

2023

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PSICOBIOLOGIA

**Tratamento com canabidiol em modelo de inflamação persistente em camundongos: Avaliação dos componentes quantitativos e qualitativos da dor**

Leonardo Abdelnur Petrilli

Dissertação



Leonardo Abdelnur Petrilli

Tratamento com canabidiol em modelo de inflamação persistente em camundongos:  
Avaliação dos componentes quantitativos e qualitativos da dor.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como  
parte das exigências para a obtenção do título Mestre  
em Ciências: Psicobiologia

Área: Psicobiologia

Orientador: Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Ribeirão Preto – SP

2023

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

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Petrilli, L.A.

Tratamento com canabidiol em modelo de inflamação persistente em camundongos: Avaliação dos componentes quantitativos e qualitativos da dor. 75p.; 30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Psicobiologia.

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

1. Sensibilidade dolorosa 2. Canabidiol 3. Dor inflamatória 4. Receptores de glicina 5. Neurotransmissão Endocanabinóide 6. Neurotransmissão glicinérgica

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Valeria e Vicente, a minha irmã Rafaela e a minha Avó Marilice por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando ao longo de toda a minha trajetória profissional, me dando suporte, amor, conhecimento e oportunidade de seguir sempre adiante. Amo vocês incondicionalmente, obrigado por serem quem são.

À minha namorada Gabriely, por todo o companheirismo, incentivo e suporte dados nesses anos. Você é incrível, muito obrigado por tudo!

À minha orientadora Profa. Dra. Christie, por ter acreditado no meu projeto, me recebendo de braços extremamente abertos e me dando a oportunidade de ir além nas neurociências. Muitíssimo obrigado pelos ensinamentos, confiança e por ter tornado este projeto possível.

À técnica do laboratório Aline, pelo imensurável suporte durante todo o meu mestrado. Seus ensinamentos e orientações foram extremamente importantes para a conclusão deste projeto, sou eternamente grato.

A todos os meus amigos do LANEDOC, que sempre foram fundamentais para me ajudar quando necessário e para tornar os dias mais tranquilos. Um abraço mais do que especial para o Vitor, Rafa, Carol, Iago, Nadine e Patrícia, muito obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. Norberto Coimbra, pela atenção, disponibilidade e extrema cordialidade em fornecer a Picrotoxina para a execução dos experimentos.

À todos os funcionários que trabalham com a limpeza do departamento. A pesquisa só é possível graças a dedicação de vocês em tornar o nosso espaço limpo, vocês fazem parte disso!

Aos animais que foram utilizados neste projeto. Infelizmente hoje em dia o avanço científico necessita de vocês, mas espero muito em breve ver um mundo no qual a ciência irá avançar nas mesmas proporções sem o uso de animais.

A todos as pessoas que direta ou indiretamente fizeram destes anos um período extremamente rico em aprendizados, no qual pude me desenvolver bastante e me tornar um profissional muito mais completo.

## EPÍGRAFE

*“Eu não quero acreditar, eu quero conhecer.”*

*Carl Sagan*

## SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	9
Introdução.....	15
Sensibilidade Dolorosa.....	15
Amígdala.....	18
Glirs e neurotransmissão da Glicina.....	20
CBD e neurotransmissão endocanabinóide.....	22
Objetivos.....	26
Materiais e Métodos.....	27
Animais e condições experimentais.....	27
Indução da inflamação persistente por CFA.....	27
Grupos experimentais e tratamento farmacológico.....	28
Testes nociceptivos.....	30
Sensibilidade mecânica.....	31
Sensibilidade térmica ao frio.....	32
Sensibilidade térmica ao calor.....	33
Paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP).....	34
Teste do campo aberto.....	35
Delineamento experimental.....	36
Experimento 1.....	36
Experimento 2.....	37
Eutanásia.....	37
Dissecação da amígdala.....	38
Análise de Western Blotting.....	38
Análise dos resultados.....	39
Resultados.....	39
<b>Experimento 1</b> .....	40
<b>Experimento 2</b> .....	45
Discussão.....	53
Conclusão.....	60
Referências.....	61
Anexo I.....	75

**Titulo:** Tratamento com canabidiol em modelo de inflamação persistente em camundongos: Avaliação dos componentes quantitativos e qualitativos da dor.

Petrilli, L.A.; Leite-Panissi, C.R.A.

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

### **Resumo**

A dor é descrita como sendo um processo de difícil compreensão e definição, em função de apresentar caráter emocional, subjetivo e multidimensional, tornando sua percepção única para cada indivíduo. A percepção da dor e o processamento da informação resultante do estímulo doloroso pode ser especificado em dor aguda ou crônica, sendo a dor crônica caracterizada de acordo com a sua origem, podendo ser nociceptiva, neuropática ou inflamatória. Pesquisas a respeito da dor podem ser realizadas por meio de modelos animais, em que se observam alterações fisiológicas e comportamentais em função de protocolos de indução de dor e possíveis mecanismos e intervenções farmacológicas. Este estudo avaliou o efeito do tratamento com canabidiol (CBD) e dos receptores de glicina em modelo de dor inflamatória induzida pela injeção do Adjuvante Completo de Freund (CFA). 124 animais machos (C57/BL6, 25-30g, CEUA 21.1.720.59.6) foram submetidos ao modelo de dor inflamatória persistente por meio da administração intraplantar de CFA ou não (administração solução salina estéril). No experimento 1, a sensibilidade mecânica (teste de von Frey) e térmica (teste da placa quente e acetona) foram avaliadas no período basal (antes da inflamação) e no 3º, 7º e 10º dia do protocolo. Já no experimento 2, a sensibilidade mecânica foi avaliada no período basal, no 3º, 7º e 10º dia do protocolo e a aversividade a dor (PEAP) e a atividade motora e o comportamento emocional (Campo Aberto) foram avaliadas no 10º dia do protocolo. Diferentes grupos experimentais foram tratados com CBD (3 mg/kg, i.p.) ou veículo, a partir do 8º dia experimental, durante o período de 3 dias e Picrotoxina (PTX) ou veículo 10 minutos antes da última administração de CBD no 10º dia do protocolo. Ao término dos experimentos, foi realizada a eutanásia para obtenção do encéfalo, e realização posterior da expressão proteica por técnica de western blotting (WB) de receptores para glicina. As análises dos resultados foram feitas por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas (testes nociceptivos) seguida do teste de Bonferroni, com  $P < 0,05$ . No experimento 1, a análise de variância (ANOVA) de dois fatores (tempo e tratamento), seguido pelo pós-teste de Bonferroni revelou que o tratamento subcrônico com CBD (3mg/kg) reverteu parcialmente a alodinia mecânica por conta do aumento do limiar mecânico avaliado no teste de Von-Frey e totalmente a alodinia térmica ao frio e a hiperalgesia térmica ao calor, por conta da redução do score observado no teste da Acetona e do aumento do tempo na placa quente respectivamente. No experimento 2, a análise de variância (ANOVA) de um fator

(tratamento), seguido pelo pós-teste de Bonferroni revelou que o tratamento subcrônico com CBD (3mg/kg) reverteu a aversividade a dor avaliada pelo PEAP e a redução da porcentagem de tempo no centro (induzida pela inflamação persistente) avaliada pelo teste do Campo Aberto. O ensaio de Western Blotting não indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando a expressão dos receptores glicinérgicos. Assim, nossos resultados sugerem que o CBD modulou a dor inflamatória independente da neurotransmissão glicinérgica, uma vez que a antagonização dos receptores de glicina pela PTX não evitou os efeitos do CBD, além de não ocorrer alteração da expressão destes receptores nos diferentes grupos experimentais, indicando possível interação com outras vias.

**Palavras-chave:** Canabidiol, comportamento emocional, dor inflamatória, glicina.



**Title:** Cannabidiol treatment in a model of persistent inflammation in mice: Evaluation of quantitative and qualitative components of pain.

Petrilli, L.A.; Leite-Panissi, C.R.A.

**Principal institution:** School of Philosophy, Science and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

### **Abstract**

Pain is often described as a complex and challenging phenomenon to comprehend and define due to its emotional, subjective, and multidimensional nature, making its perception unique for each individual. Pain perception and information processing resulting from painful stimuli can be categorized as acute or chronic pain, with chronic pain characterized by its origin, which can be nociceptive, neuropathic, or inflammatory. Pain research can be conducted using animal models, in which physiological and behavioral changes are observed due to pain induction protocols and potential pharmacological mechanisms and interventions. This study aims to assess the impact of cannabidiol (CBD) treatment and glycine receptors in an inflammatory pain model induced by the injection of Complete Freund's Adjuvant (CFA). 124 male animals (C57/BL6, 25-30g, CEUA 21.1.720.59.6) underwent the model of persistent inflammatory pain through intraplantar administration of CFA or sterile saline solution. In experiment 1, mechanical (von Frey test) and thermal (hot plate and acetone tests) sensitivities were evaluated at baseline (before surgery) and on the 3rd, 7th, and 10th days of the protocol. In experiment 2, mechanical sensitivity was assessed at baseline and on the 3rd, 7th, and 10th days of the protocol, while pain aversion (PEAP) and motor mobility (Open Field) were assessed on the 10th day of the protocol. Different experimental groups were treated with CBD (3 mg/kg, i.p.) or vehicle from the 8th experimental day for a period of 3 days, and Picrotoxin (PTX) or vehicle 10 minutes before the last CBD administration on the 10th day of the protocol. At the end of the experiments, euthanasia was performed to obtain brain tissue, followed by the assessment of protein expression of glycine receptors using the western blotting technique. Data were analyzed using a two-way repeated measures ANOVA (nociceptive tests) followed by Bonferroni's post-test, with  $P < 0.05$ . In experiment 1, a two-way analysis of variance (ANOVA) (time and treatment), followed by Bonferroni's post-test, revealed that sub-chronic CBD treatment (3 mg/kg) partially reversed mechanical allodynia by increasing the mechanical threshold assessed in the von Frey test and completely reversed cold thermal allodynia and heat thermal hyperalgesia, as indicated by the reduced score observed in the Acetone test and increased time on the hot plate, respectively. In experiment 2, one-way analysis of variance (ANOVA) for treatment, followed by Bonferroni post-test, revealed that sub-chronic treatment with CBD (3mg/kg) reversed aversiveness to pain assessed by PEAP

and the percentage of time in the center assessed by the Open Field test. The Western Blotting assay did not indicate statistically significant differences among the groups. Therefore, our results suggest that CBD did not modulate inflammatory pain through glycinergic neurotransmission, as antagonizing glycine receptors with PTX did not prevent the effects of CBD, and due to the lack of difference among CBD-treated groups in the WB, indicating a potential interaction with other pathways.

**Keywords:** Cannabidiol, emotional behavior, inflammatory pain, Inflammation, glycine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema simplificado demonstrando as vias ascendente e descendente da dor .....	18
<b>Figura 2</b> – Esquema representando a distribuição dos receptores canabinóides CB1 e CB2 e das suas respectivas funções fisiológicas no organismo.....	24
<b>Figura 3</b> – Distribuição dos grupos experimentais do Experimento 1.....	28
<b>Figura 4</b> – Distribuição dos grupos experimentais do experimento 2.....	29
<b>Figura 5</b> - Esquema da realização do teste para avaliação da sensibilidade mecânica, teste de von Frey eletrônico.....	31
<b>Figura 6</b> - Esquema da realização do teste para avaliação da sensibilidade térmica, teste de acetona.....	32
<b>Figura 7</b> – Esquema da realização do teste para avaliação da sensibilidade térmica, teste da placa quente.....	33
<b>Figura 8</b> – Esquema da realização do teste para avaliação da aversão a dor, teste do PEAP .....	34
<b>Figura 9</b> – Esquema da realização do teste para avaliação da mobilidade motora, teste do campo aberto.....	35
<b>Figura 10</b> - Delineamento experimental do Experimento 1.....	36
<b>Figura 11</b> – Delineamento experimental do Experimento 2.....	37
<b>Figura 12</b> - Aparato utilizado para a corrida do gel no teste de western blotting.....	38
<b>Figura 13</b> - Avaliação da sensibilidade mecânica pelo teste de von Frey.....	40
<b>Figura 14</b> - Avaliação da sensibilidade ao calor pelo teste da placa quente.....	42
<b>Figura 15</b> – Avaliação da sensibilidade ao frio pelo teste da acetona.....	44
<b>Figura 16</b> - Inflamação periférica persistente e efeito do tratamento subcrônico com canabidiol (CBD).....	47
<b>Figura 17:</b> Avaliação qualitativa da dor inflamatória persistente.....	49

<b>Figura 18:</b> Avaliação da atividade locomotora e do comportamento emocional no teste do campo aberto.....	51
<b>Figura 19:</b> Análise da expressão de receptores p-GLR1 na região da amígdala de camundongos (Experimento 1) .....	52
<b>Figura 20:</b> Análise da expressão de receptores p-GLR1 na região da amígdala de camundongos (Experimento 2) .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos grupos experimentais do Experimento 1.....	29
<b>Tabela 2</b> - Distribuição dos grupos experimentais do Experimento 2.....	30
<b>Tabela 3</b> - Média $\pm$ EPM do limiar de retirada de pata (g) no teste de Von Frey.....	41
<b>Tabela 4</b> - Média $\pm$ EPM do tempo de retirada de pata (s) no teste da Placa Quente.....	43
<b>Tabela 5</b> - Média $\pm$ EPM do score de resposta reflexa a alodinia térmica ao frio avaliado no teste da Acetona.....	45
<b>Tabela 6:</b> Média $\pm$ Erro padrão da média do limiar de retirada de pata (g) no teste de von Frey.....	48
<b>Tabela 7</b> - Média $\pm$ EPM da porcentagem de tempo no ambiente claro avaliado no teste do Paradigma de Fuga e Esquiva ao Local (PEAP).....	49
<b>Tabela 8</b> - Média $\pm$ EPM do valor das variáveis avaliadas no teste do Campo aberto.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**2AG** – 2 araquidonil-glicerol

**AeA** - Anandamida

**ANOVA** – Análise de variância

**BLA** – Núcleo basolateral da amígdala

**CA** – Campo Aberto

**CBD** - Canabidiol

**CB1** – Receptor canabinóide do tipo 1

**CB2** – Receptor canabinóide do tipo 2

**CFA** – Adjuvante Completo de Freund

**CeA** – Núcleo central da amígdala

**GIIR** – Receptor de glicina

**I.P.** – Intra peritoneal

**MG/KG** – Miligrama/quilogramas

**p-GLIR1** – Proteína para a subunidade  $\alpha 1$  dos receptores de glicina

**PEAP** – Paradigma de fuga e esquivas ao local

**PQ** – Placa quente

**PTX** - Picrotoxina

**SAL** - Salina

**SNC** – Sistema nervoso central

**TN** – Teste nociceptivo

**THC** - delta-9-tetrahydrocannabinol

**VEI** - Veículo

**VF** – von-Frey

**WB** – Western Blotting

## **1. Introdução**

### **1.1. Sensibilidade dolorosa**

Achados na literatura descrevem a dor como sendo um processo de difícil compreensão e definição, principalmente em função de seu caráter emocional, subjetivo e multidimensional (Basbaum e Fields, 1984; Ploghaus et al., 2003; Mogil, 2015), tornando a sua percepção única para cada indivíduo (Wall, et al., 1991). Em função de apresentar caráter multidimensional, inúmeros componentes cognitivos, sensoriais, emocionais e perceptivos são ativados para localizar e reconhecer os estímulos dolorosos (Basbaum e Fields, 1984; Ploghaus et al., 2003). A partir da identificação do estímulo, é desencadeado uma série de funções de alerta ao indivíduo, buscando a autopreservação através de respostas defensivas de acordo com a situação nociva, caracterizando o alto valor adaptativo deste processo (Basbaum e Fields, 1984; Melzack et al., 1999; Ploghaus et al., 2003). Segundo Luna (2006), a dor, juntamente com a função cardiorrespiratória e térmica do nosso organismo, pode ser considerada o quinto sinal vital.

A capacidade de compreender e de processar um estímulo doloroso é resultante de uma série de elementos perceptíveis, sensoriais e afetivo-emocionais (Ploghaus et al., 2003). Investigações a respeito da dor indicam que a mesma possui singularidades e características ligadas a experiência da dor, nos quais podem ser demonstrados os componentes sensorial-discriminativo e afetivo-motivacional. Segundo Basbaum et al. (2009), a capacidade em localizar a origem, a escala temporal e a intensidade dos danos reais ou iminentes ao tecido estão associados ao componente sensorial-discriminativo, ao passo em que as consequências da experiência da dor em emoções e respostas comportamentais, como a reação de luta ou fuga, estão relacionados com o componente afetivo-motivacional.

A percepção da dor e o processamento da informação resultante do estímulo doloroso pode ser especificado em dor fisiológica ou patológica (Fantoni e Mastrocinque, 2002; Almeida et al., 2006). A dor fisiológica ou dor aguda é explicada como sendo uma resposta protetora do organismo, buscando alertar o indivíduo para um estímulo nocivo que represente uma lesão real ou que esteja prestes a acontecer nos tecidos, resultando em respostas autonômicas e/ou comportamentais específicas (Woolf e Mannion, 1999). Este comportamento protetor do organismo traz benefícios ao indivíduo, uma vez que busca preservar a sobrevivência e, conseqüentemente, possui alto valor adaptativo (Basbaum et al., 2009). Todavia, a medida em que a dor permanece ou se repete de forma persistente, a mesma pode resultar em um estado de depressão equivalente ao desencadeado por estímulos estressantes inevitáveis, não desempenhando mais vantagem biológica, e sendo classificada como dor patológica

ou crônica, na qual é resultante de impulsos de pequena magnitude produzidos por atividade neural anormal (Woolf e Mannion, 1999; Melzack et al., 1999; Vanderah, 2007).

A dor crônica pode ser caracterizada de acordo com sua origem, podendo ser nociceptiva, neuropática ou inflamatória. A primeira, é originada através da ativação de terminações nervosas livres de fibras de neurônios ganglionares espinais ou dos gânglios trigeminais e nodoso, denominados nociceptores. Após a ativação dos nociceptores, o estímulo nocivo encaminha-se ao corno dorsal da medula espinal ou ao núcleo espinal do trigêmeo, por meio de sinapses, resultando na ativação do neurônio secundário e conseqüentemente conduzindo o estímulo a outras regiões do sistema nervoso central (SNC) (Julius e Basbaum, 2001; Schaible e Richter, 2004). Em contrapartida, a dor neuropática é procedente de lesões neurais, podendo acometer regiões periféricas como os nervos ou regiões centrais do sistema nervoso (FANTONI e Mastrocinque, 2002; Almeida et al., 2006), enquanto a dor inflamatória resulta em processo de hiperalgesia com envolvimento de mediadores inflamatórios (Mamet et al., 2003).

No caso da dor inflamatória, este processo inicia-se como uma resposta do tecido a injúria celular mediante qualquer agente lesivo, como agentes físicos (queimadura, radiação, trauma), biológicos (microrganismos, reações imunológicas) ou químicos (substância caustica) e se caracteriza como um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, envolvendo uma cascata de eventos bioquímicos e celulares, como extravasamento de fluidos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (Becker, 1983; Piper, 1983).

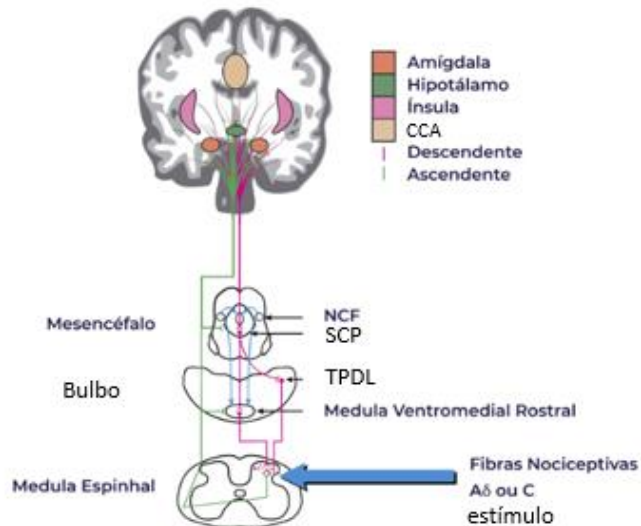
Diante do contexto lesivo, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares são recrutados pelo sítio de lesão celular, agindo no desenvolvimento do processo inflamatório, mediante liberação de fatores solúveis de regulação da fase aguda denominadas citocinas, sendo as principais a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Akira et al., 1990). Ainda, os macrófagos e leucócitos liberam uma série de substâncias oxidantes e enzimáticas, induzindo ao estresse oxidativo, e gerando subprodutos como espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio que começam a ser produzidas em demasia. Estes fatores induzem a liberação de fatores transcricionais como o NF- $\kappa$ B, dímero Fos-jun e AP-1, assim como rompimento de mitocôndrias, peroxidação e destruição de membranas e dano no DNA, resultando na estimulação de produtos gênicos capazes de codificar enzimas que eliminam radicais livres, reparam tecidos, produzem citocinas, receptores de superfície celular, fatores de crescimento e de outros mediadores inflamatórios (Dray, 1995; Coob et al., 1996). Com isso, após a liberação dos mediadores inflamatórios, ocorre uma alteração na forma com que o estímulo nociceptivo é traduzido periféricamente,



umentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores de limiar elevado, e consequentemente, reduzindo o limiar de percepção do estímulo doloroso, resultando em uma resposta potencializada a estímulos nociceptivos supra limiares (hiperalgesia) e dor espontânea (alodinia) (Bonica et al., 1990; Meyer et al., 1994).

