.B., 2020. The molecular mechanisms that underpin the biological benefits of full-spectrum cannabis extract in the treatment of neuropathic pain and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1866, 165771. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165771>

Magrinelli, F., Zanette, G., Tamburin, S., 2013. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. *Pract. Neurol.* 13, 292–307. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2013-000536>

Malfait, A.M., Gallily, R., Sumariwalla, P.F., Malik, A.S., Andreakos, E., Mechoulam, R., Feldmann, M., 2000. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9561–9566. <https://doi.org/10.1073/pnas.160105897>

Mansour, A., Fox, C.A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R.C., Akil, H., Watson, S.J., 1994. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 350, 412–438.

Manzanares, J., Julian, M., Carrascosa, A., 2006. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr. Neuropharmacol.* 4, 239–257.

Margolis, E.B., Hjelmstad, G.O., Bonci, A., Fields, H.L., 2003. κ -opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 23, 9981–9986.

Matsuda, L.A., Bonner, T.I., Lolait, S.J., 1992. Cannabinoid receptors: which cells, where, how, and why? *NIDA Res. Monogr.* 126, 48–56.

Max, M.B., 2002. Clarifying the definition of neuropathic pain. *Pain* 96, 406. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00422-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00422-5)

McCarberg, B., Peppin, J., 2019. Pain Pathways and Nervous System Plasticity: Learning and Memory in Pain. *Pain Med.* Malden Mass 20, 2421–2437. <https://doi.org/10.1093/pm/pnz017>

McWilliams, L.A., Cox, B.J., Enns, M.W., 2003. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain* 106, 127–133.

Mechoulam, R., Hanus, L., 2000. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem. Phys. Lipids* 108, 1–13.

Mechoulam, R., Shvo, Y., 1963. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19, 2073–2078.

Melzack, R., Casey, K., 2015. Melzack & Casey Determinants of Pain 1968 from original.

Melzack, R., Katz, J., 2013. Pain. Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci. 4, 1–15. <https://doi.org/10.1002/wcs.1201>

Melzack, R., Wall, P.D., 1965. Pain mechanisms: a new theory. Science. <https://doi.org/10.1126/science.150.3699.971>

Mezey, E., Tóth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., Szallasi, A., 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 3655–3660. <https://doi.org/10.1073/pnas.060496197>

Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. Prog. Neurobiol. 57, 1–164.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. Prog. Neurobiol. 66, 355–474.

Miranpuri, G.S., Bali, P., Nguyen, J., Kim, J.J., Modgil, S., Mehra, P., Buttar, S., Brown, G., Yutuc, N., Singh, H., Wood, A., Singh, J., Anand, A., 2021. Role of microglia and astrocytes in spinal cord injury induced neuropathic pain. Ann. Neurosci. 09727531211046367. <https://doi.org/10.1177/09727531211046367>

Mitchell, V.A., Harley, J., Casey, S.L., Vaughan, A.C., Winters, B.L., Vaughan, C.W., 2021. Oral efficacy of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse neuropathic pain model. Neuropharmacology 189, 108529. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108529>

Mlost, J., Bryk, M., Starowicz, K., 2020. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. Int. J. Mol. Sci. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21228870>

Moldrich, G., Wenger, T., 2000. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. Peptides 21, 1735–1742.

Monti, J.M., 1977. Hypnoticlike effects of cannabidiol in the rat. Psychopharmacology (Berl.) 55, 263–265.

