UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Karollyna Corrêa Oliveira

INFLUÊNCIA DO USO CRÔNICO DE CANABIDIOL NOS NÍVEIS DE DOPAMINA CENTRAL E SEUS METABÓLITOS E NA *PERFORMANCE* NEUROMOTORA EM RATOS

Sorocaba/SP
2023

Karollyna Corrêa Oliveira

INFLUÊNCIA DO USO CRÔNICO DE CANABIDIOL NOS NÍVEIS DE DOPAMINA CENTRAL E SEUS METABÓLITOS E NA *PERFORMANCE* NEUROMOTORA EM RATOS

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Yoko Oshima Franco

Sorocaba/SP
2023

Ficha Catalográfica

Oliveira, Karollyna Corrêa

O48i Influência do uso crônico de canabidiol nos níves de dopamina central e seus metabólitos e na performance neuromotora em ratos / Karollyna Corrêa Oliveira. – 2023.

52 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2023.

1. Canabidiol. 2. Parkinson, Doença de. 3. Dopamina. 4. Endocanabinoides. I. Oshima-Franco, Yoko, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Elaborada por Regina Célia Ferreira Boaventura – CRB-8/6179.

Karollyna Corrêa Oliveira

INFLUÊNCIA DO USO CRÔNICO DE CANABIDIOL NOS NÍVEIS DE DOPAMINA CENTRAL E SEUS METABÓLITOS E NA *PERFORMANCE* NEUROMOTORA EM RATOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 13/09/2023

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Prof.(a) Dr.(a) Yoko Oshima Franco
Universidade de Sorocaba (UNISO)

Prof (a). Dr (a). Priscila Randazzo de Moura
Pontifícia Universidade Católica – PUC

gov.br Documento assinado digitalmente
ISALTINO PEREIRA DE ANDRADE JUNIOR
Data: 09/11/2023 21:20:16-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Isaltino Pereira de Andrade Junior
Universidade de Sorocaba (UNISO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades e trilhar esta longa e satisfatória caminhada.

Aos meus pais, por todo amor, ajuda e apoio incondicional.

Ao meu esposo Joshua Antonio por não me deixar desistir, pelo apoio, amor, paciência e pelas orações.

Agradeço à Universidade de Sorocaba, pela confiança, mérito e ética presentes.

À coordenação do programa, professores por todo suporte e conhecimentos compartilhados.

Agradeço à minha orientadora Yoko Oshima Franco por toda ajuda, correções, incentivos, palavras encorajadoras e por acreditar que posso ser melhor a cada dia.

A Valéria de Campos Orsi pelos ensinamentos, apoio e base para elaboração neste trabalho.

Ao Innovatox e sua equipe pelo acolhimento, paciência, ensinamentos na obtenção de resultados, em especial ao Rafael Menck de Almeida por disponibilizar os equipamentos e materiais, e ao Danilo Augusto Alves Pereira por acompanhar e ensinar sobre a extração de forma didática e com clareza em todas as etapas.

Aos amigos da cirurgia Jonas Elígio Garcia de Azevedo, Natalia Tribuiani, Ricardo Nery de Castro; da junção neuromuscular e histologia Isabella Ravazoli e Maria Luíza Rodrigues de Castro agradeço por toda ajuda e amizade, que assim, permitiram que essa caminhada fosse mais fácil e alegre.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, tendo uma parcela de contribuição, muito obrigada!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de mestrado primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, permitindo o início, estando presente no caminho, na construção e finalização de tudo.

Aos meus pais e meu esposo, por estar sempre à disposição para me ajudar e que soube entender os momentos de ausência.

Às pessoas que durante essa jornada, me incentivaram a ser uma pessoa melhor e profissional com responsabilidade, ética e amor à profissão.

Há medicamentos para toda a espécie de doenças, mas, se esses medicamentos não forem dados por mãos bondosas, que desejam amar, não será curada a mais terrível das doenças: a doença de não se sentir amado.
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O canabidiol (CBD) tem diversas indicações terapêuticas incluindo doenças que afetam o sistema nervoso central como epilepsia, esquizofrenia e doenças neurodegenerativas crônicas como Parkinson e Alzheimer. Modelos experimentais vêm sendo estudados para avaliar a relação entre a atividade do sistema endocanabinoide e receptores CB1 com a doença de Parkinson. O objetivo deste projeto foi realizar um estudo crônico de administração de canabidiol (CBD) em ratos, via gavagem, para avaliar os seus efeitos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA da Universidade de Sorocaba – SP (protocolo 173/2020). Este estudo classifica-se como experimental com animais. Ratos Wistar, machos, receberam via gavagem CBD 50 μL qsp 1 mL água/dia. Grupos controles (CO_2 ou isoflurano) receberam pela mesma via, 1 mL de água/dia. Findo o período de 90 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 (grupos controle e CBD) ou isoflurano para a coleta de amostras como tecido cerebral (dosagem neuroquímica), preparação nervo frênico-diafragma (*performance* neuromotora por técnica miográfica) seguido de análise histológica dos músculos por microscopia de luz, e sangue para dosagem sérica de sódio e potássio. Os resultados foram expressos em média ± EPM, analisados por Anova *One w*ay seguido de teste de Tukey, com $p<0,05$ indicando significância. Os resultados mostraram que o tipo de anestésico não interferiu na *performance* neuromotora dos grupos estudados, nem provocou alterações histológicas, não alterou os valores de sódio, mas interferiu nos valores de potássio, com hipercalemia em todos os grupos, sendo isoflurano>CO_2. Não houve diferença significativa na concentração de dopamina e seus metabólitos entre os grupos. Conclui-se que o CBD administrado cronicamente na concentração eleita mostrou-se seguro, sem causar alterações em nível neuroquímico, fisiológico e histológico. Mesmo com hipercalemia, esses níveis induzidos pelo isoflurano ou CO_2 não prejudicaram a *performance* neuromotora.

Palavras-chave: canabidiol; doença de Parkinson; dopamina; endocanabinoides.

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) has several therapeutic indications including diseases that affect the central nervous system such as epilepsy, schizophrenia and chronic neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. Experimental models have been studied to evaluate the relationship between the activity of the endocannabinoid system and CB1 receptors with Parkinson's disease. The objective of this project was to carry out a chronic study in rats of cannabidiol (CBD) administration, via gavage, to evaluate its effects. The project was approved by the Committee on Ethics in Animal Use - CEUA of the University of Sorocaba - SP (protocol 173/2020). This study is classified as experimental with male Wistar rats, which received 50 μL CBD via gavage qsp 1 mL water/day. Control groups (CO_2 or isoflurane) received, by the same route, 1 mL of water/day. After a period of 90 days, the animals were euthanized in a CO_2 chamber (control and CBD groups) or isoflurane for the collection of samples such as brain tissue (neurochemical dosage), phrenic nerve-diaphragm preparation (neuromotor performance by myographic technique) followed by histological analysis of the muscles by light microscopy, and blood for serum sodium and potassium measurement. Results were expressed as mean ± SEM, analyzed by Anova One way followed by Tukey's test, with $p<0.05$ indicating significance. The results showed that the type of anesthetic did not interfere in the neuromotor performance of the studied groups, nor did it cause histological alterations, it did not change the sodium values, but it did interfere in the potassium values, with hyperkalemia in all groups, being isoflurane>CO_2. There was no significant difference in the concentration of dopamine and its metabolites between groups. It is concluded that chronically administered CBD at the chosen concentration proved to be safe, without causing changes at the neurochemical, physiological and histological levels. Even with hyperkalemia, these levels induced by isoflurane or CO_2 did not impair neuromotor performance.

Keywords: cannabidiol; dopamine; endocannabinoids; Parkinson's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Canabidiol (CBD)..... 13
Figura 2 - Distribuição de receptores CB1 no organismo..... 15
Figura 3 - Organização do circuito do gânglio basal e estruturas constitutivas..... 18
Figura 4 - Neuromodulação de MSNs (striatal medium spiny neurons) 20
Figura 5 - Grupos representativos do estudo e coleta de amostras biológicas..... 25
Figura 6 - Procedimento utilizado para a contagem das células. 28
Figura 7 - Score utilizado para a contagem do dano celular. 28
Figura 8 - Equipamento (9180 Electrolyte Analyzer (Roche)) utilizado para dosagem bioquímica de sódio e potássio por automação. 30
Figura 9 - Fluxograma de preparação das amostras preparadas para análise 31
Figura 10 - A) Diagrama de um HPLC/MS-MS. B) Triplo quadropolo (QqQ) espectrômetro de massas. 31
Figura 11 - Peso médio dos animais ao longo do estudo crônico (90 dias)..... 34
Figura 12 - Performance neuromotora, grupos controles (CO2 e isoflurano) e experimental. 35
Figura 13 - Quantificação de células (em %) 36
Figura 14 - Quantificação sérica de sódio por automação. 37
Figura 15 - Quantificação sérica de potássio por automação.**Error! Bookmark not defined.**
Figura 16 - Picos e curva de calibração da dopamina e seus metabólitos obtidos por HPLC/MS-MS 38
Figura 17 - Concentração de dopamina e seus metabólitos presentes nas amostras de cérebro de ratos tratados com CBD e ratos tratados com água (grupo controle)..... 39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Classes de compostos encontrados na planta Cannabis sativa 12
Quadro 2 - Produtos autorizados para comércio no Brasil (ANVISA, 2022) 14
Quadro 3 - Receptores CB2 encontrados no organismo. 16
Quadro 4 - Localização e efeitos de receptores CB1 nos circuitos do gânglio basal e potenciais implicações para a Doença de Parkinson (DP)..... 18
Tabela 5 - Programa de gradiente empregado na separação cromatográfica para a DA e seus metabólitos. 32
Tabela 6 - Modo de ionização, voltagem do cone, transições e suas respectivas energias de colisão empregadas para cada analito de interesse. 33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF	*Brain Development Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico do Desenvolvimento Cerebral)
CB1	Receptor canabinoide tipo 1
CB2	Receptor canabinoide tipo 2
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBE	Canabielsoin
CBG	Canabigerol
CBL	Canabiciclol
CBN	Canabinol
CBND	Canabinodiol
CBT	Canabitriol
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CM	Miofibrila Condensada (*Condensed Myofibril*)
DA	Dopamina
Δ9-THC	Δ9-tetrahidrocanabinol
DOPAC	*3,4-dihydroxyphenylacetic*
DP	Doença de Parkinson
FAAH	*Fatty Acid Amide Hydrolase* (Inibidores da Amida Hidrolase de Ácidos Graxos)
GABAA	Ácido gamaaminobutirico
GPe	*Globus Pallidus External*
GPi	*Globus Pallidus Internal*
HVA	*Homovanillic acid*
HE	Hematoxilina-eosina
HPLC	*High Performance Lliquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de alta Eficiência)
i.p	Intraperitonealmente
ISE	Eletrodo Seletivo de Íons (*Ion Selective Electrode*)
JNM	Junções Neuromusculares
MSNs	*Striatal Medium Spiny Neurons*
NMDA	N-metil D-aspartato
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SNC	Sistema Nervoso Central
SNr	*Substantia Nigra Pars Reticulata*
STN	*Subthalamic Nucleus* (núcleo subtalâmico)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 OBJETIVOS 21

2.1 Geral 21

2.2 Específicos 21

3 MATERIAL E MÉTODOS 22

3.1 Delineamento do estudo 22

3.2 Material 22

3.3 Animais 22

3.4 Estudo crônico (*in vivo*) 22

3.5 Procedimentos anestésicos para eutanásia 23

3.6 Coleta de amostras 24

3.7 Preparação nervo frênico-diafragma de ratos (*ex vivo*): *performance* neuromotora 25

3.8 Dosagem sérica de Sódio e Potássio 29

3.9 Dosagem da Dopamina – por HPLC/MS-MS 30

3.10 Análise Estatística 33

4 RESULTADOS 34

4.1 Pesagem 34

4.2 *Performance* neuromotora 34

4.3 Análise histológica 35

4.4 Dosagem sérica de sódio e potássio 36

4.5 Dosagem da Dopamina – por HPLC/MS-MS 38

5 DISCUSSÃO 40

6 CONCLUSÃO 44

REFERÊNCIAS 45

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA-UNISO 52

1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* L. é mundialmente utilizada como droga recreativa (UNODC, 2018) e ocupa o terceiro lugar neste *hanking* (MORAIS *et al*., 2022), que tem o álcool e o cigarro à sua frente (HALL; WEIER, 2015). Quando fumada, expressa no indivíduo alguns efeitos de alucinações, pensamentos anormais, sonolência e disforia, entre outros. O composto responsável pela causa desses efeitos é o Δ9-tetrahidrocanabidiol (Δ9-THC), encontrado na planta juntamente com outros inúmeros compostos (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006), como mostrado no quadro 1.

Quadro 1 - Classes de compostos encontrados na planta Cannabis sativa.

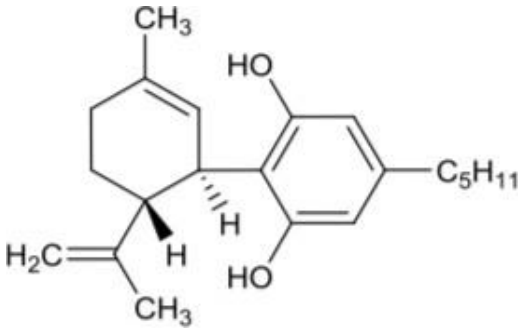
Classe	X	Classe	X
Canabinoides	61	Cetonas simples	13
Canabigerol (CBG)	06	Ácidos simples	20
Canabicromeno (CBC)	04	Ácidos graxos	12
Canabidiol (CBD)	07	Ésteres e lactonas simples	13
Δ^9-THC	09	Esteroides	11
Δ^8-THC	02	Açúcares e análogos	34
Canabiciclol (CBL)	03	Monossacarídeos	13
Canabielsoin (CBE)	03	Dissacarídeos	02
Canabinol (CBN)	06	Polissacarídeos	05
Canabinodiol (CBND)	02	Ciclitóis	12
Canabitriol (CBT)	06	Amino-açucares	02
Outros canabinoides	13	Terpenos	103
Compostos nitrogenados	20	Monoterpenos	58
Bases quaternárias	05	Sesquiterpenos	38
Amidas	01	Diterpenos	01
Aminas	12	Triterpenos	02
Alcaloides espirmidinas	02	Mistura de terpenoide	04
Aminoácidos	18	Fenóis não-canabinoides	16
Proteínas, glicoproteínas e enzimas	09	Glicosídeos flavonoide	19
Hidrocarbonetos	50	Vitaminas	01
Álcoois simples	07	Pigmentos	02
Aldeídos simples	12	Total	421

X, Número de compostos encontrados na planta.
Modificado da Fonte: HONÓRIO, K.M.; ARROIO, A.; SILVA, A.B.F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 318-325, 2006.