Consequente, a informação resultante do estímulo doloroso é encaminhada para regiões encefálicas por meio de vias ascendentes de comunicação (Figura 1), dentre as quais podemos destacar: trato espinotalâmico, trato espinoparabrâquial, trato espinohipotálâmico, trato espinorreticular e espinomesencefálico (MILLAN, 1999). Além disso, destacam-se estruturas corticais pertencentes a essas vias, como córtex somatossensorial, córtex cingulado anterior, córtex pré-frontal, tálamo e insula, e estruturas subcorticais; amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e bulbo rostro-ventromedial (RVM), compondo as vias nociceptivas, e constituindo a matriz da dor (Neugenbauer et al., 2009; Bushnell et al., 2013)

A via espinotalâmica possui projeções que vão desde as lâminas I e V do corno dorsal da medula espinal até o tálamo e regiões corticais superiores por meio do trato espinotalâmico lateral. A via espinorreticular envia aferências à formação reticular do tronco encefálico, responsável em encaminhar as projeções ao tálamo. A via espinomesencefálica projeta aferências via trato espinotalâmico lateral até regiões como os núcleos da rafe e a SCP. A via trigeminal parte das terminações sensitivas faciais desde que o gânglio trigeminal possui projeções no segundo neurônio presente no núcleo espinal do trigêmeo, este responsável em distribuir projeções ao tálamo e outros centros de processamento da dor. Ainda, a via vagal parte das terminações sensoriais viscerais, passando pelo gânglio nodoso e realizando sinapse no núcleo do trato solitário, este responsável em emitir informações da dor visceral aos centros encefálicos de processamento da dor (Jessel e Basbaum, 2000; Brandão, 2005; Hanani, 2015; Gebhart e Bielefeldt, 2016).



**Figura 1:** Esquema simplificado demonstrando as vias ascendente e descendente da dor: Fonte: Modificada de *The Cerebral Signature for Pain Perception and its Modulation*, Irene Tracey e Patrick Mantyh, (2007). Abreviações: CCA: Córtex Cingulado Anterior; NCF: Núcleo Cuneiforme; SCP: Substância Cinzenta Periaquedutal; TPD: Tegumento Pontino Dorsolateral;

Assim, na medida em que o processamento da dor para regiões superiores do SNC ocorre pelas vias ascendentes, o caminho inverso é feito por vias descendentes modulatórias, podendo resultar na inibição ou facilitação da dor (Bolles e Fanselow, 1980; Vanderah, 2007). As vias descendentes constituem-se de ramificações da SCP para o tronco encefálico, em regiões como o RVM, que posteriormente enviam projeções para a medula espinhal e núcleo espinal do trigêmeo. Das vias descendentes de controle da dor participam diferentes neurotransmissores, entre eles serotonina, opióides endógenos, canabinóides e noradrenalina. Vias inibitórias tônicas do sistema de interneurônios GABAérgicos também podem modular as vias excitatórias que conduzem a ativação da inibição da dor (Urban e Gebhart, 1999; Vanegas e Schaible, 2004). Além disso, achados na literatura demonstram que a SCP também integra impulsos originados em regiões límbicas, indicando que comportamentos como a ansiedade, depressão e medo podem regular o processamento da dor, elucidando o seu aspecto emocional (D'mello e Dickenson, 2008). Ainda, o envolvimento de regiões límbicas, como a amígdala, na modulação da dor e a relação de estados emocionais na sua percepção podem estar associados com a magnitude da inibição tônica da transmissão da dor pelas vias descendentes modulatórias (Mason e Gao, 1980).

## 1.2. Amígdala

Dentre as diversas regiões encefálicas que estão envolvidas na modulação da nocicepção, o complexo amigdalóide evidencia-se em função de receber vias

aferentes nociceptivas diretas do tronco encefálico e da medula espinal (Neugebauer et al., 2004), estando, assim, envolvida no processamento central da dor e modulando a interação entre dor e emoção (Heinricher e McGaraughty, 1999; Fields, 1999; Rhudy e Meagher, 2000). Além disso, estudos comportamentais, bioquímicos e eletrofisiológicos demonstram o envolvimento da amígdala na modulação da nocicepção (Lariviere e Melzack, 2000; Ulrich-Lai et al., 2006; Ji e Neugebauer, 2007), e também no processamento de estímulos aversivos e nas respostas emocionais, como congelamento, luta ou fuga, por exemplo (Ledoux, 2000; Leite-Panissi et al., 2004; Tavares et al., 2018).

A amígdala é constituída de complexos grupos heterogêneos de núcleos e localiza-se bilateralmente ao lobo temporal anterior do encéfalo (Amaral; Basset, 1989; Amaral; Insausti, 1992). Segundo a classificação de Price et al. (1987), os núcleos que constituem a amígdala podem ser divididos em três grupos: 1) Grupo profundo ou basolateral (BLA), no qual fazem parte o núcleo lateral, o núcleo basal e o núcleo basal acessório; 2) Grupo cortical, no qual fazem parte os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral e; 3) Grupo centromedial, no qual fazem parte os núcleos medial e central (CeA). Ainda, a constituição celular tanto da BLA quanto da CeA difere-se principalmente na quantidade de neurônios inibitórios, uma vez que a BLA consiste principalmente de neurônios excitatórios e uma pequena parcela de projeções de interneurônios inibitórios, enquanto a CeA consiste, em sua maioria, de neurônios inibitórios, incluindo tanto interneurônios locais quanto projeções descendentes (Janak e Tye, 2015; Sah et al., 2003; Gilpin et al., 2015; Spampinato et al., 2011).

Os estímulos sensoriais chegam na amígdala em grande parte pelo núcleo lateral, enquanto as vias de saída pelo CeA. Ainda, a amígdala recebe fibras polimodais envolvidas com a cognição e a afetividade vindas do tálamo e de áreas corticais superiores (Shi e Davis, 1999; Ledoux, 2000). Além disso, a região da amígdala composta pelo núcleo lateral, BLA e CeA processa informações nociceptivas vindas do tálamo e do córtex insular através de extensões das vias espinohipotálâmica e espinotalâmica (Millan, 1999; Ledoux, 2000). Existem também aferências nociceptivas diretas vindas do tronco encefálico e medula espinal que adentram a parte latero-capsular do CeA (Neugebauer et al., 2004), aferências nociceptivas da via espinoparabrânquioamigdaloide (Gauriau e Bernard 2002) e aferências via projeções diretas da medula espinal (Neugebauer et al., 2004).

O complexo amigdalóide é composto de intensa presença de neurônios nociceptivos, caracterizando a modulação da nocicepção, e dessa forma, executando função essencial no controle inibitório descendente da dor (Neugebauer et al., 2004). Este controle pode ser observado após a estimulação nociceptiva da amígdala, na qual resultou em diversas alterações comportamentais, hormonais e

autônômicas, dentre elas a analgesia (Nunes-de-Souza et al., 2000; Baptista et al., 2009; Heinricher et al., 2009), demonstrando a importância desta estrutura na modulação neuroquímica da dor e das emoções (Sah et al., 2003; Heinricher et al., 2009). Outros estudos também sugerem que a amígdala pode modular o processo inflamatório e a dor inflamatória, uma vez que foi observado aumento da concentração de TNF- $\alpha$  na BLA durante a fase crônica da inflamação periférica (Chen et al., 2013).

Diante disso, destaca-se a presença de inúmeros neurotransmissores e receptores atuando na amígdala, na qual desempenham papéis importantes na modulação dos estados emocionais e nociceptivos (Davis, 1993; McGaugh, 2004). Dentre os neurotransmissores que atuam na mediação nociceptiva, a glicina destaca-se por ser um dos principais neurotransmissores inibitórios do SNC. Os neurotransmissores inibitórios exercem papel fundamental ao contrabalancear os neurotransmissores excitatórios através da hiperpolarização, resultando na inibição de seus alvos pós-sinápticos (Marin, 2012), e conseqüentemente, gerando alteração no fluxo com que a informação é encaminhada através das redes neuronais.

Os receptores para glicina (GliRs) são altamente expressos tanto em neurônios do BLA (Danover e Pape, 1998; Mccool e Botting, 2000; Mccool e Farroni, 2001) quanto em neurônios da CeA (Delaney e Sah, 1999). Diante disso, quando ocorre a administração de picrotoxina, um antagonista dos GliRs, é observado a potencialização de comportamentos ansiogênicos, de medo e de dor (Makarovsky et al., 2008), demonstrando o potencial terapêutico dos GliRs na amígdala para o tratamento de distúrbios emocionais e dolorosos. Outros estudos também demonstraram através da técnica de análise proteica Western Blotting a presença dos GliRs na amígdala, uma vez que todas as subunidades dos GliRs foram detectadas na membrana celular tanto do BLA quanto do CeA (Delaney et al., 2010).

### **1.3. GliRs e Neurotransmissão da Glicina**

A glicina é um aminoácido não essencial formado por uma molécula de carbono ligada a um grupo amina e um grupo carboxil, a qual é encontrada em quase todas as proteínas (Nelson, 2004). É um neurotransmissor inibitório do SNC, sendo que quando os seus receptores são ativados, ocorre a penetração do ânion cloreto nos neurônios via receptores ionotrópicos, resultando em potencial pós-sináptico inibitório (Wagner et al., 1992). Além disso, a glicina desempenha função essencial na modulação da nocicepção na medula espinal e nas estruturas supramedulares (Betz, 1991), inibindo a transmissão nociceptiva em áreas específicas do encéfalo, como a SCP e o núcleo talâmico, por exemplo (Betz, 1991; Pourcho et al., 1992; Lin et al., 1996; Sherman et al., 1997).

Modelos experimentais demonstraram que a glicina desempenha efeito anti-inflamatório (Hartog et al., 2007; Carmans et al., 2010; Stoffels et al., 2011), imunoprotetor e citoprotetor, no qual pode ser evidenciado através da diminuição de lesões renais e hepáticas causadas pelo uso de drogas (Li et al., 2001; Mikalauskas et al., 2011), prevenção de lesões por isquemia-reperfusão em diversos órgãos e prevenção de choques resultantes de hemorragias e endotoxinas (Rose et al., 1999; Jacob et al., 2003). Além disso, estudos *in situ*, utilizando a técnica da imunoistoquímica (Fujita et al., 1991; Palácios et al., 1991; Fujiwara et al., 1998), e estudos *in vivo* (Renno et al., 1992), indicaram que a glicina atua nas funções analgésicas na SCP. Assim, a glicina demonstra estar envolvida na modulação de diversas funções, incluindo regulação cardiovascular e comportamental (Berrino et al., 1993; Jurgens e Lu 1993; Carobrez et al., 2001).

Segundo Zhong et al. (2003), a atuação da glicina no organismo resulta na supressão da sinalização do cálcio, uma vez que ela ativa os canais de cloro da membrana plasmática, aumentando a condução do íon cloreto pelo seu receptor, estabilizando ou hiperpolarizando o potencial da membrana, acarretando no bloqueio da entrada de cálcio na célula e impedindo o estímulo que iria resultar na cascata de formação das citocinas, assim, levando a inibição de células envolvidas no processo inflamatório, possivelmente impedindo a ativação dos complexos proteicos NF-Kb, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Figueiredo et al., 2009). O bloqueio destes complexos proteicos foi evidenciado por Mauriz et al. (2001), no qual através de modelos animais de choque hemorrágico, demonstrou que a glicina inibe a produção de enzimas antioxidantes, como a TNF- $\alpha$ , elucidando os efeitos protetores da glicina na prevenção do estresse oxidativo.

Em relação a seus receptores, os mesmos possuem natureza pentamérica, constituído por quatro subunidades  $\alpha$  e uma  $\beta$ , sendo que estes receptores são competitivamente inibidos pela estricnina e picrotoxina e intensificados por baixas concentrações de zinco e etanol (Legendre, 2001). Entretanto, segundo alguns autores, grande parte da glicina liberada na SCP deve atuar nos receptores glutamatérgicos NMDA (Berrino et al., 1993; VIU et al., 1998). Assim, a atuação da glicina nos receptores NMDA resulta em efeitos importantes ao organismo, fazendo com que alguns autores descrevam a glicina como um co-agonista do receptor NMDA (Johnson e Ascher, 1987). Assim, GliRs sensíveis a estricnina ou picrotoxina, que são hiperpolarizantes da membrana neuronal, e quando ativados, resultam na inibição da despolarização causada pelo glutamato, reprimindo a condução neuronal que constituem parte das vias descendentes que controlam a dor (Min et al., 1996; Onaka et al., 1996).

Os GliRs fazem parte do grupo de canais iônicos Cys-Loop, no qual também pertencem os receptores de acetilcolina e os receptores serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> (Lynch,

2004), e são constituídos de 5 subunidades organizadas simetricamente em volta de um poro de condução iônico. Em roedores, os GliRs são constituídos de 4 subunidades diferentes, sendo elas  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3 e  $\beta$ , sendo cada uma sintetizada a partir de um gene distinto (Grenningloh et al., 1990). Os GliRs podem ser homomultímeros contendo apenas uma subunidade  $\alpha$  ou heteromultímeros contendo tanto uma subunidade  $\alpha$  quanto uma  $\beta$ , entretanto na maior parte dos casos a constituição é heteromultímera (Betz et al., 1991). Os GliRs estão amplamente distribuídos na espinha dorsal, retina, tronco encefálico, e em regiões encefálicas como a amígdala (Rajendra et al., 1997).

Evidências prévias sugerem que os GliRs são alvos importantes de canabinóides no SNC, sendo que inúmeros fitocanabinóides, endocanabinóides e canabinóides sintéticos demonstraram potencializar as correntes de glicina (IGli) em neurônios nativos isolados de regiões encefálicas como da área tegmental ventral, amígdala, hipocampo e da medula espinal, assim como em células que expressam recombinantes GliRs via mecanismo independente dos receptores canabinóides CB1 e CB2. (Hejazi et al., 2006; Yang et al., 2008; Ahrens et al., 2009 a,b; Demir et al., 2009; Foadi et al., 2010; Xiong et al., 2011, 2012; Yevenes e Zeilhofer, 2011 a,b). Ainda, estudos também sugerem que o CBD possui efeito agonista nas subunidades  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -3 dos GliRs (Devinsky et al., 2014), suprimindo a dor inflamatória e neuropática persistente em estudos com roedores (Xiong et al., 2012).

Os canabinóides endógenos e exógenos também demonstraram ter capacidade de modular alostericamente os receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3A</sub>, os receptores nicotínicos (nACh) e os gabaérgicos do tipo A (GABAA) (FAN, 1995; Barann et al., 2002. Oz et al., 2004; Hejazi et al., 2006; Xiong et al., 2008; Sigel et al., 2011). Segundo estudos anteriores, diferentes sítios de ação dos domínios das subunidades  $\alpha$  dos GliRs podem mediar de forma distinta a modulação alostérica (Lobo e Harris, 2005; Harris et al., 2008; Foadi et al., 2010; Xiong et al., 2011; Yevens e Zeilhofer, 2011). Isso pode ser evidenciado em estudo realizado por Xiong et al. (2011), no qual o mesmo demonstrou que a presença do aminoácido serina no domínio TM3 da subunidade do GliR poderia regular a potencialização dos GliRs induzidos pelo canabinóide  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol (THC). Tal potencialização dos GliRs pelos exocanabinóides (canabidiol/CBD, e THC) demonstrou também estar envolvida na modulação da dor em ratos, promovendo efeito analgésico (Xiong et al., 2011). No entanto, o conhecimento acerca do envolvimento do sistema canabinóide com os GliRs na modulação da dor inflamatória ainda é pouco elucidado, tornando necessário estudos que busquem avaliar as facilitações alostéricas envolvendo os GliRs no intuito de contribuir com tratamentos para a dor persistente.

#### 1.4. CBD e neurotransmissão endocanabinóide

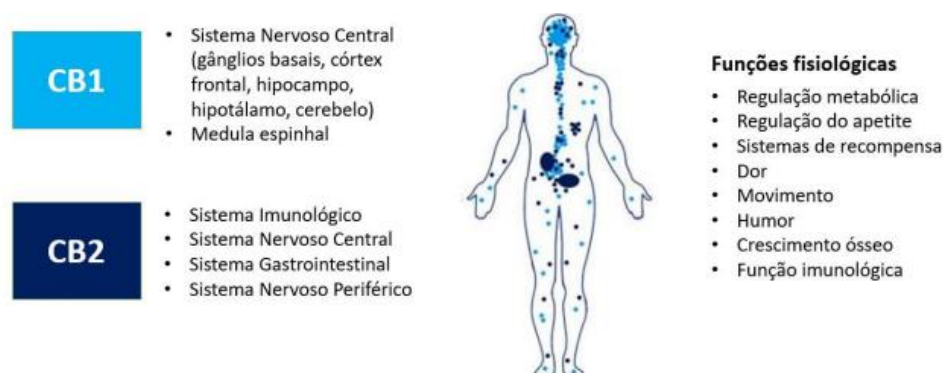
A busca por neurotransmissões que estejam envolvidas na neurobiologia da dor e das emoções vem ganhando cada vez mais espaço, sendo que a descoberta de novos substratos e receptores que participam de processos neurobiológicos vem resultando em número cada vez maior de publicações. Diante disso, dentre as neurotransmissões que desempenham papel importante na modulação da nocicepção e dos estados emocionais, os endocanabinóides vem ganhando cada vez mais espaço, em função de ser uma neurotransmissão abundante no SNC (Morena et al., 2016), e por promover analgesia em contextos clínicos e experimentais (Pacher et al., 2006; Costa et al., 2007; Genaro et al., 2017, Silva-Cardoso et al., 2021 e 2023, Macedo-Souza et al. 2023). O termo endocanabinóide compreende o conjunto de ligantes endógenos dos receptores ativados pelo THC, o composto psicoativo da *Cannabis sativa* (Howlett et al., 2002), sendo que estudos tem elucidado a participação da neurotransmissão endocanabinóide na modulação de diversas respostas comportamentais e fisiológicas, como dor, movimento, cognição e memória (Hill, Matthew e McEwen, 2010; Morena et al., 2016). Além disso, os primeiros endocanabinóides observados foram o 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1963) e a araquidonil etanolamida (anandamida) (Devane et al., 1992).

A *Cannabis sativa* possui mais de 500 substâncias, no qual podemos destacar os fitocanabinóides, como o CBD e o THC (Turner et al., 1980, 2017). Sabe-se que os principais ativos da *Cannabis* interagem com receptores canabinóides endógenos do organismo, e os mesmos foram usados durante anos como analgésicos. Entretanto, por conta de fatores tais como a falta de conhecimento e a associação negativa do uso abusivo devido o efeito psicoativo do THC, a *Cannabis sativa* teve seu uso proibido, dificultando os estudos e o avanço das pesquisas com as suas substâncias (Zuardi et al., 2006). Contudo, conforme o crescimento e o interesse nos fitocanabinóides foi aumentando por conta da identificação principalmente do THC como componente psicoativo da planta, os estudos envolvendo as substâncias da *Cannabis* aumentaram significativamente, permitindo a identificação dos receptores canabinóides CB1 e CB2 amplamente expressos no tecido nervoso e novos interesses em compreender os mecanismos de ação deste sistema, buscando novos alvos terapêuticos para uma série de condições clínicas, como por exemplo a dor persistente (Gaoni; Mechoulam, 1964; Devane et al., 1992).

Os efeitos antinociceptivos observados nos endocanabinóides ocorrem principalmente em função da ativação dos receptores CB1 pela anandamida ou 2-AG, entretanto novos estudos vêm sendo realizados buscando compreender a atuação de outros canabinóides no sistema nervoso. Diante disso, todo o processo envolvendo a

neurotransmissão endocanabinóide vem sendo cada vez mais estudada, desde a síntese, interação com receptores e degradação por enzimas, buscando compreender o real potencial para induzir analgesia, desde os nervos periféricos e células imunes, até a medula espinhal e regiões supra espinais envolvidas com o controle descendente da dor (Mechoulam et al., 1995; Ulugöl et al., 2014).

Em meados dos anos 90, a descoberta dos receptores CB1, localizados no SNC (Matsuda et al., 1990) e do CB2 (Munro et al., 1993), localizados majoritariamente fora do SNC, resultou em novas possibilidades de compreensão da atuação dos endocanabinóides (Figura 2). Os receptores CB1 localizam-se principalmente nos terminais nervosos pré-sinápticos do SNC, sendo responsáveis pela maioria dos efeitos neurocomportamentais dos canabinóides e são amplamente distribuídos no bulbo olfatório, hipocampo e cerebelo, e em baixa escala no tálamo e nos tecidos periféricos (Russo et al., 2005). Em contrapartida, os receptores CB2 encontram-se em maior escala no sistema imunológico, sendo expresso principalmente em células imunológicas como mastócitos, linfócitos, macrófagos e astrócitos (Carlini et al., 2015; Silva, 2017) mas podendo também ser encontrados em baixa escala na micróglia e em regiões pós-sinápticas (Sagar et al., 2009). Os receptores CB2, por mais que atuem principalmente como imunomoduladores periféricos, também participam da modulação da dor inflamatória persistente (Russo; Hohmann, 2012). Ainda, estudos demonstraram que a ativação destes receptores são responsáveis por efeitos antinociceptivos, como pôde ser evidenciado por Nackley (2003), que através do modelo de ligação do nervo espinal e da constrição crônica do nervo ciático, demonstrou que o agonismo seletivo destes receptores exerceu efeito antinociceptivo.



**Figura 2:** Esquema representando a distribuição dos receptores canabinóides CB1 e CB2 e das suas respectivas funções fisiológicas no organismo. Fonte: Modificado de Carlini et al., (2015).

Ademais, os canabinóides atuam como mensageiros retrógrados, buscando reestabelecer a homeostase em células pós-sinápticas ligando-se a receptores pré-sinápticos, agindo como neurotransmissores sinápticos retrógrados tonicamente ativos



(Carlini et al., 2015; Boggs et al., 2017). O estímulo inicia-se no neurônio pós-sináptico e a excitação neuronal induz a despolarização e ao influxo de íons cálcio, gerando a estimulação de enzimas fosfolipases que iniciam a síntese dos endocanabinóides, estes liberados na fenda sináptica e prontos para se ligarem nos seus receptores alvo. Este mecanismo é referido como supressão da inibição/excitação induzida pela despolarização celular (Howlett et al., 2004) e pode afetar aspectos como a memória, a cognição e a percepção da dor (Wilson, 2002).

