

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**RAFAELA SILVA DOS SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO CANABIDIOL SOBRE A ATIVAÇÃO DE  
CÉLULAS DA GLIA EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR  
PACLITAXEL E LPS**

Alfenas/MG  
2020

**RAFAELA SILVA DOS SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO CANABIDIOL SOBRE A ATIVAÇÃO DE  
CÉLULAS DA GLIA EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR  
PACLITAXEL E LPS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG.  
Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.  
Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Santos, Rafaela Silva dos.  
S237i      Investigação do efeito do canabidiol sobre a ativação de células da glia em modelos de nocicepção induzida por paclitaxel e LPS / Rafaela Silva dos Santos. -- Alfenas/MG; 2020.  
127f. il. --

Orientador: Giovane Galdino de Souza.  
Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.  
Bibliografia.

1. Dor. 2. Canabidiol. 3. Neuroglia. I Souza, Giovane Galdino de. II  
Titulo.

612

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá  
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

Rafaela Silva dos Santos

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO CANABIDIOL SOBRE A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DA GLIA EM  
MODELOS DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR DAMP E PAMPS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG. Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Aprovada em: 30 de julho de 2020

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Roseli Soncini  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira (UFMG)  
Instituição: Universidade Federal Minas Gerais  
UFMG

Prof. Dr. Pedro Henrique Gobira Nunes  
Instituição: Universidade de São Paulo  
USP

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Henrique Gobira Nunes, Usuário Externo**, em 30/07/2020, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Speroni Ceron, Professor do Magistério Superior**, em 30/07/2020, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roseli Soncini, Professor do Magistério Superior**, em 30/07/2020, às 20:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galvão de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2020, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabício de Araújo Moreira, Usuário Externo**, em 04/08/2020, às 08:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sea/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sea/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0350013 e o código CRC 98F1FF3D.

*Dedico este trabalho à toda minha família  
e ao Bruno com todo o meu amor...*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, o Senhor Soberano da minha vida, pelo dom da sabedoria, paciência nos momentos difíceis, por estar sempre presente nos meus caminhos.

À minha Nossa Senhora, por nunca me desamparar, por sempre ter me colocado debaixo do seu manto sagrado, mesmo nos momentos de desespero.

Ao meu orientador Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza, pela brilhante orientação, paciência, pelos conhecimentos infinitos, por ter me dado a oportunidade de realizar pesquisa em um país que não oferece incentivo algum. Por ter me ensinado que ainda é possível acreditar no SER HUMANO...Ele é meu exemplo de caráter, profissional, pesquisador e acima de tudo um SER HUMANO excepcional.

À Família Buscapé, Tia, Valdimir, Mi, Aninha, Filipe, Laís, Miguel, Zezé, Júlio, Dinho, Iara, Gu, Bela, Lolo, Nenzinho, João, Victor, Diego, Karla, Fio, Dri, Gabriel, Gui, Padrinho, Cléu, Dudu e Nando pelas orações, por sempre ter me apoiado e acreditado no meu potencial e nos meus sonhos.

À minha amada Voía, pelo exemplo que é na minha vida, por nunca ter me abandonado, pelas vezes que foi comigo apenas de companhia no laboratório no Natal, Ano Novo, Carnaval, mesmo sem saber sobre o meu trabalho, sempre disse com muito orgulho..."A minha neta trabalha com os ratinhos!!!!"

Aos meus pais, por muitas vezes, terem deixado de realizarem seus sonhos para que os meus fossem concretizados.

Aos meus irmãos Juninho e Rany pela confiança.

Ao meu noivo Bruno, por em tão pouco tempo, ter me mostrado o verdadeiro significado do amor e do companheirismo, por estar presente em todos os momentos...te amo!

Aos meus amores, Raul, Pedro e Mel pelo amor incondicional e pela doçura que vejo todos os dias nos seus olhares.

À Família Insetos: Pedro, Júlia e Fred por terem se tornado essenciais na minha vida, pelas risadas, pelas lágrimas, por estarem presente mesmo a muitos quilômetros de distância...Amo vocês pra sempre!

À minha querida amiga e irmã Letícia, por ter dividido comigo os melhores e piores momentos desta jornada...amo você!

Aos amigos, Luís, Ju e Lu pelas nossas conversas e cafés de todos os dias...

A secretária Adriana por sempre estar disposta a ajudar.

Aos animais, por terem doado suas vidas para a realização deste trabalho.

À UNIFAL, CAPES E FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma fizeram parte deste projeto!!!



*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore,  
dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine  
sem aplausos.”*

*Autor desconhecido*

## RESUMO

Ao longo da vida, a dor tanto de característica aguda quanto crônica, é uma das razões para a maior frequência de visitas médicas e um dos motivos mais comuns para o uso de medicamentos, além de ser uma das principais causas de incapacidade no trabalho. A dor crônica afeta o funcionamento físico e mental, a qualidade de vida e a produtividade dos indivíduos afetados. Estudos têm demonstrado que a dor causa ativação das células da glia com aumento da expressão do *Toll-like receptors* (TLR4). Os TLR4 reconhecem ligantes endógenos e exógenos DAMPS (padrões moleculares associados ao dano) e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) não só envolvidos com a infecção ou lesão, mas também com outros processos fisiopatológicos como a dor. Assim várias estratégias de tratamento têm sido desenvolvidas para controlar esse sintoma, como o tratamento com canabidiol (CBD), um fitocanabinóide. Os receptores canabinóides do tipo 2 (CB<sub>2</sub>), expressos em tecidos periféricos e células inflamatórias, parecem estar envolvidos na antinocicepção induzida pelo CBD. Além disso, estudos têm demonstrado que tais receptores também estejam expressos no Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo células gliais. Sendo assim, o presente estudo investigou o efeito do CBD na dor neuropática induzida por paclitaxel (PTX) e na nocicepção induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, foram utilizados camundongos *Swiss*, pesando entre 25 a 30g. O limiar nociceptivo foi avaliado pelo teste de filamentos de Von Frey. O modelo de dor neuropática foi induzido pela injeção intraperitoneal de PTX e o modelo de nocicepção induzido por PAMP, pela injeção intratecal de LPS. Para verificar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi realizado o ensaio de ELISA. Foram utilizadas as drogas, AM630, para investigar a participação de receptores CB<sub>2</sub>, a dosagem de anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), para avaliar a participação de endocanabinóides, a minociclina e o fluorocitrato, para investigar o envolvimento da micróglia e do astrócito e o LPS-RS para verificar a participação do receptor TLR4. Também foi realizado o ensaio de western blot para averiguar o efeito do CBD sobre os níveis da expressão do receptor CB<sub>2</sub>, IBA-1, GFAP e TLR4, além da imunofluorescência para avaliar a co-localização dos receptores CB<sub>2</sub>/TLR4 no corno da raiz dorsal da medula espinhal. Após 4 dias de tratamento com PTX, os animais

apresentaram uma alodínia mecânica e esta foi revertida pelo CBD. O mesmo ocorreu com os animais que foram tratados com LPS, a alodínia mecânica foi revertida pelo CBD. O AM630 inibiu a antinocicepção induzida pelo CBD, em ambos os modelos nociceptivos. O CBD aumentou os níveis de AEA e 2-AG na medula espinhal nos modelos estudados. A minociclina e o fluorocitrato bloquearam a nocicepção nos dois modelos. O LPS-RS também inibiu a nocicepção nos dois modelos. Os resultados do ensaio de ELISA demonstraram que o CBD reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos modelos estudados. O CBD aumentou a expressão do CB<sub>2</sub> no modelo de nocicepção induzido pelo PTX e não teve efeito no modelo de nocicepção induzido por LPS, reduziu os níveis de IBA-1 no modelo de nocicepção induzido por PTX e não teve efeito no modelo de nocicepção induzido por LPS. Na expressão de GFAP, o CBD não apresentou efeito em nenhum dos modelos e na expressão de TRL4, o CBD reduziu sua expressão no modelo de nocicepção induzido por PTX e não teve efeito no modelo de nocicepção induzido por LPS. Sendo assim, concluímos que o CBD reduz a nocicepção nos modelos induzidos por PTX e pelo LPS, o sistema endocanabinoide participa desse efeito e as células da glia parecem estar envolvidas na gênese e manutenção da dor, pela ativação do TRL4, com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Palavras-chave: Dor. Canabidiol. Sistema canabinoide. Células da glia.

## ABSTRACT

Throughout life, pain, both acute and chronic, is one of the reasons for the higher frequency of medical visits and one of the most common reasons for using medications, in addition to being a major cause of disability at work. Chronic pain affects physical and mental functioning, quality of life and productivity of affected individuals. Studies have shown that pain causes activation of glial cells with increased expression of Toll-like receptors (TLR4). TLR4 recognize endogenous and exogenous ligands DAMPS (molecular patterns associated with damage) and PAMPS (molecular patterns associated with pathogens) not only involved with infection or injury, but also with other pathophysiological processes such as pain. Thus, several treatment strategies have been developed to control this symptom, such as treatment with cannabidiol (CBD), a ficanabinoid. Cannabinoid type 2 (CB2) receptors, expressed in peripheral tissues and inflammatory cells, appear to be involved in CBD-induced antinociception. In addition, studies have shown that such receptors are also expressed in the Central Nervous System (CNS), including glial cells. Thus, the present study investigated the effect of CBD on neuropathic pain induced by paclitaxel (PTX) and on nociception induced by lipopolysaccharide (LPS). For this, Swiss mice were used, weighing between 25 and 30g. The nociceptive threshold was assessed by the Von frey filament test. The neuropathic pain model was induced by intraperitoneal injection of PTX and the nociception model induced by PAMP, by intrathecal injection of LPS. The ELISA assay was performed to verify the levels of pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The drugs, AM630, were used to investigate the participation of CB2 receptors, the dosage of anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), to evaluate the participation of endocannabinoids, minocycline and fluorocitrate, to investigate the involvement of microglia and astrocyte and LPS-RS to verify the participation of the TLR4 receptor. The western blot assay was also performed to investigate the effect of CBD on the levels of CB2, IBA-1, GFAP and TLR4 receptor expression, in addition to immunofluorescence to assess the co-location of CB2 / TLR4 receptors in the dorsal root horn of the spinal cord. After 4 days of treatment with PTX, the animals presented a mechanical allodynia and this was reversed by the CBD. The same occurred with the animals that were treated with LPS, the mechanical allodynia was reversed by the CBD. AM630

inhibited CBD-induced antinociception in both nociceptive models. CBD increased levels of AEA and 2-AG in the spinal cord in the models studied. Minocycline and fluorocitrate blocked nociception in both models. LPS-RS also inhibited nociception in both models. The results of the ELISA assay demonstrated that CBD reduced the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the models studied. CBD increased CB2 expression in the PTX-induced nociception model and had no effect on the LPS-induced nociception model, reduced IBA-1 levels in the PTX-induced nociception model, and had no effect on the nociception-induced model LPS. In GFAP expression, CBD had no effect on any of the models and in TRL4 expression, CBD reduced its expression in the nociception model induced by PTX and had no effect in the nociception model induced by LPS. Thus, we conclude that CBD reduces nociception in models induced by PTX and LPS, the endocannabinoid system participates in this effect and glial cells appear to be involved in the genesis and maintenance of pain, by activating TRL4, with consequent release of cytokines pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

Key words: Pain. Cannabidiol. Cannabinoid system. Glial cells.

## LISTA DE FIGURAS

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Figura 1-  | Via ascendente da nocicepção.....   | 26  |
| Figura 2-  | Estrutura química do CBD.....   | 34  |
| Figura 3-  | Representação esquemática do sistema<br>endocanabinóide .....   | 34  |
| Figura 4-  | Camundongo <i>Swiss</i> .....   | 39  |
| Figura 5-  | Via de administração intratecal.....  | 41  |
| Figura 6-  | Via de administração intraperitoneal .....  | 41  |
| Figura 7-  | Teste do Von Frey filamentos.....   | 44  |
| Figura 8-  | Protocolo de avaliação do efeito do CBD sobre a nocicepção<br>induzida pelo LPS.....  | 45  |
| Figura 9-  | Protocolo de avaliação do efeito do CBD sobre a neuropatia<br>induzida pelo PTX.....  | 47  |
| Figura 10- | Protocolo de avaliação do efeito da morfina sobre a<br>neuropatia induzida pelo PTX.....  | 47  |
| Figura 11- | Protocolo de avaliação da participação do TRL4, micróglia e<br>astrócitos na fase aguda da dor neuropática induzida pelo<br>PTX .....   | 47  |
| Figura 12- | Protocolo de avaliação da participação do TRL4, micróglia<br>e astrócitos na fase crônica da dor neuropática induzida pelo<br>PTX ..... | 47  |
| Figura 13- | Resumo dos resultados do presente estudo.....   | 108 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Gráfico 1A- | Efeito do CBD na dor neuropática induzida por PTX.....   | 53 |
| Gráfico 1B- | Efeito do CBD e da morfina na dor neuropática induzida por PTX.....  | 54 |
| Gráfico 1C- | Efeito do CBD na atividade motora na dor neuropática induzida por PTX.....   | 55 |
| Gráfico 2A- | Participação do receptor CB <sub>2</sub> na antinocicepção produzida pelo CBD em uma fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.....     | 56 |
| Gráfico 2B- | Participação do receptor CB <sub>2</sub> na antinocicepção produzida pelo CBD em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.....   | 58 |
| Gráfico 2C- | Efeito do CBD na expressão do receptor CB <sub>2</sub> na medula espinhal.....   | 60 |
| Gráfico 2D- | Efeito do CBD nos níveis de AEA na medula espinhal.....  | 61 |
| Gráfico 2E- | Efeito do CBD nos níveis de 2-AG na medula espinhal.....   | 63 |
| Gráfico 3A- | Participação da micróglia espinhal em uma fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.....  | 65 |
| Gráfico 3B- | Participação da micróglia espinhal em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.....  | 66 |
| Gráfico 3C- | Efeito do CBD na expressão dos níveis da proteína microglial IBA-1 na medula espinhal na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX..... | 67 |
| Gráfico 3D- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.....   | 68 |
| Gráfico 3E- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.....  | 69 |
| Gráfico 4A- | Participação de astrócitos na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.....  | 70 |
| Gráfico 4B- | Participação do astrócito em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.....   | 71 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gráfico 4C- | Efeito do CBD na expressão dos níveis de GFAP na medula espinhal na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX..... | 72 |
| Gráfico 4D- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.....  | 73 |
| Gráfico 4E- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.....   | 74 |
| Gráfico 5A- | Participação do receptor TRL4 em uma fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.....                                | 76 |
| Gráfico 5B- | Participação do receptor TRL4 em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.....                              | 77 |
| Gráfico 5C- | Efeito do CBD na expressão dos níveis de espinhais de TRL4 na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.....       | 78 |
| Gráfico 5D- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.....  | 79 |
| Gráfico 5E- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.....   | 80 |
| Gráfico 6-  | Efeito do CBD nos níveis espinhais de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....  | 82 |
| Gráfico 7-  | Avaliação de diferentes doses do LPS sobre o limiar nociceptivo.....  | 83 |
| Gráfico 8A- | Participação do receptor CB <sub>2</sub> na antinocicepção produzida pelo CBD na nocicepção induzida por LPS.....       | 85 |
| Gráfico 8B- | Efeito do CBD na expressão do receptor CB <sub>2</sub> na medula espinhal.....  | 86 |
| Gráfico 8C- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.....  | 87 |
| Gráfico 8D- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.....   | 88 |
| Gráfico 9A- | Participação da micróglia espinhal na nocicepção induzida por LPS.....  | 89 |



|              |   |     |
|--------------|---|-----|
| Gráfico 9B-  | Efeito do CBD na expressão dos níveis da proteína IBA-1 na medula espinhal .....  | 90  |
| Gráfico 9C-  | Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.....  | 91  |
| Gráfico 9D-  | Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.....   | 92  |
| Gráfico 10A- | Participação de astrócitos espinhais na nocicepção induzida por LPS.....  | 94  |
| Gráfico 10B- | Efeito do CBD na expressão dos níveis de GFAP na medula espinhal.....   | 95  |
| Gráfico 10C- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.....  | 96  |
| Gráfico 10D- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.....   | 97  |
| Gráfico 11A- | Participação do receptor TRL4 espinhal na nocicepção induzida por LPS.....  | 99  |
| Gráfico 11B- | Efeito do CBD na expressão dos níveis do receptor TRL4 na medula espinhal.....  | 100 |
| Gráfico 11C- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.....  | 102 |
| Gráfico 11D- | Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.....   | 103 |
| Gráfico 12-  | Efeito do CBD sobre os níveis medulares de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....   | 105 |
| Gráfico 13-  | Efeito do CBD sobre a co-localização espinhal dos receptores CB <sub>2</sub> e TLR4 durante a nocicepção induzida pelo PTX E LPS..... | 107 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| µL              | - Microlitros  |
| µg              | - micrograma   |
| 2-AG            | - 2-araquidonoilglicerol                             |
| AM630           | - Antagonista do receptor para canabinóide do tipo 2 |
| AEA             | - anandamida   |
| CB <sub>1</sub> | - Receptor para canabinóide do tipo 1                |
| CB <sub>2</sub> | - Receptor para canabinóide do tipo 2                |
| CBD             | - Canabidiol   |
| CCI             | - Constrição crônica do nervo ciático                |
| CDME            | - Corno Dorsal da Medula Espinal                     |
| CFA             | - Complexo Adjuvante de Freud                        |
| CGRP            | - Proteína relacionada ao gene da calcitonina        |
| COX             | - Ciclooxigenase                                     |
| CR3             | - Receptor para o complemento-3                      |
| CR3/CD11b       | - Marcador microglial                                |
| Crem            | - Cremofor   |
| CVME            | - Corno ventral da medula espinal                    |
| DAGL            | - Enzima diacilglicerol lipase                       |
| DAMP            | - Padrão molecular associado ao dano                 |
| DMSO            | - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo          |
| ELISA           | - <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>          |
| EPM             | - Erro padrão da média                               |
| FAAH            | - Ácido graxo amino hidrolase                        |
| g               | - Gramas   |

|              |  |
|--------------|--|
| GFAP         | - Proteína ácida fibrilar glial  |
| i.m.         | - Intramuscular  |
| i.p.         | - Intraperitoneal  |
| i.t.         | - Intratecal   |
| IBA          | - Marcador microglial  |
| IL-1         | - Interleucina 1   |
| IL-10        | - Interleucina 10  |
| IL-1 $\beta$ | - Interleucina 1 beta  |
| IL-4         | - Interleucina 4   |
| INF-1        | - Interferon do tipo 1   |
| LPS          | - Lipopolissacarídeo   |
| MAFP         | - Ácido metil araquidonil fluorfosfano/ (5Z, 8Z, 11Z, 14Z) - 5,8, 11, 14-eicosatetraenil-metil ester fosfluorídrico) |
| MAPK         | - Proteína quinase ativada por mitógeno  |
| MB           | - Medida basal   |
| Mg           | - miligrama  |
| MGL          | - Monoacilglicerol lipase  |
| Mino         | - Minociclina  |
| NPIQ         | - Neuropatia periférica induzida pela quimioterapia  |
| NO           | - Óxido nítrico  |
| PTX          | - Paclitaxel   |
| PAG          | - Substância Cinzenta Periaquedutal  |
| PAMP         | - Padrão molecular ativado por patógeno  |
| PBS          | - Tampão Fosfato Salino  |
| PG           | - Prostaglandina   |

|                  |   |
|------------------|---|
| PGE              | - Prostaglandina E                            |
| pH               | - Potencial hidrogeniônico                    |
| PNI              | - Ligação parcial do nervo ciático            |
| PRR              | - Receptor de reconhecimento padrão           |
| RNA <sub>m</sub> | - Ácido ribonucléico mensageiro               |
| RVM              | - Bulbo rostral ventro medial                 |
| s.c.             | - Subcutânea                                  |
| Sal              | - Salina                                      |
| SDCR tipo I      | - Síndrome de Dor Complexa Regional do tipo 1 |
| SNC              | - Sistema Nervoso Central                     |
| SNL              | - Ligação do nervo espinal                    |
| SNP              | - Sistema Nervoso Periférico                  |
| SP               | - Substância P                                |
| TLRs             | - <i>Toll like receptors</i>                  |
| TNF- $\alpha$    | - Fator de necrose tumoral alfa               |

## SUMÁRIO

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 24 |
| 1.1          | DOR.....   | 24 |
| 1.2          | DOR NEUROPÁTICA.....   | 26 |
| 1.3          | CÉLULAS DA GLIA E DOR.....   | 28 |
| 1.4          | RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO.....                                       | 31 |
| 1.5          | CANABIDIOL E DOR.....  | 33 |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 38 |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL.....  | 38 |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 38 |
| <b>3</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 39 |
| 3.1          | ANIMAIS.....   | 39 |
| 3.2          | DROGAS.....  | 39 |
| 3.3          | ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS.....  | 40 |
| <b>3.3.1</b> | <b>Administração intratecal</b> .....  | 40 |
| <b>3.3.2</b> | <b>Administração intraperitoneal</b> .....                                     | 41 |
| 3.4          | INDUÇÃO DO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA<br>INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO.....       | 41 |
| 3.5          | INDUÇÃO DE DOR INDUZIDA PELO LPS<br>BACTERIANO.....                            | 42 |
| 3.6          | ROTA ROD.....  | 42 |
| 3.7          | TESTE NOCICEPTIVO.....   | 43 |
| 3.8          | PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES<br>COMPORTAMENTAIS.....                    | 45 |
| <b>3.8.1</b> | <b>Investigação do efeito do CBD na nocicepção<br/>induzida por LPS</b> .....  | 45 |
| <b>3.8.2</b> | <b>Investigação do efeito do CBD na nocicepção<br/>induzida pelo PTX</b> ..... | 46 |
| 3.9          | AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CBD SOBRE OS  |    |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
|          | NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS<br>PELO ENSAIO DE ELISA.....   | 48        |
| 3.10     | AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CBD SOBRE A CO-<br>LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES CB <sub>2</sub> E TRL4<br>PELA IMUNOFLOURESCÊNCIA.....                      | 48        |
| 3.11     | AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CBD SOBRE OS<br>NÍVEIS DOS RECEPTORES CB <sub>2</sub> , TRL4 E DOS<br>MARCADORES DAS CÉLULAS DA GLIA IBA-1 E<br>GFAP..... | 49        |
| 3.12     | DOSAGEM DE ENDOCANABINÓIDES AEA E 2-AG<br>POR ESPECTROMETRIA DE MASSA POR<br>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (HPLC).....                                   | 50        |
| 3.13     | ANÁLISE ESTATÍSTICA  | 51        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b>  | <b>52</b> |
| 4.1      | EFEITO DO CBD NA DOR NEUROPÁTICA<br>INDUZIDA POR PTX.....  | 52        |
| 4.2      | INVESTIGAÇÃO DO SISTEMA<br>ENDOCANABINÓIDE NA ANTINOCICEPÇÃO<br>INDUZIDA PELO CBD NA DOR NEUROPÁTICA<br>INDUZIDA POR PTX.....                    | 55        |
| 4.3      | PARTICIPAÇÃO DA MICRÓGLIA ESPINHAL NA<br>DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX E DO<br>CBD NESSE PROCESSO.....  | 65        |
| 4.4      | ENVOLVIMENTO DE ASTRÓCITOS ESPINHAIS E<br>O EFEITO DO CBD NA DOR NEUROPÁTICA<br>INDUZIDA POR PTX.....  | 69        |
| 4.5      | EFEITO DO CBD NA PARTICIPAÇÃO DO<br>RECEPTOR TRL4 ESPINHAL NA DOR<br>NEUROPÁTICA INDUZIDA POR<br>PTX.....  | 74        |
| 4.6      | EFEITO DO CBD SOBRE OS NÍVEIS DE<br>CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA DOR   |           |

|      |  |     |
|------|--|-----|
|      | NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX.....  | 80  |
| 4.7  | EFEITO DO CBD NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA<br>POR LPS.....   | 82  |
| 4.8  | ENVOLVIMENTO DO SISTEMA<br>ENDOCANABINÓIDE NA ANTINOCICEPÇÃO<br>PROMOVIDA PELO CBD SOBRE A NOCICEPÇÃO<br>INDUZIDA POR LPS.....               | 84  |
| 4.9  | EFEITO DO CBD NO ENVOLVIMENTO DA<br>MICRÓGLIA ESPINHAL NA NOCICEPÇÃO<br>INDUZIDA POR LPS.....  | 88  |
| 4.10 | EFEITO DO CBD NO ENVOLVIMENTO DA<br>MICRÓGLIA ESPINHAL NA NOCICEPÇÃO<br>INDUZIDA POR LPS.....  | 92  |
| 4.11 | PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRL4 E O<br>EFEITO DO CBD NESSE PROCESSO DURANTE<br>A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LPS.....                              | 97  |
| 4.12 | EFEITO DO CBD SOBRE OS NÍVEIS DE<br>CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDO POR LPS.....                                       | 103 |
| 4.13 | EFEITO DO CBD SOBRE CO-LOCALIZAÇÃO<br>ESPINHAL DOS RECEPTORES CB <sub>2</sub> E TLR4<br>DURANTE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO PTX<br>E LPS..... | 105 |
| 5    | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 110 |
| 6    | CONCLUSÃO.....   | 120 |
|      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 121 |
|      | ANEXOS.....  | 133 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOR

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é uma sensação e experiência emocional desagradável associada à lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita em termos desta lesão (MERSKEY & BOGDUK, 1994). Ao longo da vida, a dor tanto de característica aguda quanto crônica, é uma das razões para a maior frequência de visitas médicas e um dos motivos mais comuns para o uso de medicamentos, além de ser uma das principais causas de incapacidade no trabalho. A dor crônica afeta a capacidade física e mental, a qualidade de vida e a produtividade dos indivíduos afetados. Além disso, ela impõe um encargo financeiro significativo. O custo econômico anual da dor crônica em adultos, incluindo despesas com cuidados de saúde e perda de produtividade, está entre 560-630 dólares ao ano (VAN HECKE *et al.*, 2013). Um relatório de uma pesquisa, indica que mais de 1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo sofrem de dor crônica, sendo que destes, cerca de 3-4,5% sofrem de dor neuropática, aumentando a taxa de incidência com o aumento da idade (VAN HECKE *et al.*, 2013).

Em indivíduos saudáveis, a dor é utilizada para propósitos altamente adaptáveis, orientada para a sobrevivência. O primeiro objetivo da dor é de avisar de perigo real ou iminente de danos corporais, tais como contato com objetos pontiagudos ou aquecidos (WATKINS & MAIER, 2002).

A segunda importância fisiológica da dor é de encorajar comportamentos de recuperação em resposta à dor resultante do próprio organismo. A lesão já ocorreu e a área danificada é agora inflamada. A informação dolorosa é retransmitida para os centros superiores do cérebro que organizam os comportamentos de recuperação apropriados para proteger e facilitar a cicatrização do local danificado. Tais comportamentos incluem desuso e proteção de um membro lesado e, no caso dos animais, ocorre a limpeza da lesão por meio do comportamento de "lamber" (WATKINS & MAIER, 2002).

Além disso, apesar dos animais não apresentarem a capacidade de comunicar verbalmente em ocorrência de dor; quando são submetidos a um

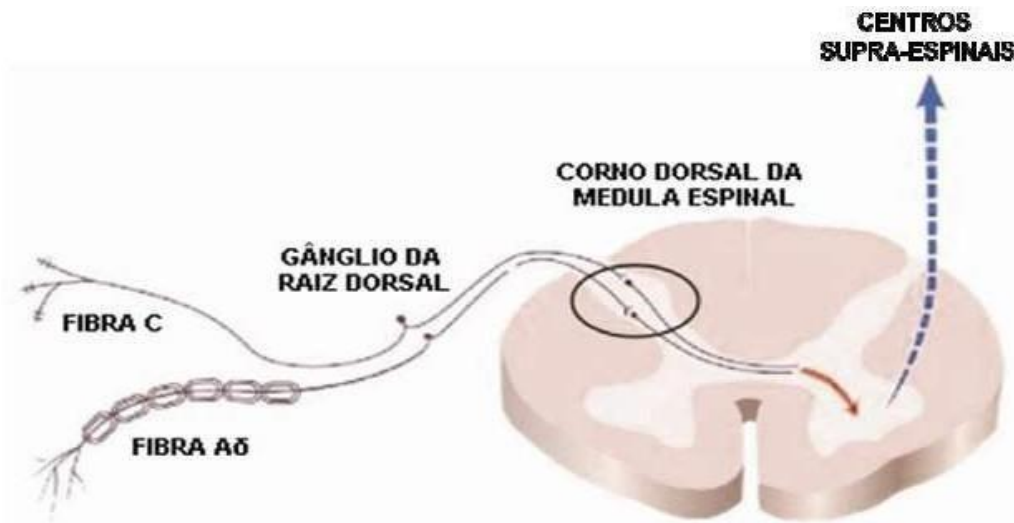


estímulo reconhecidamente nociceptivo, eles exibem algumas respostas motoras e fisiológicas, semelhantes às observadas em humanos. Assim, a partir da avaliação desses parâmetros podemos inferir que um animal está experimentando uma resposta nociceptiva. Portanto, o termo nocicepção engloba respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, dissociando do caráter cognitivo-afetivo da resposta (WIESELER-FRANK *et al.*, 2004). Especificamente, a nocicepção refere-se à detecção de um estímulo nociceptivo (mecânico, térmico ou químico) por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, os receptores da dor (também denominados de nociceptores), que recebem as informações nociceptivas e as transmitem para vias que as conduzem até o sistema nervoso central (SNC), que irá interpretá-las e verificar a existência de um estímulo potencialmente lesivo ao organismo (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Mais precisamente, os nociceptores consistem de terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias (carreiam estímulo nociceptivo da periferia à medula) com características distintas (limiar de ativação e sensibilidade) em relação a outras estruturas nervosas sensoriais. Dentre essas fibras aferentes, destacam-se as do tipo C e do tipo A $\delta$ . As fibras do tipo C possuem um menor calibre, são amielinizadas e conduzem o estímulo nociceptivo. As fibras A $\delta$  são mielinizadas, possuem uma maior velocidade de condução e respondem à estímulos (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Na medula espinhal, os estímulos oriundos dessas fibras aferentes fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, que por sua vez, ascendem contra lateralmente a áreas supra espinais, por meio de tratos neuronais específicos, como por exemplo, o trato espinotalâmico. Logo em seguida, o estímulo chega ao tálamo, no qual irá fazer uma segunda sinapse com neurônios de terceira ordem, os quais enviarão a informação nociceptiva até as áreas específicas do córtex cerebral, onde aspectos como intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão codificados e interpretados como dor (VANDERAH, 2007).

Figura 1- Via ascendente da nocicepção.



Legenda: Os axônios das fibras aferentes primárias (C e Aδ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula espinal, onde neurônios de segunda ordem repassam a informação para os tratos neuronais ascendentes.

Fonte: JULIUS & BASBAUM (2001).

## 1.2 DOR NEUROPÁTICA

A dor neuropática pode ser resultante de doenças ou injúrias que acometem diretamente o sistema nervoso periférico ou o sistema nervoso central, como, por exemplo, lesões traumáticas, intervenções cirúrgicas, doenças neurodegenerativas ou infecções, entre outras (SELTZER *et al.*, 1990; AUSTIN & MOALEM-TAYLOR, 2010).

Dentre os tipos de dor neuropática, destacamos a dor neuropática induzida por quimioterápicos. Nesse contexto, é importante ressaltar que mais de um terço de todos os pacientes com câncer que se submetem a quimioterapia desenvolvem neuropatia periférica induzida pelos agentes quimioterápicos (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2010). Várias classes de compostos quimioterápicos induzem neuropatia e, a sua gravidade depende da dose cumulativa (QUASTHOFF & HARTUNG, 2002). A neuropatia induzida por quimioterápico (NPIQ) é limitada pela dose e a principal toxicidade promovida pelo quimioterápico é a causa responsável de interrupção desse tipo de tratamento, sendo a dor neuropática como um de seus principais efeitos colaterais, a qual pode ocorrer na fase inicial da quimioterapia e persistir durante

anos após a cessação do tratamento (ROWINSKY *et al.*, 1993; WINDEBANK & GRISOLD, 2008).

Esse tipo de dor é caracterizado por várias alterações sensoriais, dentre elas, parestesia e sensação de queimação, que podem interferir diretamente com a atividade de vida diária dos pacientes, prejudicando assim a sua qualidade de vida (WOLF *et al.*, 2008).

Os fármacos quimioterápicos atuam dentro das células, interferindo em seu processo de divisão e crescimento (MCDONALD *et al.*, 2005). Alguns destes agentes, tais como os taxanos, destinam-se a desfazer os microtúbulos do fuso mitótico das células na divisão celular. No entanto, essas drogas também podem interromper o transporte baseado em microtúbulos nos axônios dos neurônios sensoriais (WARWICK & HANANI, 2013). O paclitaxel (PTX), um composto derivado da casca da árvore Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), é um agente antineoplásico eficaz e é rotineiramente incluído em tratamentos por quimioterapia, principalmente em pacientes com câncer de mama, ovário, cabeça e pescoço e de pulmão (DOUGHERTY *et al.*, 2004). No entanto, o PTX também tem sido relatado induzir dor neuropática, que é caracterizada por desenvolver alodínia mecânica, alodínia fria e uma dor relatadas pelos pacientes como ardente e espontânea em curso das extremidades distais (LEE & SWAIN, 2006). Entretanto, os mecanismos subjacentes da neuropatia periférica induzida por PTX permanecem pouco elucidados. As lesões encontradas nos nervos periféricos após o tratamento com o PTX podem levar ao estresse e inflamação oxidativa periférica e central, que resultam em uma sensibilização e atividade espontânea das fibras nervosas periféricas, com consequente hiperexcitabilidade dos neurônios na medula espinhal (HU & MCLACHLAN, 2002), levando à sensibilização da via ascendente da dor e ativação das células gliais nessa região (PETERS *et al.*, 2007).