Artigos recentes relatam até 550 compostos encontrados na planta (ROCK; PARKER, 2021). Devido ao seu potencial terapêutico, o canabidiol (CBD) (Figura 1) é utilizado em casos de isquemias, diabetes, náuseas e câncer; em doenças que afetam o sistema nervoso central como epilepsia, esquizofrenia, doenças neurodegenerativas crônicas como Parkinson e Alzheimer, ansiedade, distúrbio do sono e movimento. Tem ações, portanto, como

anticonvulsivante, analgésica, imunossupressora e anti-inflamatória (CARRANZA, 2012; GAINZA *et al*., 2003; IZZO *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2017; PERNONCINI; OLIVEIRA, 2014; PIEDRA *et al.*, 2009; ZUARDI, 2008).

Figura 1 - Estrutura química do Canabidiol (CBD)



Fonte: MATOS, R.L.A. *et al.* O uso do canabidiol no tratamento da epilepsia. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.2, p. 786-814, 2017.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 3/12/2019, o registro de medicamentos à base de *Cannabis*, mas não o seu cultivo pelas empresas produtoras, dessa forma, tramita-se um Projeto de Lei no Senado, de número 399, o que visa alterar o artigo 2º da lei nº 11.343 de 23 de agosto de 2006, que proíbe drogas e plantio de vegetais e substratos que possam produzir drogas. Uma vez registrados, de acordo com os requisitos e controles de qualidade exigidos pela, os medicamentos poderão ser comprados com expressa recomendação médica, sendo que o percentual de THC deverá estar abaixo de 0,2%, valor que poderá ser maior para pacientes em estado terminal ou quando se tenham esgotado as alternativas terapêuticas. A decisão da Diretoria estabelece que a norma, denominada Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), será revisada em até três anos após a publicação no Diário Oficial da União, justamente em razão do estágio técnico-científico em que se encontram os produtos à base de *Cannabis* mundialmente (ANVISA, 2019).

Reunindo a RDC 327/2019, de 9 de dezembro de 2019 e a resolução RE n° 1.298, de 20 de abril de 2022, os produtos autorizados para comércio no Brasil são 15 (ANVISA, 2022), conforme quadro 2:

Quadro 2 - Produtos autorizados para comércio no Brasil (ANVISA, 2022).

Produto comercializado	**Concentrações**
Canabidiol *Active Pharmaceutical*	(20 mg/mL)
Canabidiol Prati-Donaduzzi	(20 mg/mL; 50 mg/mL e 200 mg/mL)
Canabidiol *NuNature*	(17,18 mg/mL)
Canabidiol *NuNature*	(34,36 mg/mL)
Canabidiol Farmanguinhos (200 mg/mL)	
Canabidiol Verdemed	(50 mg/mL)
Canabidiol Belcher	(150 mg/mL)
Canabidiol Aura Pharma	(50 mg/mL)
Canabidiol Greencare	(23,75 mg/mL)
Canabidiol Verdemed	(23,75 mg/mL)
Extrato *de Cannabis sativa* Promediol	(200 mg/mL)
Extrato de *Cannabis sativa* Zion Medpharma	(200 mg/mL)
Extrato de *Cannabis sativa* Alafiamed	(200 mg/mL)
Extrato *de Cannabis sativa* Greencare	(79,14 mg/mL)
Extrato de *Cannabis sativa Ease Labs*	(79,14 mg/mL)

Fonte: Elaboração própria.

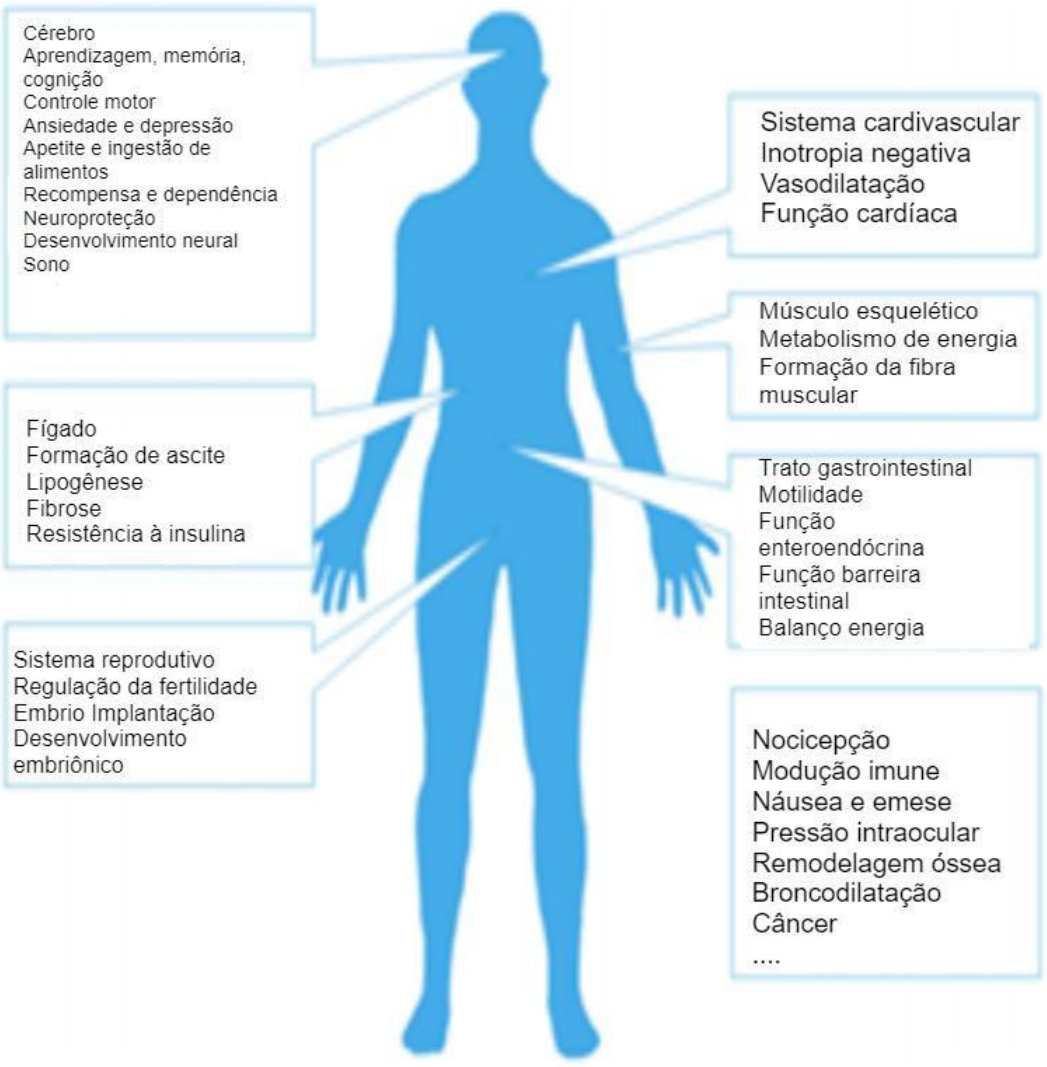
A ANVISA também autoriza a importação do medicamento com base em extrato de canabidiol para tratar doenças comprovadas por laudos médicos. No entanto, a dificuldade para continuar o tratamento, em razão do alto custo da importação, tem levado à liberação ao cultivo de *Cannabis* por meio de *habeas corpus* (STJ, 2022).

A presença de CBD em extratos da planta chega a 40% e não apresenta efeito psicoativo (CAMPOS *et al.*, 2012), sendo sua capacidade neuroprotetora atribuída ao seu poder antioxidante contra os radicais livres de oxigênio produzidos nos neurônios, devido à liberação excessiva de glutamato. O composto psicoativo da *Cannabis*, Δ^9-THC, e o CBD funcionam como antagônicos altamente competitivos (BATALLA *et al.*, 2021).

Os efeitos farmacológicos dos canabinoides decorrem de sua interação com os receptores endocanabinoides do tipo CB1 ou CB2, amplamente distribuídos no organismo. Os endocanabinóides são mediadores lipídicos que ativam os receptores canabinóides e medeiam

um amplo espectro de ação (PACHER; BATKAI; KUNOS, 2006). A Figura 2 ilustra a distribuição dos receptores CB1, no organismo (ZOU; KUMAR, 2018).

Figura 2 - Distribuição de receptores CB1 no organismo.



Modificado da Fonte: ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 833, 2018. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877694/ Acesso em 30 dez 2019.

Os receptores CB1 e o sistema endocanabinoide estão envolvidos em vários aspectos das atividades do sistema nervoso central (SNC) e desordens, incluindo apetite, aprendizado e memória, ansiedade, depressão, esquizofrenia, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, neurodegeneração como no Parkinson, Alzheimer e doença de Huntington, epilepsia e dependência (DI MARZO; STELLA; ZIMMER, 2015; IVERSEN, 2003; KANO *et al.*, 2009; PACHER; BATKAI; KUNOS, 2006), enquanto no sistema nervoso periférico e tecidos,

incluem-se dor, metabolismo energético, funções cardiovascular e reprodutiva, inflamação, glaucoma, câncer e desordens hepáticas e músculo-esqueléticas (MACCARRONE *et al.*, 2015). A ativação dos receptores endocanabinoides 1 (CB1) induz o aumento do consumo calórico e a lipogênese no tecido adiposo e no fígado. A ativação desse grupo de receptores está relacionada à obesidade e outros distúrbios metabólicos (MATIAS *et al.*, 2006; TAM *et al.*, 2012). O uso de inibidores dos receptores do tipo CB1 em ratos obesos induzidos por dieta demonstrou ação na redução da ingestão calórica e consequentemente do peso (TAM *et al.* , 2012).

O quadro 3 mostra a distribuição dos receptores CB2 de acordo com a sua identificação no organismo (ZOU; KUMAR, 2018).

Quadro 3 - Receptores CB2 encontrados no organismo.

Local	Autores
Macrófagos e fígado	MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993
Sistema imunológico (elevada densidade de receptores), cardiovascular, trato gastrointestinal, fígado, tecido adiposo, ossos e sistema reprodutivo	HOWLETT *et al.*, 2002
SNC	GONG *et al.*, 2006
Neurônios piramidais do córtex pré-frontal	DEN BOON *et al.*, 2012

Fonte: Elaboração própria.

Esse amplo espectro farmacológico do CBD tem sido discutido na interação de receptores canabinoides com os mais diversos neurotransmissores (colinérgicos, através de receptores muscarínicos e nicotínicos; inibição da liberação de GABA e glutamato dos terminais pré sinápticos; inibição da produção de óxido nítrico; redução da mobilização do zinco e aumento da expressão do fator neurotrófico do desenvolvimento cerebral – BDNF; dopaminérgicos), o que aumenta a necessidade de mais estudos para compreender tantas ações distintas (CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010; MATOS *et al.*, 2017; ZOU; KUMAR, 2018).

Ainda que o CBD apresente uma afinidade baixa pelos receptores endocanabinoides, há evidências científicas de que ele possa atuar como antagonista de CB1 e agonista de CB2, quando administrado em baixas concentrações (ZUARDI, 2008).

Estudo demonstra que o CBD inibiu o ganho de peso por abstinência de nicotina em curto prazo (SMITH; TIEU; SUHANDYNATA, 2021), porém em outro estudo, quando usado para tratar a depressão, mostrou ganho de peso significativo em ratos (GÁLL *et al.*, 2020).

A relação entre a atividade do sistema endocanabinoide e receptores CB1 com a doença de Parkinson tem sido muito estudada em modelos experimentais. Observaram-se *up regulation* de receptores CB1, que poderia ser um mecanismo compensatório da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra*, ou um processo patológico que contribui para a piora da doença (BROTCHIE, 2003); ou ainda, uma atividade diminuída do sistema endocanabinoide nesta doença (DI MARZO, 2008). Além disso, inibidores da amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, *Fatty acid amide hydrolase*) e antagonistas dos receptores CB1 mostraram aliviar os sintomas motores na Doença de Parkinson (DI MARZO, 2008).

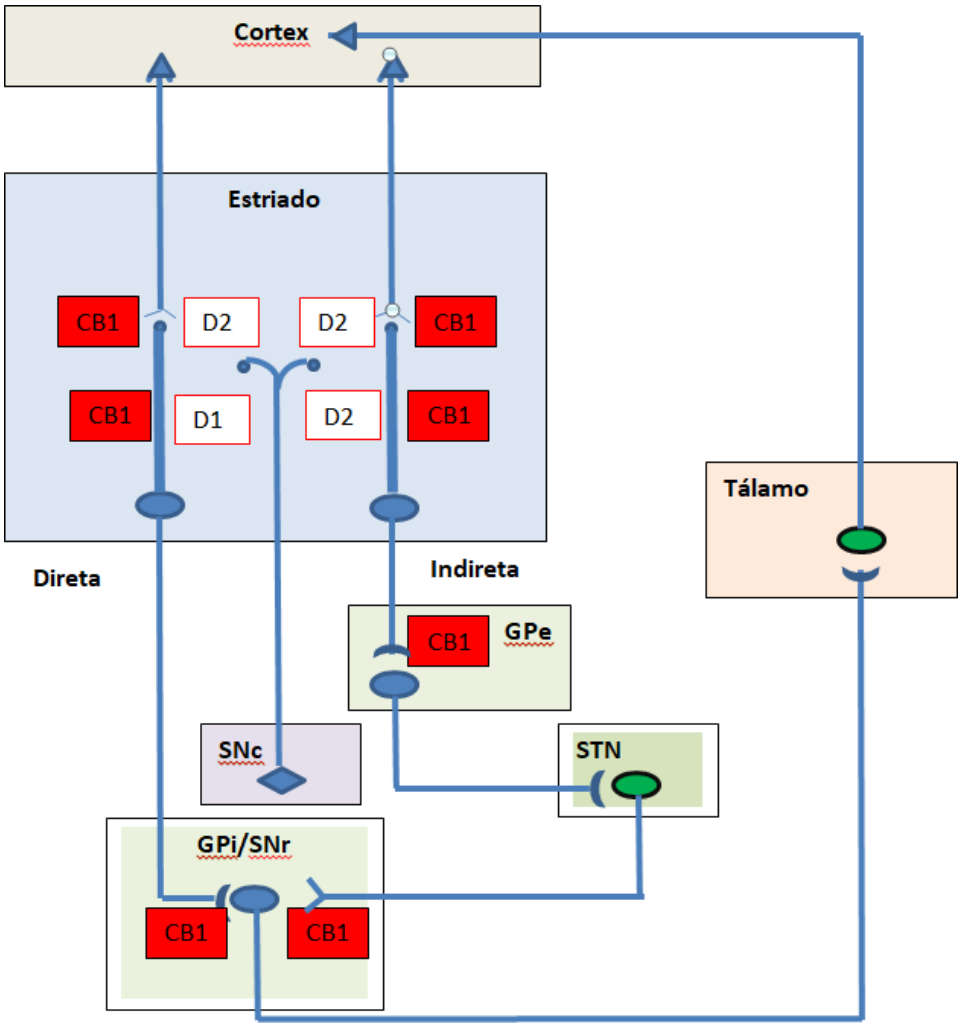
Estudos recentes mostram que o CBD pode também, ativar o receptor *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR-c), sendo assim responsável por importantes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes na doença de Parkinson (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2022). Com isso, é possível observar um crescimento no estudo do CBD, que pode contribuir com possíveis mudanças nas legislações permitindo um maior e mais fácil acesso ao CBD, resultando no surgimento de produtos no mercado (ARZIMANOGLOU *et al.*, 2020).

