UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E ASSUNTOS ESTUDANTIS
CURSO DE FARMÁCIA

Isabella Ravazoli

Maria Luíza Rodrigues de Castro

FARMACODINÂMICA DO CANABIDIOL (CBD) EM PREPARAÇÕES BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO

Sorocaba/SP
2022

Isabella Ravazoli

Maria Luíza Rodrigues de Castro

FARMACODINÂMICA DO CANABIDIOL (CBD) EM PREPARAÇÕES BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do certificado de Graduação em Farmácia, da Universidade de Sorocaba.

Orientador: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco.

Sorocaba/SP

2022

Isabella Ravazoli

Maria Luíza Rodrigues de Castro

FARMACODINÂMICA DO CANABIDIOL (CBD) EM PREPARAÇÕES BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do Diploma de Graduação em Farmácia, da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/____/_____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Sandro Rostelato Ferreira

Universidade de Sorocaba

Mestranda Karollyna Corrêa Oliveira

Universidade de Sorocaba

Dedicamos este trabalho a todas as pessoas que lutam pelo avanço dos estudos e do tratamento medicinal a base do canabidiol.

‘‘Não há oposição entre Ciência e Religião. Apenas há cientistas atrasados, que professam ideias que datam de 1880.’’

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente aos nossos pais, que cederam apoio e incentivo durante os cinco anos da graduação, permitindo que pudéssemos nos dedicar aos estudos. Que nos ensinaram a persistir e lutar sempre por nossos sonhos.

Somos gratas também a Universidade de Sorocaba e a todas as oportunidades de vivência acadêmica e infraestrutura que ela proporciona aos graduandos, como o programa de iniciação cientifica. Aos excelentes professores que tivemos a oportunidade de ter como tutores. Ao coordenador Sandro Rostelato Ferreira, que também nos auxiliou no TCC e à coordenadora que o antecedeu Magali Glauzer Silva, que esteve inteiramente presente em nossa vida acadêmica.

Em especial, agradecemos a professora Yoko Oshima Franco, que além de nos acompanhar durante todo o período de graduação e iniciação cientifica, orientou esse TCC. Sem seu apoio – inclusive com a doação do canabidiol utilizado para a realização desse projeto – ele não seria possível.

Por último, a nossa querida amiga de graduação Anna Paula França, que nos acompanhou em todos os protocolos de eutanásia animal, cedendo seus finais de semana para nos ensinar e acompanhar nos protocolos que deram origem aos resultados demonstrados nesse trabalho.

RESUMO

O canabidiol (CBD) – principal fitoquímico não psicoativo da planta *Cannabis sativa* – é, atualmente, um dos fitoquímicos de maior interesse na área da pesquisa médica pela melhora da qualidade de vida de pacientes com distúrbios no sistema nervoso central e câncer. Apesar deste potencial terapêutico, seu mecanismo de ação e sua interação com os sistemas central e periférico ainda não foram totalmente esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a farmacodinâmica do CBD em preparações biventer cervicis (BC) de pintainho, através de técnica miográfica convencional, após *screening* realizado em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos. Trata-se de estudo experimental *ex vivo*, aprovado pelo CEUA sob Parecer 193/2020. A preparação BC foi exposta à adição exógena de KCl (20 mM) e ACh (110 µM), na ausência de estímulo elétrico, para se obter as respostas contraturantes antes e após o experimento (120 min). Sob estímulo indireto a preparação BC foi exposta ao CBD (500 µL) que produziu bloqueio neuromuscular. Em preparações pré tratadas com atropina (2 µg/mL), F55-6 (200 µL) e polietilenoglicol (PEG 400, 20µL/mL) a adição de CBD foi avaliada. O veículo óleo de milho (500 µL) no qual o CBD é dissolvido foi utilizado como controle. Dos protocolos complementares realizados neste TCC em preparação de ave conclui-se que o CBD age tanto em nível pré- como pós-sináptico. Em nível pré-sináptico: o uso de F55-6 um agonista de canais de Na^+ impediu o bloqueio neuromuscular característico do CBD; o uso de atropina, um antagonista de receptor muscarínico, impediu o bloqueio neuromuscular característico do CBD, explicando o efeito facilitador visualizado na preparação de mamífero; - em nível pós-sináptico: F55-6 e atropina impediram a despolarização frente à adição exógena do KCl; PEG 400 e CBD competem pelo mesmo sítio controlador da liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático mostrando a importância do Ca^{2+}, enquanto os receptores nicotínicos explicam a natureza bloqueadora do CBD ocorridas em ambas as preparações.

Palavras-chave: Canabidiol. *Cannabis sativa*. Canal de cálcio. Junção neuromuscular.

ABSTRACT

The Cannabidiol (CBD) – the main non-psychoactive phytochemical of the *Cannabis sativa* plant– is currently one of the phytochemicals of greatest interest in the medical's research area and this is mainly due to the pharmacological characteristics that the drug has presented over several clinical studies and in improving the life quality of patients with nervous central system disorders and cancer; despite the therapeutic potential that the phytochemical has demonstrated, its mechanism of action and the interaction with the central and peripheral systems have not been fully clarified yet. The objective of this final paper was evaluating the pharmacodynamics of CBD in chick biventer cervicis (BC) preparations, through conventional myographic technique, after screening performed in phrenic nerve diaphragm preparations of mice. This is an experimental *ex vivo* study, approved by CEUA under Opinion 193/2020. The BC preparation was exposed to exogenous addition of de KCl (20 mM) and ACh (110 µM), in eletrical stimulus absence, to obtain contracting responses before and after the experiment (120min). Under indirect stimulation, BC preparation was exposed to CBD (500 µL) that produced neuromuscular blockade. In preparations pretreated with atropine (2 µg/mL), F55-6 (200 µL) and PEG 400 (20 µL/mL) the CBD addition was evaluated. The corn oil vehicle (500 µL) in which CBD is dissolved was used as a control. The complementary protocols performed in this final paper in birds' preparation it is conclued that CBD acts both at the pre and post-sinaptics levels. At pre- sinaptic level: the use of F55-6 a Na^+ channel antagonist prevented the neuromuscular blockade characteristic of CBD; the atropine use, a muscarinic antagonist receptor, prevented the neuromuscular blockade caracteristic of CBD, explaning the facilitating effect visualized in mammal preparation; at post- sinaptic level: F55-6 and atropine prevented depolarization in face of exogenous addition of KCl; PEG 400 and CBD compete for the same calcium release control site in the sarcoplasmic reticulum showing the importance of Ca^{2+}, while nicotinic receptor explain the blocking nature of CBD that occurred in both preparations.

Keywords: Calcium channel. Cannabidiol. *Cannabis sativa*. Neuromuscular junction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVO.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivo específico.....	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1	Materiais.....	13
3.2	Solução nutritiva de krebs (em mm)	14
3.3	Animais.....	14
3.4	Preparação biventer cérvicis (bc) de pintainho *(ex vivo)*	14
3.5	Planejamento de uso de animais.....	18
3.6	Manejo de animais.....	18
4	DESENVOLVIMENTO.....	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXO A.....	38
	ANEXO B.....	39
	ANEXO C.....	40

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de plantas medicinais como medidas terapêuticas e profiláticas está presente na sociedade desde os primórdios da humanidade e ao longo do tempo esse uso vem se aperfeiçoando. Plantas medicinais são aquelas que contêm em sua estrutura substâncias com potencial terapêutico. Estas substâncias são denominadas de fitoquímicos bioativos que, ao passar por todas as etapas de pesquisa comprovando eficácia, segurança e estudos de formulação da tecnologia farmacêutica, podem se tornar medicamentos inovadores para tratamento de diversas doenças (ODIEKA *et al*., 2022)

A *Cannabis* consiste em um arbusto originário da Ásia, pertencente à família Cannabaceae, cujas espécies mais conhecidas são *Cannabis sativa* e *Cannabis indica* (RAYMUNDO; SOUZA, 2007), que se distinguem principalmente pelo modo de crescimento, características morfológicas e quantidade de princípios ativos (SPINELLA, 2001). Entretanto, a espécie predominante no Brasil é a *Cannabis sativa*, pois ela possui melhor desenvolvimento em climas temperados e tropicais (MATOS, 2017). Na tabela 1, abaixo, são descritos alguns dos diversos compostos encontrados na *Cannabis sativa,* porém, artigos mais recentes chegam a mencionar entre 538 (KOPUSTINSKIENE *et al*.; 2022) a 550 compostos (ROCK; PARKER, 2021).