Dentre os canabinóides encontrados na *Cannabis sativa*, o CBD destaca-se como um dos principais alvos terapêuticos para o tratamento da dor inflamatória, uma vez que não possui os efeitos psicoativos do THC, e possui propriedades amplas de ações no sistema nervoso central e periférico (Blessing et al., 2015). O CBD possui pouca afinidade com os receptores CB1 e CB2, entretanto, na presença do THC, demonstrou capacidade em antagonizá-los (Thomas et al., 2007). Contudo, sua atuação na modulação da dor vem sendo associada a interação com outros receptores, como receptores acoplados a proteína G, como o caso dos receptores serotoninérgicos 5HT1A e 5HT3, canais iônicos do tipo receptor vanilóide de potencial transitório (TRPV1), receptores de glicina, e também via inibição da recaptação da enzima de degradação da anandamida, a FAAH (Russo et al., 2007; De Petrocelis et al., 2011; Burstein et al., 2015; Morales et al., 2017), facilitando a sinalização dos endocanabinóides (Mechoulam e Hanus, 2002).

Achados na literatura indicam que o CBD produz efeito analgésico em sítio periférico, espinal e supra-espinal (Di Marzo et al., 1998; Piomelli, 2005). Além disso, estudos utilizando diferentes modelos animais, com estímulos térmicos, químicos e mecânicos, demonstraram que os endocanabinóides induziram a antinocicepção (Walker, 2005; Walker e Hohmann, 2005), podendo caracterizar o efeito antinociceptivo dos canabinóides tão eficaz quanto o da morfina (Bloom et al., 1977). Efeitos anti-inflamatórios do CBD também foram observados em um modelo de inflamação aguda induzido por injeção intraplantar de carragenina em roedores, no qual demonstrou-se a atenuação da inflamação após administração de CBD (Costa et al., 2004). Ainda, outro estudo demonstrou que a administração sistêmica de CBD produziu diminuição das contorções no teste de contorções abdominais, indicando participação do CBD na modulação da dor (Petrilli et al., 2019). Assim, o CBD vem tendo notório destaque em função das suas propriedades anti-inflamatórias (Campos et al., 2016; Costa et al., 2007), e sendo visto como possível alternativa farmacológica para o tratamento de doenças inflamatórias persistentes (Carrier et al., 2006). No entanto, ainda existe muita limitação em localizar os sítios de ação dos endocanabinóides e evidenciar como ocorrem os

seus mecanismos de ação na modulação da dor (Hohmann e Suplita, 2006), em particular na dor inflamatória persistente.

Assumindo que a dor é descrita como o quinto sinal vital pela Organização Mundial da Saúde, influenciando diretamente na capacidade funcional e na qualidade de vida do paciente, conseqüentemente tornando-se um problema de saúde pública. Considerando que somente no Brasil, 51,44% da população reporta a presença da dor persistente isoladamente, ou associado a outra patologia (Sbed, 2018), torna-se necessário e relevante a busca por alternativas farmacológicas que demonstram capacidade de modular a dor. Dessa forma, a relevância em compreender a possível interação do CBD com os receptores de glicina na amígdala na modulação da dor, assim como os seus processos neurobiológicos envolvidos na nocicepção, torna-se importante na busca por possíveis tratamentos com alta efetividade e baixa toxicidade.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide e dos receptores de glicina na modulação da dor inflamatória persistente promovida pela injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA) intra-plantar em camundongos C57BL/6.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico com CBD (3 mg/kg, i.p., 3 dias/1 vez ao dia) ou veículo, na sensibilidade mecânica (teste de von Frey) e térmica (testes da placa quente e acetona) em camundongos machos com inflamação periférica induzida pela administração de CFA intra-plantar
- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico com CBD (3 mg/kg, i.p., 3 dias/1 vez ao dia) ou veículo, no Paradigma de Fuga e Esquiva ao local (PEAP) e no Teste do Campo Aberto em camundongos machos com inflamação periférica induzida pela administração de CFA intra-plantar
- Avaliar a expressão de receptores p-GLR1 na amígdala de camundongos com inflamação periférica através do ensaio de Western Blotting.

### **3. Material e Método**

#### **3.1. Animais e condições experimentais**

Neste estudo, foram utilizados 128 camundongos machos C57BL/6, procedentes do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Todos os camundongos tinham de 8 a 10 semanas de idade (20-25 g) no início dos experimentos, e foram mantidos em caixas coletivas (densidade populacional de 8 camundongos por área de piso de 1354 cm<sup>2</sup>), de polipropileno forradas com maravalha, em ambiente com temperatura controlada (24° C ± 1° C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais em laboratórios, conforme a Legislação Brasileira para Uso de Animais, e foram aprovados junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP (Processo CEUA 21.1.720.59.6 – ANEXO I). Tendo em vista a natureza dolorosa dos experimentos, foram tomados cuidados redobrados para não causar qualquer tipo de dor desnecessária para os animais além da dor inflamatória persistente e dos testes nociceptivos.

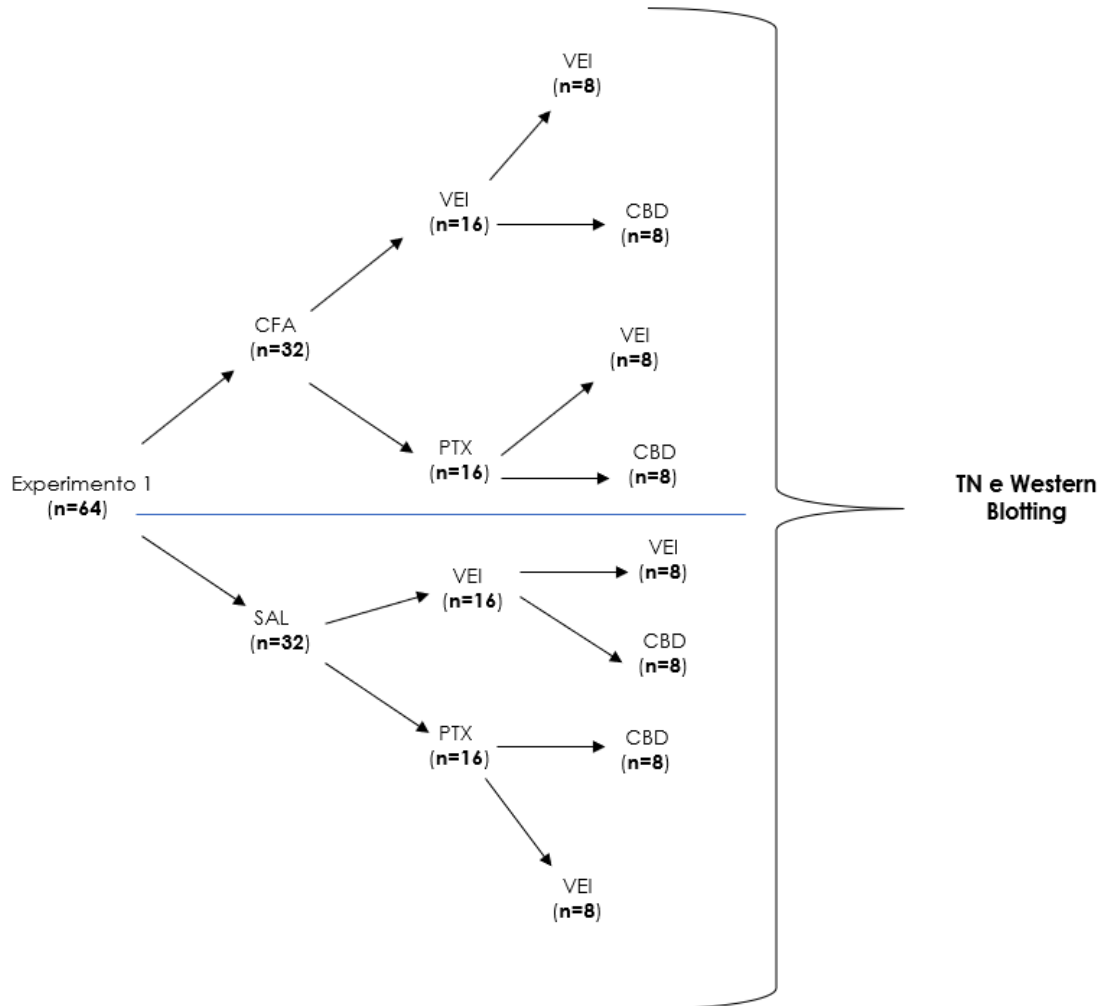
#### **3.2. Indução de Inflamação Persistente por CFA**

A dor inflamatória persistente foi induzida por meio da administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA, 30 µL) em suspensão (óleo/salina 1:1). Animais controle receberam injeção de solução salina (NaCl, 0,9%, SAL). Os camundongos foram inicialmente anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina 10% (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina 4% (10 mg/kg). No experimento 1, no 3º, 7º e 10º após a injeção de CFA ou SAL os animais foram submetidos ao teste de sensibilidade mecânica (teste de von Frey), teste da placa quente e teste da acetona. No experimento 2, no 10º dia após a injeção de CFA ou SAL, grupos independentes foram submetidos ao paradigma de fuga e esquiva (PEAP) e 5 minutos depois ao teste do campo aberto. Para a injeção do CFA ou SAL foi utilizado uma seringa de 1 mL graduada em 0,01 mL e uma agulha fina 30 ½ G (30 x 13 mm).

#### **3.3. Grupos Experimentais e Tratamento Farmacológico**

No 10º dia do protocolo, os camundongos foram submetidos a administração sistêmica i.p. de veículo (Solução Salina 0,9%) ou administração do antagonista dos receptores de glicina (Picrotoxina, Sigma Aldrich, 0,5mg/kg, i.p diluída em 99% Solução Salina 0,9% e 1% DMSO) 10 minutos antes da administração do CBD (pureza de 99,6%; BSPG-Pharm, Sandwich, UK - 3,0mg/kg, i.p diluído em 98% salina e 2% Tween 80). A administração do CBD se deu no 8º, 9º e 10º dia do protocolo, sendo que no 10º dia ocorreu 30 minutos antes do início dos testes nociceptivos ou comportamentais. As

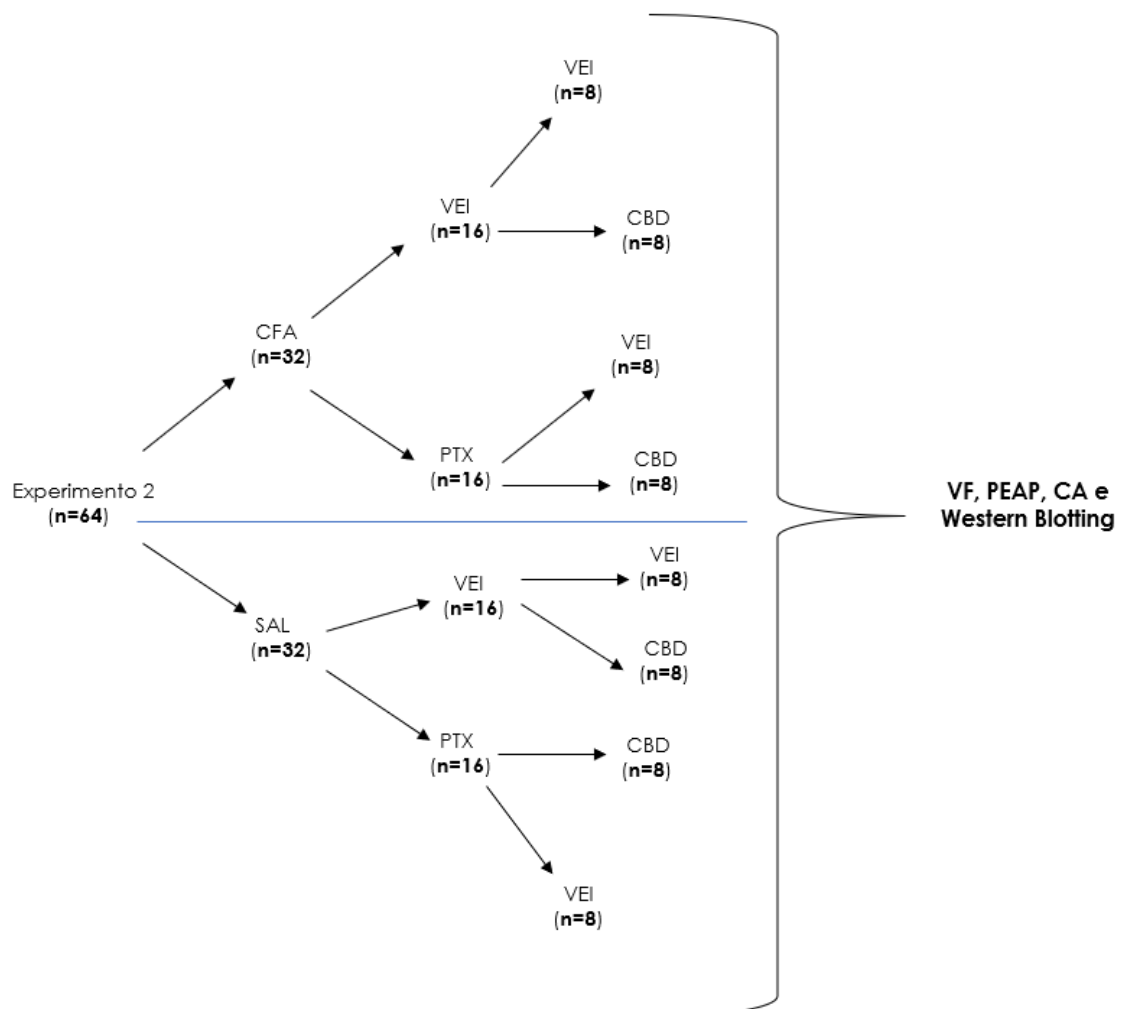
figuras 4 e 5 e as tabelas 1 e 2 apresentam os grupos experimentais utilizados neste projeto. A dose e a duração do tratamento utilizada foi fundamentada em estudo prévio de Silva-Cardoso et al. (2021 e 2023).



**Figura 3:** Distribuição dos grupos experimentais do Experimento 1. Abreviações: CBD: canabidiol; CFA: Adjuvante Completo de Freund; PTX: picrotoxina; SAL: solução salina; TN: testes nociceptivos; VEI: veículo. Fonte: autoria própria.

Experimento 1		
Condição	Tratamento	Quantidade (n)
Controle (Salina)	VEI + VEI	8
	PTX + VEI	8
	VEI + CBD	8
	PTX + CBD	8
Inflamação (CFA)	VEI + VEI	8
	PTX + VEI	8
	VEI + CBD	8
	PTX + CBD	8

**Tabela 1:** Distribuição dos grupos experimentais do Experimento 1. Abreviações: CBD: canabidiol; CFA: Adjuvante Completo de Freund; PTX: picrotoxina; VEI: veículo.



**Figura 4:** Distribuição dos grupos experimentais do Experimento 2. Abreviações: CA: campo aberto; CBD: canabidiol; CFA: Adjuvante Completo de Freund; PEAP: paradigma fuga-esquiva; PTX: picrotoxina; SAL: solução salina; VEI: veículo; VF: teste von Frey. Fonte: autoria própria.

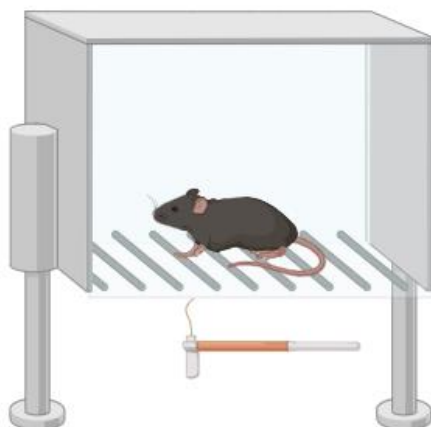
Experimento 2		
Condição	Tratamento	Quantidade (n)
Controle (Salina)	VEI + VEI	8
	PTX + VEI	8
	VEI + CBD	8
	PTX + CBD	8
Inflamação (CFA)	VEI + VEI	8
	PTX + VEI	8
	VEI + CBD	8
	PTX + CBD	8

**Tabela 2:** Distribuição dos grupos experimentais do Experimento 2. Abreviações: CBD: canabidiol; CFA: Adjuvante Completo de Freund; PTX: picrotoxina; VEI: veículo.

### 3.4. Testes Nociceptivos

#### 3.4.1. Sensibilidade Mecânica

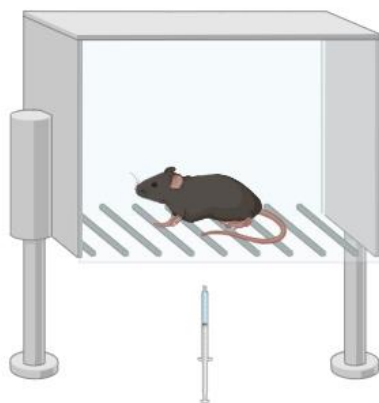
A sensibilidade mecânica foi verificada por meio do limiar de retirada da pata traseira utilizando o analgesímetro eletrônico modelo von Frey (Insight Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O aparato consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata é realizado por uma ponta descartável de polipropileno (0,5 mm de diâmetro). Os camundongos foram posicionados em uma gaiola de metacrílico (12cm x 10cm x 17cm) com o assoalho da caixa feito de arame não maleável na forma de rede, permitindo a estimulação da pata (Figura 6). As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como retirada ou sacudida da pata estimulada. A sensibilidade mecânica foi, então, quantificada (em gramas) antes da indução da inflamação (linha de base) e após a indução da inflamação. O limiar foi avaliado por 3 vezes consecutivas, sendo o limiar a média em gramas de resposta. As sessões testes foram realizadas no período basal (dia 0) e durante o desenvolvimento da inflamação, no 3º, 7º e 10º dia experimental. Foi realizado um período de habituação entre 15 e 20 minutos para adaptação ao ambiente antes da realização dos testes.



**Figura 5:** Esquema da realização do teste para avaliação da sensibilidade mecânica, teste de von Frey eletrônico. Fonte: autoria própria. Desenho/Esquema obtido no Biorender.

#### 3.4.2. *Sensibilidade Térmica ao Frio*

Para avaliar as alterações da percepção ao frio induzidas pela inflamação persistente foi utilizado o teste de instilação plantar de acetona logo após o teste de Von Frey. No procedimento, os camundongos foram colocados em uma gaiola de metacrílico (12cm x 10cm x 17cm) com o assoalho da caixa feito de arame não maleável na forma de rede, permitindo a estimulação da pata (Figura 7). O tempo de ambientação foi entre 15 e 20 minutos. Após a adaptação ao ambiente, um jato de 100  $\mu$ L de acetona foi instilado na pata traseira direita do animal com uma seringa de insulina a uma distância de aproximadamente 5 mm da pata, por entre a malha da caixa de observação. Foi quantificado durante o período de 1 minuto o número de sacudidas em resposta ao resfriamento da pele induzido pela acetona. Os parâmetros avaliados foram considerados como os índices de resposta a estímulo frio e o aumento ou redução dos valores encontrados que foram interpretados como alodinia ou hipoalgesia ao frio, respectivamente. 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). As sessões testes foram realizadas no dia 0 (linha de base) e 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia a partir do início da resposta inflamatória.

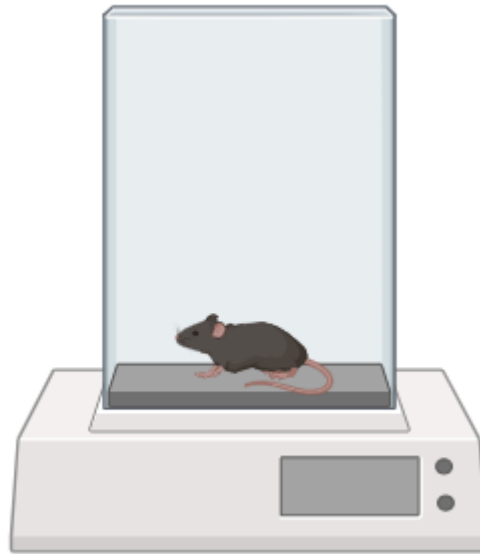


**Figura 6:** Esquema da realização do teste para avaliação da sensibilidade térmica, teste de acetona. Fonte: autoria própria. Desenho/Esquema obtido no Biorender.

### 3.4.3. Sensibilidade Térmica ao Calor

Para avaliar as alterações da percepção ao calor induzidas pela inflamação persistente foi utilizado o teste da placa quente logo após o teste da Acetona. O teste avaliou o tempo em que os animais permaneceram sobre uma superfície metálica aquecida ( $50 \pm 1^\circ\text{C}$ ) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lambida uma das patas (LIU et al., 2002). Inicialmente, os animais foram colocados sobre a placa aquecida e, as respostas ao estímulo térmico (retirada ou lambida das patas traseiras ou dianteiras), cronometradas (Figura 8). 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. Foram realizadas 3 medidas em intervalos aleatórios, sendo que o limiar foi considerado como a média das avaliações. As sessões testes foram realizadas no dia 0 (Linha de base) e no 3º, 7º e 10º dia depois do início da resposta inflamatória.





**Figura 7:** Esquema da realização do teste para avaliação da sensibilidade térmica, teste de placa quente. Fonte: autoria própria. Desenho/Esquema obtido no Biorender.

### **3.5. Paradigma de Fuga/esquiva ao local (PEAP)**

Este protocolo experimental foi fundamentado em trabalhos anteriores de Labuda e Fuchs (2000a) que padronizaram metodologia para avaliar a qualidade aversiva da dor inflamatória ou neuropática.

No experimento 2, no 10º dia após a indução da inflamação persistente por CFA, os camundongos foram submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos, e expostos a uma caixa de acrílico composta de dois compartimentos (Figura 9). Um compartimento escuro e opaco e outro claro e iluminado, sendo estes separados por anteparo que permitia livre acesso aos dois compartimentos durante 20 minutos de teste. Durante este período, os camundongos foram submetidos à avaliação da sensibilidade mecânica (teste de von Frey) na pata inflamada quando permaneciam no ambiente escuro, e na pata contralateral quando no ambiente claro com 15 segundos de intervalo entre as estimulações. O parâmetro avaliado foi o tempo de permanência no compartimento claro.