Entretanto, os mecanismos que acarretam a dor neuropática, não são simplesmente caracterizados por alterações na atividade neuronal, mas envolvem também a ativação de diversos mecanismos, dentre eles, a participação das células da glia, visto que, essas células presentes na medula espinhal, desempenham um papel importante na sensibilização central e periférica da dor.

### 1.3 CÉLULAS DA GLIA E DOR

O mecanismo da dor é amplo e envolve diferentes substâncias, neurotransmissores, canais iônicos e receptores, os quais estão localizados tanto na periferia quanto SNC. No caso do SNC, os estudos realizados nas últimas décadas, têm voltado sua atenção às células gliais, com o intuito de melhor esclarecer suas funções na gênese da dor (MILLIGAN *et al.*, 2002; SCHOLZ & WOOLF, 2007).

As células da glia estão presentes no SNC (HAYDON, 2001), sendo constituídas por várias populações, as quais incluem os astrócitos, que são encarregados de promover a sustentação e a nutrição dos neurônios (KIMELBREG, 1983), oligodendrócitos, que têm função de envolver os axônios dos neurônios de maneira a isolá-los do microambiente do tecido nervoso e a micróglia, que são células que agem como macrófagos, participando, portanto, do mecanismo de defesa (STREIT *et al.*, 1988).

A micróglia é um tipo celular não neuronal presente tanto na medula espinal quanto no cérebro, sendo responsiva a condições fisiopatológicas como trauma, isquemia, inflamação e infecção (TSUDA *et al.*, 2005; BEGGS & SALTER, 2007; MILLIGAN & WATKINS, 2009; TRANG *et al.*, 2006). Essas células constituem apenas 5-10% das células da glia do SNC total. Basicamente a micróglia é classificada em dois tipos: micróglia residente derivada de precursores que migram do saco vitelínico para o SNC, onde residem por toda a vida e a micróglia derivada da medula óssea, que são macrófagos perivasculares hematopoiéticos que infiltram no SNC durante processos patológicos como lesão cerebral, esclerose múltipla, encefalomielite autoimune experimental ou doença de Alzheimer (ZHANG *et al.*, 2007; PRINZ & PRILLER, 2014; SAWADA *et al.*, 2010).

Uma vez ativada, a micróglia rapidamente se converte em um estado reativo de uma série de progressivas mudanças celulares e moleculares, incluindo alterações morfológicas, com delgadas e longas ramificações para condição hipertrófica, com formato ameboide (ERIKSSON *et al.*, 1993). Além disso, durante essas alterações, que correspondem a uma ativação microglial, é observada a expressão de diversos marcadores celulares, como a proteína adaptadora de cálcio ionizado (IBA-1) (MCMAHON *et al.*, 2005; TERAYAMA *et al.*, 2008).

Essa ativação microglial observada após a indução de inflamação ou em situações de dor, já foi amplamente descrito na literatura realizada em diversos modelos, como por exemplo: inflamação induzida por Complexo Adjuvante de Freud (CFA) (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004), constrição crônica do nervo ciático (COLBURN *et al.*, 2007), ligação parcial do nervo ciático (COYLE, 1998) e pela ligação do nervo espinal (COYLE, 1998). Durante a dor neuropática, a micróglia é uma das primeiras células a ser ativada. Geralmente essa ativação ocorre cerca de 4 horas após a lesão periférica do nervo (TANGA *et al.*, 2004), permanecendo ativa por diversos meses (COYLE, 1998), de acordo com a gravidade da lesão.

Além da micróglia, os astrócitos também têm um papel importante na sensibilização do impulso doloroso. Essas células representam a maior população de células da glia do SNC e através da expressão de numerosas proteínas e receptores, são capazes de manter a homeostase pela regulação de íons extracelulares, prótons e neurotransmissores (HAYDON, 2001; HANSSON & RONNBACK, 2003; SOFRONIEW & VINTERS, 2010). Os astrócitos são ativados em resposta aos mesmos estímulos que induzem a ativação da micróglia ou também pelos produtos liberados por esta célula quando ela se encontra ativada (DONG & BENVENISTE, 2001). A ativação dos astrócitos é morfolologicamente caracterizada por hipertrofia e um aumento na expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e componente dos filamentos de tamanho intermediário do citoesqueleto celular (WATKINS & MAIER, 2003).

Experimentalmente, ativação astrocitária, observada pelo seu marcador, o GFAP, é claramente visível no corno dorsal da medula espinhal em diversos modelos de dor, incluindo a constrição crônica do nervo ciático, ligação do nervo espinhal, hemissecção da medula espinhal, modelo experimental de câncer ósseo, radiculopatia lombar, inflamação induzida por CFA e por formalina (REN & DUBNER, 2008).

Além disso, ao contrário da micróglia, estudos tem encontrado uma ativação mais tardia de astrócitos após a indução da neuropatia periférica, sugerindo o importante papel dessas células na manutenção da dor neuropática (COLBURN *et al.*, 2007; ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2008; TANGA *et al.*, 2004). Outro estudo demonstrou que animais deficientes para a proteína GFAP respondem a dor induzida por lesão nervosa periférica em uma intensidade

normal, porém com menor duração (KIM *et al.*, 2009). Além disso, esses pesquisadores verificaram que o tratamento com GFAP com RNA anti-sentido em ratos submetidos a neuropatia periférica foi capaz de reverter a dor já estabilizada após seis semanas de lesão (KIM *et al.*, 2009). Alguns estudos têm encontrado que os astrócitos permanecem ativados na medula espinhal por até três meses após indução de neuropatia (COYLE, 1998; LEDEBOER *et al.*, 2005).

Um estudo comparou a expressão de IBA-1 e GFAP no corno dorsal da medula espinhal em ratos com dor neuropática induzida pela transecção do nervo espinal L5, e verificou que o aumento na expressão de IBA-1 ocorre no primeiro dia após realização da cirurgia, perdurando por 7 dias. Já a expressão de GFAP, não apresentou alteração significativa nos primeiros dias após a realização da neuropatia (ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2008). Em adição, um outro estudo demonstrou um importante papel da micróglia na manutenção a longo prazo de hiperalgesia, mostrando que esse comportamento pode ser atenuado com a administração de um inibidor glial entre 4 a 6 semanas após a lesão (TAWFIK *et al.*, 2007), sugerindo assim, um envolvimento da micróglia tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da dor (CLARK *et al.*, 2007; LEDEBOER *et al.*, 2005; MARCHAND *et al.*, 2005).

A participação das células da glia presentes na medula espinhal em processos nociceptivos foi primeiramente evidenciada por Garrison e colaboradores (1991), que demonstraram o aumento da densidade dessas células, mais especificamente de astrócitos, após a indução de ligaduras no nervo ciático em ratos. Além disso, essa participação foi reforçada por um estudo demonstrou que a hiperalgesia térmica resultante da injeção s.c. de formalina e da injeção i.p. de endotoxina, foi bloqueada pela injeção intratecal de inibidores gliais (WATKINS *et al.*, 1999). Da mesma forma, a hiperalgesia resultante da injeção periférica de zimosan, um agente pró inflamatório, também foi bloqueada por um inibidor metabólico dessas células (MILLIGAN *et al.*, 2002), reforçando assim o envolvimento delas na gênese da dor.

Para iniciar o processo de sensibilização do impulso doloroso na medula espinhal, as células da glia quando ativadas expressam uma gama de receptores, dentre eles destacamos os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; TANGA *et al.*, 2005).

## 1.4 RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO

O principal avanço conceitual na imunidade inata foi a descoberta dos PRRs, os quais podem reconhecer estruturas microbianas conservadas, que são comumente conhecidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002).

Os PRRs compreendem um conjunto de receptores presentes na membrana plasmática e no citosol das células do hospedeiro, inclusive nas células da glia. Uma vez ativados por estímulos microbianos ou endógenos, várias vias de sinalização intracelulares são ativadas, incluindo as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), iniciando a indução de respostas pró-inflamatórias com liberação de citocinas (AKIRA *et al.*, 2006). Dentre os principais PRRs identificados, destacamos os receptores do tipo Toll (TLRs) (CHEN *et al.*, 2009; TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

Os TRLs foram descritos pela primeira vez a partir estudos na mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*), os quais foram verificados como essenciais para a proteção desse inseto contra infecções fúngicas (HASHIMOTO *et al.*, 1988). Esses receptores são caracterizados por apresentarem repetições ricas em leucina, além de uma região transmembrana seguida por um domínio citoplasmático homólogo, o Toll/IL-1R (TIR). Existem 13 tipos de TRLs descritos em mamíferos. Funcionalmente, foram identificados 10 TRLs em humanos (TRL1-10) e 12 TRLs em camundongos (TRL1-9;11-13), uma vez que o TRL10 não é funcional em camundongos (KAWAI & AKIRA, 2010; TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que os TLRs do tipo 4 (TLR4) são expressos pela micróglia (LEHNARDT *et al.*, 2002) e envolvidos na ativação intracelular de segundos mensageiros, tais como as proteínas adaptadoras MyD88 (proteína de diferenciação primária mielóide 88) e TRIF (adaptador de interferon- $\beta$  que contém o domínio TIR), que levam à ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, com conseqüente indução da produção citocinas pró-inflamatórias (VABULAS *et al.*, 2002), as quais contribuem para o desenvolvimento e manutenção da nocicepção. Tanga e colaboradores (2004), demonstraram que o aumento da ativação espinal de TLR4 em micróglia correlaciona-se diretamente com o comportamento de hipersensibilidade

nociceptiva em ratos após injúria do nervo ciático. Em adição, a expressão de mRNA para TLR4 foi aumentada em micróglia de ratos com transecção do segmento espinal L5 do nervo ciático (TANGA *et al.*, 2005). Além disso, foi encontrado em camundongos geneticamente modificados com deleção do gene para TLR4, uma redução no desenvolvimento de neuropatia e uma redução na ativação microglial, associadas a uma significativa redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TANGA *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que diferentes substâncias podem ativar os receptores TLR4, dentre elas destacam-se os PAMPs, os quais incluem moléculas que não sejam próprias do hospedeiro, como o lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular das bactérias; e os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que no caso são moléculas endógenas liberadas, principalmente durante lesão, infecção crônica ou necrose de células ativas ou de matriz extracelular (KAWAI & AKIRA, 2007).

Nesse contexto, Watkins e Maier (2000) demonstraram que ratos infectados com LPS apresentaram um maior comportamento doloroso, representado pela alodinia e hiperalgesia mecânica aumentadas. Além disso, um estudo demonstrou que a administração intratecal de LPS induziu alodinia mecânica e aumentou a atividade de neurônios no corno dorsal da medula espinal (REEVES *et al.*, 1996). Em adição, outro similar demonstrou que esse efeito nociceptivo induzido pelo LPS foi prevenido pelo pré-tratamento com o inibidor de micróglia, a minociclina (SAITO *et al.*, 2010). Assim, tais evidências sugerem que o mecanismo nociceptivo do LPS ocorre pela ativação dos TLR4 expressos na micróglia espinal.

Nos últimos anos, uma atenção considerável tem sido atraída por DAMPs. Os DAMPs são secretados ou expostos por células vivas sob estresse ou até mesmo por células mortas, estando principalmente ligado à inflamação. No entanto, mais recentemente, seu papel crucial no reparo tecidual foi reconhecido (VENEREAU *et al.*, 2015). Estudos demonstraram que sua produção está associada com uma degeneração walleriana crônica de fibras nociceptivas, uma das principais alterações causadas pela dor neuropática induzida por quimioterápicos, com consequente liberação de DAMPs, bem como, desenvolvimento de nocicepção (KIM *et al.*, 2009; VARGAS & BARRES, 2007).



Posteriormente, Li e colaboradores (2014) descreveram a participação do TLR4 na dor neuropática induzida pelo quimioterápico PTX (NPIQ). Nesse estudo, esses autores encontram um aumento da expressão de TLR4 em gânglio da raiz dorsal e na medula espinal de ratos, após o tratamento com o PTX e esse aumento não foi verificado no grupo de animais que recebeu o antagonista para TLR4. Esse antagonista também reverteu o comportamento nociceptivo induzido pelo PTX. Além disso, experimentos com imunofluorescência revelaram uma colocalização de TLR4 com células da glia em medula espinal de animais com neuropatia induzida pelo PTX.

Esse mesmo grupo de estudo também demonstrou que durante ativação de TLR4 na neuropatia induzida pelo PTX ocorre uma ativação da via intracelular de MAPKs, como a P38 e as ERK1 e 2 (quinases reguladas por sinais extracelulares) (LI *et al.*, 2015).

Assim, de acordo com os estudos previamente descritos, o TLR4 expresso nas células da glia pode responder a substâncias oriundas da quimioterapia, tais como DAMPs; e também por PAMPs, que levam à ativação de NFκ-β intracelular e subsequente à produção de citocinas pró-inflamatórias, que podem participar tanto da indução quanto da manutenção da dor neuropática.

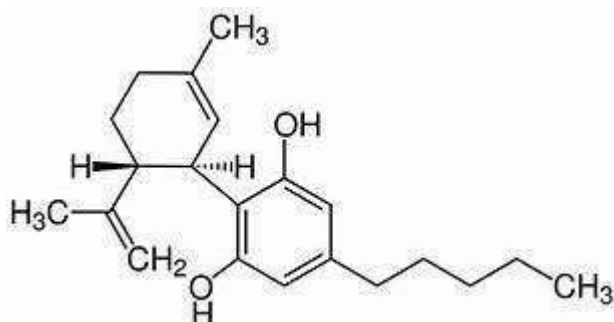
Esses estudos são importantes, pois demonstram que os TLR4 reconhecem ligantes endógenos e exógenos (DAMPs e PAMPs) não só envolvidos com a infecção ou lesão, mas também com outros processos fisiopatológicos como a dor. Assim várias estratégias para o tratamento têm sido desenvolvidas para controlar esse sintoma e o principal o enfoque do presente estudo seria investigar o efeito do CBD no alívio da dor.

## 1.5 CANABIDIOL E DOR

No decorrer dos anos com os avanços nas técnicas de isolamento, a estrutura química da *Cannabis sativa* foi melhor elucidada. Em 1963, o grupo do Prof. Mechoulam isolou o CBD e registou sua correta estrutura e estereoquímica (MECHOULAM & SHVO, 1963) (Figura 2). Um ano mais tarde, esse mesmo grupo isolou o tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (MECHOULAM & SHVO, 1963). Entretanto, diferente do CBD, o  $\Delta^9$ -THC apresenta efeitos colaterais psicoativos

que o limitam de sua utilidade clínica (JOHNSON *et al.*, 2010). Desse modo, inúmeros estudos têm crescido investigando o uso do CBD no tratamento de diversas patologias, principalmente na dor crônica (COSTA *et al.*, 2007; TOTH *et al.*, 2010; XIONG *et al.*, 2012).

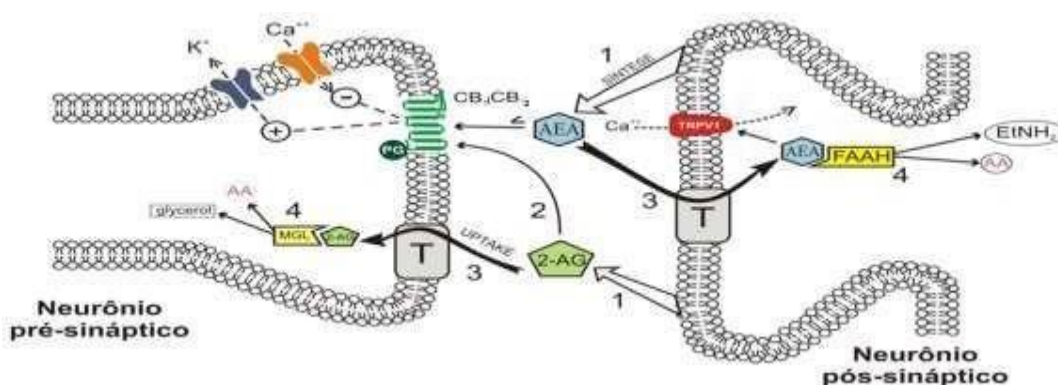
Figura 2- Estrutura química do CBD



Fonte: MECHOULAM & SHVO (1963)

Seu efeito pode ocorrer principalmente pela ativação de dois tipos de receptores da família de receptores acoplados à proteína G, descritos como receptor para canabinóides do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) e do tipo 2 (CB<sub>2</sub>), respectivamente (Figura 3). Ambos os receptores são acoplados negativamente à enzima adenilato ciclase e positivamente à MAPK (PERTWEE, 2001).

Figura 3- Representação esquemática do sistema endocanabinóide.



Legenda: AEA: Anandamida/2-AG: 2 Araquidonilglicerol / FAAH: Ácido Graxo Aminohidrolase / MGL: Monoacilglicerol Lipase / TRPV1: Receptor Vanilóide de Potencial Transitório do Tipo 1/ CB<sub>1</sub>-CB<sub>2</sub>: Receptores canabinóides tipo 1 e tipo 2.

Fonte: Adaptado de Saito *et al.*, 2010.

Dentro desse contexto, evidências têm demonstrando a ação do CBD no controle da dor inflamatória e a dor neuropática. Um dos primeiros estudos experimentais que demonstrou a ação antinociceptiva do CBD foi realizado por Costa e colaboradores (2004). Nesse estudo, foi encontrado que a administração oral de CBD reverteu a hiperalgesia térmica induzida pela carragenina de maneira dose dependente (5-40 mg/kg). Além disso, esses autores correlacionaram esse efeito com uma redução de alguns marcadores inflamatórios como: prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), cicloxigenase (COX) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO).

Em adição ao controle da dor inflamatória, o tratamento por via oral com o CBD também foi eficaz em reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica induzida pela constrição crônica do nervo ciático em ratos (COSTA *et al.*, 2007).

Um estudo demonstrou que a administração de CBD na região ventro-lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP), uma importante área da via descendente modulatória da dor, reduziu a atividade elétrica das células do bulbo rostral ventro medial (RVM), outra área envolvida na modulação descendente da dor (MAIONE *et al.*, 2011). Além disso, esse efeito foi associado a um aumento da latência de retirada de cauda frente a estímulo nociceptivo térmico.

Entretanto, diferente dos resultados encontrados por Costa e colaboradores (2004), esses efeitos nesse estudo foram revertidos por antagonistas para os receptores CB<sub>1</sub>, adenosina AD1 e TRPA1 (receptor de potencial transiente do tipo A). Além disso, o CBD demonstrou aumentar significativamente os níveis de AEA e 2-AG na PAG ventro lateral (MAIONE *et al.*, 2011).

Além dos mecanismos previamente citados, um outro estudo realizado em camundongos demonstrou que a administração do CBD tanto por via nasal quanto por via i.p. reduziu a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica induzida por um modelo de neuropatia diabética. Além disso, esse achado foi correlacionado com a redução da ativação microglial na medula espinal. Em ambos os experimentos, o efeito encontrado pelo CBD foi revertido pela pré-administração de um antagonista para os receptores CB<sub>2</sub>. Sugerindo assim, a ativação desses receptores pelo CBD pode modular a ativação das células microgliais espinais, e conseqüentemente o desenvolvimento da nocicepção (TOTH *et al.*, 2010).

Uma série de estudos experimentais tem sugerido que a ativação de células gliais na medula espinhal facilita a transmissão do estímulo doloroso e contribuindo para a indução e a manutenção da dor neuropática (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Neste contexto é importante mencionar que tem sido reportada a expressão de receptores CB<sub>2</sub> em células microgliais e astrócitos de roedores (NODA *et al.*, 2007). Assim nós hipotetizamos que a ativação de receptores CB<sub>2</sub> em micróglia e astrócitos espinais pelo CBD poderia modular a ação de TLR4 nessas células, controlando assim a nocicepção.

Como suporte para essa hipótese, um estudo demonstrou que agonistas para os receptores CB<sub>2</sub> foram capazes de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, oriundas de células microgliais *in vitro* e este efeito foi correlacionado com o alívio de sintomas nociceptivos, como a hiperalgesia térmica e a alodínia mecânica *in vivo* (MERIGHI *et al.*, 2012). Em adição, outro estudo que demonstrou que a micróglia sintetiza endocanabinóides, principalmente o 2-AG, que em seguida aumenta a proliferação dessa célula *in vitro*, por meio da ativação dos receptores CB<sub>2</sub>, podendo assim promover um mecanismo de *feedback* negativo, o qual pode ser importante de acordo com a origem de tal ativação (CARRIER *et al.*, 2004). No entanto, nenhum estudo investigou a influência do receptor CB<sub>2</sub> sobre a ativação de TLR4 em células microgliais espinhais.

Kozela e colaboradores (2017) demonstraram que o CBD reduziu a atividade astrocitária em modelo de lesão do nervo ciático em camundongos, além de diminuir funções pró-inflamatórias. Em um outro estudo, demonstraram que o CBD reduziu a reatividade dos astrócitos em ratos neonatos (PEREZ *et al.*, 2013). A administração do agonista para receptores CB<sub>2</sub>, o AM1241, em ratos, reduziu a ativação de astrócitos em um modelo de nocicepção induzida por ligadura de nervo (SHIUE *et al.*, 2017) e na neuropatia periférica induzida por PTX (RAHN *et al.*, 2014)

Além disso, estudos demonstraram que o CBD tem uma ação de inibir a inativação de endocanabinóides, por inibir a enzima FAAH (*fatty acid amide hydrolase*), responsável pela inativação da anandamida (AEA) e do 2-Aracdonil glicerol (2-AG). Uma vez que tais moléculas endógenas estão aumentadas em certas condições patológicas, o CBD pode atuar potencializando a ação desses endocanabinóides (FERNANDEZ-RUIZ *et al.*, 2012). García-Arencibia e

colaboradores (2007) demonstraram utilizando modelo de animal macho adulto com a lesão unilateral dos neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal, causada pela toxicidade através da aplicação 6-hidroxidopamina, que o CBD apresenta efeito neuro protetor. Costa e colaboradores (2009), em um estudo utilizando 17 pacientes com esclerose múltipla, uma doença inflamatória desmielinizante do SNC, demonstraram que o CBD foi eficaz na redução da dor neuropática nos pacientes. Em um estudo utilizando modelos experimentais da doença de Alzheimer, *in vivo e in vitro*, demonstrou-se que a administração, tanto do CBD como do WIN 55,212-2, um agonista canabinóide, reduziu os níveis de  $\beta$ -amilóide, bem como a atividade da micróglia.

Além disso, um estudo demonstrou que o CBD como agonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, atenuou a dor neuropática induzida por cisplatina e PTX (DENG *et al.*, 2012). Já Ward e colaboradores (2011; 2014) demonstraram que o CBD impediu o desenvolvimento da sensibilidade mecânica induzida pelo PTX em camundongos.

Desse modo, sabendo que o CBD é uma importante estratégia de tratamento para o controle da dor e tendo em vista seu amplo benefício para pacientes com câncer, o seu uso para o controle da dor neuropática induzida pelo tratamento quimioterápico pode ser de grande valia. No entanto, os mecanismos pelos quais o CBD pode inibir as células gliais, a nível espinhal, ainda são pouco elucidados.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão descritos abaixo.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a inibição do TRL4 participa do controle da nocicepção pelo CBD na ativação glial espinhal em modelo de dor induzida por paclitaxel e LPS.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São os objetivos específicos do trabalho:

- a) Investigar o efeito do CBD sobre a dor neuropática induzida pelo PTX e nocicepção induzida por LPS;
- b) Investigar a participação de receptores  $CB_2$  na antinocicepção promovida pelo CBD na dor neuropática aguda e crônica induzida pelo PTX e na nocicepção induzida por LPS;
- c) Investigar o envolvimento dos endocanabinóides na antinocicepção produzida pelo CBD na dor neuropática aguda e crônica induzida por PTX e na nocicepção induzida por LPS;
- d) Investigar o envolvimento da micróglia espinhal na dor neuropática aguda e crônica induzida por PTX e na nocicepção induzida por LPS;
- e) Investigar o envolvimento do astrócito espinhal na dor neuropática aguda e crônica induzida por PTX e na nocicepção induzida por LPS;
- f) Investigar a participação do receptor TRL4 espinhal na dor neuropática aguda e crônica induzida por PTX e na nocicepção induzida por LPS;
- g) Investigar o efeito do CBD sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias na dor neuropática induzida pelo PTX e na nocicepção induzida por LPS;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizado neste estudo estão descritos a seguir.

#### 3.1 ANIMAIS

Para a realização do presente estudo, foram utilizados camundongos *Swiss* machos (*Mus musculus*), pesando entre 25 e 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Ao longo do período dos experimentos, os animais foram mantidos em estantes ventiladas, com temperatura controlada de 23°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. A disponibilidade de água e comida foi de livre acesso aos animais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor e orientações sobre o uso de animais de laboratório (Zimmermann, 1983) e com a Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas-MG (protocolo aprovado n<sup>o</sup>: 676/2015).

Figura 4: Camundongo *Swiss*



Fonte: Arquivo pessoal

#### 3.2 DROGAS

No estudo foram utilizadas as seguintes drogas e substâncias:

- a) Lipopolissacarídeo bacteriano de *Escherichia coli* (LPS, serotype 026: B6, Sigma, EUA), um agonista de TLR4, diluído em salina estéril (0.9%);
- b) AM630 (6-iodo-2-methyl-1- [2- (morpholinyl) ethyl] -1H-iodol-3-yl (methoxyphenyl) methanone (Tocris, EUA), antagonista seletivo para o receptor CB<sub>2</sub>, diluído em salina estéril (0.9%) e DMSO (20%);
- c) Minociclina (Sigma, EUA), um inibidor seletivo de micróglia, diluído em salina estéril (0.9%);

- d) Fluorocitrato (Sigma, EUA), um inibidor de astrócito, diluído em salina estéril (0.9%);
- e) LPS-RS (Invivogen, EUA), antagonista de TLR4, diluído em salina estéril (0.9%);
- f) Canabidiol (CBD, 1570/10, Tocris, EUA) diluído em salina estéril (0.9%) e Tween 80 (5%);
- g) Paclitaxel (PTX, Sigma, EUA), diluído etanol, cremofor e salina estéril (0.9%);

### 3.3 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

#### 3.3.1 Via intratecal

Para a realização das injeções intratecais (i.t.), utilizamos o método proposto por Hylden e Wilcox (1980). Inicialmente, os animais foram sedados por inalação de isoflurano (2%) por meio de um sistema de vaporização calibrada. Após encontrar o osso ilíaco (espinhas ilíacas ventrais) e as vértebras lombares (segmentos L5 e L6), por meio de palpação, uma agulha de número 29G (13 x 0,33) foi inserida diretamente no espaço subaracnóideo cada animal. Imediatamente após a inserção e, após a verificação do reflexo de retirada da cauda, foi realizada a injeção em um volume total de 5 $\mu$ L para cada droga ou veículo.

Previamente a esse procedimento e com o objetivo de assegurar a administração correta das drogas, foi realizado um treinamento para o aprimoramento dessa técnica com a injeção de 0,5 $\mu$ L de lidocaína (2%). Como resposta positiva da administração i.t., observava-se a paralisia dos membros traseiros dos animais (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2003).



Figura 5: Via de administração intratecal



Fonte: Oliveira (2015)

### 3.3.2 Via intraperitoneal

A administração intraperitoneal é normalmente a via mais utilizada na experimentação com roedores. A injeção é realizada no quadrante inferior esquerdo posterior do abdome do animal. Para a realização, o animal é contido pelo dorso e a substância é injetada em um volume de 10 mL/Kg na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais. O tamanho das agulhas normalmente utilizado é de 25x5 ou 25x7 mm (SAAD-HOSSNE, 1997).

Figura 6: Via de administração intraperitoneal



Fonte: Arquivo pessoal

## 3.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO

A dor neuropática por quimioterápico foi induzida pelo tratamento com PTX, segundo metodologia proposta por Polomano e colaboradores (2001) e

adaptada para camundongos (SMITH *et al.*, 2004). O PTX foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 2 mg/Kg, 1 vez ao dia, durante 6 dias, de acordo com o protocolo experimental descrito na figura 6. Os animais controle receberam o veículo (solução salina estéril a 0,9%) do PTX.

O CBD também foi administrado i.p. na dose de 10 mg/Kg (COSTA *et al.*, 2004), diariamente, 1 vez ao dia por 6 dias, alternadamente ao tratamento com PTX.

### 3.5 INDUÇÃO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO LPS BACTERIANO

Com o intuito de investigar os mecanismos de ação do CBD frente a nocicepção induzida pelo PAMP LPS, foi realizado um experimento com diferentes doses (25, 50 e 100ng) de LPS administrado por via i.t., e assim, a dose que obteve uma melhor resposta nociceptiva foi utilizada nos experimentos posteriores que investigaram essa via.

### 3.6 ROTA ROD

Para avaliar se o efeito do CBD era antinociceptivo e não na redução da coordenação motora utilizamos o teste do Rota rod. A coordenação motora foi avaliada pelo tempo em que o animal passou caminhando sobre uma haste giratória (Dunham & Miya, 1957) durante 2 minutos (tempo de corte). O aparelho utilizado consta de uma haste giratória horizontal, revestida de plástico antideslizante, suspensa a uma altura de 25-30 cm e com rotação constante (16 rpm). Camundongos Swiss machos (n=6) por grupo) foram submetidos a três sessões de treinamento nos dias que antecederam os experimentos. A coordenação motora foi avaliada imediatamente antes (basal) e após o tratamento com controle (animais que receberam veículo do canabidiol e do paclitaxel), CBD+Vei (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel), CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e paclitaxel), Vei+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e paclitaxel) e xilazina, utilizada como controle positivo (2 mg/kg, s.c.).

### 3.7 TESTE NOCICEPTIVO: VON FREY FILAMENTOS

Para a avaliação do limiar nociceptivo mecânico, os animais foram mantidos inicialmente em suas caixas oriundas do biotério, dentro da sala de avaliação comportamental por 30 minutos, com o intuito de ambientação dos mesmos. Logo em seguida, foram colocados em caixas individuais de vidro do aparato para avaliação do limiar nociceptivo (Figura 7A), as quais estavam posicionadas sobre uma grade de metal, que permite o acesso e a avaliação do limiar nociceptivo pelo filamento de von Frey (Stoeling, Wood Dale, IL, EUA, Figura 7B). Durante a realização da medida, o filamento gera uma pressão mecânica, que pode ser imposta por meio de diferentes espessuras (Figura 7C). Durante o teste, o filamento é aplicado de forma perpendicular e com força suficiente para curvá-los na superfície plantar da pata posterior direita de cada animal, até que o animal realize o movimento de retirada do membro que na maioria das vezes é seguido de lambida do mesmo.

Em cada avaliação são realizadas 3 medidas, separadas por intervalos de 3 minutos cada e a média dessas 3 medidas foi descrita como o limiar mecânico, avaliado em gramas (g).

Figura 7: Teste do Von Frey filamentos



Legenda: A e B aparatos utilizados para colocar os animais durante o experimento. A: visão completa das caixas dispostas sobre a mesa; B: visão inferior da grade de metal e posicionamento dos camundongos; C: os filamentos utilizados e em destaque uma amostra do posicionamento desse filamento durante a aplicação do estímulo. S

Fonte: Oliveira (2015)

### 3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

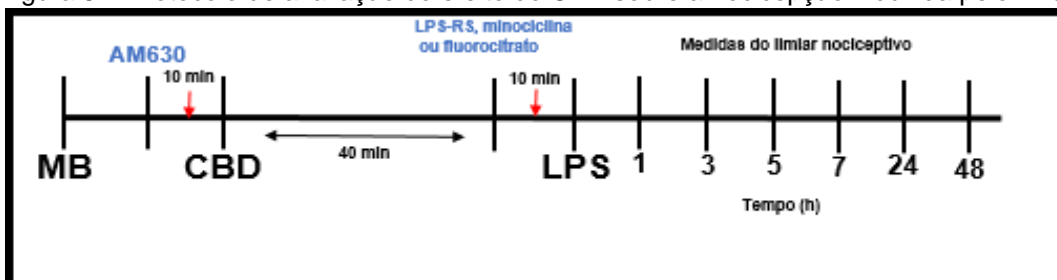
#### 3.8.1 Investigação do efeito do CBD na nocicepção induzida por LPS

Para os experimentos realizados com o intuito de investigar o efeito do CBD sobre a nocicepção induzida pelo LPS, inicialmente realizamos um experimento para escolher a melhor dose a ser utilizada desse PAMP e agonista dos TLR4. Em seguida, após determinada a dose de LPS, um experimento com as diferentes doses de CBD foi realizado, com o intuito de avaliar o envolvimento desse canabinóide na possível alodínia mecânica induzida pelo LPS. Dez minutos antes da injeção do CBD e 40 minutos antes da injeção do LPS, os animais foram tratados com o AM630, para investigar o envolvimento dos receptores CB<sub>2</sub>.

Além disso, para investigar o envolvimento da micróglia, astrócitos e TLR4 na nocicepção induzida pelo LPS, bem como, o efeito do CBD sobre essa via, os animais foram pré-tratados com minociclina, fluorocitrato e o LPS-RS, após 30 minutos da injeção do CBD e 10 minutos antes da injeção do LPS (Figura 5).

Desse modo, para a realização dos protocolos descritos anteriormente, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=6): I) LPS (25, 50 e 100 ng), animais que receberam injeção i.t. de diferentes doses de LPS; II) CBD+LPS, animais que receberam CBD (i.p.) e LPS (i.t.); III) CBD+AM630+LPS, animais que receberam CBD (i.p.) seguido das injeções i.t. de AM630 e LPS; IV) CBD+LPS+MINO, animais que receberam CBD (i.p.) seguido das injeções i.t. de minociclina e LPS; V) CBD+FC +LPS, animais que receberam CBD (i.p.) seguido das injeções i.t. de fluorocitrato e LPS; VI) CBD+LPS-RS +LPS, animais que receberam CBD (i.p.) seguido das injeções i.t. de LPS-RS e LPS.

Figura 8 – Protocolo de avaliação do efeito do CBD sobre a nocicepção induzida pelo LPS.