Morgan, C.J.A., Schafer, G., Freeman, T.P., Curran, H.V., 2010. Impact of cannabidiol on the acute memory and psychotomimetic effects of smoked cannabis: naturalistic study. Br. J. Psychiatry 197, 285–290. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.110.077503>

Mori, M.A., Meyer, E., Soares, L.M., Milani, H., Guimarães, F.S., de Oliveira, R.M.W., 2017. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and

functional recovery after brain ischemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 75, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.11.005>

Murray, C.J.L., Lopez, A.D., 2013. Measuring the global burden of disease. *N. Engl. J. Med.* 369, 448–457. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1201534>

Mutso, A.A., Petre, B., Huang, L., Baliki, M.N., Torbey, S., Herrmann, K.M., Schnitzer, T.J., Apkarian, A.V., 2013. Reorganization of hippocampal functional connectivity with transition to chronic back pain. *J. Neurophysiol.* 111, 1065–1076. <https://doi.org/10.1152/jn.00611.2013>

Mutso, A.A., Radzicki, D., Baliki, M.N., Huang, L., Banisadr, G., Centeno, M.V., Radulovic, J., Martina, M., Miller, R.J., Apkarian, A.V., 2012. Abnormalities in Hippocampal Functioning with Persistent Pain. *J Neurosci* 32, 5747–5756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0587-12.2012>

Nagarkatti, P., Pandey, R., Rieder, S.A., Hegde, V.L., Nagarkatti, M., 2009. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med. Chem.* 1, 1333–1349. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.93>

Napimoga, M.H., Benatti, B.B., Lima, F.O., Alves, P.M., Campos, A.C., Pena-dos-Santos, D.R., Severino, F.P., Cunha, F.Q., Guimarães, F.S., 2009. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *Int. Immunopharmacol.* 9, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.11.010>

Narita, Minoru, Kuzumaki, N., Narita, Michiko, Kaneko, C., Hareyama, N., Miyatake, M., Shindo, K., Miyoshi, K., Nakajima, M., Nagumo, Y., Sato, F., Wachi, H., Seyama, Y., Suzuki, T., 2006. Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. *J. Neurochem.* 97, 1369–1378. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03824.x>

Navarrete, C., García-Martín, A., Rolland, A., DeMesa, J., Muñoz, E., 2021. Cannabidiol and Other Cannabinoids in Demyelinating Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2992. <https://doi.org/10.3390/ijms22062992>

Navratilova, E., Xie, J.Y., King, T., Porreca, F., 2013. Evaluation of reward from pain relief. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1282, 1–11. <https://doi.org/10.1111/nyas.12095>

Navratilova, E., Xie, J.Y., Okun, A., Qu, C., Eyde, N., Ci, S., Ossipov, M.H., King, T., Fields, H.L., Porreca, F., 2012. Pain relief produces negative reinforcement through activation of mesolimbic reward-valuation circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20709–20713. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214605109>

- Nent, E., Nozaki, C., Schmöle, A.-C., Otte, D., Zimmer, A., 2019. CB2 receptor deletion on myeloid cells enhanced mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Sci. Rep.* 9, 7468. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43858-4>
- Neogi, T., 2013. The Epidemiology and Impact of Pain in Osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* OARS Osteoarthr. Res. Soc. 21, 1145–1153. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.03.018>
- Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128. <https://doi.org/10.1038/35053570>
- Nestler, E.J., 2008. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 3245–3255. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0067>
- Nestler, E.J., 2015. Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur. J. Pharmacol.* 753, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.034>
- Neugebauer, V., 2015. Amygdala pain mechanisms. *Handb. Exp. Pharmacol.* 227, 261–284. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_13
- Neugebauer, V., Mazzitelli, M., Cragg, B., Ji, G., Navratilova, E., Porreca, F., 2020a. Amygdala, neuropeptides, and chronic pain-related affective behaviors. *Neuropharmacology* 170, 108052. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108052>
- Noda, M., Nakanishi, H., Nabekura, J., Akaike, N., 2000. AMPA–Kainate Subtypes of Glutamate Receptor in Rat Cerebral Microglia. *J. Neurosci.* 20, 251–258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-01-00251.2000>
- Nomaru, H., Sakumi, K., Katogi, A., Ohnishi, Y.N., Kajitani, K., Tsuchimoto, D., Nestler, E.J., Nakabeppu, Y., 2014. Fosb gene products contribute to excitotoxic microglial activation by regulating the expression of complement C5a receptors in microglia. *Glia* 62, 1284–1298. <https://doi.org/10.1002/glia.22680>
- O'Brien, M., McDougall, J.J., 2018. Cannabis and joints: scientific evidence for the alleviation of osteoarthritis pain by cannabinoids. *Curr. Opin. Pharmacol.* 40, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.03.012>
- Okamoto, K., Imbe, H., Tashiro, A., Kumabe, S., Senba, E., 2004. Blockade of peripheral 5HT₃ receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. *Neurosci. Lett.* 367, 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.06.017>
- Okine, B.N., Madasu, M.K., McGowan, F., Prendergast, C., Gaspar, J.C., Harhen, B., Roche, M., Finn, D.P., 2016. N-palmitoylethanolamide in the anterior cingulate cortex attenuates inflammatory pain behaviour indirectly via a CB1 receptor-mediated mechanism. *Pain* 157, 2687–2696. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000687>

