

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Humanas Letras e Artes
Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento

ALINE MATILDE FERREIRA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIEPILÉPTICO DE UM ÓLEO DE EXTRATO DE
Cannabis sativa RICO EM CANABIDIOL: UMA ABORDAGEM *in silico* E *in vivo*

ORIENTADORA:
Prof. Dra. Mirian Graciela Da Silva Stiebbe Salvadori

João Pessoa – PB

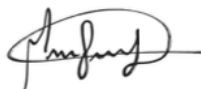
2023

ALINE MATILDE FERREIRA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIEPILEPTICO DE UM ÓLEO DE EXTRATO DE
Cannabis sativa RICO EM CANABIDIOL: UMA ABORDAGEM *in silico* E *in vivo*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Neurociência
Cognitiva e Comportamento do Centro de
Ciências Humanas e Letras da Universidade
Federal da Paraíba, para obtenção do título de
MESTRE EM NEUROCIÊNCIA
COGNITIVA E COMPORTAMENTO. Área
de concentração: Neurociência Pré-clínica e
Clínica.

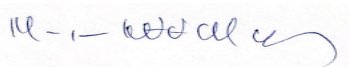
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
Orientadora



Prof. Dr. Leandro Rodrigo Ribeiro
Coorientador



Prof. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz – PPGNeC
Membro Interno



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro– PgPNSB
Membro Externo

João Pessoa-PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237i Santos, Aline Matilde Ferreira dos.

Investigação do potencial antiepiléptico de um óleo de extrato de Cannabis sativa rico em canabidiol : uma abordagem in silico e in vivo / Aline Matilde Ferreira dos Santos. - João Pessoa, 2023.

99 f. : il.

Orientação: Mirian Graciela Da Silva Stiebbe Salvadori.

Coorientação: Leandro Rodrigo Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Epilepsia. 2. Cannabis sativa. 3. Canabidiol. 4. Docking molecular. I. Salvadori, Mirian Graciela Da Silva Stiebbe. II. Ribeiro, Leandro Rodrigo. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.853(043)

Ao meu pai, Reginaldo, por todas as vezes que precisou trabalhar no sol para que eu pudesse me sentar e estudar na sombra. E a minha mãe, Maria José, pois todas as bençãos da minha vida são frutos das suas orações, dedico.

AGRADECIMENTOS

Este é um trabalho de muitas mãos, das mãos que me ajudaram de todas as formas para que ele fosse possível, mas principalmente das mãos que não largaram as minhas em todas as dificuldades nos últimos 2 anos.

Agradeço a **Deus**, ao Deus que eu acredito e que todos os dias me mostra o quanto sou abençoada e amada por ele, mas também agradeço a todos os outros que possam existir, pois toda manifestação de **fé** merece ser respeitada e validada.

Agradeço aos meus pais, **Reginaldo Gomes** e **Maria José Ferreira** por todo suporte e dedicação ao longo de todos esses anos, mas principalmente por me darem o melhor presente que eu poderia ter na minha vida que são os meus irmãos. Por isso agradeço ao meu irmão, **Alisson Ferreira** por ser o meu melhor amigo, meu companheiro de todas as horas, nos momentos bons e ruins e o meu maior incentivador. Agradeço ao meu irmão, **Igor Ferreira**, pelo suporte e apoio sempre que preciso, a minha cunhada **Jailma Porto** e dedico meu amor ao nosso amorzinho, **Heitor**.

Agradeço a minha prima-irmã, **Tatiana Evangelista**, por ser sempre amor, carinho, compreensão e conforto, por estar sempre ao meu lado e do meu lado, não importa a circunstância. E a minha prima **Carla Gessanda**, por todas as memórias, alegrias e lágrimas que compartilhamos uma com a outra através da nossa conexão, ter vocês é mais uma das bênçãos que a vida me deu.

Agradeço a minha amiga **Teresa Lustoza** por tudo, mas principalmente por acreditar e reforçar em mim o sentimento de que eu sou capaz, de que eu consigo e por me lembrar que assim como as outras coisas, “isso também passa”. Agradeço a minha amiga **Luana Amorim**, por ser minha “miga” e minhas companheiras em momentos bons e ruins, de sanidade e perturbações. E ao meu “migo” **Matheus Anderson** pelas corridas e brigas nos poucos momentos de convivência.

Agradeço a **Hellen Fabrícia**, minha psicóloga, que através do seu trabalho, mudou a minha forma de ver e viver a vida, em especial de superar os desafios dos últimos dois anos.

Daqui, agradeço e dedico meus esforços para orgulhar aqueles que hoje vivem em meu coração, mas que lá do céu olham e intercedem de forma incansável por mim.

Por sorte, sou uma pessoa rodeada de **amigos**, de amores que não poderei citar aqui para que não cometa o erro de esquecer alguns, mas aqueles que amo sabem e sentem todos os dias,

sou grata a Deus por ter **vocês** e grata a **vocês** por eu saber que tenho com quem contar e por ser tão querida.

Agradeço a minha orientadora, **Mirian Salvadori**, por me dar a minha primeira oportunidade na pesquisa, por toda paciência, compreensão e conhecimento compartilhado ao longo desses quase oito anos. Que bom que tenho em quem me inspirar. Agradeço a **Leandro Ribeiro** pela coorientação, pelos ensinamentos e por todo suporte que me foi dado nos últimos anos e estendo meus agradecimentos a **Thaíze Lopes**, pela empatia e pelas trocas que pudemos fazer.

Agradeço ao **Laboratório de Psicofarmacologia**, em especial a minha “equipe”, os meus amigos que me ajudaram e fizeram meus dias de experimento felizes e leves. **Teresa Lustoza**, obrigada por acordar cedo para conferir meus cálculos. **Hugo Fernandes**, obrigada por me ensinar que sonhar pequeno gasta mais energia. **Arthur Lins**, obrigada por me encorajar e me ensinar sobre paciência e bondade genuína e por me ensinar o mesmo cálculo mil vezes, ainda não aprendi. **Mayara Cecile**, obrigada por me ensinar sobre resiliência, dedicação e amor, você é um exemplo de pessoa, profissional e mãe. **Jaislânia Lucena**, obrigada por me ensinar sobre competência, sobre organização e gratidão, seus alunos terão muita sorte e você será incrível em qualquer atuação.

Agradeço a **Roseana Meireles**, pela ajuda e por ser uma inspiração para mim desde o primeiro estágio lá na graduação e **Anauara Lima** pela paciência e suporte na análise fitoquímica. Agradeço aos colaboradores, **Sr. Josué**, **Lourdes**, **Luciano** e **Sr. Luís**, por todo serviço prestado, sempre mantendo nosso ambiente de trabalho limpo e a todo momento dedicados a nos ajudar.

Agradeço ao programa de **Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento**, em especial aos professores: **Flávio Barbosa**, **Liana Clébia**, **Luiz Lopes** e **Mirian Salvadori** com quem tive a honra de cumprir as disciplinas e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

Sou e sempre serei grata a **Universidade Federal da Paraíba**, pois além da minha formação, a **UFPB** me deu possibilidades, me permitiu sonhar e acreditar que através da educação eu posso ir longe. Por fim, agradeço as **Políticas Públicas de Educação** por me permitirem sonhar e realizar, por viabilizar que a filha de um pedreiro e de uma professora possa no dia de hoje tornar-se mestra. Que eu possa ser fonte de inspiração na vida de outras pessoas e que outros possam ter ainda mais oportunidades que eu.

*“E foi dando certo. E poderia não ter dado certo. Mas o sonhador é
aquele que faz. Mesmo para errar. Mesmo para aprender com o erro.”*
(Vivendo Como um Guerreiro – W. Nunes)

SANTOS, A. M. F. **Investigação do potencial antiepiléptico de um óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em canabidiol: uma abordagem *in silico* e *in vivo*.** 2023. 91f. **Dissertação** (Mestrado em Neurociência Cognitiva e Comportamento) – UFPB / CCHLA, João Pessoa/PB.