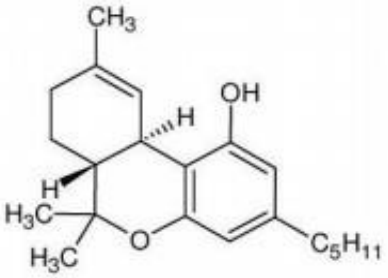
Tabela 1. Classificação dos compostos presentes na *Cannabis sativa.*

Classe	Número de compostos encontrados na planta	Classe	Número de compostos encontrados na planta
Canabinóides	61	*Cetonas simples*	13
Canabigerol (CBG)	6	*Ácidos simples*	20
Canabicromeno (CBC)	4	*Ácidos graxos*	12
Canabidiol (CBD)	7	*Ésteres e lactonas simples*	13
$\Delta^{1(9)}$-THC	9	*Esteróides*	11
$\Delta^{2(8)}$-THC	2	*Açúcares e análogos*	34
Canabiciclol (CBL)	3	Monossacarídeos	13
Canabielsoin (CBE)	3	Dissacarídeos	2
Canabinol (CBN)	6	Polissacarídeos	5
Canabinodiol (CBND)	2	Ciclitóis	12
Canabitriol (CBT)	6	Amino-açúcares	2
Outros canabinóides	13	*Terpenos*	103
Compostos Nitrogenados	20	Monoterpenos	58
Bases quartenárias	5	Sesquiterpenos	38
Amidas	1	Diterpenos	1
Aminas	12	Triterpenos	2
Alcalóides espermidinas	2	Mistura de terpenóide	4
Aminoácidos	18	*Fenóis não-canabinóides*	16
Proteínas, glicoproteínas e enzimas	9	*Glicosídeos Flavonóide*	19
Hidrocarbonetos	50	*Vitaminas*	1
Álcoois simples	7	*Pigmentos*	2
Aldeídos simples	12	Total	421

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.

O canabidiol fitocanabinóide (CBD) é um composto terpenofenólico de 21 carbonos com inúmeros alvos moleculares (BRITCH, 2020) – como podemos observar na Figura 1 – e, possui alto grau de importância por consistir o principal componente não psicoativo da *Cannabis sativa*, presente em até 40% dos extratos da planta (MATOS *et al.*, 2017). O isolamento do CBD ocorreu em 1940 (ADAMS *et al*., 1940) porém, somente em 1963 sua estrutura química foi elucidada pelo professor israelense Raphael Mechoulam e colaboradores (MECHOULAM; SHVO, 1973). No entanto, nas últimas décadas, o CBD tornou-se alvo de vários estudos experimentais, revelando um amplo espectro de propriedades farmacológicas como ação analgésica e imunossupressora, ação no tratamento de isquemias, diabetes, náuseas e câncer, efeitos sobre os distúrbios de ansiedade, do sono e do movimento, bem como no tratamento dos sintomas decorrentes da epilepsia, esquizofrenia, doenças de Parkinson e Alzheimer (ZUARDI, 2008; IZZO *et al*., 2009).

Figura 1. Estrutura química do canabidiol (CBD).



Fonte: MATOS *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 03/12/2019, o registro de medicamentos à base de *Cannabis*, mas não o seu cultivo pelas empresas produtoras. Uma vez registrados, de acordo com os requisitos e controles de qualidade exigidos pela Anvisa, os medicamentos só poderão ser comprados com expressa recomendação médica e em receituário tipo B, 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 tenha 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. Esse marco regulatório cria uma classe de produtos sujeitos à vigilância sanitária: os produtos à base de *Cannabis*, e dispõe sobre os procedimentos para a concessão de uma Autorização Sanitária para a fabricação e a importação desses produtos, bem como estabelece requisitos para comercialização, prescrição, dispensação, monitoramento e fiscalização de produtos de *Cannabis* para fins medicinais (ANVISA, 2019).

Pode-se dizer que os principais efeitos dos canabinóides derivam de sua interação com os receptores endocanabinóides CB1 e CB2, que são receptores do tipo acoplados a proteína G e amplamente distribuídos dentro do organismo. Por mais que o CBD apresente uma afinidade baixa por esses receptores, há evidências científicas de que ele atue como antagonista de CB1 e agonista de CBD2, isso em concentrações relativamente baixas (ZUARDI, 2008).

Grande parte dos estudos que apontam os efeitos terapêuticos do canabidiol derivam de estudos pré-clínicos de células e roedores, e sugerem que o CBD pode ser neuroprotetor, cardioprotetor e anti-inflamatório (BRITCH, 2020). Sua utilização, diferentemente do THC (Δ9-tetra-hidrocanabinol), não gerou qualquer tipo de dependência ou abstinência em testes feitos com camundongos (HAYAKAWA *et al*., 2007). Além desse perfil favorável de efeitos adversos, nos últimos 40 anos vêm sendo publicadas evidências experimentais que apontam seu potencial terapêutico em diversos quadros patológicos, como: epilepsia, esquizofrenia, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, isquemias, diabetes, náuseas, câncer, como analgésico e imunossupressor, em distúrbios de ansiedade, do sono e do movimento (ZUARDI, 2008; IZZO *et al*., 2009).

Também já existem artigos científicos que discorrem sobre a atuação do CBD indiretamente nos receptores canabinóides primários CB1 E CB2, que são receptores acoplados a proteína G. Os receptores CB1 estão localizados em todo o sistema nervoso central, além de tecidos cardíacos, pulmonares, do intestino delgado, rim, fígado e nas células imunes. Já os receptores CB2 estão localizados nas células imune, no trato gastrointestinal e em baixa densidade no sistema nervoso central (BRITCH, 2020). Esses receptores e o sistema endocanabinóide estão envolvidos em atividades do sistema nervoso central (SNC) e desordens, incluindo apetite, aprendizado e memória, ansiedade, depressão, esclerose múltipla, neurodegeneração e dependência (IVERSEN, 2003; PACHER; BATKAI; KUNOS,

2006; KANO *et al*., 2009; DI MARZO; STELLA; ZIMMER, 2015). O CBD é capaz de ativar o *peroxisome proliferator-activated receptor,* PPAR-c, e, por meio dessa ação, medeia importantes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes na doença de Parkinson (KOPUSTINSKIENE *et al*., 2022). Devido a isso, o interesse pelo estudo do CBD vem crescendo principalmente para o tratamento de doenças, como a epilepsia. Isso contribui para mudanças nas legislações que permitem o acesso ao CBD e o surgimento de alguns produtos no mercado (ARZIMANOGLOU *et al*., 2022).

Um grupo de pesquisadores desenvolveu protocolos com o CBD utilizando a junção neuromuscular de rãs e lagostas (TURKANIS; KARLER, 1986; 1988). Nas preparações *ex vivo* de rãs o CBD se mostrou capaz de diminuir a frequência e a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) e, também, de diminuir a média do conteúdo quântico do potencial de placa terminal (m). Os autores atribuem uma ação pré-sináptica quando uma substância provoca mudanças em "m" e na frequência de pptms; enquanto uma ação pós-sináptica é atribuída quando uma substância provoca a redução na amplitude de pptms. Os resultados obtidos por esses autores sugerem, portanto, que o CBD atua tanto em nível pré-sináptico como pós-sináptico. Em outro estudo, utilizando eletrofisiologia, Topal e colaboradores (2021) envolveram os canais de Na^+, K^+ e Ca^{2+} no mecanismo do CBD em preparações cardíacas ventriculares de coelhos e cães.

Estudos prévios em nosso laboratório com o CBD (500 µL) em preparações *ex vivo* nervo frênico-diafragma de camundongos mostraram um efeito facilitador seguido de bloqueio neuromuscular (Relatório Final Fapesp 2020/14214-6). Em preparações previamente tratadas com CBD (500 µL), a adição exógena de cálcio aos 60 min, impediu o característico bloqueio neuromuscular, mas restabeleceu a resposta contrátil em níveis basais semelhantes ao controle Tyrode. O CBD não causou danos às células musculares, quantificado sob microscopia de luz e em preparações previamente curarizadas e submetidas a estímulo direto. Em preparações biventer cervicis de pintainho, a mesma concentração utilizada em preparação de mamífero causou progressivo bloqueio muscular (sem prévia facilitação) e afetou as respostas contraturantes da adição exógena de ACh e KCl.

A partir desses pressupostos o estudo foi continuado como parte deste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), apenas em preparações de ave, através da utilização de algumas ferramentas farmacológicas que agem em sítios específicos da

Junção Neuromuscular (JNM). A importância desse trabalho se dá pela limitada quantidade de artigos que descrevem os mecanismos farmacológicos do CBD – apesar de ser um assunto que está em alta – e a necessidade de compreender como essa substância age na JNM, para contribuir com sua segurança e expandir sua aplicabilidade no tratamento de diversas doenças.

2. OBJETIVOS

21. . Objetivo geral

Elucidar a farmacodinâmica do canabidiol (CBD) utilizando a preparação biventer cervicis de pintainho, a partir do conhecimento acumulado em preparação de mamífero.

22. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do canabidiol nos canais de sódio;
- Avaliar os efeitos do canabidiol nos receptores muscarínicos pré-sinápticos;
- Avaliar os efeitos do óleo de milho na JNM;
- Analisar a resposta contraturante perante a exposição exógena de KCl (cloreto de potássio) e ACh (acetilcolina).