Okubo, M., Castro, A., Guo, W., Zou, S., Ren, K., Wei, F., Keller, A., Dubner, R., 2013. Transition to persistent orofacial pain after nerve injury involves supraspinal serotonin mechanisms. *J. Neurosci.* 33, 5152–5161.

Oliveira-Pelegri, G.R., Basso, P.J., Soares, A.S., Martinez, M.R., Riester, K.D., Rocha, M.J.A., 2013. Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis. *J. Neuroimmunol.* 258, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.02.007>

Ong, W.-Y., Stohler, C.S., Herr, D.R., 2019. Role of the prefrontal cortex in pain processing. *Mol. Neurobiol.* 56, 1137–1166. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1130-9>

Ożarowski, M., Karpiński, T.M., Zielińska, A., Souto, E.B., Wielgus, K., 2021. Cannabidiol in Neurological and Neoplastic Diseases: Latest Developments on the Molecular Mechanism of Action. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4294. <https://doi.org/10.3390/ijms22094294>

Palecek, J., Palecková, V., Dougherty, P.M., Carlton, S.M., Willis, W.D., 1992. Responses of spinothalamic tract cells to mechanical and thermal stimulation of skin in rats with experimental peripheral neuropathy. *J. Neurophysiol.* 67, 1562–1573.

Palmiter, R.D., 2018. The parabrachial nucleus: CGRP neurons function as a general alarm. *Trends Neurosci.* 41, 280–293.

Panigada, T., Gosselin, R.-D., 2011. Behavioural alteration in chronic pain: are brain glia involved? *Med. Hypotheses* 77, 584–588. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.06.036>

Parker, L.A., Burton, P., Sorge, R.E., Yakiwchuk, C., Mechoulam, R., 2004. Effect of low doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 175, 360–366. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1825-7>

Paxinos, G., Watson, C., 2006. *The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard Cover Edition.* Elsevier.

Paxinos, G.W., C., 2008. *The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed.* Academic Press, New York.

Perez, M., Benitez, S.U., Cartarozzi, L.P., Del Bel, E., Guimarães, F.S., Oliveira, A.L.R., 2013. Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3424–3434. <https://doi.org/10.1111/ejn.12341>

Pickens, J.T., 1981. Sedative activity of cannabis in relation to its delta'-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol content. *Br. J. Pharmacol.* 72, 649–656.

Phillips, R.G., LeDoux, J.E., 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274–285. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.2.274>

Philpott, H.T., O'Brien, M., McDougall, J.J., 2017. Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis. *Pain* 158, 2442–2451. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001052>

Pitcher, T., Sousa-Valente, J., Malcangio, M., 2016. The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse. *J. Vis. Exp. JoVE* 53746. <https://doi.org/10.3791/53746>

Porreca, F., Navratilova, E., 2017. Reward, motivation and emotion of pain and its relief. *Pain* 158, S43–S49. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000798>

Pothuizen, H.H.J., Zhang, W.-N., Jongen-Rêlo, A.L., Feldon, J., Yee, B.K., 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 19, 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03170.x>

Pourreza, P., Babapour, V., Haghparast, A., 2018. Role of dorsal hippocampal orexin-1 receptors in modulation of antinociception induced by chemical stimulation of the lateral hypothalamus. *Physiol. Behav.* 185, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.12.036>

Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.