RESUMO

A epilepsia é uma das doenças cerebrais mais comuns, chegando a afetar cerca 2% da população brasileira e aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar de já existir um número considerável de fármacos antiepilépticos no mercado, há uma necessidade de novos medicamentos, principalmente para diminuição da refratariedade aos tratamentos. Na busca por novos tratamentos farmacológicos estão as substâncias encontradas na *Cannabis sativa*. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo de extrato da *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) *in silico* e *in vivo*. Previamente foi realizada a análise fitoquímica para identificação dos componentes majoritários do OERCBD, seguido do *docking* molecular para avaliação da interação dessas moléculas e seus ligantes. Os estudos *in vivo* utilizaram camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos, com cerca de 3 meses de idade, que foram submetidos a avaliação de toxicidade aguda e aos protocolos de triagem farmacológica comportamental (n=3), indução de convulsões pela injeção intraperitoneal (i.p.) de pentilenotetrazol (PTZ, 75mg/kg) (n=8) e Eletrochoque Auricular Máximo (MES) (n=8) com administração aguda ou em repetidas doses do OERCBD durante 14 dias. Os animais foram divididos em grupo controle, que recebeu azeite (AZT), grupos tratados com OERCBD nas doses de 15, 30 e 60mg/kg (v.o.) e diazepam (DZP, 4mg/kg i.p.) no teste do PTZ, ou fenitoína (FEN, 30mg/kg i.p.) no MES. Para análise estatística dos testes de crises epilépticas induzidas, foram realizados os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett para determinar que todos os parâmetros deveriam ser analisados por meio de testes não paramétricos, seguidos do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Para a análise estatística da porcentagem de mortalidade/sobrevivência foi utilizado o teste exato de Fisher, em que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Como resultado, a Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) identificou o CBD como componente majoritário do OERCBD. O estudo *docking* molecular demonstrou haver boa interação entre o CBD e o receptor GABA_A, mas ainda melhor com os canais NaV. Na avaliação da toxicidade aguda, a dose de 300mg/kg (v.o.) apresentou sinais de irritabilidade e sedação, enquanto nas doses definidas para o tratamento (15, 30 e 60mg/kg) tais efeitos não foram observados. No teste do PTZ, o OERCBD nas três doses não foi capaz de aumentar o tempo da latência para as crises epilépticas mioclônicas e tônico-clônicas, impedir ou diminuir a gravidade das crises, mas protegeu os animais da ocorrência de morte quando comparado ao grupo AZT. No MES, as três doses de OERCBD tanto na administração aguda quanto em doses repetidas não foram capazes de diminuir a duração das crises epilépticas tônicas com a extensão dos membros, tampouco a latência para recuperação da postura, porém na administração aguda houve uma redução da ocorrência de mortes, em especial nas doses mais altas, enquanto na administração em doses repetidas houve uma piora em tal parâmetro, principalmente na dose mais baixa. Os resultados *in vivo* demonstram que apesar de haver uma boa interação do CBD aos receptores GABA_A e canais de sódio NaV isso pode não ser suficiente, refletindo a necessidade de coadministração com outros fármacos antiepilépticos. Os resultados obtidos contribuem para a compreensão da complexa resposta cerebral aos fitocanabinoides e destaca a importância de investigações adicionais para determinar suas potenciais respostas farmacológicas.

Palavras-chave: Epilepsia. *Cannabis sativa*. Canabidiol. *Docking* molecular.

SANTOS, A. M. F. **Investigação do potencial antiepiléptico de um óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em canabidiol: uma abordagem *in silico* e *in vivo*.** 2023. 91f. **Dissertação** (Mestrado em Neurociência Cognitiva e Comportamento) – UFPB / CCHLA, João Pessoa/PB.

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common brain diseases, affecting about 2% of the Brazilian population and approximately 50 million people worldwide. Although there is already a considerable number of antiepileptic drugs on the market, there is a need for new drugs, mainly to reduce refractoriness to treatments. In the search for new pharmacological therapies are the substances found in *Cannabis sativa*. Thus, this work aimed to evaluate the effect of *Cannabis sativa* rich in CBD (OERCBD) *in silico* and *in vivo*. Previously, phytochemical analysis was performed to identify the primary components of OERCBD, followed by molecular docking to evaluate the interaction of these molecules and their ligands. The *in vivo* studies used male Swiss albino mice (*Mus musculus*), around 3 months old, which were submitted to behavioral pharmacological screening protocols and determination of LD₅₀ (n=3), induction of seizures by intraperitoneal injection (i.p) of pentylenetetrazole (PTZ, 75mg/kg) (n=8), and the maximum atrial electroshock (MES) model (n=8) with acute or repeated doses administration of OERCBD for 14 days. The animals were divided into a control group, which received olive oil (AZT), groups treated with OERCBD at doses of 15, 30 and 60mg/kg (v.o) and diazepam (DZP, 4mg/kg i.p) in the PTZ test, or phenytoin (FEN, 30mg/kg i.p) in the MES. For the statistical analysis of the induced epileptic seizure tests, the Shapiro-Wilk and Bartlett tests were performed to determine that all parameters should be analyzed using non-parametric tests, followed by the Kruskal-Wallis test and the Dunn test. For the statistical analysis of the percentage of mortality/survival, Fisher's exact test was used, p values <0.05 were considered statistically significant. As a result, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) identified CBD as the primary component of OERCBD. The molecular docking study demonstrated a good interaction between CBD and the GABA_A receptor, but even better with NaV channels. In acute toxicity and LD₅₀, the dose of 300mg/kg (v.o) showed signs of irritability and sedation, while in the doses defined for the treatment (15, 30 and 60mg/kg) such effects were not observed. In the PTZ test, OERCBD in the three doses was not able to increase the latency time for myoclonic and tonic-clonic epileptic seizures, prevent or decrease the severity of the seizures, but protected the animals from the occurrence of death when compared to the group AZT. In MES, the three doses of OERCBD both in acute and repeated doses administration were not able to reduce the duration of tonic epileptic seizures with the extension of the limbs, nor the latency for posture recovery, but in acute administration, there was a reduction in the occurrence of deaths, especially in the highest doses. In the repeated doses administration, there was a worsening in this parameter, mainly in the lowest dose. The *in vivo* results demonstrate that although there is a good interaction between CBD and GABA_A receptors and NaV sodium channels, this may not be enough, reflecting the need for co-administration with other antiepileptic drugs, as already recommended in the clinic. However, the results contribute to understanding the complex brain response to phytocannabinoids and highlight the importance of further investigations to determine your potential pharmacological responses.

Keywords: Epilepsy. *Cannabis sativa*. Canabidiol. Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cannabis sativa</i> (<i>C. sativa</i>).....	28
Figura 2. Inflorescência da <i>C. sativa</i>	29
Figura 3. Estrutura química do Δ -9THC.....	30
Figura 4. Estrutura química do CBD.....	30
Figura 5. Biossíntese e degradação dos componentes básicos do Sistema Endocanabinoide.....	34
Figura 6. Desenho experimental.....	42
Figura 7. Ilustração de Camundongo <i>Mus musculus</i>	43
Figura 8. Administração por via oral.....	44
Figura 9. Protocolo OECD.....	46
Figura 10. Experimento das crises epiléticas induzidas por PTZ em camundongos.....	50
Figura 11A. Experimento das crises epiléticas induzidas por MES em camundongos após tratamento agudo com OERCBD.....	51
Figura 11B. Experimento das crises epiléticas induzidas por MES em camundongos após tratamento com doses repetidas com OERCBD.....	51
Figura 12A. Análise Cromatográfica do OERCBD.....	57
Figura 12B. Espectro de massas de OERBD (TR 67,489 min) e do canabidiol (bibliotecas WILEY9.LIB e NIST08.LIB).....	58
Figura 13. Interações em 3D e 2D do A) canabinol, B) canabidiol e C) diazepam com o GABA _A	60
Figura 14. Interações em 3D e 2D do A) canabidiol e B) fenitoína com a NaV.....	63
Figura 15. Latência para o primeiro espasmo mioclônicos induzido pela administração de PTZ.....	64
Figura 16. Latência para primeira crise tônico-clônica induzida pela administração de PTZ.....	65
Figura 17. Duração das crises tônico-clônicas induzidas pela administração de PTZ.....	66
Figura 18. Latência para a morte, sobrevivência e mortalidade no modelo das crises epiléticas induzidas por PTZ.....	67
Figura 19. Intensidade das crises epiléticas de acordo com a Escala adaptada de Racine....	68
Figura 20. Duração das crises tônicas no Teste do MES após administração aguda.....	69
Figura 21. Latência para recuperação da postura no Teste do MES após administração aguda.....	70

Figura 22. Latência para a morte, sobrevivência e mortalidade no Teste do MES após administração aguda.	71
Figura 23. Duração das crises tônicas no Teste do MES após administração de doses repetidas.	72
Figura 24. Latência para recuperação da postura no Teste do MES após administração de doses repetidas.	73
Figura 25. Latência para a morte, sobrevivência e mortalidade no Teste do MES após administração de doses repetidas.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da CG-EM do OERCBD.	58
Tabela 2. Resultados da energia de ligação por <i>docking</i> molecular com o alvo GABA _A	59
Tabela 3. Resultados da energia de ligação por <i>docking</i> molecular com o alvo NaV.	62