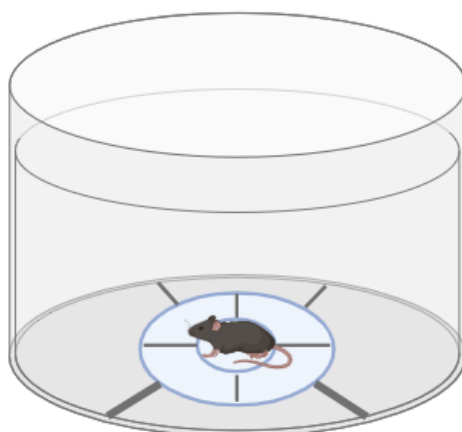
De acordo com estudos prévios (Labuda e Fuchs, 2000b) os animais tem tendência natural de permanecer mais tempo no compartimento escuro, entretanto, o animal submetido à inflamação tenderá a evitar o compartimento escuro de escolha natural, pois é neste compartimento que ocorre a estimulação aversiva dolorosa.



**Figura 8:** Esquema da realização do paradigma de fuga esquiva, para avaliação da qualidade aversiva da dor. Fonte: autoria própria. Desenho/Esquema obtido no Biorender.

### **3.6. Teste do campo aberto**

O aparato consiste em uma arena circular de acrílico transparente, sua proporção é de aproximadamente 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, colocada em um assoalho dividido em 12 seções (Figura 10). Cada animal foi colocado individualmente na área central da arena para um período de 5 minutos para livre exploração. Os comportamentos emitidos pelos animais foram registrados por uma câmera de vídeo posicionada acima da arena. Foram registrados e analisados o número total de seções percorridas, o número de seções centrais percorridas, o tempo de permanência na região central do aparato, o número de levantamentos (em pé com as patas dianteiras levantadas no meio da arena ou contra as paredes), o tempo gasto em imobilidade (ausência de movimentos do corpo) e a quantidade de bolos fecais). O teste foi realizado no 10º dia após o início da resposta inflamatória, 5 minutos após o término do teste PEAP. O teste do campo aberto foi realizado para avaliar se os tratamentos utilizados neste projeto promoveram alteração nas respostas motoras, as quais são necessárias para emissão das respostas aos estímulos sensoriais (mecânico e térmico). Em adição, este teste pode avaliar o comportamento do tipo ansioso.

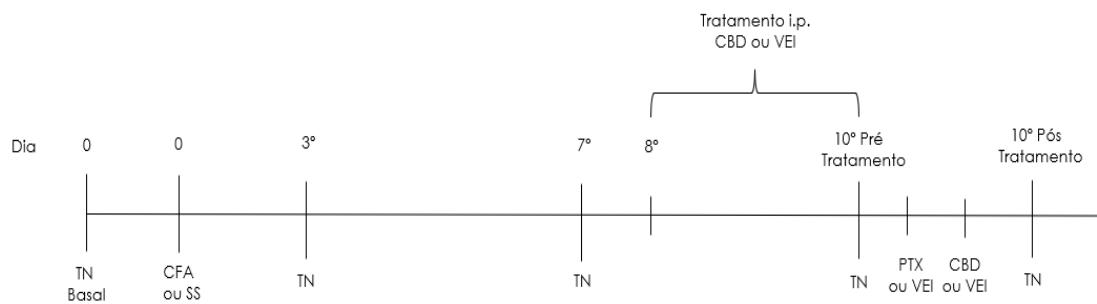


**Figura 9:** Aparato utilizado para o teste do campo aberto. Fonte: autoria própria. Desenho/Esquema obtido no Biorender.

### **3.7. Delineamento Experimental**

#### **3.7.1. Experimento 1: Avaliação do tratamento subcrônico com CBD na sensibilidade mecânica e térmica durante a inflamação persistente e possível interação com receptores para glicina (GliR).**

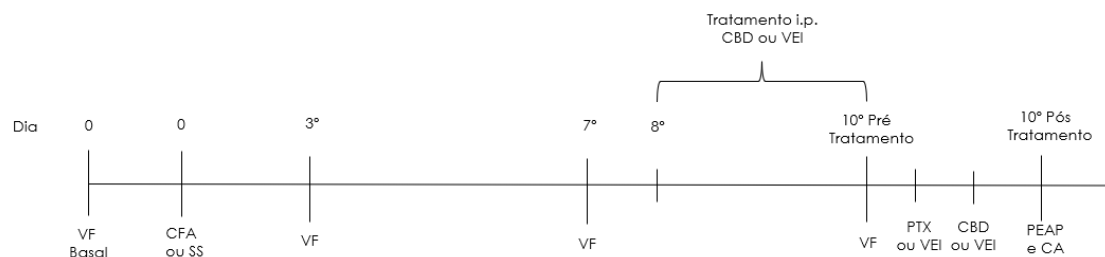
Neste protocolo foi avaliado o efeito do tratamento subcrônico com CBD (3 mg/kg, i.p., 3 dias/1 vez ao dia, tratamento iniciado no 8º dia experimental) ou veículo, na sensibilidade mecânica (teste de von Frey) e térmica (testes da placa quente e acetona) em camundongos machos com inflamação periférica induzida pela administração de CFA intra-plantar ou não (grupo controle com solução salina estéril 0,9%, SS). Para avaliar a possível interação do CBD com os GliRs, foi realizada administração prévia com antagonista de receptores GliRs, picrotoxina (0,5 mg/kg, i.p.), 10 minutos antes da administração de CBD no 10º dia experimental. Os testes para avaliação da sensibilidade mecânica e térmica foram realizados antes de qualquer procedimento (dia 0, período basal), e no 3º, 7º e no 10º dia experimental. No 10º dia experimental, os testes nociceptivos foram feitos antes e depois da administração dos fármacos, 30 minutos após a administração de CBD. Ao término dos experimentos, os camundongos foram submetidos à eutanásia, e foi removido o encéfalo para posterior análise por western blotting. A figura 10 apresenta o delineamento experimental deste protocolo experimental.



**Figura 10:** Delineamento experimental do Experimento 1. **Abreviações:** CBD: Canabidiol; CFA: Adjuvante Completo de Freund; PTX: Picrotoxina; SS: Solução salina estéril 0,9%; TN: Testes nociceptivos (von Frey, Acetona e Placa quente); VEI: Veículo. Fonte: autoria própria.

### 3.7.2. Experimento 2: Avaliação do tratamento subcrônico com CBD na aversividade à dor e mobilidade mecânica em modelo de inflamação persistente e possível interação com receptores para glicina (GliR).

Neste protocolo foi avaliado o efeito do tratamento subcrônico com CBD (3 mg/kg, i.p., 3 dias/1 vez ao dia, tratamento iniciado no 8º dia experimental) ou veículo, na aversividade à dor em camundongos machos com inflamação periférica induzida pela administração de CFA intra-plantar ou não (grupo controle com solução salina estéril 0,9%, SS). Neste protocolo experimental a sensibilidade mecânica foi avaliada através do teste de Von Frey como controle do desenvolvimento da resposta inflamatória, sendo esta análise realizada no período basal, no 3º, 7º e 10º dia do protocolo. No 10º dia, a sensibilidade mecânica foi avaliada antes da administração dos fármacos. Para avaliar a interação do CBD com GliRs foi realizada administração prévia com antagonista de receptores GliRs, Picrotoxina (0,5 mg/kg, i.p.), 10 minutos antes da administração de CBD no 10º dia experimental. A aversividade à dor foi avaliada no 10º dia experimental 30 minutos após o tratamento com CBD ou veículo pelo teste PEAP. Adicionalmente, para avaliar se os tratamentos utilizados neste estudo promovem qualquer alteração nas respostas motoras, após o término do PEAP foi realizado o teste do campo aberto (5 minutos de teste). Ao término dos experimentos, os camundongos foram submetidos à eutanásia, e o encéfalo foi removido para posterior análise por western blotting. A figura 4 apresenta o delineamento experimental deste protocolo experimental.



**Figura 11:** Delineamento experimental do Experimento 2. **Abreviações:** CA: teste do campo aberto; CBD: Canabidiol; CFA: Adjuvante Completo de Freund; PEAP: paradigma de fuga-esquiva; PTX: Picrotoxina; SS: Solução salina estéril 0,9%; VEI: Veículo; VF: teste de von Frey. Fonte: autoria própria.

### 3.8. Eutanásia

Após o término dos experimentos os camundongos foram submetidos a eutanásia por sobredose anestésica da associação de cloridrato de xilazina 4% (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (240 mg/kg). Após a anestesia profunda, os animais foram decapitados, os encéfalos retirados e guardados no freezer -80°C. Posteriormente foi realizada a dissecação da área encefálica de interesse, a amígdala, para quantificação da expressão proteica dos receptores para Gli pela técnica de western blotting. A região da amígdala foi dissecada seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Franklin (2004).

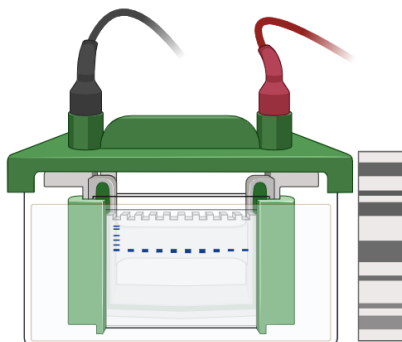
### 3.9. Dissecação da Amígdala

O processo de dissecação da amígdala iniciou-se com a preparação do tampão de extração (Tampão de Lise (RIPA BUFFER) + Inibidor de protease (protease inhibitor cocktail, ab65621, ABCAM Inc., Cambridge, Reino Unido). Após esta etapa, a amígdala foi dissecada utilizando bisturi número 3 e o tecido encefálico armazenado em eppendorf contendo 100 ml da solução tampão. Posteriormente foi realizada a etapa de trituração/homogeneização do tecido com o uso de um sonicador. Por último, as amostras foram levadas para a centrifuga por 20 minutos a 4°C e 14.000 rpm e separadas em duas alíquotas de 50 ml cada por amostra. As alíquotas foram armazenadas no freezer -80 °C.

## 4. Análise de Western Blotting

O tecido alvo foi homogeneizado em tampão de lise RIPA para extração de proteínas (150 mM NaCl, 1,0% IGEPAL® CA-630, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0 com 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, e coquetel inibidor de protease com 1% coquetel inibidor de fosfatase). Parte da amostra coletada foi utilizada para analisar os níveis de proteína de receptores para Gli. Todos os reagentes foram

comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA) com exceção do NP-40 que foi proveniente da Calbiochem (Darmstadt, Germany). A amostra homogeneizada foi dissolvida 1 hora a 4°C, sonificado por 10 segundos e centrifugado a 4°C por 20 minutos a 700 g. O sobrenadante foi misturado com tampão 4x e adicionado a 4% de tampão de homogeneização e separados 10% em gel de SDS-poliacrilamida. Os níveis de proteínas foram transferidos por eletroforese para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) por 120 minutos bloqueado com tampão fosfato salina + 5% de leite desnatado e incubado overnight a 4°C com o anticorpo policlonal de Gli (diluição 1:2000, A2958, ABclonal, MA, EUA) e bloqueio com leite desnatado 5% em PBST 0,2% (PBS 0,01M + Tween 20). As proteínas foram detectadas por anticorpo secundário conjugado-peroxidase horseradish anti-coelho (1:40.000, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) e visualizado por reagentes de quimioluminescência (ECL kit, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e exposição em hiper filme (GE, Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). A intensidade da marcação foi quantificada por densitometria. As membranas foram abertas e reveladas com anticorpo monoclonal de coelho anti- $\beta$ -actina como controle interno (1:30.000, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, INC., USA).



**Figura 12:** Aparato utilizado para a corrida do gel no teste de western blotting. Fonte: autoria própria. Imagem/representação obtida no Biorender.

## 5. **Análise dos Resultados.**

Para as análises comportamentais dos testes algesimétricos (sensibilidade térmica e mecânica) do experimento 1 foi realizada ANOVA de duas vias para medidas repetidas onde os fatores analisados foram o tratamento farmacológico e a inflamação em função do tempo. Para o teste do PEAP e campo aberto do experimento 2 foi realizado ANOVA de uma via sendo o fator analisado o tratamento. Quando possível, foi realizado o pós-teste de Bonferroni considerando-se diferença estatisticamente significativa quando  $P < 0,05$ . Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro

padrão da média. Para as análises e a construção dos gráficos foi utilizado o Programa GraphPrism, versão 8.

#### **4. Resultados**

##### **4.1. Experimento 1: Avaliação quantitativa da dor em modelo de inflamação periférica persistente e efeito do tratamento com canabidiol**

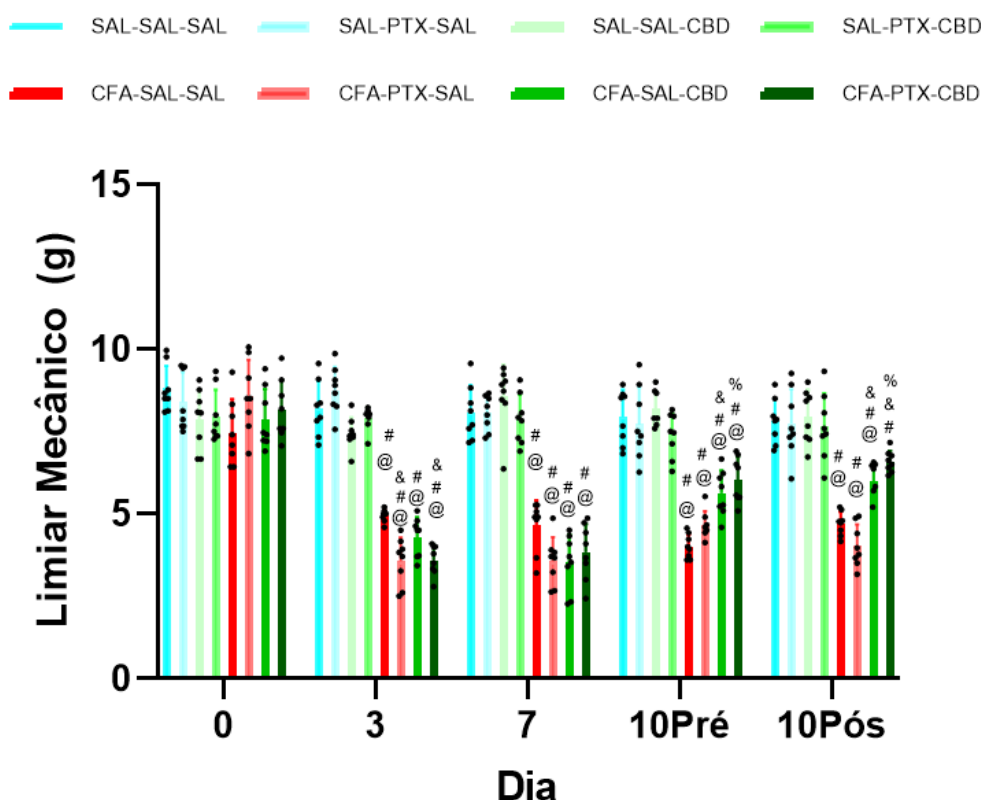
No experimento 1, os grupos de camundongos foram submetidos a inflamação persistente por meio da administração intraplantar de CFA ou não (administração de solução estéril), ao tratamento sistêmico i.p. de CBD (3mg/kg), ou administração i.p. de veículo (salina estéril 0,9%) e a administração sistêmica i.p. de Picrotoxina (0,5mg/kg). Para os 8 grupos submetidos ao experimento 1 foram avaliadas duas variáveis, a inflamação ao longo do tempo (CFA ou SAL) e o tratamento (CBD ou Veículo) e (PTX ou Veículo). Os grupos de camundongos foram avaliados quanto à sensibilidade mecânica (teste de von Frey), e térmica (teste da placa quente e teste da acetona).

##### **4.1.1. Von Frey: Efeitos antialodínicos mecânicos do tratamento subcrônico com CBD.**

Os resultados mostraram que o tratamento com CBD reverteu parcialmente a inflamação persistente periférica induzida pelo CFA intra-plantar (Figura 1), entretanto o tratamento com picrotoxina não modificou este efeito.

A aplicação da ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa para a condição ( $F(3, 186) = 101,4; P < 0,05$ ), para o tratamento ( $F(7, 56) = 95,44; P < 0,05$ ) e para a interação ( $F(28, 224) = 17,87; P < 0,05$ ). Para o grupo CFA-SAL-SAL, o pós-teste de Bonferroni indicou diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) nos dias 7, 10 pré tratamento e 10 pós tratamento quando comparado ao dia basal e em todos os dias do protocolo quando comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL), indicando eficácia da inflamação. O grupo CFA-PTX-SAL demonstrou diferença significativa em todos os dias do protocolo quando comparado ao dia basal e ao grupo controle Salina, indicando eficácia da inflamação, e não indicando efeito da picrotoxina na alodinia mecânica. O grupo CFA-SAL-CBD demonstrou diferença significativa em todos os dias do protocolo quando comparado ao dia basal e ao grupo controle salina e diferença significativa no dia 10 pré tratamento e 10 pós tratamento quando comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL), indicando eficácia da inflamação e reversão parcial do CBD tanto no pré tratamento e no pós tratamento. O grupo CFA-PTX-CBD demonstrou diferença significativa nos dias 3, 7 e 10 pré tratamento quando comparado ao dia basal, e diferença significativa em todos os dias do

protocolo quando comparado ao grupo controle Salina, indicando eficácia da inflamação. O grupo CFA-PTX-CBD demonstrou diferença significativa no dia 10 pré tratamento e pós tratamento quando comparado ao grupo controle CFA e ao grupo controle CBD (CFA-PTX-SAL), indicando participação do CBD na reversão parcial da alodinia mecânica (Figura 13). Como dados complementares, a Tabela3 apresenta os valores de cada grupo em cada dia do protocolo, e destaca os grupos que demonstraram resultado estatisticamente significativo na reversão da alodinia mecânica.



**Figura 13:** Avaliação da sensibilidade mecânica pelo teste de von Frey. Efeito do tratamento com canabidiol (CBD, 3mg/kg, i.p.) na sensibilidade mecânica em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade mecânica foi realizada no período basal (dia 0) e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média. n = 8 para cada grupo experimental. #P < 0,05 Comparado ao grupo controle Salina (SAL-SAL-SAL). @P < 0,05 Comparado ao dia Basal (0). & P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). % P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL)



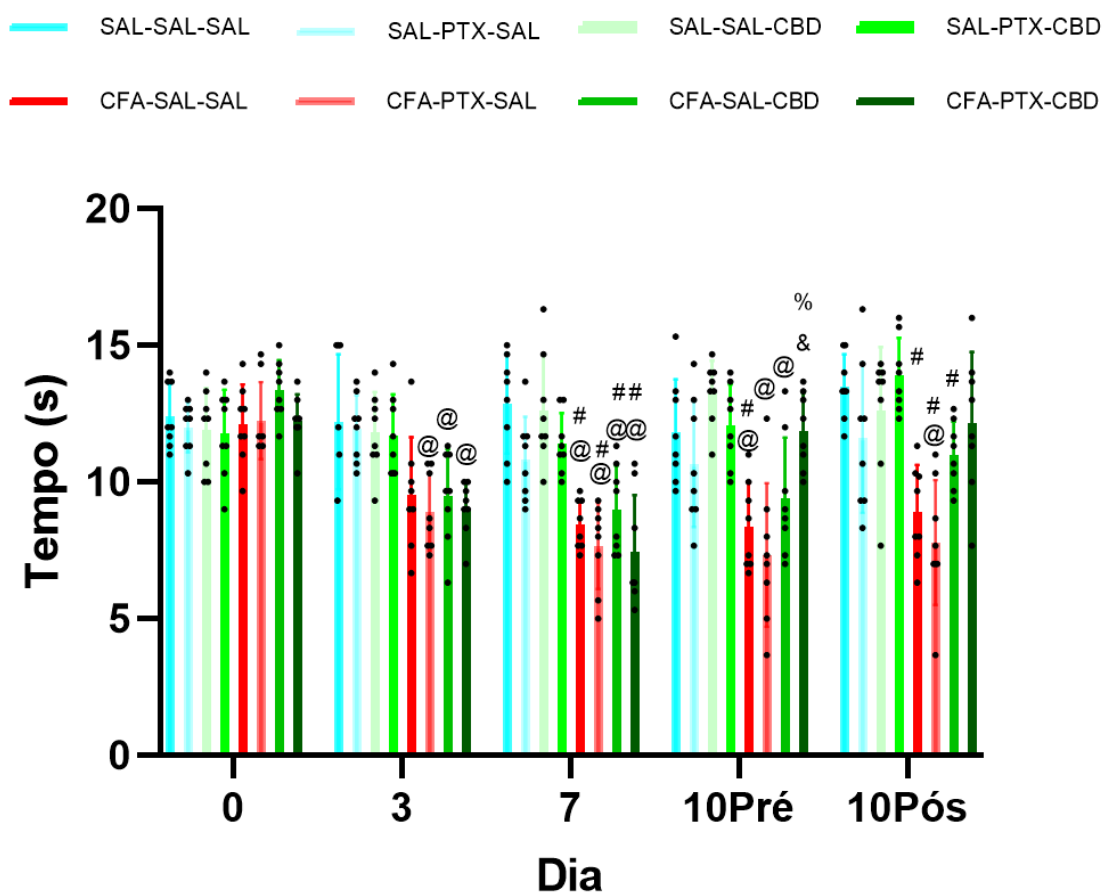
Dia	SAL				CFA			
	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD
Basal	8,8 ± 0,7	8,4 ± 0,9	7,8 ± 0,9	7,9 ± 0,8	7,4 ± 1	8,5 ± 1	7,8 ± 0,9	8,1 ± 0,9
3	8,2 ± 0,8	8,7 ± 0,7	7,4 ± 0,5	7,9 ± 0,3	4,9 ± 0,2@#	3,5 ± 0,7@##	4,3 ± 0,6@#	3,6 ± 0,4@##
7	8 ± 0,8	8 ± 0,5	8,5 ± 0,9	7,8 ± 0,7	4,6 ± 0,7@#	3,5 ± 0,7@#	3,5 ± 0,8@#	3,8 ± 0,8@#
10 Pré Tratamento	7,9 ± 0,8	7,7 ± 1,1	8,1 ± 0,5	7,3 ± 0,7	4 ± 0,4@#	4,6 ± 0,4@#	5,6 ± 0,7 @##	6 ± 0,7 @##
10 Pós Tratamento	7,8 ± 0,7	7,7 ± 1	7,9 ± 0,8	7,6 ± 1	4,7 ± 0,4@#	4 ± 0,6@#	5,9 ± 0,5 @##	6,5 ± 0,3 ##%

**Tabela 3:** Média ± Erro padrão da média do limiar de retirada de pata (g) no teste de von Frey em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade mecânica foi realizada no período basal, e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). #P < 0,05 Comparado ao grupo controle Salina (SAL-VEI-VEI). @P < 0,05 Comparado ao dia Basal (0). & P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-VEI-VEI). % P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-VEI).

