

2023

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PSICOBIOLOGIA

Tratamento sistêmico com canabidiol em ratos das linhagens Cariocas de alto e baixo congelamento no modelo de dor crônica: avaliação da dor, da ansiedade e da expressão de BDNF em áreas encefálicas

VERSÃO CORRIGIDA

Carolina Macêdo de Souza

TESE



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Tratamento sistêmico com canabidiol em ratos das linhagens Cariocas de alto e baixo congelamento
no modelo de dor crônica: avaliação da dor, da ansiedade e da expressão de BDNF em áreas
encefálicas**

Carolina Macêdo de Souza

Ribeirão Preto - SP
2023

CAROLINA MACÊDO DE SOUZA

Tratamento sistêmico com canabidiol em ratos das linhagens Cariocas de alto e baixo congelamento no modelo de dor crônica: avaliação da dor, da ansiedade e da expressão de BDNF em áreas encefálicas

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor(a) em Ciências.

Departamento: Psicologia

Programa: Psicobiologia.

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

Co-Orientador: Prof. Dr. J. Landeira-Fernandez

**Ribeirão Preto - SP
2023**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
<i>1.1. Transtorno de ansiedade generalizada e Dor crônica neuropática</i>	<i>17</i>
<i>1.2. Estruturas neurais do medo/ansiedade e da dor.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3. Modelo animal de ansiedade: Cariocas de alto e baixo congelamento</i>	<i>22</i>
<i>1.4. Expressão de BDNF nos Cariocas de alto e baixo congelamento</i>	<i>25</i>
<i>1.5. Potencial terapêutico do canabidiol (CBD) nos estados de dor e ansiedade</i>	<i>25</i>
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
<i>3.1. Animais e condições experimentais.....</i>	<i>31</i>
<i>3.2. Constrição crônica do nervo ciático (CCI)</i>	<i>33</i>
<i>3.3. Avaliação da sensibilidade mecânica</i>	<i>35</i>
<i>3.4. Avaliação da sensibilidade térmica ao frio</i>	<i>36</i>
<i>3.5. Avaliação da sensibilidade térmica ao calor.....</i>	<i>37</i>
<i>3.6. Tratamento com canabidiol (CBD).....</i>	<i>37</i>
<i>3.7. Avaliação da atividade locomotora.....</i>	<i>38</i>
<i>3.8. Paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP).....</i>	<i>39</i>
<i>3.9. Condicionamento ao medo contextual</i>	<i>40</i>
<i>3.10. Análise de Western Blotting.....</i>	<i>41</i>
<i>3.11. Análise estatística.....</i>	<i>43</i>
4. RESULTADOS.....	44
<i>4.1. Protocolo 1.....</i>	<i>44</i>
<i>4.1.1. Avaliação da sensibilidade dolorosa (teste von Frey, teste de acetona e teste da placa quente) 44</i>	
<i>4.1.2. Avaliação da motricidade (Campo aberto).....</i>	<i>48</i>
<i>4.1.3. Avaliação do aspecto aversivo da dor no teste de Paradigma de fuga/esquiva ao local (teste PEAP)</i>	<i>51</i>
<i>4.1.4. Avaliação da expressão dos níveis de BDNF (Protocolo 1)</i>	<i>53</i>
<i>4.2. Protocolo 2.....</i>	<i>57</i>
<i>4.2.1. Avaliação da sensibilidade dolorosa (teste von Frey, teste de acetona e teste da placa quente) 57</i>	
<i>4.2.2. Avaliação da motricidade (Campo aberto).....</i>	<i>58</i>
<i>4.2.3. Avaliação dos níveis de ansiedade (teste de Condicionamento ao Medo Contextual) ...</i>	<i>62</i>
<i>4.2.4. Avaliação da expressão dos níveis de BDNF (Protocolo 2)</i>	<i>65</i>
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. APOIO FINANCEIRO.....	88

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização do autor, do orientador e da universidade.

Macêdo-Souza, Carolina

Tratamento sistêmico com canabidiol em ratos das linhagens Cariocas de alto e baixo congelamento no modelo de dor crônica: avaliação da dor, da ansiedade e da expressão de BDNF em áreas encefálicas. Ribeirão Preto, 2023.

90 p. : il. ; 30 cm

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

Orientadora: Christie Ramos Andrade Leite-Panissi.

Co-Orientador: J. Landeira-Fernandez

1. Ansiedade generalizada. 2. Dor neuropática. 3. Dor crônica. 4.

Dedico,

*Aos meus pais, **Miriam e Silas**, aos meus irmãos **Silas e Bruno**,
e ao meu namorado **Júnior**, por todo apoio, incentivo e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a força motriz de toda Existência.

Aos meus pais, Miriam e Silas, pelas instruções a minha educação, pela atenção e carinho de todas as horas. São meus maiores exemplos de persistência, fé e amor. Aos meus irmãos, Silas e Bruno, e cunhada Julia, por estarem sempre presentes com palavras de motivação, força e incentivo. Ao meu namorado, Júnior, por seu companheirismo, suporte, atenção, e amor. Graças a minha família eu compreendo as palavras de Charles Chaplin: “A beleza é a única coisa preciosa na vida. É difícil encontrá-la, mas quem consegue descobre tudo”.

A minha orientadora Professora Christie Andrade Ramos Leite-Panissi, engrenagem no meu conhecimento científico, sempre humana em todas as questões que a vida acadêmica nos proporciona. Como gosta de tratar com carinho seus orientandos, minha “mãe acadêmica”. Em sua orientação sempre tive espaço para falar sobre qualquer assunto, com honestidade, respeito e abertura. Admiro sua conduta ética na pesquisa, verdadeira, valorizando a formação especializada de um profissional no campo científico e engajamento de seus alunos. Nunca mediu esforços, mesmo com os percalços de 2 anos de pandemia durante meu doutorado, esteve presente quando eu precisei de suporte nos procedimentos laboratoriais em seguidos recessos de final de ano, chuva ou sol estávamos lá fazendo a pesquisa acontecer de domingo a domingo. Gratidão por tê-la escolhido como orientadora nesta fase tão importante da minha carreira.

Ao meu co-orientador Professor J. Landeira-Fernandez pelo estímulo, parceria, aprendizado e confiança depositada em mim para a realização deste trabalho. Desde o mestrado, sempre atento, impulsionando os meus passos e dando suporte. Seguindo a linha de orientação, o considero meu “pai científico”, porque desde o início norteou minhas curiosidades e meus passos na pesquisa da emoção do medo e dos transtornos de ansiedade, sendo presente à todas as necessidades para meu

desenvolvimento na pesquisa. Nunca hesitou esforços, demonstrando confiança e respeito pelo meu trabalho e dedicação.

Aos Professores Antônio Zuardi, Jaime Hallak, e José Crippa, do Centro de Pesquisas em Canabinóides da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), pela colaboração durante o uso do cannabidiol (CBD). Oferecendo suporte necessário para o desempenho do protocolo experimental.

Aos professores que participaram da Comissão examinadora durante este percurso, que agregaram conhecimentos ao trabalho que foi realizado.

A todos os professores e funcionários do Programa de Psicobiologia da USP-RP, pela prontidão, suporte e ajuda. Em especial, aos Professores Fernando, Fabiana, Patrícia, Jorge, e a Renata B. Vicentini, secretária do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da FFCLRP-USP.

Ao Professor Guilherme Lucas por colaborar com os conhecimentos laboratoriais e disponibilidade para crescimento. À sua técnica Sônia Zanon, exemplo de doçura e amizade, sempre prestativa em sua colaboração, cedendo sua experiência e realizando todo esforço para o alcance de nossa padronização da técnica Western Blotting no LaNeDoC.

A técnica Aline Tibali, que chegou como um presente de natal no LaNeDoC em 2021, começando um ano de 2022 com muita dedicação para todos os alunos terem o melhor ambiente para desempenhar seus procedimentos experimentais. Agradeço sua colaboração durante a padronização da técnica de Western Blotting e seu trabalho durante a execução dos procedimentos experimentais, sempre deixando todos os materiais a disposição para a manutenção da qualidade dos itens para melhor resultado das análises de todos os alunos.

Aos atuais e antigos integrantes do Laboratório (LaNeDoC), Andreza, Ana Luisa, Bruna, Gleice, Henrique, Leonardo, Miguel, Melissa, Nadyne, Paulo, Patrícia, Priscila, Rafael Bonuti, Sarai, e Vitor, pelo carinho, colaboração e companheirismo. Em especial, ao Rafael Cazuza, Eduardo Primini, Milene e Naila, pela transparência, ensinamentos, simplicidade e amizade. A experiência forma o que somos e foi enriquecedora essa estadia ao lado de vocês.

A Dra. Silvia Maisonnette, Flávia Rosseti, e ao Dr. Bruno Galvão por todo aprendizado. Vocês são presentes em todos os momentos, mesmo com a distância Rio de Janeiro e Ribeirão Preto. Em especial, a Silvia e a Flávia que contribuíram nos cuidados com os animais antes e durante o transporte à Ribeirão Preto. A ciência é feita de uma construção de conhecimentos, e a Professora Silvia fez parte do meu gatilho comportamental para minha direção a tão querida “Psicobio” da USP. Também agradeço aos psicólogos Ariadne Fantasia, Matheus Macêdo, e a secretária Verinha da PUC-Rio, pelo apoio e amizade.

A professora Claudia Padovan, do Departamento de Psicologia, por toda sua atenção e consideração durante a etapa final do meu doutorado.

A todos os amigos e familiares que foram presentes. Em especial àqueles amigos de “longa data” que zelam por minha felicidade e bem-estar com ações de gentileza, amor, paciência e infinita sabedoria. Em especial, a Casa de Recuperação e Benefícios Bezerra de Menezes e a Dra. Maria Ignez Elsas.

A CAPES, CNPq, FAPESP (2019/22120-4), PUC-Rio, e a USP-RP, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado. O investimento na educação é o condutor primordial da construção de uma sociedade mais forte e amadurecida. O presente trabalho foi

realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que contribuíram com a minha formação profissional.

Título: Tratamento sistêmico com canabidiol em ratos das linhagens Cariocas de alto e baixo congelamento no modelo de dor crônica: avaliação da dor, da ansiedade e da expressão de BDNF em áreas encefálicas.

Macêdo-Souza, C; Landeira-Fernandez, J.; Leite-Panissi, CRA.

Instituição sede: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

RESUMO

Estudos epidemiológicos mostraram que o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e a dor crônica são doenças altamente prevalentes e debilitantes. Concomitante a estes estudos, pacientes com TAG apresentam alta suscetibilidade de apresentarem quadros de dor crônica. Neste cenário, é crescente a incidência de estudos acerca dos mecanismos neurobiológicos responsáveis por esta relação entre dor e ansiedade. Apesar de serem sistemas independentes, existe sobreposição dos substratos neurais correspondentes a ansiedade e a dor, dentre eles: o hipocampo, a amígdala, o córtex cingulado anterior. Além disso, estudos sugerem que nesta interação ocorra significativa ação da neuroplasticidade. Contudo, os mecanismos neurobiológicos responsáveis por esta ação ainda não são bem conhecidos.

Um meio válido de se estudar estes mecanismos se dá através do uso de modelos animais, através da pesquisa pré-clínica. Para investigar processos da neuroplasticidade na modulação nociceptiva, o sistema canabinóide atua modulando aspectos sensoriais-discriminativos e afetivos-motivacionais da dor e também da ansiedade. Deste modo, este estudo terá como objetivo avaliar possíveis interações da dor crônica neuropática em um modelo animal de ansiedade de medo contextual (modelo de TAG), os ratos das linhagens Cariocas de alto e baixo congelamento. Assim como, analisar os efeitos do tratamento sistêmico crônico com canabidiol (CBD) neste protocolo experimental de comorbidade. Para tal, foram realizados dois protocolos, o primeiro teve como principal objetivo avaliar a dor crônica nesses animais em seus múltiplos aspectos, assim como o efeito do tratamento com canabidiol. Enquanto que o segundo, foi avaliar o nível de ansiedade neste modelo animal. Em ambos, os ratos foram avaliados quanto aos aspectos sensório-discriminativos

(teste de von Frey, acetona e placa quente) antes da lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou não (SHAM) e nos dias 13 e 23 após a cirurgia. O tratamento crônico com CBD (5 mg/kg diários) foi utilizado por dez dias, iniciando-se no 14º dia de pós-operatório. O teste de campo aberto do dia 22 também avaliou a locomoção e o comportamento do tipo ansioso. No primeiro, foi realizado o teste de paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP) no 24ª dia. E no protocolo 2, os animais foram condicionados ao medo contextual (CMC) antes da CCI, e após o tratamento crônico com CBD avaliados no reteste de medo condicionado (RMC). No primeiro estudo, o tratamento com CBD teve um efeito anti-alodínico no limiar mecânico e térmico em todas as linhagens; porém esses efeitos foram menores nas linhagens CAC e CBC. Considerando a avaliação emocional, observamos um efeito ansiolítico em CTL+CCI e CAC+CCI após o tratamento com CBD e aumento da mobilidade em ratos CBC+SHAM. Desse modo, no segundo estudo o tratamento com CBD foi observado que para além dos resultados vistos anteriormente, quando nesse protocolo com CMC, que a linhagem CAC apresentou menor recuperação do efeito anti-alodínico do CBD quando comparada as demais linhagens nos testes nociceptivos. Além disso, no RMC o efeito ansiolítico do CBD foi observado em todas as linhagens e em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo CAC+CCI.

Na análise bioquímica, quando avaliada a expressão do fator neurotrófico do cérebro (BDNF), no protocolo 1 observamos que os ratos CBC e CAC com CCI tratados com CBD mostraram aumento do nível de BDNF no hipocampo dorsal (HD) e o tratamento com CBD reverteu essa condição. O mesmo ocorreu em CTL quando no hipocampo ventral (HV) e em CAC no córtex cingulado anterior (ACC). O tratamento com CBD reverteu diferenças nos níveis basais das linhagens, como visto na amígdala (AMG). Enquanto que no protocolo 2, observamos uma condição de redução dos níveis de BDNF nas linhagens de extremos de ansiedade na estrutura do HD, o mesmo não ocorre em CTL. Ainda, nos ratos CTL+CCI tratados com CBD apresentaram redução da expressão de BDNF, e ratos CAC+SHAM tratados com CBD mostraram aumento nos níveis de BDNF. Na estrutura do HV não foi observado diferenças. Esses resultados sugerem que os

efeitos mecânicos anti-alodínicos e emocionais do CBD podem depender do nível de ansiedade, assim como também seus níveis de BDNF nas estruturas analisadas.

Palavras-chaves: dor crônica; ansiedade generalizada; canabidiol; modelo animal de ansiedade; congelamento; comorbidade.

Title: Systemic treatment with cannabidiol in high- and low-freezing Carioca rats in the chronic pain model: evaluation of pain, anxiety and BDNF expression in brain areas.

MacêdoSouza, C.; Landeira-Fernandez, J.; Leite-Panissi, C.R.A.

Institution: Faculty of Philosophy Science and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

ABSTRACT

Epidemiological studies have shown that generalized anxiety disorder (GAD) and chronic pain are highly prevalent and debilitating diseases. Concomitant to these studies, patients with GAD are highly susceptible to chronic pain. In this scenario, the incidence of studies on the neurobiological mechanisms responsible for this relationship between pain and anxiety is increasing. Despite being independent systems, there is overlap in the neural substrates corresponding to anxiety and pain, including: the hippocampus, the amygdala, and the anterior cingulate cortex (ACC). Furthermore, studies suggest that significant neuroplasticity action occurs in this interaction. However, the neurobiological mechanisms responsible for this action are not yet well known.

A valid way to study these mechanisms is through the use of animal models, through pre-clinical research. To investigate neuroplasticity processes in nociceptive modulation, the cannabinoid system acts by modulating sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain and also anxiety. Therefore, this study will aim to evaluate possible interactions of chronic neuropathic pain in an animal model of contextual fear anxiety (GAD model), rats from the Carioca high and low freezing strains. As well as, analyze the effects of chronic systemic treatment with cannabidiol (CBD) in this experimental comorbidity protocol. To this end, two protocols were carried out, the first of which had the main objective of evaluating chronic pain in these animals in its multiple aspects, as well as the effect of treatment with cannabidiol. While the second was to evaluate the level of anxiety in this animal model. In both cases, the rats were evaluated for sensory-discriminative aspects (von Frey test, acetone and hot plate) before injury due to chronic constriction of the sciatic nerve (CCI) or not (SHAM) and on days 13 and 23 after surgery. Chronic

treatment with CBD (5 mg/kg daily) was used for ten days, starting on the 14th postoperative day. The open field test on day 22 also assessed locomotion and anxiety-like behavior. In the first, the escape/avoidance paradigm test (PEAP) was performed on the 24th day. And in protocol 2, the animals were contextual fear conditioned (CMC) before CCI, and after chronic treatment with CBD evaluated in the fear conditioned retest (RMC). In the first study, CBD treatment had an anti-allodynic effect on mechanical and thermal threshold in all strains; however, these effects were smaller in the CHF and CLF lines. Considering the emotional evaluation, we observed an anxiolytic effect in CTL+CCI and CHF+CCI after CBD treatment and increased mobility in CLF+SHAM rats. Thus, in the second study, treatment with CBD, it was observed that, in addition to the results seen previously, when in this protocol with CMC, the CHF lineage showed less recovery of the anti-allodynic effect of CBD when compared to the other lines in nociceptive tests. Furthermore, in RMC the anxiolytic effect of CBD was observed in all strains and in all experimental groups, with the exception of the CHF+CCI group.

In the biochemical analysis, when evaluating the expression of brain neurotrophic factor (BDNF), in protocol 1 we observed that CLF and CHF rats with CCI treated with CBD showed an increase in the level of BDNF in the dorsal hippocampus (HD) and treatment with CBD reversed this condition. The same occurred in CTL when in the ventral hippocampus (HV) and in CHF in the anterior cingulate cortex (ACC). CBD treatment reversed differences in basal lineage levels, as seen in the amygdala (AMG). While in protocol 2, we observed a condition of reduced BDNF levels in lineages with extreme anxiety in the HD structure, the same does not occur in CTL. Furthermore, CTL+CCI rats treated with CBD showed a reduction in BDNF expression, and CHF+SHAM rats treated with CBD showed an increase in BDNF levels. No differences were observed in the structure of the HV. These results suggest that the anti-allodynic and emotional mechanical effects of CBD may depend on the level of anxiety, as well as its levels of BDNF in the structures analyzed.

Keywords: chronic pain; generalized anxiety; cannabidiol; animal model of anxiety; freezing; comorbidity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Transtorno de ansiedade generalizada e Dor crônica neuropática*

Estudos epidemiológicos indicam que o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e a dor crônica são doenças altamente prevalentes e debilitantes no mundo (Rice et al., 2016; Steingrimsdóttir et al., 2017; Tyrer e Baldwin, 2006). O TAG é caracterizado principalmente por estado persistente e excessivo de preocupação (World Health Organization, 2017), enquanto que a dor crônica é marcada por classes de dor que persistem ou se repetem após fase de recuperação de uma lesão (Merskey e Bogduk, 1986). Concomitante a esta prevalência, a dor crônica ou persistente é relacionada com diversas desordens psiquiátricas (Leite-Almeida et al., 2015). Além disso, vários estudos demonstram que dentre os transtornos de ansiedade, os pacientes acometidos com TAG são os mais suscetíveis a desenvolver dor crônica (Bandelow, 2015; Gureje, 2008). Neste cenário de comorbidade, é crescente a incidência de estudos na literatura acerca dos mecanismos neurobiológicos responsáveis pelo desencadeamento dos processos desta relação entre dor e na ansiedade (Asmundson et al., 2009; Etkin, 2012; Bradford et al., 2015). Contudo, estudos demonstram que os sistemas correspondentes a estes processos são independentes e possuem diferentes aspectos psicofisiológicos (Brandão, 2019), mantendo-se ainda pouco conhecida esta interação.

Considerando a teoria evolutiva (Darwin, 1897; 2014), um meio de se estudar estes mecanismos se dá pelo uso de modelos animais. Pesquisas com modelos animais são utilizados em larga escala pela sua validade e fidedignidade (Belzung e Lemoines, 2011; Berge, 2011; Lang et al., 2000; Willner e Mitchell, 2002), avaliando o repertório comportamental de defesa desencadeado nas situações de ameaça como fator preditivo do medo/ansiedade. Isto porque, a capacidade de adaptação ao meio envolve respostas de luta e fuga importantes para assegurar a sobrevivência das espécies. Portanto, medo e ansiedade são conceitos que se sobrepõem, sendo o primeiro interpretado como “perigo real” ao passo que o segundo é um “perigo potencial”

(**American Psychiatric Association, 2013; Blanchard e Blanchard, 1988**). Neste sentido, a ansiedade possui importante valor motivacional. Segundo a lei de desempenho e excitação de Yerkes-Dodson (**Yerkes e Dodson, 1908**) existe relação entre a quantidade ideal de medo/ansiedade para se desempenhar determinada tarefa, seja ela de alta, média ou baixa dificuldade. Esta quantidade ideal está diretamente relacionada ao bom desempenho (*performance*).

Por outro lado, se a quantidade de ansiedade depositada na atividade for inadequada haverá prejuízo na execução. Entende-se que a ansiedade é importante para a realização das atividades rotineiras, e sua desregulação fisiológica e comportamental pode se tornar patológica, sendo disfuncional ao sujeito (**Cruz e Landeira-Fernandez, 2012**). Além disso, em um estudo de condicionamento de medo (**Fanselow, 1980**), a intensidade do estímulo aversivo (ameaça, geralmente um choque nas patas, sendo este um estímulo nociceptivo) modulou a força da resposta condicionada ao medo durante a aprendizagem aversiva, sendo este considerado como um processo associado a aquisição da memória do medo/ansiedade.

O conceito de dor apresentar complexa definição. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*IASP*), a dor pode ser descrita com “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante à aquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” mo” (**Raja et al., 2020**). A sensibilidade dolorosa possui dois componentes, o perceptivo-discriminativo e o aversivo-cognitivo-motivacional (**Brandão, 2019**). O primeiro é discriminável, refere-se à sensibilidade dolorosa (**Leite-Almeida et al., 2015**). E o segundo, compreende desde a ação reflexa até as respostas emocionais complexas associadas à luta e fuga do estímulo ameaçador (**Brandão, 2019**).

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 das vias ascendentes transmitem os sinais nociceptivos para áreas do sistema nervoso central (SNC) responsáveis pelo processamento e modulação deste estímulo, respondem a sinais físicos (estímulos mecânicos e térmicos) e substâncias químicas, sendo traduzidos através dos

nociceptores (receptores de alto limiar, para estímulos mecânicos, térmicos ou polimodais – que incluem estímulos mecânicos, térmicos e químicos). Estes são conduzidos por fibras mielinizadas finas (A δ) ou desmielinizadas (fibras C). As fibras (A δ) conduzem sensações dolorosas agudas, rápidas e bem localizadas, ao passo que as fibras C são de condução mais lenta, e estão associadas com um tipo de dor mais tardia e difusa (**Caterina e Julius, 2001**).

As informações dolorosas nas vias ascendentes nociceptivas são constituídas por distintos tratos, sendo eles: espinotalâmico, espinorreticular, espinomesencefálico, via pós-sináptica da coluna dorsal, espinocervical, sistema trigeminal e sistema proprioespinal. O principal trato ascendente é o espinotalâmico (**Millan, 2002**), 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), filogeneticamente mais novo, de condução rápida, responsável pela dor cutânea superficial, ou seja, pelos aspetos discriminativos da dor; e (ii) trato ascendente medial (paleoespinotalâmico), filogeneticamente mais antigo, de condução lenta, difícil de localizar, associado aos aspectos autonômicos e emocionais desagradáveis da dor. Além disso algumas fibras espinotalâmicas também projetarem-se na substância cinzenta periaquedutal constituindo importante ligação entre as vias ascendentes e descendentes (**Millan, 1999**).

A partir de seus mecanismos biológicos, a dor pode ser classificada em nociceptiva (fisiológica), neuropática (lesão no sistema nervoso central ou periférico), e dor psicogênica (fatores psicológicos prevalecem na gênese da dor), como ocorre nos quadros de dor associados à ansiedade generalizada e a depressão (**Brandão, 2019**). Deste modo, o sistema fisiológico da dor também está associado a mecanismos encefálicos de controle da dor, e aspectos psicológicos podem influenciar as respostas nociceptivas.