3. MATERIAL E MÉTODOS

31. Material

Foram necessários para a realização do estudo: carbogênio (95% O_2/5% CO_2) abastecido pela White Martins® envasado em cilindro modelo 040NW200T 40.219 ISSONGT-3/4 col-cap. Canabidiol (CBD, 200 mg/mL, apresentação 30 mL de solução oral, laboratório Prati-Donaduzzi, PR, Brasil) e comercializado pela Droga Raia, mediante receituário médico. Solução nutritiva de Krebs; Pintainhos HY-line W36 (12); Acetilcolina (2%, 88,1 mM); KCl (Sigma®, 4,8); $CaCl_2$ (1.8 mM, Sigma-Aldrich®); Isoflurano (Virbac®, Sorocaba, SP, Brazil); PEG 400 (20 µM, Synth®); Atropina (20

µM, Sigma-Aldrich®) e F55-6 (200 µg/mL) (YOSHIDA *et al*., 2016; TRIBUIANI *et al*., 2022).

3.2. Solução nutritiva de Krebs (em mM)

Esta solução mantém as condições fisiológicas da preparação de pintainhos e é composta por NaCl 118,6; KCl 4,69; $CaCl_2$ 1,88; KH_2PO_4 1,17; $MgSO_4$ 1,17; $NaHCO_3$ 25,0 e $C_6H_{12}O_6$ 11,65, em água ultrapura do tipo "milli-Q".

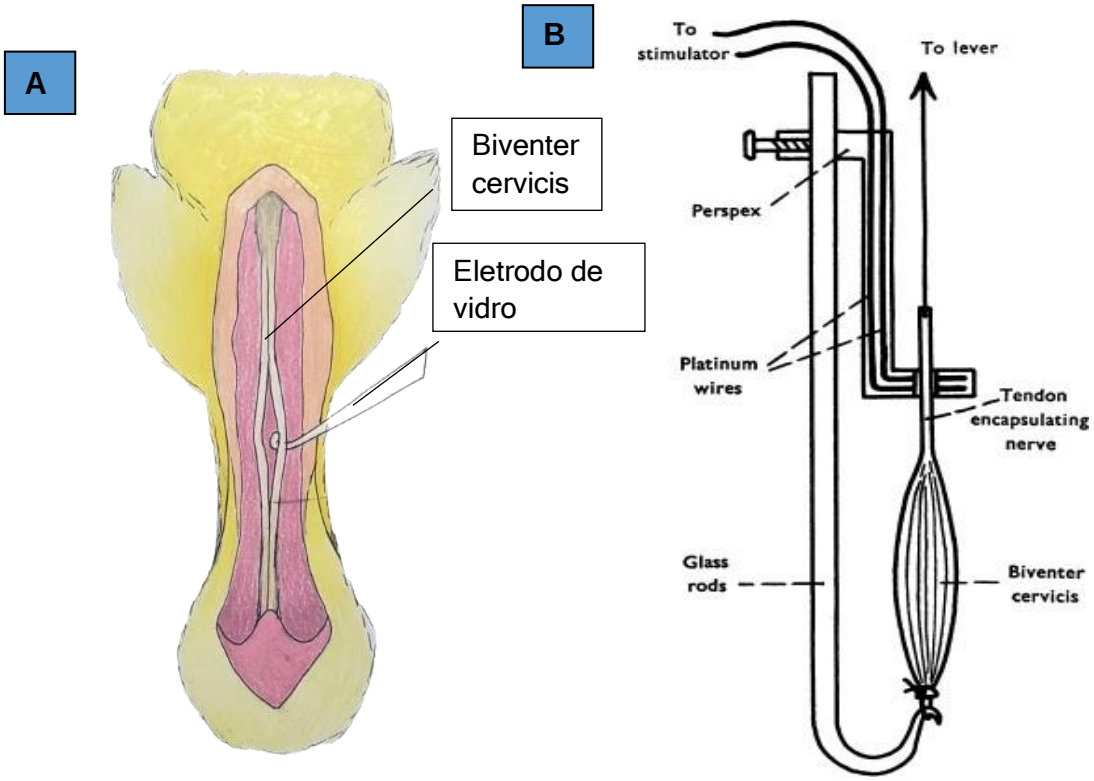
3.3. Animais

Pintainhos machos com 4 a 8 dias, da linhagem HY-line W36 foram adquiridos da Avicultura Santa Bárbara, Sorocaba, SP, e ambientados no LaPeNM (Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar) por 4 h antes do uso, e receberam ração e água *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA da Universidade de Sorocaba – SP, sob protocolo 193/2020 (anexo 1).

3.4. Preparação Biventer cervicis (BC) de pintainho (*ex vivo*)

A preparação BC foi isolada como na ilustração da Figura 2A. Após, foi montada de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960), como mostra a Figura 2B. Os pintainhos foram anestesiados com isoflurano e, após a dissecação, os músculos foram montados em cubas de 5 mL de capacidade, contendo solução nutritiva de Krebs. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (95 % O_2; 5 % CO_2) e mantida a 37 °C. Estímulos supramaximais (de 0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração, 5-12 V) provenientes do estimulador Panlab® LE12406TC foram aplicados ao músculo e as contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição exógena de KCl (20 mM) e ACh (110 µM), antes e depois do experimento, foram obtidas por meio de um transdutor isométrico MLT0201 (120 min).

Figura 2. (A) Elemento gráfico ilustrando isolamento de preparação biventer cervicis de pintainho. (B) Esquematização de montagem de eletrodo para protocolos em preparação de biventer cervicis de pintainho.



Fonte: (A) Elaboração própria. (B) GINSBORG, B.L.; WARRINER, J. The isolated chick biventer cervicis nerrve-musclrepreparation. Brithish Journal of Pharmacology and Chemotherapy, v. 15, n. 3, p. 410, 1960.

A aquisição dos dados foi feita através do sistema PowerLab 4/35 contendo o software LabChart e LabChart Pro (PL3504/P) conectado a uma unidade LE124060M Power Unit (ADInstruments). Após um período de estabilização de 20 minutos, os protocolos experimentais foram iniciados. A unidade miográfica para pintainhos (Fapesp 2012/08271-0) é mostrada na Figura 3 (instalado no LaPeNM, Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar, Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Uniso, Sorocaba, SP).

Figura 3. Unidade miográfica para pintainhos, instalado no LaPeNM/Uniso, apoio 2.

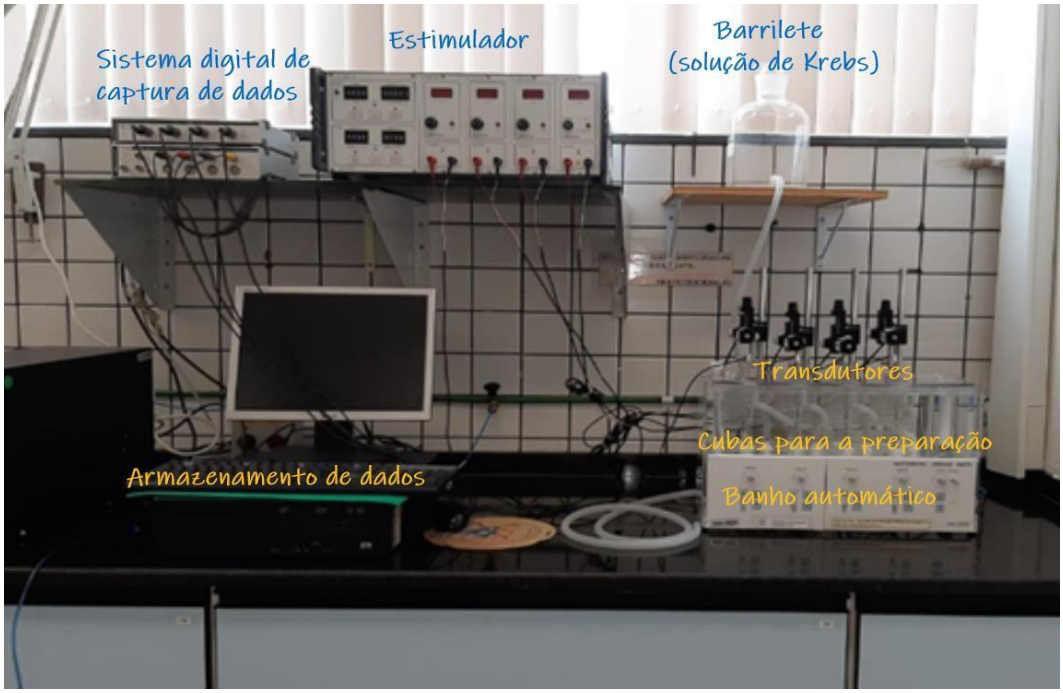


Foto: J.C.P. Assunção.