LISTA DE QUADROS E ESQUEMAS

Quadro 1. Classificação ILAE.	22
Quadro 2. Principais Drogas Antiepilépticas (DAEs) e suas aplicabilidades na clínica.	25
Quadro 3. Resultados dos sinais de toxicidade aguda observados.	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
Å	Angstrom
AA	Ácido Araquidônico
ABRACE	Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança
AEA	Anandamida
AM1	Austin Model 1
AM6701	N-dimetil-2H-tetrazol-2-carboxamida
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
ANOVA	Análise de Variância

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APEPI	Apoio à Pesquisa e Paciente de <i>Cannabis</i> Medicinal
ATP	Adenosina Trifosfato
AZT	Azeite de Oliva (grupo controle)
°C	Celsius
<i>C. indica</i>	<i>Cannabis indica</i>
<i>C. ruderalis</i>	<i>Cannabis ruderalis</i>
<i>C. sativa</i>	<i>Cannabis sativa</i>
Ca ²⁺	Íon de cálcio
cAMP	Monofosfato Cíclico De Adenosina
CB1R	Receptor endocanabinoide tipo 1
CB2R	Receptor endocanabinoide tipo 2
CBD	Canabidiol
CBR	Receptor endocanabinoide
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFM	Conselho Federal de Medicina
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
Cl ⁻	Íon cloreto
CS	Coluna de Separação
DAEs	Drogas Antiepilépticas
DAG	1,2-diacilglicerol
DAGL	Fosfolipase-C-beta-diacilglicerol-lipase
DGL	Diacilglicerol Lipase
DL ₅₀	Dose Letal mediana
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DZP	Diazepam
E.P.M.	Erro Padrão da Média
ECR	Estudo Clínico Randomizado
EI	Impacto de Elétrons
FAAH	Hidrolase de Amida de Ácido Graxo
FEN	Fenitoína

GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GABA _A	Receptor GABA tipo A
GABA _B	Receptor GABA tipo B
Gi	Proteína G inibitória (subtipo)
Glu	Glutamato
Go	Proteína G olfatória (subtipo)
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
GPR55	Receptor 55 Acoplado A Proteína G
ILAE	Liga Internacional Contra Epilepsia
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de Similaridade
K ⁺	Íon de potássio
KATP	Canal de K ⁺ Sensível ao ATP
kcal	Quilocaloria
kg	Quilogramas
LGS	Lennox-Gastaut
m/z	Massa/Carga
mA	Miliampere
MAGL	Monoacilglicerol Lipase
MAP	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MES	Eletrochoque Auricular Máximo
mg	Miligramas
MPF	Ministério Público Federal
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MVD	<i>Molegro Virtual Docker</i>
NAPE	N-araquidonilfosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	N-araquidonil-fosfatidil-fosfolipase-D
NAT	N-aciltransferase
NaV	Canal de Sódio Voltagem-dependente
NaV 1.7	Canal de Sódio Voltagem-dependente tipo 1.7
NAV1.1	Canal de Sódio Voltagem-dependente tipo 1.1
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

NMDA	N-metil-D-aspartato
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OERCBD	Óleo De Extrato Da <i>Cannabis sativa</i> . Rico em CBD
OEs	Óleos Essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PTZ	Pentilenotetrazol
RMSD	Desvio Médio da Raiz Quadrática
RNA	Ácido Ribonucleico
SCN1A	Proteína Canal de Sódio Tipo 1 Subunidade Alfa
SNC	Sistema Nervoso Central
▲-9THC	Delta-9 tetrahydrocannabinol
TR	Tempo de Retenção
TRP	Receptores De Potencial Transitório
TRPA	Receptor De Potencial Transitório Anquirina
TRPM	Receptor De Potencial Transitório Melastina
TRPV1	Receptor De Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1
TRPV2	Receptor De Potencial Transitório Vanilóide Tipo 2
TRPV3	Receptor De Potencial Transitório Vanilóide Tipo 3
TRPV4	Receptor De Potencial Transitório Vanilóide Tipo 4
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UPA	Unidade de Produção Animal
V	volts
v.i.	Via Intraperitoneal
v.o.	Via Oral
VGSCs	<i>Voltage Gated Sodium Channels</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REREFENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Epilepsia	21
2.2 Fisiopatologia da Epilepsia	23
2.3 Farmacoterapia da Epilepsia.....	24
2.4 Estudos computacionais <i>in silico</i>	26
2.5 Modelos não-clínicos para estudo da epilepsia	26
2.6 A <i>Cannabis sativa</i>	27
2.7 Fitocanabinoides	29
2.8 Efeito comitiva	31
2.9 Sistema endocanabinoide	32
2.9.1 Biossíntese dos Endocanabinoides	32
2.9.2 Degradação dos endocanabinoides	33
2.9.3 Receptores Endocanabinoides	34
2.10 <i>Cannabis sativa</i> e Epilepsia	36
2.11 Associações Brasileiras de <i>Cannabis</i>	37
2.12 Óleos de Extrato de <i>Cannabis sativa</i>	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	40

3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Desenho Experimental	42
4.2 Modelo animal, procedência e aprovação ética	43
4.3 Condições de alimentação e alojamento dos animais	43
4.4 Vias de administração	43
4.5 Investigação de toxicidade aguda.....	45
4.6 Avaliação comportamental e triagem farmacológica	46
4.7 Tratamentos.....	47
4.8 Análise cromatográfica do óleo de extrato de <i>Cannabis sativa</i> rico em CBD (OERCBD)	47
4.9 <i>Docking</i> molecular	48
4.10 Avaliação da administração de OERCBD em modelos animais de crises epilépticas	49
4.10.1 Testes das crises epilépticas induzidas por Pentilenotetrazol	49
4.10.2 Testes das crises epilépticas induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)	50
4.11 Análise Estatística	52
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Investigação de toxicidade aguda.....	54
5.2 Avaliação comportamental e triagem farmacológica	54

5.3 Análise cromatográfica do óleo de extrato da <i>Cannabis sativa</i> rico em CBD (OERCBD)	56
5.4 Docking Molecular.....	59
5.5 Avaliação da administração do OERCBD em modelos animais de crises epiléticas	64
5.5.1 Testes das crises epiléticas induzidas por Pentilenotetrazol	64
5.5.2 Testes das crises epiléticas induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES) após administração aguda do tratamento com OERCBD.....	68
5.5.3 Testes das crises epiléticas induzidas pelo MES após administração de doses repetidas de OERCBD.....	72
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	98
ANEXO I – QUADRO CONTENDO DOS PARÂMETROS AVALIADOS NA TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL.	98
ANEXO II - ESCALA ADAPTADA DE RACINE	99

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A *International League Against Epilepsy* (ILAE) descreve o conceito de crise epiléptica como “uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido ao excesso anormal ou assíncrono da atividade neural de forma crônica no cérebro”. A epilepsia é uma das doenças cerebrais mais comuns, chegando a afetar cerca 2% da população brasileira e aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo (Organization, 2023). É caracterizada por episódios repetitivos e sustentados de crises epiléticas espontâneas, resultando em uma série de consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais (Thijs et al., 2019). Essas consequências desencadeiam em pacientes epiléticos outras doenças neurobiológicas, como ansiedade, depressão e fibromialgia, diminuindo ainda mais a qualidade de vida desses indivíduos (J. J. Falco-Walter et al., 2018).

Uma parcela das pessoas com epilepsia é refratária ao tratamento, que ocorre quando a resposta medicamentosa não é totalmente satisfatória, ou ainda, quando oferece em contrapartida efeitos indesejados, que resultam em prejuízo nas atividades cotidianas (Löscher et al., 2020). Apesar de já existir um número considerável de fármacos antiepiléticos no mercado, há uma necessidade de novos medicamentos, principalmente para diminuição da existência dessa refratariedade. Sendo assim, a busca por compostos com potencial anticonvulsivante de diferentes naturezas químicas, como também a modificação estrutural de moléculas já existentes pode resultar na descoberta de novas alternativas farmacológicas para tratamentos mais eficazes ((Faggion et al., 2011).