#### 4.1.2. Placa Quente: Efeitos anti-hiperalgésicos ao calor do tratamento subcrônico com CBD.

A sensibilidade térmica também foi avaliada no conjunto de grupos avaliados pelo teste de von Frey. Os resultados obtidos evidenciam que a inflamação periférica promoveu redução do limiar térmico no teste da placa quente, sendo este efeito revertido pelo tratamento com CBD (Figura 14). Ainda, o pré-tratamento com picrotoxina não alterou o efeito analgésico do CBD. A aplicação da ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa para a condição (F (4, 197) = 17,26; P < 0,05), para o tratamento (F (7, 56) = 22,61; P < 0,05) e interação entre os fatores (F (28, 224) = 4,299; P < 0,05). Para o grupo CFA-SAL-SAL, o pós-teste de Bonferroni indicou diferença significativa (P < 0,0001) nos dias 7 e 10 pré-tratamento quando comparados ao dia basal e nos dias 7, 10 pré e 10 pós tratamento quando comparados ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL), indicando eficácia da inflamação neste grupo. No grupo CFA-PTX-SAL, foi observado resultado significativo em todos os dias do protocolo quando comparado ao dia basal e no dia 7 e 10 pós tratamento quando comparado ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação e não indicando efeito da picrotoxina na atenuação da hiperalgésia térmica ao calor. O grupo CFA-SAL-CBD demonstrou resultado significativo nos dias 3, 7 e 10 pré-tratamento quando comparado ao dia basal e nos dias 7 e 10 pós tratamento quando comparado ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação e não demonstrando efeito do CBD na atenuação da hiperalgésia térmica ao calor. O grupo CFA-PTX-CBD demonstrou

diferença significativa nos dias 3 e 7 comparados ao dia basal e no dia 7 comparado ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação. No dia 10 pré-tratamento, houve diferença significativa neste grupo quando comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL), indicando reversão total da hiperalgesia térmica ao calor, e diferença significativa quando comparado ao grupo controle CBD (CFA-PTX-SAL), indicando participação do CBD na atenuação da hiperalgesia. Os valores individuais de cada grupos estão apresentados na Tabela 4.



**Figura 14:** Avaliação da sensibilidade ao calor. Efeitos anti-hiperalgésicos do canabidiol (CBD, 3 mg/kg) na sensibilidade térmica ao calor avaliada pelo teste da placa quente em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade ao calor foi realizada no período basal (dia 0) e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média. n = 8 para cada grupo experimental. # P < 0,05 Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). @ P < 0,05 Comparado ao dia basal (0). & P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). % P < 0,05 = Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

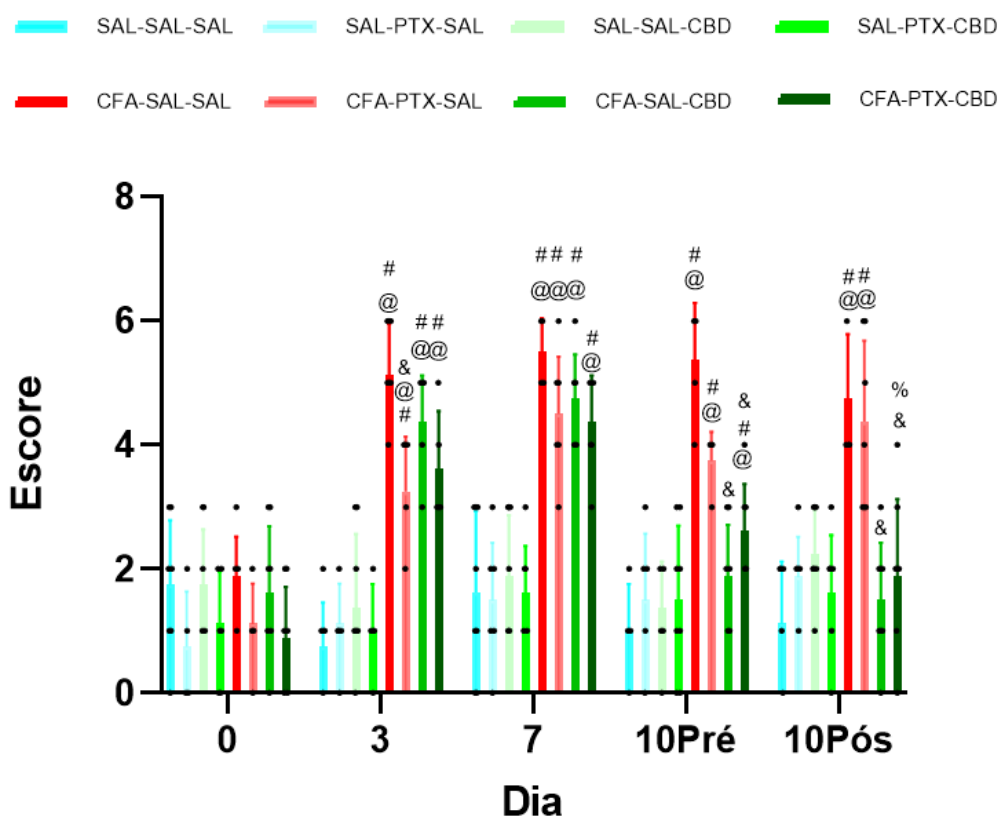
	SAL				CFA			
	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD
Basal	12,4 ± 1,1	12 ± 0,9	11,9 ± 1,5	11,7 ± 1,5	12,1 ± 1,4	12,2 ± 1,4	13,3 ± 1	12,2 ± 0,9
3	12,2 ± 2,4	11,9 ± 1,2	11,8 ± 1,4	11,7 ± 1,5	9,5 ± 2,1	8,9 ± 1,4@	9,5 ± 1,7@	9 ± 1@
7	12,8 ± 1,8	10,8 ± 1,5	12,6 ± 2	11,4 ± 1,1	8,4 ± 0,9@#	7,6 ± 1,5@#	9 ± 1,6@#	7,4 ± 2@#
10 Pré Tratamento	11,8 ± 1,9	10,6 ± 2,3	13,3 ± 1,1	12 ± 1,5	8,3 ± 1,6@#	7,3 ± 2,6@	9,4 ± 2,2@	11,8 ± 1,4 &%
10 Pós Tratamento	13,5 ± 1,1	11,6 ± 2,7	12,6 ± 2,3	13,9 ± 1,3	8,9 ± 1,7#	7,8 ± 2,2@#	11 ± 1,2#	12,1 ± 2,5

**Tabela 4:** Média ± Erro padrão da média da latência de retirada (s) no teste da placa quente em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade ao calor foi realizada no período basal, e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). #P < 0,05 Comparado ao grupo controle Salina (SAL-SAL-SAL). @P < 0,05 Comparado ao dia Basal (0). & P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). % P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

#### 4.1.3. Teste da Acetona: Efeitos antialodínicos térmicos ao frio do tratamento subcrônico com CBD.

Considerando a sensibilidade ao frio, os resultados do presente estudo mostraram que a inflamação periférica induzida pela administração intra-plantar de CFA promoveu aumento das respostas do tipo nociceptivas avaliadas no teste da acetona (Figura 15). Em adição, o tratamento com CBD reverteu estes efeitos enquanto que o pré-tratamento com PTX não alterou estas respostas (Figura 3). A ANOVA de duas vias apontou diferença estatisticamente significativa para a condição (F (4, 216) = 37,92; P < 0,05), para o tratamento (F (7, 56) = 56,58; P < 0,05) e para a interação (F (28, 224) = 8,541; P < 0,05). Para o grupo CFA-SAL-SAL, o pós-teste de Bonferroni indicou diferença significativa (P < 0,0001) em todos os dias do protocolo quando comparados ao dia basal (0), e ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL), indicando eficácia da inflamação. O grupo CFA-PTX-SAL também demonstrou diferença significativa em todos os dias do protocolo quando comparado ao dia basal e ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação e não indicando efeito significativo da picrotoxina *per se* na alodinia térmica ao frio. Para o grupo CFA-SAL-CBD, houve diferença significativa nos dias 3 e 7 quando comparado ao dia basal e ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação e diferença significativa no dia 10 pré-tratamento e 10 pós tratamento quando comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL), indicando reversão total do CBD na alodinia térmica ao frio. O grupo CFA-PTX-CBD demonstrou diferença significativa nos dias 3, 7 e 10 pré-tratamento quando comparado ao dia

basal e ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação e diferença significativa nos dias 10pré e 10 pós tratamento quando comparado ao grupo controle CFA, indicando reversão parcial no pré-tratamento e total no pós tratamento. O grupo CFA-PTX-CBD também demonstrou diferença significativa no dia 10 pós quando comparado ao grupo controle CBD (CFA-PTX-SAL) (Tabela 5), indicando participação do CBD na atenuação da alodinia térmica ao frio.



**Figura 15:** Avaliação da sensibilidade ao frio. Efeitos antialodínicos do canabidiol (CBD, 3 mg/kg) na sensibilidade térmica ao frio avaliado pelo teste da acetona em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade ao frio foi realizada no período basal (dia 0) e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média. n = 8 para cada grupo experimental. # P < 0,05 Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). @ P < 0,05 Comparado ao dia basal (0). & P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). % P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

	SAL				CFA			
	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD
<b>Basal</b>	1,7 ± 1	0,7 ± 0,86	1,7 ± 0,8	1,1 ± 0,8	1,8 ± 0,6	1,1 ± 0,6	1,6 ± 1	0,8 ± 0,8
<b>3</b>	0,7 ± 0,7	1,1 ± 0,6	1,3 ± 1,1	1 ± 0,7	5,1 ± 0,8@#	3,2 ± 0,8@#	4,3 ± 0,7@#	3,6 ± 0,9@#
<b>7</b>	1,6 ± 1,3	1,5 ± 0,9	1,8 ± 1	1,6 ± 0,7	5,5 ± 0,5@#	4,5 ± 0,9@#	4,7 ± 0,7@#	4,3 ± 0,7@#
<b>10 Pré Tratamento</b>	1 ± 0,7	1,5 ± 1	1,3 ± 0,7	1,5 ± 1,1	5,3 ± 0,9@#	3,7 ± 0,4@#	1,8 ± 0,8 &	2,6 ± 0,7 @#&
<b>10 Pós Tratamento</b>	1,1 ± 0,9	1,8 ± 0,6	2,2 ± 0,7	1,6 ± 0,9	4,7 ± 1@#	4,3 ± 1,3@#	1,5 ± 0,9 &	1,8 ± 1,2 &%

**Tabela5:** Média ± EPM do escore de resposta reflexa a alodinia térmica ao frio avaliado no teste da acetona. Efeitos antialodínicos do canabidiol (CBD, 3 mg/kg) em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade ao frio foi realizada no período basal, e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). #P<0.05 = Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). @P<0.05 = Comparado ao dia basal. &P<0.05 = Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). %P<0.05 = Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

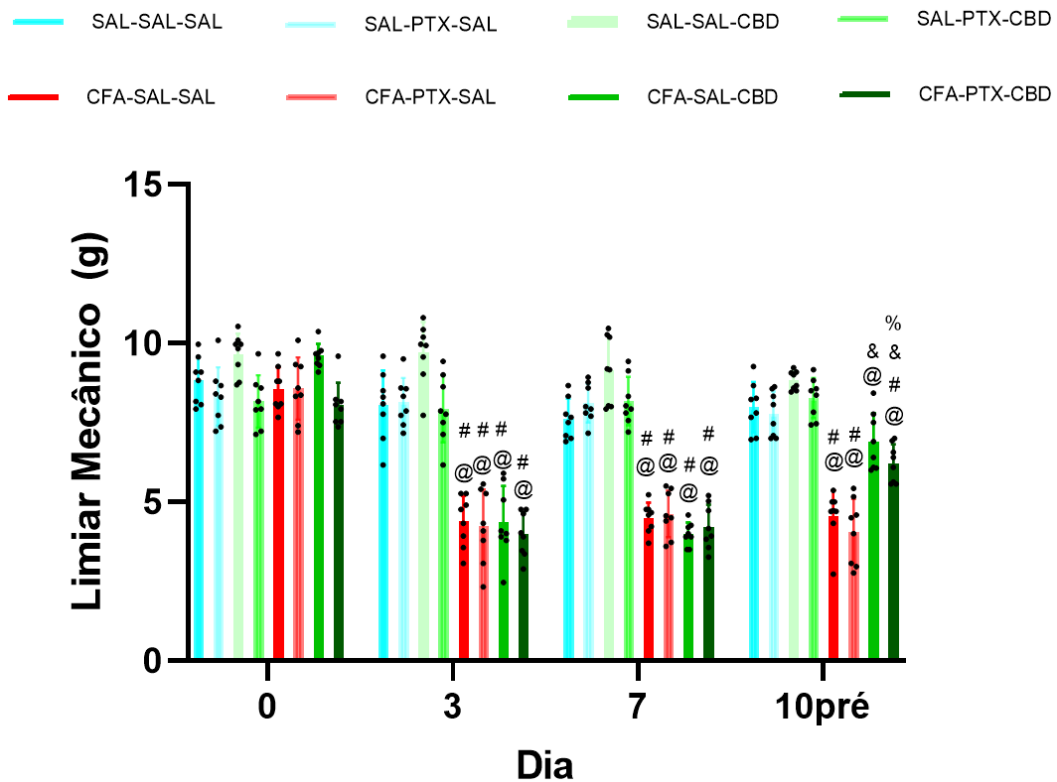
#### 4.2. **Experimento 2:** Avaliação qualitativa da dor em modelo de inflamação periférica persistente e efeito do tratamento com canabidiol.

No experimento 2, os grupos de camundongos foram submetidos a inflamação persistente por meio da administração intraplantar de CFA ou não (administração de solução estéril), ao tratamento sistêmico i.p. de CBD (3mg/kg), ou administração i.p. de veículo (salina estéril 0,9%) e a administração sistêmica i.p. de Picrotoxina (0,5mg/kg). Para os 8 grupos submetidos ao experimento 1 foram avaliadas duas variáveis, a inflamação ao longo do tempo (CFA ou SAL) e o tratamento (CBD ou Veículo) e (PTX ou Veículo). Os grupos de camundongos foram avaliados quanto à sensibilidade mecânica (teste de von Frey), para confirmar o desenvolvimento da inflamação periférica, e submetidos ao teste de fuga-esquiva, padronizado por LaBuda e Fuchs (2001) para análise do componente aversivo da dor. Em adição, foi realizado o teste do campo aberto para análise da atividade locomotora e do comportamento emocional.

##### 4.2.1. **Von Frey: Controle da infamação através do teste de von Frey e efeito subcrônico da administração de CBD na alodinia mecânica.**

Neste conjunto de experimentos, os grupos de animais foram submetidos a inflamação persistente por meio da administração de CFA ou não (administração de solução salina estéril) e avaliados no dia basal (dia 0), 3, 7 e 10 pré-tratamento no teste

de von Frey para controle do desenvolvimento da inflamação periférica persistente. No 8º dia após o início do processo inflamatório alguns grupos foram submetidos ao tratamento subcrônico de CBD durante 3 dias. Para os 8 grupos submetidos ao experimento 2 foram avaliadas duas variáveis, a inflamação ao longo do tempo (CFA ou SAL) e o tratamento (CBD ou Veículo). Os resultados obtidos confirmam os dados obtidos no protocolo 1 evidenciando que a administração de CF promoveu inflamação persistente com redução do limiar mecânico no teste do von Frey (Figura 16) e que o tratamento com CBD reverteu este efeito. A aplicação da ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa para a condição ( $F(3, 161) = 121, P < 0,05$ ), para o tratamento ( $F(7, 56) = 146,5: P < 0,05$ ) e para a interação ( $F(21, 168) = 15,49: P < 0,05$ ). Para o grupo CFA-SAL-SAL e CFA-PTX-SAL, o pós teste de Bonferroni indicou diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) em todos os dias do protocolo quando comparado ao dia basal e ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL), indicando eficácia da inflamação. Para o grupo CFA-SAL-CBD, observou-se diferença significativa em todos os dias quando comparado ao dia basal (dia 0), e no dia 3 e 7 quando comparado ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação. No dia 10 pré-tratamento, houve diferença significativa neste grupo quando comparado ao grupo controle CFA, indicando reversão total da alodinia mecânica pelo CBD. O grupo CFA-PTX-CBD demonstrou diferença significativa em todos os dias do protocolo quando comparado ao dia basal e ao grupo controle salina, indicando eficácia da inflamação e diferença significativa no dia 10 pré-tratamento quando comparado com o grupo controle CFA, indicando reversão parcial do CBD na alodinia mecânica.



**Figura 16:** Inflamação periférica persistente e efeito do tratamento subcrônico com canabidiol (CBD). Efeitos antialodínicos do canabidiol (CBD, 3 mg/kg, i.p.) na sensibilidade mecânica avaliada pelo teste de von Frey em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade mecânica foi realizada no período basal (dia 0) e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média. n = 8 para cada grupo experimental. # P < 0,05 Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). @ P < 0,05 = Comparado ao dia basal (0). & P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). % P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

	SAL				CFA			
	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD
Basal	8,8 ± 0,7	8,3 ± 0,9	9,6 ± 0,6	8,1 ± 0,8	8,5 ± 0,7	8,5 ± 1	9,6 ± 0,4	8 ± 0,7
3	8 ± 1	8,1 ± 0,7	9,7 ± 0,9	7,9 ± 1	4,3 ± 0,8@#	4,2 ± 1,1@#	4,3 ± 1,1@#	3,9 ± 0,7@#
7	7,6 ± 0,6	8,1 ± 0,6	9,1 ± 1	8,1 ± 0,7	4,5 ± 0,5@#	4,6 ± 0,7@#	3,9 ± 0,4@#	4,2 ± 0,7@#
10 Pré Tratamento	7,9 ± 0,8	7,7 ± 0,7	8,8 ± 0,3	8,2 ± 0,6	4,5 ± 0,8@#	4 ± 1@#	6,8 ± 0,9 @&	6,2 ± 0,6 @#&%

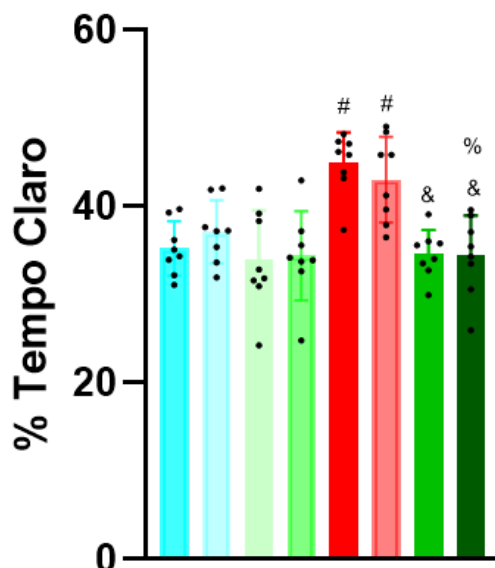
**Tabela 6:** Média ± Erro padrão da média do limiar de retirada de pata (g) no teste de von Frey em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de VEI ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). A avaliação da sensibilidade mecânica foi realizada no período basal, e nos dias 3, 7 10 (antes e após os tratamentos). #P < 0,05 Comparado ao grupo controle Salina (SAL-SAL-SAL). @P < 0,05 Comparado ao dia Basal (0). & P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). % P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

#### 4.2.2. PEAP: Efeitos do tratamento subcrônico com CBD no componente aversivo da dor.

No experimento 2, no último dia do protocolo experimental, após o teste de von Frey, os camundongos foram submetidos ao Paradigma de Fuga e Esquiva ao Local (PEAP) para avaliação do componente aversivo da dor. Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento subcrônico com CBD (3 mg/kg) reverteu o comportamento aversivo à dor (Figura 17). Adicionalmente, o pré-tratamento com picrotoxina (PTX) não alterou a resposta aversiva à dor per se, nem quando administrada previamente ao CBD (Figura 5). A aplicação da ANOVA de uma via indicou diferença estatisticamente significativa para o tratamento ( $F(7, 56) = 8,322$ ;  $P < 0,05$ ). Para o grupo CFA-SAL-SAL e CFA-PTX-SAL, o pós teste de Bonferroni indicou diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL), indicando eficácia da inflamação e não indicando efeito da picrotoxina na aversão a dor. Para os grupos CFA-SAL-CBD e CFA-PTX-CBD, houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle CFA, indicando reversão total da aversão a dor. Ainda, o teste de Bonferroni indicou diferença significativa do grupo CFA-PTX-CBD quando comparado com o grupo controle CBD (CFA-PTX-SAL), indicando participação do CBD na reversão da aversão a dor. Como dados complementares, a Tabela 7 demonstra os valores individuais de cada grupo, e destaca aqueles estatisticamente significativos na reversão da aversividade à dor.