Analogamente a este aspecto, estudos sugerem que reações defensivas desencadeadas no medo/ansiedade relacionam-se com processamentos de dor. Dentre estes estudos, Roeska et al. (**2009**), utilizando modelo de dor neuropática periférica em ratos, mostrou aumento de

comportamentos do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado (sigla do inglês, EPM), teste clássico de ansiedade. Assim como demonstram que o uso de benzodiazepínicos pode reduzir a ansiedade causada pela dor neuropática, sem ter efeito analgésico. Do mesmo modo que uma droga opióide pode causar analgesia, sem estar associada efeito ansiolítico. Estes resultados corroboram com a hipótese de que os substratos neurais destes sistemas são distintos, entretanto outros estudos indicam sobreposição considerável entre os substratos neurais que subservem medo/ansiedade e dor (**Brandão, 2019**). Esta hipótese foi sugerida pelo modelo perceptivo-defensivo-recuperativo de Bolles e Fanshew (1980). Este modelo retrata que durante a aprendizagem aversiva o estímulo é detectado, codificado e memorizado (fase perceptiva). Como consequência, o medo intenso leva a redução da sensibilidade dolorosa, ou seja, o sistema analgésico inibe a dor para responder defensivamente (fase defensiva) e os comportamentos recuperativos têm a finalidade de tratar a injúria (fase recuperativa). Dentro desta perspectiva, considerando a dor crônica, a qual persiste mesmo após a fase de recuperação, esta pode ser acompanhada de efeito ansiogênico (**Koga et al., 2015**). Neste paradigma, a ansiedade também pode resultar no aumento da dor, e consequentemente influenciar os sintomas de hiperalgesia e alodinia. Embora pouco se saiba sobre estes mecanismos, diferentes estudos psicofarmacológicos estão sendo realizados nas últimas décadas para a busca de tratamentos mais assertivos, eficazes e potentes nos transtornos de ansiedade associados à dor crônica.

1.2. Estruturas neurais do medo/ansiedade e da dor

Neste contexto, as vias da dor correspondem a um sistema sensorial complexo com influências cognitivas, emocionais e comportamentais. McCarberg e Peppin (2019) sugerem que a cronificação da dor pode ser conceituada como plasticidade induzida pela atividade do circuito límbico-cortical, e que pode ser vista como a persistência da memória da dor, assim como também, a incapacidade de extinguir tais memórias dolorosas. Esta rede sucederia na reorganização do

neocórtex. Em vista disso, no estudo citado, a rede límbico-cortical é responsável pela função de determinar se os sinais nociceptivos são transitórios ou crônicos. Por conseguinte, a dor crônica é associada a memória aversiva envolvendo diferentes estruturas deste sistema na experiência da dor aversiva-cognitiva-motivacional.

Estudos realizados em modelos animais, e também com humanos mostraram substratos neurais comprometidos primariamente com o componente afetivo da dor (**Berge, 2011; Rainville, 2002**). Dentre estas estruturas, o hipocampo parece ser responsável pela mediação do impulso aversivo (**Ploghaus, 2001**); a amígdala responsável pela antecipação da dor e pela expressão qualitativa de medo na percepção de potenciais ameaças (**LeDoux, 2012**); a ínsula, estaria correlacionada com estados emocionais, sensoriais e cognitivos, sendo ativada também na empatia (**Singer et al., 2004**); o córtex cingulado anterior (sigla do inglês, *ACC*) que está associado a dimensão de sensibilidade e a desagradabilidade correspondente dos estímulos nocivos (**Vogt, 2005**); o córtex pré-frontal modula as reações à dor (**Wiech et al., 2008**); a substância cinzenta periaquedutal (sigla do inglês, *PAG*) seria sítio de ambos sistemas (nociceptivo e emocional), sendo uma estrutura importante na modulação da dor (**Brandão, 2019**).

Considerando as estruturas que compõe o sistema de percepção e modulação da dor, e em particular o hipocampo, estudos prévios mostraram que a neurogênese desta estrutura está relacionada com a modulação de ansiedade (**Dias et al., 2014**), e da dor persistente (**Apkarian et al., 2016**); entretanto estes mecanismos ainda não são totalmente esclarecidos (**Zheng et al., 2016**). **McCarberg e Peppin (2019)** apontam sobreposição anatômica e fisiológica entre dor, aprendizado e memória na plasticidade do sistema nervoso consoante a estes processos, principalmente nas áreas associadas ao hipocampo e a amígdala.

Para além destes substratos neurais, outros parecem ser relevantes nesta interação. O *ACC* que desempenha papel importante na modulação de dor emocional, também possui conexões com a amígdala, o que sugere seu envolvimento no processo de medo/ansiedade desencadeados em experiências dolorosas (**Flonta et al., 2017**). Assim como, a *PAG* e o núcleo *accumbens* também

estão envolvidos no controle na dor crônica (Mills et al., 2017). Não obstante, apesar da neurogênese na formação hipocampal ter destaque nestes estudos, ainda carecem pesquisas com abordagens farmacológicas, físicas e/ou psicológicas que investiguem a neurogênese no sistema límbico, em vista da quantidade de regiões envolvidas na modulação destes processos.

1.3. Modelo animal de ansiedade: Cariocas de alto e baixo congelamento

Segundo a literatura, o estudo comparativo de modelos genéticos pode ser uma ferramenta de proveitosa utilidade no estudo dos mecanismos envolvidos nos transtornos relacionados à ansiedade. De tal forma que, estes modelos genéticos, normalmente compostos de duas linhagens contrastantes, podem ser originados a partir de: (a) características que se diferenciaram aleatoriamente por cruzamentos independentes realizados em diferentes populações ou linhagens; ou (b) a partir de uma seleção genética bidirecional planejada sobre uma característica específica (Trullas e Skolnick, 1993). A criação seletiva bidirecional de uma resposta defensiva ou qualquer outra característica fenotípica representa uma técnica da qual os animais são criados com o objetivo de modificar determinada frequência gênica, que estão subjacentes a um fenótipo em particular.

Portanto, o cruzamento de animais de certa população, com base nos extremos opostos de uma característica observável, irá propiciar este fenótipo particular em direções opostas após diversas gerações, propagando à criação de duas linhagens contrastantes (Trullas e Skolnick, 1993; Rex et al., 1996; Izidio et al., 2005). Os modelos animais de ansiedade, baseados no experimento realizado com a manipulação da variável independente da indução ao medo, podem ser divididos em modelos animais de medo inato ou modelos baseados em aprendizagem associativa.

Dentre estes modelos de aprendizagem associativa, temos os modelos de “medo associado ao contexto” e os de “medo associado ao estímulo específico/discreto”. Neste sistema motivacional de defesa, a ativação pode acontecer por duas maneiras: estímulos naturalmente ameaçadores (estímulos incondicionados), que são reconhecidos de maneira inata por todos os indivíduos de uma

determinada espécie, através do processo de evolução filogenético; e estímulos condicionados, adquiridos através de processos de aprendizagem ao longo do desenvolvimento ontogenético de cada organismo (**Gomes e Landeira-Fernandez, 2008**).

De acordo com Gomes et al. (2011) através da perspectiva evolucionista, os transtornos de ansiedade refletem as falhas que ocorrem no funcionamento dos circuitos neurais que estão responsáveis por detectar, organizar e expressar um conjunto de reações de defesa. Tal caráter filogenético dos circuitos é o responsável por possibilitar que estes sejam investigados de forma experimental em diversas espécies animais. Com o objetivo de estudar a ansiedade patológica foi desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RIO), Brasil, um modelo experimental genético para extremos de ansiedade gerando os roedores chamados de *Cariocas*. Este laboratório vem ao longo de 17 anos desenvolvendo a seleção fenotípica de duas linhagens baseada na resposta de congelamento condicionado ao contexto previamente associado a choques elétricos nas patas. Foi realizado o cruzamento de machos e fêmeas *Wistar* entre os animais que apresentavam maior e menor frequência da resposta comportamental de congelamento condicionado ao contexto da câmara experimental (Insight; Ribeirão Preto, SP, Brasil), onde os animais foram expostos a três choques elétricos não sinalizados no dia anterior sofrendo a associação do estímulo aversivo aos estímulos contextuais. A partir deste protocolo básico, foram criados através de uma seleção bidirecional de extremos de ansiedade os ratos *Cariocas* de Alto Congelamento (CAC) e de Baixo Congelamento (CBC). Assim como também foram selecionados animais através de cruzamentos aleatórios desta CEPA, os animais controles (CTL). Gomes e Landeira-Fernandez (2008) encontraram após três gerações, diferenças presentes entre as duas linhagens (CAC e CBC), indicando a potente força de influência da herança genética nesta classe de aprendizagem.

De acordo com Darwin (1972), perante a uma situação de ameaça “o homem amedrontado primeiro fica como uma estátua imóvel e sem fôlego [...]” (tradução nossa, p. 290). Esta frase remete a observação de Darwin sobre o comportamento de congelamento. Este é um dos

comportamentos do repertório defensivo, amplamente estudado na literatura e é caracterizado pela imobilidade corporal com exceção dos movimentos respiratórios acompanhado de respostas fisiológicas como: piloereção, exoftalmia, aumento dos batimentos cardíacos, entre outros (**Fanselow, 1980**).

Fazendo uso da seleção deste comportamento defensivo através da técnica de aprendizagem ao medo condicionado na criação destes animais, encontrou-se uma série de evidências indicando esta seleção de extremos de ansiedade como um modelo válido e confiável para estudo do Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), tendo como base os aspectos polimodal do condicionamento de medo ao contexto. O condicionamento se dá por três fases: habituação, treino e teste. Sendo as duas primeiras realizadas no primeiro dia e 24h após realizado o teste.

Ainda, sabe-se que os diferentes tipos de comportamento defensivo podem estar associados ao nível de intensidade e distancia do estímulo aversivo (**Blanchard e Blanchard, 1988**), e nesse aspecto o condicionamento de medo ao estímulo discreto e contextual são mediados por diferentes circuitarias neuronais (**Indovina et al., 2011; Kim et al., 1992; Phelps e LeDoux, 2005; LeDoux e Phillips, 1992; Curzon et al., 2011**). Tendo em vista esta análise do medo condicionado, existem duas circuitarias subjacentes, sendo o hipocampo uma estrutura essencial para a aquisição do medo contextual, enquanto que para o medo de estímulo discreto estudos demonstraram que o envolvimento do hipocampo pode não ser crítico (**Gomes e Landeira-Fernandez, 2008; LeDoux e Phillips, 1992; Huckleberry et al., 2016; Landeira-Fernandez et al., 2006**) nesse processamento.

Embora os resultados ainda sejam muito contrastantes, no que concerne o modelo animal dos *Cariocas*, uma série de estudos vem confirmando suas características de um modelo animal de TAG (**Wiech et al., 2008**) no qual pode ser estudado efeitos de psicofarmacológicos (**Daniele et al., 2020; Lages et al., 2023**), drogas em potencial terapêutico e as possíveis comorbidades (**Galvão et al., 2011; Bezerra-Karounis et al., 2020; Macêdo-Souza et al., 2020**) inerentes desta condição. Como neste atual estudo, investigamos a comorbidade com o modelo de dor crônica neuropática e os efeitos de uma droga de potencial terapêutico.

1.4. Expressão de BDNF nos Cariocas de alto e baixo congelamento

Um estudo realizado nos ratos *Cariocas* (Dias et al., 2009) investigou a atuação de biomarcadores hipocampais na aprendizagem de medo condicionado ao contexto e revelou que o hipocampo da linhagem CAC apresenta uma menor expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (sigla do inglês, *BDNF*) “*proBDNF*”, resultando na alta retenção de memória de medo e ansiedade.

O BDNF é uma proteína endógena responsável por regular a sobrevivência neuronal e a plasticidade sináptica do sistema nervoso periférico e central, seu aumento está relacionado com a aprendizagem e memória. Nesse paradigma, Dias et al. (2009) apresentaram esta forte relação entre o BDNF e a modulação da ansiedade, descrevendo que a aquisição contextual requer certa produção de BDNF maturado (sigla do inglês, *mBDNF*). Além disso, Revest et al. (2009) também afirmaram que a neurogênese hipocampal adulta está envolvida no aumento de comportamentos do tipo ansioso, estando associada a regulação de estados afetivos. Portanto, a expressão de BDNF modula muitas funções fisiológicas, englobando sinaptogêneses, neurogênese, e atividades dependentes de plasticidade (Botterill et al., 2015).

1.5. Potencial terapêutico do canabidiol (CBD) nos estados de dor e ansiedade

Dentre os sistemas neuroquímicos envolvidos na modulação da ansiedade e da dor, o sistema canabinóide é um importante sistema endógeno que participa da circuitaria da sensibilidade dolorosa, atuando simultaneamente ao sistema opioide, e desempenhando papéis essenciais no desenvolvimento e resolução dos estados da dor, bem como nos seus aspectos afetivos e cognitivos. Campos et al. (2016) aponta estas diferentes características do canabidiol (CBD), tal como a neuroproteção e a neurogênese, o que pode resultar em redução de danos neurais decorrente de respostas inflamatórias, por exemplo. Além disso, os canabinóides endógenos (CB) distribuem-se

pelo sistema nervoso central e periférico, modulando diversos processos comportamentais, englobando cognição, emoção, processamento sensorial e nocicepção (**Matsuda et al., 1990**).

Historicamente, o sistema canabinóide foi investigado a partir da análise dos efeitos da *Cannabis sativa* em alvos específicos no sistema nervoso. Somente com o desenvolvimento tecnológico alcançado a partir da década de 1940 foi possível o isolamento dos compostos. Nas décadas seguintes suas estruturas químicas foram clarificadas, 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**). O THC é o principal composto responsável pelos efeitos psicotomiméticos da *Cannabis* (efeitos mentais e psíquicos semelhantes ou associados a estados psicóticos, envolvendo modificações na percepção, pensamento, humor e na sensação subjetiva da consciência, entre outros), sendo sua estrutura química isolada por Gaoni e Mechoulam (**1964**), e elucidada em 1967 (**Mechoulam e Hanus, 2000**).

No que diz respeito ao CBD, este composto foi isolado na década de 1940 por dois grupos independentes (**Adams, 1942; Jacob e Todd, 1940**), e sua estrutura química elucidada a partir da década de 60 (**Matsuda et al., 1990**). Ademais, as proporções destas duas moléculas no preparo da *Cannabis*, assim como também de seus óleos e extratos essenciais podem alterar os seus efeitos. Deste modo, diferentes fontes e preparações da planta podem apresentar efeitos fisiológicos, farmacológicos, e psicológicos bem variáveis (**Cook et al., 2015**). É importante destacar que o CBD é um constituinte que não possui os efeitos psicotomiméticos do THC, e possui propriedades terapêuticas que desencadeiam efeitos múltiplos e potentes em distúrbios neuropsiquiátricos, com diversas ações do sistema nervoso central e periférico (**Blessing et al., 2015; De Gregorio, 2019**).

Neste paradigma, o CBD tem recebido grande destaque correspondente aos seus efeitos antipsicóticos (**Zuardi et al., 1991**), hipnóticos e sedativos (**Carlini e Cunha, 2013; Monti, 2004; Pickens, 2012**), antioxidantes, antiinflamatórios (**Campos et al., 2016**), além de apresentar baixa toxicidade e alta tolerabilidade na ausência de efeitos psicotomiméticos (**Carlini e Cunha, 2013;**

Bergamaschi et al., 2011). Nesse sentido, o CBD é visto como possível estratégia terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias persistentes (**Carrier et al., 2006**), da dor neuropática (**Costa et al., 2007**) e dos distúrbios da ansiedade (**Blessing et al., 2015; Premoli et al., 2019**). Além disso, os efeitos ansiolíticos do CBD já foram demonstrados tanto em estudos pré clínicos (em modelos animais) (**Campo et al., 2013; Alves et al., 2010; Guimarães et al., 1990**), quanto em humanos com transtorno de ansiedade social (**Bergamaschi et al., 2011**). De fato, revisão de Campos (**Campos et al., 2016**) indicou que o CBD está associado à diversas atividades, dentre elas a neurogênese no sistema nervoso central (SNC).

Em relação ao seu mecanismo de ação, O CBD atua no sistema endocanabinóide, com afinidade a receptores do tipo CB1 e CB2, bem como no sistema endovanilóide, atuando via receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (sigla em inglês, *TRPV1*) (**Maccarrone et al., 2016**). Estudos sugerem que estes receptores TRPV1 participam da modulação do comportamento emocional e da sensibilidade dolorosa em regiões encefálicas (**Cristino et al., 2006; Mezey et al., 2000**). Considerando os diferentes receptores de potencial transitório (*transient receptor potential*, sigla em inglês, *TRP*), o TRPV1 desempenha papel crucial na integração, e na detecção de estímulos químicos e térmicos nociceptivos (**Caterina et al., 2000**). Além disso, outro estudo indicou que lesões neuropáticas específicas, e doenças inflamatórias persistentes levam ao aumento da expressão de receptores TRPV1 na medula espinal, fato que colabora para a sensibilização dos neurônios aferentes primários, e contribui com o desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia (**Hudson et al., 2001**). Desta forma, estes receptores tem sido considerados alvo terapêutico importante no tratamento da dor, uma vez que: (i) seus agonistas, como a capsaicina, causam dessensibilização dos receptores, promovendo alívio da dor em estudos pré-clínicos; e (ii) seus antagonistas reduzem os comportamentos relacionados à dor em modelos animais de inflamação associada à osteoartrite, câncer ou à dor pós-operatória (**Gunthorpe e Chizh, 2009**).

Considerando as condições de dor persistente, estes quadros são frequentemente acompanhados de desordens emocionais e cognitivas, como por exemplo o aumento da ansiedade.

Essas mudanças disfuncionais ou inadaptadas nos circuitos aversivos/motivacionais provavelmente contribuem para os desafios do tratamento da dor crônica. As abordagens experimentais e métodos utilizados para medir a dimensão afetiva da dor ainda são escassas (**Genaro et al., 2017**). Uma compreensão mais profunda da base neural da nocicepção e seu componente aversivo na ansiedade patológica não só pode ampliar nosso estudo sobre a dor, mas também abrir novas abordagens para o manejo de estados comórbidos de dor aguda e crônica neuropática em grupos de uma população com ansiedade patológica, como nos quadros de transtorno de ansiedade generalizada. Desta forma, fundamentados na literatura apresentada nesta pesquisa, investigamos os efeitos do tratamento com CBD nas linhagens de ratos selecionados ao medo contextual submetidos ao modelo de dor crônica, utilizando o paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP) avaliando a dor afetiva (**LaBuda e Fuchs, 2000**). Assim como também, a sensibilidade dolorosa com os testes von Frey (**Martinov et al., 2013**), teste de acetona (**Deuis et al., 2017**), e placa quente (**Deuis et al., 2017**). Para avaliação da motricidade e ansiedade foi utilizado o teste de campo aberto, e para avaliar a ansiedade associada a seleção fenotípica deste modelo animal foi realizado o teste do condicionamento de medo contextual (**Gomes e Landeira-Fernandez, 2008**). Com o objetivo de investigar de forma exploratória a ação do BDNF nesse quadro de comorbidade, foram dissecadas e quantificado o BDNF em diferentes áreas encefálicas, pela técnica de western blotting. Dentre essas, o hipocampo (dorsal e ventral), amígdala, córtex cingulado anterior e substância cinzenta periaquedutal.

Considerando a necessidade de buscarmos alternativas terapêuticas para o tratamento da dor crônica em indivíduos com distintos quadros de ansiedade, **hipotetizamos** neste estudo que o tratamento crônico sistêmico com CBD pode atuar de forma distinta promovendo analgesia e efeito ansiolítico em modelo animal de TAG (*Cariocas Alto e Baixo Congelamento*) submetido à neuropatia periférica. Adicionalmente, hipotetizamos que a ação do CBD pode estar associada com o nível de BDNF em estruturas encefálicas responsáveis pela modulação dos estados emocionais e da dor.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento sistêmico com CBD é capaz de reduzir a alodinia, hiperalgesia e ansiedade em modelo de dor crônica nas Linhagens dos *Cariocas* (modelo de TAG) de alto (CAC) e baixo congelamento (CBC). Em particular, avaliamos se a administração de CBD altera de maneira específica a resposta comportamental frente a estímulos nocivos agudos (térmicos e mecânico), ou seja, do componente sensorial-discriminativo da dor, e/ou do componente afetivo-motivacional (qualidade aversiva da dor), assim como do nível de ansiedade no teste de condicionamento ao medo contextual. Em uma segunda etapa, foi avaliado a expressão da proteína BDNF em áreas encefálicas envolvidas na modulação do componente afetivo-motivacional da dor e da ansiedade.

Desta maneira, este estudo apresenta os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar a sensibilidade mecânica através por meio do teste von Frey e da sensibilidade térmica pelos testes da acetona (frio) e da placa quente (calor), respectivamente, em ratos da linhagem *Carioca* (CAC, CBC e CTL) com dor crônica induzida por constrição do nervo ciático (CCI) e submetidos ao tratamento sistêmico (por 10 dias) com CBD ou veículo.

2. Avaliar o efeito do tratamento sistêmico com CBD nas linhagens dos ratos *Cariocas* com o modelo de dor crônica (CCI) submetidos ao teste de paradigma de fuga/esquiva ao local (qualidade aversiva da dor).

3. Avaliar o efeito do tratamento sistêmico com CBD nas linhagens dos ratos *Cariocas* com o modelo de dor crônica (CCI) submetidos ao teste de condicionamento de medo contextual.

4. Avaliar se o tratamento sistêmico com CBD altera a expressão da proteína BDNF em ratos CAC, CBC e CTL submetidos à CCI nas seguintes estruturas: hipocampo, amígdala, córtex cingulado anterior, substância cinzenta periaquedutal, utilizando a técnica de western blotting.

Considerando estes objetivos pretendemos compreender no modelo animal de ansiedade *Cariocas*), quais características estariam envolvidas na modulação da dor crônica relacionados com a neurogênese causada pelo CBD nas áreas encefálicas abordadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e condições experimentais

Neste estudo foram utilizados 192 ratos Wistar das gerações 34 a 38 das linhagens CBC (n = 64), CTL (n = 64) e CAC (n = 64), do Laboratório de Neurociência Comportamental (LANEC) da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC – Rio) (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). Ao desmame (21º dia pós-natal), ratos do mesmo grupo foram alojados juntos (seis animais) por gaiola de polipropileno 35 x 19 x 25 cm, forrada com maravalha em ambiente com temperatura controlada (24° C ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Os ratos foram transportados com um mês de idade por transporte aéreo para o biotério do Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Para controlar os efeitos da ninhada, os ratos foram selecionados aleatoriamente de um mínimo de cinco ninhadas diferentes por linhagem e animais do grupo controle. Após o período de habituação (30 dias) mantidos nas mesmas condições, os ratos foram submetidos a diferentes tratamentos. No início dos experimentos, os ratos tinham 8 a 10 semanas de idade, pesando ± 220 g. Um observador treinado realizou à cego a separação inicial, os cuidados dos grupos experimentais dos protocolos.

Todos os protocolos experimentais foram conduzidos sob normas e cuidados no uso de animais de laboratório, 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 para Uso de Animais pela Universidade de São Paulo campus de Ribeirão Preto (protocolo número 2019.1.833.59.2). O software G*Power 3.1.7 (Desenvolvedor Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), e estudos anteriores (Dias et al., 2014; Apkarian et al., 2016) foram usados para determinar o tamanho da amostra. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e usar o menor número possível de animais. A distribuição de ratos utilizada neste estudo está sumarizada na Figura 1. Os protocolos utilizados estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

Figura 1: Esquema da distribuição dos 12 grupos utilizados neste estudo, com 8 animais cada. Primeira variável independente (VI): Linhagens (CAC, Cariocas de alto congelamento; CTL, Cariocas controle; CBC, Cariocas de baixo congelamento); segunda VI é o modelo de dor neuropática (SHAM ou CCI); a terceira VI é o tratamento de CBD ou veículo. Ao todo, dois protocolos foram realizados (avaliação da sensibilidade dolorosa e da dor aversiva; ou avaliação da ansiedade). TN: testes nociceptivos (von Frey, acetona e placa quente); CA: teste do campo aberto; *Sham: cirurgia fictícia; *CCI: constrição do nervo ciático; PEAP: Paradigma de fuga/esquiva ao local; CMC: condicionamento de medo contextual. O número de animais em cada grupo foi estimado considerando estudos similares (**Dias et al., 2014; Apkarian et al., 2016**) e a análise do poder estatístico gerado no Software G* Power 3.1.7 (Desenvolvedor Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Fonte: autoria própria.