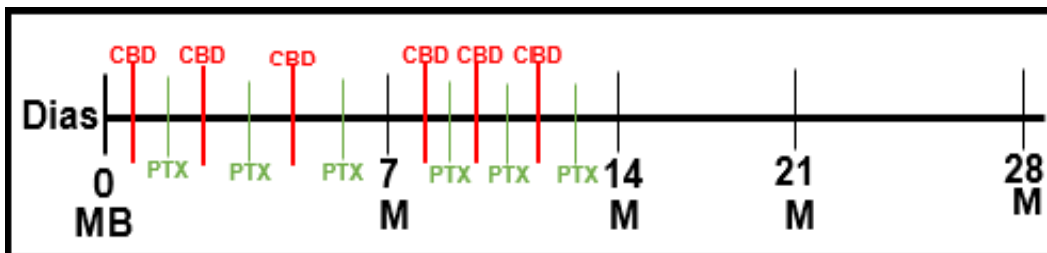
Legenda: LPS: lipolissacarídeo, CBD: canabidiol, MB: medida basal do limiar nociceptivo.  
Fonte: Da autora.

### 3.8.2 Investigação do efeito do CBD na nociceção induzida pelo PTX

Para investigar o possível efeito do CBD na nociceção induzida pelo PTX, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: grupo CBD+PTX (n=6), composto por animais que receberam 6 injeções em dias alternados de CBD (i.p.) e 6 injeções em dias alternados de PTX; CBD+VEC (n=6), composto por animais que receberam CBD (i.p.) e injeções do veículo do PTX (i.p.) (cremofor+etanol+salina estéril 0,9%); VEC+PTX (n=6), composto por animais que receberam o veículo do CBD (tween80+salina estéril 0,9%) e injeções de PTX e VEC+VEC (n=6), animais que receberam o veículo do CBD e o veículo do PTX. Já, para investigar a participação dos receptores CB2, foi administrado o AM630, 20 minutos antes da injeção do CBD, para o receptor TRP4, micróglia e astrócitos, foram administradas injeções do LPSRS, minociclina e fluorocitrato, no 7 (dor aguda) e no 14º dia (dor crônica) da administração do PTX (Figura 10 e 11). Os animais utilizados nestes experimentos foram divididos em grupos experimentais, similares aos descritos acima.

Além disso, nós realizamos um experimento que comparou o efeito do CBD ao da morfina na alodinia mecânica induzida pelo PTX. Para tal, utilizamos os seguintes grupos: MORF+PTX (n=6), composto por animais que receberam morfina subcutânea (s.c.) e PTX; MORF+VEC (n=6), composto por animais que receberam morfina (s.c.) e injeções do veículo do PTX (i.p.) (cremofor+etanol+salina); VEC+PTX (n=6), composto por animais que receberam o veículo da morfina (salina) e injeções de PTX, CBD+PTX (n=6), animais que receberam CBD e PTX e VEC+VEC (n=6), animais que receberam o veículo da morfina e o veículo do PTX.

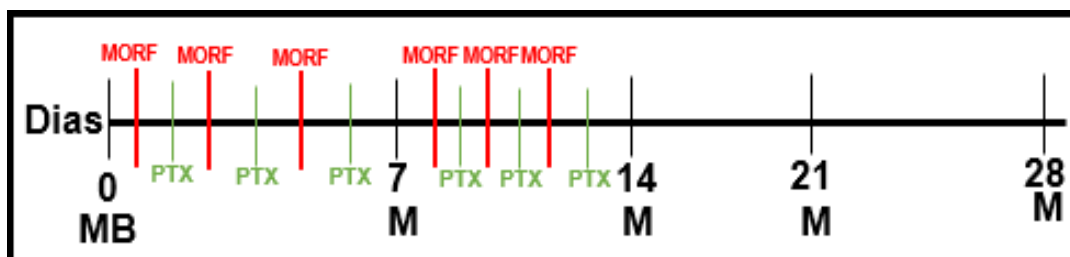
Figura 9– Protocolo de avaliação do efeito do CBD sobre a neuropatia induzida pelo PTX.



Legenda: PTX: paclitaxel, CBD: canabidiol, MB: medida basal do limiar nociceptivo, M: medida do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

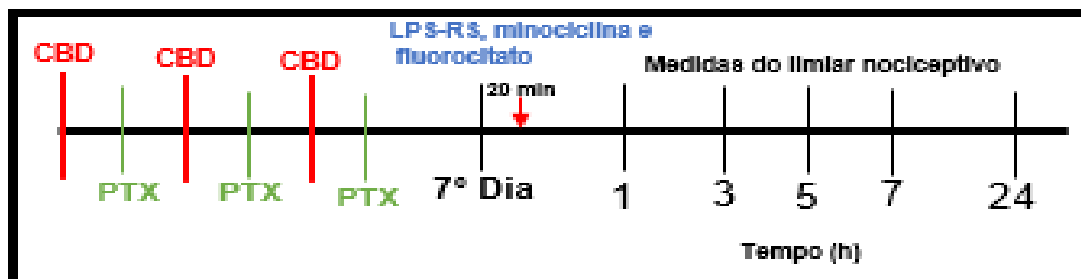
Figura 10– Protocolo de avaliação do efeito da morfina sobre a neuropatia induzida pelo PTX.



Legenda: PTX: paclitaxel, MORF: morfina, M: medida do limiar nociceptivo.

Fonte: da autora.

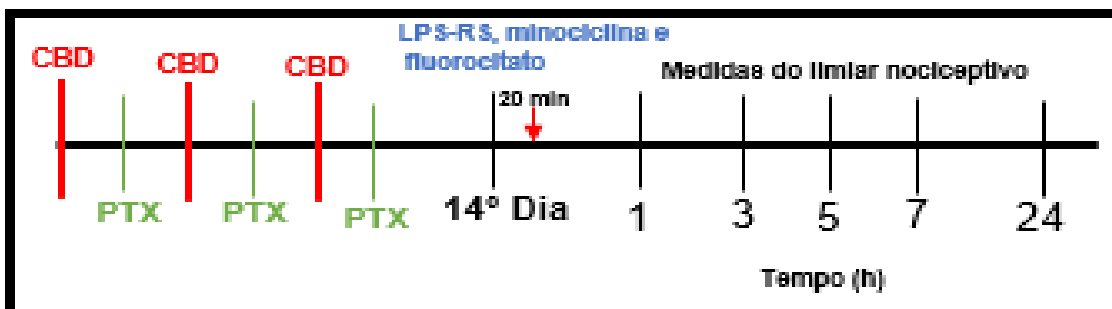
Figura 11– Protocolo de avaliação da participação do TRL4, micróglia e astrócitos na fase aguda da dor neuropática induzida pelo PTX.



Legenda: PTX: paclitaxel, CBD: canabidiol

Fonte: Da autora.

Figura 12 – Protocolo de avaliação da participação do TRL4, micróglia e astrócitos na fase crônica da dor neuropática induzida pelo PTX.



Legenda: PTX: paclitaxel, CBD: canabidiol, M: medida do limiar nociceptivo.

Fonte: da autora.

### 3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CBD SOBRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS PELO ENSAIO DE ELISA

Para a investigação do efeito do CBD sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no modelo de nocicepção induzido por LPS e PTX, foi realizado o ensaio de ELISA.

Imediatamente após último dia do experimento, as medulas espinhais (segmentos L4 a L6) de cada animal tratados com LPS ou PTX, LPS ou PTX e CBD e controle, que são seus respectivos veículos, foram removidas e colocadas em microtubos contendo uma solução de PBS 0,1 M (pH=7.4). Logo em seguida, as medulas espinhais foram homogeneizadas e o homogenato foi centrifugado a 3,000 x g por 10 minutos em uma temperatura de 4°C e cada sobrenadante foi retirado e adicionado em criotubos, os quais foram armazenados em um biofreezer a uma temperatura de -80°C até o momento da análise.

Posteriormente, os níveis de interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foram dosados por meio de kits específicos (PeproTech: EUA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Para a análise, microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura e posteriormente tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com solução de albumina bovina. Após lavagem, as amostras ou padrões foram incubadas com o anticorpo de detecção, com a solução de avidina-peroxidase e posteriormente adicionada uma solução cromogênica para as leituras das reações colorimétricas, as quais foram realizadas a 405nm de comprimento em um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Os cálculos foram realizados a partir da curva padrão para determinação das concentrações das amostras.

### 3.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CBD SOBRE A CO-LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES CB<sub>2</sub> E TRL4 PELA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Com o intuito de demonstrar a influência do CBD sobre a colocalização dos receptores CB<sub>2</sub> e TRL4, em animais que receberão LPS e PTX, foi realizado o ensaio de imunofluorescência de dupla marcação em secções medula espinal



(segmentos L4-L6). Após o último dia de experimento, os animais foram anestesiados via i.p. com tribromoetanol 2,5% (TBE, 0,1 mL/kg) e perfundidos transcardialmente com solução tampão de fosfato PB 0,01 M (pH 7,4) seguida por 4% de paraformaldeído (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4). As medulas foram removidas e pós-fixadas durante 2 h em PFA a 4% e, então armazenadas por 30 h em 30% de sacarose para crioproteção. Logo em seguida, secções coronais (30 µm) das medulas foram obtidas num criostato e lavadas em PBS 0,1 M. Logo após, foram incubadas durante 2 h em 5% de soro bovino (BSA, Sigma) e PBS 0,1 M, pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100. Em seguida, as secções foram incubadas durante 24 horas em uma mistura de anticorpo primário policlonal de coelho anti-CB<sub>2</sub> (diluído 1:100, SANTA CRUZ®, USA) diluída em PBS 0,1M + BSA a 1% + 0,1% de Triton X e anticorpo primário policlonal de rato anti-TRL4 (diluído 1:400, Abcam, USA) diluída em PBS 0,1M + BSA a 1% + 0,1% de Triton. Após incubação no anticorpo primário, as secções de tecido foram lavadas em PBS 0,1M e incubadas sequencialmente com Alexa 488 goat anti-rabbit IgGs (1:200; SANTA CRUZ®) e Alexa 594 anti-rat IgGs (1:400; INVITROGEN®) por 2 h (CASAROTTO et al., 2012). Após esse processo, as secções foram lavadas em PBS 0,1M. Subsequentemente, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e seladas com lamínulas usando Fluoromount®. As secções foram analisadas por microscopia confocal de fluorescência e as imagens capturadas pela câmera digital (Nikon, Japão).

### 3.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CBD SOBRE OS NÍVEIS DOS RECEPTORES CB<sub>2</sub>, TRL4 E DOS MARCADORES DAS CÉLULAS DA GLIA IBA-1 E GFAP

Para avaliar os níveis de proteínas do receptor canabinóide CB<sub>2</sub>, TRL4, IBA-1 e GFAP, foi realizada a análise de Western blot. Para isso, animais de grupos semelhantes aos descritos acima foram eutanasiados por decapitação e, imediatamente após, as amostras da medula espinhal (segmentos L4-L6) foram removidas cuidadosamente, homogeneizadas em tampão RIPA composto por um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e armazenados imediatamente em um freezer a -80 °C. As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 10 min e a concentração de proteína do

sobrenadante foi medida pelo método de Bradford. As amostras em tampão de dodecilsulfato de sódio de Laemmli e  $\beta$ -mercaptanol foram fervidas e sujeitas a análise por imunotransferência. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 10% (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) e transferidas para membranas de nitrocelulose com um sistema eletroforético semi-4eco (Bio-Rad, Hercules, CA). As membranas foram lavadas três vezes em TBS 1X contendo Tween 20 a 0,05%, bloqueada com albumina sérica bovina a 5% em TBS por 2 h em temperatura ambiente e depois incubada durante a noite a 4 °C com anticorpos primários anti-CB<sub>2</sub> de coelho (1:500, Cayman, EUA), anti-Iba1 de coelho (1:500, Wako, Japão), anti-GFAP de rato (1:400) e anti-TRL4 de rato (1:400). Após 3 lavagens em TBS 1X contendo Tween 20 a 0,05%, as membranas foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos. Após o período de incubação, a membrana foi lavada em TBS 1X contendo Tween 20 a 0,05% e, em seguida, um kit de detecção comercial foi aplicado por 3 min (kit de detecção de ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens da análise por imunotransferência foram capturadas em um analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades da banda foram quantificadas. A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da  $\beta$ -actina. Os dados são expressos como alterações na intensidade da banda normalizadas para o controle.

### 3.12 DOSAGEM DE ENDOCANABINÓIDES AEA E 2-AG POR ESPECTROMETRIA DE MASSA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA (HPLC)

As medulas espinhais (segmentos L4-L6) de grupos semelhantes aos descritos anteriormente foi enriquecida com 10 pMol de AEA-d8, homogeneizada em H<sub>2</sub>O / MeOH e purificada como descrito anteriormente por Bligh e Dyer (1959). Após a extração, as amostras foram secas, suspensas em 100 $\mu$ L de MeOH e injetadas no LC-MS / MS. As fases móveis foram água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A condição de gradiente: 0 a 1 min, 5% de B; 5 min, 70% de B; 9,5 a 11 min, 98% de B. Uma vazão de 0,5mL / min e a coluna Ascentis Express C8 (150 x 2,1 mm; 2,7  $\mu$ m) foram empregadas. A espectrometria de massa foi operada em modo positivo para análise de MRMHR

(monitoramento de reação múltipla de alta resolução). Os resultados são expressos como pMol por mg de tecido.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  EPM. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA). Já, o tratamento estatístico dos dados obtidos pelos ensaios moleculares foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA). Ambas as análises foram seguidas pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativas os valores de  $P < 0,05$ . As análises estatísticas e elaboração de figuras foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5*.

## 4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados a seguir.

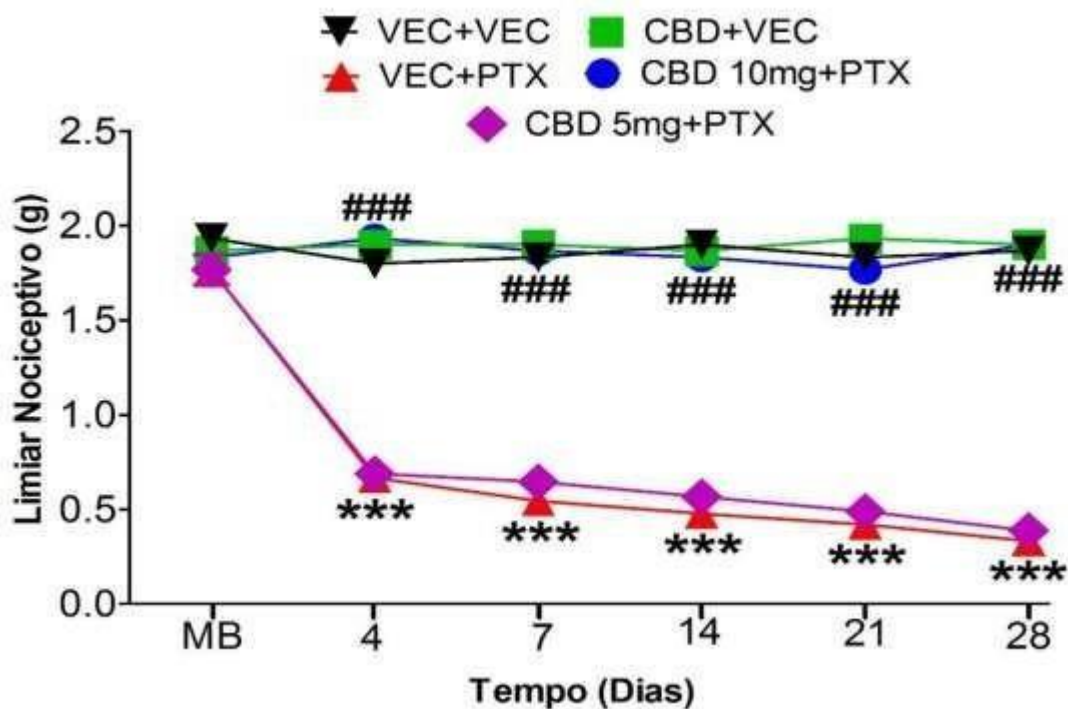
### 4.1 EFEITO DO CBD NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX

No gráfico 1A, observa-se que após 4 dias, a injeção i.p. de PTX, promoveu uma significativa alodínia mecânica ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,26} = 32,56$ ), que perdurou por 28 dias. Já nos animais com dor neuropática, o tratamento com CBD promoveu uma reversão significativa ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,26} = 32,56$ ) dessa alodínia, até o 28º dia. Os veículos dessas substâncias não alteraram o limiar nociceptivo (Gráfico 1A).

De acordo com o efeito antinociceptivo encontrado pelo CBD, foi realizado um experimento para comparar tal resultado com a morfina, um opióide muito utilizado no controle da dor oncológica (XIAO *et al.*, 2016). Assim, o gráfico 2B, demonstra que a antinocicepção promovida pela morfina foi semelhante à promovida pelo CBD à após o 4º dia e o 7º dia do tratamento. Após esse período, o tratamento com a morfina não induziu antinocicepção, caracterizando uma possível tolerância desta droga.

Para comprovar que o efeito antinociceptivo do CBD não foi devido a uma redução na atividade ou coordenação motora dos animais, realizamos o teste comportamental de Rota-rod, no qual verificamos que o CBD não alterou esses parâmetros avaliados (Gráfico 1C).

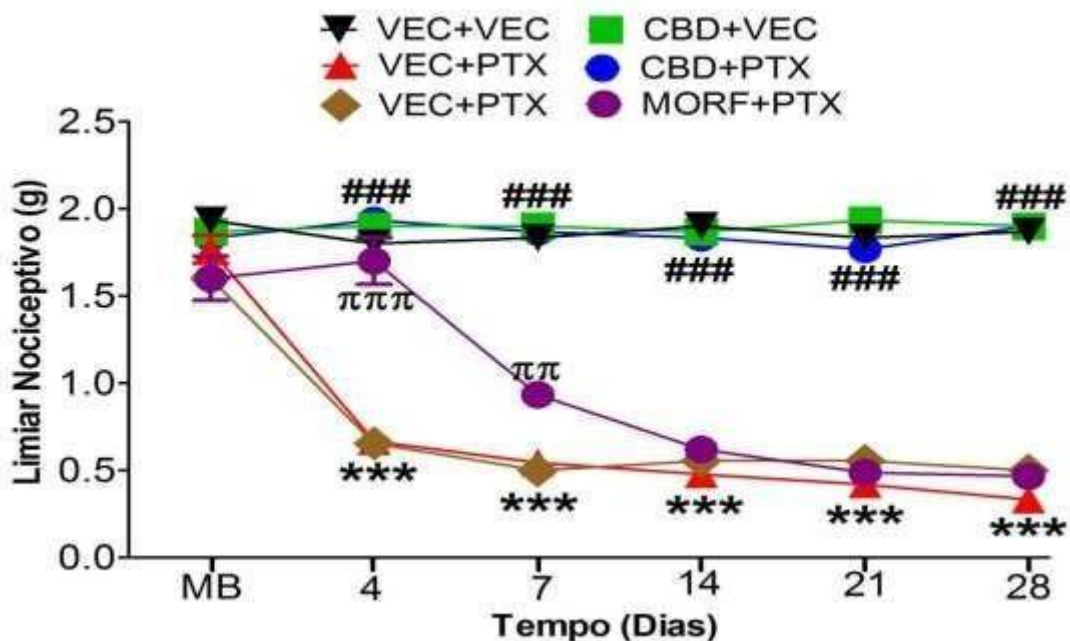
Gráfico 1A–Efeito do CBD na dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos VEC+PTX (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel),  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

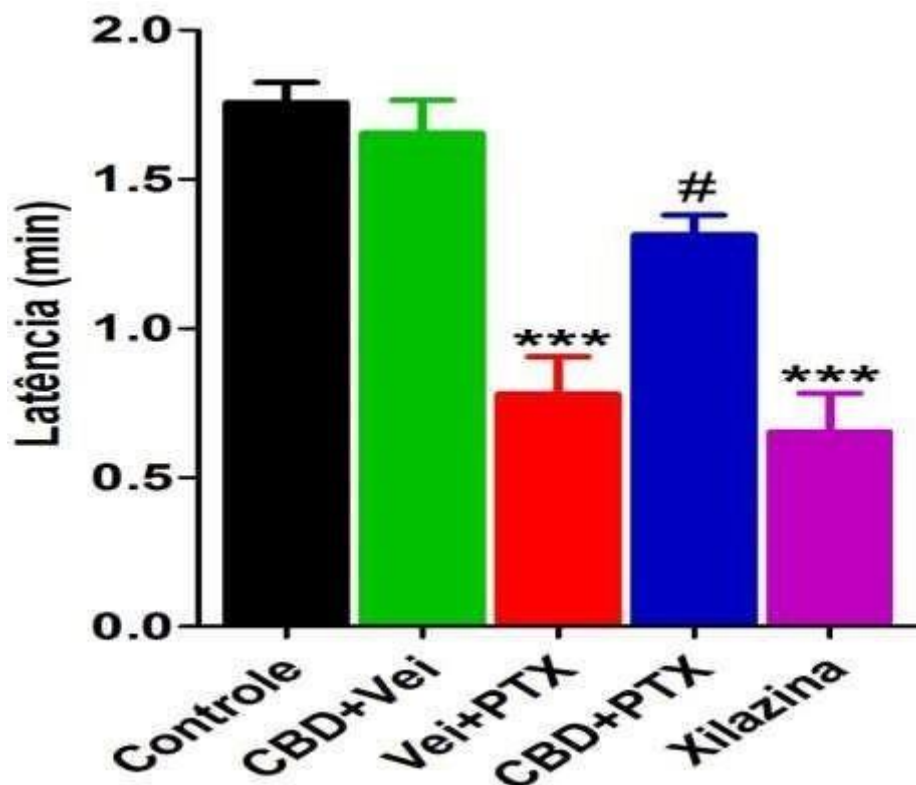
Gráfico 1B–Efeito do CBD e da morfina na dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos VEC+PTX (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e πππ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo MORF+PTX (animais que receberam injeção subcutânea de morfina e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam o veículo da morfina e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: da autora.

Gráfico 1C-Efeito do CBD na atividade motora na dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. da latência (min). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos VEC+PTX (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e Xilazina (animais que receberam xilazina) e o grupo controle e # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e os grupos Vei+PTX (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e Xilazina (animais que receberam xilazina).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: da autora.

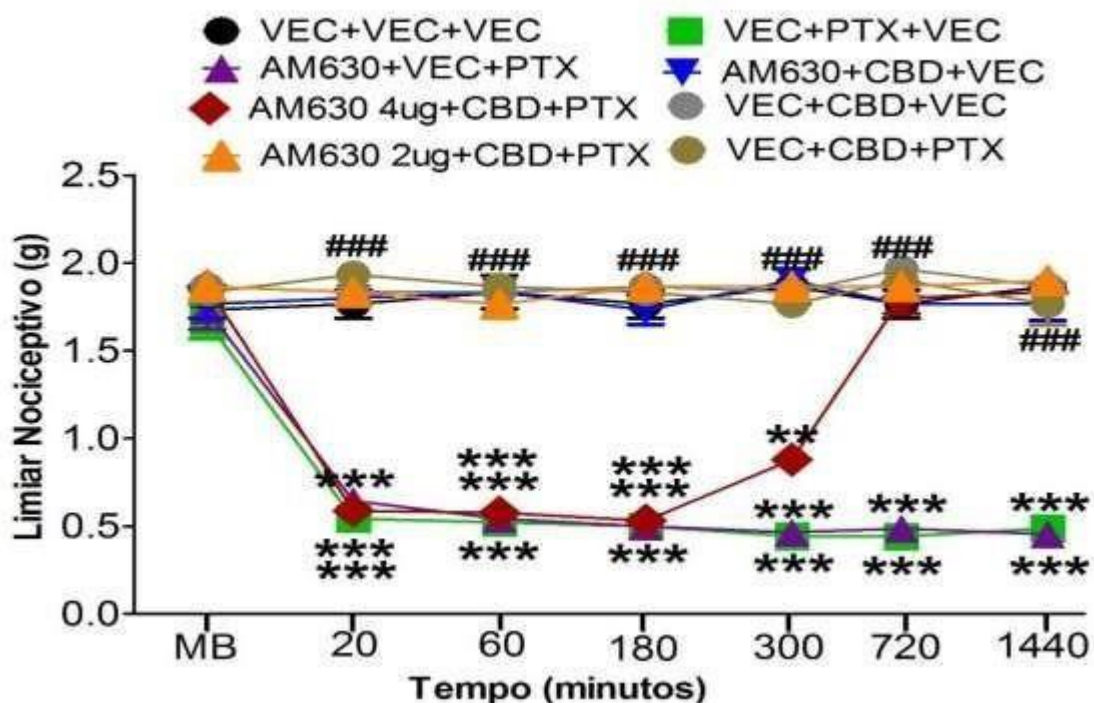
#### 4.2 INVESTIGAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO CBD NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX

Uma vez demonstrado que o CBD promoveu antinocicepção, investigamos a participação do sistema endocanabinóide neste efeito, a nível espinhal. Assim, foi verificado que o efeito antinociceptivo promovido pelo CBD foi revertido significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,41}=24,18$ ) pelo antagonista do receptor  $CB_2$ , o AM630, tanto em fase mais aguda (7º dia) quanto em uma fase mais crônica (14º dia) após a indução da dor neuropática (Gráficos 2A e 2B). Os

animais que receberam somente veículo não tiveram alterações no limiar nociceptivo (Gráficos 2A e 2B).

Além disso, no gráfico 2C, é possível verificar que o CBD nos animais com neuropatia aumentou ( $p < 0,05$ ,  $F_{4,15} = 5,876$ ) a expressão dos receptores CB<sub>2</sub>. Após o tratamento com o AM630 houve uma redução da expressão desse receptor nos animais com neuropatia tratados com CBD, reforçando o envolvimento desse receptor na antinocicepção induzida pelo CBD na dor neuropática.

Gráfico 2A– Participação do receptor CB<sub>2</sub> na antinocicepção produzida pelo CBD em uma fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.



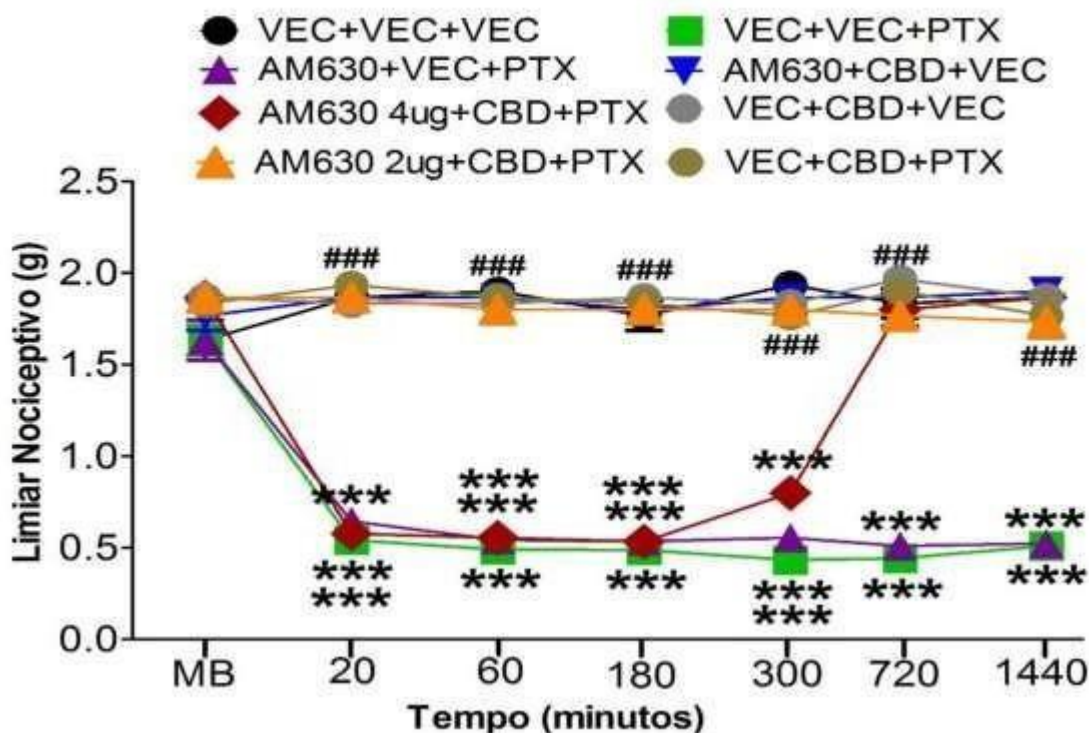
Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+CBD+PTX (animais que receberam veículo do AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.





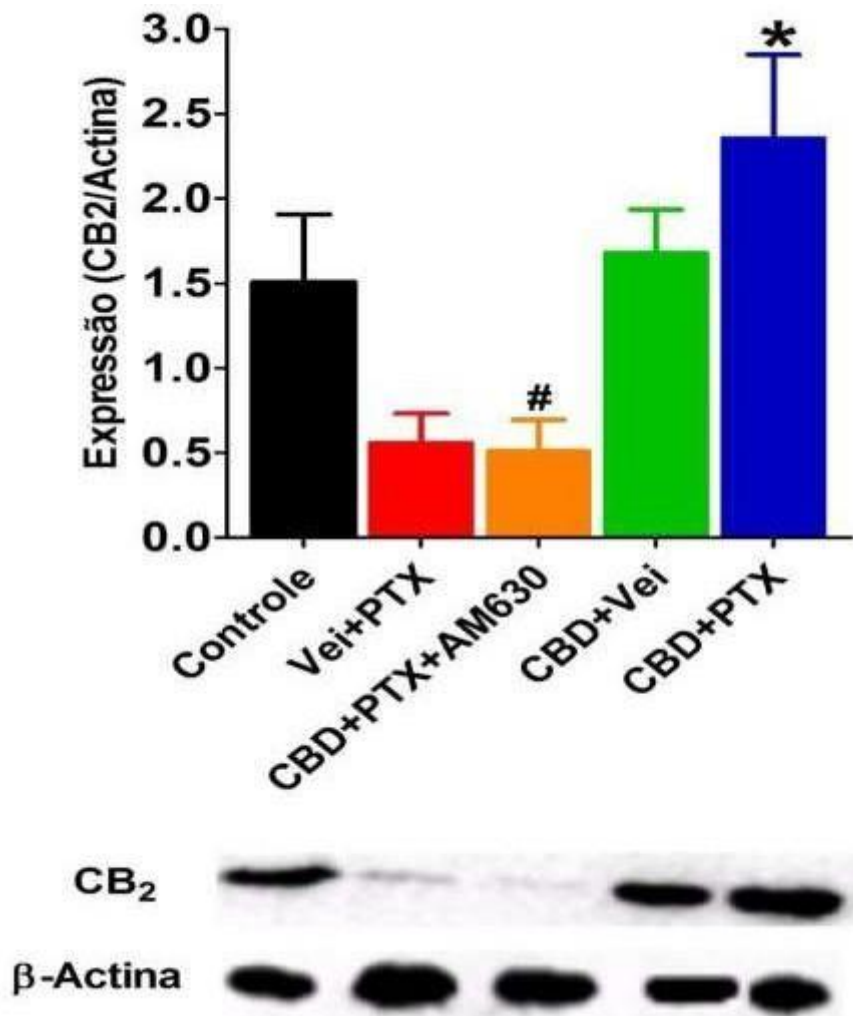
Gráfico 2B—Participação do receptor CB2 na antinocicepção produzida pelo CBD em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+CBD+PTX (animais que receberam veículo do AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.



Gráfico 2C- Efeito do CBD na expressão do receptor CB<sub>2</sub> na medula espinal.

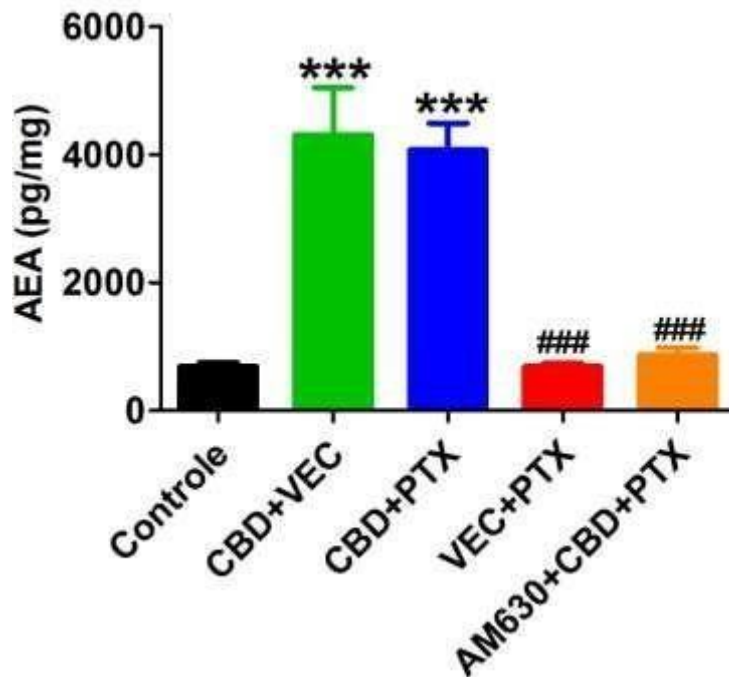
Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e #indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CBD+PTX+AM630 (animais que receberam canabidiol, injeção de paclitaxel e AM630) comparado com o grupo CBD+PTX+VEC (animais que receberam canabidiol, injeção de paclitaxel e veículo do AM630).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Visto que o CB<sub>2</sub> participa da antinocicepção promovida pelo CBD e que esse efeito pode ser através de endocanabinóides, pois Kozela e colabores (2007) demonstraram que o CBD aumenta os níveis de AEA, também realizamos a dosagem de endocanabinóides AEA e 2-AG para avaliar esse efeito na neuropatia induzida pelo PTX. Desse modo, o CBD promoveu o aumento significativo ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25}=22,65$ ) níveis de AEA e 2-AG (Gráficos 2D e 2E).