Protocolos farmacológicos:

a) Resposta contraturante frente à exposição exógena de acetilcolina (ACh) e Cloreto de potássio (KCl)

No início de todo os protocolos, antes de adicionar qualquer substância a preparação, foi adicionado 100 µL de KCl 10% e, na ausência de estímulo elétrico, registrou-se a resposta contraturante. Lavou-se a preparação até total retirada do KCl (cerca de 5X), restabeleceu-se a resposta contrátil e após 10 minutos, adicionou-se 40 µL de ACh 2 mg/mL, novamente na ausência de estímulo elétrico para se obter a resposta contraturante. Obteve-se, desta forma os valores iniciais de KCl e ACh. Após os 120 minutos dos protocolos, o processo foi repetido, adicionando-se primeiro 40 µL de ACh (sem lavar a preparação) para obter a resposta contraturante e, após a lavagem da preparação até retirada total de ACh (cerca de 5X) restabelecer o estímulo elétrico. Após 10 minutos, adicionar 100 µL de KCl, na ausência de estímulo elétrico, obter a resposta contraturante. Obtém-

se desta forma os valores finais para KCl e ACh. As respostas contraturantes finais de cada agonista serão comparadas com a iniciais e analisadas estatisticamente.

b) Utilização de atropina, alvo: receptores muscarínicos.

Após a estabilização das contrações adicionou-se a atropina (2 µg/mL) (WERNER *et al*. 2015), um antagonista muscarínico e após 10 minutos adicionou-se 500 µl de CBD. A preparação de pintainho foi submetida por um período de 120 minutos e os efeitos comparados a controle de atropina. A atropina foi diluída em 5 mL da solução Krebs.

c) Utilização de Fração Metanólica (F55-6) de *Casearia sylvestris*, alvo: canais de sódio.

Após 10 minutos de estabilização das contrações adicionou-se a FM 55-6 (200 µL) (WERNER *et al*. 2015), um agonista de canais de sódio e após 10 minutos adicionou-se se 500 µL de CBD. O protocolo teve duração de 120 minutos. O FM 55-6 foi diluído em 5mL da solução Krebs.

d) Utilização do PEG 400, alvo: retículo sarcoplasmático/receptor rianodina.

Para verificar uma possível ação da CBD sobre receptores de rianodina presentes no retículo sarcoplasmático utilizou-se o PEG 400 (20 µL/mL), cujo efeito farmacológico na JNM é uma neuro facilitação (OSHIMA *et al*., 2010). Após 10 minutos de vigência do PEG 400 (20 µL/mL) na preparação, adicionou-se 500 microlitros de CBD. O protocolo teve uma duração total de 120 minutos.

e) Controle óleo de milho

Após a estabilização das contrações foi adicionado 500 µL de óleo de milho. A preparação foi submetida por um período total de 120 minutos. O objetivo desse protocolo é observar se o óleo de milho interfere no efeito do CBD na JNM já que é seu veículo (medicamento comprado em drogaria). Como não é possível examinar apenas o CBD isolado, optamos por estudar os efeitos do óleo de milho puro.

3.5. Planejamento de uso de animais

Pintainhos: 4 protocolos farmacológicos, cada um feito em uma preparação de pintainho. Como cada animal permite isolar duas preparações foram necessários 2 animais (tabela 2).

Tabela 2. Número de animais utilizados para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

Protocolo	**Número de animais utilizados**
Protocolo Controle Óleo de milho	1 biventer cervicis
Protocolo atropina	1 biventer cervicis
Protocolo PEG 400	1 biventer cervicis
Protocolo Fração Metanólica F55-6 de *Casearia sylvestris*	1 biventer cervicis
	Total = 4 biventer cervicis **Total de animais: 2 animais**

Fonte: Elaboração própria.

3.6. Manejo de animais

Para o uso de animais de forma ética as integrantes deste TCC realizaram o Curso de Extensão oferecido pela Universidade de São Paulo (USP) intitulado Capacitação no Uso e Manejo de animais de laboratório. Nos anexos 2 e 3 são mostrados os certificados.

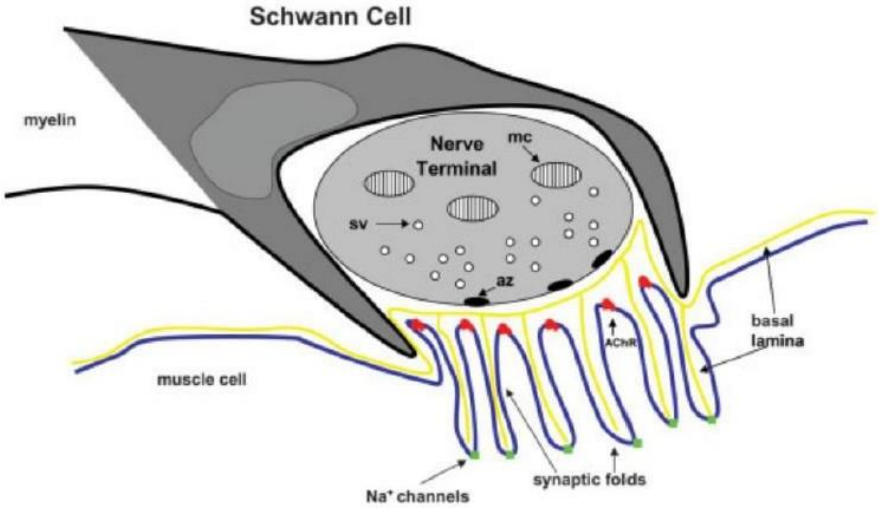
4. DESENVOLVIMENTO

As junções neuromusculares (JNM), também chamadas de placas motoras, são sinapses químicas excitatórias formadas entre os terminais nervosos dos neurônios motores da medula espinhal e as fibras musculares esqueléticas que utilizam a acetilcolina (ACh) como neurotransmissor e, a partir disso, são desencadeadas as contrações musculares (NISHIMUNE; SHINEMOTO, 2018).

Todas as JNMs possuem cinco principais componentes: 1. Processo de células de Schwann formando uma ‘‘capa’’ acima da porção terminal do nervo que não está voltada para a região pós-sináptica; 2. Terminal nervoso com o neurotransmissor; 3. Espaço sináptico revestido por uma membrana basal; 4. Membrana pós-sináptica com

receptor para o neurotransmissor; 5. Sarcoplasma juncional utilizado como suporte metabólico e estrutural para a região pós-sináptica (ENGEL, 2008). A organização da JNM é mostrada na imagem abaixo (Figura 4).

Figura 4. Organização da JNM.



Fonte: HUGHES, B. W.; KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. Muscle & Nerve, v. 33, n. 4, p. 445-461, 2006.

A enzima transferase de acetilcolina (AChT) realiza a síntese da acetilcolina no terminal pré-sináptico a partir da colina e da Acetil Coenzima A (Acetil-CoA). Então, a ACh é armazenada no interior das vesículas pelo VAChT, seu transportador. As vesículas sinápticas possuem um ciclo nos terminais nervosos. Primeiramente, os neurotransmissores são transportados até o interior das vesículas sinápticas que se agrupam nas proximidades da zona ativa, permitindo o ancoramento das vesículas e a fusão para que haja liberação do seu conteúdo na fenda sináptica (ARISI; NEDER; MOREIRA, 2001).

Os terminais e varicosidades dos neurônios colinérgicos contêm grande número de pequenas vesículas ligadas à membrana, concentradas perto da porção sináptica da membrana celular, bem como um número menor de vesículas grandes com núcleo denso, localizadas mais longe da membrana sináptica, a liberação fisiológica dos transmissores contidos nessas vesículas, depende do cálcio extracelular e ocorre quando um potencial de ação atinge o terminal e desencadeia

um influxo suficiente de íons de cálcio por meio de canais de cálcio do tipo N. O cálcio interage com as proteínas de membrana associadas a vesículas (VAMP) sinaptotagmina na membrana da vesícula e desencadeia a sua fusão com a membrana terminal e a abertura de um poro para dentro da sinapse (KATZUNG, 2014).

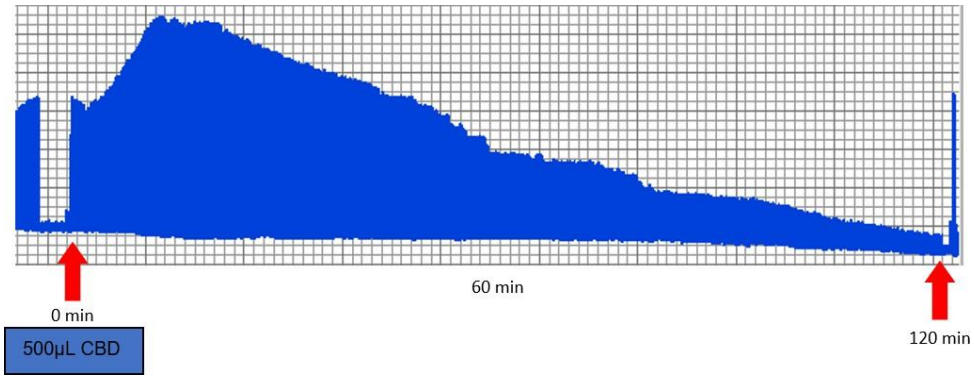
A abertura do poro e a entrada rápida de cátions resultam em liberação da ACh do proteoglicano e na expulsão exocítica para dentro da fenda sináptica. Uma despolarização de um nervo motor somático pode liberar várias centenas de quanta para dentro da fenda sináptica. Uma despolarização de uma varicosidade ou terminal nervoso pós-ganglionar autônomo provavelmente libera menos e em uma área maior. Em adição à ACh, vários cotransmissores são liberados ao mesmo tempo (KATZUNG, 2014).