Qin, N., Neeper, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., Flores, C.M., 2008. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 6231–6238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008>

Qu, C., King, T., Okun, A., Lai, J., Fields, H.L., Porreca, F., 2011. Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *Pain* 152, 1641–1648. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.03.002>

Raghavendra, V., Tanga, F., DeLeo, J.A., 2003. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 624–630. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.052407>

Rainville, P., Duncan, G.H., Price, D.D., Carrier, B., Bushnell, M.C., 1997. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 277, 968–971. <https://doi.org/10.1126/science.277.5328.968>

Ratano, P., Petrella, C., Forti, F., Passeri, P.P., Morena, M., Palmery, M., Trezza, V., Severini, C., Campolongo, P., 2018. Pharmacological inhibition of 2-arachidonolglycerol hydrolysis enhances memory consolidation in rats through CB2 receptor activation and mTOR signaling modulation. *Neuropharmacology* 138: 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.030>

Raver, C., Uddin, O., Ji, Y., Li, Y., Cramer, N., Jenne, C., Morales, M., Masri, R., Keller, A., 2020. An amygdalo-parabrachial pathway regulates pain perception and chronic pain. *J. Neurosci.* 40, 3424–3442.

Razavi, Y., Keyhanfar, F., Haghparast, A., Shabani, R., Mehdizadeh, M., 2021. Cannabidiol promotes neurogenesis in the dentate gyrus during an abstinence period in rats following chronic exposure to methamphetamine. *Metab. Brain Dis.* 36, 1381–1390. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00774-9>

Roberts, J.C., Davis, J.B., Benham, C.D., 2004. [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* 995, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.001>

Robson, P.J., 2014. Therapeutic potential of cannabinoid medicines. *Drug Test. Anal.* 6, 24–30. <https://doi.org/10.1002/dta.1529>

Rock, E.M., Limebeer, C.L., Parker, L.A., 2018. Effect of cannabidiolic acid and Δ^9 -tetrahydrocannabinol on carrageenan-induced hyperalgesia and edema in a rodent model of inflammatory pain. *Psychopharmacology (Berl.)* 235, 3259–3271. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5034-1>

Rodríguez-Muñoz, M., Onetti, Y., Cortés-Montero, E., Garzón, J., Sánchez-Blázquez, P., 2018. Cannabidiol enhances morphine antinociception, diminishes NMDA-mediated seizures and reduces stroke damage via the sigma 1 receptor. *Mol. Brain* 11, 51. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0395-2>

Roeder, Z., Chen, Q., Davis, S., Carlson, J.D., Tupone, D., Heinricher, M.M., 2016. Parabrachial complex links pain transmission to descending pain modulation. *Pain* 157, 2697–2708.

Romero-Sandoval, A., Chai, N., Natile-McMenemy, N., DeLeo, J.A., 2008. A comparison of spinal *iba1* and *gfap* expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res.* 1219, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.05.004>

Rosenberger, D.C., Blechschmidt, V., Timmerman, H., Wolff, A., Treede, R.-D., 2020. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 127, 589–624. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02145-7>

Rothman, J.S., Silver, R.A., 2018. NeuroMatic: an integrated open-source software toolkit for acquisition, analysis and simulation of electrophysiological data. *Front Neuroinform* 12, 14.

Rowinsky, E.K., Eisenhauer, E.A., Chaudhry, V., Arbuck, S.G., Donehower, R.C., 1993. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin. Oncol.* 20, 1–15.

Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Viganó, D., Marras, E., Petrosino, S., Perletti, G., Maccarrone, M., Di Marzo, V., Parolaro, D., 2008. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 18, 1292–1301. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm161>

Russo, E.B., 2008. Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. *Ther. Clin. Risk Manag.* 4, 245–259.

Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B., Parker, K.K., 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem. Res.* 30, 1037–1043. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1>

Russo, R.E., Nagy, F., Hounsgaard, J., 1998. Inhibitory control of plateau properties in dorsal horn neurones in the turtle spinal cord in vitro. *J. Physiol.* 506, 795–808.

Ryan, D., Drysdale, A.J., Pertwee, R.G., Platt, B., 2007. Interactions of cannabidiol with endocannabinoid signalling in hippocampal tissue. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2093–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05448.x>

Salimi, S., Tamaddonfard, E., 2019. Microinjection of histamine and its H₃ receptor agonist and antagonist into the agranular insular cortex influence sensory and affective components of neuropathic pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 857, 172450. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172450>

Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1985. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 5, 1222–1227.

Satpute, A.B., Mumford, J.A., Naliboff, B.D., Poldrack, R.A., 2012. Human anterior and posterior hippocampus respond distinctly to state and trait anxiety. *Emot. Wash. DC* 12, 58–68. <https://doi.org/10.1037/a0026517>

Schnitzler, A., Ploner, M., 2000. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.* 17, 592–603.

Schoenfeld, T., Gould, E., 2012. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp. Neurol.* 233, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.008>

Scholz, J., Finnerup, N.B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K.D., Evers, S., First, M., Giamberardino, M.A., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Nurmikko, T., Perrot, S., Raja, S.N., Rice, A.S.C., Rowbotham, M.C., Schug, S., Simpson, D.M., Smith, B.H., Svensson, P., Vlaeyen, J.W.S., Wang, S.-J., Barke, A., Rief, W., Treede, R.-D., Group (NeuPSIG), C.C. of the N.P.S.I., 2019. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *PAIN* 160, 53. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>

Seno, M.D.J., Assis, D.V., Gouveia, F., Antunes, G.F., Kuroki, M., Oliveira, C.C., Santos, L.C.T., Pagano, R.L., Martinez, R.C.R., 2018. The critical role of amygdala subnuclei in nociceptive and depressive-like behaviors in peripheral neuropathy. *Sci. Rep.* 8, 13608. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31962-w>

Seretny, M., Currie, G.L., Sena, E.S., Ramnarine, S., Grant, R., MacLeod, M.R., Colvin, L.A., Fallon, M., 2014. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 155, 2461–2470. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.020>

Sermet, S., Li, J., Bach, A., Crawford, R.B., Kaminski, N.E., 2021. Cannabidiol selectively modulates interleukin (IL)-1 β and IL-6 production in toll-like receptor activated human peripheral blood monocytes. *Toxicology* 464, 153016. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153016>

Shao, Z., Yan, W., Chapman, K., Ramesh, K., Ferrell, A.J., Yin, J., Wang, X., Xu, Q., Rosenbaum, D.M., 2019. Structure of an allosteric modulator bound to the CB1 cannabinoid receptor. *Nat. Chem. Biol.* 15, 1199–1205. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0387-2>

Sharma, V., McNeill, J.H., 2009. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *Br. J. Pharmacol* 157, 907–921. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00267.x>

Shillo, P., Sloan, G., Greig, M., Hunt, L., Selvarajah, D., Elliott, J., Gandhi, R., Wilkinson, I.D., Tesfaye, S., 2019. Painful and Painless Diabetic Neuropathies: What Is the Difference? *Curr. Diab. Rep.* 19, 32. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1150-5>

Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., Takahashi, R., Kitazawa, S., Hattori, N., 2010. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J. Neurosci. Methods* 189, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>

Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Strużyńska, L., 2021. Dysfunctional glia: contributors to neurodegenerative disorders. *Neural Regen. Res.* 16, 218–222. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.290877>

Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wegrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A.B., Aschner, M., 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol. Pathol.* 39, 115–123. <https://doi.org/10.1177/0192623310385254>

Sikes, R.W., Vogt, B.A., 1992. Nociceptive neurons in area 24 of rabbit cingulate cortex. *J. Neurophysiol.* 68, 1720–1732.