A doença Parkinson (DP) exibe sintomas motores clássicos de bradicinesia, rigidez e tremores causados pela morte de neurônios dopaminérgicos, na *substantia nigra pars compacta* (BERNHEIMER *et al.*, 1973; BORTOLANZA *et al.*, 2018) e seus terminais no *striatum* (HORNYKIEWICZ, 1987). Também apresenta sintomas não-motores como disfunção no olfato, disfunção autonômica, desordens no sono, dor e problemas sensoriais (RODRÍGUEZ-VIOLANTE *et al.*, 2017). Na área do comportamento motivado, atribuído exclusivamente ao sistema de recompensa, recentes estudos têm implicado o gânglio basal (KRAVITZ; KREITZER, 2012; KRAVITZ; TYE; KREITZER, 2012).

As manifestações motoras da DP resultam da redução de *inputs* dopaminérgicos para o *striatum*. Isto leva ao aumento do glutamato na via corticoestriatal e hiperatividade da via indireta, resultando na hipoatividade do *globus pallidus external* (GPe). Como consequência, há desinibição do núcleo subtalâmico (STN, *subthalamic nucleus*) e aumento da via excitatória para o *globus pallidus internal* (GPi) e *substantia nigra pars reticulata* (SNr). O resultado é uma excessiva inibição do tálamo motor e regiões locomotoras cerebrais e anormal sincronização da atividade oscilatória nos circuitos do gânglio basal (DELONG; WICHMANN, 2007).

A Figura 3 ilustra a distribuição de receptores canabinoides CB1 em circuitos do gânglio basal e as implicações para a doença de Parkinson são mostradas no quadro 4 (BENARROCH, 2007).

Figura 3 - Organização do circuito do gânglio basal e estruturas constitutivas.



Distribuição dos receptores CB1 (em vermelho) no circuito do gânglio basal e relação com receptores dopaminérgicos (D2, D1). GPe, *globus pallidus* external. GPi, *globus pallidus* internal. SNc, *substantia nigra pars compacta*. SNr, *substantia nigra pars reticulata*. STN, *subthalamic nucleus*.
Fonte: BENARROCH, E. Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. Neurology, v. 69, n. 3, p. 306-309, 2007.

Quadro 4 - Localização e efeitos de receptores CB1 nos circuitos do gânglio basal e potenciais implicações para a Doença de Parkinson (DP).

Estrutura	**Localização do receptor CB1**	**Efeito da ativação do receptor CB1**	**Potenciais implicações para DP e LID**
Striatum	Aferências corticoestriatais	Diminuição da liberação glutamatérgica*	Melhora de DP, Melhora de LID
	MSN da via direta	Antagoniza o efeito de receptores D_1	Piora de DP, Melhora de LID

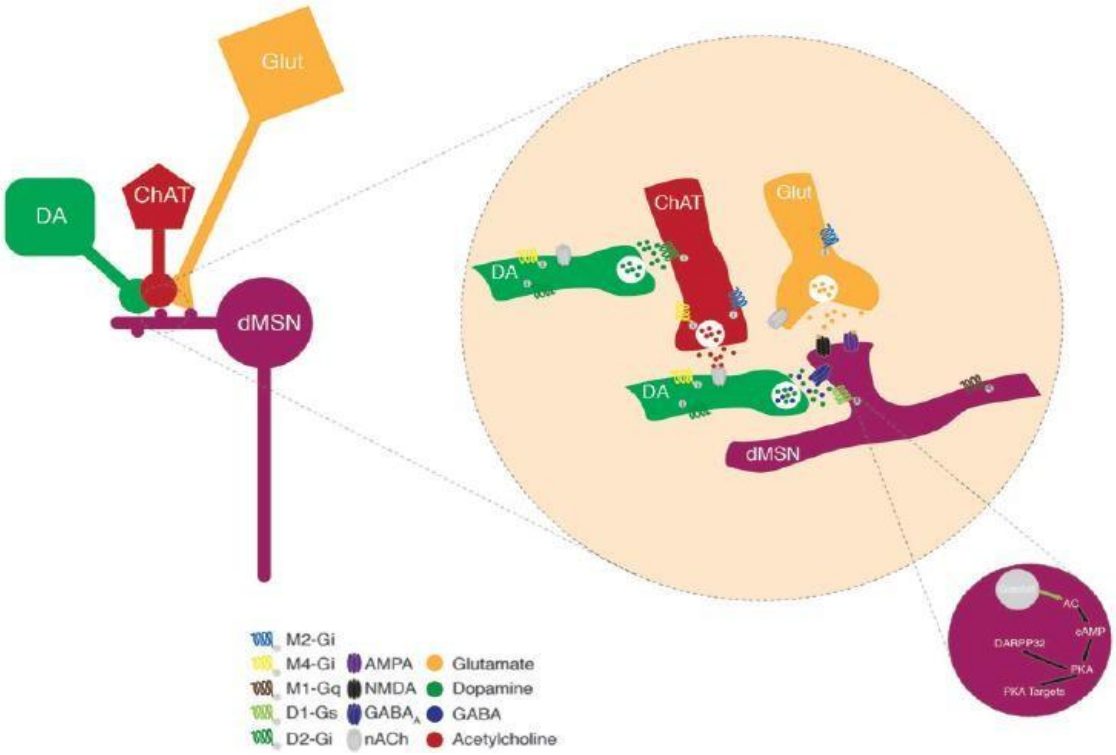
	MSN da via indireta	Modifica o efeito de receptores D2, aumentando a atividade[+]	Piora de DP
GPe	Aferências estriatais	Aumenta o nível de GABA pela redução da receptação pré-sináptica	Piora de DP
GPi	Aferências estriatais	Inibe a liberação de GABA	Incerto
SNC	Aferências estriatais	Inibe a liberação de GABA aumentando o disparo de neurônios dopaminérgicos [++]	Benefício potencial na DP

*Potência o efeito da dopamina agindo via receptores D2 pré-sinápticos nas aferências nigroestriatais.
[+] Ativação simultânea de receptores CB1 e D2 aumenta a formação *in vitro* de adenosina monofosfato cíclica (AMPc); se isso ocorre *in vivo*, pode aumentar a atividade da via indireta.
[++] Anandamida, age via receptores pós-sinápticos tipo vaniloide (VR1), inibe atividade de células dopaminérgicas.
LID, *levodopa-induced dyskinesia*. GPe, *Globus Pallidus External.* GPi, *Globus Pallidus* Internal. SRn, *Substantia Nigra Pars Reticulata.* STN, *Subthalamic Nucleus.* GABA, ácido gama-aminobutírico.

Fonte: BENARROCH, E. Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. **Neurology,** v. 69, n. 3, p. 306-309, 2007.

Outra interação importante que ocorre no gânglio basal é entre a dopamina (DA) e a acetilcolina (ACh) (RIZZI; TAN, 2017), os principais neuromoduladores dos movimentos finos (Figura 4).

Figura 4 - Neuromodulação de MSNs (*striatal medium spiny neurons*).



Legenda. Representação esquemática da convergência da modulação DA e ACh sobre *inputs* excitatórios sobre um neurônio espinhal (dMSN) do *striatum* dorsal (DS). Terminais DA modulam a neurotransmissão excitatória formando sinapses no espinho do pescoço de MSN, através de dois mecanismos moleculares envolvendo DA e a co-liberação de GABA. Esse *input* DAérgico é modulado por receptores nicotínicos de ACh e este controle colinérgico pode por si só ser afinado na presença de receptores pré-sinápticos D2. A ativação de receptores D1, que estão acoplados à proteína Gas, leva à produção de cAMP (cyclic adenosine monophosphate) via adenilato ciclase (AC, adenylate cyclase). Isto promove a função da proteína kinase A (pKA), que fosforila DARPP32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa, um integrador da neurotransmissão) indiretamente motivando um aumento na excitabilidade neuronal via ativação de canais de Ca^{2+} e receptores NMDA bem como a inibição de canais de K^{+}.

Fonte: RIZZI, G.; TAN, K.R. Dopamine and acetylcholine, a circuit point of view in Parkinson's disease. **Frontiers in Neural Circuits,** v. 11, p. 110, 2017. Doi: 10.3389/fncir.2017.00110. eCollection 2017.

Através de várias pesquisas, a ANVISA vem reconhecendo a eficácia do CBD no tratamento de diversas doenças, permitindo assim que ele entrasse para a lista da de substâncias controladas liberadas para importação e uso por laboratórios para o desenvolvimento de outros estudos mais aprofundados.

Considerando-se que o uso médico do CBD é recente no Brasil e que muitos dos espectros farmacológicos ainda necessitam ser aprofundados, o objetivo deste projeto foi contribuir para os estudos da área, por meio da avaliação da influência do uso crônico de CBD em ratos sobre a DA central e sobre a performance neuromotora, bem como sobre o efeito do anestésico utilizado na eutanásia dos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Realizar um estudo crônico da administração de canabidiol (CBD) em ratos, via gavagem, e avaliar os seus efeitos.

2.2 Específicos:

Avaliar o efeito do CBD sobre a dopamina central.

Avaliar o efeito do CBD sobre a performance neuromotora em preparações neuromusculares isoladas e seus aspectos morfológicos.

Avaliar a influência do anestésico utilizado na eutanásia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Este estudo classifica-se como experimental com animais.

3.2 Material

Cilindro de gás CO_2, câmara para inalação respiratória (Chamber W/Dump Door Med, Harvard Apparatus®), Isoflurano (Instituto Biochimico Ind. Farm. Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); Carbogênio (95% O_2/5% CO_2) abastecido pela White Martins® envasado em cilindro modelo 040NW200T 40.219 ISSONGT-3/4 col-cap.; maravalha (J.D. Goulart Comercio e Serviços Ltda, Indaial, Santa Catarina, SC, Brasil); ração (Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda, Paulínia, São Paulo, SP, Brasil); Canabidiol (CBD) (CBD, 200 mg/mL, apresentação 30 mL de solução oral, laboratório Prati-Donaduzzi, Paraná, PR, Brasil) comercializado pela Droga Raia, mediante receituário médico; kits de dosagem enzimática de sódio e potássio (Bioclin, Quibasa Quimica Básica Ltda, Santa Branca, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.3 Animais

Ratos machos da linhagem Wistar, adultos pesando entre 290-300 g, foram adquiridos da Anilab Animais para Laboratório, Paulínia, SP, Brasil. Os animais foram ambientados em gaiolas (2 ratos/gaiola) no biotério do Lapetox (Laboratório de Pesquisa Toxicológica) da Universidade de Sorocaba, sob sistema de exaustão e ventilação apropriada (sistema de microventilação ambiental, Alesco®), com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas controlados por timer. Os animais foram acomodados em camas de maravalha livre de substâncias químicas e receberam ração e água *ad libitum*. O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA da Universidade de Sorocaba – SP e aprovado sob CEUA da Universidade de Sorocaba – SP, sob o protocolo 173/2020 em 07/05/2020 (Anexo 1), para execução do estudo. O relatório de finalização de pesquisa foi aprovado pelo CEUA em 18/04/2023.

3.4 Estudo crônico (*in vivo*)

Vinte e quatro animais foram distribuídos randomicamente em 3 grupos (n=8). Dois grupos foram controles do processo de eutanásia (isoflurano ou CO_2), enquanto o grupo teste foi eutanasiado com CO_2. Aos animais do grupo tratado com CBD 200 mg/mL, foi pipetado 50 μL do óleo e completado até o volume de 1 mL com água e administrado via gavagem, enquanto os grupos controles recebiam o mesmo volume de água (1 mL). Os animais foram tratados diariamente durante 90 dias e pesados mensalmente. A concentração utilizada de CBD baseou-

se em estudos realizados por Elbatsh e colaboradores (2012), porém, com a diferença que esses autores administraram intraperitonealmente i.p. Concentrações acima de 20 mg/kg não comprovaram aumento da eficácia do composto, principalmente o efeito ansiolítico, ficando esta concentração como limitante de eficácia (CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010). Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados utilizando-se dois procedimentos anestésicos (isoflurano ou CO_2). É importante ressaltar que o tratamento crônico de cada grupo foi iniciado conforme rigoroso calendário, não excedendo dois animais por dia, prevendo que, ao completar 90 dias, os animais seriam eutanasiados e experimentos de *performance* neuromotora deveriam ser realizados no mesmo dia.

3.5 Procedimentos anestésicos para eutanásia

É necessário cuidado com a escolha dos agentes inalatórios para que essa técnica seja efetiva, de acordo com a necessidade do agente de ter que atingir uma concentração alveolar, podendo demorar determinado tempo para induzir inconsciência no animal. Nos casos em que a morte induzida pelos anestésicos inalatórios é lenta, um segundo método deve ser aplicado, garantindo a morte rápida do animal, antes da recuperação da consciência (CONCEA, 2018). Por mais que o método químico seja a escolha mais comum, seus agentes também são comumente conhecidos devido a interferência no resultado de alguns experimentos, quanto à capacidade de alguns agentes serem neuroprotetores e neurotóxicos (KARMARCAR; BOTTUM; TISCHKAU, 2010).