Incluídos no grupo dos potenciais antiepiléticos estão algumas das substâncias presentes na *Cannabis sativa*. O efeito antiepilético dos compostos dessa espécie pode ser observado em casos clínicos utilizando seus extratos brutos (da Silva Junior et al., 2022; Gedde & Maa, 2013; Maa & Figi, 2014; Press et al., 2015), como também em estudos com compostos isolados da planta (Cunha et al., 1980; Davis & Ramsey, 1949; Devinsky et al., 2016; Mechoulam & Carlini, 1978).

Contudo, a utilização da *Cannabis sativa* para o tratamento da epilepsia é milenar, e no final do século XIX pesquisadores britânicos e americanos já relatavam diminuição de crises epiléticas por meio do seu uso (O’Connell et al., 2017). Porém, seus estudos e resultados benéficos não se resumem apenas a epilepsia, sendo observado outros efeitos, como

analgésico, antiemético, neuroprotetor e anti-inflamatório (Grotenhermen & Müller-Vahl, 2012a).

Apesar de famoso, tal potencial terapêutico encontra-se longe de ser elucidado por completo. O que se sabe é que os responsáveis pelos seus efeitos são os chamados fitocanabinoides, metabólitos secundários encontrados na planta (O’Connell et al., 2017). Descobriu-se também que o próprio organismo humano é capaz de produzir endocanabinoides, que são substâncias similares às encontradas na *Cannabis sativa* (Lu & Mackie, 2021). Além disso, sabe-se que os efeitos observados com o uso dos fitocanabinoides são influenciados por um mecanismo chamado de “efeito comitiva”, no qual a utilização dos compostos da *Cannabis sativa* de forma conjunta, com seus vários constituintes, demonstra efeitos mais promissores do que seu uso isolado (Russo, 2011).

Nesse contexto, o óleo enriquecido com fitocanabinoides derivados da *Cannabis sativa* utilizado neste estudo não-clínico foi gentilmente cedido pelo Apoio à Pesquisa e Pacientes de *Cannabis* Medicinal (APEPI) e já é utilizado por pacientes na clínica, inclusive para o tratamento de crises epiléticas. Nesse sentido, esta pesquisa contribui com a construção de evidências científicas a respeito do potencial antiepilético do produto em questão tanto para fabricantes e fornecedores, quanto para os usuários.

A vista de todo o potencial ainda inexplorado da planta somado à necessidade de novas alternativas terapêuticas para a epilepsia, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da administração de óleo enriquecido com fitocanabinoides em modelos animais de crises epiléticas, assim como a determinação de possíveis sinais de toxicidade a nível de sistema nervoso central após administração aguda.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REREFENCIAL TEÓRICO

2.1 Epilepsia

A epilepsia é uma doença crônica não transmissível que afeta cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo e aproximadamente 2% da população brasileira, podendo ocorrer em qualquer fase da vida (Organization, 2023). Embora a probabilidade de uma pessoa ter uma crise epilética esteja em torno de 10% e que cada indivíduo possa ao longo da sua vida sofrer ao menos uma única crise, isso não significa que a pessoa desenvolverá a doença (J. Falco-Walter, 2020).

Estima-se que 4 a 10 pessoas em cada mil são diagnosticadas com a doença, chegando a atingir anualmente um número de 5 milhões. Contudo, essas taxas sofrem variações em relação ao desenvolvimento do país e da condição em que a população vive, por exemplo, em países desenvolvidos, estima-se cerca de 49 a cada 100 mil pessoas com epilepsia, em contrapartida, países menos desenvolvidos esse número pode chegar a 139 a cada 100 mil (Organization, 2023).

Segundo a Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE), sua classificação (Quadro 1) deverá ser realizada de acordo com o tipo de crise, tipo de epilepsia, etiologia e síndrome associada (Perucca et al., 2018). Deve-se considerar a importância dessa classificação na obtenção de diagnósticos e etiologias mais claros (J. Falco-Walter, 2020), de forma que tal classificação dará direcionamento ao tratamento na ausência de algumas informações, como a presença de alguma doença ou síndrome que o torne predisposto a desenvolver a doença (Fisher et al., 2017).

Quadro 1. Classificação ILAE.

Início Focal		Início Generalizado	Início Desconhecido
Consciente	Inconsciente	Motor	Motor
Início Motor			
• Automatismo • Atônica • Clônica • Espasmos • Hipercinéticos • Mioclônica		• Tônico-clônica • Clônica • Mioclônica • Mioclônica-tônico-clônica • Mioclônica-atônica • Atônica • Espasmos	• Tônico - clônica • Espasmos
Início Não-Motor		Não-Motor (ausência)	Não-motor
• Autônomo • Comportamental • Cognitivo • Emocional • Sensorial		• Típica • Atípica • Mioclônica • Mioclônia palpebral	• Alterações comportamentais
Focal para bilateral tônico-clônica			Não-classificadas

Fonte: Adaptado de Fisher et al., 2017 e Perucca et al., 2018.

As características das crises são variáveis e dependentes da região do cérebro onde se inicia o distúrbio até o ponto onde ele alcança (Organization, 2023). Uma crise epiléptica é caracterizada por episódios convulsivos espontâneos que podem acontecer de forma focal ou geral (Löscher et al., 2020). As crises consideradas parciais são aquelas que partem de apenas uma região do cérebro, onde as pessoas podem ter sua consciência prejudicada ou não e ainda contar com a ausência ou não de sinal motor. Já nas crises generalizadas, o início embora parta de um ponto específico se espalha rapidamente por todo o hemisfério cerebral com a presença de características motoras ou não (Fisher et al., 2017).

Estima-se que 25% dos casos de epilepsia podem ser evitáveis, de modo que a forma mais eficaz ainda é a prevenção de lesões na região da cabeça, cuidados no parto, assim como o uso de medicamentos que diminuam a temperatura corporal de crianças e evitam a chances

de crises febris (Organization, 2023). Os danos causados pela epilepsia vão além dos cognitivos e psicossociais, refletindo também em impactos econômicos, uma vez que os gastos com o tratamento desses pacientes são elevados, sendo reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde pública (Organization, 2023; Thijs et al., 2019).

2.2 Fisiopatologia da Epilepsia

A fisiopatologia da epilepsia ainda não está completamente elucidada. Estudos sugerem que a doença pode ser mais complexa e que pode envolver não apenas crises epiléticas espontâneas, mas também componentes sistêmicos do corpo (Fisher et al., 2017; Yuen et al., 2018). Essas crises ocorrem quando há disparos anormais e assíncronos em regiões específicas ou, até mesmo, em todo o cérebro, podendo ter sua origem tanto da má formação das redes neurais, quanto de algum distúrbio estrutural, infeccioso ou metabólico (J. Falco-Walter, 2020).

As crises epiléticas afetam consideravelmente a liberação de neurotransmissores, assim como as propriedades dos receptores e canais. Isso porque, a sua fisiopatologia está diretamente ligada a vários dos neurotransmissores, sendo os principais e mais conhecidos, o Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) e Glutamato, que desempenham respectivamente papéis inibitórios e excitatórios no sistema nervoso (Sierra-Paredes & Sierra-Marcuño, 2007).

O GABA é formado dentro dos terminais axonais dos neurônios GABAérgicos e em seguida liberado na sinapse. Seus principais receptores são o GABA_A, que age controlando a entrada de cloreto (Cl⁻) na célula, e o GABA_B que está presente tanto pré- quanto pós-sinápticamente, aumentando a condutância de potássio (K⁺) e diminuindo a entrada de cálcio (Ca²⁺), respectivamente (Treiman, 2001). Este é o principal neurotransmissor inibitório no córtex cerebral, e é responsável por manter o tônus inibitório normal, necessário para a excitação neuronal normal. Alterações nessa condição podem resultar em crises epiléticas (Ghit et al., 2021).

Por sua vez, a hiperexcitação neuronal mediada pelo Glutamato é fundamental no mecanismo que desencadeia as crises epiléticas. O aumento dos níveis de glutamato extracelular no cérebro e/ou a redução das concentrações de GABA resultam em citotoxicidade, crises epiléticas e morte celular (Sarlo & Holton, 2021). O N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e o Ácido α -Amino-3-hidroxi-5-Metilisoxazol-4-Propiônico (AMPA) são moléculas agonistas de receptores glutamatérgicos e possuem a capacidade de induzir crises epiléticas em animais e

humanos, enquanto os antagonistas, como o topiramato e o perampanel demonstram potencial inibidor dessas crises (French et al., 2015; Glauser et al., 2007; Hanada, 2020).