Silva-Cardoso, G.K., Lazarini-Lopes, W., Hallak, J.E., Crippa, J.A., Zuardi, A.W., Garcia-Cairasco, N., Leite-Panissi, C.R.A., 2021. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. *Neuropharmacology* 108712. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108712>

Silva-Cardoso, G.K., Nobre, M.J., 2021. Context-specific tolerance and pharmacological changes in the infralimbic cortex-nucleus accumbens shell pathway evoked by ketamine. *Neurochem. Res.* 46, 1686–1700. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03300-6>

Siracusa, R., Fusco, R., Cuzzocrea, S., 2019. Astrocytes: role and functions in brain pathologies. *Front. Pharmacol.* 10.

Snyder, J.S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., Cameron, H.A., 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476, 458–461. <https://doi.org/10.1038/nature10287>

Starowicz, K., Finn, D.P., 2017. Chapter Thirteen - Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action, in: Kendall, D., Alexander, S.P.H. (Eds.), *Advances in Pharmacology, Cannabinoid Pharmacology*. Academic Press, pp. 437–475. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.05.003>

Starowicz, K., Malek, N., Przewlocka, B., 2013. Cannabinoid receptors and pain. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 2, 121–132. <https://doi.org/10.1002/wmts.83>

Straub, R.H., 2014. TRPV1, TRPA1, and TRPM8 channels in inflammation, energy redirection, and water retention: role in chronic inflammatory diseases with an evolutionary perspective. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 92, 925–937. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1175-9>

Strobel, C., Hunt, S., Sullivan, R., Sun, J., Sah, P., 2014. Emotional regulation of pain: the role of noradrenaline in the amygdala. *Sci. China Life Sci.* 57, 384–390. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4638-x>

Su, P., Zhang, J., Wang, D., Zhao, F., Cao, Z., Aschner, M., Luo, W., 2016. The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia. *Neuroscience* 319, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.035>

Suryavanshi, S.V., Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., 2021. Cannabinoids as key regulators of inflammasome signaling: a current perspective. *Front. Immunol.* 11.

Szabo-Fresnais, N., Blondeau, J.-P., Pomérance, M., 2008. Activation of the cAMP pathway synergistically increases IL-1-induced IL-6 gene expression in FRTL-5 thyroid cells: Involvement of AP-1 transcription factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 284, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.12.017>

Szok, D., Tajti, J., Nyári, A., Vécsei, L., 2019. Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain. *Behav. Neurol.* 2019, 8685954. <https://doi.org/10.1155/2019/8685954>

Tawfik, V.L., Nutile-McMenemy, N., Lacroix-Fralish, M.L., Deleo, J.A., 2007. Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. *Brain. Behav. Immun.* 21, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.07.001>

Tham, M., Yilmaz, O., Alaverdashvili, M., Kelly, M.E.M., Denovan-Wright, E.M., Laprairie, R.B., 2019. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors: CBD and CBD-DMH at the cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 176, 1455–1469. <https://doi.org/10.1111/bph.14440>

Thapa, D., Cairns, E.A., Szczesniak, A.-M., Kulkarni, P.M., Straiker, A.J., Thakur, G.A., Kelly, M.E.M., 2020. Allosteric cannabinoid receptor 1 (CB1) ligands reduce ocular pain and inflammation. *Mol. Basel Switz.* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25020417>

Thomas, B.F., Gilliam, A.F., Burch, D.F., Roche, M.J., Seltzman, H.H., 1998. Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 285–292.