Entretanto, o aumento dos níveis desses endocanabinóides foi inibido ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25} = 22,65$ ) nos animais com neuropatia tratados com o veículo do CBD e com o antagonista do receptor  $CB_2$ , sugerindo, mais uma vez, a participação desse receptor, bem como do sistema endocanabinóide, na antinocicepção promovida pelo CBD a nível espinhal.

Gráfico 2D–Efeito do CBD nos níveis de AEA na medula espinhal.

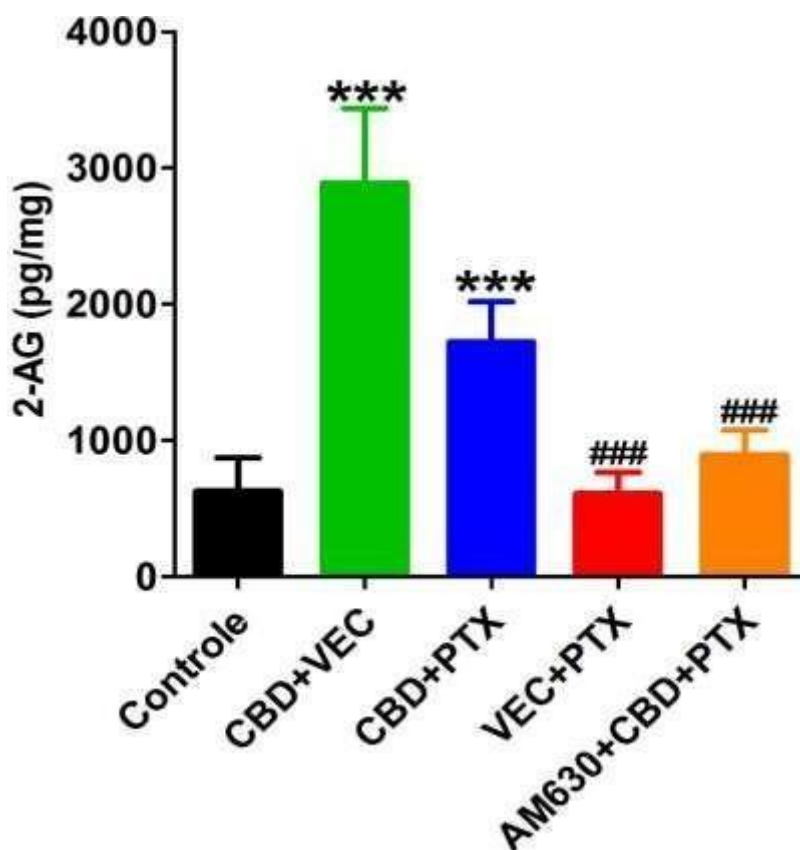


Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ### indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n = 6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.



Gráfico 2E–Efeito do CBD nos níveis de 2-AG na medula espinhal.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

#### 4.3 PARTICIPAÇÃO DA MICRÓGLIA ESPINHAL NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX E DO CBD NESSE PROCESSO

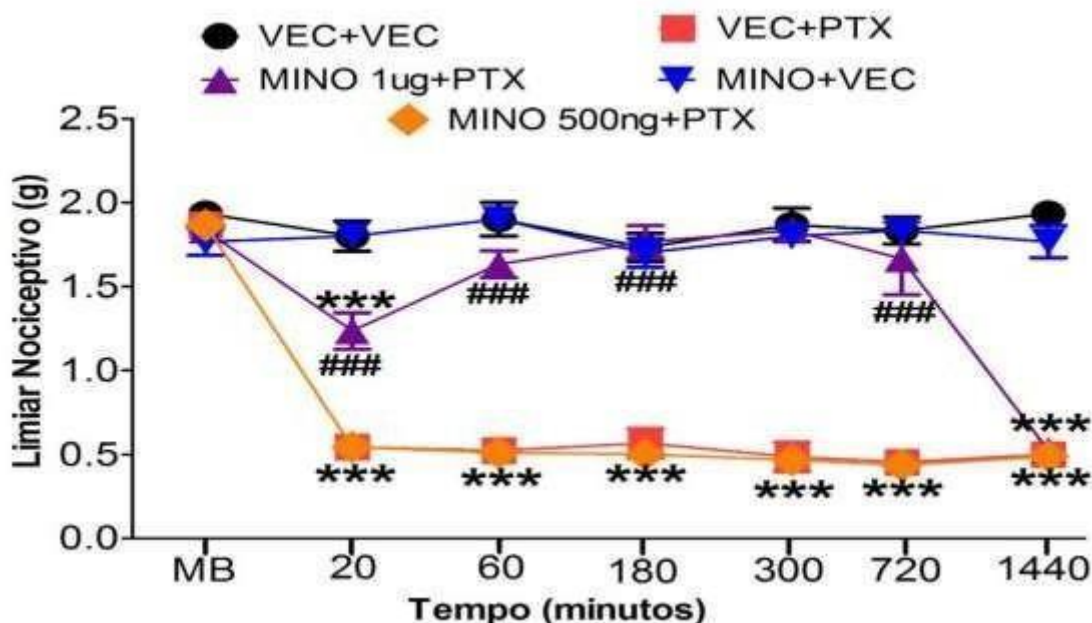
Estudos recentes têm demonstrado que a micróglia é uma das primeiras células situadas na medula espinhal a responder à resposta nociceptiva, principalmente induzida pelo PTX (WU *et al.*, 2018), as quais uma vez ativadas, irão liberar mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas e

iniciando assim, uma atividade sináptica aumentada e potencializando o processo nociceptivo (YAN *et al.*, 2018).

Diante disso, investigamos a participação da micróglia, a nível espinhal, na gênese da dor neuropática induzida por PTX, administrando a minociclina, uma droga inibidora seletiva para a micróglia. Sendo assim, os animais com dor neuropática pré-tratados com minociclina na dose de 1ug, apresentaram uma redução da alodínia mecânica, tanto em um período agudo (7 dias) quanto em um período crônico (14 dias) da neuropatia. No período agudo, o efeito antinociceptivo promovido pela minociclina perdurou 12 horas ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25} = 19,23$ ) e no período mais tardio foi de 5 horas ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25} = 38,51$ ) (Gráficos 3A e 3B). Os veículos do CBD e minociclina não alteraram o limiar nociceptivo. Em adição, podemos observar que o PTX promoveu o aumento significativo ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,15} = 10,55$ ) na expressão dos níveis da proteína IBA-1, um marcador microglial (gráfico 3C). Nos animais com dor neuropática induzida pelo PTX e tratados com CBD ou minociclina, esse aumento foi inibido ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,15} = 10,55$ ). Além disso, a minociclina inibiu o aumento ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25} = 22,65$ ) dos níveis de endocanabinóides AEA e 2-AG promovido pelo CBD (Gráficos 2D e 2E), sugerindo a participação da micróglia na dor neuropática induzida pelo PTX, bem como, que o CBD pode inibir esse mecanismo.



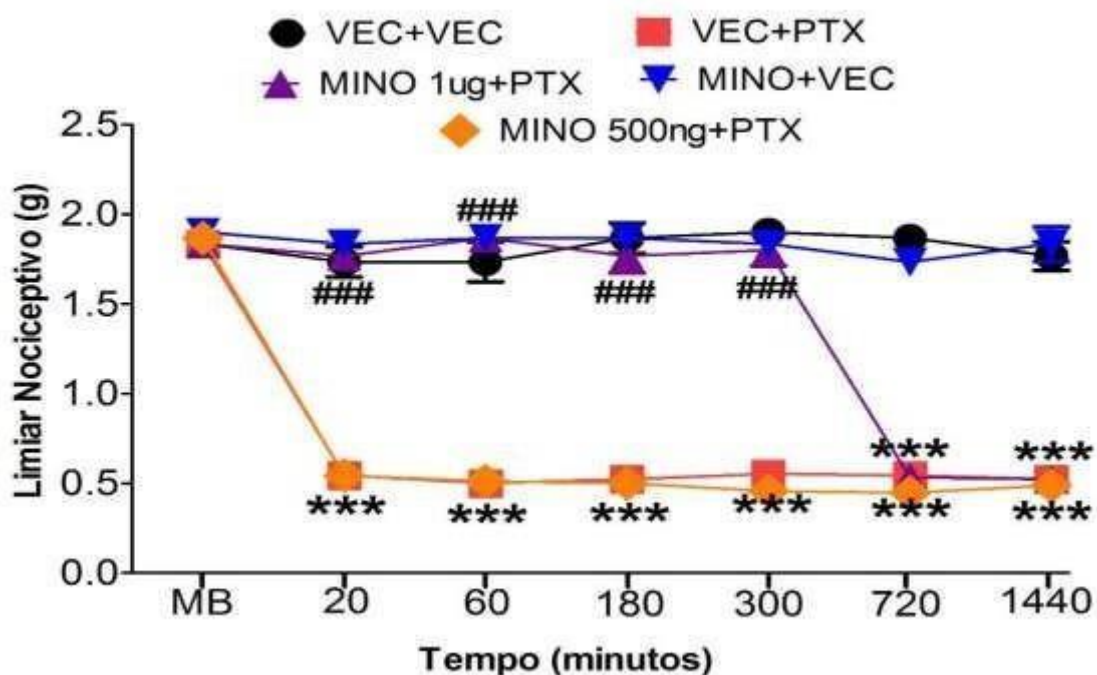
Gráfico 3A–Participação da micróglia espinal em uma fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos MINO+PTX (animais que receberam minociclina e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

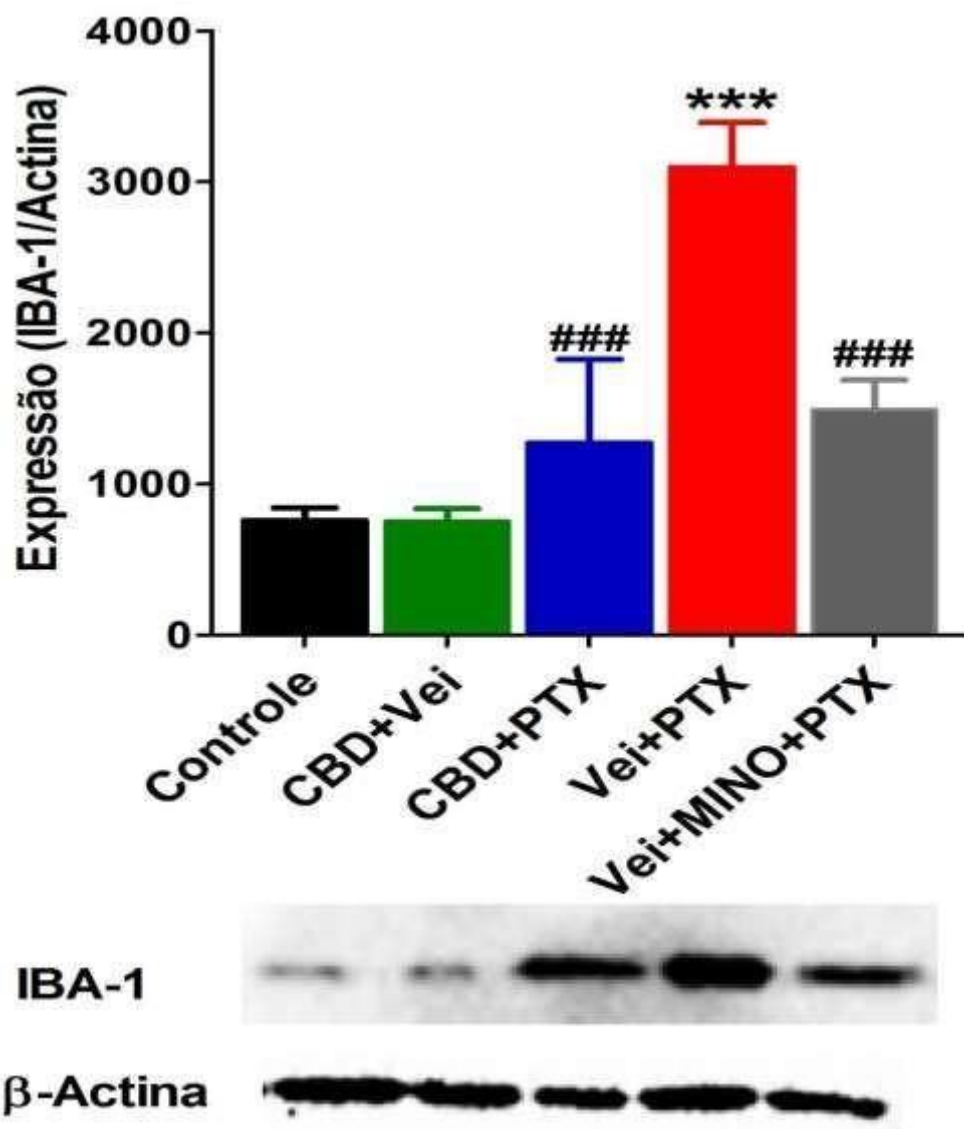
Gráfico 3B–Participação da micróglia espinal em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos MINO+PTX (animais que receberam minociclina e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

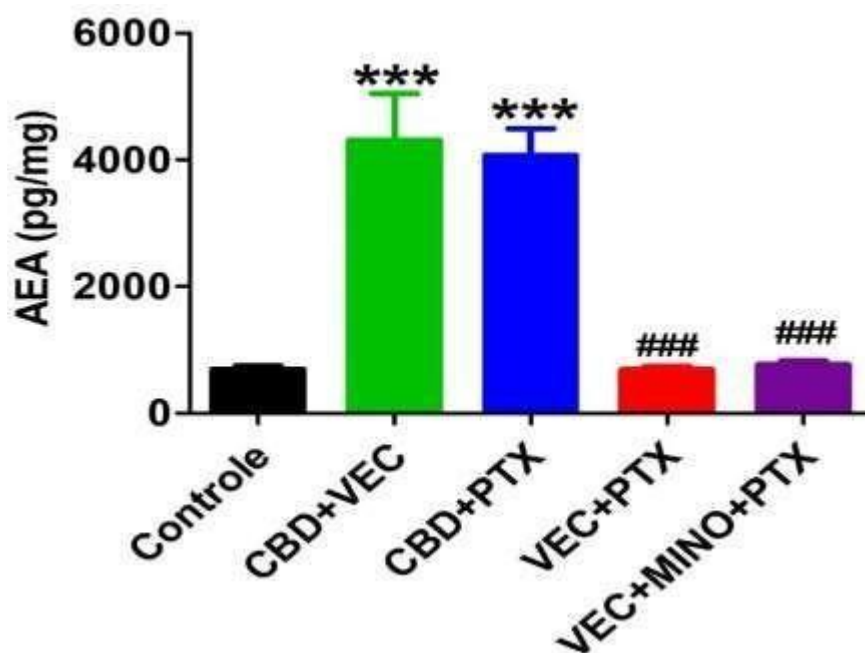
Gráfico 3C-Efeito do CBD na expressão dos níveis da proteína microglial IBA-1 na medula espinhal na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+Mino+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, minociclina e injeção de paclitaxel) comparados com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

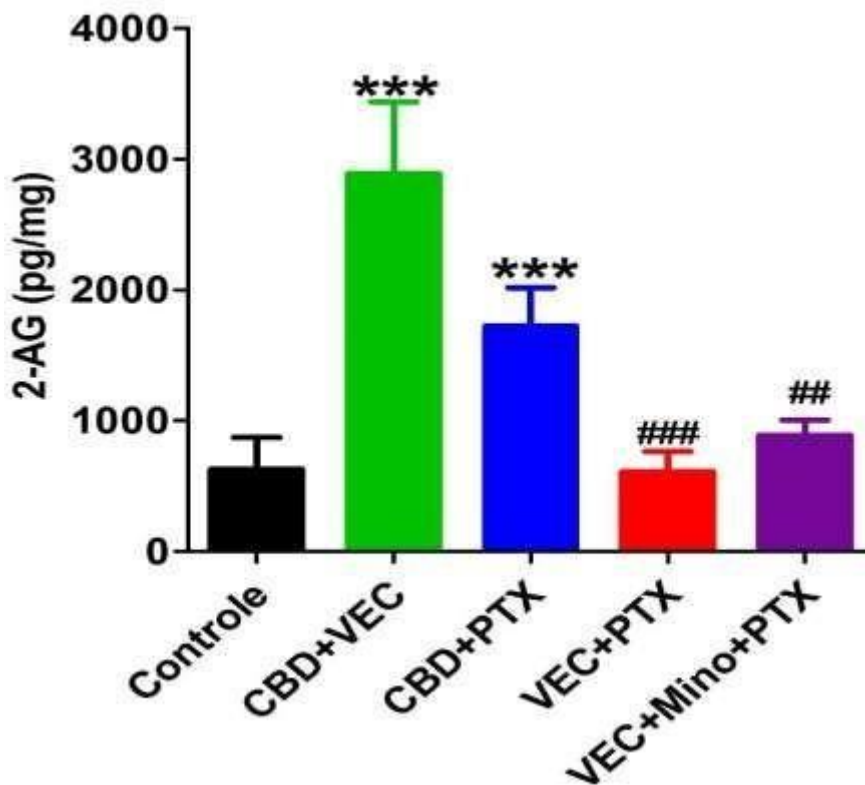
Gráfico 3D- Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+MINO+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, minociclina e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Gráfico 3E- Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+MINO+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, minociclina e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

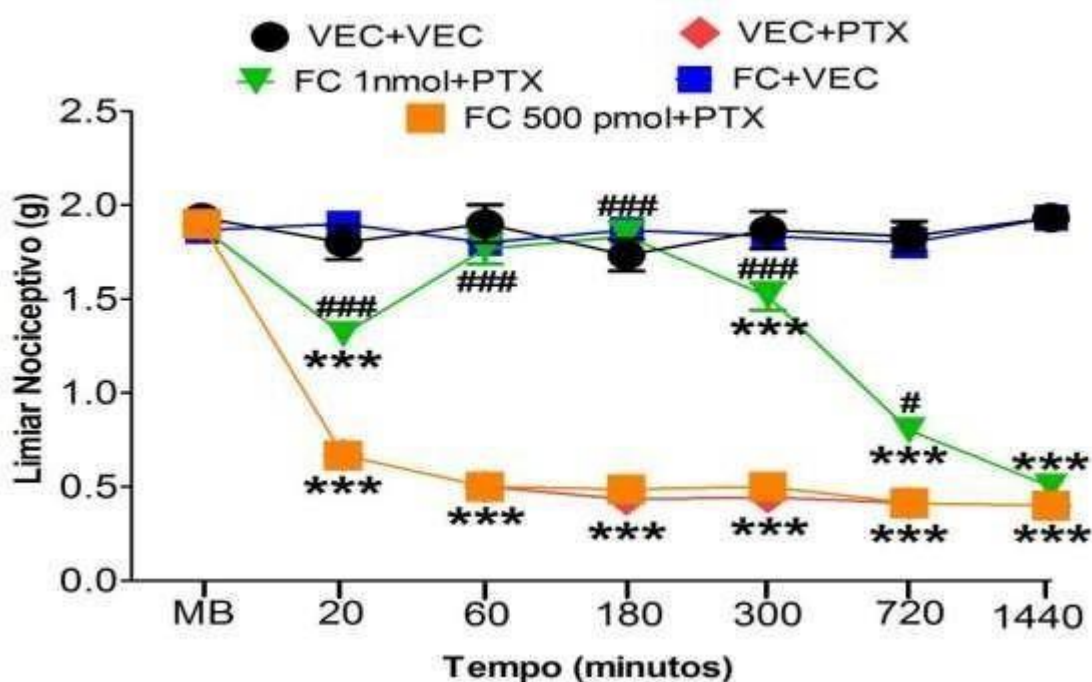
#### 4.4 ENVOLVIMENTO DE ASTRÓCITOS ESPINHAIS E O EFEITO DO CBD NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX

Após verificado um possível envolvimento da micróglia espinhal na dor neuropática induzida pelo PTX, investigamos também a participação dos astrócitos nesse efeito, tendo em vista que, tais células também são descritas envolvidas na sensibilização da dor a nível espinhal (NAGUIB *et al.*, 2012). Assim, o pré-tratamento com o fluorocitrato (1nmol, i.t.), um inibidor de astrócitos, reverteu a alodínia mecânica tanto na fase aguda (7º dia), por 7 horas ( $p < 0,001$ ,

$F_{4,25}=37,54$ ), como na crônica (14<sup>o</sup> dia), também por 12 horas ( $p<0,001$ ,  $F_{4,25}=38,10$ ) (Gráfico 4A e 4B). Os animais que receberam veículo não apresentaram alterações no limiar nociceptivo.

No gráfico 4C, podemos observar que os animais tratados com fluorocitrato, apresentaram uma redução significativa ( $p<0,05$ ,  $F_{4,15}=3,862$ ) da expressão de proteínas para o GFAP, um marcador de astrócito. Além disso, o pré-tratamento com fluorocitrato inibiu o aumento ( $p<0,001$ ,  $F_{4,15}=3,862$ ) da síntese de endocanabinóides, AEA e 2-AG, promovido pelo CBD (Gráficos 4D e 4E), sugerindo também a participação dos astrócitos na dor neuropática induzida pelo PTX.

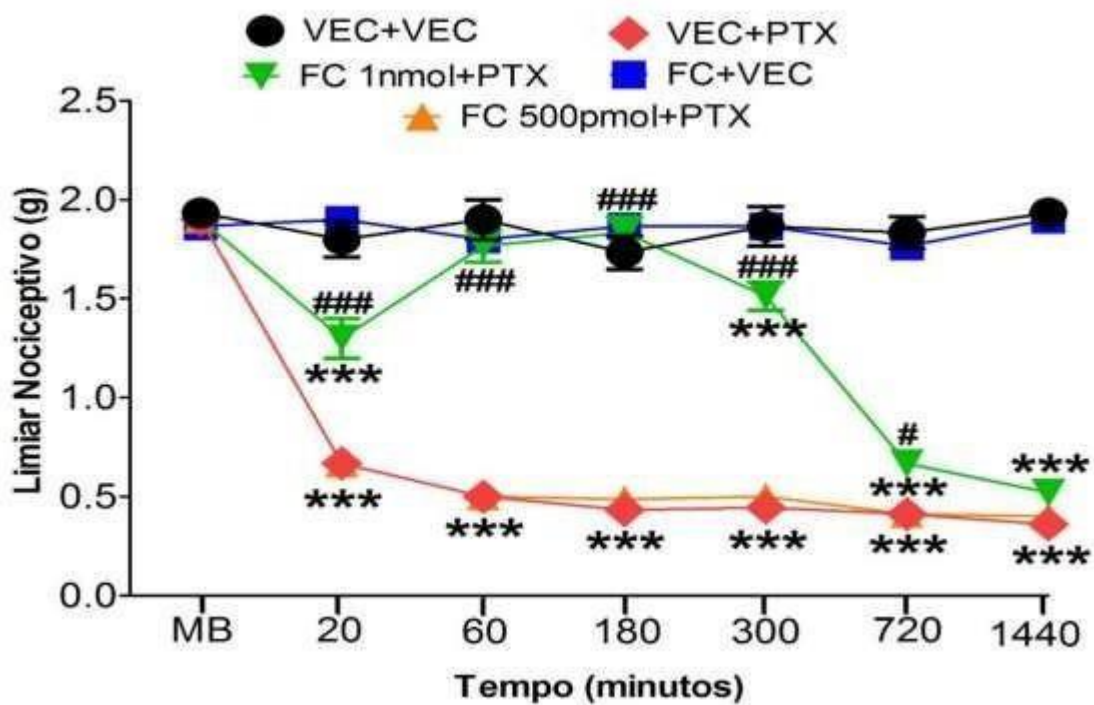
Gráfico 4A- Participação de astrócitos na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p<0,001$ ) em relação ao grupo PTX+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica significância estatística ( $p<0,001$ ) em relação aos grupos FC+PTX (animais que receberam fluorocitrato e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

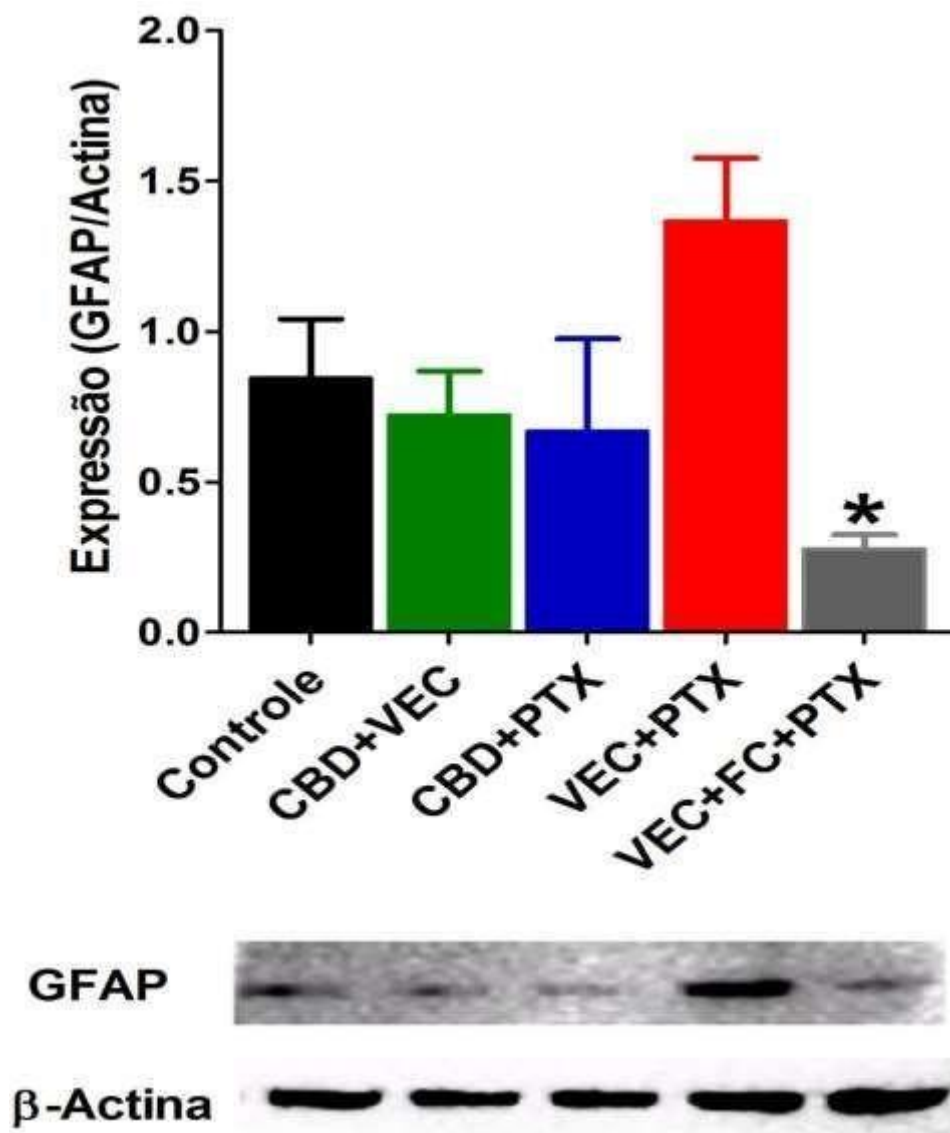
Gráfico 4B- Participação do astrócito em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo PTX+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos FC+PTX (animais que receberam fluorocitrato e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

Gráfico 4C- Efeito do CBD na expressão dos níveis de GFAP na medula espinhal na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.

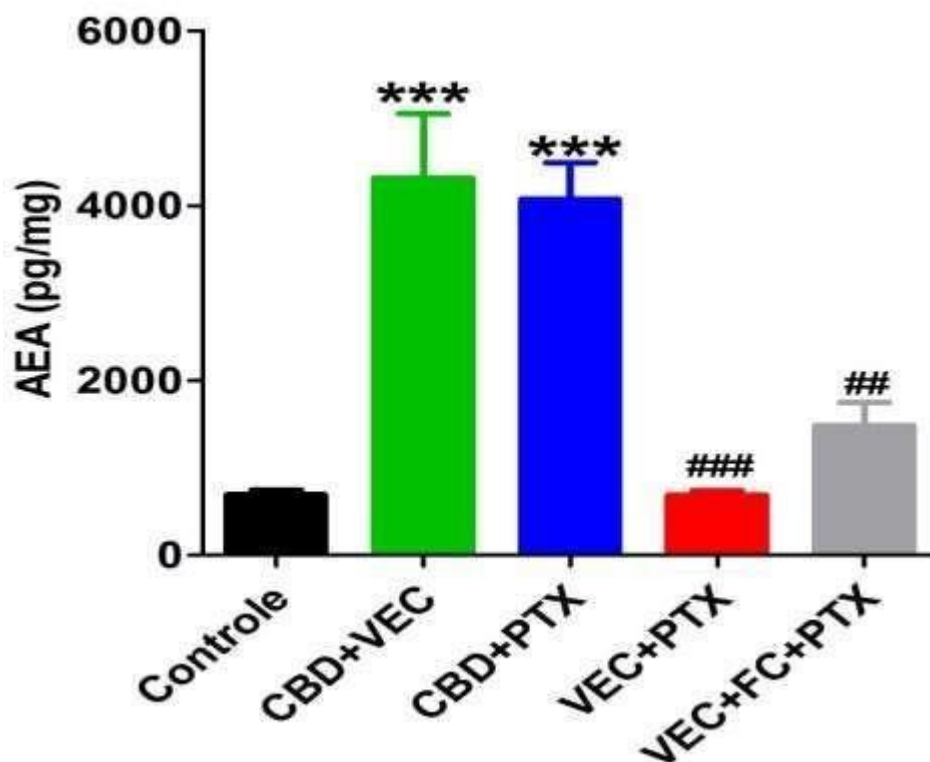


Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos VEC+FC+PTX (animais que receberam veículo do canabidio, fluorocitrato e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.



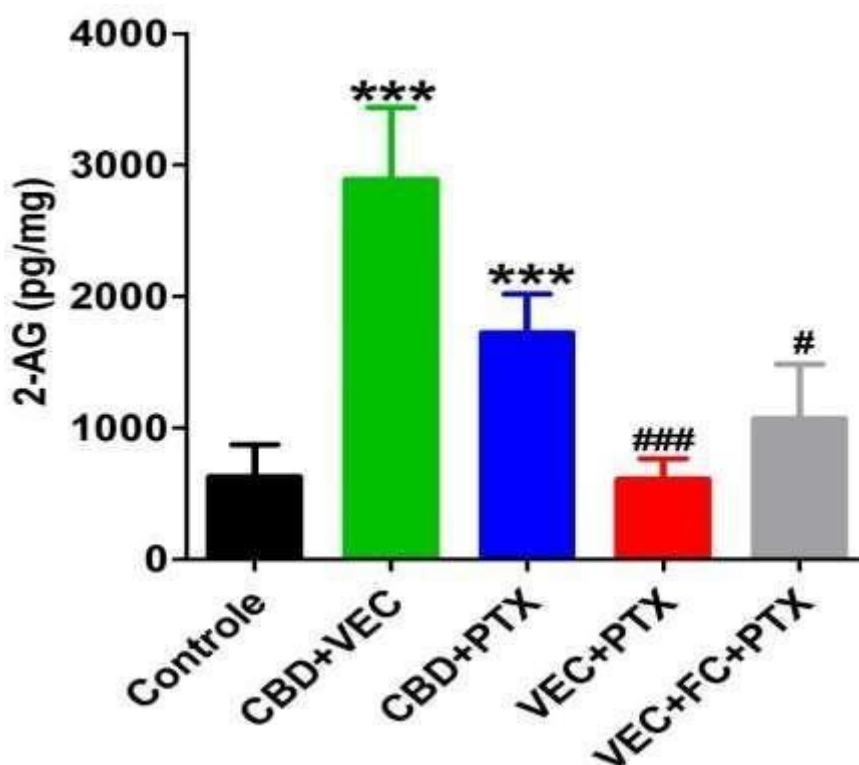
Gráfico 4D- Efeito do CBD nos níveis espinhais de AEA.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+FC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, fluorocitrato e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Gráfico 4E- Efeito do CBD nos níveis espinais de 2-AG.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+FC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, fluorocitrato e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

#### 4.5 EFEITO DO CBD NA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRL4 ESPINHAL NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX

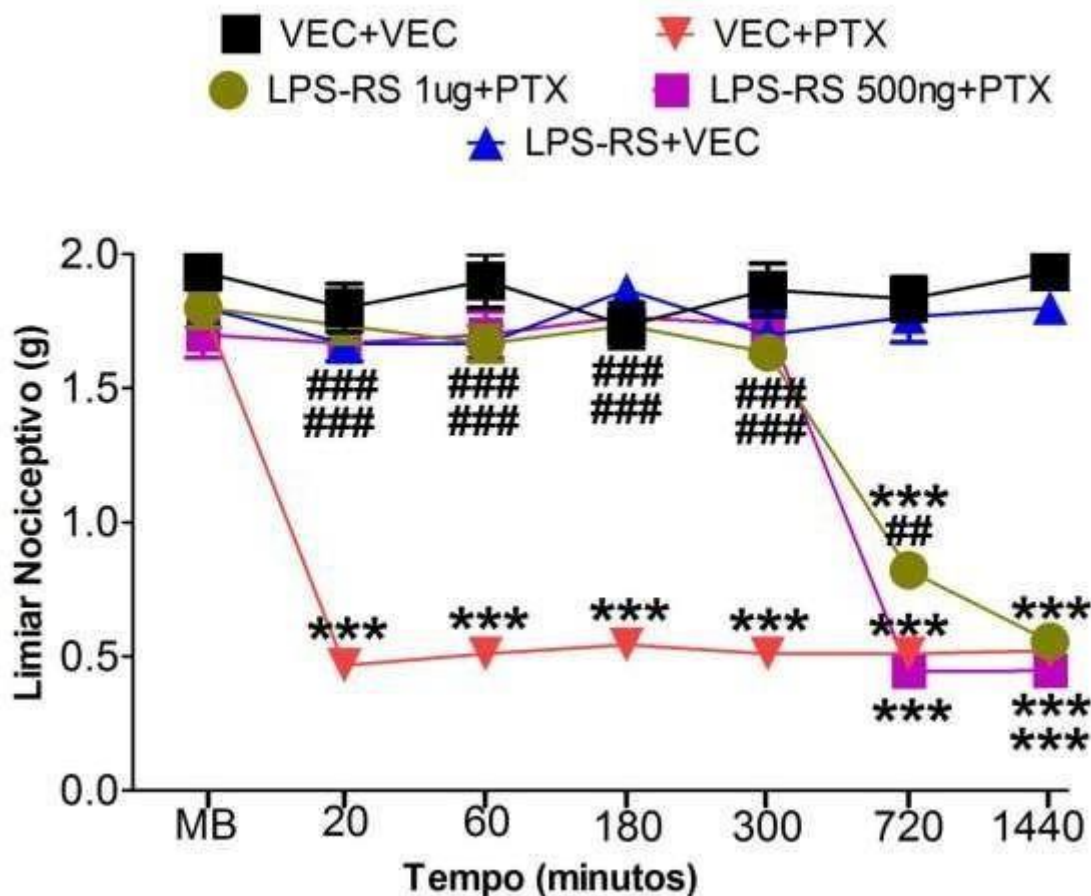
Um considerável número de receptores é expresso nas células da glia e envolvidos na gênese da nocicepção (WU *et al.*, 2018). Dentre eles, destaca se TRL4, que também desempenham papel crucial na ativação dessas células, contribuindo para a indução e manutenção da dor (TANGA *et al.*, 2005). Diante dos prévios resultados com micróglia e astrócitos, investigamos o envolvimento do receptor TRL4, o quais são expressos por estas células e também são

envolvidos na gênese da dor neuropática induzida pelo PTX. Para tal, utilizamos o LPS-RS, um antagonista deste receptor.