Protocolo 1

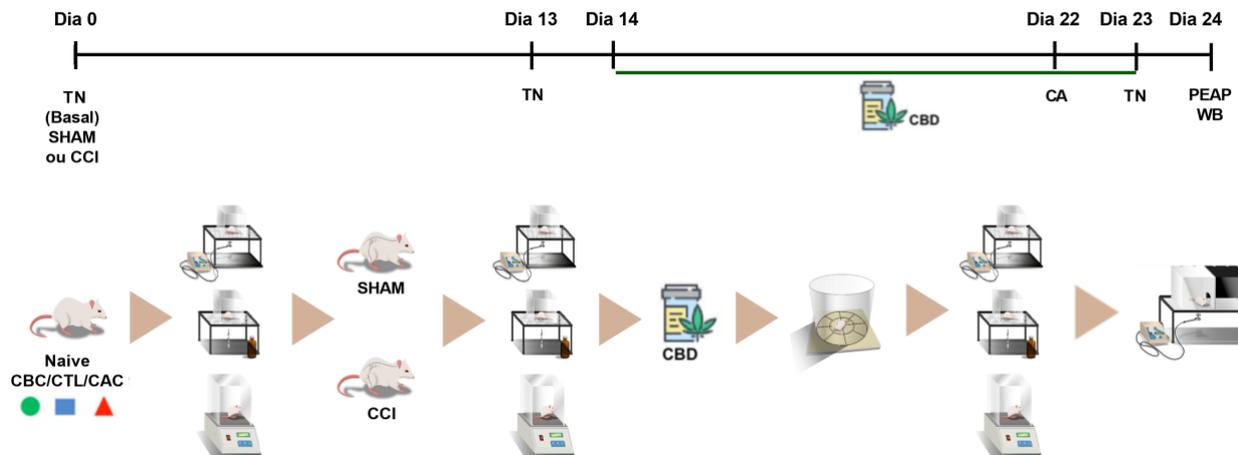


Figura 2. Protocolo 1: testes nociceptivos (TN, von frey, placa quente e acetona); cirurgia de constrictão do nervo ciático (CCI); grupo controle da cirurgia de constrictão do nervo ciático (SHAM); campo aberto (CA); paradigma de fuga e esquiwa (PEAP); western blotting (WB). Tratamento crônico com 5mg/kg de canabidiol (CBD). CAC: Cariocas alto congelamento; CBC: Cariocas de baixo congelamento; CTL: Cariocas controle (cruzamentos aleatórios). Fonte: autoria própria.

Protocolo 2

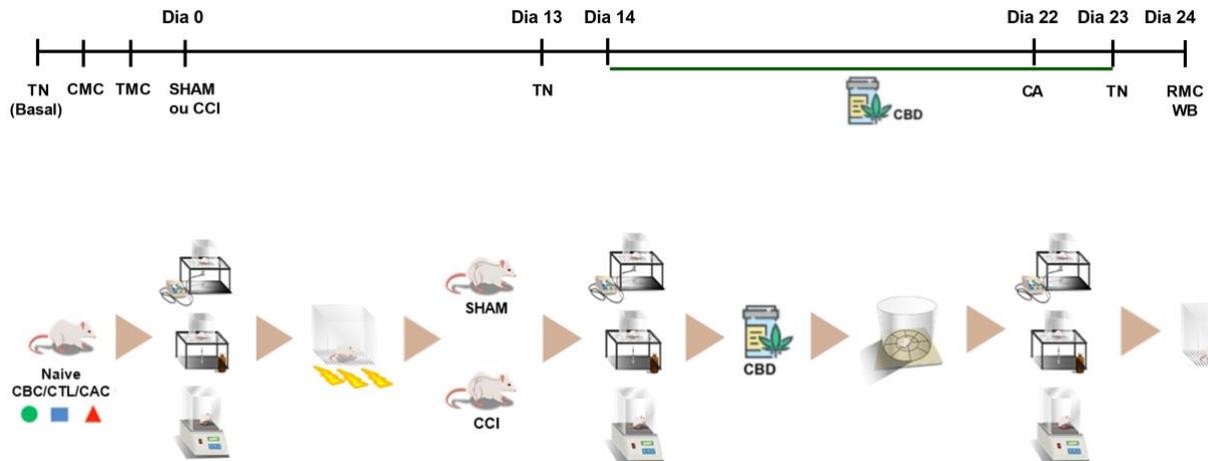


Figura 3. Protocolo 2: testes nociceptivos (TN); condicionamento de medo contextual (CMC); cirurgia de constrictão do nervo ciático (CCI); teste de medo contextual (TMC); reteste de medo contextual (RMC); western blotting (WB). Tratamento crônico com 5mg/kg de canabidiol (CBD). CAC: Cariocas alto congelamento; CBC: Cariocas de baixo congelamento; CTL: Cariocas controle (cruzamentos aleatórios). Fonte: autoria própria.

3.2. Constrictão crônica do nervo ciático (CCI)

A neuropatia periférica foi induzida por meio da ligadura do nervo isquiático direito, de acordo com método previamente descrito por Bennett & Xie (1988), adaptado por Dias et al. (2013). Para isso, os ratos foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina 10% (75

mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg), administradas no membro posterior por via intramuscular. Após estarem anestesiados, os animais foram colocados sobre uma mesa cirúrgica, com o ventre para baixo e seus membros imobilizados com o auxílio de esparadrapo. Nos membros posteriores realizou-se tricotomia na parte interna e a desinfecção da área com iodopolvidina. A incisão de 1,5 cm foi realizada na face interna da coxa alcançando a fáscia muscular de modo a separar os músculos glúteos e o músculo bíceps femoral, com exposição do nervo ciático. Foi realizada dissecação na altura do pequeno trocânter do fêmur em um comprimento medindo em torno de 8 mm do nervo ciático proximal. O nervo foi constricto usando um fio mononylon 4.0 e também transfixado com o mesmo fio, usando-se uma mini-agulha cortante 3/8. O nervo ciático foi transfixado em 3/4 de seu diâmetro e constricto em um local separado por 2 mm de distância aproximadamente. Em seguida, foi recolocado no seu local de origem, os músculos liberados e a pele suturada com fio de algodão. Esse procedimento foi realizado no membro posterior direito constituindo o modelo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático (CCI). No grupo controle falso-operado (Sham), o nervo foi apenas exposto (Figura 4). Logo depois de concluída a realização da ligadura ou a simples exposição do nervo, o tecido epitelial foi suturado com fio de seda 2.0.

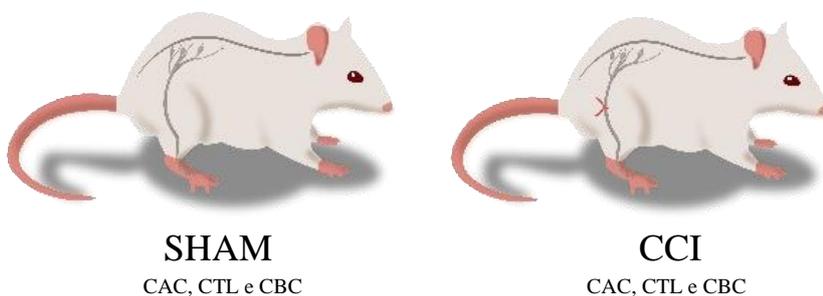


Figura 4. Ratos com cirurgia sem a constrição do nervo ciático (SHAM) e com a constrição do nervo ciático (CCI). CAC: Cariocas alto congelamento; CBC: Cariocas de baixo congelamento; CTL: Cariocas controle (cruzamentos aleatórios). Fonte autoria própria.

3.3. Avaliação da sensibilidade mecânica

A sensibilidade mecânica foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata dos animais (von Frey eletrônico), aplicado por um anestesímetro eletrônico (Deuis et al., 2017; Wu et al., 2008). O aparelho possui um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). No dia anterior à cirurgia de constrição de nervo ciático, os ratos foram habituados a caixa-teste em que foi realizada a avaliação da sensibilidade mecânica por 10 min. No primeiro dia experimental, todos os animais foram colocados na caixa-teste por 30 minutos, e foi realizada a avaliação da linha de base com utilização do analgesímetro digital modelo von Frey (Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O estímulo foi cessado quando o animal produziu uma resposta de retirada ou sacudida da pata estimulada (Figura 5).

Em detalhes, para avaliação da sensibilidade mecânica, foi avaliado o limiar (em gramas) de retirada de pata após a aplicação de um estímulo mecânico, com o analgesímetro, o qual utiliza um filamento (0,5 mm de diâmetro) com aumento progressivo de força (0 a 50 gramas em período de 15 segundos). O limiar foi avaliado por 3 vezes consecutivas, sendo o limiar de retirada a média em gramas de resposta (3 avaliações) (Wu et al., 2008). Foram avaliadas as duas patas posteriores, ou seja, a que passou pela constrição do nervo ciático e a contralateral. As sessões teste foram realizadas antes (basal) da cirurgia para indução da neuropatia periférica e após 13 e 23 dias da cirurgia de constrição do nervo ciático. Sendo que o 23º dia representa o 10º dia de tratamento com CBD ou veículo.

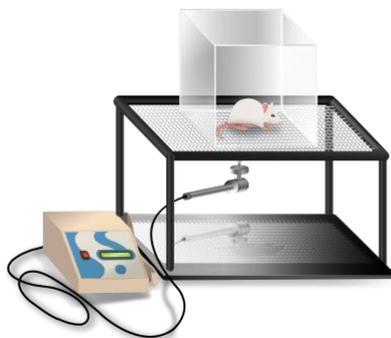


Figura 5. Desenho do teste de von Frey. Fonte: autoria própria.

3.4. Avaliação da sensibilidade térmica ao frio

Para avaliar as alterações da percepção ao frio nas Linhagens dos *Cariocas* foi utilizado o teste de instilação plantar de acetona (Deuis, 2017). Para esta finalidade, os animais foram mantidos em caixas acrílicas individuais com assoalho de 5 mm² correspondente a uma rede de malha feita de arame não maleável de 1 mm (Figura 6). Após habituação de 15 minutos, um jato de 100 µL de acetona foi instilado na pata traseira direita do animal com uma seringa de insulina na distância de aproximadamente 5 mm da pata com neuropatia periférica, por entre a malha da caixa de observação. Após aplicação do estímulo, foi quantificado durante o período de 40s o número de sacudidas em resposta ao resfriamento da pele induzido pela acetona. Foi utilizado o seguinte índice: 0 (ausência de resposta ao estímulo); 1 (retirada da pata ou rápido movimento); 2 (repetidos movimentos com a pata, sacudidas repetidas); 3 (movimentos repetidos da pata, sacudidas repetidas, e lambidas). Os parâmetros avaliados foram considerados como os índices de resposta a estímulo frio e o aumento ou redução dos valores encontrados, em comparação com a medida basal, foram interpretados como alodinia ou hipoalgesia ao frio, respectivamente. Foram realizadas 3 avaliações em cada sessão teste com intervalos aleatórios de 5-10 minutos entre os estímulos. Tanto no protocolo de 1 como no 2, as sessões teste foram realizadas antes (basal) da cirurgia para indução da neuropatia periférica e após 13, e 23 dias após a cirurgia de constrição do nervo ciático, sendo 23º dia o 10º dia de tratamento com CBD ou veículo.



Figura 6. Desenho do teste de acetona (avaliação da sensibilidade térmica ao frio). Fonte: autoria própria.

3.5. *Avaliação da sensibilidade térmica ao calor*

O teste da placa quente avalia o tempo em que os animais permanecem sobre uma superfície metálica aquecida ($\pm 52^{\circ}\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lambe uma das patas. Inicialmente, os animais foram colocados sobre a placa aquecida e, as respostas ao estímulo térmico (retirada ou lambida das patas traseiras), cronometradas (figura 7). Foi adotado um tempo de corte de 20 segundos para evitar possíveis lesões na pata do animal devido a exposição ao estímulo térmico nocivo por tempo prolongado. As aferições foram realizadas nos tempos de 0, 15 e 30 minutos do início do teste. A primeira leitura-controle teve o objetivo de adaptação dos animais ao ensaio. A média das 3 aferições foi realizada para a medida de latência da sensibilidade dolorosa térmica ao calor. Tanto no protocolo 1 como no 2, as sessões teste foram realizadas antes (basal) da cirurgia para indução da neuropatia periférica e após 13, e 23 dias da realização da cirurgia de constrição do nervo ciático, sendo 23^o dia o 10^o dia de tratamento com CBD ou veículo.



Figura 7. Desenho do teste de placa quente (avaliação da sensibilidade térmica ao calor). Fonte: autoria própria.

3.6. *Tratamento com canabidiol (CBD)*

Para o tratamento com CBD (99,9% de pureza; STI Pharmaceuticals, Brentwood, UK), o fármaco foi diluído em solução veículo (98% salina à 0,015M e 2% Tween 80) e administrado no volume de 1 ml/kg pela via intraperitoneal (i.p.) a partir do 14^o dia após a realização da cirurgia de constrição do nervo ciático. No protocolo 1 e no 2, os ratos foram avaliados nos testes nociceptivos

1 h após a administração de CBD no 23º dia. A dose utilizada foi de 5 mg/kg. Devido ao tempo de eliminação e meia vida do CBD cada administração foi realizada por meio de uma injeção por 10 dias, 60 minutos antes dos testes a fim de se favorecer a manutenção do fármaco no organismo (Campos et al., 2013; Deiana et al., 2012; Campos et al., 2012).

3.7. Avaliação da atividade locomotora

Para averiguar as alterações comportamentais no padrão de locomoção, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. O teste do campo aberto é um dos principais modelos animais para o estudo do comportamento tipo ansioso, sendo capaz de detectar alterações no padrão emocional e de exploração e ser sensível a ansiolíticos clássicos (Prut e Belzung, 2003; Walsh e Cummins, 1976). O aparato do campo aberto (60 cm de diametro x 50 cm de altura) pode ser dividido em quadrantes internos e externos (Figura 8), de forma que o tempo despedido na periferia do aparato está diretamente relacionado aos níveis de aversão e ansiedade apresentados pelo animal (Walsh e Cummin, 1976). Neste estudo, os animais foram colocados no centro do aparato e filmados por 5 minutos para análise comportamental. Os parâmetros usados para avaliar o padrão de exploração do animal no campo aberto foram: a porcentagem do tempo de centro (local mais ansiogênico), comportamentos com significados etológicos, *rearing* (comportamento de levantamento das patas dianteiras, exploração vertical) e *self-grooming* (comportamento de auto-limpeza, exploração horizontal), e o total do número de cruzamentos entre os quadrantes para averiguar possíveis alterações no padrão locomotor dos animais, bem como possíveis efeitos sedativos, os quais podem interferir na avaliação dos testes nociceptivos, pois os índices de avaliação dependem de respostas motoras.

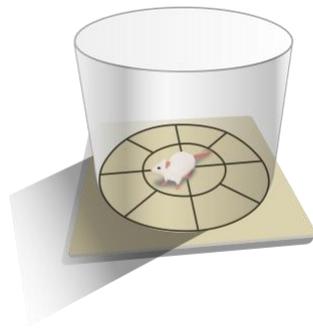


Figura 8. Desenho do campo aberto. Fonte: autoria própria.

3.8. *Paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP)*

Este protocolo experimental foi fundamentado em trabalhos anteriores de LaBuda e Fuchs (2000) onde padronizaram esta metodologia para avaliar a qualidade aversiva da dor inflamatória ou neuropática. Após 24 dias da indução da neuropatia periférica (que representa o 10º dia de tratamento com CBD), no 24º dia os ratos foram expostos a uma caixa de acrílico composta de dois compartimentos, um escuro e opaco e um claro e iluminado separados por anteparo que permite livre acesso aos dois compartimentos durante 20 minutos (Figura 9), sendo submetidos à avaliação da sensibilidade mecânica (teste do von Frey) na pata inflamada quando entrarem no ambiente escuro e na pata contralateral quando no ambiente claro, com 15 segundos de intervalo entre as aplicações. Como parâmetro avaliado foi registrado o tempo que os animais passaram para o compartimento claro e o tempo no escuro. De acordo com estudo prévio (LaBuda e Fuchs, 2000) os animais apresentam tendência natural de permanecer mais tempo no compartimento escuro, entretanto, o animal submetido à inflamação tenderá a evitar o compartimento escuro de escolha natural, pois é neste compartimento que ocorre a estimulação aversiva. Ao término deste experimento, os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de anestesia (cloridrato de xilazina 2%, 30 mg/kg, e cloridrato de cetamina 10%, 225 mg/kg, via intraperitoneal seguida por dissecação das áreas encefálicas para quantificação de BDNF pela técnica de western blotting.

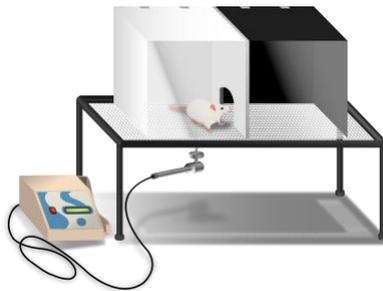


Figura 9. Desenho do paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP). Fonte: autoria própria.

3.9. Condicionamento ao medo contextual

O protocolo contextual de condicionamento de medo envolve sessões de aquisição e teste, como descrito em Gomes e Landeira-Fernandez (**Gomes e Landeira-Fernandez, 2008**). Durante a aquisição, ratos albinos Wistar da linhagem dos *Cariocas* foram colocados na câmara de observação (Figura 10). Após 8 min, três choques elétricos (0,6 mA e 1 s, cada) com intervalos de 20 segundos entre eles foram entregues nas patas dos animais e o congelamento pré e pós-choque foram medidos. Vinte e quatro horas depois, cada animal foi colocado novamente no contexto da aquisição, mas nenhum choque ou outro estímulo ocorreu. O congelamento foi registrado por 8 minutos. A fase de reteste do medo condicionado (RMC) foi adicionada, para avaliação posterior ao tratamento crônico de 10 dias, sendo realizado no 24º dia do protocolo 2. Além disso, como esse modelo animal de ansiedade foi o teste de seleção do nível de ansiedade desses animais, é o teste que avaliará fidedignamente o comportamento do tipo ansioso nestes animais após o tratamento com CBD.

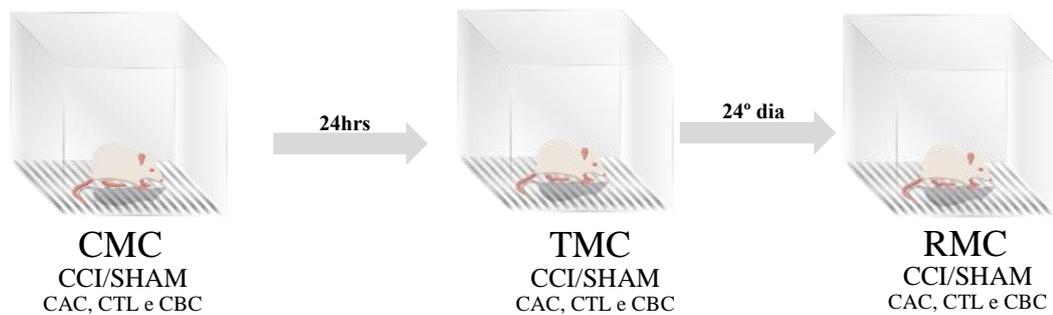


Figura 10. Desenho do condicionamento ao medo contextual (condicionamento clássico). Foi realizado o condicionamento ao medo contextual (CMC) e 24 horas após o teste de medo condicionado (TMC). No 24º dia experimental do Protocolo 2 foi realizado o reteste do medo condicionado (RMC). CAC: Carioca de alto congelamento; CBC: Carioca de baixo congelamento; CCI: constrição do nervo ciático; CTL: Carioca controle; SHAM: cirurgia fictícia. Fonte: autoria própria.

3.10. Análise de Western Blotting

Para realização desta metodologia (Figura 11) foram utilizados grupos independentes de animais. Para a coleta do material encefálico, após o término dos experimentos, os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica da associação de cloridrato de xilazina 2% (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (225 mg/kg), via intraperitoneal, sendo em seguida decapitados e realizada a dissecação das áreas do hipocampo dorsal e ventral, amígdala, córtex cingulado anterior, substância conzenta periaquedutal dorsal e ventral, núcleo accumbens, e estriado dorsal. Os tecidos foram armazenados em freezer -80°C. Os tecidos da região encefálica a ser analisada foram homogeneizados em tampão de extração (tampão de lise RIPA *buffer* R0278; 0,5% coquetel inibidor de protease). Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Parte das áreas coletadas foram utilizadas para quantificar a expressão da proteína BDNF. A amostra homogeneizada foi dissolvida e sonicada por 10 segundos e centrifugada a 4°C/14.000 rpm/por 15 minutos. O sobrenadante (proporção para ± 60 μ g do total de proteína) foi armazenado em temperatura -80°C. Em sequência foi realizada a quantificação total de proteínas. Os reagentes para a etapa de quantificação total de proteínas das amostras foram do kit de quantificação (Bio-Rad, CA, EUA). A curva e as tabelas foram geradas a partir das placas colocadas na leitora de microplaca (Synergy H®, Biotek) analisadas no programa Gen5. Já quantificadas as amostras,

foram separadas em gel de SDS - poliacrilamida 10%, onde os sobrenadantes foram mantidos em ordem e pipetados junto ao tampão da amostra (*Laemmli Sample Buffer*, Sigma) no gel que foi acoplado ao equipamento de eletroforese da Sigma, ficando submerso em tampão de corrida durante 120 minutos. Os níveis de proteínas foram transferidos por eletroforese para membrana de nitrocelulose por 120 minutos, no tampão de transferência, após bloqueado com solução TBT-T + 5% de albumina bovina (BSA) e incubado durante a noite a 4°C com o anticorpo anti-BDNF (ab226843, 1:2.000, *Abcam*). Após, realizada a lavagem com TBS-T, a membrana foi incubada durante 1h com anticorpo secundário Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab97080, 1:50.000, *Abcam*). Em seguida, a membrana passou por lavagem com TBS-T e foi preparada para a etapa de revelação visualizado por reagentes de quimioluminescência fornecidos pelo uso de *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (WBKL 0500, *Millipore Corporation*, EUA) e exposição em fotodocumentador (Bio-Rad, CA, EUA). A marcação foi removida com tampão (*stripping buffer*) para a próxima etapa em que foi incubado *overnight* no anticorpo monoclonal anti- β -actina (sc-47778, 1:3000; *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas-Texas, EUA), lavado no dia seguinte em TBS-T e incubado em anticorpo secundário RB x Ms IgG (H+L) HRP (AP160P, 1:20.000; *Millipore Corporation*, EUA) como controle de carga. A intensidade do blotting foi quantificada por densitometria usando o software NIH-ImageJ (uso livre).