Alguns canais iônicos também podem desempenhar papel fundamental na fisiopatologia da epilepsia, como é o caso dos canais de sódio dependentes de voltagem (VGSCs, do inglês *Voltage Gated Sodium Channels*”), que são atualmente apontados como os principais envolvidos nas epilepsias genéticas (Oliva et al., 2012). Mutações no canal de sódio do tipo NaV 1.1, que é codificado pelo gene SCN1A, prejudicam as correntes de sódio, de forma a influenciar o disparo do potencial de ação normal (Catterall et al., 2010).

Desse modo, compreendendo que a excitabilidade neuronal é determinada pelo fluxo de íons através da membrana, os canais iônicos tornam-se alvos importantes no tratamento das epilepsias e no desenvolvimento de novos fármacos antiepilépticos (Gross & Tiwari, 2018).

2.3 Farmacoterapia da Epilepsia

O tratamento farmacológico da epilepsia consiste basicamente em controlar as crises epiléticas do paciente, utilizando fármacos antiepilépticos, que por sua vez agem sozinhos ou em conjunto com outros fármacos, suprimindo a hiperativação sináptica, agindo nos canais iônicos, enzimas metabólicas, transportadores ou receptores de neurotransmissores (Faggion et al., 2011).

Apesar de existirem muitos medicamentos disponíveis em todo o mundo, poucos são considerados de primeira escolha. Isso se deve principalmente ao fato de que a escolha de cada medicamento antiepiléptico depende do tipo de síndrome a ser tratada, as comorbidades do paciente, riscos de tolerabilidade e características individuais (Thijs et al., 2019). Seus mecanismos de ação não necessariamente estão relacionados a fisiopatologia da doença, mas em geral influenciam nos mecanismos fundamentais da excitabilidade cerebral, com a finalidade de suprimir a condição patológica e anormal (Sills & Rogawski, 2020).

Dito isso, o objetivo das Drogas Antiepilépticas (DAEs) é de garantir principalmente uma melhor qualidade de vida, maximizando o controle das crises e, em contrapartida diminuindo a toxicidade dos medicamentos (Perucca et al., 2018). As principais DAEs, assim como sua principal utilização na clínica encontram-se descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Principais Drogas Antiepilépticas (DAEs) e suas aplicabilidades na clínica.

DAEs de Primeira Geração	Ácido Valpróico Benzodiazepínicos	Todos os Tipos de Crises Epilépticas
	Fenobarbital Primidona	A maioria dos Tipos de Crises Epilépticas
	Carbamazepina Fenitoína	Crises focais, generalizadas e Tônico-clônicas
	Etossuximida	Crises de ausência
DAEs de Segunda Geração	Lamotrigina Levetiracetam Topiramato Zonisamida	A maioria dos Tipos de Crises Epilépticas
	Oxcarbazepina Perampanel	Crises focais, generalizadas e tônico-clônicas
	Vigabatrina	Crises focais e espasmo infantil
	Rufinamida Felbamate	Crises focais associado a Síndrome de Lennox-Gastaut (LGS)
	Acetato de eslicarbazepina Lacosamida Pregabalina Gabapentina Tiagabina Brivaracetam	Crises focais
	Everolimo	Esclerose Tuberosa
	Estiripentol	Crises associadas a Dravet

Fonte: Adaptado de Perucca et al., 2018.

Apesar da vasta disponibilidade de medicamentos no mercado, cerca de um terço dos pacientes que possuem algum tipo de epilepsia ainda sofrem com a chamada epilepsia refratária ou resistente a medicamentos (Löscher et al., 2020). A epilepsia é considerada resistente quando o indivíduo está sendo tratado com duas ou mais DAEs, que possuem uma dose eficaz, boa tolerância e foram adaptadas as necessidades do paciente, mas ainda assim não é observado um quadro de controle das crises (Loizon & Rheims, 2018).

Considerando a multifatorialidade da doença, o manejo de controle das crises epiléticas é feito de acordo com o perfil de cada paciente, visto que cada um experimenta as crises de forma diferente. Além do tratamento farmacológico, algumas alternativas terapêuticas são sugeridas, como terapias com estímulo do nervo vago, modificações da dieta e nos casos mais graves, até mesmo procedimentos cirúrgicos para a remoção do foco epilético (Kaeberle, 2018).

2.4 Estudos computacionais *in silico*

Os estudos computacionais, são uma área de pesquisa que envolve o uso de algoritmos, técnicas e métodos computacionais, como ferramenta para analisar, modelar e resolver problemas em diferentes áreas (Vijayakumar et al., 2020). O *docking* molecular trata-se de uma técnica computacional utilizada principalmente na pesquisa de novos fármacos. Através dela, é possível analisar a interação entre uma molécula alvo (receptor) e a molécula em potencial (ligante), além de encontrar a conformação espacial mais favorável do ligante dentro do sítio de ligação do receptor, podendo assim, prever suas possíveis interações e atividades (Morris et al., 1998).

Tal abordagem, combina métodos de busca algorítmica a cálculos de energia para avaliar o acoplamento das moléculas, sendo fundamental como técnica antecedente aos estudos *in vivo* pois auxiliam na seleção de moléculas promissoras e permitem identificar compostos candidatos a novos fármacos, reduzindo custos e contribuindo no desenvolvimento de medicamentos (Kitchen et al., 2004).

Desta forma, o *docking* molecular contribui substancialmente na busca por novos fármacos para o tratamento de várias doenças, incluindo a epilepsia. Através dele, é possível avaliar a interação das moléculas aos alvos moleculares, como canais iônicos e receptores que estão relacionados a doença, sendo uma ferramenta valiosa na descoberta de novos tratamentos farmacológicos antiepiléticos e servindo como importante ferramenta de norteio dos ensaios experimentais (T. C. M. L. Rodrigues et al., 2023; Schmidt & Löscher, 2005).

2.5 Modelos não-clínicos para estudo da epilepsia

Modelos animais são a base para o desenvolvimento e identificação de terapias antiepiléticas (CARLINI; MENDES, 2011). Foi através deles que Merritt e Putnam relataram

em 1938 a eficácia da fenitoína através de um modelo de convulsão por eletrochoque em ratos, assim como Everett e Richards em 1944 que utilizando o modelo de convulsão com Pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos comprovaram a eficácia da trimetadiona, fármaco que mais tarde se mostrou capaz de bloquear crises de ausência em humanos (Löscher, 2017).

Os modelos citados anteriormente, embora já tenham sido propostos há alguns anos, ainda são os mais utilizados na busca por novas DAEs. O Eletrochoque auricular máximo (MES) e o teste do PTZ são capazes de induzir crises epiléticas agudas por meio de estimulação elétrica e química, respectivamente (Almeida, 2006). O PTZ é um derivado tetrazol com ação antagonista do receptor GABA_A, que bloqueia o canal de cloreto (Cl) e impede a ação inibitória central do GABA, induzindo crises generalizadas, de ausência, mioclônicas e tônico-clônicas (Carlini & Mendes, 2011). Já no MES, as crises epiléticas ocorrem devido a despolarização anormal das células neuronais, especialmente por meio da alteração dos canais de sódio, causada pelos pulsos elétricos, que desencadeiam hiperexcitabilidade do SNC, resultando em crises do tipo tônico-clônicas, caracterizadas pela extensão dos membros (Melo, 2017; Venâncio, 2015).

2.6 A *Cannabis sativa*

A *Cannabis sativa* L. (Fig. 1) é uma planta pertencente à família *Cannabaceae*, e que tem apenas um gênero, o “*Cannabis*” (Radwan et al., 2021) Possui característica dióica, ou seja, “fêmea” ou “macho” e que ao longo do tempo teve suas diferentes partes utilizadas para fins terapêuticos e/ou recreativos (Bonini et al., 2018). Estudos paleobotânicos demonstram a presença de *Cannabis* há cerca de 11.700 anos nas regiões da Ásia Central, mais precisamente próximo as montanhas de Altai, além do Sudeste asiático também ser apontado como uma região alternativa para o cultivo doméstico da *Cannabis* na mesma época (Crocq, 2022).

Figura 1. *Cannabis sativa* (*C. sativa*).



Fonte: autoria própria, 2023 (ABRACE, João Pessoa 2020).

Quanto a sua classificação taxonômica, além da *Cannabis sativa* (*C. sativa*) há mais duas espécies, a *Cannabis indica* (*C. indica*) e a *Cannabis ruderalis* (*C. ruderalis*), que se diferem principalmente em termos de concentração dos seus metabólitos secundários, os chamados fitocanabinoides. A planta “fêmea” é a grande responsável pela maior concentração de fitocanabinoides, pois essas produzem resina que é acumulada em tricomas glandulares que cobrem densamente a superfície de suas inflorescências (Fig. 2). Por sua vez, as concentrações na planta “macho” são mais baixas pois não possuem inflorescência e as folhagens das espécies são pobres em fitocanabinoides (Bonini et al., 2018; Booth & Bohlmann, 2019).