De acordo com os gráficos 5A e 5B, podemos sugerir que o receptor TRL4 participa da indução (aguda) e manutenção (crônica) da dor neuropática induzida por PTX, pois os animais tratados com LPS-RS na dose de 1ug, apresentaram uma reversão significativa ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25} = 35,16$ ) da alodínia mecânica quando comparado aos animais neuropáticos tratados com o veículo desta droga. Esse resultado foi encontrado tanto em uma fase aguda quanto em uma fase crônica da neuropatia, tendo perdurado por 12 horas e na dose 1ug de por 5 horas na dose de 500ng. Os animais tratados com veículo do PTX e do LPS-RS não apresentaram nenhum efeito sobre o limiar nociceptivo.

Adicionalmente, no gráfico 5C, demonstramos que o PTX promoveu um aumento ( $p < 0,001$ ,  $F_{5,15} = 18,44$ ) na expressão do receptor TRL4. Nos animais com neuropatia pré-tratados com CBD, tiveram uma redução ( $p < 0,001$ ,  $F_{5,15} = 18,44$ ) na expressão dos níveis do receptor TRL4. Similar resultado foi encontrado no grupo com neuropatia induzida pelo PTX e pré tratado com LPS-RS. Além disso, o LPS-RS promoveu uma redução ( $p < 0,001$ ,  $F_{5,15} = 22,65$ ) nos níveis dos endocanabinóides AEA e 2-AG (Gráficos 5D e 5E) sugerindo a participação do receptor TRL4 na dor neuropática induzida por PTX e que o CBD pode esse inibir mecanismo.

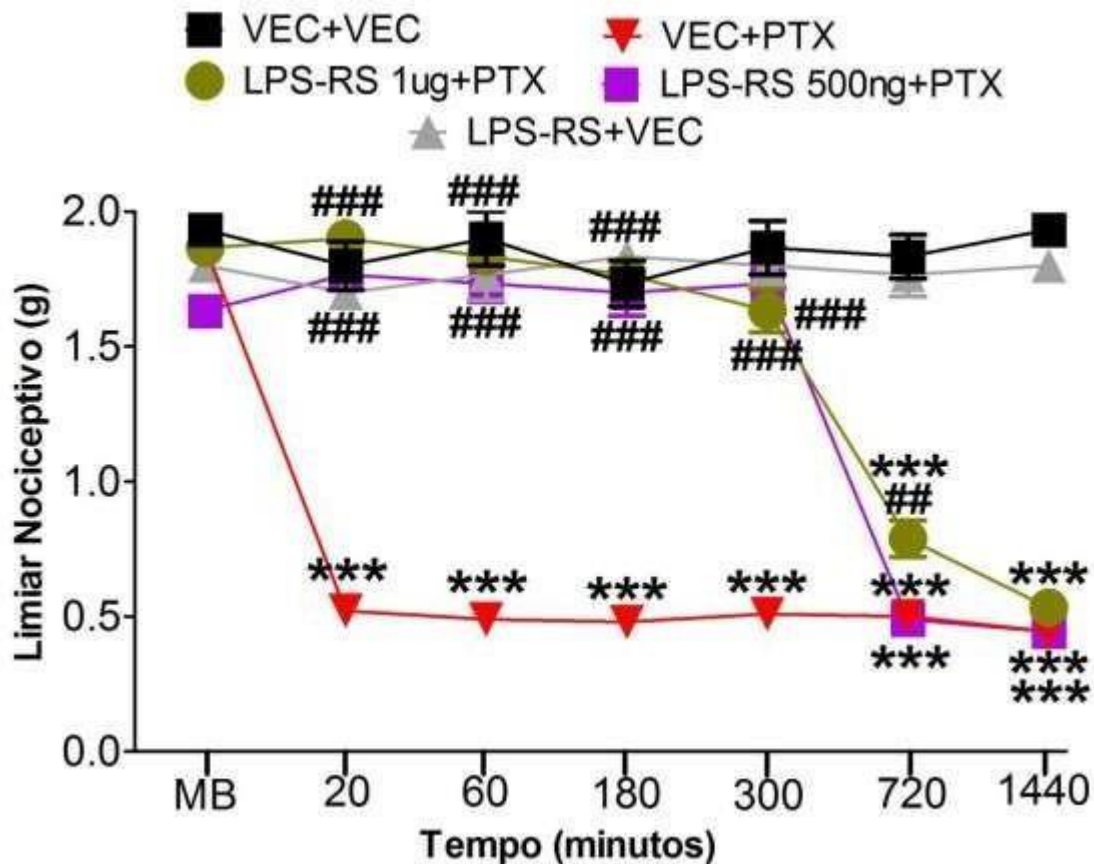
Gráfico 5A- Participação do receptor TRL4 em uma fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, injeção de paclitaxel) comparado com os grupos LPS-RS 500ng+PTX (animais que receberam LPS-RS na dose de 500ng e injeção de paclitaxel) e LPS-RS 1ug+PTX (animais que receberam LPS-RS na dose de 1ug e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

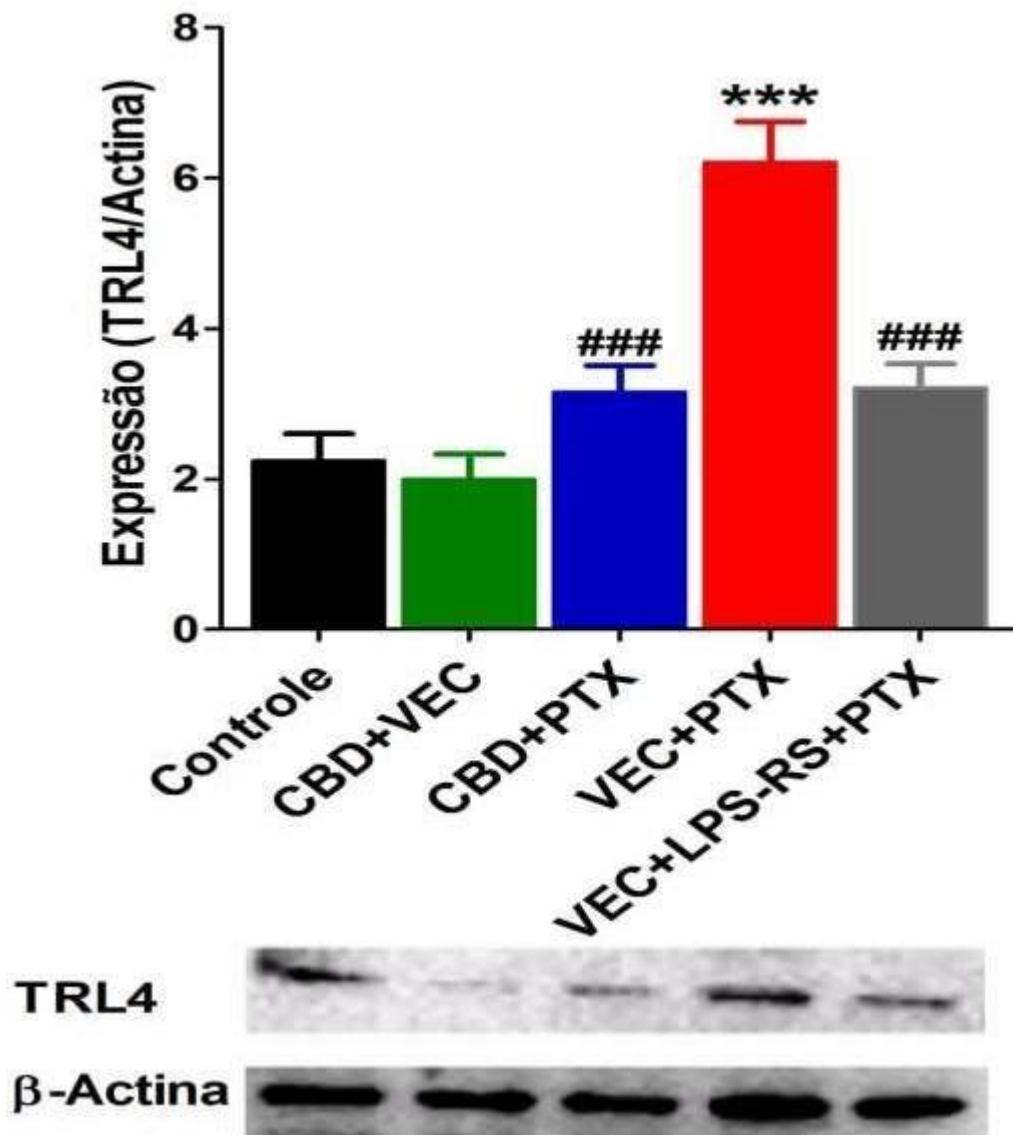
Gráfico 5B- Participação do receptor TRL4 em uma fase crônica da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, injeção de paclitaxel) comparado com os grupos LPS-RS 500ng+PTX (animais que receberam LPS-RS na dose de 500ng e injeção de paclitaxel) e LPS-RS 1ug+PTX (animais que receberam LPS-RS na dose de 1ug e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

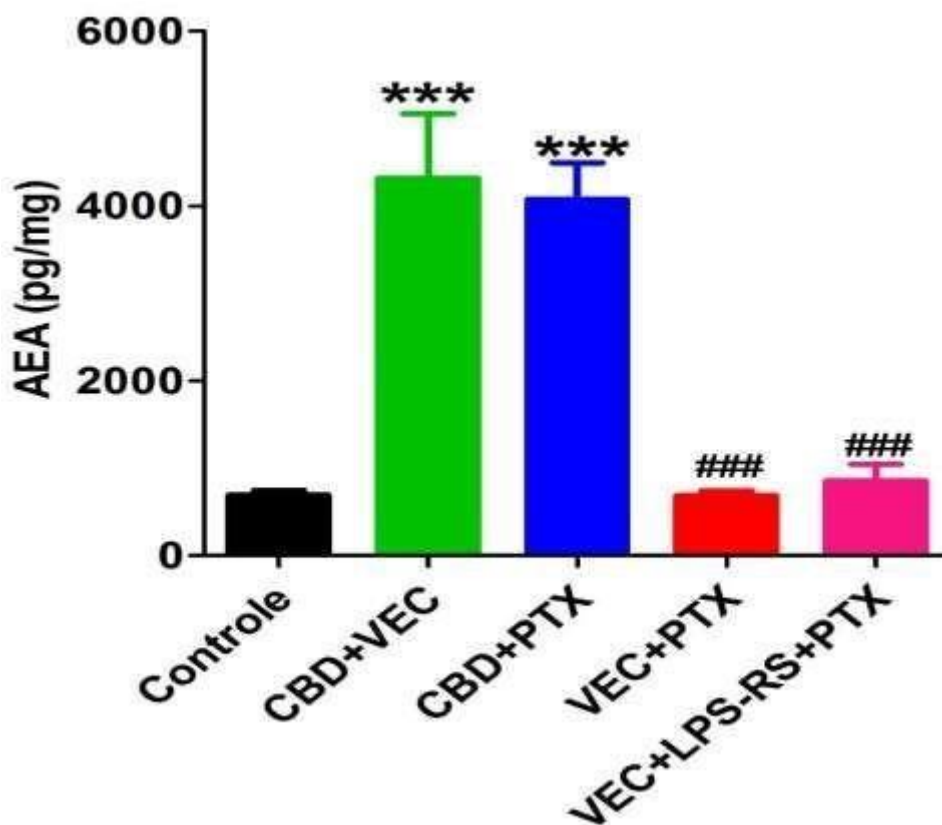
Gráfico 5C- Efeito do CBD na expressão dos níveis de espinhais de TRL4 na fase aguda da dor neuropática induzida por PTX.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel), ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+LPS-RS+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, LPS-RS e injeção de paclitaxel) comparado com o grupo VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

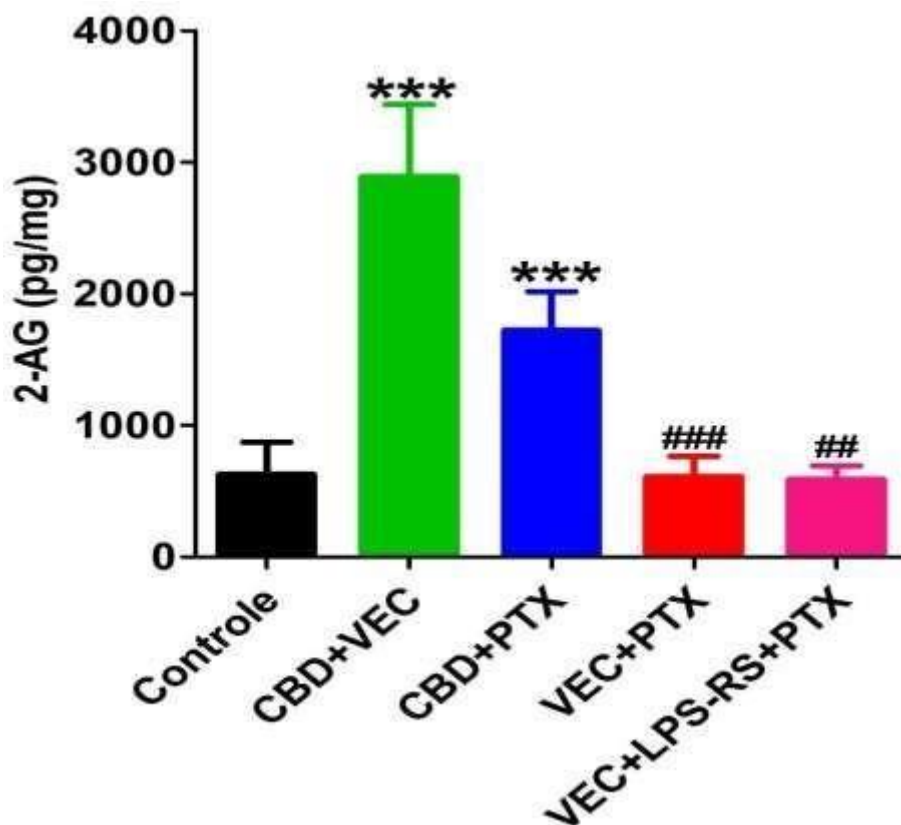
Gráfico 5D- Efeito do CBD nos níveis espinais de AEA.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+LPS-RS+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, LPS-RS e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Gráfico 5E- Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+LPS-RS+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, LPS-RS e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

#### 4.6 EFEITO DO CBD SOBRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PTX

As células da glia, uma vez ativadas, liberam uma variedade de substâncias álgicas que potencializam a transmissão da dor pelos neurônios (SOMMER, 2004; WATKINS E MAIER, 2003). Dentre essas substâncias “gliais”, as citocinas pró-inflamatórias são importantes mediadores envolvidos na

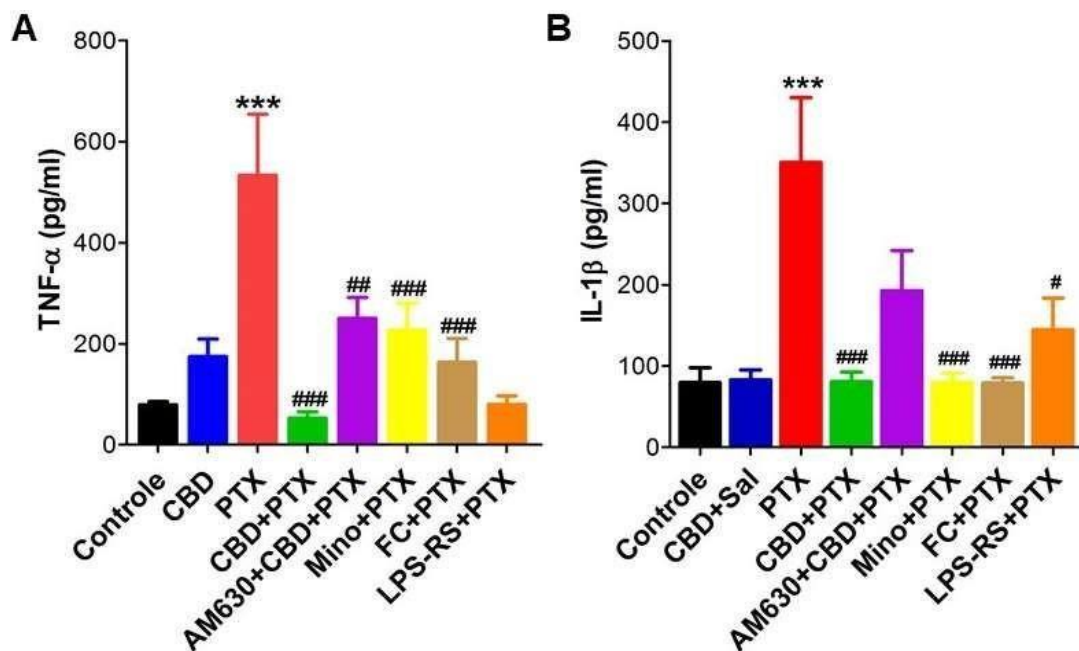


sensibilização central da dor, mais precisamente a nível espinhal, favorecendo o desenvolvimento de alodínia e hiperalgesia (SOMMER, 2004).

Desta maneira, realizamos o ensaio de ELISA para investigar a participação de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , no modelo de dor neuropática induzida pelo PTX e também buscamos avaliar o efeito do CBD nos níveis dessas citocinas.

Nesse contexto, o gráfico 6A e B demonstra que os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32} = 7,360$ ) nos animais com neuropatia induzida pelo PTX comparado a animais do grupo controle. Esse aumento foi significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32} = 7,360$ ) inibido pelo CBD.

Além disso, podemos sugerir que o efeito do CBD pode ser via receptor CB2, pois no grupo pré-tratados com AM630, os níveis dessas citocinas foram significativamente reduzidos ( $p < 0,01$ ,  $F_{7,32} = 7,360$ ). Além disso, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em tecidos de medula espinhal de animais neuropáticos pré-tratados com minociclina e fluorocitrato também reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32} = 7,360$ ), reforçando o envolvimento dessas células na liberação dessas proteínas (Gráficos 6A e B). Em adição, nos animais com neuropatia induzida pelo PTX e pré-tratados com o antagonista para o receptor TLR4, o LPS-RS, os níveis dessas citocinas foram diminuídos ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32} = 7,360$ ), demonstrando que esse receptor também participa desse processo.

Gráfico 6- Efeito do CBD nos níveis espinais de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  (pg/mL). Legenda: **A-** Efeito do CBD nos níveis medulares de TNF- $\alpha$  \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) comparado com o grupo PTX (animais que receberam injeção de paclitaxel), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos PTX comparado com os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel), AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel), Mino+PTX (animais que receberam minociclina e injeção de paclitaxel) e FC+PTX (animais que receberam fluorocitrato e injeção de paclitaxel). **B-** Efeito do CBD nos níveis medulares de IL-1 $\beta$ . \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) comparado com o grupo PTX (animais que receberam injeção de paclitaxel), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos PTX comparado com os grupos CBD+PTX (canabidiol e injeção de paclitaxel), AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel), Mino+PTX (animais que receberam minociclina e injeção de paclitaxel), FC+PTX (animais que receberam fluorocitrato e injeção de paclitaxel) e LPS-RS+PTX (animais que receberam LPS-RS e injeção de paclitaxel)  $n=5$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

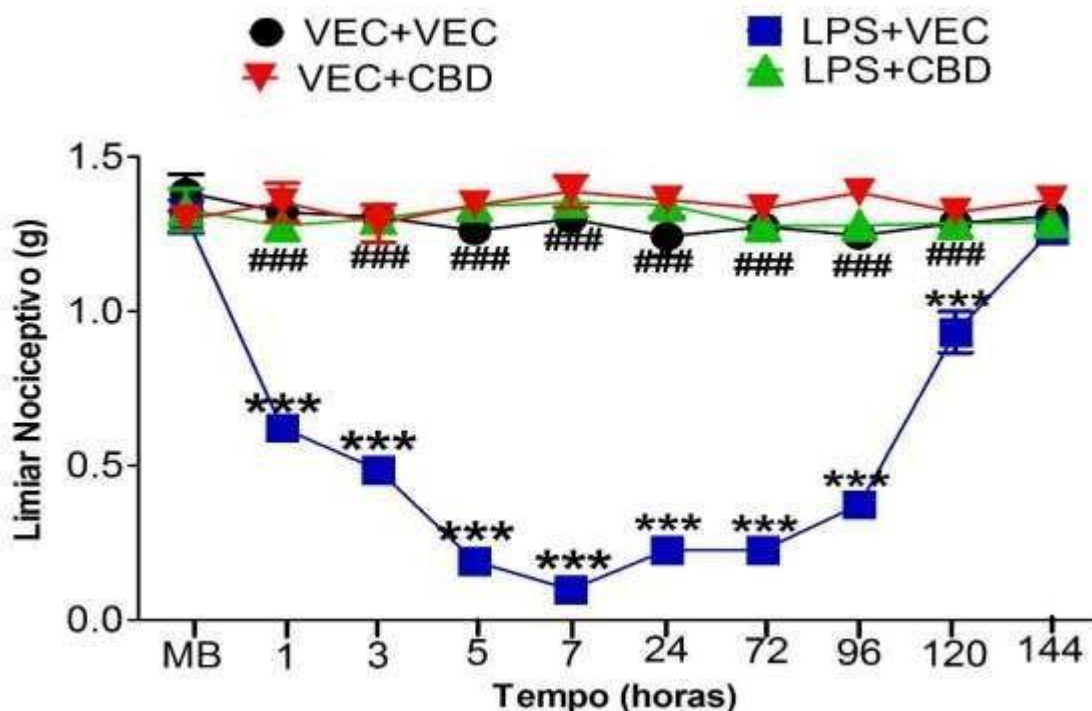
#### 4.7 EFEITO DO CBD NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LPS

Diferentes substâncias podem ativar os receptores TLR4, dentre elas destacam-se os PAMPs, os quais incluem moléculas que não sejam próprias do hospedeiro, como o LPS das paredes das bactérias (KAWAI & AKIRA, 2007).

Para avaliar o efeito do LPS sobre o limiar nociceptivo, inicialmente realizamos uma curva dose-resposta (25, 50 e 100ng) de LPS administrado intratecalmente. Assim, o gráfico 7, demonstra que o LPS na dose de 25ng promoveu alodínia mecânica a partir da 3ª hora ( $p<0,01$ ,  $F_{3,20}=3,604$ ) de sua administração, perdurando por 24 horas ( $p<0,01$ ,  $F_{3,20}=3,604$ ). Já, a dose de 50ng induziu alodínia mecânica a partir da 1ª hora ( $p<0,001$ ,  $F_{3,20}=3,604$ ) e esse efeito durou 7 horas ( $p<0,001$ ,  $F_{3,20}=3,604$ ). Do mesmo modo, na dose de 100ng, o estado alodínico iniciou-se na 1ª hora ( $p<0,001$ ) permanecendo até a 24ª hora ( $p<0,001$ ,  $F_{3,20}=3,604$ ).

Portanto, a partir desses resultados, optamos por utilizar o LPS na dose de 100ng nos próximos experimentos.

Gráfico 7- Avaliação de diferentes doses do LPS sobre o limiar nociceptivo.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p<0,001$ ) em relação aos grupos LPS 25ng (animais que receberam injeção de LPS na dose de 25ng) comparado com o grupo Sal (animais que receberam salina), ###indica significância estatística ( $p<0,001$ ) em relação aos grupos LPS 50ng (animais que receberam injeção de LPS na dose de 50ng) comparado ao grupo Sal (animais que receberam salina) e #####indica significância estatística ( $p<0,001$ ) em relação aos grupos LPS 100ng (animais que receberam injeção de LPS na dose de 100ng) comparado ao grupo Sal (animais que receberam salina).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

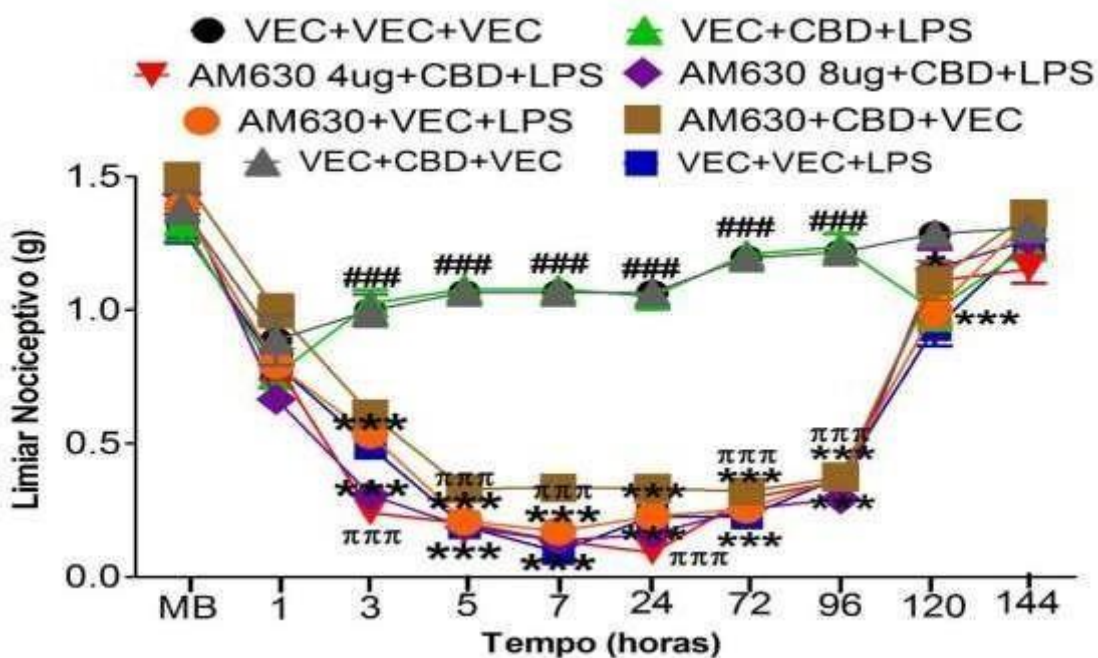
Fonte: da autora

#### 4.8 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA ANTINOCICEPÇÃO PROMOVIDA PELO CBD SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LPS

Após verificar que o LPS administrado intratecalmente induz nocicepção da 3<sup>a</sup> até a 96<sup>a</sup> hora ( $p < 0,001$ ,  $F_{3,20}=37,96$ ). O próximo passo do estudo foi avaliar o CBD nesse efeito. No gráfico 8A, demonstramos que o CBD promoveu um efeito antinociceptivo significativo ( $p < 0,001$ ,  $F_{3,20}=37,96$ ) por 96 horas sobre a nocicepção induzida por LPS.

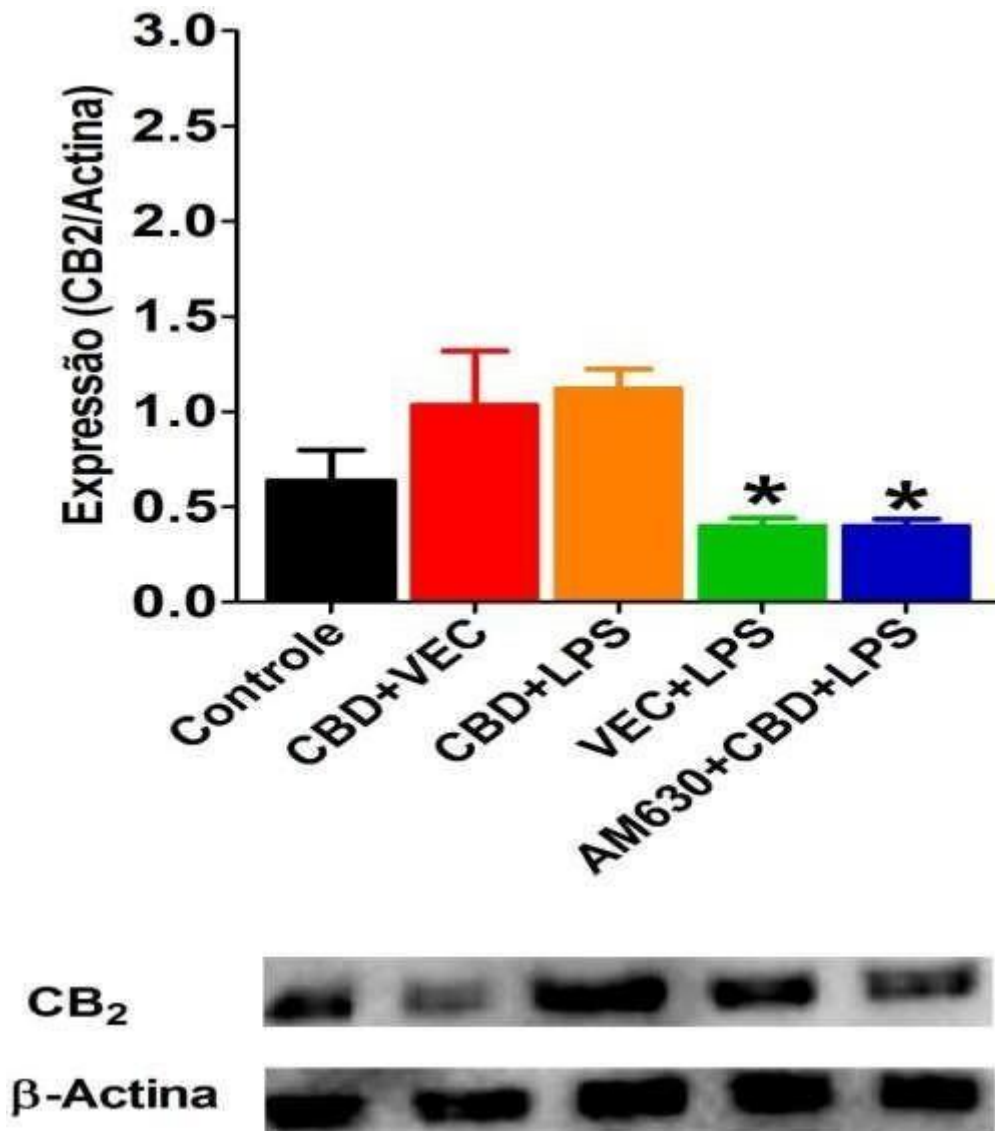
Além disso, verificamos que o efeito antinociceptivo promovido pelo CBD foi revertido significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,40}=32,45$ ) pelo AM630, da 3<sup>a</sup> até a 96<sup>a</sup> hora, nas doses de 4 e 8ug (Gráfico 8A). Os animais que receberam os veículos das drogas não apresentaram alterações no limiar nociceptivo. Em adição, no gráfico 8B reforçamos a participação do receptor CB<sub>2</sub> na antinocicepção promovida pelo CBD, no qual animais com nocicepção e tratados com AM630 antes do tratamento com CBD tiveram uma menor ( $p < 0,05$ ,  $F_{4,15}=5,028$ ) expressão espinal do receptor CB<sub>2</sub>, comparado a animais que receberam LPS e tratados com CBD.

Gráfico 8A- Participação do receptor CB<sub>2</sub> na antinociceção produzida pelo CBD na nociceção induzida por LPS.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo VEC+LPS (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo CBD+LPS (animais que receberam canabidiol e injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+LPS (animais que receberam o veículo do canabidiol e injeção de LPS) e πππ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo AM630+CBD+LPS (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de LPS) comparado com o grupo CBD+LPS (animais que receberam canabidiol e injeção de LPS).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

Gráfico 8B- Efeito do CBD na expressão do receptor CB<sub>2</sub> na medula espinhal.