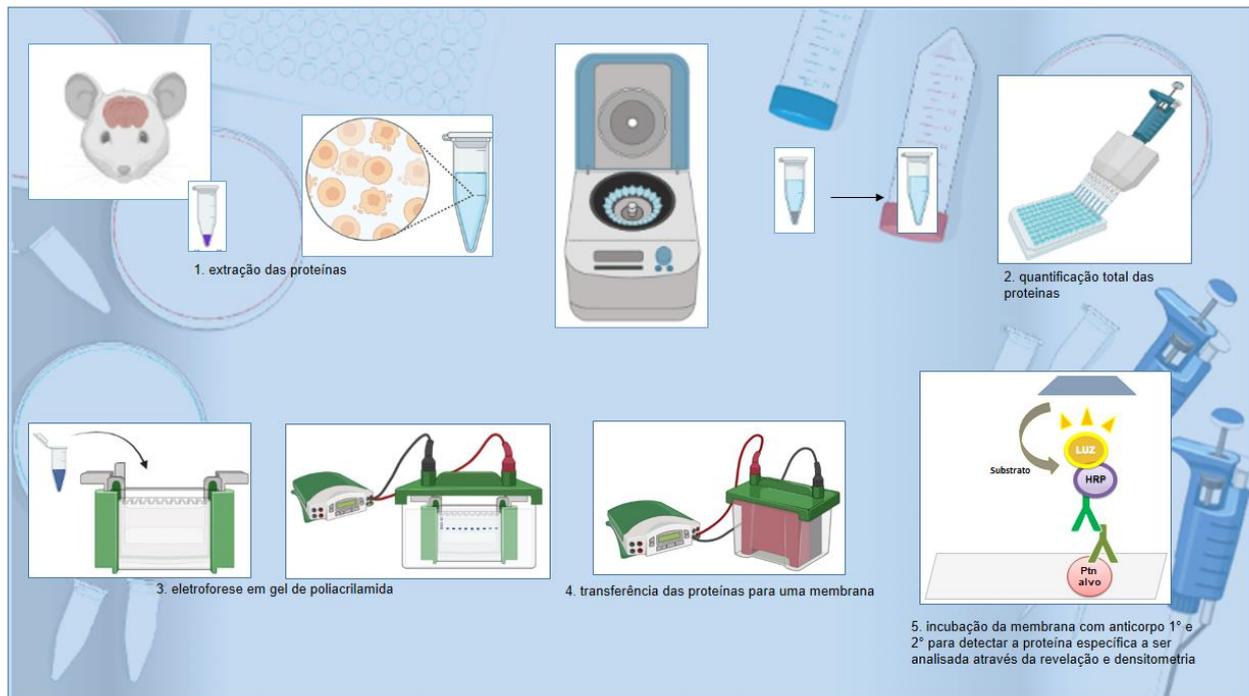


Figura 11. Desenho agrupando partes das etapas realizadas na técnica do western blotting, imagem própria criada através de itens do site de imagens BioRender.com (itens 1, 2, 3, 4). Item 5 criado no power point. (1. extração das proteínas; 2. quantificação total das proteínas; 3. eletroforese em gel de poliacrilamida; 4. transferência das proteínas para uma membrana; 5. incubação da membrana com anticorpo 1° e 2° para detectar a proteína específica a ser analisada através da revelação e densitometria. Fonte: autoria própria, elaborado com algumas imagens do site BioRender.

3.11. Análise estatística

Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média (EPM). Após análise da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, os resultados foram analisados por meio de ANOVA de medidas repetidas (3 variáveis, linhagem – CBC; CTL; CAC, condição – SHAM ou CCI, e tratamento farmacológico – VEÍCULO ou CBD). Quando possível, foi realizado o teste Bonferroni para comparação entre os grupos nos testes nociceptivos, que avaliaram o limiar de retirada da pata frente a estímulos mecânicos, químicos e térmicos ao longo do desenvolvimento da dor neuropática e após o tratamento. O resultado dos testes campo aberto e PEAP foram analisados por meio de ANOVA de duas vias (3 variáveis, linhagem, condição, e tratamento farmacológico), e o condicionamento ao medo contextual foi analisado por meio de ANOVA de medidas repetidas (3 variáveis, linhagem, condição, e tratamento farmacológico) comparando o nível da medida comportamental de congelamento nos períodos de habituação, teste (TMC) e reteste (RMC),

seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância está definido em $p < 0,05$ para todos os testes.

4. RESULTADOS

4.1. Protocolo 1

4.1.1. Avaliação da sensibilidade dolorosa (teste von Frey, teste de acetona e teste da placa quente)

Neste protocolo experimental, foi avaliado a sensibilidade mecânica dos animais que passaram pela indução de dor crônica neuropática através do teste do von Frey nos diferentes períodos após a cirurgia controle (SHAM) e a cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI). Os resultados obtidos demonstram que a CCI foi capaz de promover alodinia mecânica e alodinia térmica ao frio, assim como a hipersensibilidade térmica ao calor, em todas as linhagens Cariocas avaliadas (CBC, CTL e CAC). O tratamento com CBD reduziu a alodinia mecânica induzida por CCI independentemente das linhagens (Tabela 1); no entanto, esse efeito foi menor nas linhagens CAC e CBC (Figura 12A e C).

Testes Nociceptivos	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Fator Tempo (Basal x 13º x 23º)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
von Frey	$F(4,168) = 6,409$ $P < 0,05$	$F(2,168) = 547,176$ $P < 0,0001$	$F(2,168) = 312,546$ $P < 0,0001$	$F(2,168) = 657,563$ $P < 0,0001$	$F(4,168) = 2,187$ $P < 0,05$
Acetona	$F(4,168) = 1,811$ $P > 0,0001$	$F(2,168) = 247,434$ $P < 0,0001$	$F(2,168) = 43,275$ $P < 0,0001$	$F(2,168) = 244,175$ $P < 0,0001$	$F(4,168) = 0,368$ $P > 0,0001$
Placa quente	$F(4,168) = 5,137$ $P = 0,001$	$F(2,168) = 17,451$ $P < 0,0001$	$F(2,168) = 10,532$ $P < 0,0001$	$F(2,168) = 29,308$ $P < 0,0001$	$F(4,168) = 0,479$ $P > 0,05$

Tabela 1. Dados dos testes nociceptivos (von Frey, Acetona e Placa quente) nas linhagens (CBC, CTL e CAC) analisados por meio da ANOVA duas vias para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni. O nível de significância foi de $P < 0,05$ para todas as análises.

A análise de variância duas vias para medidas repetidas (ANOVA) aplicada a todos os grupos experimentais revelou no teste de von Frey diferença significativa nos fatores linhagem,

condição, tratamento, tempo e interação (Tabela 1). O teste post hoc de Bonferroni mostrou diferença significativa ($p < 0,0001$) no limiar mecânico no 13º dia nos grupos CCI (CCI+VEI e CCI+CBD) em comparação com os respectivos grupos SHAM e os valores basais (Figura 12A-C). O tratamento crônico com CBD reduziu a alodinia mecânica em todas as linhagens, pois o limiar mecânico no 23º dia nos grupos CCI+VEI foi diferente ($p < 0,0001$, teste de Bonferroni) quando comparado aos outros grupos (CCI+CBD, SHAM +VEI, e SHAM+ CBD) nas mesmas linhagens, e em comparação com as respectivas linhas de base (Figura 12A-C).

Além disso, nas linhagens de baixo e alto congelamento (CBC e CAC), o limiar mecânico em CCI+CBD foi diferente em comparação com SHAM+VEI e SHAM+CBD no 23º dia na mesma linhagem ($p < 0,0001$), assim como quando comparado com o grupo CCI+CBD da linhagem CTL ($p < 0,0001$, Figura 12C). Portanto, o tratamento com CBD reverteu completamente a alodinia mecânica na linhagem CTL, uma vez que o limiar mecânico dos grupos CCI+CBD no 23º dia não diferiu da respectiva linha de base (Figura 12A-B). Em contraste, essa reversão foi parcial nas linhagens CBC e CAC desde que o limiar mecânico do grupo CCI+CBD no 23º dia diferiu da respectiva linha de base e o limiar mecânico no 13º dia ($p < 0,0001$, teste de Bonferroni, Figura 12C).

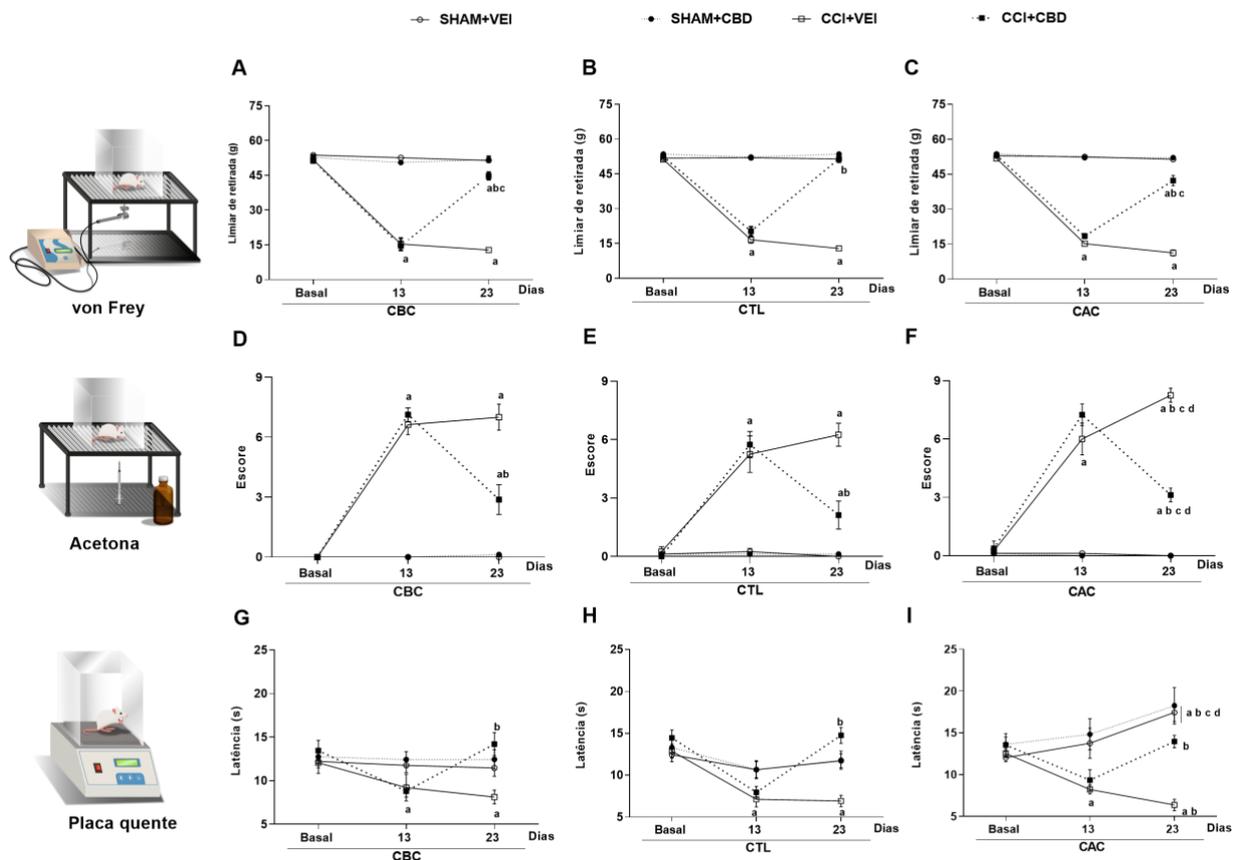


Figura 12. O tratamento crônico com canabidiol (CBD) reverte a alodinia mecânica, reduz a alodinia térmica e a hiperalgesia induzida por lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em Congelamento Carioca de Baixo Condicionamento (CBC), Condicionamento de Alto Congelamento (CAC) ou Controle (CTL) ratos. A sensibilidade mecânica foi avaliada pelo teste de von Frey (A-C); a sensibilidade térmica foi avaliada nos testes de acetona (D-F) e placa quente (G-I). Os limiares mecânicos ou térmicos foram avaliados na linha de base (Basal), após CCI ou cirurgia simulada (SHAM) no dia 13 e após o tratamento com CBD (5 mg/kg/dia, i.p., por dez dias, a partir do 14º dia experimental) ou veículo (VEI) no dia 23. a $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com sua respectiva linha de base e diferentes tratamentos na mesma linhagem; b $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com dia 13 e dia 23 no mesmo tratamento; c $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com linhagem CTL no mesmo tratamento; d $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com a linhagem CBC no mesmo tratamento. Os dados representam média \pm erro padrão da média. $N = 8$ animais por grupo.

A análise dos dados do teste de acetona mostrou que o tratamento com CBD reduziu parcialmente a alodinia ao estímulo térmico ao frio independente das linhagens (Figura 12D-F). A análise de variância duas vias para medidas repetidas (ANOVA) aplicada em todos os grupos experimentais revelou diferença significativa na linhagem, condição, tratamento e tempo (Tabela 1). O pós-teste de Bonferroni evidenciou diferença significativa ($p < 0,0001$) no escore térmico ao frio no 13º dia nos grupos CCI em comparação com os respectivos grupos SHAM e respectivas linhas de base (Figura 12D-F). O tratamento crônico com CBD reduziu essa alodinia ao frio em todas as linhagens, pois o escore de sensibilidade ao frio no 23º dia nos grupos CCI+VEI foi diferente ($p <$

0,0001, teste de Bonferroni) quando comparado aos outros grupos (CCI+CBD, SHAM+VEI e SHAM +CBD) na mesma linhagem, e em comparação com as respectivas linhas de base (Figura 12D-F). No entanto, esse efeito foi parcial porque, no 23º dia, o escore de sensibilidade ao frio dos grupos CCI+CBD de todas as linhagens diferiu de SHAM+VEI e SHAM+CBD ($p < 0,0001$, teste de Bonferroni, Figura 12D-F) e seus respectivas linhas de base ($p < 0,0001$, teste de Bonferroni). As linhagens CBC e CAC apresentaram diferença significativa quando comparadas com a linhagem CTL no dia 23 após a cirurgia em condição CCI tratada com CBD, e CAC+CCI tratada com VEI foi diferente de CBC e CTL na mesma condição e tratamento ($p < 0,0001$, Teste de Bonferroni, Figura 12D-F).

Os dados mostraram que o CCI reduziu a latência da placa quente no 13º dia independente da linhagem (os grupos CCI foram diferentes dos grupos SHAM em todas as linhagens), e o tratamento com CBD recuperou a sensibilidade térmica avaliada no 23º dia experimental (Figura 4G-I). A análise estatística (análise de variância duas vias para medidas repetidas, ANOVA) evidenciou diferença significativa na linhagem, condição, tratamento e tempo (Tabela 1). Os resultados não revelaram diferença entre as linhagens e a latência da placa quente nos grupos CCI no início e no 13º dia. Além disso, no 13º dia, a latência da placa quente dos grupos CCI (CCI+CBD e CCI+VEI) diferiu dos respectivos grupos SHAM e linha de base de todas as linhagens. Ainda, nos grupos CCI+VEI (em todas as linhagens), as latências basais do teste da placa quente foram diferentes quando comparadas às latências no 13º e 23º dias ($p < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 12G-I, todas as linhagens). No 23º dia nos grupos CCI que receberam tratamento com CBD (CCI+CBD), as latências foram diferentes em comparação com as respectivas latências no 13º dia e não diferiram das respectivas linhas de base ($p < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 12G- I) em todas as linhagens. No entanto, no 23º dia, na linhagem CAC, os grupos SHAM+VEI e SHAM+CBD foram diferentes ($p < 0,001$, teste de Bonferroni) comparados com a mesma condição e tratamento com as linhagens CBC e CTL (Figura 4G-I), e em comparação com a latência da placa quente no 13º dia e na linha de base ($p < 0,05$, Figura 12I).

4.1.2. Avaliação da motricidade (Campo aberto)

A avaliação das medidas do CA com ANOVA de duas vias foi realizada para analisar a porcentagem de tempo no centro, os cruzamentos totais, porcentagem de tempo de grooming e rearing (Figura 13). Esses resultados podem ser observados na Tabela 2. As análises foram feitas para todos os grupos, e o CA foi realizado no dia 22 após a cirurgia (SHAM e CCI). A ANOVA de duas vias analisou porcentagem de tempo no centro, e revelou a diferença significativa nos fatores de linhagem, condição e tratamento (Tabela 2). Os resultados mostraram que o CCI promoveu redução da porcentagem de tempo no centro nos grupos CCI+VEI em comparação com os respectivos grupos SHAM+VEI ($p < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 13A). O tratamento com CBD reverteu a redução de porcentagem de tempo no centro induzido por CCI nas linhagens CTL e CAC, uma vez que os grupos CCI+CBD eram diferentes em comparação aos grupos CCI+VEI nessas linhagens (CTL e CAC, $p < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 13A). A porcentagem de tempo no centro nos grupos SHAM+VEI e CCI+VEI da linhagem CBC foi diferente em comparação com a mesma condição e tratamento da linhagem CAC (grupos SHAM+VEI e CCI+VEI, Figura 13B). Além disso, na linhagem CBC, o grupo CCI+VEI não foi diferente de CCI+CBD (Figura 13A).

CA	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
% tempo no centro	$F(2,84) = 3,127$ $P < 0,05$	$F(1,84) = 8,156$ $P < 0,05$	$F(1,84) = 6,038$ $P < 0,05$	$F(2,84) = 1,156$ $P > 0,05$
Total de cruzamentos	$F(2,84) = 20,519$ $P < 0,0001$	$F(1,84) = 5,445$ $P < 0,0001$	$F(1,84) = 0,045$ $P > 0,05$	$F(2,84) = 4,248$ $P < 0,05$
% tempo grooming	$F(2,84) = 0,936$ $P > 0,05$	$F(1,84) = 0,724$ $P > 0,05$	$F(1,84) = 5,395$ $P < 0,05$	$F(2,84) = 2,245$ $P > 0,05$
% tempo rearing	$F(2,84) = 4,454$ $P < 0,05$	$F(1,84) = 15,696$ $P < 0,05$	$F(1,84) = 0,133$ $P > 0,05$	$F(2,84) = 0,754$ $P > 0,05$

Tabela 2. Dados da ANOVA de tr vias para análise do teste de campo aberto (CA), seguido pelo teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$ para todas as análises.

A ANOVA de duas vias analisou o número total de cruzamentos e revelou diferença significativa em linhagem, condição e interação (Tabela 2). Na condição SHAM, não houve

diferença entre as linhagens no tratamento VEI ($p < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 13B). Além disso, na condição SHAM, o tratamento com CBD promoveu aumento no número de cruzamentos na linhagem CBC em comparação com SHAM+VEI na mesma linhagem ($p = 0,011$, teste de Bonferroni, Figura 13B), e em comparação com as linhagens CTL e CAC em mesma condição e tratamento ($p < 0,05$, teste de Bonferroni). Considerando os grupos CCI+VEI, a linhagem CBC foi diferente em relação às linhagens CTL e CAC com número maior no total de cruzamentos ($p < 0,05$, teste de Bonferroni).

A análise da porcentagem do tempo de grooming revelou diferença significativa no fator de tratamento (Tabela 2). Os animais do grupo CTL+SHAM+CBD apresentaram menor porcentagem de tempo de grooming quando comparados aos CTL+CCI+CBD. Outra diferença ocorreu entre os grupos CBC+CCI+VEI e CBC+CCI+CBD. Ainda, os animais CAC quando em SHAM+CBD foram diferentes das demais linhagens (Figura 13C, $P < 0,05$).

Na porcentagem de tempo em rearing, a ANOVA de duas vias, revelou diferença nos fatores linhagem e tratamento. A linhagem CBC mostrou diferença ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) entre os grupos SHAM+CBD e CCI+CBD, e ainda CBC+SHAM+CBD apresentou tempo de rearing mais elevado quando comparado as demais linhagens na mesma condição e tratamento (Figura 13D, $P < 0,05$, teste de Bonferroni).

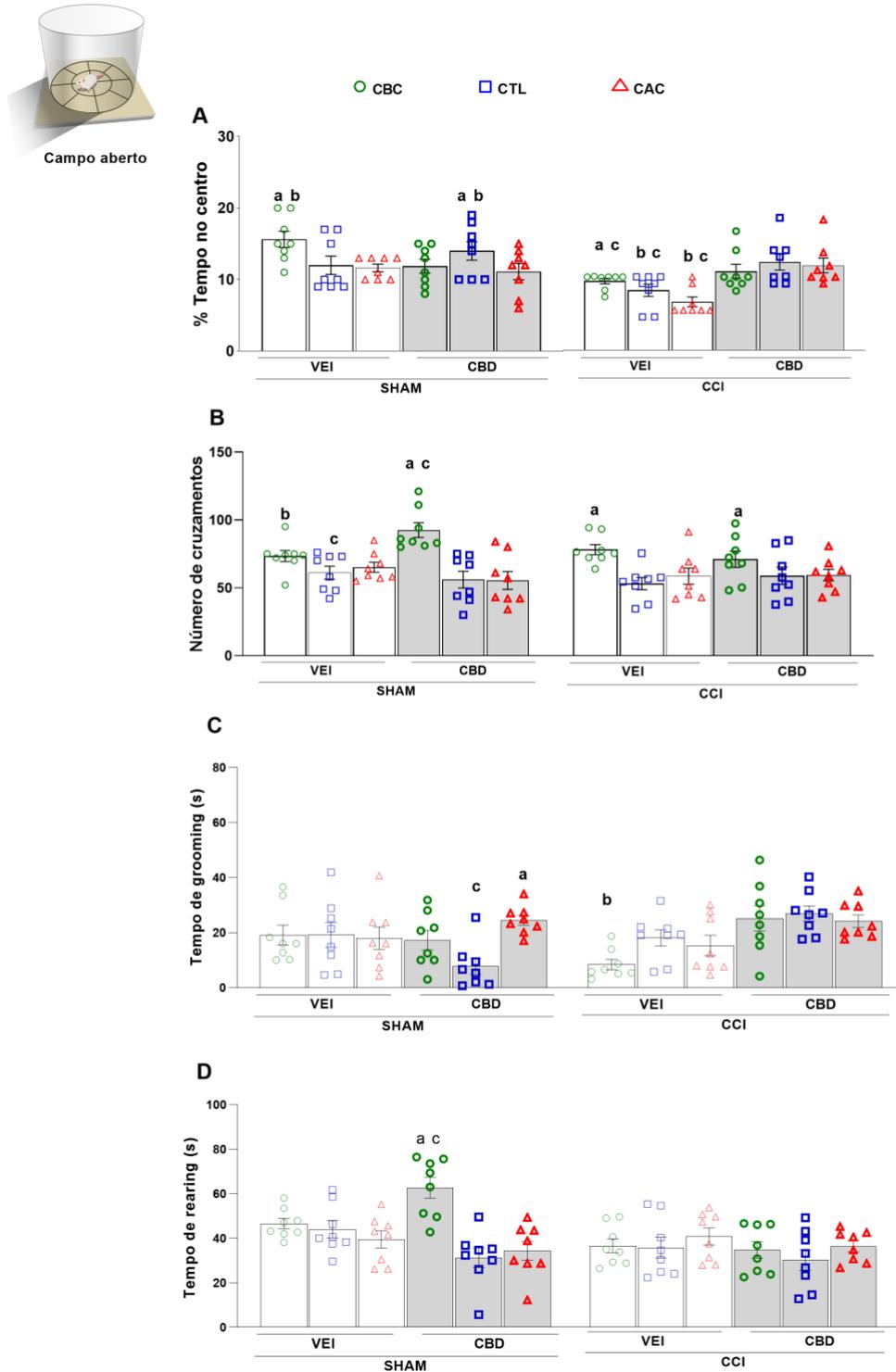


Figura 13. O tratamento crônico com canabidiol (CBD) preveniu o efeito ansiogênico induzido pela lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos Cariocas de baixo congelamento (CBC), alto congelamento (CAC) ou controle (CTL) dependentes da linhagem quando avaliados no teste de campo aberto (CA). As medidas analisadas foram a porcentagem (%) de tempo de duração no centro (A), o número total de cruzamentos (B), (%) de tempo de grooming (C) e (%) de tempo de rearing (D). O CA foi realizado por 5 minutos, 22 dias após lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM) e após dez dias de tratamento com CBD (nas doses de 5 mg/kg/dia, i.p., iniciando no 14º dia experimental) ou veículo (VEI). a $P < 0,05$ para o teste de Bonferroni comparou as linhagens (CBC, CTL, CAC) na mesma condição e tratamento; b $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e condição, mas tratamento diferente (VEI ou CBD). c $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e tratamento, mas condição diferente (SHAM ou CCI). Os dados representam média \pm erro padrão da média. N = 8 para cada grupo experimental.

4.1.3. Avaliação do aspecto aversivo da dor no teste de Paradigma de fuga/esquiva ao local (teste PEAP)

O teste de Paradigma de fuga e esquiva ao local (PEAP) foi utilizado para avaliar o aspecto afetivo motivacional da dor neuropática nas linhagens de Alto (CAC) e Baixo (CBC) congelamento, assim como também nos animais controle dessa cepa (CTL). Quando o animal está com dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI), a resposta contra natural (teste de claro/escuro) é esperada. O animal passa a preferir a câmara clara ao em vez da escura, pois no ambiente escuro o animal recebe uma leve pressão na pata que está com injúria e, portanto, com a alodinia mecânica. Este aumento de preferência da permanência na câmara clara dos animais com CCI+VEI foi apresentado na Figura 14 A-B. Os resultados nos animais Cariocas com CCI mostraram que, em todas as linhagens, o tratamento com CBD reduziu a alodinia mecânica e assim, alterou a preferência ao local, que se manteve menor na câmara clara, retomando a resposta de preferência natural que é a câmara escura (Figura 14A). A análise da ANOVA de duas vias do PEAP está descrita na Tabela 3.