Figura 2. Inflorescência da *C. sativa*



Fonte: autoria própria, 2023 (ABRACE, João Pessoa 2020).

Além disso, há relatos de que variedades da planta com baixo teor de canabinoides eram ainda utilizadas para a produção de fibras e oleaginosas (Booth & Bohlmann, 2019). Embora a *Cannabis sativa* e seus derivados tenham sido considerados uma ameaça e ainda hoje são proibidos em vários países, sendo a droga ilícita mais consumida no mundo e sua legalização viabilizaria linhas de pesquisa que tem como objetivo explorar seu potencial médico e terapêutico (Charitos et al., 2021).

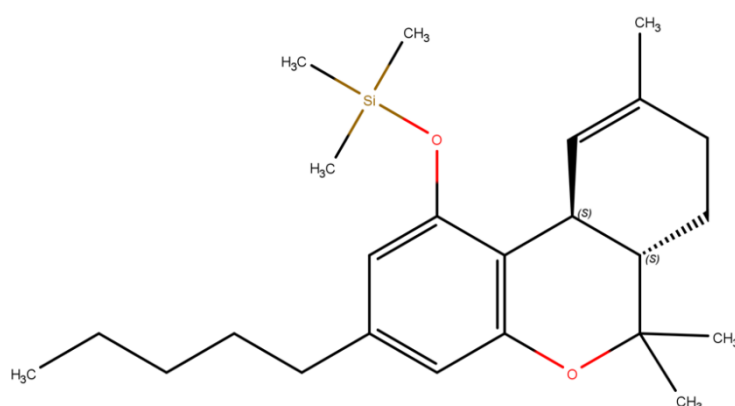
O potencial terapêutico da *Cannabis sativa* acabou tornando-a alvo de vários estudos que buscam investigar os mecanismos pelos quais essa espécie age em doenças como a epilepsia, esclerose múltipla, doença de Parkinson e até mesmo síndromes menos comuns, como a síndrome de Tourette, o que comprova alguns dos benefícios farmacológicos mediados pelos vários constituintes químicos da planta (Stasiłowicz et al., 2021).

2.7 Fitocanabinoides

Os fitocanabinoides são metabólitos secundários pertencentes a uma classe estruturalmente homogênea de monoterpenos extraídos e presentes majoritariamente na

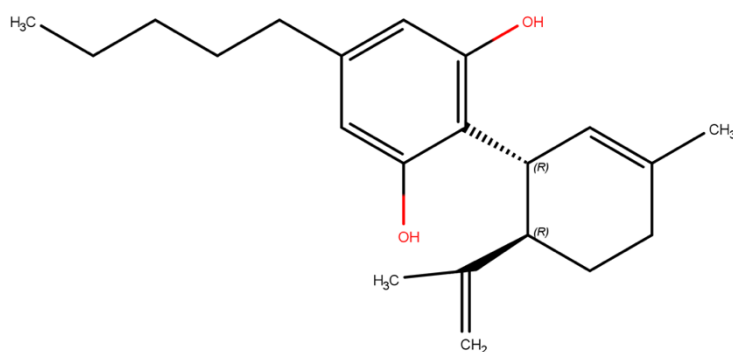
Cannabis sativa, sendo responsáveis pelo seu potencial terapêutico (Namdar et al., 2019). Porém, a pesquisa destes constituintes é relativamente recente, apenas em 1964 a molécula conhecida como Delta-9 Tetrahydrocannabinol (Δ -9THC) (Fig. 3) foi estereoquimicamente definida, sendo considerada responsável pela maioria das ações farmacológicas da *Cannabis sativa*, incluindo seus efeitos psicoativos. Já o Canabidiol (CBD) (Fig. 4) é o mais importante composto não psicoativo encontrado na planta (Grotenhermen & Müller-Vahl, 2012b).

Figura 3. Estrutura química do Δ -9THC.



Fonte: autoria própria, 2023 (Marvin Sketch, 2023).

Figura 4. Estrutura química do CBD.



Fonte: autoria própria, 2023 (Marvin Sketch, 2023).

Fatores como local de cultivo, horário de coleta, bem como características geográficas e hidrográficas são capazes de influenciar na biossíntese e no teor dos componentes de cada planta (Simões et al., 2016). Além disso, a polinização da *Cannabis sativa* acontece pelo vento e isso contribui diretamente para a variabilidade dos metabólitos, o que dificulta a padronização das “cepas” da planta para os produtores e consumidores pelas suas variedades genéticas e fenotípicas (Booth & Bohlmann, 2019).

Até o momento, mais de 500 compostos químicos já foram identificados na *Cannabis sativa*, sendo cerca de 124 pertencentes a classe dos canabinoides, além dos alcaloides, flavonoides e terpenos, principais constituintes dos Óleos Essenciais (OEs) e que são responsáveis tanto pelas características aromáticas da planta, quanto pela ação sinérgica conhecida como “efeito comitiva”, assim aumentando os benefícios terapêuticos dos demais constituintes (Foster et al., 2019; Radwan et al., 2021; Sommano et al., 2020).

2.8 Efeito comitiva

O chamado “efeito comitiva” (do inglês “*entourage effect*”) foi inicialmente hipotetizado pelo grupo coordenado pelo professor Raphael Mechoulam, em 1998, para explicar seus resultados experimentais baseados em estudos de canabinoides endógenos sintetizados em vários tecidos corporais (Anand et al., 2021). Entre as várias cepas de *Cannabis sativa*, além dos famosos CBD e Δ -9THC, dezenas de outros fitocanabinoides são produzidos, assim como vários terpenos, terpenóides e álcoois terpênicos (Sommano et al., 2020).

Estudos evidenciaram que esse conjunto de compostos possuem resultados significativamente melhores, uma vez que o extrato bruto a partir da inflorescência da *Cannabis sativa*, contendo uma infinidade de substâncias, se demonstrou mais ativo do que fitocanabinoides isolados (Namdar et al., 2019). Alguns estudos demonstraram que a combinação de CBD- Δ -9THC foi mais eficaz do que o tratamento isolado dos compostos na melhoria da memória em pacientes com alzheimer. Outro benefício observado foi a capacidade da associação CBD- Δ -9THC em reduzir a gliose reativa, uma resposta inflamatória do sistema nervoso central, e promover a neurogênese, processo de formação de novos neurônios (Kim et al., 2019; Watt & Karl, 2017).

Outros trabalhos descrevem que o efeito comitiva pode ocorrer ainda de duas formas: “*intra-entourage*” ou “*inter-entourage*”. O primeiro pode ser observado quando a atividade

biológica é atribuída as interações entre diferentes fitocanabinoides presentes em uma determinada cepa, enquanto o segundo está relacionado ao ambiente, sugerindo que o ambiente onde é realizado o cultivo pode aumentar a produção de metabólitos secundários, em especial os terpenoides da planta. Essas substâncias possuem diversos efeitos medicinais, mas no caso do efeito comitativa, são vistos como promotores e instigadores da atividade terapêutica dos fitocanabinoides (Namdar et al., 2019).

2.9 Sistema endocanabinoide

O Sistema Endocanabinoide é composto por canabinoides endógenos chamados de endocanabinoides, receptores e as proteínas responsáveis por transportar, sintetizar e degradar os endocanabinoides, apresentados na figura 5 (Zou & Kumar, 2018). Esse sistema é capaz de influenciar e ser influenciado por diversas outras vias de sinalização que não somente a via dos canabinoides (Lu & Mackie, 2021). Os canabinoides endógenos mais amplamente estudados são o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e a Anandamida (AEA), e seus principais receptores CB1 (CB1R) e CB2 (CB2R) (Osafo et al., 2021), ambos acoplados a proteína G ligados a Gi/o (Zhou et al., 2019).

Foi a descoberta dos receptores canabinoides que tornou possível a identificação dos seus primeiros ligantes endógenos citados anteriormente, o 2-AG e a AEA, e marcou o início das pesquisas voltadas à elucidação de suas vias de síntese e inativação (Giuffrida & Piomelli, 2000). Tanto o 2-AG quanto a AEA são produzidos sob demanda nos neurônios pós-sinápticos e atuam principalmente por via de sinalização retrógrada. Agonistas dos CBRs agem diminuindo a liberação adicional de neurotransmissores, incluindo a dopamina, norepinefrina, glutamato e serotonina da célula pré-sináptica (Porter & Felder, 2001).