O isoflurano, éter volátil halogenado muito utilizado em anestesia por via inalatória, tem sido amplamente estudado devido à sua capacidade de neuroproteção, acreditar-se que o efeito anestésico deste éter pode antagonizar/inibir o receptor de N-metil D-aspartato (NMDA) ou ativar/potencializar o receptor de ácido gamaaminobutirico (GABAA), além da modulação quanto à função de proteínas celulares e até mesmo aumento do volume sanguíneo cerebral e pressão intracraniana. Devido a essas características do agente, é possível gerar um mecanismo de neuroproteção, tanto na hipoxia como na hipoxemia (BURCHELL *et al.*, 2013; WREN-DAIL *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2016).

Outro método também utilizado para a eutanásia de roedores, porém, com restrição é a inalação de CO_2 (FAVORETTO, 2019) - culminando em morte por decapitação (GLOWINSKI; IVERSEN, 1966) indicada para a preservação de tecido cerebral (SPINOSA; GERENUTTI; BERNARDI, 2000) - técnica esta que induz de forma rápida e confiável a perda de consciência. Mas, este método não contém uma dose ideal de CO_2, apesar do fato de que altas concentrações estariam diretamente relacionadas à intensidade da dor nos animais, logo a exposição de

animais com uma concentração acima de 50% podem levar a formação de ácido carbônico nas mucosas, fazendo com que o animal sinta dor e sofrimento antes de atingir a inconsciência, o que acaba por se tornar uma controvérsia, já que a técnica exige uma rápida exposição a uma alta concentração para que a inconsciência seja induzida rapidamente (BOIVIN *et al.*, 2017; CONCEA, 2018). Sabe-se também que a inalação de CO_2 pode produzir acidose do fluido cérebro-espinhal, depressão cardiovascular e estupor, levando inconsciência em concentrações de 15-20%. Concentrações elevadas, em torno de 50%, podem levar ao coma, apneia, hipercalemia e parada cardíaca (LANGFORD, 2005; PERMENTIER *et al.*, 2017).

Com a finalidade de avaliar se os animais chegavam à hipercalemia com a quantidade de CO_2 utilizada durante a eutanásia, um grupo foi acrescentado como controle, representado pelo isoflurano, conforme descrito abaixo.

Grupo 1: Controle que só recebeu água e anestesiado com isoflurano (n=8)

Grupo 2: Controle que só recebeu água e anestesiado com CO_2 (n=8)

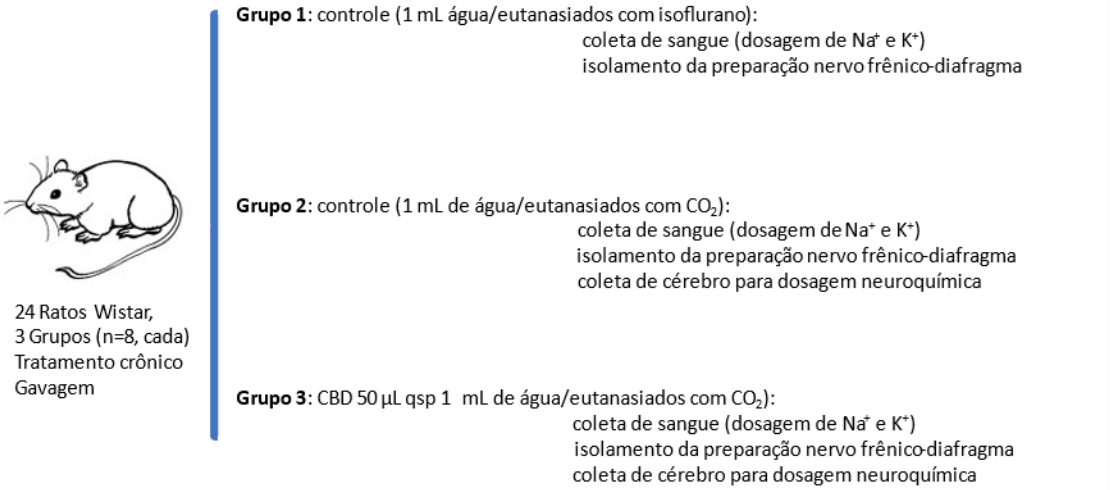
Grupo 3: Experimental CBD e anestesiado com CO_2 (n=8)

No grupo 1 os animais foram colocados em câmara vedada para inalação de isoflurano embebido em algodão até completa perda de reflexos a estímulos dolorosos. Nos grupos 2 e 3, os animais foram colocados na câmara (Chamber W/Dump Door Med, Harvard Apparatus®, Massachusetts, MA, USA) totalmente vedada para, em seguida, receberem o CO_2 de um cilindro, acoplado a um regulador de pressão, cujos parâmetros foram 0,4 kgf/cm², sendo necessária uma concentração de CO_2 entre 6-10%, temperatura ambiente, tempo de fluxo variando entre 45-50 segundos, com monitorização clínica dos ratos pelo médico veterinário, para ajuste dos parâmetros de acordo com a reação de cada animal.

3.6 Coleta de amostras

Findo os 90 dias de tratamento os animais foram eutanasiados para coleta das seguintes amostras biológicas (Figura 5).

Figura 5 - Grupos representativos do estudo e coleta de amostras biológicas.



Fonte: Elaboração própria.

A diferença dos procedimentos anestésicos entre isoflurano e CO_2 foi avaliada nos 3 grupos, através da dosagem bioquímica de Na^+ e K^+ e da *performance* neuromotora. A dosagem neuroquímica foi realizada nos grupos G2 e G3. Após o procedimento anestésico realizado por médico veterinário, os animais dos 3 grupos foram rapidamente guilhotinados. O período entre a decapitação do animal, a retirada e a estocagem das estruturas cerebrais de cada animal, não deve ultrapassar 3 minutos, sendo necessária uma equipe composta por 5 pessoas para realização do procedimento. Após serem guilhotinados o sangue resultante da exsanguinação foi coletado em tubos sem anticoagulante. Cada tubo foi previamente identificado e após meia-hora para a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, soro separado, identificado e armazenado em biofreezer – 80 °C, até o momento do uso. A cabeça decapitada foi rapidamente manipulada para a coleta dos tecidos cerebrais do grupo experimental e grupo controle CO_2. O encéfalo foi retirado e as estruturas cerebrais (córtex frontal, hipotálamo e estriado) foram coletadas sobre placa de gelo (GLOWINSKI; IVERSEN, 1966) e pesadas, registrando cuidadosamente o peso do cérebro de cada animal. Posteriormente, as estruturas cerebrais foram acondicionadas em tubos tipo *eppendorfs* com a devida identificação e estocadas em biofreezer – 80 °C. O corpo do animal era recebido para o isolamento da preparação nervo frênico-diafragma (descrito abaixo) para avaliar a *performance* neuromotora, único experimento realizado no próprio dia da eutanásia.

3.7 Preparação nervo frênico-diafragma de ratos (*ex vivo*): *performance* neuromotora

Os ratos foram anestesiados com isoflurano ou CO_2, ambos por via inalatória e posteriormente exsanguinados pela secção e sangria dos vasos cervicais. Isolava-se a

preparação nervo frênico-diafragma conforme o protocolo proposto por Bülbring (1946) e colocava-se em cuba com capacidade para 20 mL contendo solução de Tyrode (solução nutritiva: pH 7,0; composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $MgCl_2$ 0,49; NaH_2PO_4 0,42; $NaHCO_3$ 11,9 e Glicose 11,1.) e, presa através dos músculos da costela por ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O_2 e 5% CO_2). Uma tensão de 20 g/cm foi aplicada por meio de um fio preso à porção tendinosa. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo e mantido em contato com a superfície da solução nutritiva. O registro da contração muscular foi alcançado através do transdutor isométrico cat. 7003, acoplado a um sistema de aquisição de dados digital (Data Capsule-Digital Recorder, cat. 17400, Ugo Basile®, Itália) contendo amplificadores Basic Preamplifiers cat.7080 (Ugo Basile®), acoplado a um computador via interface USB para armazenamento dos dados. Em seguida, a preparação foi estimulada (estimulador fisiológico duplo ESF-15D) indiretamente, através do nervo frênico, usando-se estímulos supramaximais e frequência de 0,1 Hertz com duração de 0,2 milissegundos. Após registro em condições controle durante 10 minutos de estabilização da preparação, iniciava-se a marcação do tempo para registrar a *performance* neuromotora, durante 60 minutos.

Os músculos resultantes dos protocolos farmacológicos foram reservados para procedimento de rotina para análise histológica, conforme descrito a seguir.

Após ser utilizada a preparação de ratos para gerar os dados miográficos e estatísticos, o músculo diafragma de cada experimento foi fixado em formalina 10% por 24 horas e após esse período migrado para o álcool 70%, onde ficou até o início da confecção das lâminas. Foram selecionados para a análise histológica 3 músculos do grupo tratado com CBD, 3 músculos do grupo Isoflurano e 3 músculos do grupo CO_2, cada um foi seccionado em três partes marcadas como ‘‘começo, meio ou fim’’ para obter cortes do músculo inteiro. Depois desse processo as peças passaram pelos seguintes procedimentos:

• Desidratação: a peça foi acondicionada em frascos com álcool absoluto, 90º e 70º para a retirada da água do tecido. Foi feita a imersão em cada concentração de álcool por 50 minutos.

• Diafanização: para retirada das impurezas presentes no tecido e com intuito de deixá-lo transparente e apropriado para receber a coloração, as peças passaram por três trocas de xilol (mesma concentração).

• Inclusão: foi feita a inclusão das peças em parafina (Paraplast Plus® - McCormick Scientific) mantida em estufa microbiológica (Solidsteel, mod. SSB, Brasil) na temperatura de cerca de 58 ºC. No decorrer do procedimento, foram efetuadas 2 trocas, de 1 em 1 e posteriormente, os tecidos inclusos foram colocados em formas de silicone com parafina pré-

aquecida em mesma temperatura da estufa e deixados para descanso em uma superfície plana e resfriada dentro de ambiente protegido para a secagem e solidificação do Paraplast Plus®. Nessa etapa, foi realizada a identificação dos blocos com: 1, 2 e 3 (controle Isoflurano), 4, 5 e 6 (controle CO_2) e 7, 8, e 9 (CBD) + identificação de começo, meio ou fim (C, M ou F) + número da lâmina. Em seguida, os blocos foram fixados em pequenos blocos de madeira (suporte para o micrótomo).

• Secção do tecido: após a fixação em madeira, foi posicionado na opção de desbaste de 30 μm no micrótomo (Criostato 300 Ancap®) para retirada do excesso de parafina, até atingir o tecido, em seguida, foi selecionada a opção de corte para obter secções de 5 μm de forma seriada.

• Banho histológico: ao serem retiradas fitas de parafina contendo os cortes do micrótomo, elas foram colocadas em banho histológico (Ancap®) na temperatura de 39º C ± 3 ºC e pescados com lâmina de vidro. Então, a parte fosca foi marcada com a identificação da lâmina.

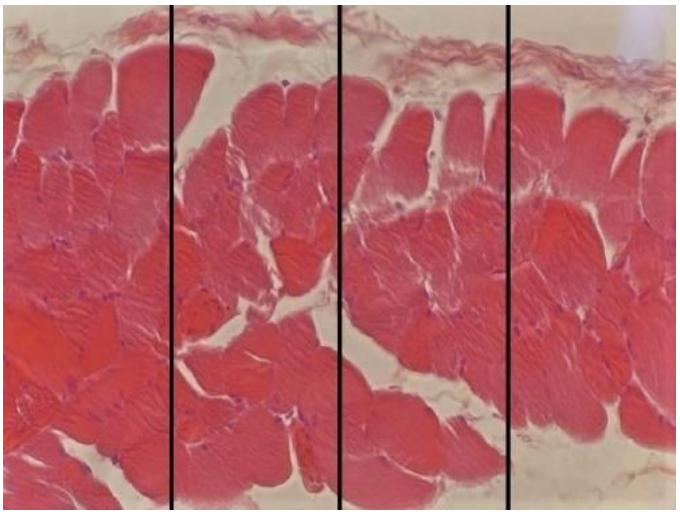
• Desparafinização: as lâminas já identificadas foram acondicionadas em estufa na temperatura de 100 ºC por cinco minutos para a parafina remanescente fundir e não atrapalhar no momento da coloração.

• Coloração das lâminas: as lâminas foram alocadas em berços histológicos e mergulhados em três cubas contendo xilol (mesma concentração), onde permaneceram cinco minutos na primeira cuba e dez segundos nas outras duas. Após isso, as lâminas foram mergulhadas em cubas contendo concentrações decrescentes de álcool (álcool absoluto, 85º e 70º), permanecendo 10 segundos em cada, após isso, foram lavadas em água corrente por cinco minutos. O próximo passo foi submeter as lâminas a coloração HE (hematoxilina/eosina), permanecendo por um minuto e meio na hematoxilina, cinco minutos em lavagem com água corrente, três minutos na eosina e novamente lavagem em água corrente por cinco minutos. Por fim as lâminas passaram novamente pelo álcool, porém, de forma crescente (70 ºC, 85 ºC e álcool absoluto, respectivamente) e por duas cubas de xilol (mesma concentração); em cada cuba permaneceu por 1 minuto. Por último, estavam prontas para a fixação com Entellan (Merck®) e lamínulas, onde demoram cerca de 24 horas para secarem e depois foram armazenadas em estojo de lâminas.

Após a confecção das lâminas, a leitura em microscópio óptico foi feita da seguinte forma: as fotos foram tiradas utilizando-se a lente de aumento de 40X, sendo padronizadas em tamanho por quantidade de pixel (800 x 600), então, foram traçadas três linhas em distâncias iguais para orientar o leitor quais células deveriam ser contatadas. As divisões foram feitas da

seguinte forma (Figura 6) e a contagem das células foi feita em três regiões distintas e não adjacentes (FERRAZ *et al.*, 2014).