A ACh se difunde na fenda e combina-se com os receptores nicotínicos na membrana do musculo esquelético (SILVERTHORN, 2010). A reação entre o neurotransmissor e o seu receptor resulta na abertura seletiva de canais de Na+ e K+, e a ocorrência de um potencial pós-sináptico despolarizante (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008), que vai culminar na contração muscular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

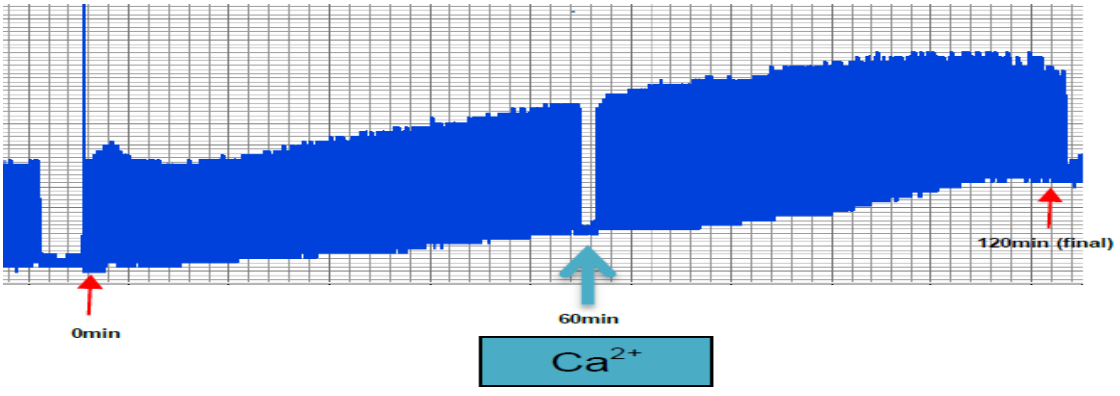
Em pesquisa própria (ainda não publicada) apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) observou-se em modelo animal de camundongo *Swiss* que, 1) CBD 500 µL produz inicialmente facilitação para em seguida causar bloqueio neuromuscular; 2) o pré-tratamento com CBD 500 µL por 60 min seguido da adição de 50 µL de $CaCl_2$ 10% na preparação impediu o bloqueio característico do CBD. Nas Figuras 5 e 6 pode-se observar a diferença entre os registros miográficos de uma preparação contendo apenas a quantidade de cálcio padrão na solução Tyrode (solução semelhante ao Krebs utilizada em preparação de camundongo com a mesma finalidade ao Krebs) e uma em que se foi adicionado cloreto de cálcio ($CaCl_2$, Figura 6).

Figura 5. **Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo**. Registro miográfico utilizando 500 µL de CBD (concentração de 20 mg/mL). Observa-se que logo que o CBD é adicionado há uma facilitação (aumento da amplitude da resposta contrátil) e no decorrer dos 120 minutos de experimento, a substância provoca o bloqueio na junção neuromuscular.



Fonte: elaboração própria.

Figura 6. **Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo**. Registro miográfico utilizando 500 µL de CBD (concentração de 20 mg/mL). Adição de Cálcio (Ca^{2+} 1,8 mM ou 50 µL de $CaCl_2$ 10%, Sigma®) aos 60 minutos – momento antes em que se foi observado que o CBD começa a causar o bloqueio na JNM. Observa-se que, diferentemente da imagem anterior onde só se foi utilizado o CBD (Figura 5), não há bloqueio.



Fonte: elaboração própria.

.

O efeito facilitador do CBD em preparação de mamífero pode ser discutido com base no seguinte conhecimento acumulado, a seguir. Uma substância facilitadora

pode ser aquela responsável por potencializar a resposta contrátil denominada antimiastênica e antagonista do curare, como um dos exemplos (RIKER; STANDAERT, 1966) e que, portanto, pode atuar como um anticolinesterásico. Também pode envolver os canais de sódio voltagem-dependentes, responsáveis pela despolarização que ocorre no terminal nervoso e se propaga através da JNM. Existem substâncias com efeitos sobre esses canais quando estão abertos, levando à ativação do canal; ou à diminuição da atividade quando inativados (CATTERALL, 2000; HEMMINGS, 2009). Obviamente facilitação é observada somente com a ativação (e não com inativação) desses canais de sódio neuronais. Também podem ser envolvidos os de canais de cálcio voltagem-dependentes e dependentes de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) capazes de prolongar a resposta contraturante por permitir o influxo de cálcio extracelular (CATTERALL, 2000b). A entrada de cálcio também pode advir do retículo sarcoplasmático – localizado no próprio músculo – logo após a despolarização dos túbulos transversais (SANCHEZ; STEFANI, 1978; ALMERS; PALADE, 1981). Em resumo, um efeito facilitador pode ser um evento pré-sináptico e/ou anticolinesterásico e/ou pós-sináptico e/ou, também, sobre a fibra muscular. O real mecanismo de uma certa substância deve ser estudado nesses diferentes "sítios" para se atribuir um mecanismo de ação ou farmacodinâmica.

Em experimentos realizados com preparações BC de pintainho observou-se que a concentração de 20 mg/mL de CBD (a mesma utilizada na preparação de mamífero) apresentou resultados mais homogêneos com o predomínio do efeito bloqueador, assim como em camundongos, sem a facilitação que precedia o bloqueio na preparação de mamífero. Sendo assim, a concentração foi mantida para o estudo na preparação de aves. Na Figura 7 observa-se um registro miográfico da preparação de pintainho.

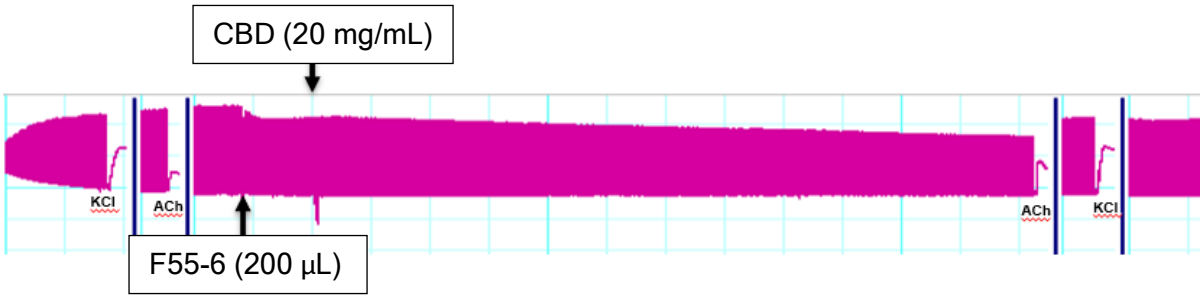
Figura 7. **Preparação Biventer cervicis de pintainho.** Experimento com adição de 20 mg/mL de CBD e adição exógena de cloreto de potássio (KCl) e acetilcolina (ACh), antes e depois do experimento.

Fonte: Elaboração própria.

No intuito de investigar o mecanismo farmacológico do CBD foi realizado protocolo utilizando a fração metanólica F55-6 da planta *Casearia sylvestris* Swartz (popularmente conhecida como guaçatonga), voltados para a análise de sua ação em canais neuronais voltagem-dependentes. Segundo Werner (2011), a F55-6 age na ativação dos canais de sódio e, sabe-se que, a facilitação neuronal é modulada pelo cálcio extracelular.

Na presença de F55-6, ou excesso de Ca^{2+} (observado em mamífero em estudo próprio realizado anteriormente e ainda não publicado), o CBD não demonstrou o usual efeito bloqueador, ou seja, esses resultados evidenciam que a paralisia pode ser iniciada no canal de sódio neuronal, no qual a F55-6 e o Ca^{2+} foram capazes de antagonizar a paralisia muscular. A porcentagem de bloqueio foi de apenas 15,65% se comparado ao controle (100%). Após a lavagem, a recuperação da preparação ficou em 98,63% também em relação ao controle. A partir disso, fica evidente a ação neuroprotetora da F55-6.

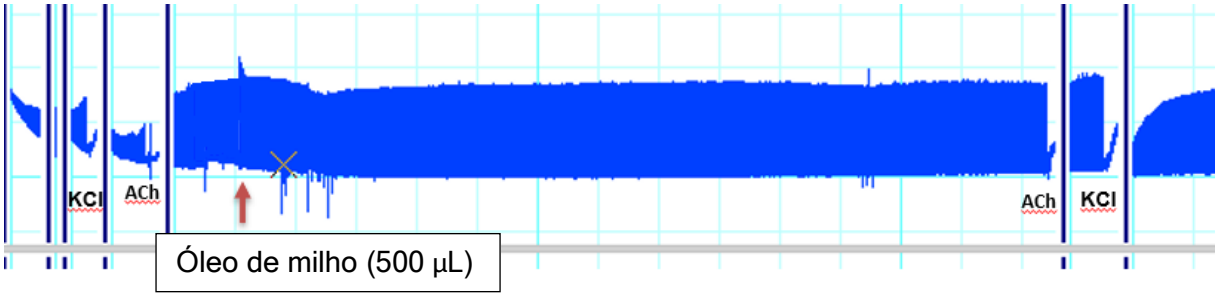
Figura 8. **Preparação Biventer cervicis de pintainho.** Adição de F55-6 seguida da adição de CBD (20 mg/mL), após 10 min. Note que o usual efeito bloqueador do CBD não ocorreu neste modelo, evidenciando uma ação "neuroprotetora" do extrato.