2.9.1 Biossíntese dos Endocanabinoides

A despolarização pós-sináptica e o influxo de cálcio estimulam a síntese dos endocanabinoides, sendo a Diacilglicerol Lipase (DGL) a principal enzima responsável pela síntese de 2-AG e a Fosfolipase-D (PLD) da AEA. A síntese dos endocanabinoides é regulada por diferentes estímulos e condições fisiológicas, desempenhando papéis importantes na modulação do sistema endocanabinoide. O 2-AG além de ser considerado um importante

ligante para os CBRs é também um importante intermediário na síntese de lipídios e fornece ácido araquidônico na síntese de prostaglandinas, o que faz com que seus efeitos no organismo sejam amplos e independentes (Lu & Mackie, 2016). A principal via sintética do 2-AG é composta por duas etapas: a primeira que é iniciada mediante ativação da fosfolipase-C-beta-diacilglicerol-lipase (DAGL), que converte fosfoinosítídeos de membrana em 1,2-Diacilglicerol (DAG) e a segunda etapa onde ocorre a liberação de 2-AG que se dá através da hidrólise de DAG por meio da DGL (Bukiya, 2019).

A AEA, por sua vez, é um endocanabinoide de origem lipídica que possui seus efeitos mediados principalmente pelos CB1R e CB2R, como também pelo receptor vanilóide TRPV1 (do inglês, “*transiente receptor potencial cation channel subfamily V member 1*”, ou “receptor de capsaicina”), um receptor de membrana encontrado em diferentes tipos de células, incluindo neurônios periféricos e células do sistema imunológico (Biringer, 2021; Caterina et al., 1997).

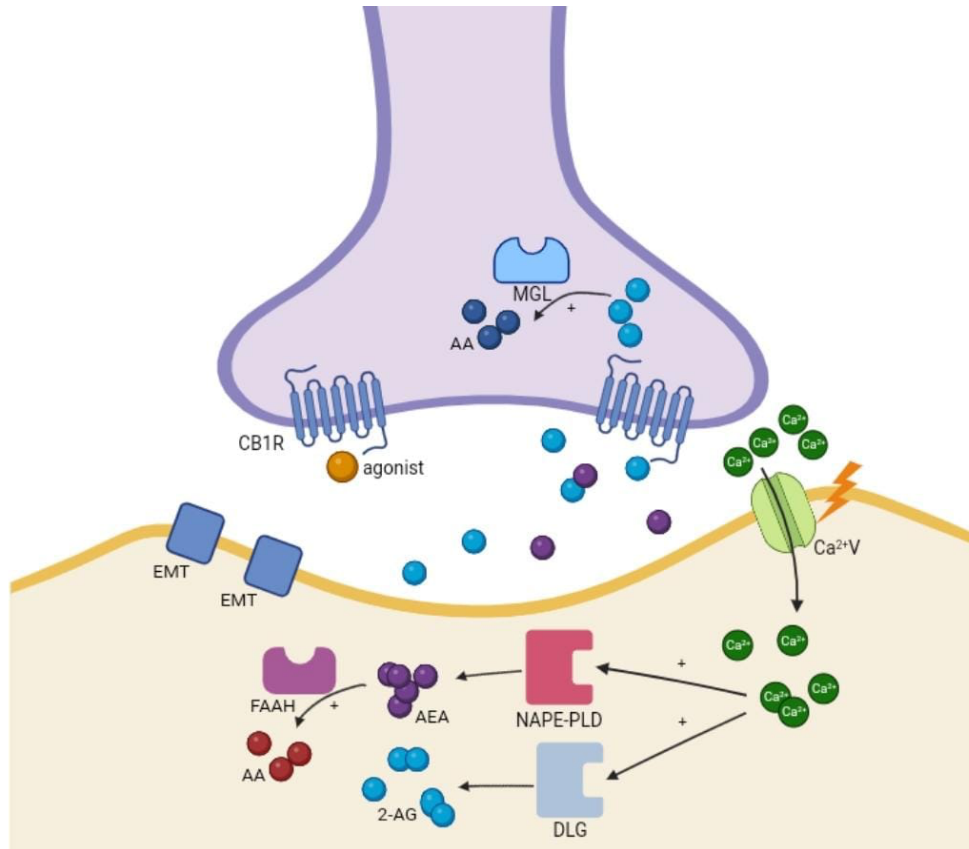
Sua síntese ocorre através de uma série de etapas bioquímicas a partir do ácido araquidônico, um ácido graxo essencial, que sofre ação da enzima Fosfolipase D, que o libera do fosfolípido de membrana. Em seguida, o Ácido Araquidônico (AA) é convertido em N-Araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE), pela ação da enzima N-Aciltransferase (NAT), sendo em seguida hidrolisado pela N-Araquidonil-Fosfatidil-Fosfolipase-D (NAPE-PLD), dando origem a anandamida, que é liberada pelas células e age como um ligante endógeno nos receptores canabinoides presentes no sistema endocanabinoide (Marzo & Petrocellis, 2006), processo pode ser observado na figura 5.

2.9.2 Degradação dos endocanabinoides

A degradação dos endocanabinoides é mediada por duas principais enzimas, a “*Fatty Acid Amide Hydrolase*” (FAAH) e a Monoacilglicerol Lipase (MAGL). A MAGL é uma importante enzima do sistema endocanabinoide que atua na degradação do 2-AG em ácido araquidônico e glicerol através da hidrólise do éster de ácido graxo presente no 2-AG. Tal processo de degradação ocorre principalmente no citoplasma das células onde a MAGL está localizada, e o ácido araquidônico liberado pode ser utilizado para a síntese de outros lipídios e desempenhar outras funções de sinalização celular. Já a FAAH é a responsável pela quebra da AEA em seus componentes moleculares, o ácido araquidônico e a etanolamina, estando presente em várias regiões do cérebro e em outros tecidos periféricos e sua ação regula os níveis

de AEA no organismo, controlando tanto a sua disponibilidade, quanto a duração de sua ação. (fig. 5) (Biringer, 2021; Bukiya, 2019; Wyrofsky et al., 2019).

Figura 5. Biossíntese e degradação dos componentes básicos do Sistema Endocanabinoide.



Nota: Despolarização pós-sináptica e influxo de cálcio estimulando a formação de Anandamida (AEA) e 2-Araquidonoilglicerol (2-AG). O 2-AG é sintetizado por meio da ação da enzima Diacilglicerol Lipase (DGL) que hidrolisa uma molécula de 1,2-diacilglicerol. Já a AEA é sintetizada pela ação da N-Araquidonil-Fosfatidil-Fosfolipase-D (NAPE-PLD) que hidrolisa uma molécula de araquidonilfosfatidiletanolamina. Quanto à degradação, o 2-AG é degradado pela Monoacilglicerol Lipase (MGL) em Ácido Araquidônico (AA) e glicerol, e a AEA é degradada pela “*Fatty Acid Amide Hydrolase*” (FAAH) formando também AA e etanolamina. Além disso, são apresentados os receptores canabinoides tipo 1 (CB1R) que juntamente com o CB2R são os principais alvos dos endocanabinoides.

Fonte: Adaptado de Wyrofsky et al., 2019.

2.9.3 Receptores Endocanabinoides

Após a descoberta e caracterização do Δ^9 -THC, vários estudos se seguiram para então caracterizar os sítios de ligação aos quais ele e outras moléculas canabiméticas são capazes de

se ligar (Mechoulam et al., 2014). O êxito no mapeamento e caracterização dos sítios de ligação dos canabinoides no cérebro revelaram a existência de um receptor com características dos acoplados a proteína G (GPCRs) que foi então denominado de receptor CB1 (Zou & Kumar, 2018).

Mais tarde um outro receptor expresso em menor predominância que o CB1R foi também identificado, o CB2R. A sua estimulação ocorre de forma semelhante a do CB1R, exceto na modulação dos canais iônicos onde este se mostra mais variável (Mackie, 2008). Estes são, até o momento, os receptores canabinoides mais bem identificados, ambos acoplados a proteína Gi/o, que inibem a adenilato ciclase e alguns canais de cálcio dependentes de voltagem, além de estimularem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP), canais de potássio e recrutarem arrestina-beta (LU; MACKIE, 2021)(LU; MACKIE, 2021).