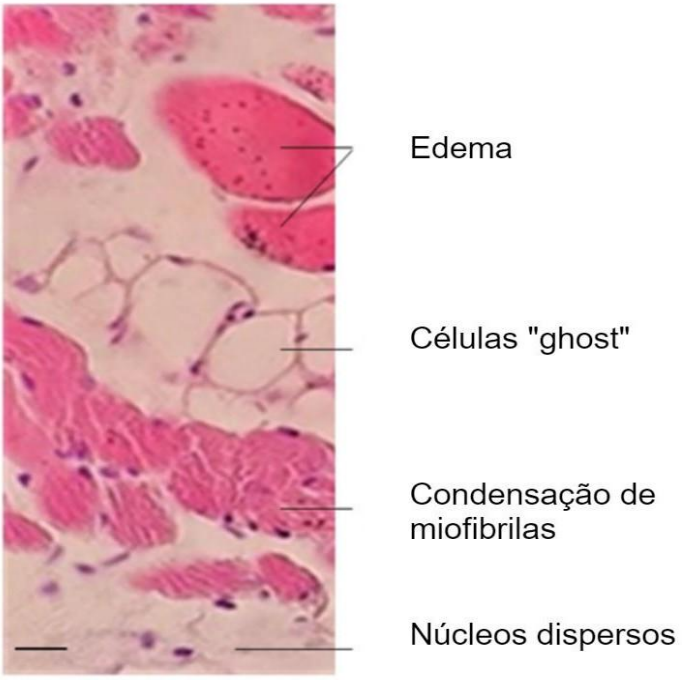
Figura 6 - Procedimento utilizado para a contagem das células.



Fonte: Elaboração própria.

É possível observar a partir da imagem, a padronização utilizada para contar as células, por 3 leitores. Um exemplo é dado nas áreas demarcadas pelas três linhas pretas, contando o número de células totais e classificando-as em células normais, *ghost*, edema, células delta, células com miofibrila condensada (Figura 7).

Figura 7 - *Score* utilizado para a contagem do dano celular.



Fonte: RAVAZOLI, I. **Relatório Fapesp IC 2020/08913-9.** Acervo do LaPeNM/Uniso, Sorocaba, 2020.

Foram contabilizados os registros de leitura em forma de planilha Excel para posteriormente serem calculados os danos celulares, incluindo total de células, células normais *ghost*, edema, lesão delta, necrose e condensação de miofibrila. Terminando esse procedimento foi feita a comparação entre as leituras executadas por três leitores diferentes, sendo assim calculada a média geral das lesões utilizando o programa de estatística Origin. Após análise quantitativa do material histológico, o melhor corte da lâmina representativo da análise quantitativa foi selecionado e a documentação dos resultados obtidos processada através do fotomicroscópio Zeiss AXIOSTAR Plus. As fotos foram retiradas em um aumento de 400x (objetiva de 40x, onde uma barra de 1 cm=50 μm) com a câmera do celular (Modelo: Iphone 12 – MGHN3J/A 12 megapixels).

3.8 Dosagem sérica de Sódio e Potássio

Para a dosagem sérica do sódio e potássio optou-se pelo método de automação. O equipamento utilizado foi o bioquímico automatizado (Figura 8), no qual os resultados são expressos pelo equipamento em mmol/L, utilizando-se os reagentes da Roche (Sodium Electrode Conditioner, Reagent SnapPak, ISE-trol Quality Control Kit e outros necessários para o funcionamento do equipamento) de acordo com as especificações do fabricante. A metodologia do AVL 9180 Analyzer é baseada no princípio de medição de eletrodo seletivo de íons (ISE) para determinar com precisão os valores de medição. Cada eletrodo possui uma membrana seletiva de íons que sofre uma reação específica com os íons correspondentes contidos na amostra que está sendo analisada. A membrana é um trocador de íons, reagindo à carga elétrica do íon causando uma mudança no potencial de membrana, ou voltagem de medição, que é construída no filme entre a amostra e a membrana. Uma cadeia de medição galvânica dentro do eletrodo determina a diferença entre os dois valores de potencial em ambos os lados da membrana. A corrente galvânica é fechada através da amostra de um lado pelo eletrodo de referência, eletrólito de referência e o "terminal aberto". A membrana, o eletrólito interno e o eletrodo interno fecham o outro lado. Uma diferença nas concentrações de íons entre o eletrólito interno e a amostra causa a formação de um potencial eletroquímico através da membrana do eletrodo ativo. O potencial é conduzido por um eletrodo interno altamente condutor para um amplificador. O eletrodo de referência é conectado à terra, bem como ao amplificador. A concentração de íons na amostra é então determinada usando uma curva de calibração determinada por pontos medidos de soluções padrão com concentrações de íons precisamente conhecidas. Manual do fabricante está disponível em:

https://archive.org/details/manual_Roche_9180_Electrolyte_Analyzer_User_Manual/page/n7/mode/2up. (ELECTROLYTE [...], 1996).

Após a determinação da concentração presente na amostra, por automação, foram utilizados os seguintes valores de referências via fabricante: 1,5 - 15 mmol/L para potássio e 40 - 205 mmol/L para sódio.

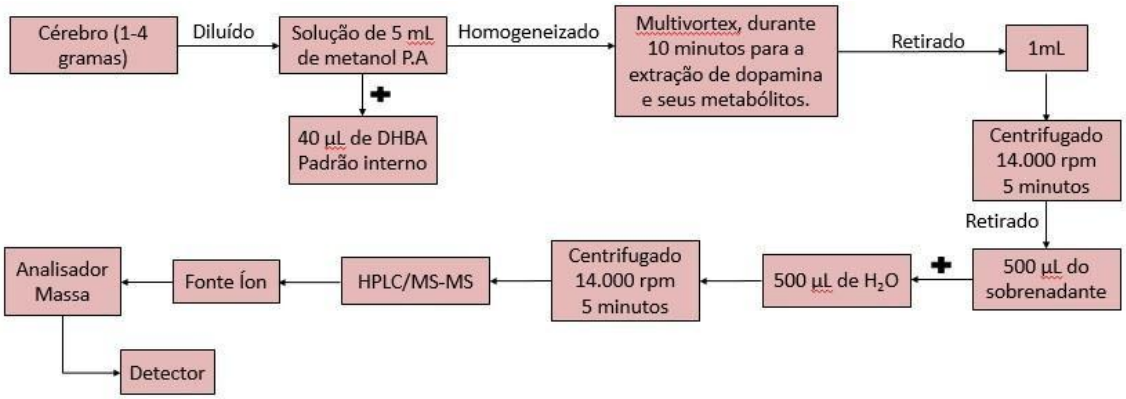
Figura 8 - Equipamento (9180 Electrolyte Analyzer (Roche)) utilizado para dosagem bioquímica de sódio e potássio por automação.

Fonte: Elaboração própria.

3.9 Dosagem da Dopamina – por HPLC/MS-MS

Esta análise foi realizada no Innovatox Análises e Pesquisas (Sorocaba, SP, Brasil). Os padrões, na concentração de 1 mg/mL de dopamina e de seus metabólitos 3,4-*dihydroxyphenylacetic* (DOPAC) e *Homovanillic acid* (HVA) foram diluídos em metanol distribuídos em tubos de polipropileno do tipo falcon de 15 mL, em seguida foram congelados em freezer a -80ºC. Antes de iniciar as corridas analíticas, os padrões diluídos em metanol foram infundidos no espectrômetro de massas, intercaladamente, para obtenção do pico cromatográfico de cada substância injetada no equipamento, e montagem da curva padrão (Figura 9).

Figura 9 - Fluxograma de preparação das amostras preparadas para análise.

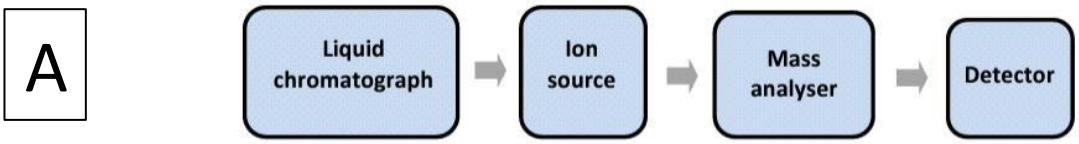


Fonte: Elaboração própria.

Para que as análises fossem realizadas, foi feito o preparo das amostras, no qual as estruturas cerebrais (córtex frontal, hipotálamo e estriado), pesando entre 1-4 gramas, foram diluídas em 5 mL de metanol (P.A., Supelco Merck, Lote: I1224707226, Val: 31/05/2025). Para cada 5 mL de metanol foram adicionados 40 µL de 3,4-di-hidroxibenzilamina (DHBA, Sigma Chemical). O DHBA foi utilizado como padrão interno por ter as mesmas características fisico-químicas da monoamina que foi dosada, para monitoramento do processo. Após este procedimento, o material (refrigerado com gelo seco) foi homogeneizado por um multivortex (VWR, modelo VX-2500), durante 10 minutos para a extração de dopamina e seus metabólitos. Retirado 1 mL do material extraído e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos, para precipitação de proteínas e ácidos nucléicos, que podem interferir nas análises. Foi retirado 500 µL do sobrenadante e adicionado 500 µL de H_2O acondicionados em tubos tipo *eppendorf*. Posteriormente levado a centrifuga por mais 5 minutos a 14.000 rpm.

A dopamina (DA, Sigma Chemical) e seus metabólitos ácido homovanílico (HVA, Sigma Chemical) e ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC, Sigma Chemical) foram dosados por Cromatografia Liquida (HPLC/MS-MS Triplo quadropolo, marca Waters, modelo TQS Micro) com espectrômetro de massas (Figura 10).

Figura 10 - A) Diagrama de um HPLC/MS-MS. B) Triplo quadropolo (QqQ) espectrômetro de massas.

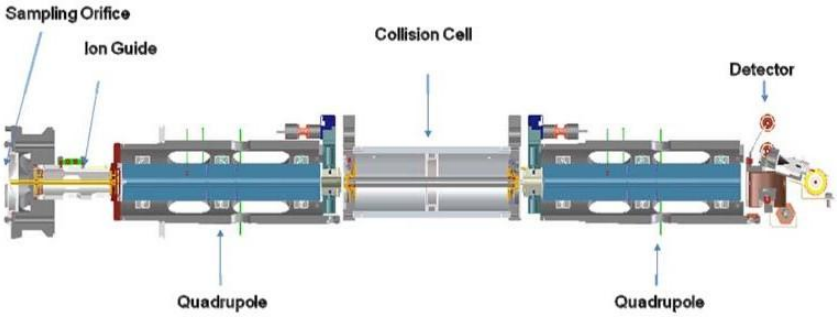


Onde:

Ion source: usado na vaporização/ionização das moléculas alvo.

Mass analyser: usado para separar os íons da fase gasosa pela razão massa-carga (m/z). Detector: detecção dos íons separados em massa e medição de sua abundância relativa.

B



Fonte: SARGENT, M. (Ed.), Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements. **RSC Analytical Methods Committee**, 2013. ISBN 978-0-948926-27-3.

As condições de trabalho foram: temperatura de 40 ºC; tempo de retenção: até 2,0 minutos, sendo que cada amostra deve correr até 5,5 minutos e, o limite de detecção foi de 0,2 µg/mL e de quantificação de 0,5 µg/mL para DA, DOPAC e HVA.

Para a cromatografia líquida em fase reversa, utilizou-se coluna analítica Acquity BEH C18 com 100 mm x 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters Technology, Brasil). A fase móvel foi composta por solução água ultrapura com 0,1% ácido fórmico (Supelco Merck; Lote: K54212164212, Val: 31/01/2024) Fase móvel A, e Acetonitrila (J.T.Baker, Lote: 615W61, Val: 16/02/2027) com 0,1% ácido fórmico (Supelco Merck; Lote: K54212164212, Val: 31/01/2024), Fase Móvel B.

A Tabela 5 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 5 - Programa de gradiente empregado na separação cromatográfica para a DA e seus metabólitos.

Tempo (min)	Fase móvel B (%)	Vazão (mL/min)
0	1	0,4
2,5	50	0,4
3,5-4,5	90	0,4
4,51	1	0,4
5,5	1	0,4

Fonte: Elaboração própria.

Os analitos foram ionizados no modo positivo e negativo, dependendo do analito. A fonte de ionização foi mantida conforme os seguintes parâmetros: voltagem do capilar nebulizador foi ajustada a 1,0 kV (quilovolts), com temperatura da fonte de íons a 150 °C. A temperatura de dessolvatação foi ajustada a 550 °C, com fluxo de gás de dessolvatação (N_2) de 900 L/h. O gás de colisão empregado foi o argônio à vazão de 0,17 mL/min, com pressão

constante de 388 Pa (pascal). A otimização do potencial do cone do espectrômetro de massas, a seleção dos íons precursores e íons produtos, bem como as respectivas energias de colisão para cada transição "íon precursor → íon produto" foram realizadas por meio da infusão direta no espectrômetro de massas de uma solução padrão a 1 mg/L preparada individualmente para cada analito.

A Tabela 6 mostra as transições dos íons precursores, e as transições dos íons fragmentos, o modo de ionização e a energia de colisão para cada transição "íon precursor → íon produto".

Tabela 6 - Modo de ionização, voltagem do cone, transições e suas respectivas energias de colisão empregadas para cada analito de interesse.

Substância	Ionização	Cone (v)	Íon Precursor (m/z)	Íon Fragmento (m/z)	Energia de Colisão
Dopamina	ESI +	30	154,0	91,0	22
DOPAC	ESI -	10	187,0	123,0	10
HVA	ESI -	20	181,0	122,0	15
DHBA - PI	ESI +	40	123,0	50,8	22

Fonte: Elaboração própria.

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média ± Erro Padrão da Média (EPM e estatisticamente analisados usando Anova *One way*, seguido de teste de *Tukey*. O nível de significância foi de 5% para todos os experimentos ($p<0,05$), analisado através do software estatístico Origin 9.5.

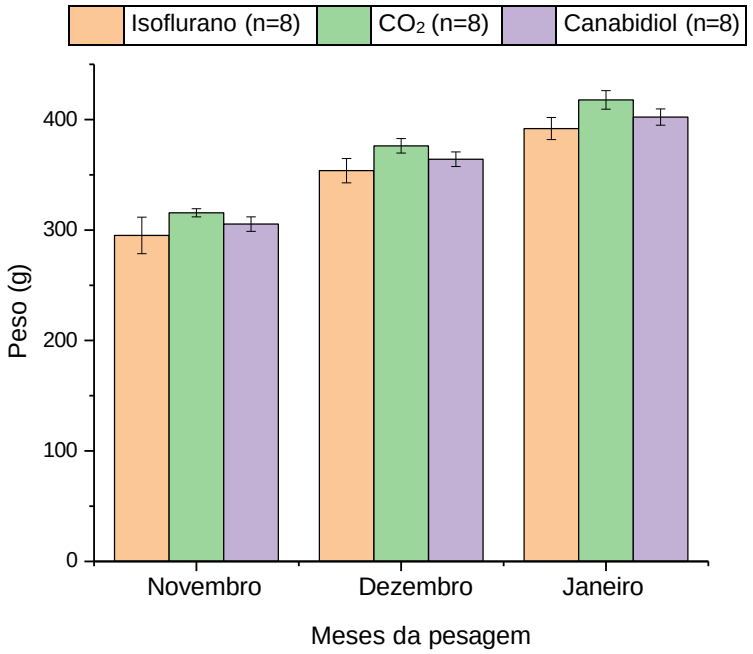
4 RESULTADOS

4.1 Pesagem

Os ratos usados no estudo foram tratados com CBD (grupo teste) e água (2 grupos controles), sendo feito ainda o abastecimento da ração e água diariamente. Os animais foram pesados mensalmente (Figura 11) para análise de possíveis efeitos toxicológicos quanto a alterações de peso, pretendendo avaliar a influência do canabidiol sobre o apetite do mamífero tratado com CBD quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento farmacológico.