PEAP	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
% tempo na câmara clara	$F_{(2,84)} = 18,871$ $P < 0,05$	$F_{(1,84)} = 3,082$ $P = 0,54$	$F_{(1,84)} = 9,981$ $P > 0,05$	$F_{(2,84)} = 0,969$ $P < 0,05$

Tabela 3. Dados da ANOVA de duas vias para análise do teste de paradigma/fuga ao local (PEAP), seguido pelo teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$ para todas as análises.

A aplicação da ANOVA de duas vias evidencia diferença significativa no fator linhagem, bem como interação entre linhagem e tratamento (Tabela 3). Nas linhagens CTL e CAC observou-se diferença entre os grupos nas condições SHAM e CCI, o teste post hoc de Bonferroni apresentou diferença nessas linhagens quando nos grupos CCI (CCI+VEI) comparado aos grupos SHAM (SHAM+VEI). Esta diferença não foi observada na linhagem de baixo congelamento (CBC; Figura

14A). Portanto, quando comparado os grupos CCI+VEI e CCI+CBD, houve diferença em todas as linhagens. Além disso, nas linhagens CTL e CAC ($P < 0,05$) o resultado mostrou aumento de preferência na câmara clara quando estavam em condição de dor crônica tratados com veículo (CCI+VEI). O teste post hoc Bonferroni também mostrou diferença da linhagem CBC e as demais linhagens quando em SHAM+VEI, assim como os ratos CAC foram diferentes das demais linhagens quando em SHAM+CBD (Figura 14B, $P < 0,05$). Na Figura 14B pode ser observada outra diferença, o grupo CTL+SHAM+CBD apresentou maior porcentagem de tempo na câmara clara quando comparado ao grupo CTL+SHAM VEI.

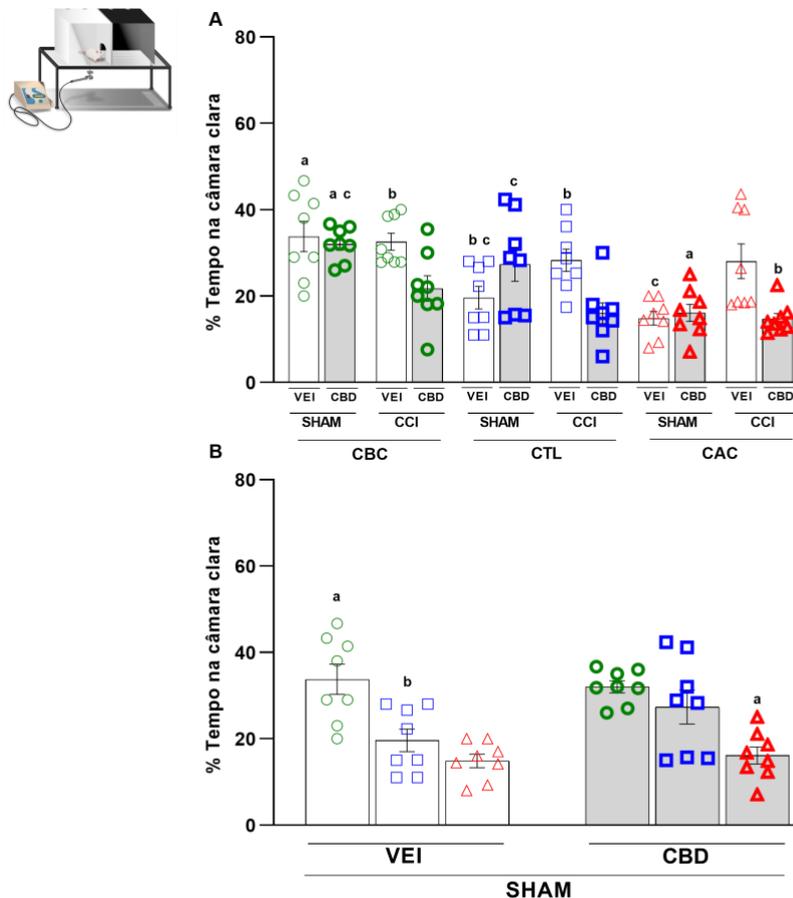


Figura 14. O tratamento crônico com canabidiol (CBD) preveniu o efeito aversivo induzido pela lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos Cariocas controle (CTL) e alto congelamento (CAC) quando avaliados no teste de paradigma/fuga ao local (PEAP). As medidas analisadas foram a porcentagem (%) de tempo de duração na câmara clara nas linhagens de baixo congelamento (CBC), CTL e CAC, na condição de dor neuropática (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM) e tratamento (VEI, CBD) (A), e (%) de tempo na câmara clara de todas as linhagens na condição SHAM em ambos os tratamentos (VEI e CBD) (B). O PEAP foi realizado por 20 minutos, 24 dias após lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM) e após os dez dias de tratamento com CBD (nas doses de 5 mg/kg/dia, i.p., iniciando no 14º dia experimental) ou veículo (VEI). a $P < 0,05$ para o teste de Bonferroni comparou as linhagens (CBC, CTL, CAC) na mesma condição e tratamento; b $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e condição, mas tratamento diferente (VEI ou CBD). c $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e tratamento, mas condição diferente (SHAM ou CCI). Os dados representam média \pm erro padrão da média. N = 8 para cada grupo experimental.

4.1.4. Avaliação da expressão dos níveis de BDNF (Protocolo 1)

Neste protocolo foi avaliado a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) das áreas hipocampo dorsal, hipocampo ventral, amígdala e córtex cingulado anterior dos ratos de todas as linhagens (CBC, CTL e CAC) submetidos ao modelo de neuropatia periférica induzida pela constrição do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM). A Figura 15 apresenta fotografias dos géis de western blotting de animais representativos dos distintos grupos experimentais deste estudo.

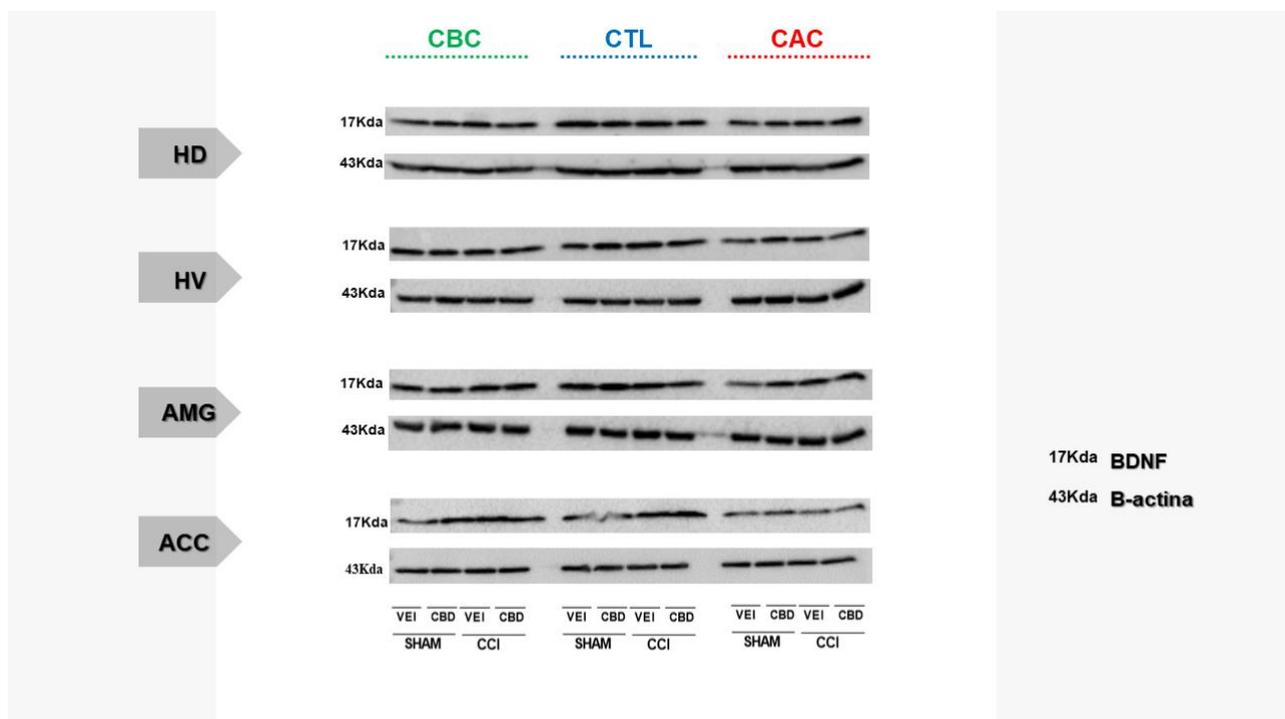


Figura 15. Quantificação pela técnica do Western Blotting da proteína BDNF. Imagem final das bandas da expressão do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) das áreas do hipocampo dorsal (HD), hipocampo ventral (HV), amígdala (AMG), e córtex cingulado anterior (ACC). Animais representativos das diferentes linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL) e alto congelamento (CAC), nos grupos com dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM), tratados com canabidiol (CBD, 5mg/kg, 1 vez ao dia, por 10 dias tratamento iniciado no 14º dia após a cirurgia) ou veículo (VEI). A análise foi realizada por densitometria e quantificada em razão da proteína beta-actina como padrão.

Nesse protocolo, foi realizado também a análise da substância cinzenta periaquedutal dorsal e ventral. Contudo, o sinal da expressão de BDNF nessas áreas foi muito baixo não tendo sido

possível realizar a quantificação por meio da densitometria. No que concerne as áreas avaliadas, os resultados diferiram de acordo com a estrutura encefálica analisada. A área do hipocampo dorsal mostrou diferenças entre CBC e CTL, já a área do hipocampo ventral diferiu a linhagem CTL quando em quadro de dor (CCI) e também em tratamento com CBD. Enquanto que, na amígdala foi observado diferença entre as linhagens CAC e CTL. Os resultados da aplicação da ANOVA de duas vias estão detalhados na Tabela 4.

Western Blotting	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
Hipocampo Dorsal (HD)	$F(2,48) = 0,720$ $P < 0,05$	$F(1,48) = 0,102$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 1,076$ $P < 0,05$	$F(2,48) = 0,927$ $P > 0,05$
Hipocampo Ventral (HV)	$F(2,48) = 1,612$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 0,589$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 1,004$ $P < 0,05$	$F(2,48) = 1,678$ $P > 0,05$
Amígdala (AMG)	$F(2,48) = 3,265$ $P < 0,05$	$F(1,48) = 0,752$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 0,402$ $P < 0,05$	$F(2,48) = 0,624$ $P < 0,05$
Córtex Cingulado Anterior (ACC)	$F(2,48) = 4,555$ $P < 0,05$	$F(1,48) = 0,410$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 0,345$ $P < 0,05$	$F(2,48) = 0,757$ $P > 0,05$

Tabela 4. Detalhamento dos resultados da ANOVA de duas vias Estatística da análise dos níveis da expressão de BDNF no hipocampo dorsal, hipocampo ventral, amígdala, e córtex cingulado anterior das linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL), e alto congelamento (CAC), submetidos a neuropatia periférica (constricção do nervo isquiático, CCI) ou cirurgia simulada (SHAM), e tratados com canabidiol (CBD, 5mg/kg, 1 vez ao dia, por 10 dias tratamento iniciado no 14º dia após a cirurgia), ou veículo (VEI).

Na Figura 16 apresenta os grupos e os níveis de BDNF nas estruturas: hipocampo dorsal (HD), hipocampo ventral (HV), amígdala (AMG), e córtex cingulado anterior (ACC). A ANOVA de duas vias revelou diferença no fator linhagem e tratamento. Pode ser visto na Figura 16A, menor expressão de BDNF no hipocampo dorsal do grupo CBC+SHAM+VEI, quando comparados aos grupos CTL+SHAM+VEI e CAC+SHAM+VEI (Figura 16, $P < 0,05$, teste de Bonferroni). O tratamento com CBD elevou o nível de expressão de BDNF no HD no grupo SHAM da linhagem CBC, enquanto que o oposto ocorreu quando com CCI tratado com CBD (Figura 16, $P < 0,05$, teste de Bonferroni), ainda, o nível de BDNF em CBC+SHAM+CBD não difere de CBD+CCI+CBD. Esse resultado pode ser considerado reversão da alteração que ocorreu na linhagem CBC. Além disso, no HD, o grupo CAC+CCI+CBD apresentou redução do nível de BDNF comparado ao grupo CAC+CCI+VEI ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

No hipocampo ventral, a ANOVA de duas vias revelou diferença no fator tratamento ($P < 0,05$). A linhagem CTL apresentou aumento da expressão de BDNF no grupo CCI+VEI. Esse resultado se alterou com o tratamento por CBD, nesse caso o nível de BDNF retornou ao nível basal dessa linhagem no grupo CTL+CCI+CBD (Figura 16, $P < 0,05$, teste de Bonferroni).

Ademais, quando analisada a amígdala, foi revelada na ANOVA de duas vias a diferença nos fatores linhagem e tratamento ($P < 0,05$). Na amígdala foi mostrado menor expressão de BDNF no grupo CAC+SHAM+VEI quando comparados aos da linhagem CTL e ao CBC na mesma condição e tratamento (Figura 16, $P < 0,05$, teste de Bonferroni). O tratamento com CBD elevou o nível de BDNF nos animais CAC+SHAM ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

A ANOVA de duas vias revelou diferença na quantificação de BDNF considerando os fatores linhagem e tratamento no córtex cingulado anterior ($P < 0,05$). No ACC, o nível de BDNF difere entre as linhagens CBC e CAC nos grupos SHAM+VEI, onde os grupos CBC apresentaram nível mais elevado de BDNF ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Adicionalmente, observa-se tendência deste resultado dos animais CBC em relação a linhagem CTL, entretanto o post hoc de Bonferroni não evidenciou diferença. Nos grupos CCI+CBD todas as linhagens apresentaram diferença quando comparadas aos grupos CCI+VEI ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Nesses resultados, o grupo CTL+CCI mostraram pequeno aumento no nível de BDNF quando tratados com CBD. Enquanto que os ratos das linhagens CBC e CAC na condição CCI tratados com CBD mostraram redução do nível de BDNF quando comparados aos grupos CCI+VEI (Figura 16).

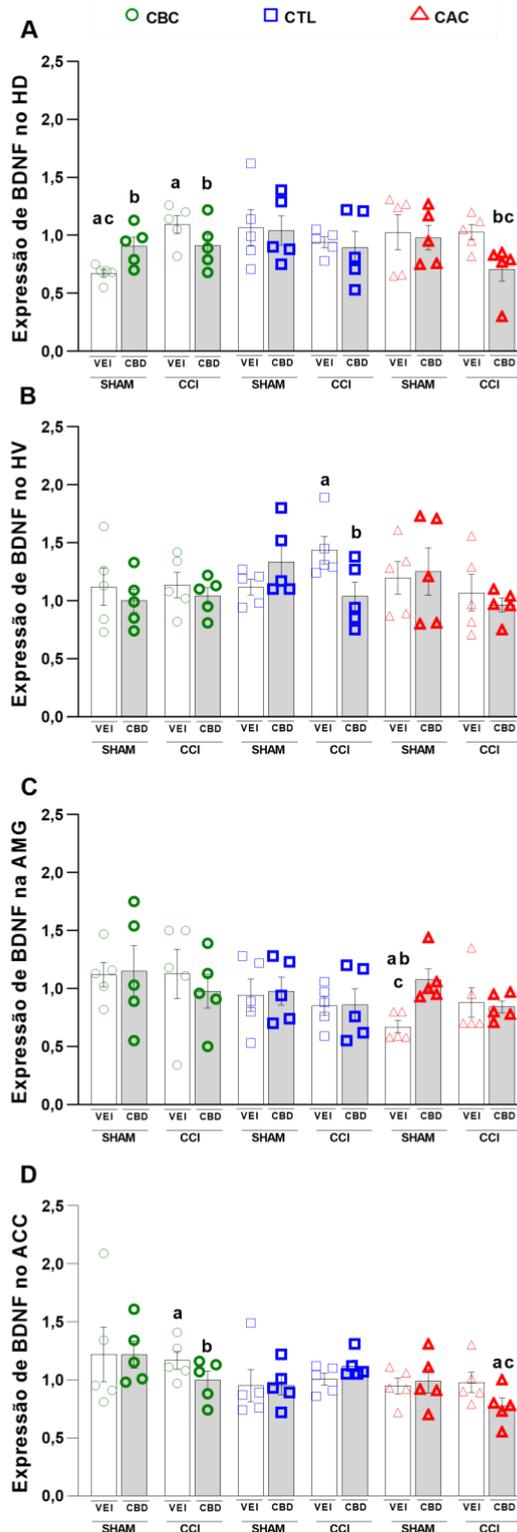


Figura 16. Quantificação do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) nas linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL) e alto congelamento (CAC) das áreas do hipocampo dorsal (HD), hipocampo ventral (HV), amígdala (AMG), e córtex cingulado anterior (ACC). Os ratos foram submetidos a cirurgia controle (SHAM) ou cirurgia para constrição do nervo isquiático (CCI), e submetidos ao tratamento crônico com canabidiol (CBD, 5 mg/kg ao dia, via i.p., a partir do 14^o dia experimental) ou veículo (VEI). a $P < 0,05$ para o teste de Bonferroni comparou as linhagens (CBC, CTL, CAC) na mesma condição e tratamento; b $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e condição, mas tratamento diferente (VEI ou CBD). c $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e tratamento, mas condição diferente (SHAM ou CCI). Os dados representam média \pm erro padrão da média. N = 8 para cada grupo experimental.

4.2. Protocolo 2

4.2.1. Avaliação da sensibilidade dolorosa (teste von Frey, teste de acetona e teste da placa quente)

Neste segundo protocolo também foi avaliada a sensibilidade mecânica e a térmica ao frio para confirmar o desenvolvimento da neuropatia periférica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Desse modo, foi realizado o teste von Frey e o teste de acetona, antes e após a realização do procedimento cirúrgico, bem como após o tratamento com CBD ou veículo. A Tabela 5 sumariza os resultados obtidos com a aplicação da ANOVA duas vias para medidas repetidas dos testes nociceptivos realizados.

Testes Nociceptivos	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Fator Tempo (Basal x 13 x 23)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
von Frey	$F(2,84) = 13,771$ $P > 0,05$	$F(1,84) = 841,159$ $P < 0,0001$	$F(1,84) = 390,493$ $P < 0,0001$	$F(1,84) = 941,804$ $P < 0,0001$	$F(2,84) = 4,166$ $P < 0,0001$
Acetona	$F(2,84) = 0,562$ $P > 0,05$	$F(1,84) = 285,749$ $P < 0,0001$	$F(1,84) = 31,263$ $P < 0,0001$	$F(1,84) = 285,749$ $P < 0,0001$	$F(2,84) = 0,714$ $P > 0,05$

Tabela 5. Dados dos testes nociceptivos (von Frey e Acetona) nas linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL) e alto congelamento (CAC) submetidas à ANOVA duas vias para medidas repetidas. O nível de significância foi de $P < 0,05$ para todas as análises.

No teste de von Frey foi evidenciada diferença significativa os fatores condição, tratamento, tempo e bem como interação entre estes fatores (Tabela 6). Os resultados referentes aos limiares de retirada mecânico (Figura 17A-C) revelaram dados semelhantes aos vistos anteriormente no protocolo 1, com uma exceção. Os animais da linhagem CAC quando em condição de constrição do nervo isquiático (CCI) tratados com CBD apresentaram menor recuperação da alodinia mecânica quando comparados aos ratos das demais linhagens dos grupos comparativos correspondentes ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

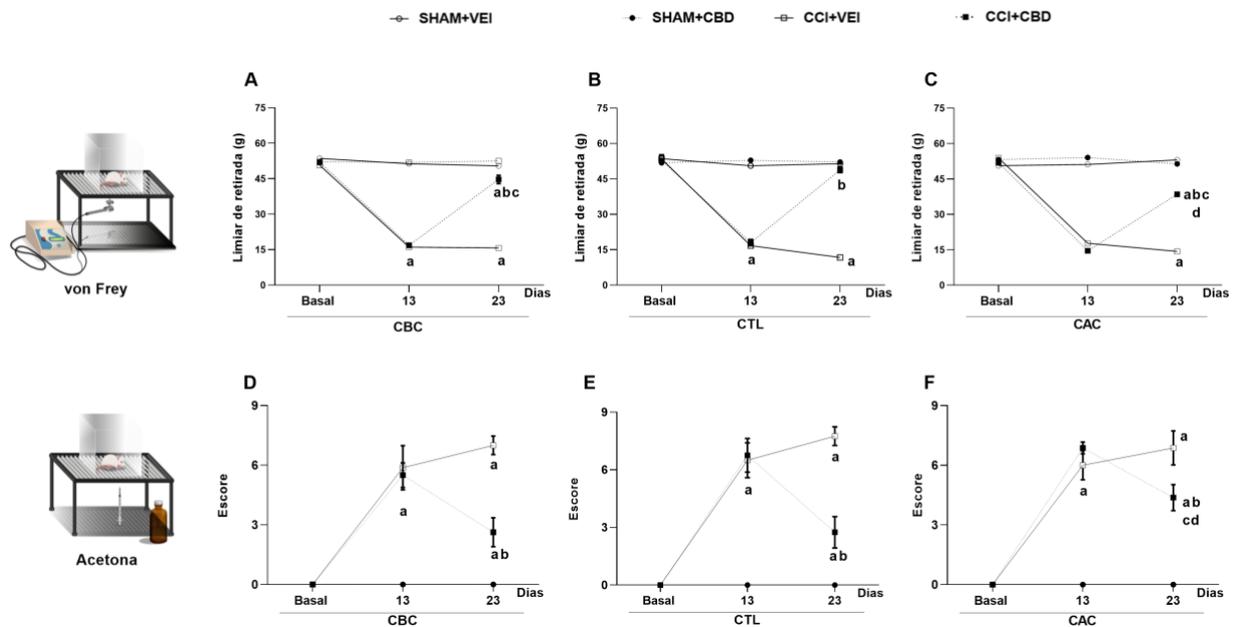


Figura 17. O tratamento crônico com canabidiol (CBD) reverte a alodinia mecânica, e reduz a alodinia térmica ao frio induzida por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) nas linhagens Carioca de Baixo Condicionamento (CBC), Controle (CTL), ou Alto Congelamento (CAC). A sensibilidade mecânica foi avaliada pelo teste de von Frey (A-C); a sensibilidade térmica foi avaliada no teste de acetona (D-F). Os limiares mecânicos ou térmicos foram avaliados antes da cirurgia (Basal) e após a realização da CCI ou cirurgia simulada (SHAM, dia 13) e após o tratamento com CBD (5 mg/kg/dia, i.p., por dez dias, a partir do 14º dia experimental) ou veículo (VEI). a $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com sua respectiva linha de base e diferentes tratamentos na mesma linhagem; b $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com dia 13 e dia 23 no mesmo tratamento; c $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com linhagem CTL no mesmo tratamento; d $P < 0,05$, teste de Bonferroni comparado com a linhagem CBC no mesmo tratamento. $N = 8$ animais por grupo.

No teste de acetona, observou-se diferença significativa nos fatores condição, tratamento e tempo (ANOVA de variância duas vias para medidas repetidas, Tabela 5) considerando os escores do teste nas distintas linhagens avaliadas (CBC, CTL e CAC). Assim como no teste von Frey, os resultados do teste de acetona foram semelhantes aos observados no protocolo 1, com a exceção do grupo CAC+CCI+CBD. Esse grupo foi diferente das demais linhagens, e apresentou menor recuperação da alodinia térmica ao frio (Figura 17D-F).

4.2.2. Avaliação da motricidade (Campo aberto)

Para avaliação da motricidade, neste segundo protocolo foi realizado o teste de campo aberto. Neste, foram analisados a porcentagem do tempo de duração no centro, o número total de cruzamentos, tempo de grooming (autolimpeza; exploração horizontal) e rearing (exploração

vertical). Durante 5 minutos os animais ficaram nesta arena padronizada do teste de campo aberto.

Os resultados da aplicação da ANOVA de duas vias são apresentadas na Tabela 6.