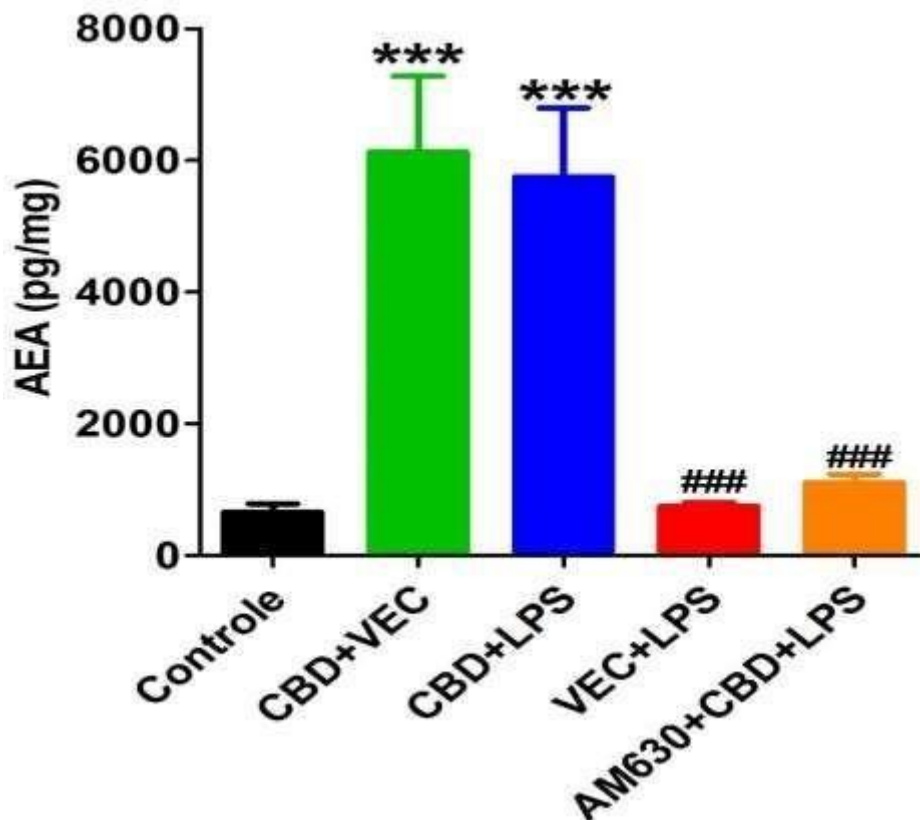
Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos VEC+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de LPS) e AM630+CBD+LPS (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de LPS) comparado ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Como demonstramos a participação de endocanabinóides no efeito antinociceptivo produzido pelo CBD na dor neuropática induzida pelo PTX, nós também investigamos os níveis espinhais de AEA e 2-AG na nocicepção induzida pelo LPS. Desse modo, o CBD promoveu um aumento significativo nos níveis de AEA ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,15}=16,74$ ) e 2-AG ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ,  $F_{4,15}=22,01$ )

tanto em animais controle quanto em animais que receberam LPS (Gráficos 8C e 8D). Além disso, esse aumento foi inibido em um grupo similar pré-tratado com o AM630, reforçando a nossa hipótese da participação do sistema endocanabinóide na antinocicepção promovida pelo CBD frente ao PAMPLPS.

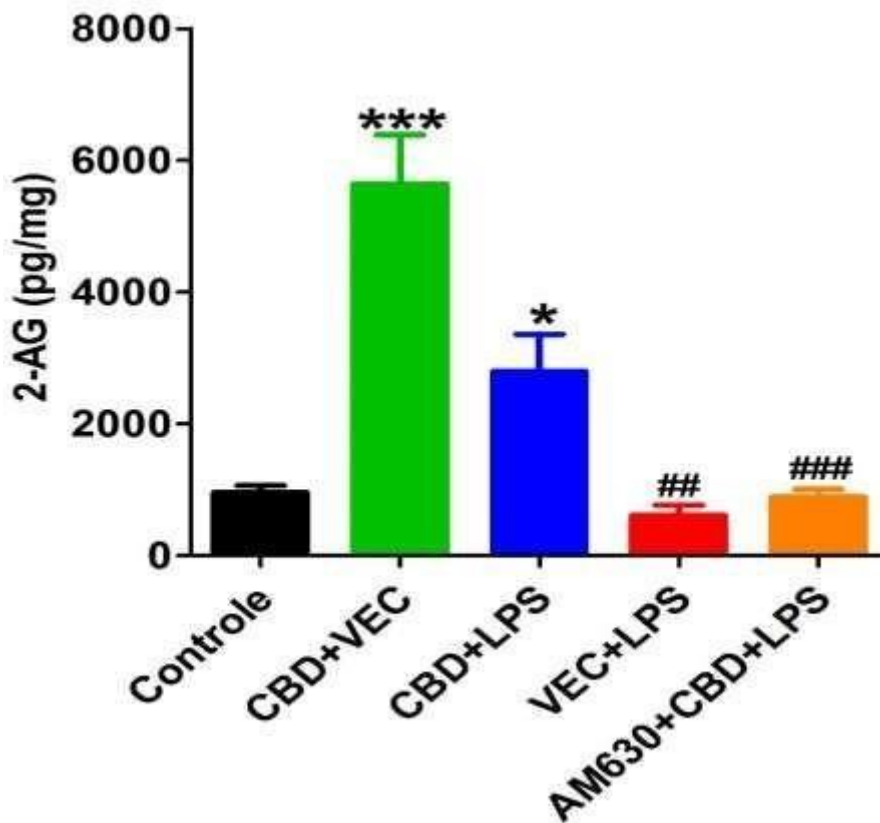
Gráfico 8C- Efeito do CBD nos níveis espinais de AEA.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Gráfico 8D- Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo AM630+CBD+PTX (animais que receberam AM630, canabidiol e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

#### 4.9 EFEITO DO CBD NO ENVOLVIMENTO DA MICRÓGLIA ESPINHAL NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LPS

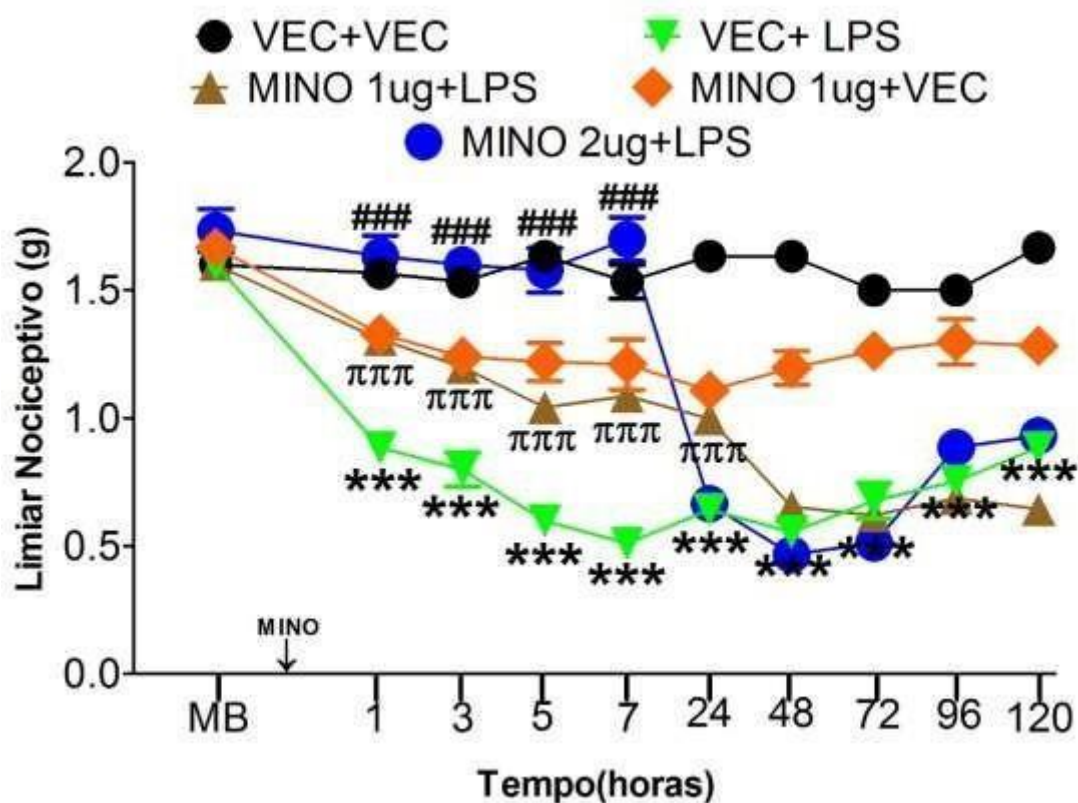
As células da glia surgiram como principais contribuintes para os mecanismos de dor patológica e crônica. Na ativação, tanto os astrócitos quanto a micróglia, respondem e liberam várias moléculas de sinalização, que têm funções protetoras e/ou patológicas (MILLIGAN & WATKINS, 2009). Dentro deste contexto, buscamos avaliar o envolvimento da micróglia, a nível espinhal,



na nociceção induzida por LPS, com a administração da minociclina. Como podemos verificar no gráfico 9A, a injeção i.t. de minociclina na dose de 1 $\mu$ g reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25}=22,07$ ) a alodínia mecânica induzida pelo LPS. Já no grupo de animais que não foram tratados com LPS, a minociclina não promoveu nenhum efeito significativo (Gráfico 9A). Os animais que receberam veículo não apresentaram alteração no limiar nociceptivo.

Além disso, no gráfico 9B, podemos observar que os animais tratados com minociclina tiveram uma menor ( $p < 0,05$ ,  $F_{4,15}=10,14$ ) expressão de IBA-1. Em adição, no gráfico 9C e 9D, observamos que a minociclina reduziu ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,15}=16,74$ ) a síntese dos endocanabinóides AEA e 2AG, sugerindo a participação da micróglia na nociceção induzida por LPS.

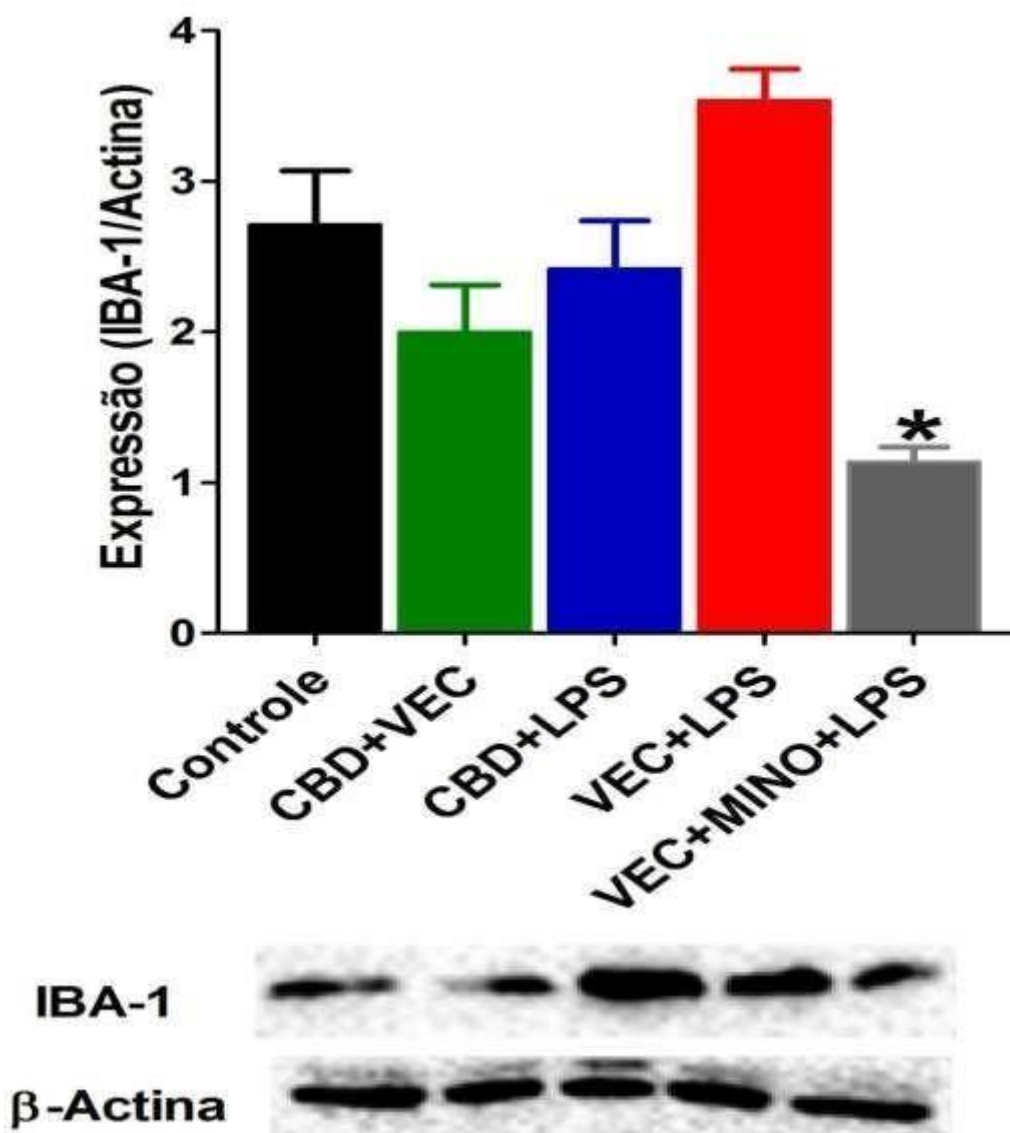
Gráfico 9A- Participação da micróglia espinhal na nociceção induzida por LPS.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo VEC+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS) e ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos MINO+LPS (animais que receberam minociclina e injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de LPS).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

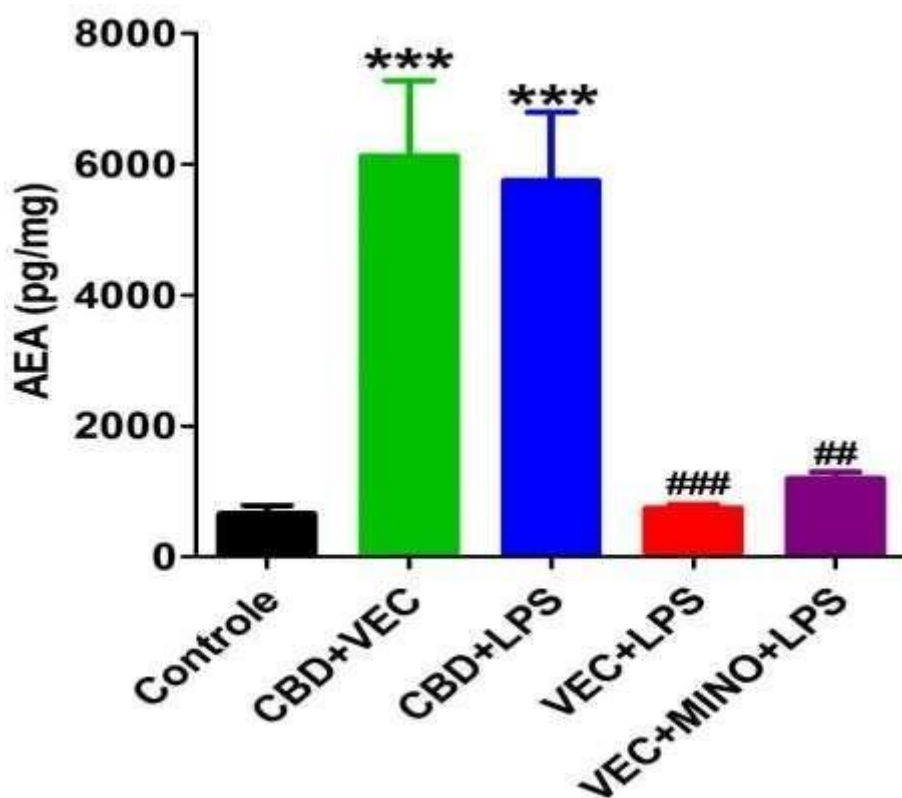
Gráfico 9B- Efeito do CBD na expressão dos níveis da proteína IBA-1 na medula espinhal.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo VEC+MINO+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol, minociclina e injeção de LPS) comparado ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

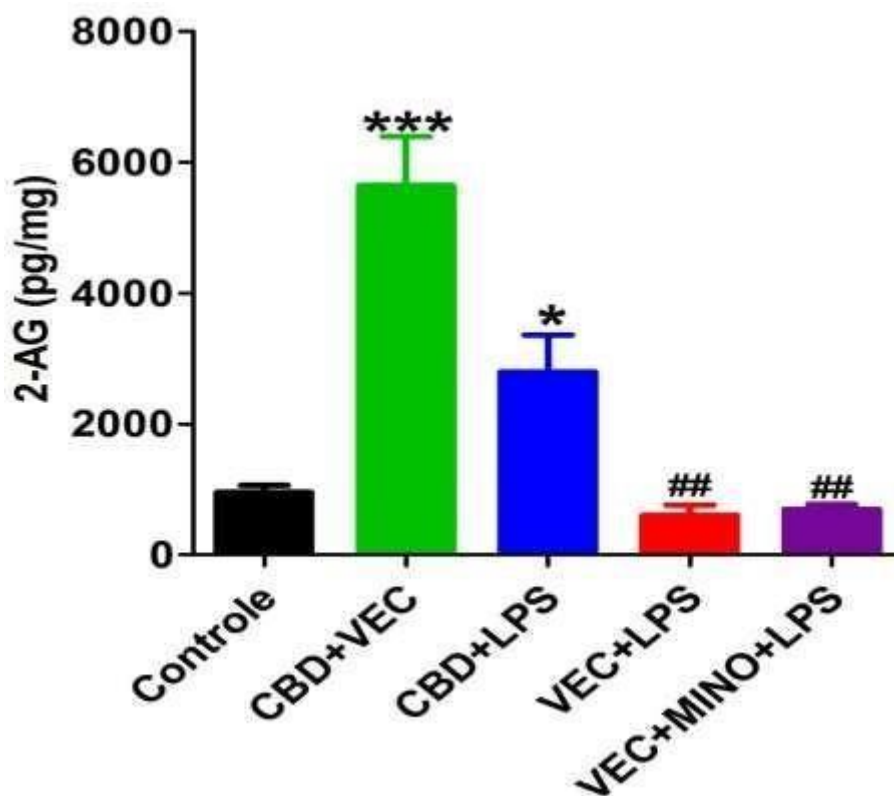
Gráfico 9C- Efeito do CBD nos níveis espinais de AEA.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+MINO+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, minociclina e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Gráfico 9D- Efeito do CBD nos níveis espinhais de 2-AG.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ## indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+MINO+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, minociclina e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

#### 4.10 INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE ASTRÓCITOS ESPINHAIS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LPS

Para finalizar o experimento da participação das células da glia na nocicepção induzida por LPS, também investigamos o efeito dos astrócitos na nocicepção induzida por LPS. Diante disso, tratamos os animais com fluorocitrato (1nmol, i.t.), um inibidor de astrócitos.

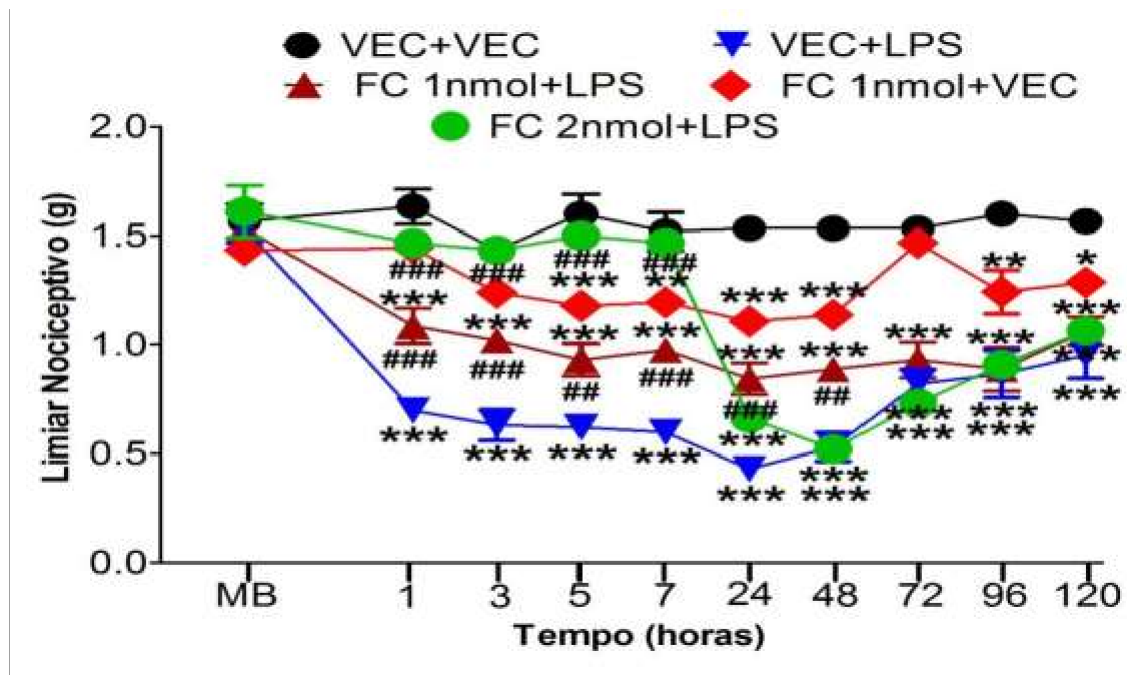
Desse modo, os animais tratados com fluorocitrato, apresentaram uma redução da alodínia mecânica significativa ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,25}=11,09$ ) nas duas

doses (1 e 2nmol) por 48 horas. Nos animais que não receberam injeção i.t. de LPS, o fluorocitrato não promoveu nenhum efeito. Os animais que receberam os veículos não apresentaram alterações no limiar nociceptivo.

Além disso, demonstramos que o CBD não apresentou efeito na expressão dos níveis de GFAP. Nos animais que receberam LPS (i.t.) não tiveram aumento na expressão de GFAP, porém, quando pré-tratados com fluorocitrato, houve uma menor expressão ( $p < 0,05$ ,  $F_{4,15} = 4,047$ ) dos níveis de proteínas para o GFAP (gráfico 10B).

Adicionalmente, o fluorocitrato reduziu ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,15} = 16,74$ ) os níveis dos endocanabinóides, AEA e 2-AG (Gráfico 10C e 10D). Assim, esses resultados sugerem que os astrócitos espinhais podem estar envolvidos na nocicepção induzida pelo LPS.

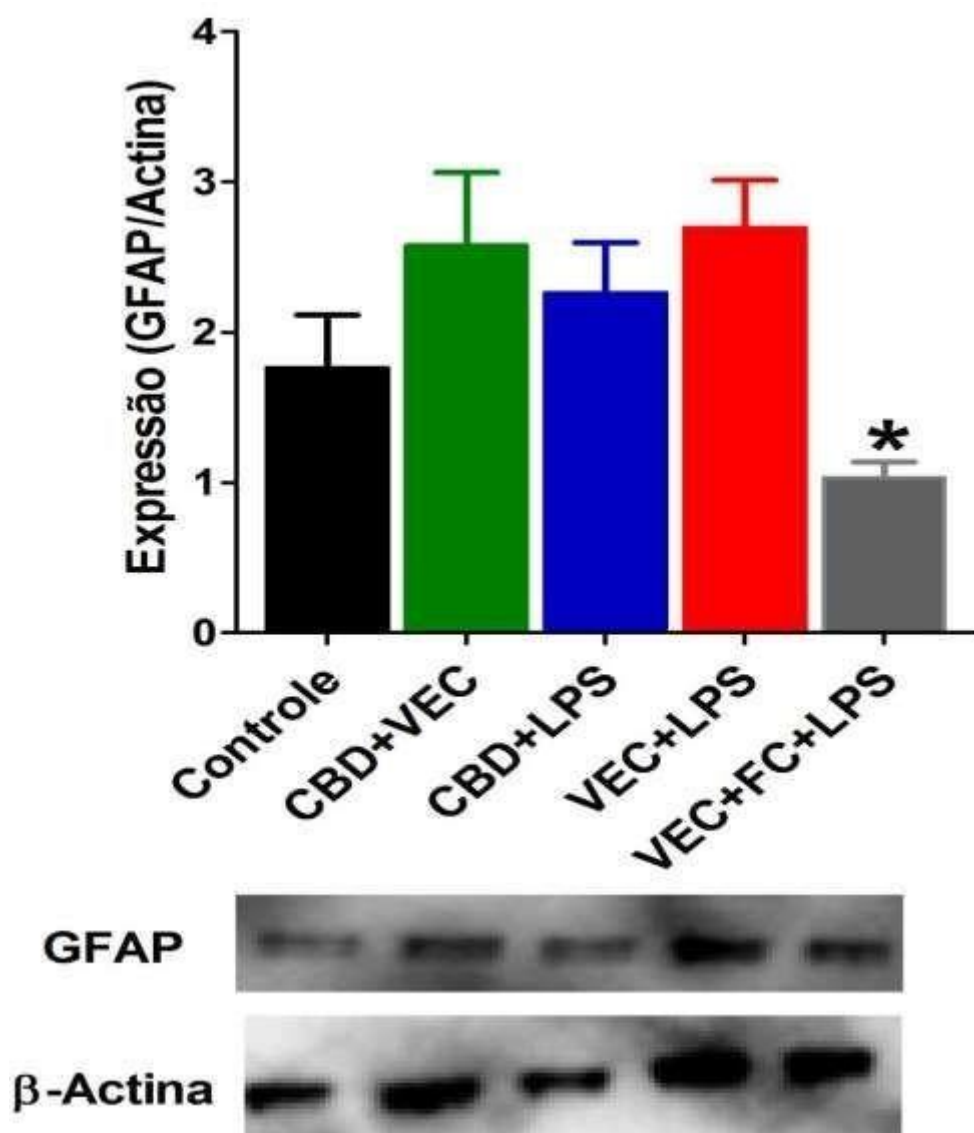
Gráfico 10A- Participação de astrócitos espinais na nociceção induzida por LPS.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo VEC+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos FC+LPS (animais que receberam fluorocitrato e injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de LPS).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

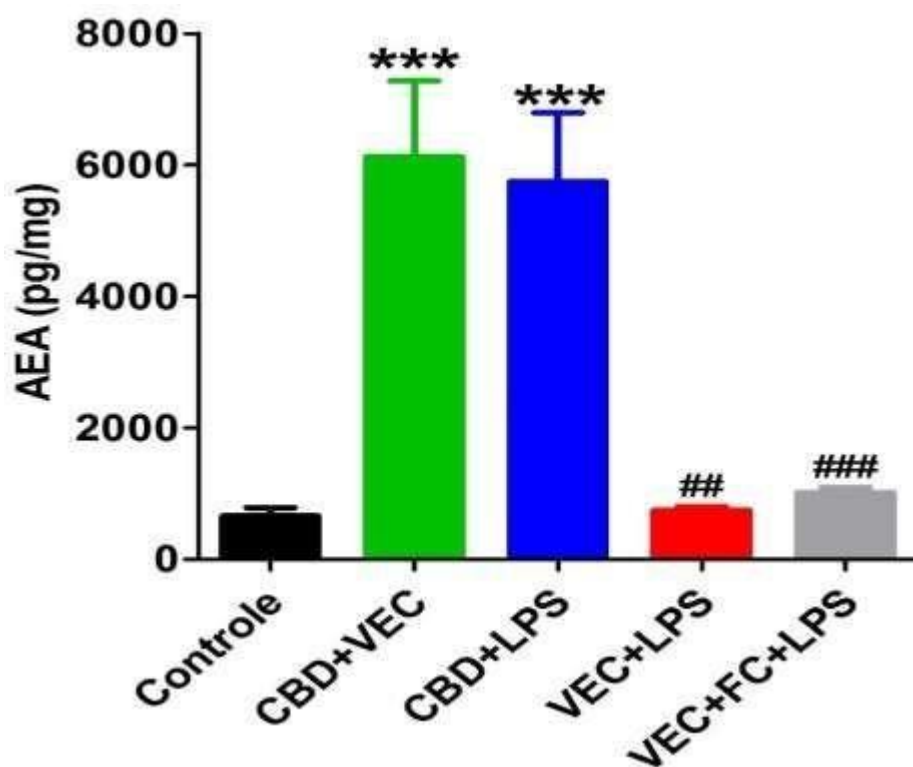
Gráfico 10B- Efeito do CBD na expressão dos níveis de GFAP na medula espinhal.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo VEC+MINO+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol, fluorocitrato e injeção de LPS) comparado ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Gráfico 10C- Efeito do CBD nos níveis espinais de AEA.

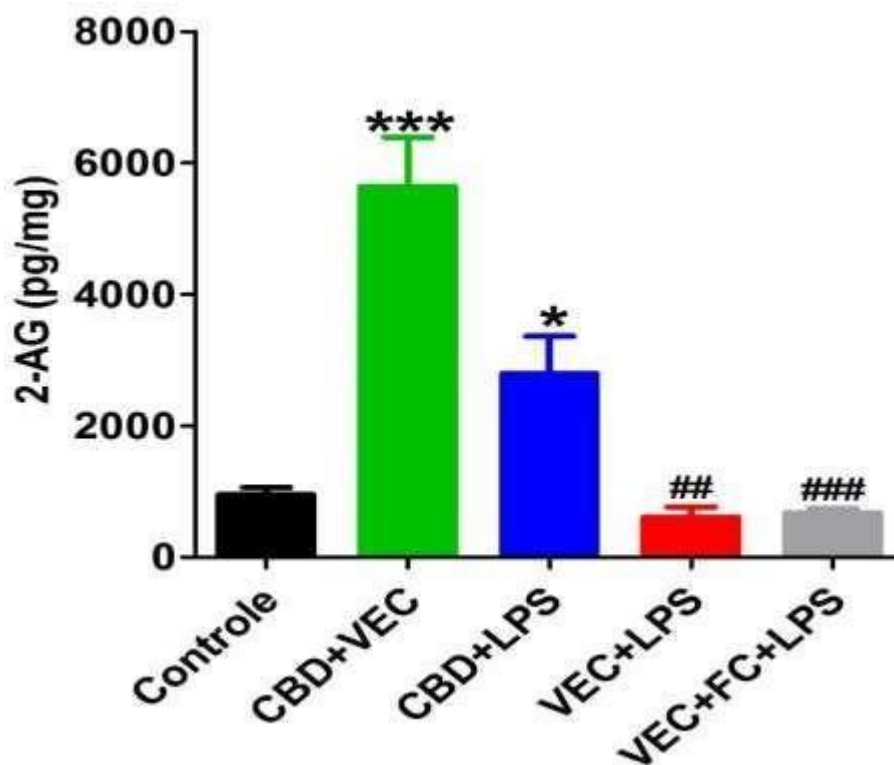


Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ### indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+FC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, fluorocitrato e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.



Gráfico 10D- Efeito do CBD nos níveis espinais de 2-AG.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ## indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+FC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, fluorocitrato e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

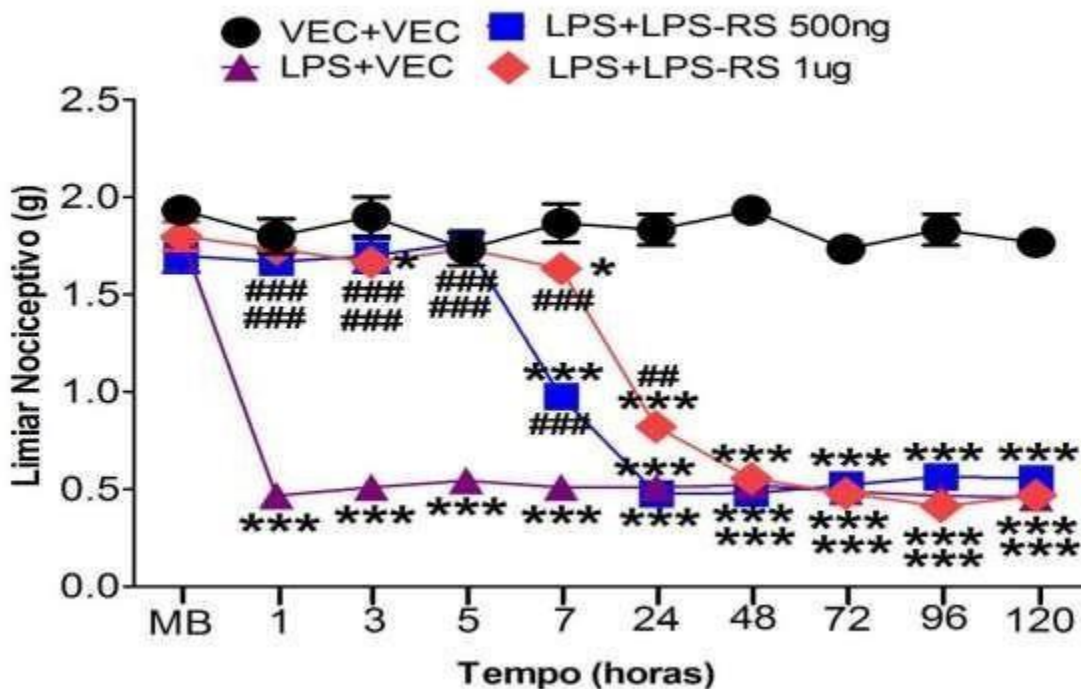
#### 4.11 PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRL4 E O EFEITO DO CBD NESSE PROCESSO DURANTE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LPS

Uma vez verificados que a micróglia e astrócitos espinais participam da nocicepção induzida pelo PAMP LPS, nós investigamos também o envolvimento do TRL4 nesse efeito, visto que, esses receptores são expressos nessas células e também envolvido na nocicepção (WANG *et al.*, 2015). Para tal, assim como nos experimentos com PTX, também utilizamos o LPS-RS.

Podemos verificar que os animais tratados com LPS-RS na dose de 1ug, tiveram uma redução ( $p < 0,001$ ,  $F_{3,20}=45,65$ ) da alodínia mecânica induzida pelo LPS, que perdurou por 24 horas quando comparado aos animais tratados com o veículo desta droga. Já na dose de 500 ng de LPS-RS, esse efeito durou 7 horas ( $p < 0,001$ ,  $F_{3,20}=45,65$ ). Os animais que receberam apenas veículo não tiveram alterações nos limiares de retirada da pata.

Em adição, quando avaliada a expressão de proteínas para o TLR4 nos da expressão de TLR4 e esse aumento foi inibido ( $p < 0,05$ ) no grupo pré-tratado com LPS-RS, enquanto que, o CBD não apresentou nenhum efeito (Gráfico 11B). Além disso, demonstramos que o LPS-RS reduziu ( $p < 0,001$ ,  $F_{4,15}=16,74$ ) os níveis dos endocanabinóides, AEA e 2-AG (Gráfico 11C e 11D). Esses resultados sugerem que o TLR4 pode estar envolvido na nocicepção induzida pelo LPS a nível espinhal.