Thompson, J.M., Neugebauer, V., 2017. Amygdala plasticity and pain. *Pain Res. Manag.* 2017, 8296501. <https://doi.org/10.1155/2017/8296501>

Thompson, J.M., Neugebauer, V., 2019. Cortico-limbic pain mechanisms. *Neurosci. Lett.* 702, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.037>

Thompson, S.A., Patterson, K., Hodges, J.R., 2003. Left/right asymmetry of atrophy in semantic dementia: Behavioral–cognitive implications. *Neurology* 61, 1196–1203. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000091868.28557.B8>

Timmers, I., Quaedflieg, C.W.E.M., Hsu, C., Heathcote, L.C., Rovnaghi, C.R., Simons, L.E., 2019. The interaction between stress and chronic pain through the lens of threat learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 107, 641–655. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.007>

Ting JT, Daigle TL, Chen Q, Feng G (2014) Acute Brain Slice Methods for Adult and Aging Animals: Application of Targeted Patch Clamp Analysis and Optogenetics. In: *Methods in Molecular Biology: Patch-Clamp Methods and Protocols* (eds), pp 221–242. New York, NY: Springer New York.

Toth, C.C., Jedrzejewski, N.M., Ellis, C.L., Frey, W.H., 2010. Cannabinoid-Mediated Modulation of Neuropathic Pain and Microglial Accumulation in a Model of Murine Type I Diabetic Peripheral Neuropathic Pain. *Mol. Pain* 6, 1744-8069-6–16. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-16>

Tracey, I., 2010. Getting the pain you expect: mechanisms of placebo, nocebo and reappraisal effects in humans. *Nat. Med.* 16, 1277–1283. <https://doi.org/10.1038/nm.2229>

Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.

Turner, C.E., Elsohly, M.A., Boeren, E.G., 1980. Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *J. Nat. Prod.* 43, 169–234.

Uddin, O., Studlack, P., Akintola, T., Raver, C., Castro, A., Masri, R., Keller, A., 2018. Amplified parabrachial nucleus activity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiol. Pain* 3, 22–30.

van den Hoogen, N.J., Harding, E.K., Davidson, C.E.D., Trang, T., 2022. Cannabinoids in chronic pain: therapeutic potential through microglia modulation. *Front. Neural Circuits* 15.

Vann, R.E., Gamage, T.F., Warner, J.A., Marshall, E.M., Taylor, N.L., Martin, B.R., Wiley, J.L., 2008. Divergent effects of cannabidiol on the discriminative stimulus and place conditioning effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend.* 94, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2007.11.017>

Verrico, C.D., Wesson, S., Konduri, V., Hofferek, C.J., Vazquez-Perez, J., Blair, E., Dunner, K.J., Salimpour, P., Decker, W.K., Halpert, M.M., 2020. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of daily cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis pain. *PAIN* 161, 2191–2202. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001896>

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Luca, M.D., Galli, C.L., Marinovich, M., 2003. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the src family of kinases. *J. Neurosci.* 23, 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>

Vogt, B.A., 2005. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 533–544. <https://doi.org/10.1038/nrn1704>

Vogt, B.A., Derbyshire, S., Jones, A.K., 1996. Pain processing in four regions of human cingulate cortex localized with co-registered PET and MR imaging. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1461–1473.

Vogt, B.A., Pandya, D.N., Rosene, D.L., 1987. Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. *J. Comp. Neurol.* 262, 256–270. <https://doi.org/10.1002/cne.902620207>

Vogt, B.A., Rosene, D.L., Pandya, D.N., 1979. Thalamic and cortical afferents differentiate anterior from posterior cingulate cortex in the monkey. *Science* 204, 205–207.

Vuckovic, S., Srebro, D., Vujović, K.S., Vučetić, Ć., Prostran, M., 2018. Cannabinoids and pain: new insights from old molecules. *Front. Pharmacol.* 9, 1259.

Wang, G.-W., Liu, J., Wang, X.-Q., 2017. Post-training reversible disconnection of the ventral hippocampal–basolateral amygdaloid circuits impairs consolidation of inhibitory avoidance memory in rats. *Learn. Mem.* 24, 602–606. <https://doi.org/10.1101/lm.044701.116>

Ward, S.J., McAllister, S.D., Kawamura, R., Murase, R., Neelakantan, H., Walker, E.A., 2014. Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT1A receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. *Br. J. Pharmacol.* 171, 636–645. <https://doi.org/10.1111/bph.12439>