Os oito animais do grupo CBD aumentaram o peso durante os três meses em que a pesagem foi realizada, de forma proporcional crescente em relação aos demais grupos controle (isoflurano e CO_2). Esses parâmetros foram compatíveis com o estado de crescimento normal dos ratos. Durante os três momentos de avaliação do grupo CBD, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas aos grupos controle.

Figura 11 - Peso médio dos animais ao longo do estudo crônico (90 dias).



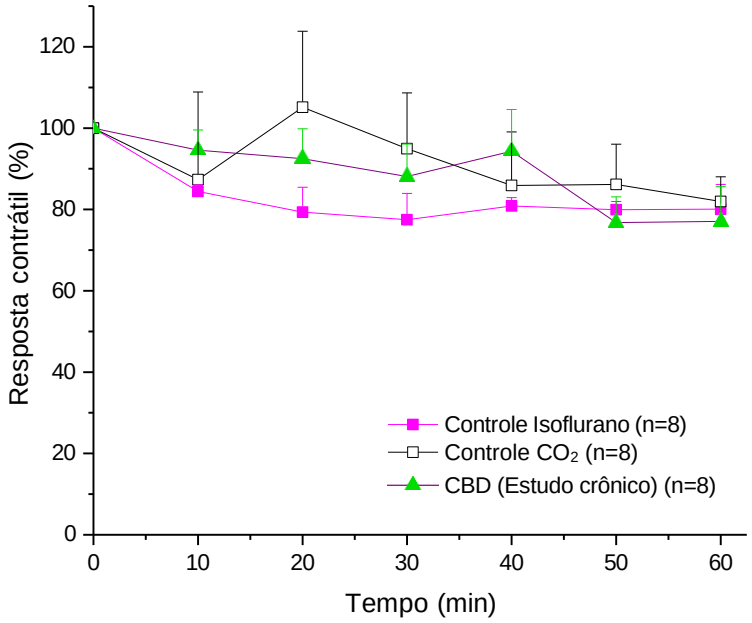
Legenda: Variação mensal do peso corporal. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados (p>0,05).
Fonte: Elaboração própria.

4.2 *Performance* neuromotora

O desempenho neuromotor foi avaliado no dia em que os animais foram sacrificados, foi conduzido em preparações isoladas nervo frênico-diafragma, um modelo funcional *ex vivo*,

que permite acompanhar a fisiologia da contração muscular em tempo real. A Figura 12 ilustra a *performance* neuromotora dos três grupos. Comparando o grupo teste (CBD) com os grupos controle (isoflurano e CO_2) pode-se observar que não houve diferença significativa na resposta contrátil pela técnica miográfica entre os grupos estudados.

Figura 12 - Performance neuromotora, grupos controles (CO2 e isoflurano) e experimental.



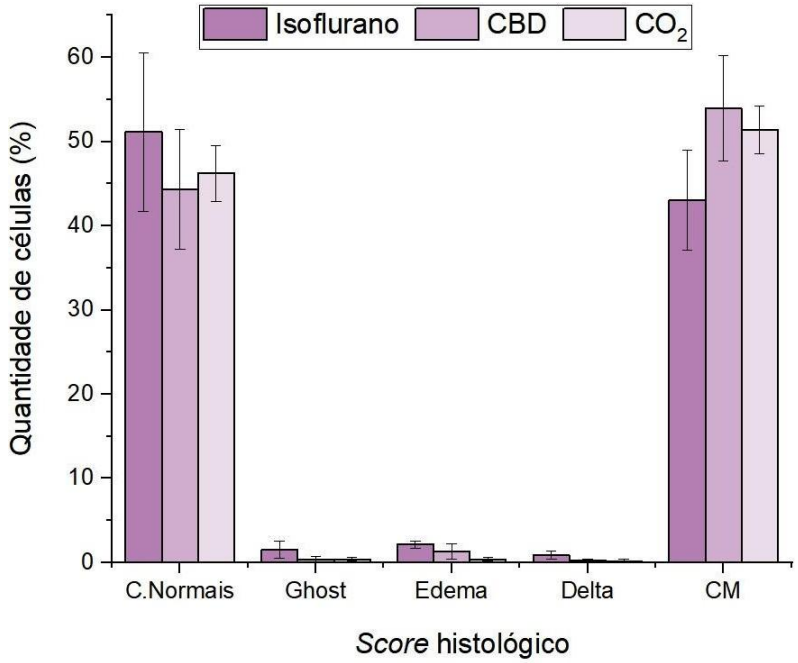
Legenda. **Resposta contrátil da preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto**. Observa-se que a resposta contrátil do grupo CBD corresponde aos obtidos pelos grupos controle. O CBD quando administrado cronicamente não influencia a *performance* neuromotora, bem como o tipo de anestésico (isoflurano ou CO_2) utilizado na eutanásia dos animais.
Fonte: Elaboração própria.

4.3 Análise histológica

A morfologia da célula muscular esquelética foi observada e quantificada em músculos diafragma, resultantes dos experimentos da *performance* neuromotora. Embora a condensação de miofibrilas tenha sido elevada, ela foi encontrada em todos os grupos, o que não se pode descartar a ocorrência de algum tipo de artefato experimental, que pode até mesmo ser consequência da estimulação elétrica e contração muscular durante 60 minutos, tempo do experimento.

A Figura 13 ilustra a análise histológica quantitativa conforme *score* adotado neste estudo.

Figura 13 - Quantificação de células (em %).



Legenda. Músculos diafragma de ratos. Não houve diferença significativa entre preparações neuromusculares dos grupos controle (isoflurano e CO_2) e grupo teste (CBD). Foi aplicado o seguinte o *score*: C. Normais, células normais. *Ghost*, células opticamente vazias, sem citoplasma e com núcleos dispersos. Edema, células com volume aumentado. Delta, um tipo de lesão que mostra uma inflexão na membrana da célula, indicativo de dano. CM, condensação de miofibrilas.

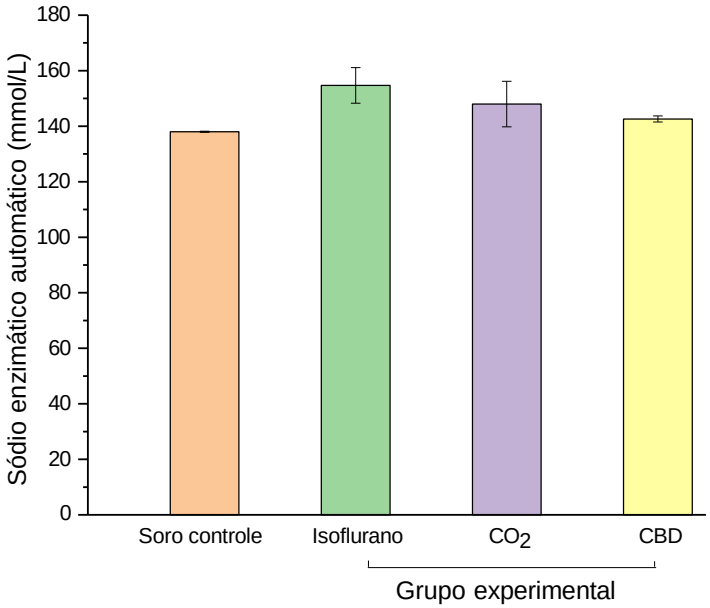
Fonte: Elaboração própria.

4.4 Dosagem sérica de sódio e potássio

Com a finalidade de avaliar a influência do tipo de anestésico utilizado no momento da eutanásia, sobre a *performance* neuromotora, escolheu-se como biomarcadores os eletrólitos sódio e potássio.

A Figura 14 ilustra os resultados obtidos da dosagem sérica de sódio por automação.

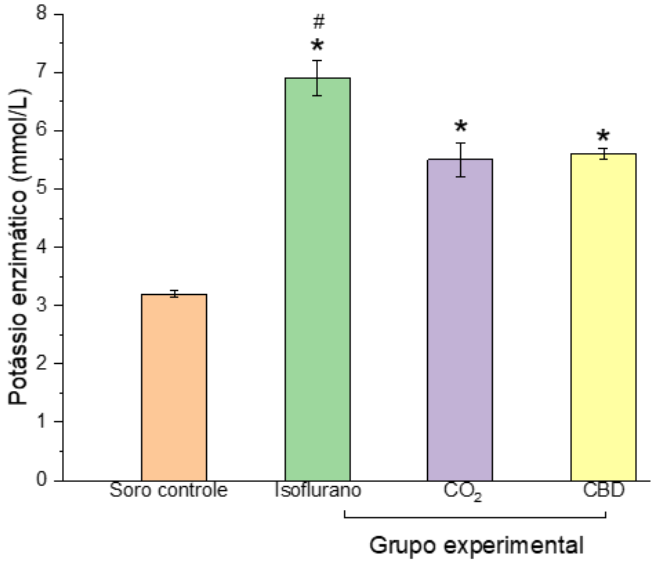
Figura 14 - Quantificação sérica de sódio por automação.



Legenda. **Dosagem sérica de sódio por automação**. Os valores de sódio obtidos em grupos tratados cronicamente (controles isoflurano e CO_2 e grupo CBD) não apresentaram diferença significativa com o soro controle.
Fonte: Elaboração própria.

A Figura 15 ilustra os resultados obtidos da dosagem sérica de potássio por automação de todos os grupos tratados cronicamente, comparativamente ao soro controle.

Figura 15 - Quantificação sérica de potássio por automação.

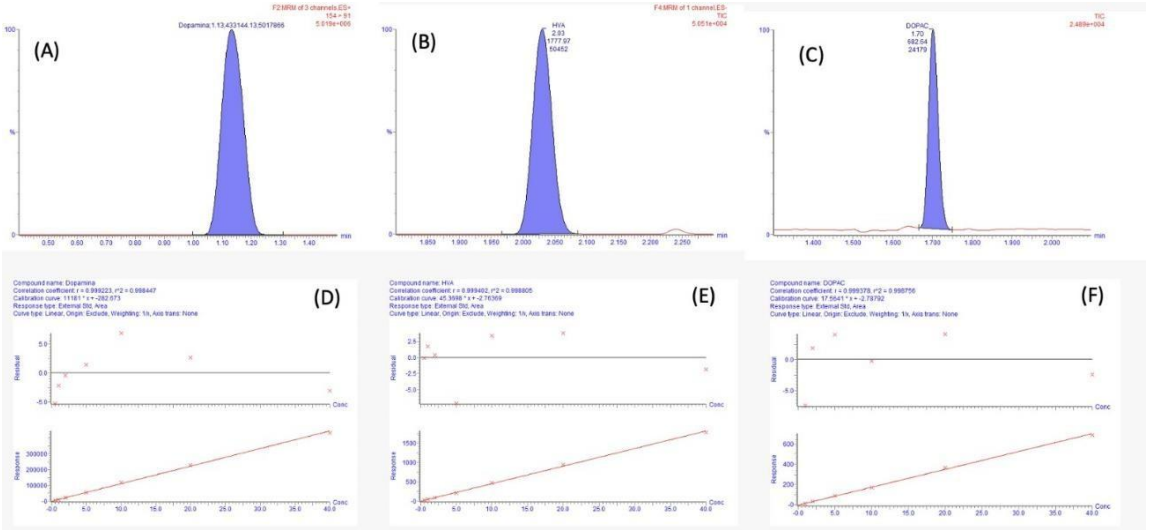


Legenda. **Dosagem sérica de potássio por automação**. Os valores de potássio obtidos nos grupos tratados cronicamente (controles isoflurano e CO_2 e grupo CBD) apresentaram diferença significativa com o soro controle (*, $p<0,05$). O grupo eutanasiado com isoflurano foi significativamente diferente dos grupos eutanasiados com CO_2.
Fonte: Elaboração própria.

4.5 Dosagem da Dopamina – por HPLC/MS-MS

Os padrões foram diluídos e injetados para identificação das moléculas de dopamina e seus metabólitos, e para obtenção da curva padrão. A Figura 16 ilustra os picos da dopamina e seus metabólitos (A-C), bem como a curva de calibração realizada (D-E).

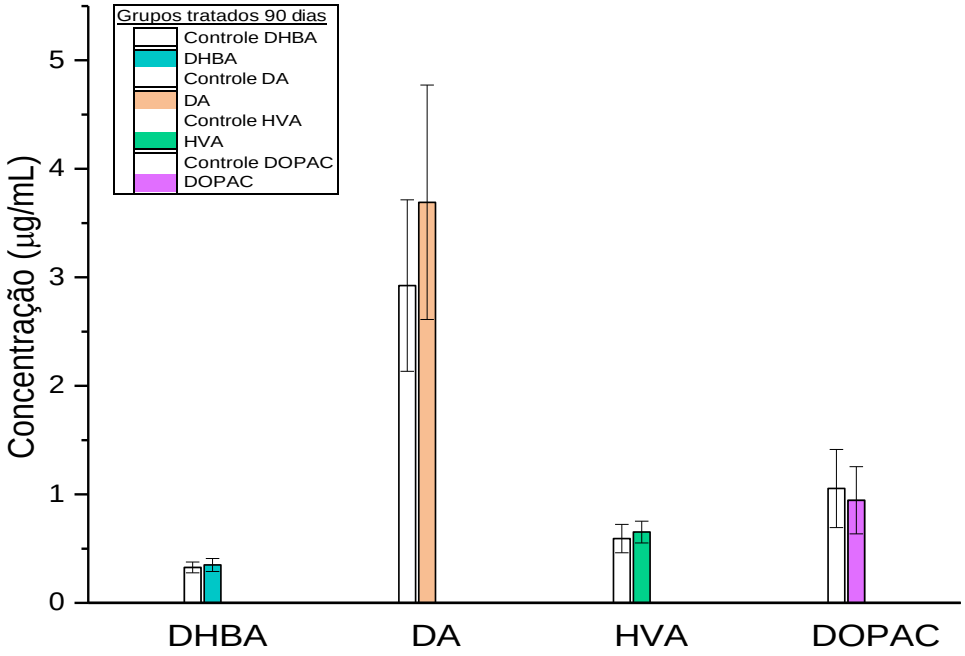
Figura 16 - Picos e curva de calibração da dopamina e seus metabólitos obtidos por HPLC/MS-MS.