CA	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
% tempo no centro	$F_{(2,83)} = 6,953$ $P = 0,0001$	$F_{(1,83)} = 0,101$ $P > 0,05$	$F_{(1,83)} = 9,261$ $P < 0,05$	$F_{(2,83)} = 1,665$ $P < 0,05$
Total de cruzamentos	$F_{(2,83)} = 90,301$ $P < 0,0001$	$F_{(1,83)} = 1,057$ $P > 0,05$	$F_{(1,83)} = 1,464$ $P > 0,05$	$F_{(2,83)} = 0,653$ $P < 0,05$
% tempo grooming	$F_{(2,83)} = 27,655$ $P < 0,0001$	$F_{(1,83)} = 1,923$ $P > 0,05$	$F_{(1,83)} = 0,353$ $P > 0,05$	$F_{(2,83)} = 0,633$ $P < 0,05$
% tempo rearing	$F_{(2,83)} = 27,279$ $P < 0,0001$	$F_{(1,83)} = 0,321$ $P > 0,05$	$F_{(1,83)} = 0,030$ $P > 0,05$	$F_{(2,83)} = 0,144$ $P < 0,05$

Tabela 6. Dados da ANOVA de duas vias para análise dos parâmetros avaliados no teste de campo aberto (CA) nas linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL), e alto congelamento (CAC) submetidos ao modelo de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM) e tratados com canabidiol (CBD, 5 mg/kg, 1 vez ao dia por dez dias, i.p. a partir do 14º dia experimental) ou veículo (VEI). O nível de significância foi de $P < 0,05$ para todas as análises.

Considerando o parâmetro porcentagem de tempo no centro, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatística nos fatores linhagem, tratamento e interação (Tabela 6, $P < 0,05$). Todas as linhagens (CBC, CTL, CAC) apresentaram diferença no tempo gasto no centro nos grupos SHAM+VEI quando comparados entre eles (Figura 18A, $P < 0,05$). A linhagem CBC apresentou maior tempo gasto no centro do que as demais linhagens, e a CAC apresentou menor tempo gasto no centro quando comparado ao CTL ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Nessa condição, as linhagens CBC e CAC mostraram alteração do tempo gasto no centro quando tratados com CBD ($P < 0,05$), onde o grupo CBC+SHAM+CBD apresentou menor tempo gasto no centro, enquanto, que no grupo CAC+SHAM+CBD foi observado aumento do tempo gasto no centro ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Nos grupos CCI+VEI, o tempo gasto no centro também se mostrou diferente quando comparadas as linhagens entre si (CBC, CTL e CAC; $P < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 18).

Os animais das linhagens CBC, CTL e CAC submetidos ao modelo de neuropatia periférica (CCI) apresentaram redução do tempo gasto no centro quando comparados a condição SHAM (Figura 18, $P < 0,05$, teste de Bonferroni). Esse resultado foi revertido nas linhagens CTL e CAC com CCI quando tratados com CBD ($P < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 18). Ainda, o grupo

CBC+CCI apresentaram maior tempo no centro comparado as demais linhagens, e o tratamento com CBD não alterou este parâmetro comportamental (Figura 18).

Com relação ao número total de cruzamentos, a ANOVA de duas vias revelou diferença nos fatores linhagem e interação (Tabela 6). A diferença no número total de cruzamentos entre as linhagens (CBC, CTL, CAC) foi observada nos grupos de condição SHAM e CCI quando tratados com VEI (Figura 18B, $P < 0,05$, teste de Bonferroni). Ainda nos grupos com condição SHAM e CCI tratados com CBD, a linhagem CBC foi diferente das demais na mesma condição e tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Entre os grupos tratados com CBD na mesma condição, foi mostrada diferença entre CBC+SHAM+VEI e CBC+SHAM+CBD, assim como também apresentou diferença entre CAC+SHAM+VEI e CAC+SHAM+CBD (Figura 18B, $P < 0,05$, teste de Bonferroni), desde que o tratamento com CBD aumentou o total de cruzamentos nessas linhagem (grupos CBD).

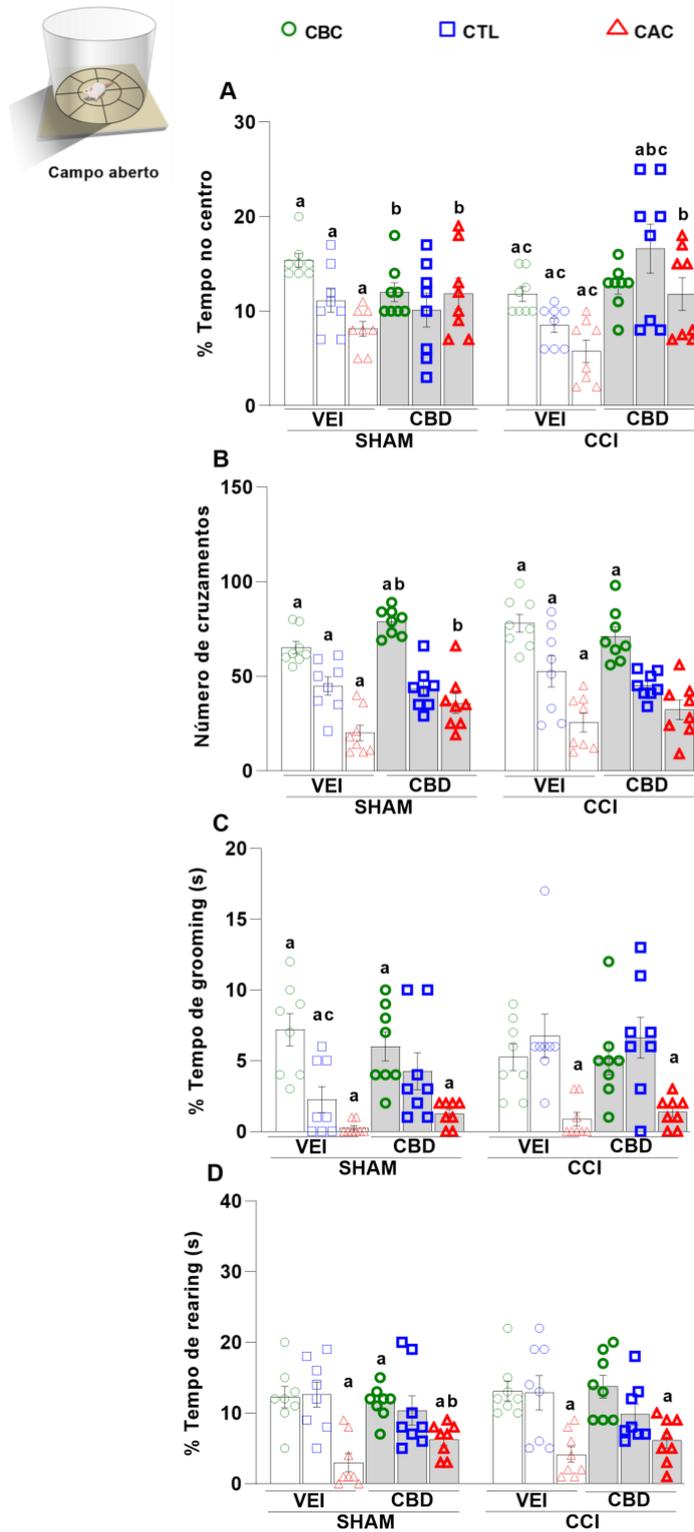


Figura 18. O tratamento crônico com canabidiol (CBD) preveniu o efeito ansiogênico induzido pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos Cariocas de baixo congelamento (CBC), controle (CTL) ou alto congelamento (CAC) dependentes da linhagem quando avaliados no teste de campo aberto (CA). As medidas analisadas foram a porcentagem (%) de tempo de duração no centro (A), o número total de cruzamentos (B), % tempo de grooming (C) e % tempo de rearing (D). O CA foi realizado por 5 minutos, 22 dias após (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM) e após nove dias de tratamento com CBD (na dose de 5 mg/kg/dia, i.p., iniciando no 14º dia experimental) ou veículo (VEI). a $P < 0,05$ para o teste de Bonferroni comparou as linhagens (CBC, CTL, CAC) na mesma condição e tratamento; b $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e condição, mas tratamento diferente (VEI ou CBD). c $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e tratamento, mas condição diferente (SHAM ou CCI). Os dados representam média \pm erro padrão da média. $N = 8$ para cada grupo experimental.

No comportamento observado da % de tempo de grooming, a ANOVA de duas vias revelou diferença nos fatores linhagem e interação entre os fatores (Tabela 6). O teste post hoc de Bonferroni mostrou que todas as linhagens foram diferentes entre si no tempo de grooming no grupo SHAM+VEI (Figura 18C, $P < 0,05$). Os animais do grupo CTL apresentaram aumento do tempo de grooming na condição CCI+VEI quando comparados ao grupo da própria linhagem na condição SHAM+VEI ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Ainda, neste contexto, o grupo CTL+SHAM+CBD aumentou o tempo de grooming comparado com o grupo CTL+SHAM+VEI ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Neste protocolo, a linhagem CAC foi diferente das demais linhagens em todos os grupos experimentais (Figura 18). Adicionalmente, a linhagem CBC apresentou diferença no tempo de grooming no grupo SHAM+VEI quando comparado com as demais linhagens (CTL e CAC), e foi diferente do grupo CAC+SHAM+CBD (Figura 18, $P < 0,05$, teste de Bonferroni).

No parâmetro % de tempo de rearing, a ANOVA de duas vias revelou diferença nos fatores linhagem e interação (Tabela 6). Nesse comportamento foi evidenciado na linhagem CAC diferença comparada com as demais linhagens (CTL e CBC) em todos os grupos experimentais (Figura 18D, $P < 0,05$, teste de Bonferroni). Além disso, ocorreu aumento do tempo de rearing no grupo CAC+SHAM+CBD quando comparado ao grupo CAC+SHAM+VEI ($P < 0,05$, teste de Bonferroni). Ademais, os ratos CBC apresentaram maior tempo de rearing quando comparados as demais linhagens (CTL e CAC) em condição SHAM+CBD ($P < 0,05$, teste de Bonferroni, Figura 18D).

4.2.3. Avaliação dos níveis de ansiedade (teste de Condicionamento ao Medo Contextual)

Neste protocolo foi avaliado o nível de ansiedade dos ratos das diferentes linhagens Cariocas (CBC, CTL e CAC) a partir da porcentagem de congelamento, uma vez que foram submetidos a fenotipagem por meio do condicionamento ao medo contextual (CMC). Este protocolo teve como objetivo avaliar se a indução da neuropatia periférica induzida pela constrição do nervo isquiático

(CCI) ou cirurgia simulada (SHAM) pode alterar a resposta no teste do medo contextual. Ainda, avaliamos se na condição (SHAM), o tratamento com CBD pode modular a ansiedade do fenótipo das linhagens Cariocas. Enquanto que, na condição de neuropatia periférica (CCI), o objetivo foi avaliar este mesmo efeito na condição de comorbidade. A Tabela 7 apresenta os dados obtidos na aplicação da ANOVA duas vias para medidas repetidas dos resultados obtidos no teste de medo contextual.

CMC	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
% Congelamento	$F_{(2,84)} = 226,204$ $P < 0,0001$	$F_{(1,84)} = 23,627$ $P < 0,0001$	$F_{(1,84)} = 38,126$ $P < 0,0001$	$F_{(2,84)} = 9,507$ $P < 0,0001$

Tabela 7. Dados da ANOVA duas vias para medidas repetidas para análise do teste de condicionamento ao medo contextual (CMC) entre todos os grupos nos dias habituação, teste e de reteste, na linhagem Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL), e alto congelamento (CAC), submetidos ao modelo de neuropatia periférica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM) e tratados com canabidiol (CBD, 5mg/kg/dia, i.p., por 10 dias). O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$ para todas as análises.

Para avaliação do comportamento do tipo ansioso neste modelo animal, a ANOVA duas vias para medidas repetidas é fidedigna para comparar nos mesmos animais o desenvolvimento do nível de ansiedade ao longo do tempo, sendo antes da cirurgia (habituação e teste) e ao final do tratamento (reteste após tratamento VEI ou CBD). Assim como também todos os grupos quanto a linhagem (CBC, CTL, CAC), condição (SHAM, CCI), e tratamento (VEI, CBD).

Com relação à porcentagem de congelamento na câmara de CMC, a ANOVA duas vias para medidas repetidas revelou diferenças nos fatores linhagem, condição, tratamento e interação entre os fatores (Tabela 7). Como característico desse modelo animal de ansiedade, não houve diferença significativa entre os grupos durante a fase de habituação ($P > 0,05$, teste de Bonferroni). Desse modo, nas demais fases, o CBD apresentou efeito ansiolítico no condicionamento ao medo contextual em todas as linhagens dos Cariocas em SHAM+CBD (Figura 19), bem como nos grupos CBC e CTL nos animais CCI+CBD quando comparados aos seus respectivos grupos controle (CCI+VEI) (Figura 19, $P < 0,05$, teste de Bonferroni).

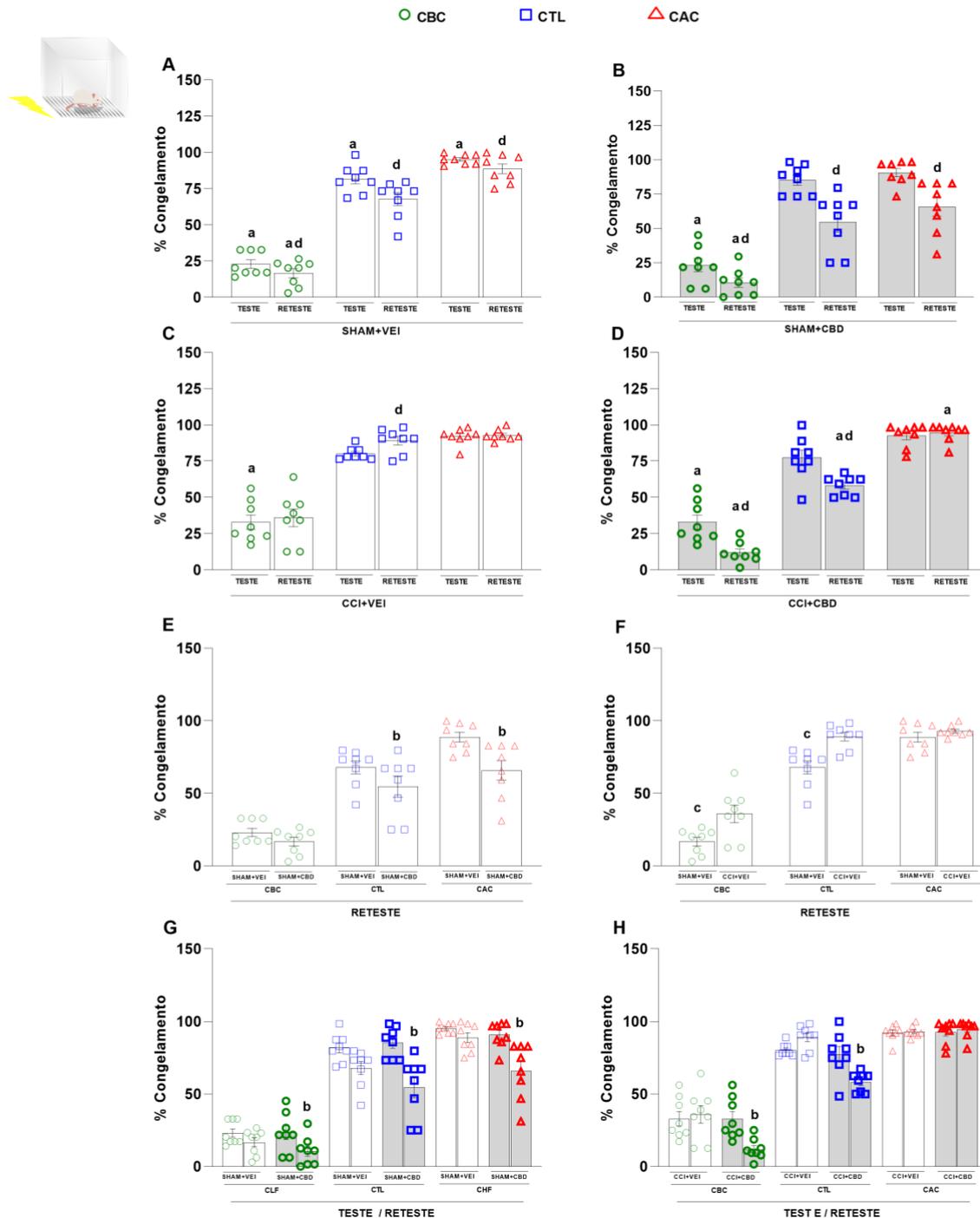


Figura 19. Média da porcentagem do tempo de congelamento no contexto em que os aratos foram condicionados ao medo contextual (CMC), tanto os grupos submetidos à cirurgia simulada (SHAM) ou cirurgia para constrição do nervo isquiático (CCI), e submetidos ao tratamento crônico com canabidiol (CBD, 5 mg/kg ao dia, via i.p., a partir do 14^o dia experimental) ou veículo (VEI) nas linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL) ou alto congelamento (CAC). A: SHAM+VEI; B: SHAM+CBD C: CCI+VEI; D: CCI+CBD; E: reteste dos grupos SHAM nos tratamentos VEI e CBD; F: reteste dos grupos nas condições SHAM e CCI em tratamento VEI; G: teste e reteste na condição SHAM; H: teste e reteste na condição CCI, comparando os níveis de congelamento da fase de teste (condicionamento da memória aversiva ao medo contextual) e de reteste (retorno a câmara/contexto aversivo após cirurgia e tratamento), assim como a diferença entre os grupos. a $P < 0,05$ para o teste de Bonferroni comparou as linhagens (CBC, CTL, CAC) na mesma condição e tratamento; b $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e condição, mas tratamento diferente (VEI ou CBD). c $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e tratamento, mas condição diferente (SHAM ou CCI). d $P < 0,05$ Teste Bonferroni comparou dia de teste e reteste do mesmo grupo experimental. Os dados representam média \pm erro padrão da média. N = 8 para cada grupo experimental.

Adicionalmente, nos grupos SHAM+VEI, o teste post hoc Bonferroni apresentou diferença da frequência de congelamento entre linhagens característica desse modelo animal de ansiedade ($CBC < CTL < CAC$, $P < 0,05$), assim como pequena redução do congelamento no 24º dia (Figura 19A). Em contrapartida, foi observado aumento do congelamento nos animais CTL e uma permanência da mesma frequência de congelamento nas linhagens CBC e CAC quando em condição CCI tratados com VEI (Figura 19C).

Além disso, o teste post hoc Bonferroni mostrou que na fase reteste, os grupos SHAM+VEI quando comparados com os grupos SHAM+CBD, das linhagens CTL e CAC apresentaram menor frequência de congelamento quando tratados com a linhagem CBC (Figura 19E, $P < 0,05$). Ainda na fase reteste, quando comparado os dias de teste e reteste, os grupos nas condições SHAM e CCI tratados com veículo mostraram aumento de congelamento quando em CCI+VEI nas linhagens CBC e CTL (Figura 19F).

Para ilustrar todos os grupos e todas as linhagens em teste e reteste, a Figura 19G apresenta os grupos na condição SHAM tratados VEI ou CBD. Assim como também, a Figura 19H apresentou os grupos na condição CCI em ambos os tratamentos (VEI e CBD), com o objetivo de mostrar que com exceção do grupo CAC+CCI+CBD, todos os demais grupos tiveram redução do congelamento quando tratados com CBD ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

4.2.4. Avaliação da expressão dos níveis de BDNF (Protocolo 2)

Neste procedimento de western blotting foi analisado a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) das áreas hipocampo dorsal e hipocampo ventral dos ratos das diferentes linhagens (CBC, CTL e CAC) submetidos ao condicionamento de medo contextual e ao modelo de neuropatia periférica induzida pela constrição do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM). A Figura 20 apresenta a quantificação do BDNF de animais representativos de cada um dos grupos experimentais realizados neste protocolo.

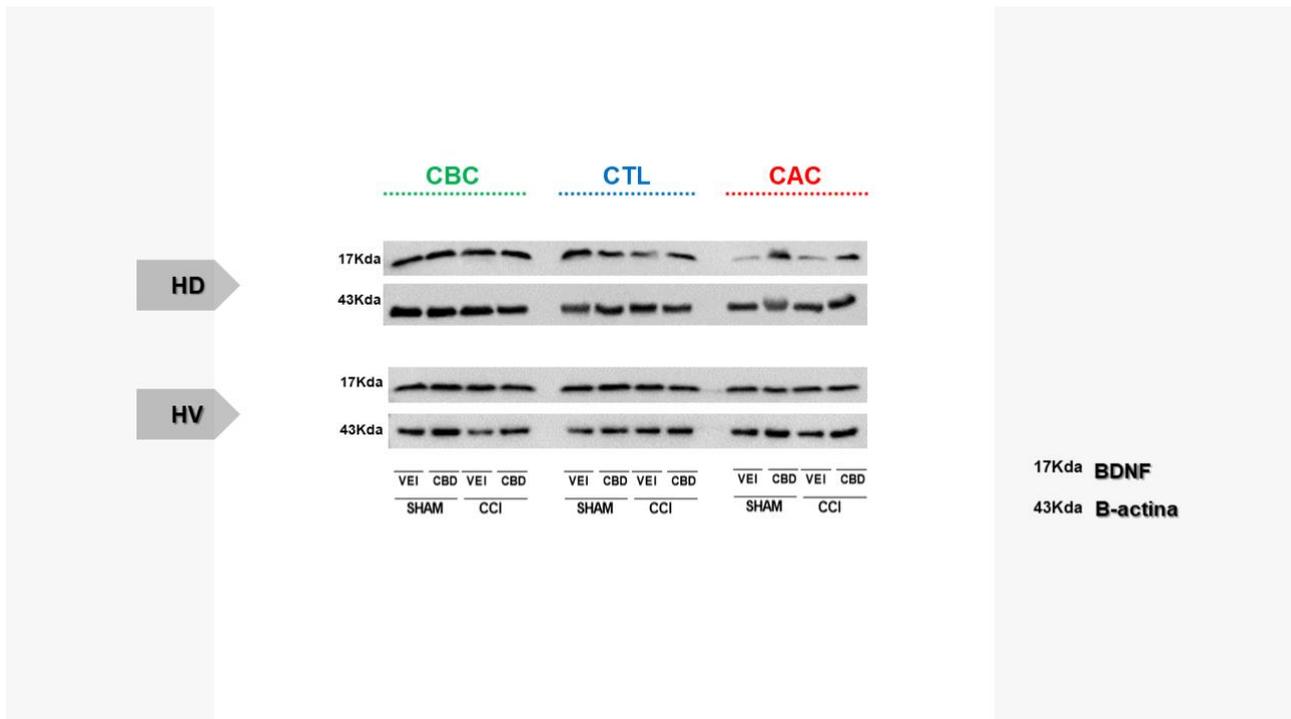


Figura 20. Quantificação pela técnica do Western Blotting da proteína BDNF. Imagem final das bandas da expressão do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) das áreas do hipocampo dorsal (HD), hipocampo ventral (HV). Animais representativos das diferentes linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL) e alto congelamento (CAC), nos grupos com dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático (CCI) ou cirurgia simulada (SHAM), tratados com canabidiol (CBD, 5mg/kg, 1 vez ao dia, i.p., por 10 dias tratamento iniciado no 14º dia após a cirurgia) ou veículo (VEI). A análise foi realizada por densitometria e quantificada em razão da proteína beta-actina como padrão.

Os resultados da quantificação de BDNF foram analisados pela aplicação da ANOVA de duas vias revelou que no hipocampo dorsal ocorreu diferença no fator condição e interação entre os fatores. Enquanto que no hipocampo ventral evidenciou-se interação entre os fatores. O detalhamento dos resultados obtidos na aplicação da ANOVA de duas vias estão apresentados na Tabela 8.

Western Blotting	Fator Linhagem (CBC x CTL x CAC)	Fator Condição (SHAM x CCI)	Fator Tratamento (VEI x CBD)	Interação (Linhagem x Condição x Tratamento)
Hipocampo Dorsal (HD)	$F(2,48) = 3,011$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 4,375$ $P < 0,05$	$F(1,48) = 2,665$ $P > 0,05$	$F(2,48) = 0,499$ $P < 0,05$
Hipocampo Ventral (HV)	$F(2,48) = 0,53$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 0,251$ $P > 0,05$	$F(1,48) = 0,074$ $P > 0,05$	$F(2,48) = 0,838$ $P < 0,05$

Tabela 8: Detalhamento dos resultados da ANOVA de duas vias. Estatística da análise dos níveis da expressão de BDNF no hipocampo dorsal (HD), e hipocampo ventral (HV) das linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL), e alto congelamento (CAC), submetidos a neuropatia periférica (constricção do nervo isquiático, CCI) ou cirurgia simulada (SHAM), e tratados com canabidiol (CBD, 5mg/kg, 1 vez ao dia, por 10 dias tratamento iniciado no 14º dia após a cirurgia), ou veículo (VEI).