Fonte: Elaboração própria

Para verificar a influência do óleo de milho (insumo utilizado pela indústria farmacêutica para veicular o CBD em forma de solução oral – atualmente a única forma disponível para compra) no comportamento de bloqueio apresentado, foi realizado um protocolo utilizando somente o óleo de milho, na mesma concentração do CBD, ou seja, 500 µL (Figura 9). Pode-se observar no registro abaixo que o óleo não exerceu nenhuma influência sobre a preparação, fator determinante para evidenciar que o efeito bloqueador nos receptores provem do CBD. Não houve porcentagem alguma de bloqueio ou facilitação durante os 120 minutos de protocolo.

Figura 9. **Preparação Biventer cervicis de pintainho.** Adição de 500 µL de óleo de milho na preparação biventer cervicis de pintainho. A ilustração evidencia que não há característico bloqueio na JNM como nas outras em que se utililizou o CBD.

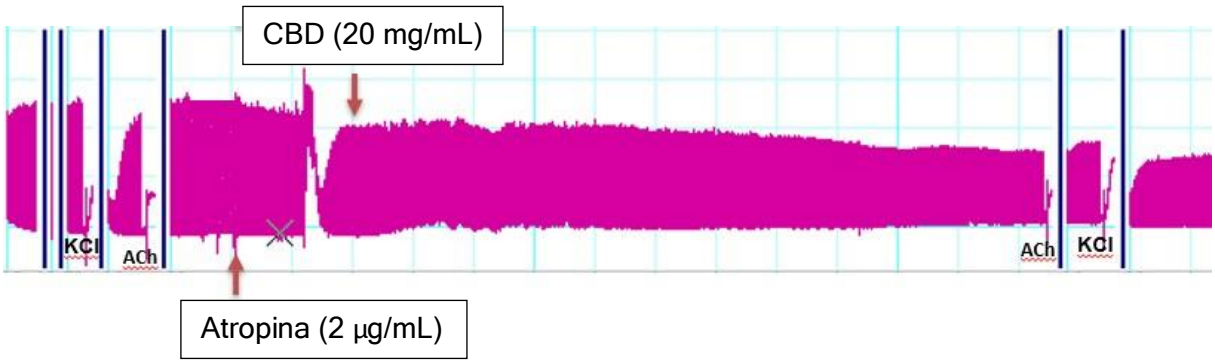


Fonte: Elaboração própria.

Existem duas categorias de bloqueadores neuromusculares: os despolarizantes e o os não despolarizantes. No caso dos despolarizantes, a produção de bloqueio neuromuscular depende da presença de moléculas suficientes de um fármaco bloqueador no receptor nicotínico pós-sináptico neuromuscular para produzir a despolarização da placa terminal. Já os não despolarizantes, competem com a ACh para evitar sua ação nos receptores nicotínicos, como acontece com o decametônio e o suxametônio (MOORE; HUNTER, 2001).

A atropina – alcaloide extraído da *Atropa beladona* – atua como um antagonista competitivo da acetilcolina, que age nos receptores muscarínicos. Quando a acetilcolina está em maior concentração o efeito do fármaco pode ser anulado, prevalecendo o efeito da ACh nos receptores nicotínicos (BERÁNEK; VYSKOČIL,1968). A atropina é utilizada no tratamento infantil da miopia desde o século XIX e que, atualmente, é um dos fármacos mais utilizados para tratar essa condição (MATHIS; FELDKAEMPER; SCHAEFFEL, 2021). Já foi observado em estudos anteriores (ABBS; JOSEPH, 1981) que a atropina – dependendo da dosagem - tem a capacidade de se ligar aos receptores muscarínicos inibitórios pré-sinápticos e assim, realizar a autorregulação da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular de camundongo. Para investigar a ação do CBD nos receptores muscarínicos, foi realizado um protocolo adicionando-se atropina e após 10 minutos o CBD. Após a adição do CBD, o bloqueio foi de apenas 30% ao final do protocolo de 120 minutos, ou seja, a atropina diminuiu as proporções do bloqueio causado pelo CBD.

Figura 10. **Preparação Biventer cervicis de pintainho.** Adição de atropina (2 µg/mL) seguida da adição de CBD (20 mg/mL), após 10 min. Note que a atropina impediu o efeito bloqueador do CBD, evidenciando seu efeito em nível pré-sináptico nos receptores muscarínicos que regulam a liberação de ACh.



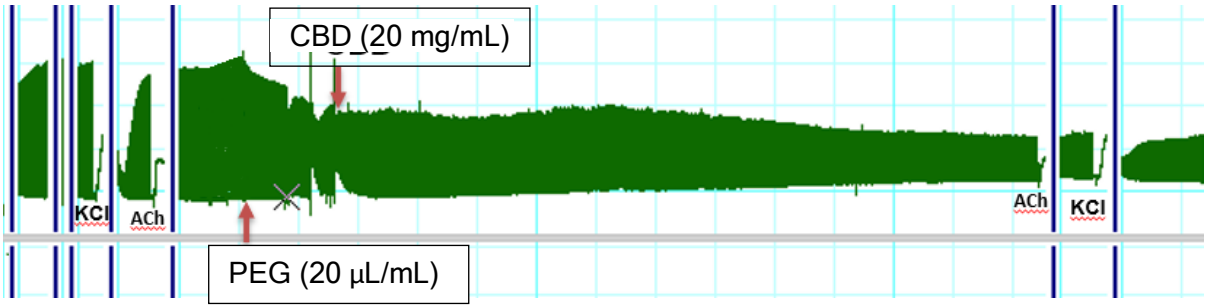
Fonte: Elaboração própria.

Observa-se que a atropina nesse caso teve um comportamento diferente do citado por Tribuiani (2022) em protocolo farmacológico utilizando a mesma concentração de atropina (2 µg/mL), porém, em preparação de mamífero (camundongo) para estudo farmacológico da doxiciclina. Foi notado que assim como o CBD, o antibiótico da classe das tetraciclinas possui efeito bloqueador. Diferentemente do resultado mostrado acima, o pré-tratamento com atropina não impediu o bloqueio característico da doxiciclina, evidenciando que os receptores muscarínicos pré-sinápticos não foram afetados pela doxicilina como foram pelo CBD. Aparentemente neste caso, a dose de atropina utilizada inibiu receptores muscarínicos inibitórios pré-sinápticos (inibiu a inibição característica desses receptores) e causou uma facilitação (PRADO; CORRADO, 1986) visualizada em preparação de mamífero e impediu o bloqueio característico de CBD em preparação de ave, comprovado pela resposta contraturante de ACh que se manteve pouco alterada após 120 min de experimento.

Outro agente farmacológico que pode ser utilizado é o polietilenoglicol 400 (PEG 400). Ele aumenta a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático tendo como efeito a facilitação na JNM, influenciando no mecanismo controlado pelo receptor rianodina (OSHIMA *et al*., 2010). Como pode se observar na Figura 11, abaixo, a adição do PEG 400 expressou um efeito facilitador que foi gradualmente declinando. No momento da adição do CBD (após 10 min) já se notava um declínio do efeito do

PEG em cerca de 35,3 %, o que equivale dizer que havia uma resposta funcional de 64,7 %. A resposta contrátil ao final de exposição ao CBD registrou funcionalidade de 54,5 % da maquinaria. Matematicamente significa que, em relação ao momento da adição do CBD, ao final do experimento a função da maquinaria contrátil encontrava-se 84,2 % ativa.

Figura 11. **Preparação Biventer cervicis de pintainho.** Registro miográfico com a adição de PEG seguida de CBD (20 mg/mL), após 10 min. Pode-se observar que o conhecido efeito facilitador do PEG foi reduzido pela adição do CBD após 10 minutos.