Legenda. (A) dopamina, ESI positivo, transição monitorada MRM 154 > 91; (B) HVA, ESI negativo, transição monitorada MRM 181 > 122; (C) DOPAC, ESI negativo, transição monitorada MRM 167 > 123. (D) curva de calibração dopamina; (E) curva de calibração HVA; (F) curva de calibração DOPAC.
Fonte: Elaboração própria.

Após a obtenção da curva de calibração foram determinadas as concentrações de dopamina (grupo controle: 2,9 ± 0,7; CBD: 3,6 ± 1,0) e seus metabólitos (HVA: 0,59 ± 0,1; 0,65± 0,1; DOPAC: 1,0 ± 0,3; 0,95 ± 0,3, para os grupos controle e CBD, respectivamente), presentes nas amostras de cérebro de rato (Figura 17). As recuperações em amostras reais foram de 86,2% para dopamina, 106,1% para HVA e 89,5% para DOPAC.

Figura 17 - Concentração de dopamina e seus metabólitos presentes nas amostras de cérebro de ratos tratados com CBD e ratos tratados com água (grupo controle).



Legenda. DA, dopamina. HVA, ácido homovanílico, DOPAC, ácido dihidroxifenilacético. DHBA, 3,4-dihidroxibenzilamina.
Fonte: Elaboração própria.

Não houve diferença significativa na quantidade de dopamina e seus metabólitos em cérebros de ratos tratados com CBD e água, quando dosados por HPLC/MS-MS.

5 DISCUSSÃO

Muito se sabe sobre o uso crônico e abusivo da planta *Cannabis sativa* decorrente dos efeitos do Δ^9-THC, a substância psicoativa da planta. Ao CBD não se atribui o mesmo efeito, entretanto, os medicamentos liberados pela ANVISA poderão ter o percentual de até 0,2% (ANVISA, 2019). O efeito deste percentual residual nas apresentações comerciais administrado cronicamente é desconhecido.

Houve uma explosão de estudos publicados com o CBD que podem ser encontrados na literatura, em face da recente liberação de uso medicinal de alguns constituintes da planta por algumas agências regulatórias de alguns países, entre eles, o Brasil. Então, toda a discussão foi direcionada pelas dúvidas que originaram este projeto e que de forma ao nosso alcance procuramos responder.

A primeira questão que foi considerada neste trabalho foi a concentração de CBD que seria utilizada, na administração crônica. Com base em dados da literatura (MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2006; ELBATSH *et al.*, 2012) foi selecionada a concentração de 10 mg/kg, tendo em vista que concentrações acima de 20 mg/kg não comprovaram aumento da eficácia do composto, principalmente o efeito ansiolítico (CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010). Contudo, Elbatsh *et al.* (2012) administraram CBD intraperitonealmente enquanto em nosso estudo, a opção foi a via gavagem, para simular a forma como o CBD é utilizado.

É sabido que o uso crônico e abusivo da maconha leva à “larica” e uma das explicações se dá pela via do receptor endocanabinoide CB1, um mediador primário para a captura de energia, armazenamento e conservação, por vários mecanismos. Sua estimulação modula as vias gustativas e olfativas para aumentar a palatabilidade dos alimentos. Também estimula os centros de apetite do cérebro, promovendo hiperfagia e contribuindo para o acúmulo de gordura no tecido adiposo (CAVALHEIRO *et al.*, 2022; WILEY *et al.*, 2005). Por outro lado, diminuição de peso em ratos foi observado pela estimulação de receptores CB2 (IGNATOWSKA-JANKOWSKA; JANKOWSKI; SWIERGIEL, 2011) e através do uso de antagonistas de endocanabinoides (RIEDEL *et al.*, 2009). Em nosso estudo, a administração crônica de CBD, em ratos, não alterou o ganho de peso em relação aos grupos controles que só receberam água. A importância desse resultado do ponto de vista translacional, é que as pessoas sob tratamento com CBD com rígido controle de qualidade de obtenção, não seriam afetados com ganho de peso, guardando as devidas proporções na comparação rato e ser humano.

Sabe-se, também, que o uso crônico e recreativo da planta *Cannabis sativa* leva a um quadro de psicose (SCHIFANI *et al.*, 2019) que, por sua vez, está relacionado ao aumento de

liberação de dopamina (DA). Questionou-se se os efeitos do CBD aumentariam a liberação nigroestriatal da DA, como acontece nos níveis de DA no sistema de recompensa (OLESON; CHEER, 2012), ou se esse aumento seria decorrente do Δ^9-THC, a substância psicoativa da planta. Neste estudo demonstrou-se que o CBD não teve influência sobre a DA e seus metabólitos em cérebros de ratos nos grupos controle e teste. Translacionalmente, a importância desse resultado é que o CBD não atuou sobre o neurotransmissor relacionado ao mecanismo de recompensa do cérebro, logo, sob este aspecto não causaria dependência química.

A relação da DA com os receptores do tipo CB1 (OLESON; CHEER, 2012) em nível central vem sendo muito estudada, com o intuito de novas descobertas sobre o seu mecanismo de sinalização e evidências capazes de modular a dopamina nigroestriatal (BENARROCH, 2007), principalmente na Doença de Parkinson, no qual os níveis de DA no sistema nervoso central são progressivamente esgotados (HADDAD *et al.*, 2017).

Como a DP é uma doença que também apresenta sintomas não-motores, dentre eles a disfunção autonômica (RODRÍGUEZ-VIOLANTE *et al.*, 2017) buscou-se verificar se o CBD teria alguma influência negativa sobre o desempenho neuromotor. Também é sabido que a neuromodulação dos movimentos finos decorre da interação DA e ACh (RIZZI; TAN, 2017). Além disso, receptores CB1 também se localizam na junção neuromuscular em músculos estriados periféricos e músculo intestinal liso pré juncional (IZZO *et al.*, 1998; IZZO; SHARKEY, 2010), sendo de real interesse verificar o impacto do efeito sobre o sistema neuromotor como consequência do uso crônico, ainda não relatado. Os resultados aqui obtidos de desempenho neuromotor de preparações nervo frênico-diafragma de ratos dos 3 grupos, resultantes de estudo crônico, não mostraram diferença entre o grupo experimental e os controles, analisados pelo parâmetro da técnica miográfica.

Pelo parâmetro da eletrofisiologia, entretanto, os resultados do CBD diretamente adicionado em preparações isoladas ainda é controverso, pois foi constatado o aumento da amplitude de potenciais de placa terminal em um estudo na (MORSCH *et al.*, 2018) e sua diminuição em outro (SANCHEZ-PASTOR *et al.*, 2007), sem uma real compreensão desses resultados, que permanecem para serem esclarecidos. A adição direta de CBD em preparações isoladas já foi bem estudada e sabe-se que age sobre canais de Na^+, K^+ e Ca^{2+}. Os canais voltagem-dependentes de Na^+ e K^+ atuam na condução axonal do impulso nervoso, enquanto o canal de Ca^{2+} é essencial no processo de exocitose, no terminal nervoso. Nessas condições experimentais, o CBD prolongou a repolarização (em concentração superior a 5 μM) devido os vários efeitos que possui sobre o canal de potássio (TOPAL, L. *et al.*, 2021). Em estudo feito com modelo em cardiomiócitos ventriculares de coelhos, o CBD produziu efeitos antagônicos

sobre esses canais (ISAEV *et al.*, 2022). Em outro estudo realizado por Layman e Milton (1971) foi possível observar um resultado mais aproximado ao modelo experimental utilizado no presente estudo, onde foi possível observar que não há efeito de THC e CBD (concentrações acima de 1,59 x 10-5M), em preparações nervo frênico diafragma de ratos. Esses estudos com o CBD diretamente adicionados em preparações isoladas têm importância nas interações com receptores presentes para compreender os mecanismos envolvidos.

Neste estudo de desempenho neuromotor, após administração crônica de CBD, outro fator que poderia influenciar nos resultados seria o tipo de anestésico utilizado para a eutanásia dos animais. Isoflurano tem sido o anestésico utilizado para o isolamento da preparação, contudo, quando se deseja coletar tecido cerebral a sugestão é o CO_2 (KARMARCAR; BOTTUM; TISCHKAU, 2010; TRIBUIANI, 2021). Assim, a dosagem de eletrólitos Na^+ e K^+ séricos foi utilizada para esta finalidade.

A dosagem de sódio permite verificar a relação entre o sódio e o potássio decorrente do tipo de anestésico inalatório utilizado para eutanásia, visto que na presença de ácidos circulantes como o ácido carbônico (H_2CO_3), que é gerado pelo aumento da pressão e concentração de CO_2, mecanismos celulares dependentes de proteínas transportadoras, como a sódio-potássio-adenosina trifosfatase (Na^+K^+ATPase), são inibidos, o que leva a uma cascata de regulações eletrolíticas (WEINBERG *et al*., 2019). A inibição do trocador de íons de sódio e hidrogênio eleva a concentração de H^+ no meio intracelular que, por sua vez, inibe a ação da Na^+K^+ATPase. A ausência de HCO_3 no meio extracelular causa uma falha no influxo de sódio via Na^+HCO_3, o que também gera a inibição da Na^+K^+ATPase. Com a inibição da Na^+K^+ATPase, a entrada de cloreto via $ClHCO_3$ fica reduzida devido à queda de HCO_3 extracelular, levando então o efluxo de K^+ via co-transportador K^+Cl^- (WEINBERG *et al.*, 2019). Contudo, neste estudo não se verificou alteração nos parâmetros de sódio entre os grupos.

O acompanhamento dos valores de potássio sérico nos animais eutanasiados é importante para estabelecer uma relação com a hipercalemia, visto que, estudos mostram que elevadas concentrações de CO_2 podem levar ao coma, apneia, hipercalemia e parada cardíaca (PERMENTIER *et al.*, 2017; LANGFORD, 2005). Os resultados aqui obtidos mostram a presença da hipercalemia tanto em ratos eutanasiados com CO_2 quanto em ratos eutanasiados com isoflurano. Vale ressaltar ainda, que o grupo isoflurano apresentou valores maiores quando comparado ao soro controle e ao grupo CO_2. Isto mostra que apesar da presença de hipercalemia em ambos, os valores encontrados no grupo CO_2 continua sendo a mais segura e melhor escolha para eutanásia dos animais, principalmente nas condições indicadas de coleta de tecido cerebral, como realizado neste estudo. As alterações agudas de potássio demonstram sinais e sintomas

severos podendo apresentar lesões celulares, disfunções renais ou distúrbios ácido-base (SIMON *et al.*, 2021). É necessário levar em consideração que, a hemólise *in vitro* interfere na avaliação precisa da concentração sérica de potássio devido à liberação do conteúdo intracelular, sendo considerado o artefato pré-analítico mais comum que afeta laboratórios clínicos e é responsável por até 70% das amostras inadequadas (DITORO; CONRAD; JAROLIM, 2022).

Neste trabalho foram realizados estudos morfológicos complementares ao desempenho neuromotor, que mostraram nenhum prejuízo no grupo CBD em relação ao grupo controle, o que mostra segurança do CBD sob este parâmetro. Os efeitos de CBD sobre o músculo esquelético parecem ocorrer por meio de mecanismos moleculares (SCHOUTEN; DALLE; KOPPO, 2022) e não por ação direta sobre a célula muscular.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo mostraram que a administração crônica de CBD na concentração eleita não interferiu nos níveis de dopamina e não causou dano às células musculares esqueléticas. O nível de hipercalemia produzido pelos anestésicos para a eutanásia não interferiu no desempenho neuromotor. O uso de CO2 como anestésico para coletar amostras de tecido cerebral é vantajosa sobre o isoflurano pelo parâmetro da hipercalemia produzida.

REFERÊNCIAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cannabis: Dicol delibera sobre plantio e registro.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/. Acesso em: 29 dez 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa aprova novo produto medicinal à base de Cannabis.** Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-novo-produto-medicinal-a-base-de-cannabis-1. Acesso em: 27 maio 2023.

ARZIMANOGLOU, A. *et al.* Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. **Epileptic Disord**, University of Zurich, v. 22, n. 1, p.1-14, 2020.

BATALLA, A. *et al.* The Impact of Cannabidiol on Human Brain Function: A Systematic Review. **Frontiers Pharmacology**, Netherlands, v. 11, n. 6, p. 181-184, 2021. Doi: 10.3389/fphar.2020.618184. PMID: 33551817. PMCID: PMC7858248.

BENARROCH, E. Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. **Neurology**, EUA, v. 69, n. 3, p. 306-309, 2007.

BERNHEIMER, H. *et al.* Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. **Journal of the Neurological Sciences**, Filadélfia, v. 20, n. 4, p. 415-455, 1973.

BOIVIN, G. P. *et al.* Review of co_2 as a euthanasia agent for laboratory rats and mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 56, n. 5, p. 491-499, 2017.

BORTOLANZA, M. et al. Tetracycline repurposing in neurodegeneration: focus on Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission,** Califórnia, v. 125, n. 10, p. 1403-1415, 2018.

BROTCHIE, J. M. CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. **Current Opinion in Pharmacology,** Toronto, v. 3, n. 1, p. 54-61, 2003.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat (Reprinted from **British Journal of Pharmacology,** v. 1, p. 38-61, 1946), **British Journal of Pharmacology,** Londres, v. 120, p. 3-26, 1997 (reprinted).

BURCHELL, S. R. et al. Isoflurane provides neuroprotection in neonatal hypoxic ischemic brain injury. **The Journal of Investigative Medicine,** Califórnia, v. 61, n. 7, p. 1078-1083, 2013.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,** Minas Gerais; São Paulo, v. 367, n. 1607, p. 3364-3378, 2012.

CARRANZA, R. R. Los productos de Cannabis sativa: situación actual y perspectivas en medicina. **Salud Mental,** Cidade do México, v. 35, n. 3, p. 247-256, 2012.