Na região do HD evidenciou-se diferença significativa entre as linhagens CBC e CAC, no nível de BDNF quando comparados a linhagem CTL (Figura 21). Em detalhes, observa-se menor

expressão de BDNF em nos grupos CBC+SHAM+VEI e CAC+SHAM+VEI (Figura 21A, $P < 0,05$, teste de Bonferroni) comparados com o grupo CTL+SHAM+VEI. Na condição de neuropatia periférica (grupos CCI), o grupo da linhagem CTL apresentou redução da expressão de BDNF, comparados com o grupo controle (CTL+SHAM+VEI, Figura 21, $P < 0,05$, teste de Bonferroni), enquanto que o grupo tratado com CBD mostrou aumento do nível de BDNF quando nessa condição (CCI).

Considerando a região do HV, embora a aplicação da ANOVA de duas vias tenha revelado interação entre os fatores, o pós-teste de Bonferroni evidenciou que não há diferenças significativas entre as diferentes linhagens, ou mesmo entre os tratamentos (CBD ou VEI) e condição (SHAM ou CCI, Figura 21).

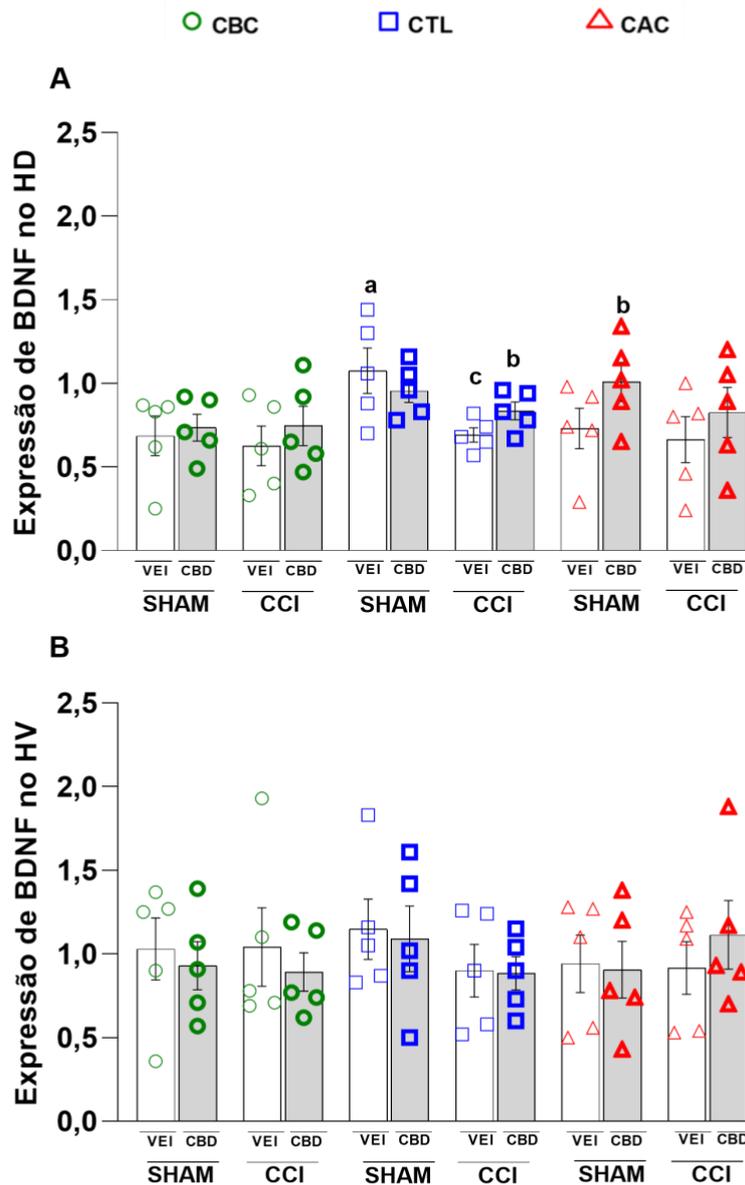


Figura 21. Quantificação do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) nas linhagens Carioca de baixo congelamento (CBC), controle (CTL) e alto congelamento (CAC) das áreas do hipocampo dorsal (HD), e hipocampo ventral (HV). Os ratos foram submetidos a cirurgia controle (SHAM) ou cirurgia para constrição do nervo isquiático (CCI), e submetidos ao tratamento crônico com canabidiol (CBD, 5 mg/kg ao dia, via i.p., a partir do 14^o dia experimental) ou veículo (VEH). a $P < 0,05$ para o teste de Bonferroni comparou as linhagens (CBC, CTL, CAC) na mesma condição e tratamento; b $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e condição, mas tratamento diferente (VEH ou CBD). c $P < 0,05$ Teste de Bonferroni comparou à mesma linhagem e tratamento, mas condição diferente (SHAM ou CCI). Os dados representam média \pm erro padrão da média. N = 8 para cada grupo experimental.

5. DISCUSSÃO

Os presentes resultados, de ambos os protocolos (PT1 e PT2), mostraram que a dor neuropática induzida por CCI promoveu redução do limiar mecânico e térmico em todas as

linhagens. Essas alterações foram acompanhadas de redução da porcentagem de tempo gasto no centro (PT1 e PT2) e do total de cruzamentos (PT2) no teste do campo aberto, sugerindo efeito do tipo ansiogênico associado à dor crônica (persistente). O tratamento crônico com CBD produziu efeito antialodínico na sensibilidade mecânica, e ao frio, além de reduzir a hiperalgesia ao calor (Figuras 12 e 17). Ainda, o tratamento com CBD reverteu o efeito do tipo ansiogênico na condição de dor crônica nas linhagens CTL e CAC (Figuras 13 e 18), assim como, o tratamento com CBD reduziu a qualidade aversiva do estímulo mecânico em todas as linhagens (Figura 14). Quando avaliadas no condicionamento ao medo contextual (PT2), o tratamento com CBD também reduziu a ansiedade em todas as linhagens quando avaliadas sem a comorbidade (SHAM), e nos ratos CBC e CTL quando em condição de dor persistente (Figura 19). Além do mais, no primeiro protocolo, o tratamento com CBD mostrou redução da neuroplasticidade, avaliada pela expressão de BDNF, nas linhagens submetidas à dor persistente em diferentes estruturas: HD, HV, AMG e ACC (Figura 16). Por outro lado, essa mesma análise em uma das estruturas neurais (HD) no protocolo 2, mostrou que o tratamento com CBD produziu aumento de neuroplasticidade (maior expressão de BDNF) na linhagem CTL com dor persistente, e em CAC sem a condição de dor (Figura 21).

Estudos experimentais anteriores avaliando o uso de CBD em condições de dor crônica mostraram efeito antialodínico, redução da hiperalgesia (**Gregorio et al., 2019; Silva-Cardoso et al., 2021**) e efeito ansiolítico (**Blessing et al., 2015, Silva-Cardoso et al., 2021**). Nossos dados revelaram que o tratamento com CBD produziu efeitos diferentes na dor neuropática em indivíduos com níveis distintos de ansiedade (linhagens CBC, CTL, CAC). As linhagens não apresentaram diferenças basais, confirmando que estímulos nociceptivos não selecionaram essas linhagens (**Gomes e Landeira-Fernandez, 2011**). Além disso, foi observada menor eficácia do CBD no grupo CAC+CCI em comparação com o CTL+CCI na sensibilidade mecânica e térmica ao frio (PT1 e PT2), o que sugere a hipótese de menor efeito terapêutico do CBD nesta linhagem que apresenta nível elevado de ansiedade. Ademais, a reversão parcial também foi evidenciada nos ratos CBC (PT1 e PT2), talvez devido a esta linhagem ter um nível de ansiedade diferente do CTL e

CAC, o que sugere que o efeito terapêutico do CBD pode estar associado com as características emocionais individuais. Adicionalmente, no segundo protocolo, o qual avaliou o condicionamento de medo ao contexto, a linhagem CAC apresentou menor eficácia do CBD comparado à linhagens CTL e CBC, o que pode confirmar a associação do efeito deste tratamento com as respostas emocionais de cada linhagem (Figura 19). Além disso, observou-se maior sensibilidade da linhagem CAC na avaliação do estímulo térmico ao calor, em particular no grupo CCI+VEI no último dia do protocolo, o que sugere maior sensibilidade ou percepção de dor nesta linhagem. Os presentes resultados corroboram estudo anterior com as linhagens de *High Anxiety Behavior (HAB)* and *Low Anxiety Behavior (LAB)* (Roeska et al., 2009), onde ratos com o fenótipo bidirecional de extremos do medo inato no labirinto em cruz elevado mostrou aumento da sensibilidade à dor na linhagem *HAB* (linhagem da seleção mais ansiosa) quando avaliados no teste von Frey. Portanto, é possível que o nível de ansiedade pode modificar a sensibilidade dolorosa em modelos animais.

Projetos anteriores com ratos Wistar Hannover (Silva-Cardoso et al., 2021) mostraram que o tratamento agudo com CBD em diferentes doses reverteu a dor neuropática e a ansiedade induzida por CCI. Além disso, este estudo (Silva-Cardoso et al., 2021) também mostrou por meio de imunofluorescência a alta ativação dos receptores CB1 e TRPV1 nas áreas do córtex cingulado anterior (ACC), córtex insular agranular (AIC), amígdala basolateral (BLA), hipocampo dorsal (HD) e ventral (VH), após o tratamento com CBD (dose de 3 mg/kg). Nos ratos Cariocas, a linhagem CAC apresentou maior expressão da proteína c-Fos no BLA e no locus coeruleus (LC) induzida por medo contextual em comparação com as outras linhagens (León et al., 2020), sugerindo maior ativação destas estruturas na linhagem de maior ansiedade. Tomadas em conjunto, essas diferenças morfofuncionais observadas nas estruturas envolvidas nos efeitos analgésicos e ansiolíticos do CBD, pelo menos no BLA e na região do hipocampo, podem explicar em parte os diferentes efeitos do CBD em nossos protocolos. Embora, outros estudos sejam necessários, com essas análises nos animais Cariocas.

No protocolo 1, é relevante notar que o grupo SHAM apresentou limiar térmico elevado no teste da placa quente na linhagem CAC. Uma hipótese para esse dado é de que esse comportamento pode estar associado à facilitação da aprendizagem aversivo, onde, desde o início, esses animais são selecionados com base no comportamento defensivo de congelamento usando um estímulo nocivo (**Gomes e Landeira-Fernandez, 2008; Fanselow et al., 1980; Blanchard e Blanchard, 1988**). Para ampliar essa questão acerca da aprendizagem, um estudo (**Messing et al., 1983**) mostrou que a exposição repetida de camundongos ao ensaio de placa quente resulta em latências de resposta mais curtas, independentemente da avaliação do nível de ansiedade. Esses resultados corroboram a perspectiva sugerida no presente estudo. Além disso, essa condição de facilitação do aprendizado foi observada apenas na linhagem CAC. Desse modo, é importante ressaltar que o CAC foi selecionado para o comportamento de congelamento (alto congelamento), e que a ausência de comportamento na placa quente mantém o animal por mais tempo no aparelho, resultando em elevado limiar, onde foi observado na condição SHAM (Figura 12), e não devido a condição de analgesia.

Contudo, o uso de CBD não mostrou diferença neste grupo SHAM entre os tratamentos em animais CAC (Figura 12I); os animais do grupo CAC+SHAM foram diferentes quando comparados a linha de base. Além disso, o resultado foi diferente no VEI da condição CCI em relação ao nível apresentado pelo CBC e CTL no tratamento com CBD (Figura 12G–I). A primeira hipótese foi a desses animais CAC terem apresentado aprendizagem aversiva. Essa hipótese pode ser questionada a partir dos resultados do condicionamento ao medo contextual através do tratamento com CBD no protocolo 2, isto porque é o modelo de aprendizagem mais fidedigno correspondente à sua reprodução seletiva (**Gomes et al., 2013; Gones et al., 2011; Blanchard e Blanchard, 1988**). Os estímulos de um aparato de placa quente diferem muito de uma câmara com todos os estímulos contextuais selecionados, e desse modo, seria necessário investigação aprofundada para explicar o aumento de limiar dos animais CAC+SHAM na placa quente.

Nesse paradigma, **Gebhart et al. (1971)** discutiram que o comportamento de aprendizagem é desencadeado quando há a reexposição do animal na placa quente, isso ocorre pelo reforço da resposta de remoção do animal da superfície aquecida (estímulo aversivo) após a exibição de uma resposta emitida (lamber a pata). Se uma aprendizagem aversiva pode explicar o aumento do limiar dos ratos CAC, a resposta ao medo de seu fenótipo seria a de congelamento ao contexto, que é caracterizado pela imobilidade corporal com exceção dos movimentos respiratórios acompanhada de alguns sinais como exoftalmia, piloereção, entre outros. Desse modo, o comportamento esperado seria o de “não-ação” e permanência na placa quente (aumento do limiar). Outra hipótese poderia ser a habituação a estímulos nocivos repetidos, o que seria um conceito para explicar nossas observações. **Bardo e Hughes (1979)**, por exemplo, mostraram que ratos expostos a uma placa quente (não aquecida) por quatro dias exibiu diminuição da latência de lambar a pata quando testado em superfície aquecida. Eles atribuíram esse comportamento “tolerância” à habituação a novos estímulos distrativos associados ao ambiente de teste. Os ratos CAC não foram habituados a placa quente, no entanto, podem ter apresentado “tolerância” ao estímulo térmico.

No protocolo (PT2) optamos por não realizar o teste de placa quente para evitar tal variável, e assim podermos também realizar avaliação mais fidedigna quanto aos objetivos já expostos (PT1: dor; PT2: comorbidade dor e ansiedade patológica desse modelo animal). No condicionamento de medo ao contexto, o tratamento com CBD reduziu significativamente o congelamento em todas as linhagens (CBC, CTL, CAC) em condição controle (SHAM+CBD; Figura 19B). Estudos anteriores mostraram que o uso do CBD resultou em efeito ansiolítico geral em testes de aprendizagem aversiva (**Iffland e Grotenhermen, 2017; Stern et al., 2017; Riaz et al., 2017**). Estudos com humanos e não humanos confirmam o aumento da ansiedade na dor crônica (**Roeska et al., 2009; Malvestio et al., 2021; Jochum et al., 2007; Magri et al., 2021**) e o tratamento com CBD na dosagem de 5mg/kg não reduziu a ansiedade da linhagem CAC na presença da dor persistente (CCI).

A literatura já estabeleceu que o LC é uma estrutura que facilita a transição da dor aguda para a crônica e a manutenção da dor crônica, contendo projeções para estruturas como hipocampo, amígdala e hipotálamo (**Taylor e Westlund, 2017**). Além disso, estudo anterior que avaliou a imunohistoquímica de c-Fos para investigar mudanças na atividade neural em diferentes estruturas encefálicas entre ratos CBC e CAC, fenotipados, mostrou alta ativação de c-Fos no LC dos animais CAC em comparação com CBC (**Léon et al., 2020**). Seguindo essa perspectiva, existe a possibilidade de que o LC seja uma estrutura nesse modelo animal de ansiedade que contenha processos essenciais na modulação da dor e aprendizagem aversiva das quais foram observadas em comorbidade.

Na avaliação do comportamento locomotor, no PT1 não houve diferença no total de cruzamentos entre as linhagens nos grupos SHAM que não receberam CBD (Figura 13), porém no PT2 todas as linhagens diferem quanto ao número de cruzamentos (Figura 18B). O teste CA foi realizado para avaliar a locomoção (**Tatem et al., 2014**) e o nível de medo inato/ansiedade (**Prut e Belzung, 2003**). Com o primeiro protocolo, tem-se a comprovação de que a locomoção dos animais não foi comprometida pela cirurgia e nem pelo desenvolvimento da dor crônica (Figuras 12 e 13). Ainda que tenha sido mostrado diferença entre os animais quando fenotipados (PT2, Figura 18), esta diferença pode ser devido ao níveis de ansiedade de cada linhagem. Nos animais CCI+VEHI, observou-se redução da porcentagem de tempo no centro sugerindo aumento do nível de ansiedade em todas as linhagens (Figuras 13 e 18). Além disso, o uso de CBD nas linhagens CTL e CAC (condição CCI) teve efeito ansiolítico. A diferença do nível de ansiedade também foi evidenciada entre os grupos CAC+CCI+VEI e CCB +CCI+VEI (Figuras 13A e 18A). Neste paradigma (teste do campo aberto), ao avaliar o medo inato, o CBD mostrou efeito ansiolítico associado com a condição de dor persistente, reduzindo o tipo de ansiedade analisada no CA, o difere da ansiedade associada a aprendizagem aversiva que corresponde ao fenótipo deste modelo animal de ansiedade (seleção por meio do teste de medo condicionado ao contexto).

Por outro lado, a linhagem CBC nas condições SHAM (associado com o tratamento com CBD) e CCI apresentou maior locomoção quando comparada às linhagens CTL e CAC (Figura 13B e 18B). No entanto, na condição SHAM, o CBC tratado com CBD apresentou maior locomoção do que outros grupos da mesma linhagem (Figuras 13B e 18B). É importante destacar que estudos prévios mostraram que linhagens selecionadas a um nível mais baixo de ansiedade estão associadas a comportamentos impulsivos (**Rahi e Kumar, 2021; Yen et al., 2013**), o que representa a linhagem CBC. As linhagens *HAB* e *LAB* mencionadas anteriormente, também apresentam altos resultados de locomoção na linhagem menos ansiosa (**Varvel et al., 2006**). Não obstante, esse comportamento já foi observado anteriormente em outros estudos com o modelo animal dos Cariocas (**Macêdo-Souza et al., 2020; Lages et al., 2021; Lages et al., 2021**). Esses resultados sugerem que investigação mais específica é necessária para avaliar um possível modelo de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) nessa linhagem (CBC), o que implicaria em outra condição de comorbidade, e também poderia explicar a recuperação parcial da sensibilidade mecânica e ao frio nessa linhagem (Figura 12A e D, 17A e D).

Ademais, alguns estudos observaram que o efeito do CBD aumenta a locomoção (**Varvel et al., 2006; Hayakawa et al., 2008; Calapai et al., 2022**), enquanto outros não mostram essa diferença (**Varvel et al., 2006; ElBatsh, 2012**). Um outro estudo que também avaliou a mobilidade de ratos Cariocas no campo aberto reafirma a alta mobilidade de ratos da linhagem CBC (**Lages et al., 2021**). No entanto, o mecanismo subjacente a este efeito de locomoção elevada de ratos CBC ainda precisa ser esclarecido (**Lages et al., 2021**).

No aspecto afetivo-motivacional da dor, os presentes resultados mostraram que a administração de CBD promoveu redução da aversividade à dor (componente emocional) avaliada pelo teste PEAP (Figura 14). Um estudo anterior em ratos Wistar Hannover (**Silva-Cardoso et al., 2023**) mostrou a reversão da aversividade à dor, utilizando o tratamento sub-crônico com CBD (3mg/kg/dia durante 3 dias) em animais com neuropatia periférica induzida por constrição crônica do nervo isquiático, sendo possível que esse efeito seja mediado ativação de estruturas do sistema

límbico que apresentaram maior ativação de proteína c-Fos, em particular no córtex cingulado anterior, hipocampo dorsal e na amígdala. Ainda, pelo menos em parte, esse efeito poderia ser explicado pelo fator de neuroproteção do CBD (**Campos et al., 2016**). De acordo com estudo de **Campo et al. (2016)** o CBD altera a plasticidade sináptica e facilita a neurogênese, embora os mecanismos desses efeitos ainda não estejam completamente esclarecidos.

Considerando o BDNF, estudos mostram que esta neurotrofina medeia várias ações adaptativas, além de atuar como neuromodulador. Nossos resultados mostraram padrões distintos da expressão de BDNF nas condições avaliadas. **Coderre e Melzack (1987)** sugerem que a dor crônica é como um “traço de memória”, e tem sido estabelecido na literatura que o BDNF está associado ao desenvolvimento da dor crônica (**Garraway e Huie, 2016**). De fato, vários estudos mostraram níveis elevados de BDNF em neurônios sensoriais, e no corno dorsal em uma variedade de modelos de dor crônica neuropática (**Fukuoka et al., 2001; Há et al., 2001; Miletic e Miletic, 2002; Yajima et al., 2002; Yajima et al., 2005**). Ainda, há um consenso de que o BDNF normalmente pode promover ações pró-nociceptivas, em particular na facilitação e hiperalgesia, alterando, portanto, a excitabilidade neuronal na mediação de comportamentos de dor (**Mannion et al., 1999; Shu et al., 1999; Groth e Aanonsen, 2002; Cao et al., 2012**). Interpretado como um efeito de superexpressão e sinalização de BDNF (**Garraway e Huie, 2016**), nos presentes resultados observamos um padrão em determinados grupos (linhagens CBC e CAC no HD; linhagem CTL no HV; linhagens CBC e CAC no ACC) que quando em condição de dor neuropática apresentaram níveis elevados de BDNF, e serem tratados com CBD esses níveis foram reduzidos.

Por outro lado, quando avaliado o nível basal das linhagens nesse protocolo sem o teste de CMC e na condição SHAM, a linhagem CBC apresentou menor expressão de BDNF no HD (Figura 21), enquanto que, CAC apresentou menor expressão de BDNF na AMG. (Figura 21). Esses baixos níveis de BDNF foram revertidos pelo tratamento com CBD. Destaca-se que o hipocampo dorsal (HD) é reconhecido por ser uma estrutura essencial na consolidação da memória e na

aprendizagem, e não só ele, como também a AMG, são estruturas reconhecidamente importantes para a modulação das emoções, em particular do medo e da ansiedade.

No segundo protocolo, observa-se redução dos níveis basais de BDNF nas linhagens CBC e CAC quando comparados ao CTL (Figura 21A), na condição SHAM+VEI. Esse resultado foi revertido no grupo CAC+SHAM quando tratado com CBD. Esse resultado corrobora com o achado de um estudo anterior das linhagens Cariocas nas gerações 9, 13 e 14, onde os ratos CAC apresentaram nível mais baixo de BDNF na área hipocampal (**Dias et al., 2014**). No nosso atual estudo, foi possível distinguir que essa diferença ocorreu no HD, mas não no HV. Ainda, a linhagem CTL apresentou baixo nível de BDNF na condição de dor persistente (grupo CTL+CCI+VEI), o que diferiu desse mesmo grupo quando no protocolo 1, sem o teste de CMC. Estes dados sugerem que a comorbidade causada pela aprendizagem aversiva do condicionamento ao medo contextual (CMC) associada a condição de dor neuropática (CCI) reduziram o nível de BDNF nos animais CTL dessa linhagem no HD. Contudo, o tratamento com CBD novamente reverteu esse resultado. Portanto, tanto no protocolo 1 quanto no protocolo 2, além dos múltiplos efeitos conhecidos do CBD, ele também pode ser visto como regulador dos níveis de BDNF em determinadas estruturas escefálicas na dor persistente e/ou com quadro de ansiedade generalizada.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo corroboram com as perspectivas de que tratamento do CBD apresenta efeitos analgésicos e ansiolíticos em modelo de dor neuropática, em particular em quadros de ansiedade patológica. O presente estudo reforça a informação de que o CBD promove efeito anti-alodínico na dor persistente. Assim, foi mostrado que a administração sistêmica de CBD modulou a hipersensibilidade dolorosa desses animais quando submetidos a protocolo de dor neuropática. Adicionalmente observou-se que o CBD reduz a qualidade aversiva da dor nas linhagens CBC, CTL e CAC quando comparados com seus respectivos grupos controle. Assim como também, foi observado o efeito ansiolítico nas linhagens Cariocas, nos grupos SHAM em que não estão em comorbidade com a dor crônica. O mesmo ocorreu nos animais CBC e CTL com CCI, mas não em comorbidade (CAC+CCI).