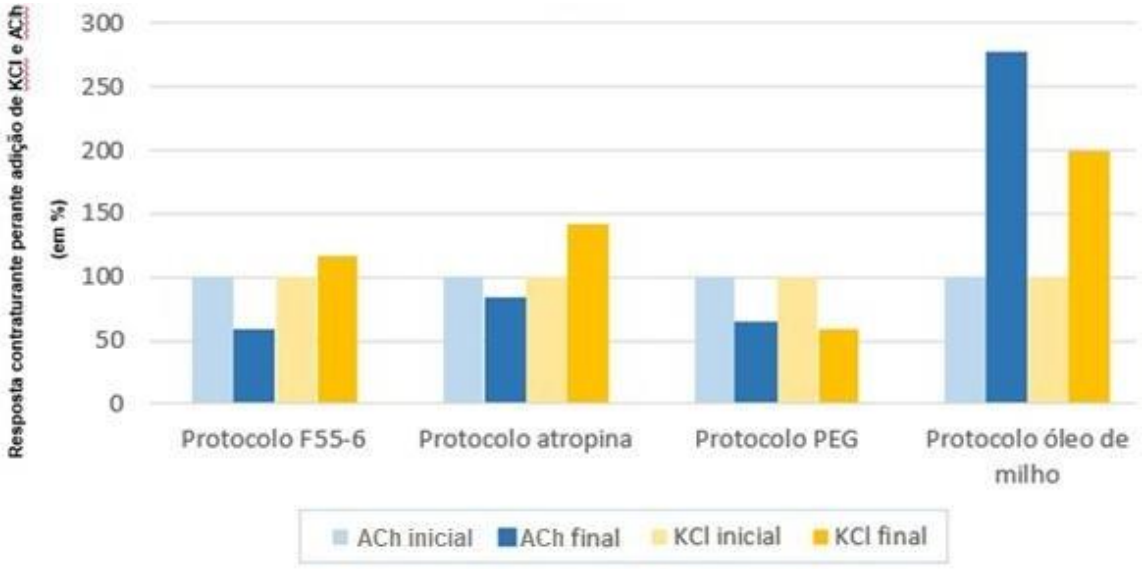


Fonte: Elaboração própria.

Outra importante informação que a preparação Biventer cervicis de pintainho fornece diz respeito aos elementos pós-sinápticos da JNM. As contrações musculares liberadas por receptores "intrínsecos" são aquelas que respondem ao neurotransmissor liberado do terminal nervoso, essas são elicitadas sob estímulo elétrico, como as que são mostradas no decorrer dos 120 minutos dos protocolos mostrados nas figuras acima. As contraturas evocadas por receptores "extrínsecos" são as que respondem à ACh e ao KCl adicionados de forma exógena na ausência de estímulos elétricos (GINSBORG; WARRINER, 1960; CHANG; TANG, 1974).

O objetivo da realização das respostas contraturantes frente à adição exógena de ACh e KCl em todos os protocolos farmacológicos realizados é avaliar a ação do CBD nos elementos pós-sinápticos que compõem a JNM. A ACh tem relação direta com receptores nicotínicos, enquanto o KCl avalia a integridade da membrana da fibra muscular ou sarcolema, através dos canais de potássio ali existentes. Como já abordado, as duas substâncias são adicionadas à preparação na ausência de estímulo elétrico e a partir disso é observado e calculado os valores iniciais da amplitude da contratura (representa o controle) e comparado aos valores finais. A Figura 12 ilustra o comparativo dessas medidas.

Figura 12. **Respostas contraturantes frente à adição exógena de KCl e ACh (início e final)**. Comparativo entre os protocolos farmacológicos realizados (F55-6, atropina, PEG 400 e óleo de milho).



Fonte: Elaboração própria

Nos protocolos envolvendo PEG 400 e F55-6 observa-se uma queda no valor da ACh, o que evidencia que CBD age inibindo receptores nicotínicos pós-sinápticos. A tênue diminuição de ACh no caso da atropina mostra que este antagonista ocupou receptores muscarínicos pré-sinápticos que têm uma atividade inibitória. Em outras palavras, atropina inibe a atividade inibitória desses receptores. Este resultado pode explicar o efeito facilitador que ocorreu em preparação de mamífero (PRADO; CORRADO, 1987).

O fato de o KCl estar maior aos finais dos protocolos com F55-6 e atropina indica que não houve despolarização da fibra muscular, mostrando o efeito protetor das substâncias.

Considerações finais

Como considerações finais é importante conciliar os resultados a partir do conhecimento acumulado em preparações de mamíferos (abordados na Introdução). Dados importantes não mostrados aqui, mas apresentados no Relatório Final Fapesp é que o CBD 20 mg/mL (n=6) reduziu a resposta contraturante da ACh exógena para 50,6 % ± 9,9 e do KCl para 30,2 % ± 5,4, em preparações de ave. Também foi

apresentado no Relatório Final, que em preparação de mamífero não se verificou danos às células em relação ao controle, quantificadas a partir de microscopia de luz e evidenciada em protocolo em que a preparação foi curarizada previamente e, sob estímulo elétrico direto, a adição de CBD 500 µL não interferiu na resposta basal.

A base de discussão e direcionamento experimental em preparação de mamífero baseou-se no estudo de Topal e colaboradores (2021), os quais postularam uma ação do CBD sobre canais de Na^+, K^+ e Ca^{2+}. É sabido que 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. Segundo Topal e colaboradores (2021), o CBD em concentração superior a 5 µM prolonga a repolarização pelos múltiplos efeitos que possui sobre o canal de potássio. Com isso, pode-se interpretar que o efeito facilitador observado em preparação de mamífero causado pelo CBD decorreria de uma ativação de canais de Na^+ com certa inativação do canal de K, e ativação do canal de Ca^{2+} no terminal nervoso (dado mostrado no Relatório Fapesp). Deve-se abrir uma ressalva pois o CBD produz efeitos antagônicos sobre esses canais, dependendo do modelo experimental utilizado, como visto no estudo em cardiomiócitos ventriculares de coelhos (ISAEV *et al*., 2022). Um resultado mais aproximado a este modelo experimental foi realizado por Layman e Milton (1971) que observaram nenhum efeito de THC e CBD (concentrações acima de $1,59 \times 10^{-5}$ M), em preparações nervo frênico diafragma de ratos; ou sobre contrações de acetilcolina em músculo *rectus abdominis* de rãs.

Quanto ao efeito bloqueador visualizado em preparação de mamífero, a utilização da preparação de ave foi apropriada para melhor explicá-lo. CBD inequivocamente mostrou agir sobre os receptores nicotínicos pós-sinapticos, pela diminuição na amplitude da resposta contraturante da ACh ao final do experimento.

Já do ponto de vista do dano às células teciduais, embora haja certa despolarização frente à adição exógena do KCl em preparações de pintainho, a microscopia óptica realizada em preparações de mamífero mostraram inexistir diferença significativa quando comparadas com preparações controles, mostrando segurança do CBD mesmo quando adicionado diretamente à preparação nervo-músculo.

6. CONCLUSÃO

Do modelo experimental em mamífero depreende-se (RELATÓRIO FINAL PROCESSO 2020/14214-6):

1) CBD age primeiramente causando um efeito facilitador para depois causar bloqueio neuromuscular dependente da concentração.
2) O Ca^{2+} participa do efeito facilitador impedindo a instalação do bloqueio neuromuscular.
3) Nossa hipótese para o efeito facilitador, corroborado por achados na literatura é que canais de Na^{+} e Ca^{2+} são ativados, enquanto o canal de K^{+} é inativado pelo CBD.
4) A preparação de mamífero não foi suficiente para estabelecer uma interpretação sobre o bloqueio neuromuscular.
5) As preparações neuromusculares submetidas às análises histológicas mostraram não haver diferença significativa entre controle e CBD, nos parâmetros comparados.

Do modelo experimental em pintainhos depreende-se:

1) Utilizando-se a mesma concentração, o CBD não expressou efeito facilitador, apenas um bloqueio neuromuscular progressivo, mostrando que as preparações respondem de forma diferente quanto à sensibilidade ao CBD.
2) Esta preparação permitiu visualizar o efeito do CBD sobre receptores nicotínicos explicando a natureza do bloqueio.
3) A maior sensibilidade da preparação afetou a resposta contraturante frente à adição exógena de KCl.

Dos protocolos complementares realizados neste TCC em preparação de ave:

- em nível pré-sináptico: o uso de F55-6 um agonista de canais de Na^{+} impediu o bloqueio neuromuscular característico do CBD, mostrando que o CBD age pré-sinapticamente;

  O uso de atropina, um antagonista de receptor muscarínico, impediu o bloqueio neuromuscular característico do CBD, mostrando que o CBD age pré-

sinapticamente, além de explicar o efeito facilitador visualizado na preparação de mamífero.

- em nível pós-sináptico: F55-6 e atropina impediram a despolarização frente à adição exógena do KCl;
PEG 400 e CBD competem pelo mesmo sítio controlador da liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático; e mostra a importância do Ca^{2+};
Receptores nicotínicos explicam a natureza bloqueadora do CBD ocorridas em ambas as preparações.

Esses achados são corroborados pelos estudos de Turkanis e Karler (1986; 1988), que concluíram que CBD atua tanto em alvos pré-sinápticos como pós-sinápticos, além de reforçar os resultados de Topal e colaboradores (2021), que concluíram que canais de Na^{+}, K^{+} e Ca^{2+} participam dos efeitos do CBD em sinapses nervo-músculo.