CAVALHEIRO, E. K. F. F. *et al.* Cannabis sativa as a Treatment for Obesity: From Anti-Inflammatory Indirect Support to a Promising Metabolic Re-Establishment Target. **Cannabis Cannabinoid**, Tubarão, v. 7, n. 2, p. 135-151, 2022. Doi: 10.1089/can.2021.0016. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34242511; PMCID: PMC9070748.

CONCEA. **Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA**, p.1–54. 2018.

CRIPPA, J. A. S.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E. Uso terapêutico dos canabinoides em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Ribeirão Preto, v. 32, n. supl. 1, p. S56-S65, 2010.

DELONG, M. R.; WICHMANN, T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. **Archives of Neurology**, Atlanta, v. 64, n. 1, p. 20-24, 2007.

DEN BOON, F. S. *et al.* Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Amsterdã, v. 109, n. 9, p. 3534-3539, 2012.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nature reviews Drug discovery**, Nápoles, v. 7, n. 5, p. 438-455, 2008.

DI MARZO, V.; STELLA, N.; ZIMMER, A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. **Nature Reviews Neuroscience**, Nápoles, v. 16, n. 1, p. 30-42, 2015.

DITORO, D. F.; CONRAD, M. J.; JAROLIM, P. Hemolysis Index and Potassium Reporting. **American Journal of Clinical Pathology**, Boston, v. 157, n. 6, p. 809-813, 2022. Doi: 10.1093/ajcp/aqab217. PMID: 35038719

ELBATSH, M. M. *et al.* Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. **Psychopharmacology**, Nottingham, v. 221, n. 2, p. 239-247, 2012.

ELECTROLYTE analyzer operator's manual. **AVL Corporation**, Georgia, USA, 2nd edition, 1996. Disponível em: https://archive.org/details/manual_Roche_9180_Electrolyte_Analyzer_User_Manual/page/n7/mode/2up. Acesso em 19 dez 2022.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. **Guia de Eutanásia para animais de ensino e pesquisa.** Universidade Federal de São Paulo, Unifesp, 2019.

FERRAZ, M. *et al.* An isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is active against the in vitro neuromuscular paralysis of *Bothrops jararacussu* snake venom and bothropstoxin I, and prevents venom-induced myonecrosis. **Molecules**, Sorocaba, v. 19, n. 5, p. 5790-5805, 2014.

GAINZA, I. *et al.* Intoxicación por drogas. In: **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, Gobierno de Navarra. Departamento de Salud, p. 99-128, 2003.

GÁLL, Z. *et al.* Effects of Chronic Cannabidiol Treatment in the Rat Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression. **Biomolecules**, Târgu Mures, v. 10, n. 5, p. 801, 2020. Published 2020 May 22. Doi:10.3390/biom10050801.

GLOWINSKI, J.; IVERSEN, L. L. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I: the disposition of [3H] norepinephrine, [3H] dopamine and [3H] dopa in various regions of the brain. **Journal of Neurochemistry,** Maryland, v. 13, n. 8, p. 655-669, 1966.

GONG, J. P. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, Baltimore, v. 1071, n. 1, p. 10-23, 2006.

HADDAD, F. *et al.* Dopamine and Levodopa Prodrugs for the Treatment of Parkinson's Disease. **Molecules,** Jerusalem, v. 23, n. 1, p. 40, 2017. Doi: 10.3390/molecules23010040. PMID: 29295587; PMCID: PMC5943940.

HALL, W; WEIER, M. Assessing the Public Health Impacts of Legalizing Recreational Cannabis Use in the USA. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Brisbane; London, v. 97, n. 6, p. 607-615, 2015.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta Cannabis sativa. **Química nova**, São Carlos, v. 29, n. 2, p. 318-325, 2006.

HORNYKIEWICZ, O. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. **Parkinson's disease. Advances in Neurology,** Toronto, v. 45, p. 19-34, 1987.

HOWLETT, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological Reviews,** Durham, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.

IGNATOWSKA-JANKOWSKA, B.; JANKOWSKI, M. M.; SWIERGIEL, A. H. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: involvement of CB2 receptors. **Neurosci Lett,** Okinawa, v. 490, n. 1, p. 82-84, 2011. Doi: 10.1016/j.neulet.2010.12.031. Epub 2010 Dec 21. PMID: 21172406.

ISAEV, D. *et al.* Cannabidiol Inhibits Multiple Ion Channels in Rabbit Ventricular Cardiomyocytes. **Frontier Pharmacology**, Kiev, v. 13, 2022. doi: 10.3389/fphar.2022.821758. PMID: 35185573; PMCID: PMC8850628.

IVERSEN, L. Cannabis and the brain. **Brain,** Oxford, v. 126, n. 6, p. 1252–1270, 2003.

IZZO, A. A. *et al.* Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptors. **British journal of Pharmacology,** Nápoles, v. 124, n. 7, p. 1363-1368, 1998.

IZZO, A. A. *et al.* Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences,** Nápoles, v. 30, n. 10, p. 515-527, 2009.

IZZO, A. A.; SHARKEY, K. A. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. **Pharmacology & Therapeutics,** Nápoles, v. 126, n.1, p. 21-38, 2010.

KANO, M. *et al.* Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiological Reviews,** Tóquio, v. 89, n. 1, p. 309-380, 2009.

KARMARKAR, S. W.; BOTTUM, K. M.; TISCHKAU, S. A. Considerations for the use of anesthetics in neurotoxicity studies. **National Library of Medicine,** Springfield, v. 60, n. 4, p. 256-262, 2010.

KOPUSTINSKIENE, D. M. *et al.* Cannabis sativa L. Bioactive Compounds and Their Protective Role in Oxidative Stress and Inflammation. **Antioxidants (Basel),** Kaunas, v. 4, n. 11, p. 660, 2022. Doi: 10.3390/antiox11040660. PMID: 35453344; PMCID:PMC9030479.

KRAVITZ, A. V.; KREITZER, A. C. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. **Physiology,** Califórnia, v. 27, n. 3, p. 167-177, 2012.

KRAVITZ, A. V.; TYE, L. D.; KREITZER, A. C. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. **Nature Neuroscience,** São Francisco, v. 15, n. 6, p. 816-818, 2012.

LANGFORD, N. J. Carbon dioxide poisoning. **Toxicological Reviews,** Birmingham, v. 24, n. 4, p. 229-235, 2005.

LAYMAN, J. M.; MILTON, A. S. Some action of D1 - tetrahydrocannabinol and cannabinol at cholinergic junctions. **British Journal of Pharmacology,** London, v. 40, p. 553, 1971.

MACCARRONE, M. *et al.* Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacological Sciences,** Roma, v. 36, n. 5, p. 277-296, 2015.

MATIAS, I. *et al.* Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism,** Nápoles, v. 91, p. 3171–3180, 2006.

MATOS, R. L. A. *et al.* O uso do canabidiol no tratamento da epilepsia. **Revista Virtual de Química,** Brasília, v. 9, n.2, p. 786-814, 2017.

MORAIS, P. R. *et al.* Mental health and quality of life in a population of recreative cannabis users in Brazil. **Journal of Psychiatric Research,** São Paulo, v. 146, p. 11-20, 2022. Doi: 10.1016/j.jpsychires.2021.12.010. Epub 2021 Dec 15. PMID: 34936933.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry,** Ribeirão Preto, v. 30, n. 8, p. 1466-1471, 2006. ISSN 0278-5846, https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.06.004.

MORSCH, M. *et al.* Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission. **Scientific Reports,** Sydney, v. 8, Article 4685, 2018. Doi:10.1038/s41598-018-22888-4.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature,** Cambridge, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

OLESON, E. B.; CHEER, J. F. A brain on cannabinoids: the role of dopamine release in reward seeking. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,** Baltimore, v. 2, n. 8, p. a012229, 2012.

PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews,** Maryland, v. 58, n. 3, p. 389-462, 2006.

PERMENTIER, K. *et al.* Carbon dioxide poisoning: a literature review of an often-forgotten cause of intoxication in the emergency department. **The International Journal of Emergency Medicine,** Bélgica, v. 10, n. 14, 2017.

PERNONCINI, K. V.; OLIVEIRA, R.M.M.W. Usos terapêuticos potenciais do canabidiol obtido da Cannabis sativa. **Revista Uningá Review,** Maringá, v. 20, n. 3, p. 101-106, 2014.

PIEDRA, C. N. *et al.* La marihuana y el sistema endocanabinoide: De sus efectos recreativos a la terapéutica. **Revista Biomédica,** Puebla, v. 20, n. 2, p. 128-153, 2009. PMID: 35185573; PMCID: PMC8850628.

RAVAZOLI, I. Relatório Fapesp IC 2020/08913-9. Acervo do LaPeNM/Uniso, Sorocaba, 2020.

RIEDEL, G. *et al.* Synthetic and plant-derived cannabinoid receptor antagonists show hypophagic properties in fasted and non-fasted mice. **British Journal Pharmacology,** Aberdeen, v. 156, p. 1154–1166, 2009.

RIZZI, G.; TAN, K. R. Dopamine and acetylcholine, a circuit point of view in Parkinson's disease. **Frontiers in Neural Circuits,** Basel, v. 11, p. 110, 2017. Doi: 10.3389/fncir.2017.00110. eCollection 2017.

ROCK, E. M.; PARKER, L. A. Constituents of Cannabis sativa. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** Guelph, v. 13, n. 1, p. 1264, 2021.

RODRÍGUEZ-VIOLANTE, M. *et al.* Who can diagnose Parkinson's disease first? Role of pre-motor symptoms. **Archives of Medical Research,** Cidade do México, v. 48, n. 3, p. 221-227, 2017.

SANCHEZ-PASTOR, E. *et al.* Effects of cannabinoids on synaptic transmission in the frog neuromuscular junction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** Colima, v. 321, n. 2, p. 439-445, 2007.

SARGENT, M. (Ed.), Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements. **RSC Analytical Methods Committee**, Reino Unido, 2013. ISBN 978-0-948926-27-3.

SCHIFANI, C. *et al.* Stress-induced cortical dopamine response is altered in subjects at clinical high risk for psychosis using cannabis. **Addiction Biology,** Toronto, Aug 6:e12812, 2019. Doi: 10.1111/adb.12812.

SCHOUTEN, M.; DALLE, S.; KOPPO, K. Molecular Mechanisms Through Which Cannabidiol May Affect Skeletal Muscle Metabolism, Inflammation, Tissue Regeneration, and Anabolism: A Narrative Review. **Cannabis Cannabinoid,** Leuven, v. 7, n. 6, p. 745-757, 2022. Doi: 10.1089/can.2022.0220. Epub 2022 Nov 28. PMID: 36454174.

SIMON, L. V. *et al.* Hyperkalemia (Nursing). **StatPearls,** Flórida, [S.L], 2021.

SMITH, L. C.; TIEU, L.; SUHANDYNATA, R. T. Cannabidiol reduces withdrawal symptoms in nicotine-dependent rats. **Psychopharmacology (Berl),** Califórnia, v. 238, n. 8, p. 2201-2211, 2021. Doi:10.1007/s00213-021-05845-4.

SPINOSA, H. de S.; GERENUTTI, M.; BERNARDI, M. M. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistric evaluations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, São Paulo, v. 127, n. 3, p. 359-366, 2000.

STJ Superior Tribunal de Justiça. **Sexta Turma dá salvo-conduto para pacientes cultivarem Cannabis com fim medicinal.** Disponível em: https://www.stj.jus.br/sites/portalp/Paginas/Comunicacao/Noticias/14062022-Sexta-Turma-da-salvo-conduto-para-pacientes-cultivarem-Cannabis-com-fim-medicinal.aspx. 2022. Acesso em 27 maio 2023.

TAM, J. *et al.* Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. **Cell Metabolism,** Munich, v. 16, n. 2, p. 167-179, 2012. Doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.002. Epub 2012 Jul 26. PMID: 22841573; PMCID: PMC3832894.

TOPAL, L. *et al.* The electrophysiological effects of cannabidiol on action potentials and transmembrane potassium currents in rabbit and dog cardiac ventricular preparations. **Archives of Toxicology,** Szeged, v. 95, p. 2497–2505, 2021.

TRIBUIANI, N. **Análise dos efeitos farmacológicos da doxiciclina no mecanismo neuromuscular, mutagenicidade e segurança do uso crônico.** 2021. Tese (Doutorado Em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, UNISO. São Paulo, 2021.
UNODC. United Nations Office on drugs and crime. **Drogas: campanhas,** Brasil, 2018. Disponível em: https://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/frontpage/2018/06/relatorio-mundial-drogas-2018.html Acesso em 30 dez 2019.

WEINBERG, L. *et al.* Relationship between acute hypercarbia and hyperkalaemia during surgery. **World Journal of Clinical Cases,** Melbourne, [S.L.], v. 7, n. 22, p. 3711-3717, 2019.

WILEY, J. L. *et al.* CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. **British Journal of Pharmacology,** Richmond, v. 145, p. 293–300, 2005.

WREN-DAIL, M. A. *et al.* Effect of isoflurane anesthesia on circadian metabolism and physiology in rats. **Comparative Medicine,** New Orleans, v. 67, n. 2, p. 138-146, 2017.

ZHAO, D. *et al.* Isoflurano fornece neuroproteção em lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal por inibição da apoptose. **Revista Brasileira de Anestesiologia,** Weihui, v. 66, n.8, p. 613-621, 2016.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences,** Vancouver, v. 19, n. 3, p. 833, 2018. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877694/ Acesso em 30 dez 2019.

ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Brazilian Journal of Psychiatry,** Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 271-280, 2008.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA-UNISO

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA–UNISO

PARECER

Protocolo nº 173/2020
Interessado (a): Yoko Oshima Franco
Orientador (a): o mesmo
Título do Projeto: Influência do canabidiol (*Cannabis sativa*) administrado cronicamente em ratos nos níveis de dopamina central e na performance neuromotora

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

[ ] **APROVADO**.

[X] **APROVADO com RECOMENDAÇÃO**, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

[ ] **COM PENDÊNCIA**, devendo o proponente readequar os itens do protocolo; [ ] **REPROVADO**

Manifestação do Parecerista:

Itens 10.2 – Estresse intencional: SIM – CURTO (contenção do animal gera estresse).
Itens10.3, 10.4 e 10.5 – Justificar tanto o uso quanto o não uso (Escrever "não se aplica" quando for o caso).

Nome: Denise Grotto

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura:

Data: 07/05/2020