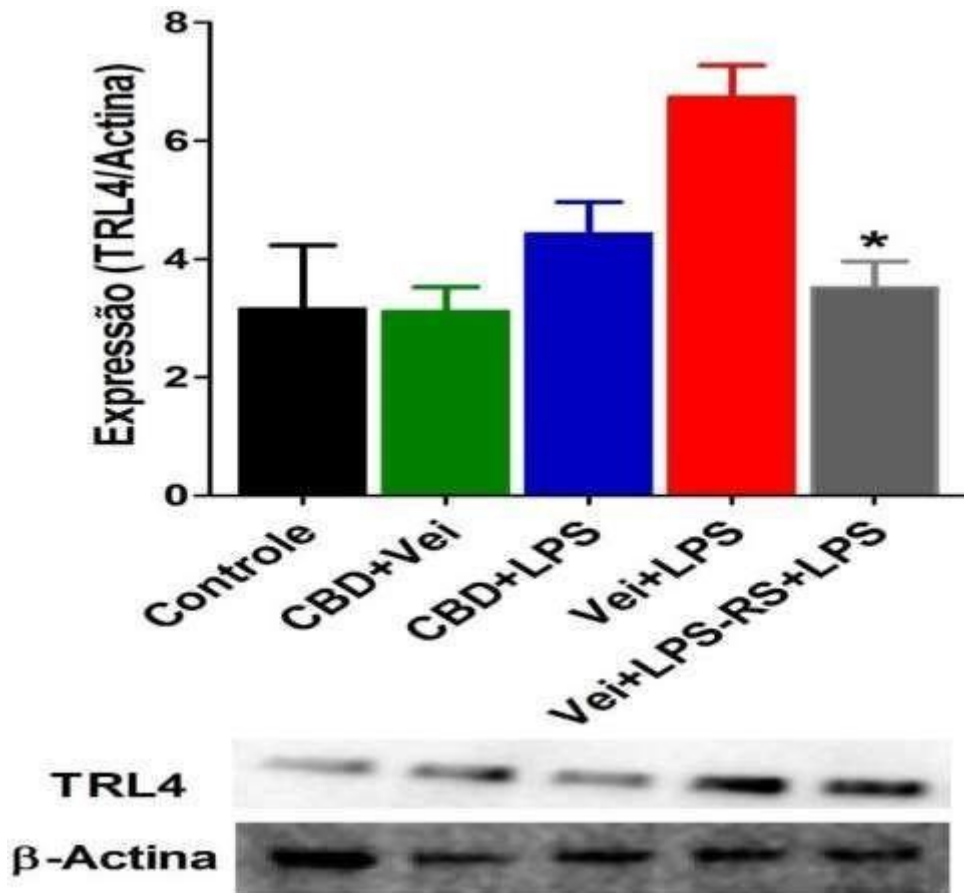
Gráfico 11A- Participação do receptor TRL4 espinal na nociceção induzida por LPS.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo VEC+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol, injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+VEC (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS), #### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos LPS-RS 500ug+LPS (animais que receberam LPS-RS na dose de 500ug e injeção de LPS) e LPS-RS 1ug+LPS (animais que receberam LPS-RS 1ug e injeção de LPS) comparado com o grupo VEC+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de LPS).  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo.

Fonte: Da autora.

Gráfico 11B- Efeito do CBD na expressão dos níveis do receptor TRL4 na medula espinhal.

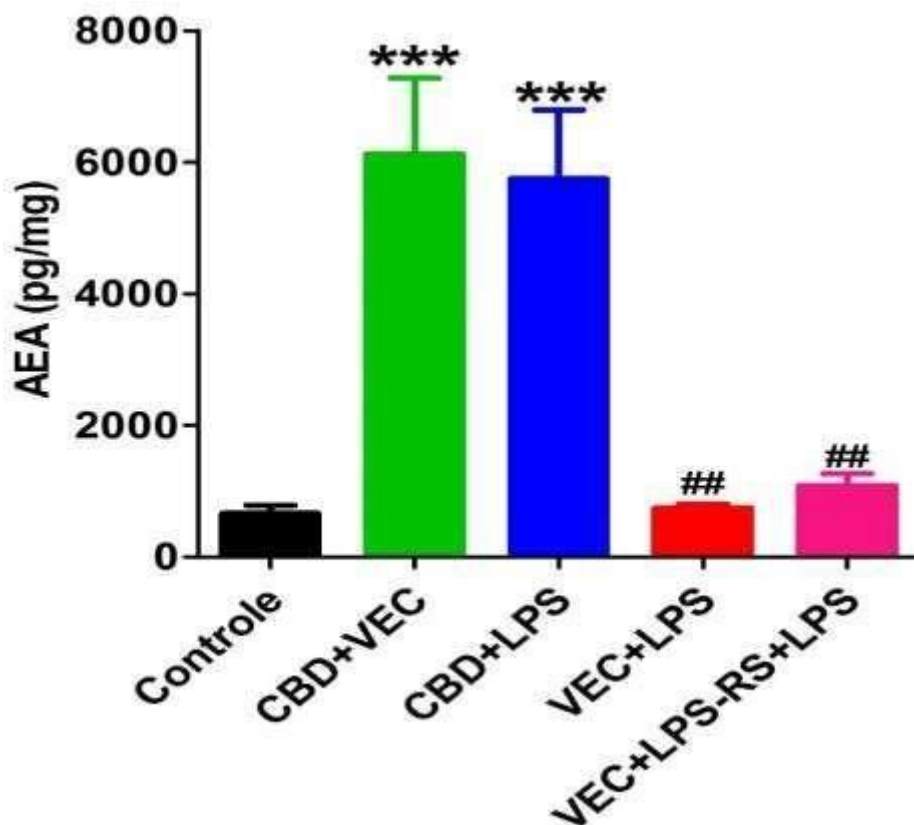


Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos VEC+LPS-RS+LPS (animais que receberam veículo do canabidiol, LPS-RS e injeção de LPS) comparado com o grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS).  $n=4$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.



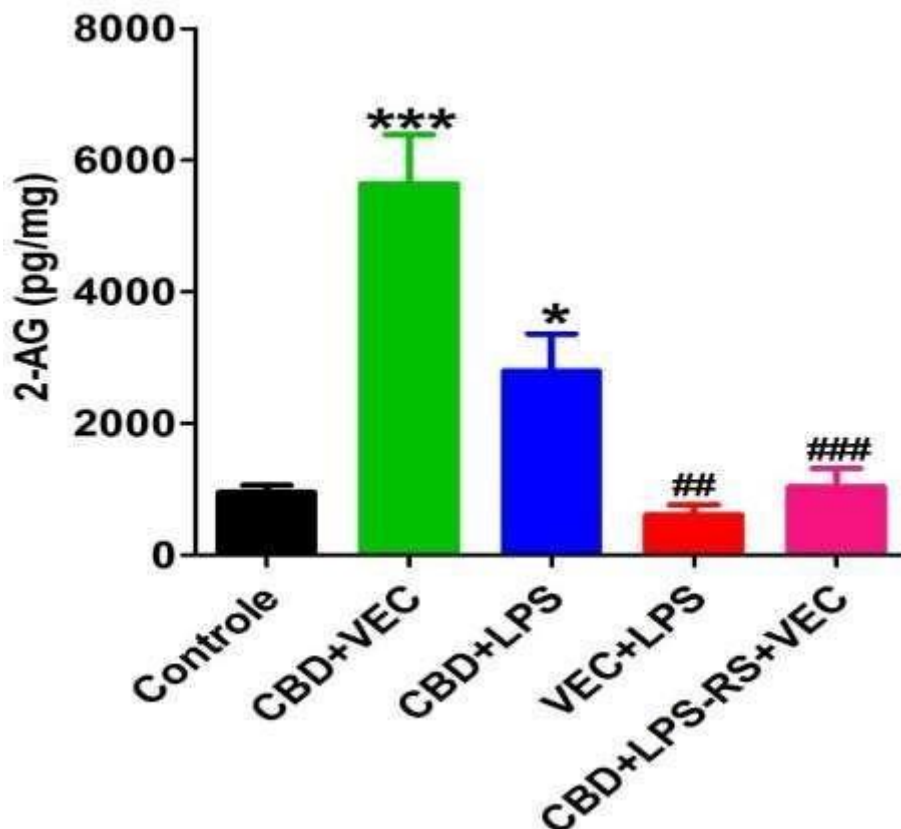
Gráfico 11C- Efeito do CBD nos níveis espinais de AEA.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides AEA (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ## indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+LPS-RS+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, LPS-RS e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Gráfico 11D- Efeito do CBD nos níveis espinais de 2-AG.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis dos endocanabinóides 2-AG (pg/mg). \*\*\*indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+VEC (animais que receberam canabidiol e veículo do paclitaxel) e CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) comparados ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do paclitaxel) e ###indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos CBD+PTX (animais que receberam canabidiol e injeção de paclitaxel) e VEC+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol e injeção de paclitaxel) e o grupo VEC+LPS-RS+PTX (animais que receberam veículo do canabidiol, LPS-RS e injeção de paclitaxel).  $n=6$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

#### 4.12 EFEITO DO CBD SOBRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDO POR LPS

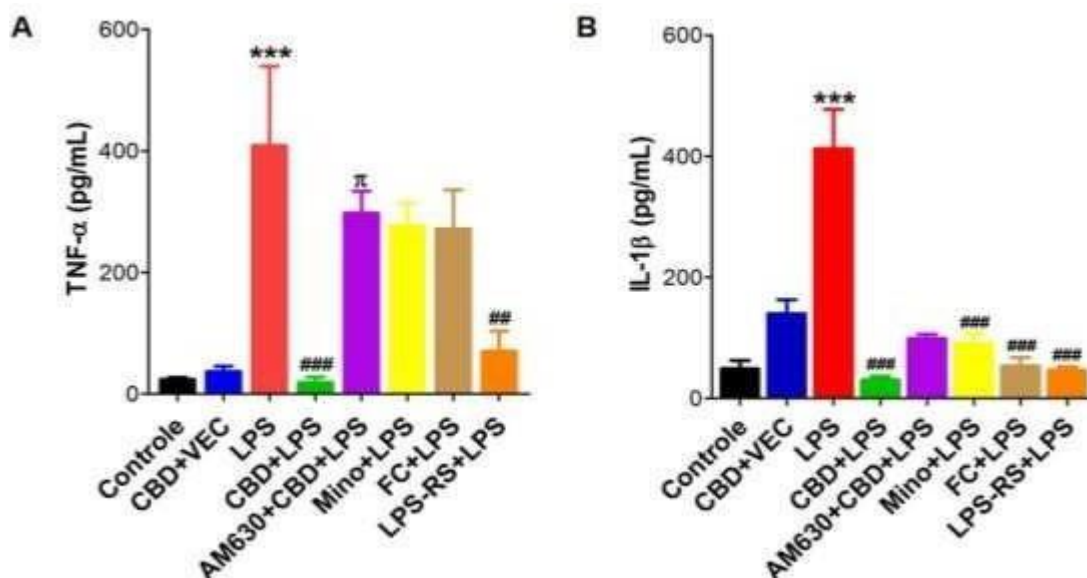
As células da glia, durante estados dolorosos, são ativadas, produzindo e liberando substâncias que facilitam a transmissão do impulso doloroso, dentre elas temos as citocinas (MARIANI & KIELIAN, 2010).

Assim, também foi investigado o efeito do CBD sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  durante a nocicepção induzida pelo LPS. Os níveis

das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32}=7,926$ ) nos animais que receberam LPS, comparado aos animais que receberam veículo (Gráficos 12A e 12B). Quando avaliado o efeito do CBD nesse processo, podemos verificar o CBD reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32}=7,926$ ) o aumento das citocinas no grupo que recebeu a injeção i.t. de LPS.

Em adição, podemos sugerir que esse efeito prévio demonstrado pelo CBD pode ser via receptor CB2, para a citocina TNF- $\alpha$ , pois nos animais tratados com AM630, os níveis dessa citocina foram reduzidos ( $p < 0,05$ ,  $F_{7,32}=7,926$ ) (Gráfico 12A). Além disso, confirmando a hipótese que ambos a micróglia e astrócitos participam da liberação dessas proteínas no grupo que recebeu LPS, verificamos que a minociclina e o fluorocitrato inibiram o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32}=7,926$ ). Além disso, o LPS-RS foi responsável por diminuir os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32}=7,926$ ) e IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ,  $F_{7,32}=7,926$ ) no grupo que recebeu LPS, reforçando a hipótese do presente estudo que esse receptor pode estar envolvida na liberação dessas citocinas a nível espinhal e que o CBD pode inibir esse efeito (Gráficos 12A e 12B).



Gráfico 12- Efeito do CBD sobre os níveis medulares de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  (pg/mL).

Legenda: **A-** Efeito do CBD nos níveis medulares de TNF- $\alpha$ . \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle (animais que receberam veículo do canabidiol e veículo do LPS) comparado com o grupo LPS (animais que receberam injeção de LPS), ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo LPS comparado com os grupo CBD+LPS (animais que recebem canabidiol e injeção de LPS),  $\pi$ indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CBD+LPS (animais que recebem canabidiol e injeção de LPS) comparado com o grupo AM630+CBD+LPS (animais que recebem AM630, canabidiol e injeção de LPS) e ##indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo LPS comparado com os grupo LPS-RS+LPS (animais que recebem LPS-RS e injeção de LPS). **B-** Efeito do CBD nos níveis medulares de IL-1 $\beta$ . \*\*\*indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos controle (animais que recebem veículo do canabidiol e veículo do LPS) comparado com o grupo LPS (animais que recebem injeção de LPS), ###indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos LPS comparado com os grupos CBD+LPS (canabidiol e injeção de LPS), Mino+LPS (animais que recebem minociclina e injeção de LPS), FC+LPS (animais que recebem fluorocitrato e injeção de LPS) e LPS-RS+LPS (animais que recebem LPS-RS e injeção de LPS).  $n=5$  por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

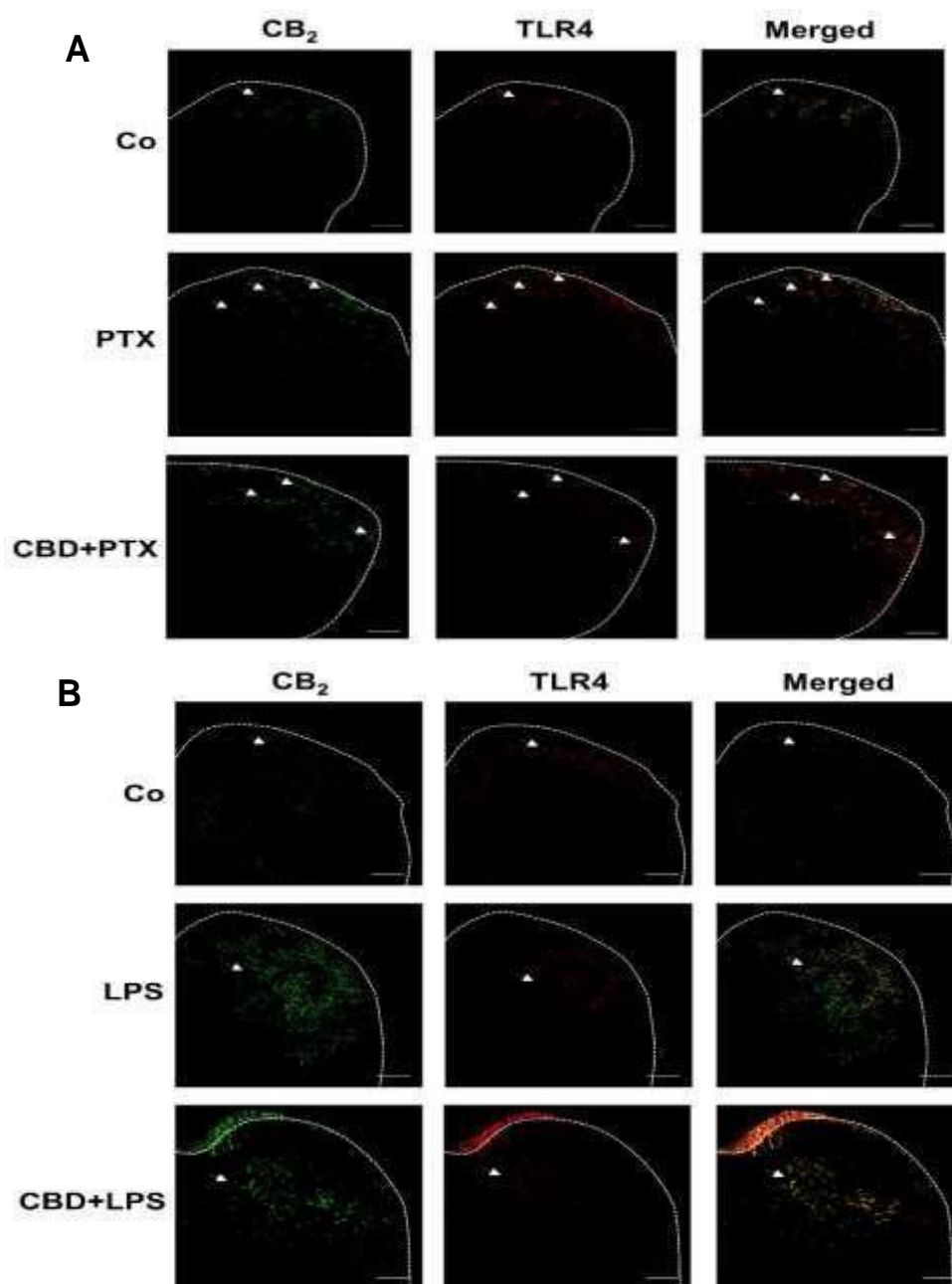
Fonte: Da autora.

#### 4.13 EFEITO DO CBD SOBRE CO-LOCALIZAÇÃO ESPINHAL DOS RECEPTORES CB<sub>2</sub> E TLR4 DURANTE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO PTX E LPS

Após os prévios resultados demonstrarem que o TLR4 participa da nocicepção induzida pelo PTX e LPS e que os receptores CB<sub>2</sub> estão envolvidos no controle dessa resposta pelo CBD, nós realizamos um ensaio de imunofluorescência para avaliar a expressão, bem com a co-localização desses receptores no corno dorsal da medula espinhal. Sendo assim, o gráfico 13A

demonstra que nos animais com neuropatia induzida pelo PTX houve um aumento da expressão de TLR4, sendo na maioria co-localizados com receptores CB<sub>2</sub>. Além disso, nos animais com neuropatia e pré-tratados com CBD, foi verificado um aumento da expressão dos receptores CB<sub>2</sub> e uma redução do TLR4. No caso do LPS, foi encontrado que sua administração intratecal induziu um aumento da expressão de ambos receptores CB<sub>2</sub> e TLR4, sendo a maioria presente na mesma localização e o tratamento com CBD reduziu a expressão dos TLR4 (Gráfico 13B).

Gráfico 13- Efeito do CBD sobre a co-localização espinal dos receptores CB<sub>2</sub> e TLR4 durante a nocicepção induzida pelo PTX E LPS.



Legenda: Setas no gráfico representativo indicam os receptores CB<sub>2</sub> e TLR4. Escala 200 µm; n = 4. Co (grupo controle, PTX (grupo que recebeu veículo do canabidiol e paclitaxel), CBD+PTX (grupo que recebeu canabidiol e injeção de paclitaxel), LPS (grupo que recebeu LPS) e CBD+LPS (grupo que recebeu canabidiol e injeção de LPS).

Fonte: Da autora.

Figura 13-Resumo dos resultados do presente estudo.

| <b>Investigação Farmacológica</b>                | <b>Dor neuropática induzida pelo PTX</b> | <b>Nociceção induzida pelo LPS</b> |
|--|--|------------------------------------|
| - CBD (5mg/kg)<br>- CBD (10mg/kg)                | <b>S/E</b><br><b>(-)</b>                 | <b>S/E</b><br><b>(-)</b>           |
| - AM630 (dose 2ug/4ug)<br>- AM630 (dose 4ug/8ug) | <b>(-) efeito CBD</b>                    | <b>(-) efeito CBD</b>              |
| - Minociclina (dose 500ng e 1ug)                 | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - Fluorocitrato (dose 1nmol)                     | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - LPS-RS (dose 500ng e 1ug)                      | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| <b>Dosagem do endocanabinóide AEA</b>            |  |                                    |
| - CBD (10 mg/kg)                                 | <b>(+)</b>                               | <b>(+)</b>                         |
| - AM630 (4ug)                                    | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - Minociclina (1ug)                              | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - Fluorocitrato (1nmol)                          | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - LPS-RS (1ug)                                   | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| <b>Dosagem do endocanabinóide 2-AG</b>           |  |                                    |
| - CBD (10mg/kg)                                  | <b>(+)</b>                               | <b>(+)</b>                         |
| - AM630 (4ug)                                    | <b>()</b>                                | <b>()</b>                          |
| - Minociclina (1ug)                              | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - Fluorocitrato (1nmol)                          | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - LPS-RS (1ug)                                   | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| <b>Expressão de CB<sub>2</sub></b>               |  |                                    |
| - CBD (10mg/kg)                                  | <b>(+)</b>                               | <b>S/E</b>                         |
| - AM630 (4ug)                                    | <b>(-)</b>                               | <b>-</b>                           |
| <b>Expressão de Iba-1</b>                        |  |                                    |
| - CBD (10mg/kg)                                  | <b>(-)</b>                               | <b>S/E</b>                         |
| - Minociclina (1ug)                              | <b>-</b>                                 | <b>(-)</b>                         |
| <b>Expressão de GFAP</b>                         |  |                                    |
| - CBD (10mg/kg)                                  | <b>S/E</b>                               | <b>S/E</b>                         |
| - Fluorocitrato (1nmol)                          | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| <b>Expressão de TRL4</b>                         |  |                                    |
| - CBD (10mg/kg)                                  | <b>(-)</b>                               | <b>S/E</b>                         |
| -LPS-RS (1ug)                                    | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| <b>Dosagem de TNF-<math>\alpha</math></b>        |  |                                    |
| - CBD (10mg/kg)                                  | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - AM630 (4ug)                                    | <b>(-)</b>                               | <b>(-)</b>                         |
| - Minociclina (1ug)                              | <b>(-)</b>                               | <b>S/E</b>                         |
| - Fluorocitrato (1nmol)                          | <b>(-)</b>                               | <b>S/E</b>                         |

|  |     |     |
|--|-----|-----|
| - LPS-RS (1ug)                           | (-) | (-) |
| <b>Dosagem de IL-1<math>\beta</math></b> |     |     |
| - CBD (10mg/kg)                          | (-) | (-) |
| - AM630 (4ug)                            | S/E | (-) |
| - Minociclina (1ug)                      | (-) | (-) |
| - Fluorocitrato (1nmol)                  | (-) | (-) |
| - LPS-RS (1ug)                           | (-) | (-) |

Legenda: (+): Aumentou;(-): reduziu/inibiu; S/E: sem efeito; CBD: cababidiol, PTX: paclitaxel, AM630: antagonista para receptor CB2, TRL4: receptor Tool Like 4, Iba-1: proteína de cálcio ionizado, GFAP: proteína fibrilar glial ácida.

Fonte: Da autora.

## 5 DISCUSSÃO

Nossos achados demonstraram que o CBD promoveu antinocicepção em camundongos com dor neuropática induzida por PTX. A administração i.p. de PTX em camundongos foi capaz de induzir uma alodínia mecânica, reproduzindo um quadro de dor neuropática induzida por PTX. Estudos anteriores já haviam demonstrado que o PTX induz dor neuropática (SERETNY *et al.*, 2014; FLATTERS *et al.*, 2006; DUGGETT *et al.*, 2016). Outros estudos demonstram que esse quimioterápico causa inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em nervos periféricos e gânglio da raiz dorsal, levando à neuropatia periférica, e esse efeito é limitante da dose, ou seja, quanto maior é a dose, maior os efeitos colaterais desta droga. Esses fatores não apenas desencadeiam a resposta inflamatória, mas também ativam as células da glia, podendo causar dor (FLATTERS *et al.*, 2006; DUGGETT *et al.*, 2016; KIDD *et al.*, 2002; VENDRELL *et al.*, 2015).

Além disso, o presente estudo encontrou que os animais com dor neuropática tratados com CBD, apresentaram uma redução da alodínia, um efeito que perdurou por 28 dias. Esse resultado corrobora ao estudo conduzido por Ward e colaboradores (2011), que demonstraram que a dose de 1,5mg/Kg de CBD, administrado durante 10 dias, por via i.p., em camundongos fêmeas C57 BL/6, impediu o desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica induzida pelo PTX em camundongos, sendo esse efeito mantido por mais de 60 dias.

Ward e colaboradores (2014) verificaram que o CBD (10mg/kg, i.p.), preveniu o desenvolvimento de alodínia mecânica em camundongos tratados com PTX. Outras evidências clínicas mostraram a eficácia do CBD no tratamento de sintomas de dor neuropática, isoladamente (WADE *et al.*, 2003) ou em combinação com o tetrahydrocannabinol (KWIATKOWSKA *et al.*, 2004; NURMIKKO *et al.*, 2007).

Após verificarmos uma significativa antinocicepção induzida pelo CBD, comparamos esse efeito à morfina, um eficaz analgésico opióide muito utilizado para o controle da dor oncológica (XIAO *et al.*, 2013). Assim, foi verificado que a antinocicepção promovida pelo CBD foi semelhante à da morfina até o 7º dia. Após esse período, a morfina que foi também administrada por 6 dias, não

produziu mais efeito, sugerindo uma possível indução de tolerância dessa droga. Além disso, um estudo demonstrou que a morfina administrada por via i.t. duas vezes ao dia durante sete dias consecutivos induziu tolerância em ratos com dor óssea induzida por câncer (GUO *et al.*, 2018). Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse fenômeno são complexos e podem envolver dessensibilização e endocitose de receptores, hiperatividade da sinalização intracelular, ativação secundária de receptores de aminoácidos excitatórios, e subsequentes cascatas intracelulares, bem como ativação glial e liberação de mediadores pró-inflamatórios (MAYER *et al.*, 1999; WATKINS *et al.*, 2005).

Em particular, há boas evidências de que os mediadores pró-inflamatórios derivados da glia, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, possam estar envolvidos na tolerância às propriedades antinociceptivas da morfina. As células gliais também são consideradas fontes cruciais de NO, responsáveis pela tolerância à morfina (MAYER *et al.*, 1999; CHEN & SOMMER, 2009). O tratamento repetido com morfina pode ativar a glia e, portanto, regular positivamente esses vários mediadores (RAGHAVENDRA *et al.*, 2002; 2004; JOHNSTON *et al.*, 2004; WATKINS *et al.*, 2005) através da via p38 MAPK, que é responsável pela cascata de sinalização intracelular que leva ao desenvolvimento de tolerância à morfina (MAYER *et al.*, 1999; WATKINS *et al.*, 2001; RAGHAVENDRA *et al.*, 2002; 2004; GALEOTTI *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2010).

A morfina sistêmica, libera um metabólito, a morfina-3-glucoronida (M3G). Esse metabólito ativa os receptores TRL4 presentes na micróglia espinhal, liberando substâncias que aumentam a dor, incluindo a interleucina -1 (IL-1) (LEWIS *et al.*, 2011).

Diante destes achados, sugerimos a utilização do CBD como alvo terapêutico para o alívio da dor, principalmente a neuropática, devido ao seu potente efeito analgésico, sem induzir tolerância.

Os mecanismos responsáveis pelo efeito antinociceptivo do CBD ainda não estão muito bem elucidados. Estudos têm demonstrado que esse canabinóide pode ativar mediadores endógenos, tais como a glicina e a serotonina, envolvidos no controle da dor (WARD *et al.*, 2011; XIONG *et al.*, 2012). Diante dessas poucas evidências, o presente estudo sugere que o CBD pode controlar a dor neuropática agindo a nível medular, principalmente pela inibição da atividade das células da glia e pela ativação do sistema

endocanabinóide, principalmente pela ativação de receptores CB<sub>2</sub>, os quais uma vez ativados podem inibir essas células (KOZELA *et al.*, 2017).

Neste contexto, buscamos inicialmente avaliar a participação dos receptores CB<sub>2</sub>, administrando intratecalmente o antagonista AM630. Assim, nossos resultados demonstraram que o AM630 bloqueou a antinocicepção promovida pelo CBD em camundongos. Entretanto, Deng e colaboradores (2012), demonstraram em um modelo de dor neuropática induzida por PTX, em ratos, que o CBD 15mg/kg, por via i.p. promoveu antinocicepção, a qual foi revertida pela pré-administração i.p. de AM630 na dose de 3mg/kg.

Estudos têm demonstrado o envolvimento do receptor CB<sub>2</sub> no controle da dor. Pascual e colaboradores (2005) demonstraram que o agonista WIN55,212-2 (1mg/kg, i.p.), para receptor canabinóide, suprimiu a dor neuropática induzida por PTX em ratos. Já Zhang e colaboradores (2014), demonstraram que a administração de outro agonista para o receptor CB<sub>2</sub>, o LY3038404 HCl, 10mg/kg, por 7 dias, por via oral, atenuou o comportamento de dor, aumentando consequentemente o limiar nociceptivo de retirada de pata no teste de Von frey filamentos e reduzindo a sensibilidade térmica no teste da placa quente em ratos com pancreatite crônica.

Além disso, Deng e colaboradores (2015) demonstraram que a pré-administração, por via i.p., do AM1710, um agonista seletivo de CB<sub>2</sub>, aboliu a dor neuropática induzida por PTX em ratos. Sabe-se também que as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas dos agonistas dos receptores canabinóides são expressas também após a ativação de receptores CB<sub>2</sub> (ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2009).

Estudos encontraram que agonistas para os receptores CB<sub>2</sub> são capazes de reduzir a produção de citocinas pelas células microgliais em modelos *in vitro* (MERIGHI *et al.*, 2012). Em adição um estudo encontrou que o agonista de CB<sub>2</sub>, o JWH-015, administrado por via i.t. reduziu a ativação microglial e astrocítica em medula espinhal, induzida pela incisão da pata, sendo esse efeito revertido pelo AM630 (ROMERO-SANDOVAL & EISENACH, 2007).

Portanto, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar a participação do receptor CB<sub>2</sub> na antinocicepção induzida pelo CBD, pela administração i.t. do AM630 em camundongos.



Assim, sugerimos que o receptor CB<sub>2</sub>, parece estar envolvido no controle da dor neuropática induzida pelo PTX promovido pelo CBD.

Nós também demonstramos que os endocanabinóides, AEA e 2-AG, estão envolvidos no controle da dor neuropática promovido pelo CBD, a nível espinhal. Estudos têm demonstrado que o CBD pode aumentar as concentrações plasmáticas de AEA agindo principalmente como um inibidor da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (do inglês FAAH) (WATANABE *et al.*, 1996; BISOGNO *et al.*, 2001), resultando em antinocicepção. Embora o CBD, tenha pouca afinidade para os receptores CB<sub>2</sub>, e verificamos que tais receptores estão envolvidos em seu efeito antinociceptivo, uma hipótese seria pela inibição da FAAH e monoacilglicerol lipase (MGL), enzimas responsáveis pela degradação de AEA e 2-AG, respectivamente.

Nesse contexto, estudos encontraram que a administração subcutânea dos inibidores de FAAH e MGL, o URB597 e o URB602, reduziu a alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, em um modelo de dor neuropática induzida por PTX em camundongos (DESROCHES *et al.*, 2014). Além disso, a administração dos inibidores da MGL, o JZL184 e MJN110, também reverteu a alodínia mecânica induzida pelo PTX em ratos e reduziu marcadores pró-inflamatórios, proteína quimioatrativa de monócitos-1, na medula espinal e MAPK p-p38 (proteína cinase ativada por mitógenos fosforilada p-38) no gânglio da raiz dorsal em camundongos (CURRY *et al.*, 2018). Esses achados suportam a nossa hipótese de um efeito indireto do CBD na ativação dos receptores CB<sub>2</sub>, pelo aumento de endocanabinóides, que irá resultar em antinocicepção. Entretanto, mais estudos necessitam ser realizados.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o receptor CB<sub>2</sub> encontra-se expresso em células gliais sob condições patológicas, como a dor (BIE *et al.*, 2018). Diante disso, o presente estudo investigou o envolvimento destas células na geração e manutenção da dor neuropática induzida por PTX, por meio da pré-administração de minociclina e o fluorocitrato, drogas inibidoras da micróglia e de astrócitos, respectivamente, bem como o efeito do CBD nesse processo.

Assim, nossos resultados demonstraram que a minociclina bloqueou a dor neuropática induzida pelo PTX, tanto em uma fase aguda quanto crônica de sua gênese.

A dor neuropática é uma consequência de um processo neuro-inflamatório que se caracteriza pela ativação de micróglia e astrócitos, ativação da cascata inflamatória e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no corno dorsal da medula espinhal (NAGUIB *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2014). Esse processo resulta em um mecanismo descrito como “sensibilização central”, caracterizado por uma facilitação dos impulsos nociceptivos ao nível espinhal, com um comportamento persistente da dor (KAWASAKI *et al.*, 2008). O PTX parece induzir alterações no SNC (LETOURNEAU & RESSLER, 1984), que pode levar a alterações na expressão e nos fenótipos dos genes da micróglia (GOSSELIN *et al.*, 2017). A micróglia pode se apresentar em vários estados fenotípicos distintos. Nos distúrbios neuro-inflamatórios, o fenótipo pró-inflamatório (M1) é predominante e, eventualmente, resulta em dano neuronal. Em contraste, em condições fisiológicas saudáveis, o fenótipo anti-inflamatório (M2) mantém a integridade neuronal e a plasticidade sináptica (NIMMERJAHN *et al.*, 2005; PANATIER & ROBITAILLE, 2012). A transição entre os dois fenótipos foi denominada “polarização microglial” (LAN *et al.*, 2017). Os mediadores liberados pela micróglia são específicos para cada fenótipo, por exemplo, a liberação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-6 e IL-1 $\beta$ ) é característico do fenótipo M1 reativo (KAWASAKI *et al.*, 2008), enquanto que, de citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-10 e IL-4R $\alpha$ ) é uma característica do fenótipo M2 (LAN *et al.*, 2017).