7. CRONOGRAMA

Data	Semana	Atividades
Agosto de 2022	**2ª semana**	Inicio do planejamento do TCC
	3ª semana	Construção da metodologia
Setembro de 2022	**1ª semana**	Estudo e análise de quais protocolos seriam usados
	2ª semana	Realização de experimentos em JNM
	3ª semana	Realização de experimentos em JNM
	4ª semana	Realização de experimentos em JNM
Outubro de 2022	**1ª semana**	Discussão dos resultados com o orientador
	2ª semana	Construção do texto do projeto
	3ª semana	Finalização e última discussão com o orientador.
	4ª semana	Correção do TCC e entrega da versão final.
Novembro de 2022	**1ª semana**	Elaboração do slide de apresentação
	2ª semana	Apresentação do TCC

REFERÊNCIAS

ABBS, E. T.; JOSEPH, D. N. The effects of atropine and oxotremorine on acetylcholine release in rat phrenic nerve-diaphragm preparations. **British Journal of Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 481, 1981.

ADAMS, R.; HUNT, M.; CLARK, J. H. Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, p. 196, 1940

ALMERS, W.; PALADE, P. Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. **The Journal of Physiology**, v. 312, n. 1, p. 159-176, 1981.

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.

ARISI, G. M. A. M.; NEDER, L.; MOREIRA, J. E. O ciclo da vesícula sináptica: panorama molecular. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 34, n. 2, p. 154-169, 2001.

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

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 2 ed. Artmed Editora, 2008.

BERÁNEK, R.; VYSKOČIL, F. The effect of atropine on the frog sartorius neuromuscular junction. **The Journal of Physiology**, v. 195, n. 2, p. 493-503, 1968.

BRITCH, S. C.; BABALONIS S, WALSH S. L. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. **Psychopharmacology (Berl).** v. 238, n. 1, p. 9-28, 2021. doi:

10.1007/s00213-020-05712-8. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33221931; PMCID: PMC7796924.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology,** v. 16, n. 1, p. 521-555, 2000.

CHANG, C. C.; TANG, S. S. Differentiation between intrinsic and extrinsic acetylcholine receptors of the chick Biventer cervicis muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 282, n. 4, p. 379–388, 1974.

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

ENGEL, A. G. The neuromuscular junction. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 91, n. 3, p. 103–148, 2008. doi:10.1016/s0072-9752(07)01503-5

GINSBORG, B. L.; WARRINER, J. The isolated chick biventer cervicis nerrve-musclrepreparation**. Brithish Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 410, 1960.

HAYAKAWA, K. et al. Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol via CB(1) receptor-dependent mechanism. **Brain Research**. v. 10, p. 157-164, 2008. doi: 10.1016/j.brainres.2007.09.090. Epub 2007 Oct 12. PMID: 18021759.

HEMMINGS, H. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. **British Journal of Anaesthesia,** v. 103, n. 1, p. 61-69, 2009.

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.

HUGHES, B. W.; KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. **Muscle & Nerve**, v. 33, n. 4, p. 445-461, 2006.

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

IVERSEN, L. Cannabis and the brain. **Brain**, v. 126, n. 6, p. 1252-1270, 2003. doi:10.1093/brain/awg143

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

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

KATZUNG, B. G. et al. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2014. 1228p.

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

LAYMAN, J. M.; MILTON A.S. Some actions of delta-1 tetrahydrocannabinol and cannabidiol at cholinergic junctions. **Br J Pharmacol,** v. 41, n. 2, p. 379-380, 1971. doi: 10.1111/j.1476-5381.1971.tb08039.x. PMID: 5572283; PMCID: PMC1703324.

MATHIS, U.; FELDKAEMPER M. P.; SCHAEFFEL, F. Effects of Single and Repeated Intravitreal Applications of Atropine on Choroidal Thickness in Alert Chickens. **Ophthalmic Research**, v. 64, n. 4, p. 664-674, 2021. doi:10.1159/000515755

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.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Haschich. I. The Structure of Cannabidiol. **Tetrahedron**, n.19, v.12, p. 2073-2078, 1973. doi:10.1016/0040-4020(63)85022-x

MOORE, E.; HUNTER, J. The new neuromuscular blocking agents: do they offer any advantages? **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 6, p. 912-925, 2001.

NISHIMUNEI, H., SHIGEMOTO, K. Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. **Neurologic Clinics**, v.36, n. 2, p. 231-240, 2018. doi:10.1016/j.ncl.2018.01.009

ODIEKA, A. et al. The Medicinal Natural Products of *Cannabis sativa* Linn.: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1689, 2022.

OSHIMA, M. et al. Insights of the effects of polyethylene glycol 400 on mammalian and avian nerve terminals. **Muscle & Nerve**, v. 41, n. 4, p. 540-546, 2010

PACHER P.; BÁTKAI S.; KUNOS G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacol Reviews.** v. 28, n. 3, p. 389-462, 2006. doi: 10.1124/pr.58.3.2. PMID: 16968947; PMCID: PMC2241751.

PRADO, W. A., CORRADO, A. P. Cholinergic agonist and antagonist interactions on motor nerve endings of the rat — evidence for the involvement of presynaptic receptors in the regulation of acetylcholine release. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 1987

RAYMUNDO, P. G.; SOUZA, P. R. K. *Cannabis sativa L*: os prós e contras do uso terapêutico de uma droga de abuso. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde,** v. 3, n. 13, p. 23-30, 2007.

RELATÓRIO FINAL PROCESSO 2020/14214-6. Relatório científico aprovado pela Fapesp conforme despacho emitido em 11.08.2022.

RIKER, W. F.; STANDAERT, F. G. The action of facilitatory drugs and acetylcholine on neuromuscular transmission. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 135, n. 1, p. 163-176, 1966.

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

SANCHEZ, J.; STEFANI, E. Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog. **The Journal of Physiology**, v. 283, n. 1, p. 197-209, 1978.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

SPINELLA, M. Herbal Medicines and Epilepsy: The Potential for Benefit and Adverse Effects. **Epilepsy & Behavior**, v. 2, n. 6, p.524–532, 2001. doi:10.1006/ebeh.2001.0281

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

TRIBUIANI, N. et al. In situ effects of doxycycline on neuromuscular junction in mice. **Current Molecular Medicine**, v. 22, p. 349-353, 2022.

TURKANIS, S. A., KARLER, R. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, 11 -hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neuromuscular transmission in the frog. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 11, p. 1273–1278, 1986.

TURKANIS, S. A., KARLER, R. Changes in neurotransmitter release at a neuromuscular junction of the lobster caused by cannabinoids. **Neuropharmacology**, v. 27, n. 7, p. 737-742, 1988.

WERNER, A. C. et al. The facilitatory effect of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga) fractions on the contractile activity of mammalian and avian neuromuscular apparatus. **Curr Pharm Biotechnol,** v. 16, n. 5, p. 468-481, 2015.

YOSHIDA, E. H. et al. A Highly polar phytocomplex involving rutin is responsible for the neuromuscular facilitation caused by Casearia sylvestris (guacatonga). **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 15, p. 1360-1368, 2016. doi.org/10.2174/1389201017666161117145947 PMID: 27855599

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

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA–UNISO

PARECER

Protocolo nº 193/2020
Interessado (a): Yoko Oshima Franco
Orientador (a): o mesmo
Título do Projeto: Efeito do canabidiol (*Cannabis sativa*) em preparações neuromusculares

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:

[X] **APROVADO**.

[ ] **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:

Item 10.2 - Faltou responder com "não se aplica" o item dor. Acertar o texto do item 13 - Substituir sacrificado por eutanasiado. Incluir o significado da sigla ASP.

Nome: Denise Grotto

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura:

Data: 08/12/2020

ANEXO B

República Federativa do Brasil
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

A Diretora do Instituto de Ciências Biomédicas, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto da Universidade de São Paulo, certifica que

Maria Luíza Rodrigues de Castro da Silva

de nacionalidade brasileira,
portadora da cédula de identidade RG nº 577583268 SP,
nascida a 14 de março de 2000 e natural do Estado de São Paulo,
concluiu o

Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão:
Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório

E, para que possa gozar de todos os direitos e prerrogativas legais, outorga-lhe o presente Certificado.

São Paulo, 28 de julho de 2022

Presidente da Comissão de Cultura e Extensão Universitária
Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Diretora
Patricia Gama

Código de controle: **BNPY-XXQT-YNLE-ERTC**

ANEXO C

República Federativa do Brasil
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

A Diretora do Instituto de Ciências Biomédicas, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto da Universidade de São Paulo, certifica que

Isabella Ravazoli

de nacionalidade brasileira,
portadora da cédula de identidade RG nº 589126817 SP,
nascida a 15 de junho de 1999 e natural do Estado de São Paulo,
concluiu o

Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão:
Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório

E, para que possa gozar de todos os direitos e prerrogativas legais, outorga-lhe o presente Certificado.

São Paulo, 28 de julho de 2022

Presidente da Comissão de Cultura e Extensão Universitária
Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Diretora
Patricia Gama

Código de controle: **PTE4-RS1G-PMDU-RUPJ**