— SAL-SAL-SAL    — SAL-PTX-SAL    — SAL-SAL-CBD    — SAL-PTX-CBD  
— CFA-SAL-SAL    — CFA-PTX-SAL    — CFA-SAL-CBD    — CFA-PTX-CBD



**Figura 17:** Avaliação qualitativa da dor inflamatória persistente. Efeitos do tratamento subcrônico com canabidiol (CBD, 3mg/kg, 3 dias, i.p.) na aversão a dor avaliada pelo teste do Paradigma de fuga/esquiva ao local em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). O teste PEAP foi realizado no 10º dia experimental. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média. n = 8 para cada grupo experimental. #P < 0,05 Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). &P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). %P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

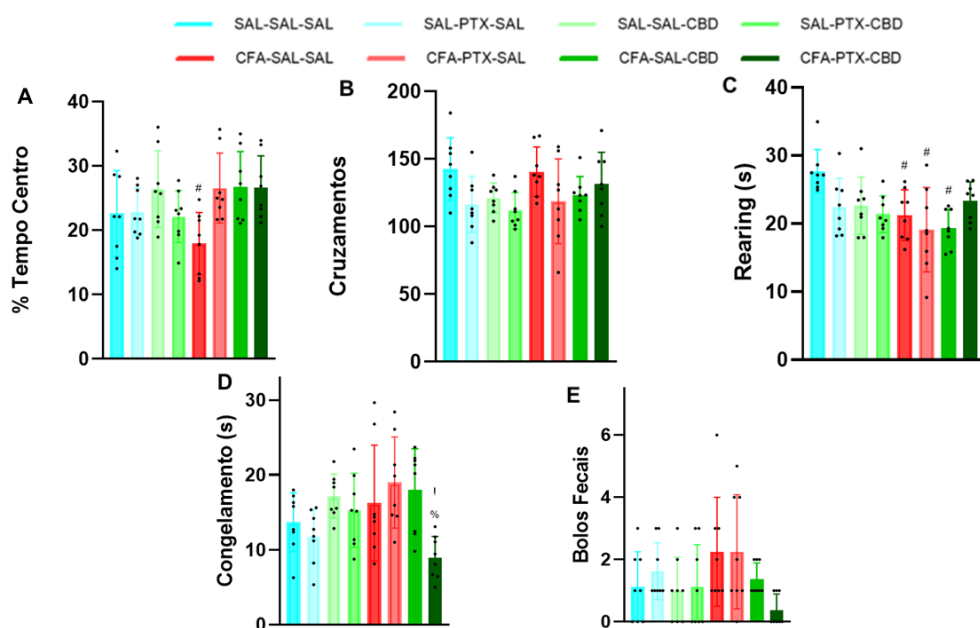
	SAL				CFA			
	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD
10 Pós Tratamento	35 ± 3	37 ± 3,5	33,8 ± 5,6	34,3 ± 5	44 ± 3,4 #	43 ± 4,8 #	34,5 ± 2,7 &	34,4 ± 4,5 &%

**Tabela 7:** Média ± Erro padrão da média da porcentagem de tempo no ambiente claro avaliado no teste do Paradigma de Fuga e Esquiva ao Local (PEAP) em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de VEI ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). #P < 0,05 Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). @P < 0,05 Comparado ao dia basal. &P < 0,05 Comparado ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL). %P < 0,05 = Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL).

#### **4.2.3. Campo Aberto: Efeitos do Tratamento subcrônico com CBD na alteração das respostas motoras e no comportamento emocional.**

No experimento 2, 5 minutos após o término do PEAP, os camundongos, dos diferentes grupos experimentais, foram submetidos ao teste do Campo Aberto para aferição das respostas motoras e do comportamento emocional do tipo ansioso. Para o teste do Campo Aberto foi avaliado somente o tratamento. Para a variável Tempo no Centro (Figura 18a), a ANOVA de uma via indicou diferença estatisticamente significativa para o tratamento ( $F(7, 56) = 2,981$ ;  $P < 0,05$ ). O pós teste de Bonferroni demonstrou que para os grupos CFA-PTX-SAL, CFA-SAL-CBD e CFA-PTX-CBD houve diferença significativa quando comparados ao grupo controle CFA (CFA-SAL-SAL), indicando reversão total da PTX e do CBD na redução do tempo no centro induzida pela administração de CFA. Considerando a atividade locomotora, a aplicação da ANOVA de uma via indicou resultado significativo para o tratamento ( $F(7, 56) = 2,448$ ;  $P < 0,05$ ), entretanto o pós teste de Bonferroni não foi evidenciado diferença significativa no número de cruzamentos nos distintos grupos experimentais (Figura 18B). Estes resultados mostram que não há alteração da atividade locomotora induzida pela inflamação persistente periférica, ou devido aos tratamentos realizados.

Na análise dos parâmetros etológicos, no parâmetro levantamentos ou exploração vertical (Rearing, Figura 18C), a aplicação da ANOVA de uma via indicou resultado significativo para o tratamento ( $F(7, 56) = 3,894$ ;  $P < 0,05$ ), entretanto o pós teste de Bonferroni não indicou diferença significativa entre os grupos experimentais realizados. Entretanto, considerando o tempo de Congelamento (Figura 18D), a ANOVA de uma via indicou resultado significativo para o tratamento ( $F(7, 56) = 3,700$ ;  $P < 0,05$ ). O pós teste de Bonferroni demonstrou que houve diferença significativa no grupo CFA-PTX-CBD quando comparado com os grupos controle CBD e PTX (CFA-PTX-SAL e CFA-SAL-CBD respectivamente, Figura 18D), indicando participação tanto da PTX quanto do CBD na reversão do comportamento do tipo ansioso, induzido pelo desenvolvimento da inflamação persistente. Por fim, considerando o número de bolos fecais, a aplicação da ANOVA de uma via não demonstrou resultado estatisticamente significativo para o tratamento ( $F(7, 56) = 2,140$ ;  $P = 0,0540$ ).



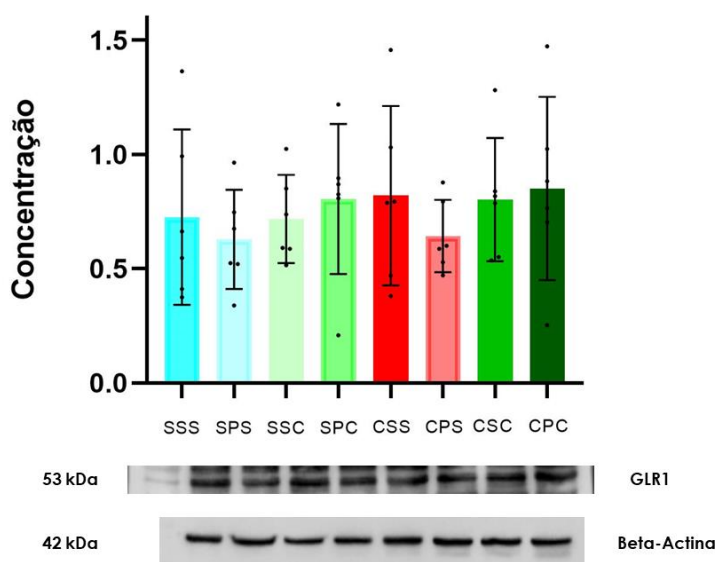
**Figura 18:** Avaliação da atividade locomotora e do comportamento emocional no teste do campo aberto. Efeitos da administração subcrônica (3 dias) de canabidiol (CBD, 3 mg/kg, i.p.) na porcentagem (%) de tempo no centro (A), no número de cruzamentos (B), no rearing (C, segundos), no tempo de congelamento (D, segundos) e no número de bolos fecais (E) em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). #P < 0,05 = Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). %P < 0,05 Comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL). !P < 0,05 Comparado ao grupo controle da PTX (CFA-SAL-CBD).

	SAL				CFA			
	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD	VEI + VEI	PTX + VEI	VEI + CBD	PTX + CBD
% Tempo no centro	22,6 ± 6,6	22,8 ± 3,7	26,4 ± 5,9	22,1 ± 4	17,9 ± 4,8#	26,5 ± 5,4	26,8 ± 5,4	26,6 ± 4,9
Cruzamentos	142 ± 23	116 ± 20	121 ± 10	111 ± 13	140 ± 18	118 ± 31	123 ± 13	131 ± 23
Rearing (s)	27,7 ± 3,1	22,4 ± 4,1	22,6 ± 4,2	21,3 ± 2,7	21,2 ± 3,7#	19 ± 6#	19 ± 2,7#	23,3 ± 2,8
Congelamento (s)	13,6 ± 3,9	11,8 ± 3,5	17,1 ± 2,9	15,2 ± 4,9	16,2 ± 7,7	18,9 ± 6	17,9 ± 5,5	8,9 ± 2,8 % !
Bolos Fecais	1,1 ± 1,1	1,6 ± 0,9	1 ± 1	1,1 ± 1,1	2,2 ± 1,7	2,2 ± 1,8	1,3 ± 0,5	0,3 ± 0,3

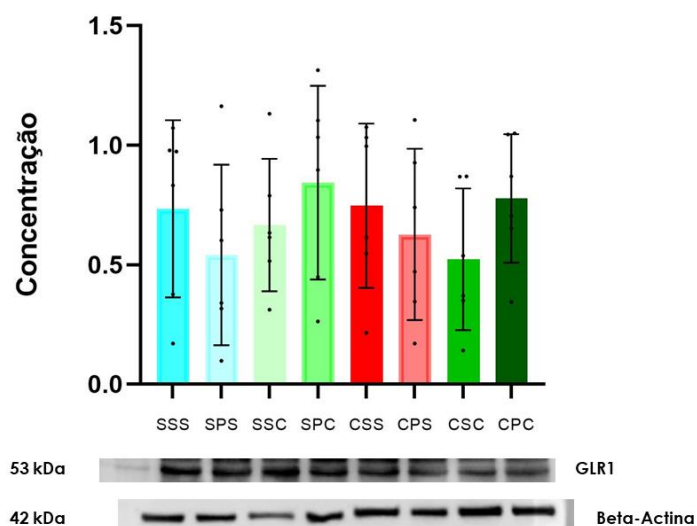
**Tabela 8:** Média ± EPM do valor das variáveis avaliadas no teste do Campo aberto realizado em camundongos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg), na porcentagem de tempo no centro (A), no número de cruzamentos (B), no rearing (C), no tempo de congelamento (D) e no número de bolos fecais (E) #P < 0,05 = Comparado ao grupo controle salina (SAL-SAL-SAL). %P < 0,05 comparado ao grupo controle do CBD (CFA-PTX-SAL). !P < 0,05 = Comparado ao grupo controle da PTX (CFA-SAL-CBD).

#### 4.3. Avaliação da expressão de receptores p-GLR1 na amígdala de camundongos com inflamação periférica.

Neste conjunto de resultados, avaliou-se a expressão de receptores p-GLR1 nos diferentes grupos experimentais realizados neste estudo. A realização desta análise foi realizada por meio da técnica de western blotting e os resultados estão apresentados nas Figuras 19 (animais do Protocolo 1) e 20 (animais do Protocolo 2). No experimento 1, a ANOVA de uma via (tratamento) para a expressão de p-GLR1 não revelou diferença estatisticamente significativo para nenhum dos grupos avaliados ( $F_{7,40} = 0,4420$ ,  $P = 0,8696$ , Figura 7). De forma similar, no experimento 2, a ANOVA de uma via (tratamento) para a expressão de p-GLR1 não evidenciou diferença estatisticamente significativo para nenhum dos grupos avaliados ( $F_{7,40} = 0,6691$ ,  $P = 0,6967$ , Figura 8).



**Figura 19:** Análise da expressão de receptores p-GLR1 na região da amígdala de camundongos (Experimento 1) com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). Abreviações: **CPC**= CFA-PTX-CBD. **CPS** = CFA-PTX-SAL. **CSC**= CFA-SAL-CBD. **CPS**= CFA-PTX-SAL. **SSC**= SAL-SAL-CBD. **SSS**= SAL-SAL-SAL. **SPC**= SAL-PTX-CBD. **SPS**= SAL-PTX-SAL. N = 7 para cada grupo experimental.



**Figura 20:** Análise da expressão de receptores p-GLR1 na região da amígdala de camundongos (Experimento 2) com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou não (administração de solução salina estéril, grupo controle SAL), e submetidos à administração de CBD precedido de veículo (VEI) ou picrotoxina (PTX, 0,5 mg/kg). Abreviações: **CPC**= CFA-PTX-CBD. **CPS** = CFA-PTX-SAL. **CSC**= CFA-SAL-CBD. **CPS**= CFA-PTX-SAL. **SSC**= SAL-SAL-CBD. **SSS**= SAL-SAL-SAL. **SPC**= SAL-PTX-CBD. **SPS**= SAL-PTX-SAL. N = 7 para cada grupo experimental.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou se o tratamento subcrônico com canabidiol é capaz de modular a dor inflamatória persistente, via Adjuvante Completo de Freund (CFA), e se neste mecanismo há participação de receptores de glicina, em um protocolo de 10 dias. Os resultados obtidos demonstraram que a administração intraplantar de CFA em camundongos machos da linhagem c57BL/6 induziu inflamação, resultando em alodinia mecânica no teste de von Frey, alodinia térmica ao frio, avaliada no teste da acetona, e hiperalgesia térmica ao calor, no teste da placa quente, assim como aversão à dor avaliado no Paradigma de Fuga e Esquiva (PEAP). Na análise do comportamento emocional, os resultados mostraram que a inflamação persistente desencadeou comportamento do tipo ansioso no campo aberto evidenciado pela redução da porcentagem de tempo no centro do grupo CFA, o que foi revertido pela administração do CBD.

Os resultados obtidos neste estudo, corroboram resultados previamente encontrados por outros autores (Li et al., 2005). A atuação do CFA ocorre mediante

liberação de mediadores inflamatórios, responsáveis por causar alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares no local da aplicação (Billiau e Matthys, 2001), assim como, ocorre a sensibilização de alguns centros encefálicos envolvidos com o processamento da dor. Em particular, estudos anteriores observaram que o CFA promove uma série de eventos celulares e vasculares, como a infiltração e a proliferação de leucócitos polimorfonucleares que potencializam o edema no local da aplicação (Medzhitov, 2010), causando dor inflamatória intensa (Burguess et al., 2000). O uso do CFA como agente inflamatório é um protocolo amplamente utilizado para estudar mecanismos envolvidos com a dor inflamatória, assim como estudar os efeitos antiinflamatórios de possíveis agentes terapêuticos (Fehrenbacher et al., 2012; Billiau e Matthys, 2001).

Em relação ao experimento 1, observamos que o tratamento subcrônico com CBD (3mg/kg) reverteu a alodinia mecânica induzida por CFA no teste de von Frey em função do aumento do limiar mecânico no dia 10 do protocolo quando comparado ao grupo controle CFA. Além disso, também observamos reversão total do CBD na alodinia térmica ao frio induzida por CFA no teste da acetona em função da diminuição dos comportamentos reflexos observados no dia 10 do protocolo e reversão parcial do CBD na hiperalgesia térmica ao calor avaliado pelo teste da placa quente, evidenciado pelo retorno da latência aos níveis do basal, no dia 10. Os resultados corroboram com achados anteriores que demonstraram os efeitos analgésicos e antiinflamatórios do CBD em modelos de dor inflamatória (Costa et al., 2007). A eficácia do tratamento subcrônico com baixas doses de CBD já foi evidenciada em outros estudos utilizando o modelo de dor pós-operatória, no qual foi observado redução na alodinia mecânica em ratos após o tratamento com CBD (Genaro et al., 2017) e também no modelo de dor neuropática induzida por CCI, no qual foi observado redução no limiar mecânico e na hiperalgesia térmica ao calor após tratamento com 20 mg/kg (Costa et al., 2007) ou 3 mg/kg (Silva-Cardoso et al., 2021) de CBD.

Já no experimento 2, observou-se que o tratamento com CBD 3mg/kg 30 min antes dos testes diminuiu a aversividade a dor avaliada no teste do Paradigma de Fuga e Esquiva (PEAP), mediante o aumento do tempo de exposição ao ambiente escuro quando comparado ao grupo controle CFA. Por conta do processo inflamatório induzido pela administração de CFA, o estabelecimento da dor inflamatória concede ao indivíduo a busca por contextos no qual existe o alívio da dor. Assim, ambientes associados com este alívio podem ser utilizado como critério para a avaliar o componente emocional da dor (Navratilova et al., 2013). No caso do PEAP, o ambiente claro é associado ao alívio, uma vez que neste ambiente é aplicado um estímulo na

pata não inflamada do animal, enquanto no ambiente escuro o estímulo é feito na pata inflamada. Diante disso, uma vez que nossos resultados demonstram aumento estatisticamente significativo do grupo tratado com CBD no ambiente escuro, sugere-se reversão da aversividade a dor pelo CBD.

O modelo animal reproduzido neste estudo busca compreender os possíveis mecanismos de atuação do CBD na atenuação da dor inflamatória, sendo a neurotransmissão glicinérgica o principal alvo de análise. No contexto da dor inflamatória, modelos animais são utilizados para buscar aumentar o entendimento das questões multidimensionais da dor, visto que os distúrbios crônicos inflamatórios não são constituídos de causa óbvia e podem ser influenciados por questões sociais e ambientais (Smith., 2016). Diante disso, o modelo de inflamação persistente via CFA busca compreender tais aspectos em roedores, no intuito de avaliar os efeitos de possíveis alternativas farmacológicas para quadros inflamatórios em humanos, como no caso da osteoartrite por exemplo. A osteoartrite é uma das doenças crônicas mais comuns no mundo, caracterizada por degeneração celular, dor e em alguns casos neuropatia (Mcdougall, 2006). Evidências sugerem que o surgimento da doença pode ocorrer em função do acúmulo de mediadores inflamatórios na articulação (Guermazi et al., 2011), induzindo a sensibilização periférica, e conseqüentemente a dor intensa (Krustev et al., 2015). Atualmente os tratamentos convencionais para a condição costumam perder a eficácia ao longo do tempo, e geram efeitos colaterais indesejáveis como irritabilidade gastrointestinal e problemas cardiovasculares, fazendo necessário o surgimento de novas alternativas farmacológicas capazes de inibir a inflamação, a neuropatia e a dor (Philpott et al., 2017), sem efeitos adversos significativos.

Diante desse contexto, o sistema endocanabinóide evidencia-se como um possível alvo terapêutico na modulação central e periférica da dor uma vez que os receptores CB1 e CB2, assim como os endocanabinóides desempenham ações analgésicas e sedativas, podendo ser comparados, inclusive, com a ação dos opioides. Além disso, diversos estudos descrevem o potencial uso dos canabinóides em patologias humanas como diabetes, fibromialgia, osteoartrite e esclerose múltipla, uma vez que as suas ações analgésicas podem ser utilizadas para diminuir a dor advinda destas condições (Lynch e Ware, 2015; Whiting et al., 2015), o que demonstra que o CBD pode ser uma alternativa viável para o tratamento da dor crônica e inflamatória (Vigil et al., 2018). Estudos com roedores em um modelo de osteoartrite demonstraram que a administração de CBD promoveu efeito antiinflamatório e analgésico (Hammelet al., 2016), entretanto neste estudo não foram evidenciados os mecanismos de atuação do CBD. Ainda, evidências literárias já observaram que o CBD atua diminuindo os níveis de

mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , e aumentando os níveis de interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Verrico et al., 2020).

Achados na literatura descrevem os efeitos do CBD utilizando diversas doses, havendo variabilidade considerável entre 3 mg/kg e 20 mg/kg (Costa et al., 2007; Degregorio et al., 2019; Genaro et al., 2017; Jesus et al., 2019). Silva-cardoso et al., (2021) demonstrou ao realizar uma curva dose-resposta que a dose de 3 mg/kg de CBD reverteu 96% no teste de von Frey, representando o melhor efeito no limiar mecânico entre as doses avaliadas. Ainda, outro estudo observou diminuição do limiar de retirada da pata no teste de von Frey em protocolo de osteoartrite após a administração sistêmica de CBD (Philpott et al., 2017). Tais achados corroboram com os resultados encontrados neste estudo utilizando a dose de 3 mg/kg, e evidenciam o potencial uso terapêutico do canabidiol e da ativação do sistema endocanabinóide na modulação da dor. Ainda, os efeitos positivos na atenuação da intensidade da dor inflamatória foram observados em pacientes tratados com CBD (Nugent et al., 2017), evidenciando os potenciais usos clínicos (Wade et al., 2003) e pré-clínicos (Costa et al., 2007; Ward et al., 2014) do CBD para o tratamento de condições relacionadas a dor inflamatória. Outro estudo demonstrou que a administração intra-amigdalóide de CBD atenuou a hipernocicepção em roedores (Tavares et al., 2020), corroborando com os achados encontrados neste estudo.

Mesmo os mecanismos de atuação do CBD ainda não sendo completamente elucidados, sabe-se que o CBD possui a capacidade de interagir com diversos receptores endógenos, resultando em ação terapêutica no tratamento de condições como depressão, epilepsia, psicose, inflamação e dor (Devinsky et al., 2014). Estudos sugerem que o CBD possui afinidade por receptores diferentes do  $\delta$ -9-THC e baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2 (Mechoulam, 2002). Sugere-se também que o CBD atue facilitando a sinalização de endocanabinóides via inibição da hidrólise enzimática da anandamida, e potencializando a sinalização mediada pela adenosina, por conta de inibir a sua recaptção ao ativar o canal iônico vanilóide do tipo 1 (TRPV1) (Bisogno et al., 2001), receptor este expresso nos terminais nervosos e ativado pela anandamida (Brown, 2007). Além disso, evidências demonstram que o CBD pode atuar sensibilizando a atividade de receptores glicinérgicos (IGli) (Hejazi et al., 2006; Yang et al., 2008; Ahrens et al., 2009 a,b; Demir et al., 2009; Foadi et al., 2010; Xiong et al., 2011, 2012; Yevens e Zeilhofer, 2011 a,b), inibindo a recaptção da enzima amido hidrolase de ácido graxo (FAAH), sensibilizando receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>. (Russo et al., 2007; Gomes et al., 2012), nicotínicos (naCh) e gabaérgicos (GABA<sub>A</sub>) (Fan, 1995; Barann et al., 2002. Oz et al., 2004; Hejazi et al., 2006; Xiong et al., 2008; Sigel et al., 2011).