Nos grupos da linhagem CAC, com comorbidade a dor neuropática, o tratamento com CBD não apresentou eficácia adequada ante o nível de ansiedade quando avaliado no teste correspondente a sua fenotipagem (condicionamento ao medo contextual). Considerando a expressão de BDNF, um marcador de neuroplasticidade, o tratamento com CBD é um possível modulador desta neurotrofina em determinadas estruturas escefálicas na dor persistente e/ou em quadro de ansiedade generalizada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apkarian, A. et al. Role of adult hippocampal neurogenesis in persistent pain. *Pain* 157, 418–428, 2016.
- Adams, R. Marihuana: Harvey Lecture, February 19, 1942. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 18, 705–30, 1942.
- Alvarado, S. et al. An epigenetic hypothesis for the genomic memory of pain. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 88, 2015.
- Alves, F. H. et al. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex activity through 5-HT1A receptors. *Pharmacol. Res.* 62, 228–236, 2010.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed.; American Psychiatric Publishing, Inc.: Arlington, VA, USA, 2013.
- Aouchiche, L. et al. An Adaptive Solution for the Detection of Small and Slowly-Moving Targets in Highly Ambiguous Radar Context. 2018 26th Eur. Signal Process. Conf. 101–104, 2016.
- Asmundson, G. J. G. e Katz, J. Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: State-of-the-art. *Depress. Anxiety* 26, 888–901, 2009.
- Bandelow, B. Generalized anxiety disorder and pain. *Mod. Trends Pharmacopsychiatry* 30, 153–165, 2015.
- Bardo, M. T. e Hughes, R. A. Exposure to a nonfunctional hot plate as a factor in the assessment of morphine-induced analgesia and analgesic tolerance in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 10(4), 481-485, 1979.
- Beiderbeck, D. I. et al. High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait anxiety - Involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1969–1980, 2012.
- Belzung, C. e Lemoine, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 1, 9, 2011.
- Bennett, G. J. e Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 33, 87–107, 1988.
- Bergamaschi, M. M. et al. Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr. Drug Saf.* 6, 237–249, 2011.
- Berge, O. G. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1195–1206, 2011.
- Bezerra-Karounis, M.A. et al. Alcohol intake in carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 197, 173019, 2019.
- Blanchard, R. J. e Blanchard, D. C. Ethoexperimental Approaches. *Annu. Rev. Psychol.* 39, 43–68, 1988.

- Blessing, E. M. et al. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics* 12, 825–836 (2015).
- Bolles, R. C. e Fanselow, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. 291–323, 1980.
- Botterill, J. J. et al. Epilepsy & Behavior Aberrant hippocampal neurogenesis after limbic kindling : Relationship to BDNF and hippocampal-dependent memory. *Epilepsy Behav.*, 2015.
- Bradão, M. L. *Psicofisiologia*. 4ª Ed. 2019.
- Brandão, M. L. et al. Neural organization of different types of fear: Implications for the understanding of anxiety. *Braz. J. Psiquiatr.* 2003, 25 (Suppl. 2), 36–41, 2003.
- Britch, S. C. et al. Cannabidiol: Pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology* 2021, 238, 9–28, 2021.
- Calapai, F. et al. Effects of cannabidiol on locomotor activity. *New Trends Pharm. Sci.*, 12, 652, 2022.
- Calhoon, G. G. e Tye, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat. Neurosci.*, 18, 1394–1404, 2015.
- Campos, A. C. et al. Plastic and neuroprotective mechanisms involved in the therapeutic effects of cannabidiol in psychiatric disorders. *Front. Pharmacol.* 8, 2017.
- Campos, A. C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: Involvement of the endocannabinoid system. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1407–1419, 2013.
- Campos, A. C. et al. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Res.* 112, 119–127, 2016.
- Campos, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 3364–3378, 2012.
- Cao, X. H. et al. Nerve injury increases brain-derived neurotrophic factor levels to suppress BK channel activity in primary sensory neurons. *Journal of Neurochemistry.* 121, 6, 944–953, 2012.
- Carlini, E. A. e Cunha, J. M. Hypnotic and Antiepileptic Effects of Cannabidiol. *J. Clin. Pharmacol.* 21, 417S-427S, 2013.
- Carrier, E. J., et al. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: A mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 7895–7900, 2006.
- Caterina, M. J. e Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual review of neuroscience*, 24, 1, 487-517, 2001.
- Caterina, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 288, 306–313, 2000.
- Cazuza, R. A. et al. Enhanced expression of heme oxygenase-1 in the locus coeruleus can be associated with anxiolytic-like effects. *Behav. Brain Res.* 336, 204–210, 2018.

- Chaaya, N. et al. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 92, 43–54, 2018.
- Chen, T. et al. Current understanding of the neural circuitry in the comorbidity of chronic pain and anxiety. *Neural Plast.* 2022, 1–13, 2022.
- Coderre, T. e Melzack, R. Cutaneous hyperalgesia: contributions of the peripheral and central nervous systems to the increase in pain sensitivity after injury. *Brain Research*, 404, 1-2, 95–106, 1987.
- Colloca, L. et al. Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 3, 17002, 2017.
- Cook, J. et al. Medical use of cannabis: an addiction medicine perspective. *Intern. Med. J.* 45, 677–680, 2015.
- Corcoran, K. A. e Maren, S. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction., 21, 1720–1726, 2001.
- Corcoran, K. A. et al. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction., 25, 8978–8987, 2005.
- Costa, B. et al. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 556, 75–83, 2007.
- Cristino, L. et al. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptors in the mouse brain. *Neuroscience.* 139, 1405–1415, 2006.
- Cruz, A. P. M. e Landeira-Fernandez, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. *Métodos em Neurociência.* 192–217, 2012.
- Curzon, P. et al. Cued and contextual fear conditioning for rodents – Method. Chapter 2 cued and contextual fear conditioning for rodents cued and contextual fear conditioning for rodents – Method. 1–17, 2011.
- Darwin, C. A. *Origem das Espécies.* Edição especial, 2014.
- Darwin, C. A. *A expressão das emoções nos homens e nos animais.* 1ª Edição, 2009.
- Deiana, S. et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarine (CBDV), Δ 9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive – compulsive – compu. 859–873, 2012.
- Deiana, S. et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarine (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.* 219, 859–873, 2012.
- Deuis, J. R. et al. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 284, 2017.
- Devinsky, O. et al. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia.* 55, 791–802, 2014.

- Dias, G. P. et al. Hippocampal biomarkers of fear memory in an animal model of generalized anxiety disorder. *Behav. Brain Res.* 263, 34–45, 2014.
- Dias, G. P. et al. Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in carioca high-conditioned freezing rats. *Behav. Brain Res.* 205, 342–348, 2009.
- Dias, Q. M. et al. An improved experimental model for peripheral neuropathy in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 253–256, 2013.
- ElBatsh, M. M. et al. Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 221, 239–247, 2012.
- Etkin, A. Neurobiology of anxiety: from neural circuits to novel solutions? *Depress. Anxiety*. 29, 355–358, 2012.
- Fanselow, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 15, 177–182, 1980.
- Flonta, M.-L. e Ristoiu, V. Building elements of the adaptive and pathological pain. *Neural Networks*. 417–445, 2017.
- Fukuoka, T. et al. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *The Journal of Neuroscience*. 21, 13, 4891–4900, 2001.
- Galvão, B. O. et al. Panic-like behaviors in carioca high-and low-conditioned freezing rats. *Psychol. Neurosci.* 4, 205–210, 2011.
- Gaoni, Y. e Mechoulam, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646–1647, 1964.
- Garraway, S. M. e Huie, J. R. Spinal plasticity and behavior: BDNF-induced neuromodulation in uninjured and injured spinal cord. *Neural Plast.* 1–19, 2016.
- Gebhart, G. F. et al. The influence of learning on morphine analgesia and tolerance development in rats tested on the hot plate. *Psychopharmacologia*. 22, 295-304, 1971.
- Genaro, K. et al. Cannabidiol is a potential therapeutic for the affective-motivational dimension of incision pain in rats. 8, 1–12, 2017.
- Gomes, V. e Landeira-Fernandez, J. Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Res.* 1233, 137–145, 2008.
- Gomes, V. D. C. et al. The Carioca high and low conditioned freezing lines : a new animal model of generalized anxiety disorder. *Anxiety Disord.* 1, 2011.
- Gomes, V. C. et al. Behavioral evaluation of eight rat lines selected for high and low anxiety-related responses. *Behav. Brain Res.* 257, 39–48, 2013).
- Gomes, V. et al. Behavioral evaluation of eight rat lines selected for high and low anxiety-related responses. *Behav. Brain Res.* 257, 39–48, 2013.

- Gomes, V. e Landeira-Fernandez, J. Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Res.* 1233, 137–145, 2008.
- Gomes, V.C. et al. The carioca high and low conditioned freezing lines: a new animal model of generalized anxiety disorder. *Anxiety Disord.* 1, 121–134, 2011.
- Goulart, V. G. et al. Differential expression of glutamatergic receptor subunits in the hippocampus in carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Mol. Cell. Neurosci.* 116, 103666, 2021.
- Gregorio, D. et al. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain.* vol. 160, 2019.
- Gregorio, D. et al. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain.* 160, 136–150, 2019.
- Groth, R. e Aanonsen, L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia. *Pain*, vol. 100, no. 1-2, pp. 171–181, 2002.
- Guimarães, F. S. et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl).* 100, 558–559, 1990.
- Gunthorpe, M. J. e Chizh, B. A. Clinical development of TRPV1 antagonists : targeting a pivotal point in the pain pathway. 14, 2009.
- Gureje, O. Comorbidity of pain and anxiety disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 10, 318–322, 2008.
- Ha, S. et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. *Neuroscience*, 107, 2, 301–309, 2001.
- Hassan, W. et al. Association between oxidative stress and contextual fear conditioning in Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Res.* 1512, 60–67, 2013.
- Hayakawa, K. et al. Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol via CB1 receptor-dependent mechanism. *Brain Res.* 1188, 157–164, 2008.
- Huckleberry, K. A. et al. Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice. *Learn. Mem.* 23, 703–709, 2016.
- Hudson, L. J. et al. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. 13, 2001.
- Iffland, K.; Grotenhermen, F. An update on safety and side effects of cannabidiol: A review of clinical data and relevant animal studies. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2, 139–154, 2017.
- Indovina, I. et al. Fear-conditioning mechanisms associated with trait vulnerability to anxiety in humans. *Neuron*, 2011.
- Izídio, G. S. et al. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. *Genes Brain Behav.* 7, 412–419, 2005.

- Jacob A e Todd, A. Cannabidiol and cannabiol: constituents of cannabis sativa. *Nature*. vol. 145350, 1940.
- Jasmin, L. et al. Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid, in the rat. *J. Neurosci.* 1–27, 2019.
- Jasmin, L. et al. Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature*. 424, 316, 2019.
- Jochum, T. et al. Decreased sensitivity to thermal pain in rats bred for high anxiety-related behaviour is attenuated by citalopram or diazepam treatment. *Behav. Brain Res.* 183, 18–24, 2007.
- Julius, D. e Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *insight Rev. Artic. Mol.* 413, 203–210, 2001.
- Kim, J. J. et al. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav. Neurosci.* 107, 1093–1098, 1993.
- Koga, K. et al. Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. *Neuron* 85, 377–389, 2015.
- LaBuda, C. J. e Fuchs, P. N. A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp. Neurol.* 5–9, 2000.
- Lages, Y. V. et al. Behavioral effects of chronic stress in Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Stress.* 24, 602–611, 2021.
- Lages, Y. V. et al. Haloperidol and methylphenidate alter motor behavior and responses to conditioned fear of Carioca Low-conditioned Freezing rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 211, 173296, 2021.
- Landeira-Fernandez, J. et al. Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. *Behav. Neurosci.* 120, 873–879, 2006.
- Lang, P. J. et al. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal of affective disorders.* 61, 3, 137-59, 2000.
- Ledoux, J. e Daw, N. D. Surviving threats: neural circuit and computational implications of a new taxonomy of defensive behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 269–282, 2018.
- LeDoux, J. E. e Phillips, R. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274–285, 1992.
- LeDoux, J. E. Rethinking the emotional brain. *Neuron*, 73, 653–676, 2012.
- Leite-Almeida, H. et al. Animal models for the study of comorbid pain and psychiatric disorders. *Mod. Trends Pharmacopsychiatry* 30, 1–21, 2015.
- Leite-Almeida, H. et al. Animal models for the study of comorbid pain and psychiatric disorders. *Mod. Trends Pharm.* 30, 1–21, 2015.
- León, L. A. et al. Distinct patterns of brain Fos expression in Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *PLoS One.* 15, 2020.

- Lewinter, R. D. et al. A Capsaicin Receptor Homolog, in the Spinal Cord of the Rat. *J. Comp. Neurol.* 408, 400–408, 2004.
- Lieu, T. et al. Neurotrophin and GDNF family ligand receptor expression in vagal sensory nerve subtypes innervating the adult guinea pig respiratory tract. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 300, 790–799, 2011.
- Loeser, J. D. e Treede, R. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *137*, 473–477, 2008.
- Ma, Q. Vanilloid receptor homologue, VRL1, is expressed by both A- and C- fiber sensory neurons. *Somatosens. Syst. Pain.* 12, 3693–3695, 2001.
- Maccarrone, M. et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in pharmacological sciences.* 36, 5, 277-96, 2005.
- Macêdo-Souza, C. et al. Cued fear conditioning in carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 285, 2020.
- Magri, L. V. et al. Follow-up results of a randomized clinical trial for low-level laser therapy in painful TMD of muscular origins. *Cranio - J. Craniomandib. Pract.* 00, 1–8, 2019.
- Magri, L.V.; Bataglion, C.; Leite-Panissi, C.R.A. Follow-up results of a randomized clinical trial for low-level laser therapy in painful TMD of muscular origins. *Cranio J. Craniomandib. Pract.* 39, 502–509, 2021.
- Magri, L.V. et al. Effectiveness of low-level laser therapy on pain intensity, pressure pain threshold, and SF-MPQ indexes of women with myofascial pain. *Lasers Med. Sci.* 32, 419–428, 2017.
- Magri, L.V. et al. Non-specific effects and clusters of women with painful TMD responders and non-responders to LLLT: Double-blind randomized clinical trial. *Lasers Med. Sci.* 33, 385–392, 2018.
- Malvestio, R. B. et al. Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT1A and CB1 receptors. *Brain Res. Bull.* 174, 323–338, 2021.
- Malvestio, R.B. et al. Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT1A and CB1 receptors. *Brain Res. Bull.* 174, 323–338, 2021.
- Mannion, M. et al. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96, 16, 9385–9390, 1999.
- Martinov, T., et al. Measuring changes in tactile sensitivity in the hind paw of mice using an electronic von Frey apparatus. *J. Vis. Exp.* 1–6, 2013.
- Matsuda, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 343, 515–520, 1990.
- McCarberg, B. & Peppin, J. Pain pathways and nervous system plasticity: learning and memory in pain. *Pain Med.* 0, 1–17, 2019.

- Mechoulam, R. e Hanuš, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem. Phys. Lipids* 108, 1–13, 2000.
- Mechoulam, R. e Shvo, Y. Hashish-I the structure of cannabidiol. *Tetrahedron*. 19, 2073–2078, 1963.
- Melchior, M.O. et al. Clusters according to anxiety phenotypes impact on pain perception and muscular fatigue in temporomandibular disorders. *Int. J. Oral Dent. Health*. 5, 083, 2019.
- Merskey, H. e Bogduk, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 3, S1-226. *Pain*. 1986.
- Messing, R. B. et al. Facilitation of hot-plate response learning by pre- and posttraining naltrexone administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 81, 33–36, 1983.
- Mezey, É. Et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science (80)*. 290, 1–4 (2000).
- Millan, M. J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474, 2002.
- Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1999.
- Miletic, G. e Miletic, V., Increases in the concentration of brain derived neurotrophic factor in the lumbar spinal dorsal horn are associated with pain behavior following chronic constriction injury in rats. *Neuroscience Letters*. vol. 319, 3, pp. 137–140, 2002.
- Mills, E. P. et al. Brainstem pain-control circuitry connectivity in chronic neuropathic Pain. *J. Neurosci.* 38, 465–473, 2017.
- Monti, J. M. Hypnoticlike effects of cannabidiol in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 55, 263–265, 2004.
- Nahman-Averbuch, H. et al. The relationships between parasympathetic function and pain perception: the role of anxiety. *Pain Pract.* 2016, 16, 1064–1072.
- Noreen, N. et al. Is cannabidiol a promising substance for new drug development? A review of its potential therapeutic applications. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 28, 73–86, 2018.
- Noreen, N. et al. Is cannabidiol a promising substance for new drug development? A review of its potential therapeutic applications. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2018, 28, 73–86.
- Nugraha, B. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11 : functioning properties of chronic pain. *Pain* 160, 88–94, 2019.
- Onefile, A. The neurobiology of pain perception in normal and persistent pain Bradford W Fenton, Elim Shih and Jessica Zolton. 4, 1–26, 2017.
- Pedrazzi, J. F. C. et al. Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. *Psychopharmacology*. 232, 3057–3065, 2015.
- Phelps, E. A. e LeDoux, J. E. Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. *Neuron*. 48, 175–187, 2005.

- Pickens, J. T. Sedative activity of cannabis in relation to its Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol content. *Br. J. Pharmacol.* 72, 649–656, 2012.
- Pineda, J. et al. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: Involvement of a nonselective cationic channel. *J. Neurosci.* 16, 1389–1399, 1996.
- Ploghaus, A. et al. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J. Neurosci.* 21, 9896–903, 2001.
- Premoli, M. et al. Cannabidiol: recent advances and new insights for neuropsychiatric disorders treatment. *Life Sci.* 2019.
- Premoli, M. et al. Cannabidiol: Recent advances and new insights for neuropsychiatric disorders treatment. *Life Sci.* 2019, 1, 120–127.
- Prut, L. e Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33, 2003.
- Rahi, V. e Kumar, P. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Int. J. Dev. Neurosci.* 81, 107–124, 2021.
- Rainville, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1–10, 2002.
- Raja, S.N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain.* 161, 9, 1976–1982, 2020.
- Revest, J. et al. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol. Psychiatry.* 14, 959–967, 2009.
- Rex, A. et al. Strain Differences in Fear-Motivated Behavior of Rats. 54, 107–111, 1996.
- Riaz, S. et al. Ventral, but not dorsal, hippocampus inactivation impairs reward memory expression and retrieval in contexts defined by proximal cues. *Hippocampus.* 27, 822–836, 2017.
- Rice, A. S. C., et al. Pain and the global burden of disease. *Pain.* 157, 791–796, 2016.
- Roeska, K. et al. Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. *Neurosci. Lett.* 464, 160–164, 2009.
- Roeska, K. et al. Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. *Pain* 139, 349–357, 2009.
- Roeska, K. et al. Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. *Neurosci. Lett.* 464, 160–164, 2009.
- Sales, A. J., et al. Antidepressant-like effect induced by cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 86, 255–261, 2018.
- Sanders, M. J. et al. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 217–223, 2003.

- Shu, X. et al. Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study. *Pain*. 80, 3, 463–470, 1999.
- Silva-Cardoso, G. K. et al. Cannabidiol modulates chronic neuropathic pain aversion behavior by attenuation of neuroinflammation markers and neuronal activity in the corticolimbic circuit in male wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 452, 114588, 2023.
- Silva-Cardoso, G. et al. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. *Neuropharmacology*. 197, 108712, 2021.
- Simons, L. et al. The human amygdala and pain: evidence from neuroimaging. *Hum. Brain Mapp*. 35, 527–538, 2014.
- Singer, T. et al. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science*. 1157, 2004.
- Steingrimsdóttir, Ó. A. et al. Defining chronic pain in epidemiological studies. *Pain*. 2092–2107, 158, 2017.
- Stern, C. A. J. et al. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. *Neuropharmacology* 125, 220–230, 2017.
- Straub, R. H. Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. 16, 2014.
- Tatem, K. S. et al. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J. Vis. Exp.* 29, e51785, 2014.
- Taylor, B. K. e Westlund, K. N. The noradrenergic locus coeruleus as a chronic pain generator. *J. Neurosci. Res.* 95, 1336–1346, 2017.
- Trullas, R. e Skolnick, P. Psychopharmacology differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. 323–331, 1993.
- Turner, C. et al. Constituents of *Cassia sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *J. Nat. Prod.*, 1980.
- Tyrer, P. e Baldwin, D. Generalised anxiety disorder. *Lancet* . 368, 2156–2166, 2006.
- Tyrtysnaia, A. e Manzhulo, I. Neuropathic pain causes memory deficits and dendrite tree morphology changes in mouse hippocampus. *J. Pain Res.* 13, 345–354, 2020.
- Uhelski, M.L. et al. Modulation of pain by endocannabinoids in the periphery. In *Recent Advances in Cannabinoid Research*; IntechOpen: London, UK. 101–118, 2018.
- Vaccarino, A. L. et al. Analgesia produced by normal doses of opioid antagonists alone and in combination with morphine. *Pain*. 35, 103–109, 1989.
- Varvel, S. A. et al. Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 186, 226–234, 2006.

- Vogt, B. A. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 533–544, 2005.
- Walsh, R. N. e Cummins, R. A. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull.* 482–504, 1976.
- Weisenberg, M. et al. Relevant and irrelevant anxiety in the reaction to pain. *Pain.* 20, 371–383, 1984.
- Wiech, K. et al. Neurocognitive aspects of pain perception. *Trends Cogn. Sci.* 12, 306–313, 2008.
- Willner, P. e Mitchell, P. J. The validity of animal models of depression. *Behav. Pharmacol.* 13, 169–188, 2002.
- World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. World Health Organization. 2017. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610> (disponível em 10 maio de 2023).
- Wu, L. J. et al. Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus. *Neurochem Res.* 33, 1925–1932, 2008.
- Yajima, T. et al. Direct evidence for the involvement of brain-derived neurotrophic factor in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *Journal of Neurochemistry.* 93, 3, 584–594, 2005.
- Yajima, Y. et al. Involvement of a spinal brain-derived neurotrophic factor/full-length TrkB pathway in the development of nerve injury-induced thermal hyperalgesia in mice. *Brain Research.* 958, 2, 338–346, 2002.
- Yen, Y. C. et al. Co-segregation of hyperactivity, active coping styles, and cognitive dysfunction in mice selectively bred for low levels of anxiety. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 1–19, 2013.
- Yen, Y. C. et al. Co-segregation of hyperactivity, active coping styles, and cognitive dysfunction in mice selectively bred for low levels of anxiety. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 103, 2013.
- Yerkes, R. M. e Dodson, J. D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J. Comp. Neurol. Psychol.* 18, 459–482, 1908.
- Young, B. J. et al. Correlates of hippocampal complex-spike cell activity in rats performing a nonspatial radial maze task. *J. Neurosci.* 14, 6553–63, 1994.
- Zheng, J. et al. Hippocampal neurogenesis: does it relieve or worsen chronic pain? *Pain.* 157, 506–507, 2016.
- Zuardi, A. W. et al. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl).* 104, 260-264, 1991.

8. APOIO FINANCEIRO

Este projeto foi apoiado financeiramente pela CAPES-PROEX (Código 001, CAPES PrInt-PDSE) e FAPESP processo 2019/22120-4, 2021/12500-4 e 2022/05471-0.

ANEXO



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais
Campus de Ribeirão Preto

AUTORIZAÇÃO

O projeto intitulado "Tratamento sistêmico com canabidiol em ratos nas linhagens Cariocas de alto e baixo congelamento no modelo de dor crônica: avaliação da sensibilidade dolorosa, do componente efetivo da dor, da ansiedade e sua expressão de BDNF", protocolo no. 2019.1.833.59.2, sob responsabilidade da profa. Christie Ramos A. Leite Panissi e com participação de Carolina Macêdo de Souza e colaboração de Gleice Kelli R. da Silva Cardoso, foi avaliado segundo os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Foi aprovado por mim hoje e será referendado na próxima da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (CEUA-FFCLRP).

O relatório final da pesquisa (modelo disponível na página da CEUA-FFCLRP) deverá ser encaminhado à CEUA, para apreciação e emissão de certificado de conduta ética, em até 30 dias após o término da vigência do projeto.

Vigência do Projeto	13/09/2019 a 30/03/2023
Espécie/linhagem	rato wistar
Nº de animais	240
Idade/peso	9 a 10 semanas
Sexo	macho
Origem	Laboratório de Neurociência do Comportamento - LANE/C/PUC-RIO

Profª Patrícia Ferreira Monticelli
Coordenadora da CEUA FFCLRP-USP

Ribeirão Preto, 13 de setembro de 2019