Ward, S.J., Ramirez, M.D., Neelakantan, H., Walker, E.A., 2011. Cannabidiol Prevents the Development of Cold and Mechanical Allodynia in Paclitaxel-Treated Female C57Bl6 Mice. *Anesth. Analg.* 113, 947–950. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182283486>

Wilson, T.D., Valdivia, S., Khan, A., Ahn, H.-S., Adke, A.P., Martinez Gonzalez, S., Sugimura, Y.K., Carrasquillo, Y., 2019. Dual and opposing functions of the central amygdala in the modulation of pain. *Cell Rep.* 29, 332–346.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.011>

- Wong, H., Cairns, B.E., 2019. Cannabidiol, cannabinol and their combinations act as peripheral analgesics in a rat model of myofascial pain. *Arch. Oral Biol.* 104, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.05.028>
- Woodhams, S.G., Chapman, V., Finn, D.P., Hohmann, A.G., Neugebauer, V., 2017. The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology* 124, 105–120.
- Woolf, C.J., King, A.E., 1987. Physiology and morphology of multireceptive neurons with C-afferent fiber inputs in the deep dorsal
- Wu, J., Hocevar, M., Bie, B., Foss, J.F., Naguib, M., 2019. Cannabinoid type 2 receptor system modulates paclitaxel-induced microglial dysregulation and central sensitization in rats. *J. Pain* 20, 501–514. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.10.007>
- Wu, L.-J., Kim, S.S., Zhuo, M., 2008. Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus. *Neurochem. Res.* 33, 1925–1932. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9679-8>
- Wu, Y., Yao, X., Jiang, Y., He, X., Shao, X., Du, J., Shen, Z., He, Q., Fang, J., 2017. Pain aversion and anxiety-like behavior occur at different times during the course of chronic inflammatory pain in rats. *J. Pain Res.* 10, 2585–2593. <https://doi.org/10.2147/JPR.S139679>
- Xiao, X., Zhang, Y.-Q., 2018. A new perspective on the anterior cingulate cortex and affective pain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 90, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.03.022>
- Xiao, Y., Chen, X., Zhang, P.-A., Xu, Q., Zheng, H., Xu, G.-Y., 2016. TRPV1-mediated presynaptic transmission in basolateral amygdala contributes to visceral hypersensitivity in adult rats with neonatal maternal deprivation. *Sci. Rep.* 6, 29026. <https://doi.org/10.1038/srep29026>
- Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S.-R., Willenbring, D., Guan, Y., Pan, H.-L., Ren, K., Xu, Y., Zhang, L., 2012a. Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *J. Exp. Med.* 209, 1121–1134. <https://doi.org/10.1084/jem.20120242>
- Xu, D.H., Cullen, B.D., Tang, M., Fang, Y., 2020. The Effectiveness of Topical Cannabidiol Oil in Symptomatic Relief of Peripheral Neuropathy of the Lower Extremities. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 21, 390–402. <https://doi.org/10.2174/1389201020666191202111534>
- Yang, S., Chang, M.C., 2019. Chronic pain: structural and functional changes in brain structures and associated negative affective states. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20133130>

Zhang, Q., Manders, T., Tong, A.P., Yang, R., Garg, A., Martinez, E., Zhou, H., Dale, J., Goyal, A., Urien, L., Yang, G., Chen, Z., Wang, J., 2017. Chronic pain induces generalized enhancement of aversion. *eLife* 6, e25302. <https://doi.org/10.7554/eLife.25302>

Zheng, J., Jiang, Y.-Y., Xu, L.-C., Ma, L.-Y., Liu, F.-Y., Cui, S., Cai, J., Liao, F.-F., Wan, Y., Yi, M., 2017. Adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis contributes differentially to environmental enrichment combined with voluntary exercise in alleviating chronic inflammatory pain in mice. *J. Neurosci.* 37, 4145–4157. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3333-16.2017>

Zuardi, A.W., Rodrigues, J.A., Cunha, J.M., 1991. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl.)* 104, 260–264.