Tanto no experimento 1 quanto no experimento 2, observamos a atenuação da dor inflamatória nos grupos tratados com CBD, corroborando os achados demonstrados acima. Entretanto, não observamos diferença significativa do grupo inflamado tratado com Salina e Picrotoxina (PTX) quando comparado ao respectivo grupo CFA, exceto para a variável tempo no centro no teste do campo aberto, indicando que a PTX, per se, não atenuou as respostas nociceptivas associadas à inflamação persistente, entretanto pode ter participado na modulação do comportamento do tipo ansioso. No grupo inflamado que recebeu administração de CBD associada com PTX ocorreu reversão parcial ou total das respostas nociceptivas em todos os testes do experimento 1, e reverteu a aversividade a dor no teste do PEAP, e a redução da porcentagem de tempo no centro no teste do campo aberto, indicando que a ação do CBD ocorreu mesmo na ausência de atividade dos receptores de glicina. A ação da PTX nos receptores de glicina vem sendo cada vez mais elucidada, entretanto os sítios ativos de cada subunidade e seus mecanismos inibitórios ainda não são bem definidos (Lynch, 2004). Achados na literatura demonstram que a PTX inibe diferentes subunidades dos receptores de Glicina (GliR), sendo as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  as mais sensíveis a PTX (Pribilla et al., 1992). Evidências sugerem que os mecanismos inibitórios da PTX ocorrem via resíduos de aminoácidos situados no domínio transmembrânico TM2 que formam o poro do canal iônico (Pribilla et al., 1992; French et al., 1993; Das e Dillon, 2005). Vale destacar que a estrutura dos receptores de glicina é constituída por cinco subunidades responsáveis em formar o canal iônico (Legendre, 2001). Ainda, Hawthorne e Lynch, 2005 demonstraram que a PTX deve, possivelmente, ligar-se no poro do canal iônico da subunidade  $\alpha 1$  dos receptores de Glicina, entretanto estudos também sugerem que a ação da PTX pode ser diferente mediante as diferentes subunidades em que ela possivelmente atua (Lynch, 2004).

Considerando o ensaio de Western Blotting, os nossos resultados não demonstraram diferenças significativas na expressão de p-GLR1 na amígdala entre os grupos avaliados. Tais achados corroboram com os resultados dos testes comportamentais, uma vez que os grupos tratados com CBD demonstraram resultados significativos na atenuação da dor inflamatória mesmo quando os receptores de glicina estavam antagonizados pela PTX. Como abordado anteriormente, os resultados do Western Blotting reforçam a possibilidade do CBD ter modulado a inflamação através de outras vias, como serotoninérgica e inibição da enzima FAAH, independente da atividade de receptores glicinérgicos, ou pelo menos daqueles antagonizados pela PTX.

Ao analisarmos somente os resultados dos testes nociceptivos, poderíamos assumir que o CBD modulou a inflamação mesmo sob a presença de PTX. Considerando

que PTX pode não ter antagonizado todos os receptores de glicina, o que poderia ser avaliado em projetos futuros por meio da utilização de agonistas dos receptores de glicina. Entretanto, com os resultados do Western Blotting não demonstrando aumento significativo da concentração de p-GLR1 nos grupos tratados com CBD, podemos assumir que a maior probabilidade é de que de fato o CBD atuou na modulação através de outra via, uma vez que caso tivesse atuado via receptores de glicina, era esperado aumento na concentração destes receptores nos grupos tratados com CBD, o que não ocorreu. Destaca-se que Lu et al. (2018) observou que a administração de CBD suprimiu a inflamação desencadeada pela administração de CFA, e observou posteriormente através da análise de Western Blotting que a expressão de p-GLR1 aumentou nos grupos administrados com CFA, sugerindo participação de p-GLR1 na dor inflamatória e modulação da analgesia pelo CBD. Outra observação foi a de que o efeito analgésico do CBD foi suprimido quando realizaram alteração de um dos sítios ativos do p-GLR1, sugerindo que o CBD atenua a dor inflamatória via p-GLR1. Por mais que estes resultados sustentem os nossos achados comportamentais de que o CBD atenua a dor inflamatória, ainda sim não observamos aumento significativo na expressão de p-GLR1 nos grupos tratados com CBD, possivelmente por conta da alta variabilidade encontrada em variáveis fisiológicas, ou por que de fato não houve modulação via GLR1. Diante disso, sugere-se para futuros trabalhos a possibilidade de avaliar outras vias de atuação do CBD, por exemplo, utilizando agonistas e antagonistas específicos, e buscando compreender de forma mais detalhada os mecanismos neuroquímicos do CBD.

Poucos estudos buscaram avaliar os efeitos da picrotoxina no comportamento do tipo ansioso em roedores, entretanto evidências demonstraram que a microinjeção de antagonistas dos GliRs na amígdala promoveu diminuição dos comportamentos do tipo ansioso avaliados através do teste do labirinto em cruz elevado (Mccool & Chappell, 2007), provavelmente por conta da alta afinidade da PTX pela subunidade  $\alpha 1$  dos GliRs (Yang et al., 2007). Entretanto, evidências também demonstraram que a administração de PTX no núcleo basolateral da amígdala (BLA) aumentou a ansiedade (Sanders, 1995), sugerindo a necessidade de novos estudos avaliando o comportamento da PTX na modulação do comportamento do tipo ansioso. Nossos resultados sugerem que a PTX pode ter atuado na modulação do comportamento do tipo ansioso uma vez que demonstrou resultado estatisticamente significativo na variável porcentagem de tempo no centro, avaliada no teste do campo aberto quando comparado ao grupo controle CFA, indicando atenuação da ansiedade pela PTX. Achados na literatura sustentam tais resultados, uma vez que observaram alta concentração de GliRs no BLA (Mccool & Botting, 2000), estrutura envolvida na modulação de comportamentos emocionais, tal

como do tipo ansioso, o que possivelmente justifica a modulação da PTX na porcentagem de tempo no centro considerando que a glicina pode promover efeito ansiogênico (Matheus et al., 1994; Teixeira e Carobrez, 1999).

Entretanto, no que diz respeito aos testes nociceptivos do experimento 1, a ausência de efeito da PTX pode ter ocorrido uma vez que a glicina demonstra efeito antiinflamatório e imunomodulador, atuando de forma neuroprotetora em diversos modelos experimentais, como demonstrado em um estudo no qual a administração de glicina diminuiu a lesão renal e hepática causada pela administração de drogas (Rose et al., 1999; Jacob et al., 2003). Os mecanismos antiinflamatórios de atuação da glicina ocorrem possivelmente via supressão da sinalização de cálcio na membrana plasmática, impedindo a estimulação da cascata de formação das citocinas e inibindo a ativação de marcadores inflamatórios como NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  (Zhong et al., 2003) e a formação de radicais livres (Mauriz et al., 2011). Levando em consideração tais evidências, sugere-se que a antagonização dos Glirs, via PTX, inibiu a atuação da glicina, e pode em parte ser responsável pela ausência de resultados da PTX observados neste estudo.

Da mesma forma, estudos sugerem que o CBD também possui afinidade pelos receptores de glicina, sendo a subunidade  $\alpha$ 1 um dos principais potenciais alvos da ação do CBD, inclusive podendo modular aspectos neuroprotetivos, analgésicos e antialodínicos em camundongos (Xiong et al., 2011). Ahrens et al., 2009 demonstraram que o CBD modula a funcionalidade dos receptores de glicina, interagindo tanto com a subunidade  $\alpha$ 1 quanto a subunidade  $\alpha$ 1 $\beta$ . Outro estudo demonstrou que a ativação destes receptores pode inibir o potencial de ação por meio da abertura de canais de cloro, ocasionando aumento da resistência do neurônio para a entrada de novos impulsos elétricos (Jentsch et al., 2002). Ainda, estudos sugerem que a ação do CBD sob os receptores de glicina pode compensar a falta de inibição que ocorre a nível espinhal em contexto de dor inflamatória (Zeilhofer, 2005; Harvey et al., 2004).

Apesar dos resultados promissores obtidos neste estudo, é importante considerar que o CBD possivelmente atuou na modulação da dor inflamatória através de outra via, uma vez que a antagonização dos receptores de glicina não foi suficiente para inibir a ação do CBD. Como citado previamente, estudos sugerem que o CBD também atua na modulação da dor inflamatória através de outras vias, como na inibição da enzima FAAH (Tavares et al., 2020), como um inibidor alostérico dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> (Russo et al., 2007; Gomes et al., 2012) e agonista dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> (Crippa, Zuardi, Hallak, 2010) e via ativação dos receptores TRPV1 (Bisogno et al.,

2001). Ainda, o mecanismo de inibição alostérica do CBD sobre os receptores 5HT<sub>3</sub> é tido na literatura como um dos principais mecanismos de modulação dos compostos canabinóides (Barann et al., 2002; Yang et al., 2010).

No que diz respeito a possível modulação do CBD via receptores serotoninérgicos, evidências demonstraram que a administração subcutânea de CBD durante o período de 7 dias aumentou a liberação de 5-HT pela dessensibilização dos receptores 5HT<sub>1A</sub> em roedores saudáveis. Ainda, os efeitos antinociceptivos observados do CBD foram bloqueados quando os receptores 5HT<sub>1A</sub> e TRPV1 foram antagonizados (De Gregorio et al., 2019). Além disso, outro estudo observou que a administração aguda de CBD produziu efeito antialodínico no teste do Von Frey, e que este efeito observado possivelmente foi mediado pela ativação do sistema serotoninérgico via receptores 5HT<sub>1A</sub>, uma vez que a administração de um antagonista seletivo do receptor 5HT<sub>1A</sub> bloqueou este efeito (Jesus et al., 2019). Barann et al., 2002 observou também que a administração de ondansetron, um potente antagonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub> (Milne et al., 1991), acabou modulando negativamente a ação antinociceptiva do CBD, uma vez que é capaz de bloquear o seu sítio alostérico e impedir a ligação do CBD ao receptor. Diante das evidências citadas, sugere-se que o CBD pode ter produzido os efeitos farmacológicos antiinflamatórios observados neste estudo em parte via neurotransmissão serotoninérgica (Yang et al., 2010).

Outra possível alternativa para os efeitos observados do CBD reside na habilidade do CBD em inibir a hidrólise de anandamida via inibição da atividade da enzima FAAH (Russo et al., 2007). Isso é, por conta da redução da atividade de FAAH, a concentração de AEA na fenda sináptica tende a aumentar, potencializando a ativação do sistema endocanabinóide via receptores CB1 e CB2. Maione et al., 2011 demonstrou que os níveis de anandamida e 2-AG aumentaram na substância cinzenta periaquedutal ventromedial após a microinjeção de CBD 3 nmol, indicando que o CBD pode indiretamente acabar atuando nos receptores CB1 e CB2, via aumento da concentração de AEA e 2-AG. Outro estudo demonstrou que a administração de CBD reduziu a inflamação em um modelo de osteoartrite (Philpott et al., 2017), entretanto quando ocorreu a administração de antagonistas de receptores CB2, os efeitos antiinflamatórios do CBD foram cessados. Outros achados também demonstraram que os efeitos antiinflamatórios do CBD foram bloqueados sob a administração do antagonista dos receptores CB1 AM251 (Maione et al., 2011). Tais achados corroboram com a ideia de que a atuação do CBD na atenuação da dor inflamatória pode ter ocorrido via inibição da enzima FAAH.

Achados literários também sugerem que o efeito do CBD observado neste estudo pode em parte ter ocorrido via ação em canais iônicos do tipo TRPV1. Bisogno et al. (2001) demonstraram que o CBD atua nos receptores TRPV1 potencializando os canais de cálcio e aumentando a sua concentração intracelular no mesmo nível que o agonista capsaicina, indicando que o CBD também atua como um agonista destes receptores. Além disso, achados observaram que o CBD possivelmente atue em outros receptores da família TRP, como o TRPV2 e TRPA1. Em outro estudo utilizando um modelo de convulsão em camundongos, a administração de 60 mg/kg de CBD atenuou o quadro convulsivo, entretanto após a administração de antagonistas dos receptores TRPV1, CB1 e CB2, o efeito observado do CBD foi revertido, sugerindo participação destes receptores na modulação do CBD (Vilela et al., 2017). Ainda, estudos sugerem que a administração de CBD nas doses de 3, 10, 20 e 40mg/kg possuem potencial de reverter o comportamento motivacional de camundongos administrados com cocaína, sendo que tal efeito inibitório no sistema de recompensa é revertido quando ocorre a administração de antagonistas dos receptores CB2, 5HT<sub>1A</sub> e TRPV1, indicando que o CBD pode atuar como um agonista nestes receptores (Russo et al., 2005; Bisogno et al., 2001).

Considerando o importante papel da neurotransmissão endocanabinóide e a atuação do CBD na modulação da inflamação, e de que a administração de baixa dose (3 mg/kg) promoveu efeito em (1) reverter a alodinia mecânica e térmica ao frio, (2) reverter a hiperalgesia térmica ao calor, (3) reverter a aversividade a dor e (4) compreender melhor os mecanismos de ação e as vias de atuação do CBD, os achados deste estudo demonstram ser relevantes para o enriquecimento na contribuição em desenvolver novas alternativas farmacológicas para o tratamento de diversas patologias caracterizadas por dor inflamatória, uma vez que esta condição está amplamente presente na vida das pessoas e reduz drasticamente a qualidade de vida. Embora o nosso trabalho tenha contribuído em elucidar os mecanismos de atuação do CBD através da neurotransmissão da glicina, e de que em parte o CBD possa atuar através de outras vias além da glicinérgica, os nossos resultados sugerem que novos estudos sejam feitos, buscando compreender outros mecanismos de ação do CBD e as particularidades de cada via.

## 6. CONCLUSÃO:

Sumarizando os resultados encontrados podem ser destacadas as seguintes conclusões:

- O tratamento subcrônico com CBD (3mg/kg) atenua a alodinia mecânica, alodinia térmica ao frio e a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela inflamação persistente por CFA.
- O tratamento subcrônico com CBD (3mg/kg) atenua a aversividade a dor e comportamentos do tipo ansioso induzidos pela inflamação persistente por CFA.
- O CBD possivelmente não modulou a dor inflamatória via neurotransmissão glicinérgica, uma vez que a antagonização dos receptores de glicina pela PTX não evitou os efeitos do CBD.
- A análise por ensaio de Western Blotting não indicou aumento significativo da expressão de p-GLR1 na amígdala dos animais tratados com CBD, indicando possível interação com outras vias.

## 7. REFERÊNCIAS:

- Ahrens, J., Demir, R., Leuwer, M., De-la-roche, J., Krampfl, K., Foadi, N., Karst, M., Haeseler, G. (2009). The nonpsychotropic cannabinoid cannabidiol modulates and directly activates alpha-1 and alpha-1-beta glycine receptor function. *Pharmacology*, v. 83, n. 4, p. 217-222.
- Ahrens, J. (2009). The nonpsychotropic cannabinoid cannabidiol modulates and directly activates alpha-1 and alpha-1-beta glycine receptor function. *Pharmacology*, v. 83, n. 4, p. 217-222.
- Almeida, T. P., Maia, J. Z., Fischer, C. D. B., Pinto, V. M., Pulz, R. S., Rodrigues, P. R. C. (2006) Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. *Veterinária em foco*, v. 3, n. 2, p. 107- 118.
- Amaral, D. G., Bassett, J.I. (1989). Cholinergic innervation of the monkey amygdala: an immunohistochemical analysis with antisera to choline acetyltransferase. *Journal of comparative neurology*, v. 281, n. 3, p. 337-361.
- Amaral, D.G., Insausti, R. (1992) Retrograde transport of d-[3 h]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. *Experimental brain research*, v. 88, p. 375-388.
- Baptista, D., Bussadori, K., Nunes-de-souza, R.L., Canto-de-souza, A. (2009) Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: influence of prior test experience. *Brain research*, v. 1294, p. 29-37.
- Barann, M., Molderings, G., Brüss, M., Bönisch, H., Urban, B.W., Göthert, M. (2002). Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *British journal of pharmacology*, v. 137, n. 5, p. 589-596.
- Basbaum, A. L., Fields, H. L. (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual rev. Neurosci.*, v. 7, p. 309-338.
- Basbaum, A. I. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- Berrino, L., Maione, S., Lampa, E., Rossi, F. (1993). Modulation by glycine on vascular effects of nmda: in vivo experimental research. *Amino acids*, 5: 239-244,
- Betz, H. (1991). Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends in neurosciences*, v. 14, n. 10, p. 458-461.
- Billiau, A., Matthys, P. (2001) modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases, *J leukoc Biol* 70(6) 849-860.
- Bisogno, T., Ganus, L., De Petrocellis L., Tchilibon, S., Ponde, D.I. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 134: 845-52.
- Blessing, E.M., Steenkamp, M.M., Manzanares, J., Marmar, C.R. (2015). Cannabidiol as a potential treatment for anxiety disorders. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 12, 825-836.

- Bloom, A.S., Dewey, W.L., Harris, L.W., Brosius, K.K. (1977). 9-nor-9-hydroxyhexahydrocannabinol a cannabinoid with potent antinociceptive activity: comparisons with morphine. *J pharmacol exp ther*, v. 200, p. 263-270.
- Bolles, R. C., Fanselow, M.S. (1980). A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and brain sciences*, v. 3, n. 2, p. 291-301.
- Bonica, J. J. (1990). General considerations of acute pain. *The management of pain*, p. 159-179.
- Brandão, M.I. (2005). *As bases biológicas do comportamento: introdução a neurociência*.
- Brown, A. J. (2007). Novel cannabinoid receptors. *British journal of pharmacology*, 152(5), 567-575.
- Burgess, G.M. (2000). Bradyzide, a potent non-peptide b2 bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *British journal of pharmacology*, v. 129, n. 1, p. 77-86.
- Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(7), 1377-1385.
- Bushnell, M. C., Ceko, M., Low, I. A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat rev neurosci*, v. 14, n. 7, p. 502-11.
- Campos, A.C., Fogaça, M.V., Sonego, A.B., Guimarães, F.S., (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Res.* 112, 119–127.
- Cardoso, G. K. R. D. S. (2022). *Canabidiol em modelo pré-clínico de dor neuropática: uma avaliação dos aspectos sensoriais, emocionais e inflamatórios relacionados com a modulação da sensibilidade dolorosa* (doctoral dissertation, universidade de são paulo).
- Carmans, S., Hendriks, J.J.A., Thewissen, K., Van-den-eynden., Stinissen, P., Rigo, J.M., Hellings, N. (2010) The inhibitory neurotransmitter glycine modulates macrophage activity by activation of neutral amino acid transporters. *Journal of neuroscience research*, v. 88, n. 11, p. 2420-2430,.
- Carobrez, A.P., Teixeira, K.V., Graeff, F.G. (2001) modulation of defensive behavior by periaqueductal gray nmda/glycine-b receptor. *Neuroscience and biobehavioural reviews*, 25: 697- 709.
- Carrier, E.J., Auchampach, J.A., Hillard, C.J. (2006). Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7895–7900.
- Chen, J., Song, Y., Yang, J., Zhang, Y., Zhao, p., zhu, X.J., Su, H.C. (2013). the contribution of tnf-alpha in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain. *Neurosci lett*, 541:275–280
- Costa, B., Trovato, A.E., Comelli, F., Gagnoni, G., Colleoni, M. (2007). The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 556, 75–83.



- Costa, B. (2007). The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *European journal of pharmacology*, v. 556, n. 1-3, p. 75-83.
- Crippa, J. A. S., Zuardi, A. W., & Hallak, J. E. (2010). Uso terapêutico dos canabinoides em psiquiatria. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 32, 556-566.
- Danober, L., Pape, H.C. mechanisms and functional significance of a slow inhibitory potential in neurons of the lateral amygdala. *European journal of neuroscience*, v. 10, n. 3, p. 853- 867.
- Das, P., Dillon, G. H. (2005). Molecular determinants of picrotoxin inhibition of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(1), 320-328.
- Davis, R.W. (1993). Phantom sensation, phantom pain, and stump pain. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, v. 74, n. 1, p. 79-91.
- De gregorio, D., Mclaughlin, R. J., Posa, L., Ochoa-sanchez, R., Enns, J., Lopez-canul, M., Gobbi, G. (2019). Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*, 160(1), 136.
- De petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., Di marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched cannabis extracts on trp channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1479–1494.
- Delaney, A.J., Sah, P. (1999). Gaba receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. *Journal of neuroscience*, v. 19, n. 22, p. 9698-9704.
- Demir, R., Leuwer, M., De-la-roche, J., Krampfl, K., Foadi, N., Karst, M., Dengler, R., Haeseler, G., Ahrens, J. (2009). Modulation of glycine receptor function by the synthetic cannabinoid hu210. *Pharmacology*, v. 83, n. 5, p. 270-274.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, I. A., Griffin, G., Mechoulam, R. (1993). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v. 258, p. 1946-1949.
- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-ruiz, J., French, J., Hill, C., ... & Friedman, D. (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791-802.
- Di marzo, V., Breivogel, C.S., Tao, Q., Bridgen, Q.T., Razdan, Q.K., Zimmer, A.M., Zimmer, A., Martin, B.R. (2000). Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in cb1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-cb1, non-cb2 receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *Journal of neurochemistry*, v. 75, n. 6, p. 2434-2444,
- Di marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De-petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in neurosciences*, v. 21, n. 12, p. 521-528.