Um estudo demonstrou que a minociclina administrada i.t., produziu antinocicepção por meio da inibição da enzima p38, uma enzima importante na cascata de sinalização intracelular e na síntese de citocinas pró-inflamatórias, em animais com lesões teciduais e com dor induzidas por inflamação periférica (HUA *et al.*, 2005). Recentemente, os efeitos da minociclina como diminuição de alodínia e hiperalgisia, têm sido demonstrados em modelos de artrite, transecção do nervo espinhal e neurite inflamatória do isquiático (LEDEBOER *et al.*, 2005; RAGHAVENDRA *et al.*, 2003). Entretanto, nenhum estudo demonstrou a participação da microglia espinhal na dor neuropática induzida por PTX.

Em adição, demonstramos que o PTX promoveu um aumento na expressão de IBA-1 e esse aumento foi abolido pela minociclina e pelo CBD, corroborando com o estudo de Kosela e colaboradores (2011) que, em contrapartida, demonstraram que o CBD (5mg/kg, i.p.) reduziu a expressão de

IBA-1 em um modelo de encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

Silva e colaboradores (2020), em um modelo de esquizofrenia, demonstraram que o CBD (15mg/kg, i.p. por sete dias) reduziu a expressão de IBA-1 em camundongos.

Além disso, demonstramos que a minociclina inibiu o aumento de AEA e 2-AG espinhais, promovido pelo CBD, não visto antes na literatura.

Com isso, sugerimos que a micróglia participa da dor neuropática induzida pelo PTX, bem como, que o CBD pode inibir esse mecanismo.

Em adição à micróglia, nosso estudo também foi o primeiro que encontrou o envolvimento de astrócitos na dor neuropática induzida pelo PTX, a nível espinhal em camundongos e sua inativação pelo CBD e pelo fluorocitrato, um inibidor metabólico de astrócitos. Além disso, o presente estudo encontrou uma redução na expressão do GFAP e dos níveis de AEA e 2-AG pelo fluorocitrato.

Entretanto, um estudo realizado em ratos, demonstrou que o tratamento com fluorocitrato inibiu a ativação de astrócitos e reverteu as alterações na expressão de transportador de glutamato (GLT-1), um neurotransmissor excitatório, a fosforilação da MAPK, ERK1, além de reduzir a alodínia mecânica em um modelo de neuropatia induzida por PTX (XU *et al.*, 2016).

As células da glia modulam a atividade neuronal durante a dor, pois quando ativadas por condições fisiopatológicas, elas liberam substâncias que modificam a sinalização entre os neurônios (FIELDS & STEVENS-GRAHAM, 2002; MARCHAND *et al.*, 2005). Dentre essas substâncias incluem o NO, o ATP e citocinas pró-inflamatórias (MARCHAND *et al.*, 2005). Em modelos animais, estudos têm demonstrado que quando a glia é inibida, a dor é atenuada e os níveis dessas substâncias são reduzidos (MILLIGAN *et al.*, 2003; CHACUR *et al.*, 2004).

Com relação a grande quantidade de receptores expressos nas células da glia envolvidos na gênese da dor neuropática, estudos têm demonstrado que os receptores TRL4 também desempenham papel crucial na ativação destas células, contribuindo para a indução e manutenção da dor (LAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que a administração do LPS-RS, antagonista do receptor TRL4, reduziu a expressão de IL-1, TNF-  $\alpha$  e a alodínia mecânica em

ratos com dor neuropática (LIU & FASSBENDER, 2018). Além disso, outro estudo também demonstrou que a administração deste antagonista de TLR4 atenuou a dor e aumentou a analgesia induzida pela buprenorfina em ratos com dor neuropática induzida por CCI do nervo ciático (JURGA *et al.*, 2016).

Diante disso, o CBD inibe o aumento da expressão do receptor TLR4, à nível espinhal, presente na micróglia, durante a dor neuropática induzida por PTX, sugerindo a participação do receptor nesse modelo de nocicepção.

Nossos achados demonstraram que o CBD reduz os níveis das citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pela inibição das células da glia. Entretanto, Vuolo e colaboradores (2015), demonstraram que o CBD reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias em um modelo inflamatório de asma em camundongos.

Li e colaboradores (2018) demonstraram que o CBD reduz os níveis de TNF- $\alpha$  em camundongos com lesão medular.

Assim, demonstramos que o CBD reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias, secretadas pelas células da glia, após a sua ativação pelo receptor TLR4.

É importante ressaltar que diferentes substâncias podem ativar os receptores TLR4, além dos DAMPs (padrões moleculares associados aos danos), eles também podem ser ativados por padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), os quais incluem moléculas que não sejam próprias do hospedeiro, como os lipopolissacarídeos (LPS) das paredes das bactérias (KAWAI & AKIRA, 2007).

Assim, o presente estudo investigou o efeito do CBD, a nível espinhal, sobre a nocicepção induzida pelo LPS, onde foi verificado que o CBD promoveu antinocicepção nos animais tratados com LPS.

Sendo o CBD, um agonista do receptor CB<sub>2</sub>, o presente estudo investigou se a antinocicepção promovida por esse sobre a nocicepção induzida pelo LPS é via este receptor.

O LPS é uma endotoxina presente na membrana externa de bactérias gram-negativas, amplamente utilizado para desencadear a resposta imune em modelos experimentais (LIU & BING, 2011). O LPS se liga a receptores específicos nas células hospedeiras promovendo assim sua estimulação onde ocorre a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (KUWATA *et*

*al.*, 2003). Ele ativa os receptores TLR4, os quais estão amplamente expressos nas células da glia (SANCHEZ-GUAJARDO *et al.*, 2013). Interessantemente, diversos estudos (*in vitro* e *in vivo*) têm mostrado que o LPS promove a ativação da glia (GAO *et al.*, 2002; LIU, 2006), produzindo elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (WU *et al.*, 2007). Malfait e colaboradores (2000), demonstram que o CBD reduz a alodínia mecânica em camundongos com artrite por inibir a produção de IFN- $\gamma$ , um importante agente inflamatório.

Dos-Santos-Pereira (2020) verificou que o CBD inibe a neuro-inflamação microglial induzida por LPS por reduzir a atividade da via NF- $\kappa$ B.

Gay e colaboradores (2007) demonstraram que a sinalização do LPS através do TLR4 ativa várias vias intracelulares e induz amplas alterações na expressão gênica, eventualmente induzindo a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias.

Watkins e colaboradores (1995) demonstraram que o LPS estimula a glia, que são células imunes residentes do cérebro e da medula espinhal. Assim, estudos demonstram que a minociclina preveniu a ativação da micróglia induzida por LPS e ativação de macrófagos em resposta a citocinas, na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal em ratos (YOON *et al.*, 2012).

Henry e colaboradores, demonstraram que a minociclina reduziu a ativação microglial, por bloquear a liberação de citocinas pró-inflamatórias após estimulação por LPS.

Bressam e colaboradores (2012), demonstraram que a administração intratecal de fluorocitrato e minociclina atenuou a nocicepção articular e a inflamação induzida por LPS em ratos.

No presente estudo, o fluorocitrato na dose de 1nmol, reduziu os níveis de AEA e 2-AG e a expressão de GFAP. Contudo, Meller e colaboradores (1994) demonstraram que a inibição seletiva do metabolismo da glia com administração i.t. de fluorocitrato na dose de 1nmol, resultou em uma acentuada atenuação da hiperalgesia térmica e mecânica persistente produzida pelo zimosan intraplantar na dose de 5mg.

As células da glia expressam diversos receptores, dentre eles, o TLR4. O TLR4 é bem conhecido por sua resposta ao LPS (TRUDLER *et al.*, 2010). O reconhecimento do LPS pelo TLR4 conduz à oligomerização de TLR e recrutamento de proteínas adaptadoras e cinases para os seus domínios de

sinalização intracelular de receptores de interleucina-1 (TIR). Esses processos desencadeiam a ativação de fatores de transcrição e expressão de citocinas, bem como a adesão de moléculas co-estimulatórias através de duas vias principais de sinalização (MEDVEDEV *et al.*, 2007).

Nossos resultados demonstraram que o LPS promove o aumento nos níveis espinhais de TNF- $\alpha$ . Lembrando que, o TNF- $\alpha$  é responsável pela gênese e manutenção da dor por ativar a micróglia a sintetizar e liberar novas citocinas (WATKINS *et al.*, 2005). Esse achado corrobora com os estudos de Mondeveanu e colaboradores (2001), que demonstram que após lesão, os níveis de TNF- $\alpha$  ficam aumentados, iniciando um processo de sensibilização local. Essa citocina é também responsável por induzir a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, promovendo, assim, a migração de leucócitos para os locais de inflamação, com liberação de mediadores álgicos, substância P, NO, bradicinina (MONDEVEANU *et al.*, 2001). Além disso, o TNF- $\alpha$  ativa o fator-nuclear kB (NFkB), um complexo proteico responsável por regular a resposta imune, que conduz à ativação de diferentes genes para a transcrição de mediadores inflamatórios, levando a ativação microglial, com liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, resultado em dor (MARCHAND *et al.*, 2005). Outra importante citocina pró-inflamatória presente durante a dor é a IL-1 $\beta$ . O mecanismo de ação da IL-1 $\beta$  na gênese da dor envolve a ativação da adenilato ciclase, provocando aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) celular, com consequente ativação da proteína quinase A e fosforilação de proteínas intracelulares (RANG & URBAN, 1995).

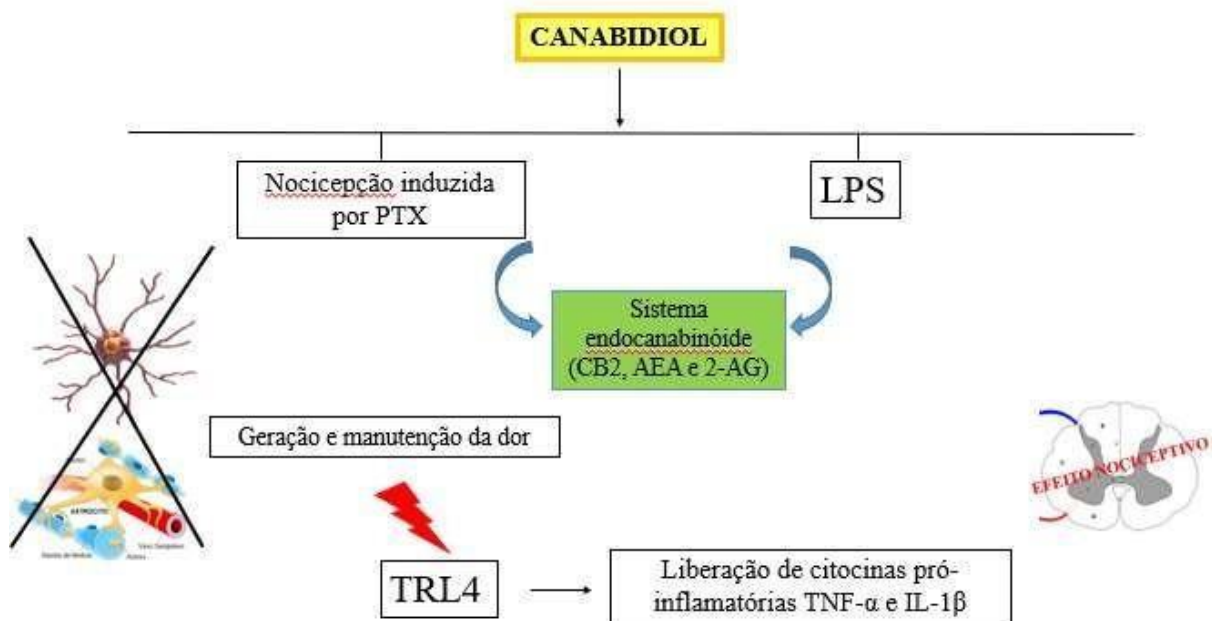
Outros estudos demonstraram que IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são regulados positivamente, ou seja, aumentados na medula espinhal e cérebro em modelo de nocicepção inflamatória por meio da administração de CFA (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004).

Quando a micróglia é ativada por LPS ocorre um processo de fagocitose associado à liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios (PRINZ *et al.*, 2002). Na fase de resolução da infecção, durante a remoção de restos apoptóticos de células envolvidas na resposta imune, a micróglia libera fatores anti-inflamatórios (CHAN *et al.*, 2001). Dentre os diversos fatores a micróglia são capazes de produzir temos a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, dentre outros (HANISCH, 2002).

Após o tratamento com o CBD, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram reduzidos. Rajan e colaboradores (2016) demonstraram que o CBD reduz citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 em macrófagos estimulados por LPS. Kozela e colaboradores (2010) demonstraram que o CBD reduz a atividade da via do NF- $\kappa$ B, a qual regula a expressão de genes pró-inflamatórios, como as citocinas. Além disso, Ribeiro e colaboradores (2015) demonstraram que uma única dose de CBD administrada antes da indução de lesão pulmonar por LPS, reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 em ratos.

Assim, sugerimos que o CBD regula o sistema imune, com redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, ativação do receptor CB<sub>2</sub>, com aumento dos níveis de AEA e 2-AG, assim, temos a inibição do receptor TRL4 presente nas células da glia.

## 6 CONCLUSÃO





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S. *et al.* Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**. v. 124, p. 783-801, 2006.

AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. Pathophysiology of neuropathic pain: inflammatory mediators. **Neuropathic Pain**. v. 7, p. 77-89, 2013.

BEGGS, S.; SALTER, M. W. Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. **Brain Behav Immun**. v. 21, p. 624-633, 2007.

BETTONI, I. *et al.* Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. **Glia**. v. 56, p. 1312-1319, 2008.

BIESMANS, S. *et al.* Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators Inflamm**. v. 2013, p. 271359, 2013.

BISOGNO, T. *et al.* Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **Br J Pharmacol**. v. 134, p. 845-852, 2001.

BRESSAN, E. *et al.* Evidence that LPS-reactive arthritis in rats depends on the glial activity and the fractalkine-TNF- $\alpha$  signaling in the spinal cord. **Neuropharmacology**. v. 62, p. 947-958, 2012.

CARRIER, E. J. *et al.* Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. **Mol Pharmacol**. v. 65, p. 999-1007, 2004.

CHACUR, M. *et al.* Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. **Pain**, v. 1, p. 65-76, 2004.

CHAN, A. *et al.* Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: MICROGLIAL PHAGOCYTOSIS OF APOPTOTIC CELLS 241 mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. **Glia**. v. 33, p. 87-95, 2001.

CHEN, K. *et al.* Break-Dancer: An algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. **Nat Methods**. v. 6, p. 677-681, 2009.

CLARK, A. K. *et al.* Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2007.

COLBURN, R. W. *et al.* Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. **Neuron**. v. 54, p. 379-386, 2007.

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

COYLE, D.E. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. **Glia**, v.23, p.75-83, 1998

DE GREGORIO, D. *et al.* Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. **Pain.** v. 160, p.136-150, 2019.

DENG, L. *et al.* The maintenance of cisplatin- and paclitaxel-induced mechanical and cold allodynia is suppressed by cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor activation and independent of CXCR4 signaling in models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Mol Pain.** v. 8, p. 71–82, 2012.

DENG, L. *et al.* Prophylactic treatment with the tricyclic antidepressant desipramine prevents development of paclitaxel-induced neuropathic pain through activation of endogenous analgesic systems. **Pharmacol Res.** v. 114, p. 114-175, 2016.

DESROCHES, J. *et al.* Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. **Neuropharmacol.** v. 77, p. 441-452, 2014.

DI MARZO, V. *et al.* The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nat Rev Drug Discov.** v. 9, p. 771-784, 2004.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia.** v.36, p.180-90, 2001.

DOUGHERTY, P. M. *et al.* Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. **Pain.** v. 109, p. 132-142, 2004.

DUGGETT, N. A. *et al.* Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. **Neuroscience.** v. 333, p. 13-26, 2016.

ERIKSON, N. P. *et al.* A quantitative analysis of the microglial cell reaction in central primary sensory projection territories following peripheral nerve injury in the adult rat. **Exp Brain Res.** v. 96, p. 19-27, 1993.

FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New Insights into Neuron-Glia Communication. **Science.** v. 298, p. 556-562, 2002.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**. v. 122, p. 245–257, 2006.

MEDVEDEV, A. E. *et al.* Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. **J Biol Chem**. v. 282, p. 16043-16053, 2007.

FERNANDEZ-RUIZ, J. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? **Trends Pharmacol Sci**. v. 28, p. 39-44, 2007.

GAO, H. M. *et al.* Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. **J Neurochem**. v. 81, n. 6, p. 1285-97, 2002.

GARCÍA-ARENCIBIA, M. *et al.* Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Res**. v. 1134, p. 162-170, 2007.

GARRISON, C. J. *et al.* Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. **Brain Res**. v. 1, p. 1-7, 1991.

GOSSELIN, D. *et al.* An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. **Science**. v. 23, p. 356, 2016.

GUO, G. *et al.* Envolvimento da quimiocina CXCL11 no desenvolvimento de tolerância à morfina em ratos com dor óssea induzida por câncer. **J Neurochem**. v. 141, p. 553-564, 2017.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: clinical features, diagnosis, prevention and treatment strategies. **Clin Transl Oncol**. v. 2, p. 81-91, 2010.

HANISCH, U. K. *et al.* Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**. v. 40, p. 140-155, 2002.

HANSSON, E.; RÖNNBÄCK, L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. **FASEB**. v. 17, p. 341-348, 2003.

HASHIMOTO C. *et al.* The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**. v. 52, p. 269-279, 1988.

HAYDON, P G. Glia: listening and talking to the synapse. **Nat Rev Neurosci**. v. 2, p. 83-91, 2001.

HENRY, C. J. *et al.* Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)- induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **J Neuroinflam.** v. 5, p. 15, 2008.

HERKENHAM, M. *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **Journal of Neuroscience.** v. 11, p. 563-83, 1991.

HU. P.; MCLACHLAN, E. M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience.** v. 112, p. 23-38, 2002.

HUA X. Y. *et al.* Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. **Eur J Neurosci.** v. 22, p. 2431–2440, 2005.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol.** v. 67, p.313-316, 1980.

IZZO, A. A. *et al.* Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends Pharmacol Sci.** v. 30, p. 515-527, 2009.

JANEWAY, C. A. JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.** v. 20, p. 197-216, 2002.

JOHNSON, J. R. *et al.* Multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy, safety, and tolerability of THC: CBD extract and THC extract in patients with intractable cancer-related pain. **J Pain Symptom Manage.** v. 39, p. 167–179, 2010.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** v. 43, p. 203-210, 2001.

JURGA, A. M. *et al.* Blockade of Toll-Like Receptors (TLR2, TLR4) Attenuates Pain and Potentiates Buprenorphine Analgesia in a Rat Neuropathic Pain Model. **Neural Plast.** v. 2016, p. 523-573, 2016.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol.** v.11, p. 373-384, 2010.

KIDD, J. F. *et al.* Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. **J Biol Chem.** v. 277, p. 6504–6510, 2002.

KILMELBERG, H. K. Primary astrocyte cultures- a key to astrocyte function. **Cell Mol neurobiol.** v. 1, p. 1-16, 1983.

KINSEY, S. G. *et al.* The CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. **Neuropharmacology**. v. 20, p. 244-251, 2011.

KIM, D. S. *et al.* A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **J Biol Chem**. v. 282, p. 14975-14983, 2009.

KIM, J. H. *et al.* O Bacterial endotoxin induces the release of high mobility group box 1 via the IFN-beta signaling pathway. **J. Immunol**. v.182, p. 2458-2466, 2009.

KOZELA, E. *et al.* Modulation of Astrocyte Activity by Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid. **Int J Mol Sci**. v. 18, p. e1669, 2017.

KUWATA, H. *et al.* IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. **Blood**. v. 102, p. 4123- 4129, 2003.

KWIATKOSKI, M. *et al.* Cannabidiol- treated rats exhibited higher motor score after cryogenic spinal cord injury. **Neurotox Res**. v. 21, p. 271–280, 2012.

KWIATKOWSKA M. *et al.* A comparative analysis of the potential of cannabinoids and ondansetron to suppress cisplatin-induced emesis in the *Suncus murinus* (house musk shrew). **Psychopharmacology**. v. 174, p. 254–259, 2004.

LALANI, I. *et al.* Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. **Ann Allergy Asthma Immunol**. v. 79, p. 469-483, 1997.

LAN, L. S. *et al.* Down-regulation of Toll-like receptor 4 gene expression by short interfering RNA attenuates bone cancer pain in a rat model. **Mol Pain**. v. 6, p. 2, 2010.

LAN, X. *et al.* Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. **Nat Rev Neurol**. v. 13, p. 420-433, 2017.

LEDEBOER, A. *et al.* Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**. v. 1, p. 71-83, 2005.

LEE, J. J.; SWAIN, S. M. Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. **J Clin Oncol**. v. 10, p. 1633-1642, 2006.

LEHNARDT, S. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. **J Neurosci**. v. 22, p. 2478-2486, 2002.

LETOUMEAU, P. C.; RESSLER, A. H. Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. **J. Cell Biol**. v. 98, p. 1355-1362, 1984.

- LI, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 signaling contributes to Paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **J Pain**. v. 15, p. 712-725, 2014.
- LI, Y. *et al.* MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Brain Behav Immun**. v. 49, p. 255–266, 2015.
- LIU, B. Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. **AAPS J**. v. 8, p. E606-21, 2006.
- LIU, M.; BING, G. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. **Parkinsons Dis**. v. 2011, p. 327089, 2011.
- LIU, Y.; FASSBENDER, K. Deficiency of TLR4 ameliorates hypoperfusion-induced brain pathology. **Theranostics**. v. 8, p. 6355-6356, 2018.
- LUONGO, L. *et al.* 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB2 agonist, alleviates neuropathic pain through functional microglial changes in mice. **Neurobiol Dis**. v. 37, p. 177-185, 2010.
- MAIONE, S. *et al.* 2011. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. **Br J Pharmacol**. v. 162, p. 584-596, 2011.
- MALFAIT, A. M. *et al.* The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 97, p. 9561–9566, 2000.
- MARCHAND, F. *et al.* Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**. v. 7, p. 521-532, 2005.
- MC DONALD, E. S. *et al.* Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: A potential mechanism for neurotoxicity. **Neurobiology of diseases, Amsterdã**. v. 18, p. 305-313, 2005.
- MCMAHON, E. J. *et al.* Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. **Nat Med**. v. 11, p. 335-339, 2005.
- MECHOULAM, R.; SHVO, Y. The structure of cannabidiol. **Tetrahedron**. v. 19, p. 2073–2078, 1963.
- MEDVEDEV, A. E. *et al.* Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. **J Biol Chem**. v. 282, p. 16042–16053, 2007.
- MELLER, S. T. *et al.* The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology**. v. 33, p. 1471-1480, 1994.

- MERIGHI, S. *et al.* Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor attenuates morphine-induced inflammatory responses in activated microglial cells. **Br J Pharmacol.** v. 8, p. 2371-2385, 2012.
- MERSKEY H, BOGDUK N. Classification of chronic pain. 2nd ed. **Seattle: IASP Press.** p. 1, 1994.
- MILLIGAN, E. D. *et al.* The potential role of fractalkine, a neural chemokine, in creating spinally mediated exaggerated pain states. **J Pain Suppl.** v. 2, p. 30, 2002.
- MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci.** v. 10, p. 23-36, 2009.
- MOLDOVEANU, A. I. *et al.* The Cytokine Response to Physical Activity and Training. **Sports Med.** v. 31, p. 115-144, 2001.
- NAGUIB, M. *et al.* MDA7: a novel selective agonist for CB2 receptors that prevents allodynia in rat neuropathic pain models. **Br J Pharmacol.** v. 155, p. 1104-1016, 2008.
- NAGUIB, M. *et al.* Prevention of paclitaxel-induced neuropathy through activation of the central cannabinoid type 2 receptor system. **Anesth Analg.** v. 114, p. 1104-1120, 2012.
- NIMMERJAHN, A. *et al.* Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science.** v. 308, p. 1314-1318, 2005.
- NODA, M. *et al.* Multifunctional effects of bradykinin on glial cells in relation to potential anti-inflammatory effects. **Neurochem Int.** 2007.
- NURMIKKO T.J. *et al.* 2007. Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Pain.** v. 133, p. 210–220, 2007.
- PANATIER, A., ROBITAILLE, R. The soothing touch: microglial contact influences neuronal excitability. **Dev Cell.** v.23, p. 1125–1126, 2012.
- PASCUAL, D. *et al.* A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. **Pain.** v. 118, p. 23–34, 2005.
- PEAKE, J. *et al.* Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exerc Immunol Rev.** v. 11, p. 64-85, 2005.
- PEREZ, M. *et al.* Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. **Eur J Neurosci.** v. 38, p. 3424-3434, 2013.
- PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptors and pain. **Prog Neurobiol.** v. 5, p. 569-611, 2001.

PERTWEE, R. G. Cannabinoids and multiple sclerosis. **Pharmacol Ther.** v. 95, p. 165-174, 2002.

PETERS, C. M. *et al.* Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. **Exp Neurol.** v. 203, p. 42-54, 2007.

POLOMANO, R. *et al.* A painful peripheral neuropathy in rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. **Pain.** v. 94, p. 293–304, 2001.

PRINZ M.; PRILLER J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. **Nat Rev Neurosci.** v. 15, p. 300-312, 2014.

QUASTHOFF, S.; HARTUNG, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J Neurol.** v. 249, p. 9-17, 2002.

RADHAKRISHNAN, R. *et al.* Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain.** v. 3, p. 567-577, 2003.

RAGHAVENDRA, V. *et al.* Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 306, n. 2, p. 624-630, 2003.

RAGHAVENDRA, V. *et al.* Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **Eur J Neurosci.** v. 2, p. 467-473, 2004.

RAJAN, T. S. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of a combination of cannabidiol and moringin in LPS-stimulated macrophages. **Fitoterapia.** v. 112, p. 104-115, 2016.

RANG, H. P.; URBAN, L. New molecules in analgesia. **Br J Anaesth.** v. 75, p. 145-156, 1995.

REEVES, P. R. *et al.* Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. **Trends Microbiol.** v. 4, p. 495–503, 1996.

REN, K.; DUBNER, R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. **Curr Opin Anaesthesiol.** v. 21, p. 570-579, 2008.

RIBEIRO, A. *et al.* Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** v. 37, p. 35-51, 2015.

ROMERO-SANDOVAL, A.; EISENACH, J. C. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. **Anesthesiol.** v. 106, p. 787-794, 2007.



ROMERO-SANDOVAL, M.D. *et al.* A Comparison of Spinal Iba1 and GFAP expression in Rodent Models of Acute and Chronic Pain. **Brain Res.** v. 1219, p. 116-126, 2008.

ROMERO-SANDOVAL, E. A. *et al.* Cannabinoid receptor type 2 activation induces a microglial anti-inflammatory phenotype and reduces migration via MKP induction and ERK dephosphorylation. **Mol Pain.** v. 5, p. 25, 2009.

ROWINSKY, E. K. *et al.* Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). **Semin Oncol.** v. 20, p. 1-15, 1993.

SAAD-HOSSNE, R. Intrapleural and intraperitoneal anesthesia in guinea-pigs. **Acta Cir Bras.** v. 12, 1997.

SAITO O. *et al.* Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E (2) and TNF. **Br J Pharmacol.** v. 160, p. 1754-1764, 2010.

SANCHEZ-GUAJARDO, V. *et al.* Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to  $\alpha$ -synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. **ASN Neuro.** v. 5, p. 113-119, 2013.

SAWADA H. *et al.* Neuroprotective and neurotoxic phenotypes of activated microglia in neonatal mice with respective MPTP and ethanol-induced brain injury. **Neurodegener Dis.** v. 7, p. 64-67, 2010.

SELTZER, Z. *et al.* A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain.** v. 43, p. 205-218, 1990.

SERETNY, M. *et al.* Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **Pain.** v. 155, p. 2461–247, 2014.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J; The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci,** v. 10, p. 1361-1368, 2007.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica.** v.119, p.7-35, 2010.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscien Letters.** v. 361, p. 184-187, 2004.

SRIVASTAVA, M. D. *et al.* Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. **Immunopharmacology.** v. 40, p. 179–185, 1998.

STREIT, W. J. *et al.* Functional plasticity of microglia: a review. **Glia.** v. 5, p. 301-307, 1988.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell.** v. 140, p. 805-820, 2010.

TANGA, F. Y. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem. Int.** v. 45, p. 397-407, 2004.

TANGA, F. Y. *et al.* The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 102, p. 5856–5861, 2005.

TAWFIK, V. L. *et al.* Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. **Brain Behav Immun.** v. 21, p. 238–246, 2007.

TERAYAMA, R. *et al.* Activation of microglia and p38 mitogen- activated protein kinase in the dorsal column nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury. **Neuroscience.** v.153, p. 1245–1255, 2008.

TOTH, C. C. *et al.* Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. **Mol Pain.** v. 6, p. 16, 2010.

TRANG, T. *et al.* Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. **Pflugers Arch.** v. 452, p. 645–652, 2006.

TRUDLER, D. *et al.* Toll-Like Receptors Expression and Signaling in Glia Cells in Neuro-Amyloidogenic Diseases: Towards Future Therapeutic Application. **Mediators Inflamm.** v. 2010, p. 12, 2010.

TSUDA, M. *et al.* Neuropathic pain and spinal microglia: A big problem from molecules in “small” glia. **Trends Neurosci.** v. 28, p. 101–107, 2005.

VABULAS, R. M. *et al.* Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 270, p. 169-184, 2002.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Med Clin North Am.** v. 1, p. 1-12, 2007.

VAN HECKE, O. *et al.* Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. **Br J Anaesth.** v. 111, p. 13-18, 2013.

VARGAS, M. E.; BARRES, B. A. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? **Annu Rev Neurosci.** v. 30, p. 153-79, 2007.

VÉNÉREAU, E. *et al.* DAMPs from Cell Death to New Life. **Front Immunol.** v. 6, p. 422, 2015.

WADE, D. T. *et al.* A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. **Clin Rehabil.** v. 17, p. 18–26, 2003.

WANG, C. X. *et al.* Bainscalein alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats: possible involvement of TLR4/NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory pathway. **Brain Res.** v. 1594, p. 245-55, 2015.

WARWICK, R. A.; HANANI, M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. **Eur J Pain.** v. 4, p. 571-580, 2013.

WARD, S. J. *et al.* Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. **Anesth Analg.** v. 113, p. 947–950, 2011.

WARD, S. J. *et al.* Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT<sub>1A</sub> receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. **Br J Pharmacol.** v. 171, p. 636-645, 2014.

WATANABE, K. *et al.* Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. **Biol. Pharm. Bull.** v. 19, p. 1109-1111, 1996.

WATKINS, L. R. *et al.* Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain.** v. 63, p. 289-302, 1995.

WATKINS, L. R. *et al.* Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 14, p. 7710-7713, 1999.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. **Annu Rev Psychol.** v. 51, p. 29-57, 2000.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci.** v. 24, p. 450-5, 2001.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol Rev.** v. 4, p. 981-1011, 2002.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat Rev Drug Discov.** v. 12, p. 973-985, 2003.

WATKINS, L. R. *et al.* Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. **Trends Neurosci.** v. 28, p. 661-669, 2005.

WIESELER-FRANK, J. *et al.* Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. **Neurosignals.** v. 4, p. 166-174, 2004.

- WINDEBANK, A. J.; GRISOLD, W. Chemotherapy-induced neuropathy. **J Peripher Nerv Syst.** v. 13, p. 27-46, 2008.
- WOLF, S. *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. **Eur J Cancer.** v. 11, p. 1507-1515, 2008.
- WU, C. W. *et al.* Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. **J Neurochem.** v. 103, p. 2471–2481, 2007.
- XIAO, W. F. *et al.* MicroRNA-93-5p may participate in the formation of morphine tolerance in bone cancer pain mouse model by targeting Smad5. **Oncotarget.** v. 32, p. 52104-52114, 2016.
- XIONG, W. *et al.* Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting  $\alpha 3$  glycine receptors. **J Exp Med.** v. 209, p. 1121-1134, 2012.
- XU, J. *et al.* Role of glycogenolysis in stimulation of ATP release from cultured mouse astrocytes by transmitters and high K<sup>+</sup> concentrations. **ASN Neuro.** v. 6, p. e00132, 2014.
- YAN, X. *et al.* Interleukin-1beta released by microglia initiates the enhanced glutamatergic activity in the spinal dorsal horn during paclitaxel-associated acute pain syndrome. **Glia.** v. 67, p. 482-497, 2018.
- YOON, W. J. *et al.* Anti-inflammatory effect of sargachromanol G isolated from *Sargassum siliquastrum* in RAW 264.7 cells. **Arch Pharm Res.** v. 35, p. 1421-1430, 2012.
- ZHANG, R. L. Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 6, p. 1201-1212, 2007.
- ZHANG, L. *et al.* Cannabinoid receptor 2 agonist attenuates pain related behavior in rats with chronic alcohol/high fat diet induced pancreatitis. **Mol Pain.** v. 10, p. 66, 2014.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. (Guest Editorial). **Pain.** v. 16, p. 109–110, 1983.

## ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG - CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3225-1000, Fax: (35) 3225-1002

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL




## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Investigação do efeito protetor do canabidiol na ativação do receptor tol-like 4 durante a dor neuropática induzida pelo paclitaxel ", registrada com o nº 13/2017, sob a responsabilidade de Giovane Galdino de Souza, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

|                         |                                 |   |
|-------------------------|---------------------------------|---|
| Finalidade              | <input type="checkbox"/> Ensino | <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | De 12/06/2017 a 14/02/2019      |   |
| Espécie/Inhagem/raça    | Camundongo Swiss / heterogênico |   |
| Nº de animais           | 192                             |   |
| Sexo                    | Macho                           |   |
| Origem                  | Biotério Central da UNIFAL      |   |

Alfenas, 12 de Junho de 2017.

  
 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador CEUA-UNIFAL