- D'mello, R., Dickenson, Antony, H. (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *British journal of anaesthesia*, v. 101, n. 1, p. 8-16.
- Dray, A. (1995). Inflammatory mediators of pain. *British journal of anaesthesia*, v. 75, n. 2, p. 125- 131.
- Fan, P. (1995). Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors in rat nodose ganglion neurons. *Journal of neurophysiology*, v. 73, n. 2, p. 907-910.
- Fantoni, D.T., Mastrocinque, D.T. (2002) fisiopatologia e controle da dor. *Anestesia em cães e gatos*, p. 323-336.
- Fehrenbacher, J. C., Vasko, M. R., Duarte, D. B. (2012). Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Current Protocols in Pharmacology*, 56(1), 5-4.
- French-Constant, R. H., Rocheleau, T. A., Steichen, J. C., Chalmers, A. E. (1993). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, 363(6428), 449-451.
- Fields, H.L. (1999). Pain: an unpleasant topic. *Pain*, v. 82, p. S61-s69.
- Figueiredo, J. A., Petroianu, A., Correia, M. I. T. D., Castro Júnior, H. A. D., Speschit, W., Silveira, R. D. O. P., ... & Abrantes, M. M. (2009). Efeito da suplementação nutricional com glicina e glutamina, por via oral, na cicatrização colônica em coelhos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 36, 148-151.
- Foadi, N., Leuwer, M., Demir, R., Dengler, R., Buchholz, V., De-la-roche, J., Karst, M., Haeseler, G., Ahrens, J. (2010). Lack of positive allosteric modulation of mutated  $\alpha 1\beta 2\gamma 1$  glycine receptors by cannabinoids. *Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 381, n. 5, p. 477-482.
- Foadi, N., Leuwer, M., Demir, R., Dengler, R., Buchholz, V., De-la-roche, J., Karst, M., Haeseler, G., Ahrens, J. (2010). Lack of positive allosteric modulation of mutated  $\alpha 1\beta 2\gamma 1$  glycine receptors by cannabinoids. *Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 381, n. 5, p. 477- 482.
- Fujita, M., Sato, K., Sato, M., Inoue, T., Kozuka, T., Tohyama, M. (1991). Regional distribution of the cells expressing glycine receptor beta subunit mRNA in the rat brain. *Brain research*, 560: 23-37.
- Fujiwara, K., Kaminishi, Y., Inoue, Y., Yabuuchi, M. (1998). Monoclonal antibody monospecific to glycine for brain immunocytochemistry. *Brain research*, 806: 210-218.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646-1647.
- Gauriau, C., Bernard, J-F. (2002). Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Experimental physiology*, v. 87, n. 2, p. 251-258.
- Gebhart, G.F., Bielefeldt, K. (2011). Physiology of visceral pain. *Comprehensive physiology*, 6(4), 1609-1633.

- Genaro, K., Fabris, D., Arantes, A.L.F., Zuardi, A.A., Crippa, J.A.S., Prado, W.A. (2017). Cannabidiol is a potential therapeutic for the affective-motivational dimension of incision pain in rats. *Front. Pharmacol.* 8.
- Gilpin, N.W., Herman, M.A., Roberto, M. (2015). The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. *Biological psychiatry*, v. 77, n. 10, p. 859-869.
- Gomes, F. V., Reis, D. G., Alves, F. H., Corrêa, F. M., Guimaraes, F. S., Resstel, I. B. (2012). Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Journal of psychopharmacology*, 26(1), 104-113.
- Grenningloh, G., Pribilla, I., Prior, P., Multhaup, G., Beyreuther, K., Taleb, O., & Betz, H. (1990). Cloning and expression of the 58 kd  $\beta$  subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron*, 4(6), 963-970.
- Hanani, M. (2015). Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 412.
- Hartog, A., Leenders, I., Van-der-kraan, P.M., Garsen, J. (2007). Anti-inflammatory effects of orally ingested lactoferrin and glycine in different zymosan-induced inflammation models: evidence for synergistic activity. *International immunopharmacology*, v. 7, n. 13, p. 1784-1792,
- Harvey, R.I., Depner U.B., Wasse, H. (2004). Gyr alpha3: an essential target for spinal pge2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*; 304:884-887
- Hawthorne, R., & Lynch, J. W. (2005). A picrotoxin-specific conformational change in the glycine receptor M2-M3 loop. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 35836-35843.
- Heinricher, M. M., Mcgaraughty, S., Farr, D. A. (1999). The role of excitatory amino acid transmission within the rostral ventromedial medulla in the antinociceptive actions of systemically administered morphine. *Pain*, v. 81, n. 1-2, p. 57-65.
- Hejazi, N., Zhou, C., oz, M., Sun, H., Ye, J. H., Zhang, I. (2006).  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and endogenous cannabinoid anandamide directly potentiate the function of glycine receptors. *Molecular pharmacology*, 69(3), 991-997.
- Hill, M. N., Mcewen, B.S. (2010). Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, v. 34, n. 5, p. 791-797.
- Hohmann, A. G., Suplita, R. L. (2006). Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *The AAPS Journal*, v. 8, n. 4, p. 693-708.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., C, G., Casellas, P., Devane, W. A., Mechoulam, R. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 54, p. 161-202.
- Jacob, T., Ascher, E., Hingorani, A., Kallakuri, S. (2003). Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Surgery*, 134(3), 457-466..

- Janak, P. H., Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, v. 517, n. 7534, p. 284-292.
- Krustev, E., Rioux, D., & McDougall, J. J. (2015). Mechanisms and mediators that drive arthritis pain. *Current Osteoporosis Reports*, 13, 216-224.
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews*, 82, 503-568.
- Jessel, T. M., Basbaum, A. I. (2000). The bodily senses. In *Principles of Neural Science*, Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Eds.), McGraw-Hill, New York, p. 430-450.
- Jesus, C. H. A., Redivo, D. D. B., Gasparin, A. T., Sotomaior, B. B., de Carvalho, M. C., Genaro, K., ... & da Cunha, J. M. (2019). Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. *Brain Research*, 1715, 156-164.
- Ji, G., Neugebauer, V. (2007). Differential effects of CRF1 and CRF2 receptor antagonists on pain-related sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala. *Journal of Neurophysiology*, v. 97, n. 6, p. 3893-3904.
- Johnson, J. W., Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325, 529-531.
- Julius, D., Basbaum, A.I. (2010). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 203-210.
- Jürgens, U., & Lu, C. L. (1993). The effects of periaqueductally injected transmitter antagonists on forebrain-elicited vocalization in the squirrel monkey. *European Journal of Neuroscience*, 5(6), 735-741.
- Lariviere, W. R., Melzack, R. (2000). The role of corticotropin-releasing factor in pain and analgesia. *Pain*, v. 84, n. 1, p. 1-12.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, v. 23, n. 1, p. 155-184.
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and molecular life sciences cmls*, v. 58, n. 5, p. 760-793.
- Leite-Panissi, C. R. A., Brentegani, M. R., Menescal-de-Oliveira, L. (2004). Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 10, p. 1571-1579.
- Li, W. M., Cui, K. M., Li, N., Gu, Q. B., Schwarz, W., Ding, G. H., Wu, G. C. (2005). Analgesic effect of electroacupuncture on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: A model of antipain treatment by acupuncture in mice. *Japanese Journal of Physiology*, v. 55, n. 6, p. 339-344.
- Lin, Q., Peng, Y., & Willis, W. D. (1996). Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. *Journal of Neurophysiology*, 76(2), 1005-1014.

- Lin, Q., Peng, Y. B., Willis, W. D. (2006). Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, v. 60, n. 6, p. 645-649.
- Lobo, I. A., & Harris, R. A. (2005). Sites of alcohol and volatile anesthetic action on glycine receptors. *International review of neurobiology*, 65, 53-87.
- Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews*, 84(4), 1051-1095.
- Lynch, M. E., & Ware, M. A. (2015). Cannabinoids for the treatment of chronic non-cancer pain: An updated systematic review of randomized controlled trials. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 10, 293-301.
- Maione, S., Piscitelli, F., Gatta, L., Vita, D., De Petrocellis, L., Palazzo, E., Di Marzo, V. (2011). Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *British journal of pharmacology*, 162(3), 584-596.
- Makarovsky, I., Markel, G., Hoffman, A., Schein, O., Brosh-Nissimov, T., Tashma, Z., Dushnitsky, T., Eisenkraft, A. (2008). Strychnine - a killer from the past. *Israel Medical Association Journal: IMAJ*, v. 10, n. 2, p. 142-145.
- Mamet, J., Lazdunski, M., Voilley, N. (2003). How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 49, p. 48907-48913.
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature reviews neuroscience*, v. 13, n. 2, p. 107-120.
- Mason, P., & Gao, K. (1998). Raphe magnus serotonergic neurons tonically modulate nociceptive transmission. *Pain Forum*, 7(3), 143-150.
- Matheus, M. G., Nogueira, R. L., Carobrez, A. P., Graeff, F. G., & Guimarães, F. S. (1994). Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*, 113, 565-569.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, n. 6284, p. 561-564.
- Mauriz, J. L., Matilla, B., Culebras, J. M., González, P., González-Gallego, J. (2001). Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, n. 10, p. 1236-1244.
- McCool, B. A., Botting, S. K. (2000). Characterization of strychnine-sensitive glycine receptors in acutely isolated adult rat basolateral amygdala neurons. *Brain Research*, v. 859, n. 2, p. 341-351.
- McCool, B. A., Chappell, A. (2007). Strychnine and taurine modulation of amygdala-associated anxiety-like behavior is 'state' dependent. *Behavioural brain research*, 178(1), 70-81.

- McCool, B. A., Farroni, J. S. (2001). Subunit composition of strychnine-sensitive glycine receptors expressed by adult rat basolateral amygdala neurons. *European Journal of Neuroscience*, v. 14, n. 7, p. 1082-1090.
- McDougall, J. J. (2006). Arthritis and pain: Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Research & Therapy*, 8, 1-10.
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience*, v. 27, p. 1-28.
- Mechoulam, R., Hanus, L. (2002). Cannabidiol: An overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 121, p. 35-43.
- Mechoulam, R., Parker, L. A., & Gallily, R. (2002). Cannabidiol: An overview of some pharmacological aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(s1), 11s-19s.
- Mechoulam, R., Shvo, Y., Hashish, I. (1963). The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*, v. 19, p. 2073-2078.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-776.
- Melzack, R. (1999). From the gate to the neuromatrix. *Pain*, v. 6, p. S121-126.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57, 1-164.
- Min, B. I., Kim, C. J., Rhee, J. S., Akaike, N. (1996). Modulation of glycine-induced chloride current in acutely dissociated rat periaqueductal gray neurons by mu-opioid agonist, DAGO. *Brain Research*, 734, 72-78.
- Mikalauskas, S., Mikalauskiene, L., Bruns, H., Nickkholgh, A., Hoffmann, K., Longerich, T., ... & Schemmer, P. (2011). Dietary glycine protects from chemotherapy-induced hepatotoxicity. *Amino Acids*, 40, 1139-1150.
- Mogil, J. S. (2015). Social modulation of and by pain in humans and rodents. *Pain*, v. 156, p. 35-41.
- Morales, P., Reggio, P. H., & Jagerovic, N. (2017). An overview on medicinal chemistry of synthetic and natural derivatives of cannabidiol. *Frontiers in pharmacology*, 8, 422.
- Morena, M., Patel, S., Bains, J. S., & Hill, M. N. (2016). Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacology*, v. 41, p. 80-102.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, p. 61-65.
- Nackley, A. G. (2003). Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses spinal Fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience*, v. 119, p. 747-757.
- Navratilova, E., Xie, J. Y., King, T., & Porreca, F. (2013). Evaluation of reward from pain relief. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1282(1), 1-11.

- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Edition. W. H. Freeman.
- Neugebauer, V., Galhardo, V., Maione, S., Mackey, S. C. (2009). Forebrain pain mechanisms. *Brain Research Reviews*, v. 60, n. 1, p. 226-242.
- Nugent, S. M., Morasco, B. J., O'Neil, M. E., Freeman, M., Low, A., Kondo, K., ... & Kansagara, D. (2017). The effects of cannabis among adults with chronic pain and an overview of general harms: a systematic review. *Annals of internal medicine*, 167(5), 319-331.
- Nunes-de-Souza, R. L., Canto-de-Souza, A., Da-Costa, M., Fornari, R. V., Graeff, F. G., Pelá, I. R. (2000). Anxiety-induced antinociception in mice: Effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology*, v. 150, n. 3, p. 300-310.
- Onaka, M., Minami, T., Nishihara, I., Ito, S. (1996). Involvement of glutamate receptors in strychnine- and bicuculine-induced allodynia in conscious mice. *Anesthesiology*, 84, 1215-1222.
- Oz, M., Zhang, L., Ravindran, A., Morales, M., Lupica, C. R. (2004). Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 310, n. 3, p. 1152-1160.
- Palacios, J. M., Mengod, G., Sarasa, M., Vilaro, M. T., Pompeiano, M., Martinez-Mir, M. I. (1991). The use of in situ hybridization histochemistry for the analysis of neurotransmitter receptor expression at the microscopic level. *The Journal of Receptor Research*, 11, 459-472.
- Philpott, H. T., O'Brien, M., & McDougall, J. J. (2017). Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis. *Pain*, 158(12), 2442.
- Piomelli, D. (2005). The endocannabinoid system: A drug discovery perspective. *Current Opinion in Investigational Drugs* (London, England: 2000), v. 6, n. 7, p. 672-679.
- Ploghaus, A., Becerra, L., Borras, C., Borsook, D. (2003). Neural circuitry underlying pain modulation: expectation, hypnosis, placebo. *Trends cogn sci*, v. 7, n. 5, p. 197-200.
- Pourcho, R. G., Goebel, D. J., Jojich, L., Hazlett, J. C. (1992). Immunocytochemical evidence for the involvement of glycine in sensory centers of the rat brain. *Neuroscience*, v. 46, n. 3, p. 643-656.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J., & Betz, H. (1992). The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *The EMBO journal*, 11(12), 4305-4311.
- Rajendra, S., Lynch, J. W., & Schofield, P. R. (1997). The glycine receptor. *Pharmacology & therapeutics*, 73(2), 121-146.
- Renno, W. M., Mullet, M. A., Beitz, A. J. (1992). Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Research*, 594, 221-232.

- Rhudy, J. L., Meagher, M. W. (2000). Fear and anxiety: Divergent effects on human pain thresholds. *Pain*, v. 84, n. 1, p. 65-75.
- Rodrigues Tavares, L. A., Petrilli, L. A., Baptista-de-Souza, D., Canto-de-Souza, L., Planeta, C. D. S., Guimarães, F. S., ... & Canto-de-Souza, A. (2023). Cannabidiol Treatment Shows Therapeutic Efficacy in a Rodent Model of Social Transfer of Pain in Pair-Housed Male Mice. *Cannabis and Cannabinoid Research*.
- Rose, M. L., Rusyn, I., Bojes, H. K., Germolec, D., Luster, M., Thurman, R. G. (1999). Role of Kupffer cells in peroxisome proliferators-induced hepatocyte proliferation. *Drug Metabolism Reviews*.
- Rose, M. L., Madren, J., Bunzendahl, H., & Thurman, R. G. (1999). Dietary glycine inhibits the growth of B16 melanoma tumors in mice. *Carcinogenesis*, 20(5), 793-798.
- Russo, E. B., Guy, G. W., & Robson, P. J. (2007). Cannabis, pain, and sleep: Lessons from therapeutic clinical trials of Sativex®, a cannabis-based medicine. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1729-1743.
- Russo, E. B., Burnett, A., Hall, B., Parker, K. K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1A receptors. *Neurochemical Research*, 30, 1037–1043.
- Russo, E. B., & Hohmann, A. G. (2012). Role of cannabinoids in pain management. In *Comprehensive Treatment of Chronic Pain by Medical, Interventional, and Integrative Approaches: The AMERICAN ACADEMY OF PAIN MEDICINE Textbook on Patient Management* (pp. 181-197).
- Sagar, S. S., Busch, B. K., & Jowett, S. (2010). Success and failure, fear of failure, and coping responses of adolescent academy football players. *Journal of Applied Sport Psychology*, v. 22, p. 213-230.
- Sah, P., Faber, E. S. L., Lopes-de-Armentia, M., Power, J. (2003). The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, v. 83, n. 3, p. 803-834.
- Sanders, S. K., & Shekhar, A. (1995). Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(4), 701-706.
- Schaible, H-S., Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbeck's archives of surgery*, v. 389, p. 237-243.
- Sherman, S. E., Luo, L., Dostrovsky, J. O. (1997). Spinal strychnine alters response properties of nociceptive-specific neurons in rat medial thalamus. *Journal of Neurophysiology*, v. 78, n. 2, p. 628-637.
- Shi, C., Davis, M. (1999). Pain pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: Lesion studies. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 1, p. 420-430.
- Sigel, E., Baur, R., Rácz, I., Marazzi, J., Smart, T. G., Zimmer, A., & Gertsch, J. (2011). The major central endocannabinoid directly acts at GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18150-18155.
- Spampanato, J., Polepalli, J., Sah, P. (2011). Interneurons in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, v. 60, n. 5, p. 765-773.
- Stoffels, B., Türler, A., Schmidt, J., Nazir, A., Tsukamoto, T., Moore, B. A., Schnurr, C., Kalff, J. C., Bauer, A. J. (2011). Anti-inflammatory role of glycine in reducing rodent



- postoperative inflammatory ileus. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 23, n. 1, p. 76-8.
- Tavares, L.R.R., Baptista-de-souza, D., Canto-de-souza, A. (2018). Activation of 5-HT<sub>2c</sub> (but not 5-HT<sub>1a</sub>) receptors in the amygdala enhances fear-induced antinociception: blockade with local 5-HT<sub>2c</sub> antagonist or systemic fluoxetine. *Neuropharmacology*, v. 135, p. 376-385.
- Tavares, L. R. R. (2020). Os sistemas serotoninérgico, gabaérgico e endocanabinoide da amígdala medeiam a empatia relacionada à nocicepção em camundongos.
- Teixeira, K. V., Carobrez, A. P. (1999). Effects of glycine or (±)-3-amino-L-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behavioral neuroscience*, 113(1), 196.
- Thomas, B. F., Gilliam, A. F., Burch, D. F., Roche, M. J. (1998). Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285, 285–292.
- Turner, C. E., Elsohly, M. A., Boeren, E. G. (1980). Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of Natural Products*, 43, 169–234.
- Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C. (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 291, n. 5, p. E965-E973.
- Urban, M. O., Gebhart, G. F. (1999). Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 96, n. 14, p. 7687-7692.
- Vanderah, T.W. (2007). Pathophysiology of pain. *Medical clinics*, v. 91, n. 1, p. 1-12.
- Vanegas, H., Schaible, H. G. (2004). Descending control of persistent pain: Inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews*, v. 46, n. 3, p. 295-309.
- Verrico, C. D., Wesson, S., Konduri, V., Hofferek, C. J., Vazquez-Perez, J., Blair, E., Halpert, M. M. (2020). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of daily cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis pain. *Pain*, 161(9), 2191.
- Vigil, J. M., Stith, S. S., Diviant, J. P., Brockelman, F., Keeling, K., & Hall, B. (2018). Effectiveness of raw, natural medical cannabis flower for treating insomnia under naturalistic conditions. *Medicines*, 5(3), 75.
- Viu, E., Zapata, A., Capdevila, J. L., Fossom, L. H., Skolnick, P., Trullas, R. (1998). Glycine site antagonists and partial agonists inhibit N-methyl-D-aspartate receptor-mediated 3H-arachidonic acid release in cerebellar granule cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285, 527-532.
- Wade, D. T., Robson, P., House, H., Makela, P., & Aram, J. (2003). A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms.

- Wagner, A. F., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schäfer, W., Knappe, J. (1992). The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-743. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Walker, J. M., Hohmann, A. G. (2005). Cannabinoid mechanisms of pain suppression. In: *Cannabinoids*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 509-554.
- Wall, P. D. (1991). Neuropathic pain and injured nerve: Central mechanisms. *British Medical Bulletin*, v. 47, n. 3, p. 631-643.
- Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., ... & Kleijnen, J. (2015). Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 313(24), 2456-2473.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet*, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964.
- Xiong, W., Cheng, K., Cui, T., Godlewski, G., Rice, K. C., Xu, Y., Zhang, L. (2011). Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nature Chemical Biology*, v. 7, n. 5, p. 296-303.
- Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S.-R., Willenbring, D., Guan, Y., Pan, H.-L., Ren, K., Xu, Y., Zhang, L. (2012). Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting  $\alpha 3$  glycine receptors. *Journal of Experimental Medicine*, v. 209, n. 6, p. 1121-1134.
- Yang, Z., Cromer, B. A., Harvey, R. J., Parker, M. W., & Lynch, J. W. (2007). A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *Journal of neurochemistry*, 103(2), 580-589.
- Yang, Z., Aubrey, K. R., Alroy, I., Harvey, R. J., Vandenberg, R. J., Lynch, J. W. (2008). Subunit-specific modulation of glycine receptors by cannabinoids and N-arachidonyl-glycine. *Biochemical Pharmacology*, v. 76, n. 8, p. 1014-1023.
- Yevenes, G. E., Zeilhofer, H. U. (2011). Allosteric modulation of glycine receptors. *British Journal of Pharmacology*, v. 164, n. 2, p. 224-236.
- Zeilhofer H.U. (2005). The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell mol life sci*; 62:2027–2035.
- Zeilhofer, H. U., Benke, D., & Yevenes, G. E. (2012). Chronic pain states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 111-133.
- Zhong, Z., Wheeler, M. D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M. (2003). Glycine: A novel anti-inflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*.
- Zuardi, A. W., Rodrigues, J. A., Cunha, J. M. (1991). Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl.)*, 104, 260–264.



**AUTORIZAÇÃO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do envolvimento do sistema canabinóide e dos receptores de glicina na dor inflamatória persistente em ratos machos e fêmeas", registrado no processo nº 21.1.720.59.6, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi e Leonardo Abdelnur Petrilli** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (CEUA-FFCLRP) em reunião de 12/11/2021.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/12/2021 a 30/11/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	128 (M) e 128 (F)
Peso/idade	20-25g / 8 a 10 semanas
Sexo	Macho (128) e Fêmea (128)
Origem	Biotério Central da USP - Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 16 de novembro de 2021.

Prof. Dr. Wilfried Klein  
 Coordenador da CEUA FFCLRP