Sob algumas condições, os receptores canabinoides são capazes de estimular a formação de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e envolver as vias das proteínas Gq/G11, o que foi observado em especial nos CB1R de astrócitos (Navarrete & Araque, 2008). Essa seletividade funcional é explicada pela capacidade dos GPCRs assumirem diversas conformações, favorecendo a ligação entre diferentes ligantes, estimulando vias de sinalização distintas e gerando respostas biológicas divergentes (Lu & Mackie, 2021).

Os endocannabinoides também possuem a capacidade de modular a função dos canais iônicos Receptores de Potencial Transitório (TRP) localizados principalmente nas fibras nervosas sensoriais (Lowin & Straub, 2015). Esses receptores estão subdivididos em três famílias: os vanilóides (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4), a anquirina (TRPA) e a melastatina (TRPM); e são classificados como receptores canabinoides ionotrópicos (Muller et al., 2019).

Os agonistas CB1 podem aumentar a ativação do canal de K⁺ sensível ao ATP (KATP) diminuindo os níveis de ATP mitocondrial, sendo assim a regulação mediada por CB1R na excitabilidade neuronal pode exercer efeitos anticonvulsivantes. Porém, devido à alta disponibilidade de CB1R no SNC em condições normais, há um risco de efeitos colaterais na ativação desses receptores, que tornam os receptores CB2R uma interessante alternativa para terapias antiepilépticas devido a sua rápida e significativa expressão em condições patológicas no SNC (Haj-Mirzaian et al., 2019; Ji et al., 2021; Zhu et al., 2019).

2.10 *Cannabis sativa* e Epilepsia

Efeitos hipnóticos e antiepilépticos de derivados da *Cannabis* em seres humanos são objetivos de estudos desde a década de 1970 (Carlini & Cunha, 1981; Cunha et al., 1980). Paralelo aos estudos clínicos, um estudo não-clínico da mesma época buscou investigar os efeitos da *Cannabis* em crises epiléticas utilizando o MES em ratos. Na ocasião, avaliou-se o potencial antiepiléptico de uma resina a base de *Cannabis indica* com 17% de Δ -9THC e quais monoaminas cerebrais estariam envolvidas como mediadoras da ação (Ghosh & Bhattacharya, 1978). Na época, contudo, não se tinha mais informações sobre outros componentes da planta e sobre o sistema endocanabinoide, o que acabou limitando as conclusões do referido trabalho (Devinsky et al., 2014).

Em um modelo epileptiforme, foi observado que os CB1R expressos em neurônios glutamatérgicos modulam alguns efeitos observados no sistema nervoso central (SNC), de forma que a ativação pelo Δ -9THC, por exemplo, consegue reduzir a liberação de neurotransmissores e controlar a atividade neuronal. Além disso, na presença de atividade neuronal excessiva os endocanabinoides se ligam aos CBR ativando-os e regulando a liberação de GABA e Glutamato (Anderson et al., 2017).

Assim, o CBD parece possuir alta afinidade e atividade agonista ou antagonista funcional com diversos receptores transmembranares, iônicos e transportadores de neurotransmissores. Embora seu mecanismo de ação na epilepsia também não esteja totalmente elucidado, evidências demonstram que ele age na modulação dos canais cálcio, inclusive de transporte de cálcio, via receptor 55 acoplado a proteína G (GPR55), influxo de cálcio e canais TRPV1, assim como na modulação sinalização mediada por adenosina (Gray & Whalley, 2020).

Já a sinalização endocanabinoide parece desempenhar importante papel neuroprotetor nas crises epiléticas. Isso foi observado em modelos não-clínicos, *in vitro* e *in vivo*, utilizando ácido cáínico. Assim, foi possível observar que a administração do AM6701, um bloqueador da FAAH e MAGL, protegeu contra eventos excitotóxicos em fatias cultivadas do hipocampo, tal qual a perda de proteínas e alterações nos neurônios. Além disso, em modelos animais injetados com o ácido cáínico, o AM6701 foi capaz de proteger contra crises comportamentais epiléticas (Fernández-Ruiz et al., 2020; Naidoo et al., 2012).

Tais evidências apontam a *Cannabis sativa* e seus componentes como potenciais agentes alvos terapêuticos na busca por tratamentos antiepilépticos, em especial para as epilepsias

refratárias aos fármacos disponíveis (Golub & Reddy, 2021). Um estudo utilizando um produto padronizado a base de *Cannabis sativa* demonstrou uma boa eficácia na redução das crises em síndromes como a de Dravet e a de Lennox-Gastaut, as quais possuem um perfil de resistência farmacológica já descrito (Braithwaite et al., 2021). Uma vez que as epilepsias refratárias correspondem a cerca de um terço da população que convive com a doença, se faz necessário mais alternativas terapêuticas para essas pessoas (Thomas & Cunningham, 2018).

2.11 Associações Brasileiras de *Cannabis*

A primeira autorização para importação de medicamento a base de *Cannabis sativa* aconteceu em 2014 por meio de decisão judicial, para o tratamento de uma síndrome rara. Em seguida, o Conselho Federal de Medicina (CFM) autorizou os médicos a prescreverem medicamentos a base da planta, em especial para o tratamento de epilepsias refratárias e outras doenças que possuem limitações na sua farmacoterapia (ALVES, 2018).

Em 2017, a Associação Brasileira de *Cannabis* Esperança (ABRACE) tornou-se a primeira instituição no Brasil autorizada pela justiça a cultivar a *Cannabis sativa* para fins medicinais (Pimentel, 2021a). Em seguida, a Apoio à Pesquisa e Pacientes de *Cannabis* Medicinal (APEPI), solicitou na Justiça Federal a sua autorização em setembro de 2019, tendo parecer favorável do Ministério Público Federal (MPF) e apoio da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), conseguindo a sua aprovação em julho de 2020. Além dessas, atualmente outras associações buscam autorização no país, como a Cultive, que reúne outros pacientes que necessitam do acesso ao tratamento (Marinho & Neves, 2022).

As autorizações para cultivo por meio das Associações de *Cannabis* se baseiam no decreto 5.912/2006, que regulamenta a lei 11.343/2006 e dispõe sobre medidas para prevenção do uso indevido (CINTRA, 2019), assim como transfere a responsabilidade ao Ministério da Saúde de autorizar o cultivo e colheita de plantas das quais podem ser extraídas substâncias para fins medicinais e científicos (Pimentel, 2021b). Por unanimidade, em 2019 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou duas propostas preliminares que podem culminar na liberação para o cultivo da *Cannabis* para fins medicinais, científicos e para a produção de medicamentos derivados da planta (Barboza, 2019).

2.12 Óleos de Extrato de *Cannabis sativa*

A principal forma farmacêutica utilizada na formulação com compostos a base de *Cannabis sativa* são os óleos devido a sua fácil administração por via oral, possibilidade de ajuste de dose e maior biodisponibilidade (Dei Cas et al., 2020). Isso porque os canabinoides são lipofílicos e possuem baixa solubilidade em água, portanto vias tópicas ou orais possuem melhor absorção na presença de veículos gordurosos, óleos ou solventes polares como o etanol (MacCallum & Russo, 2018).

Estudos relatam que a concentração plasmática de CBD quando dissolvido em óleo vegetal, como o óleo de milho, mostrou-se mais adequada, com pico mais rápido em comparação com a formulação em pó, aumentando em aproximadamente quatro vezes a biodisponibilidade oral (Crippa et al., 2021). Além disso, outros fatores podem afetar a biodisponibilidade como refeições recentes e, em caso de formulações inalatórias, a profundidade da inalação, duração da respiração e temperatura do vaporizador afetam a absorção dos canabinoides, que pode variar de 20% a 30% por via oral e até mesmo 10 a 60% por vias inalatórias (MacCallum & Russo, 2018).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do óleo de extrato da *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) *in silico* e sobre o comportamento em modelos animais de crises epiléticas.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas os componentes majoritários do OERCBD;
- Analisar a energia de ligação molécula-receptor dos componentes majoritários do OERCBD através de ferramentas computacionais de *docking* molecular;
- Analisar o efeito da administração prévia do OERCBD sobre o comportamento de camundongos submetidos a avaliação de toxicidade aguda e ao modelo de triagem farmacológica comportamental;
- Analisar o efeito da administração prévia do OERCBD sobre o comportamento de camundongos submetidos ao modelo de crises epiléticas induzidas por PTZ em camundongos;
- Analisar o efeito da administração aguda prévia do OERCBD sobre o comportamento de camundongos submetidos ao modelo animal de Eletrochoque Auricular Máximo (MES) para o desenvolvimento de crises epiléticas;
- Analisar o efeito da administração de doses repetidas durante 14 dias do OERCBD sobre o comportamento de camundongos submetidos ao modelo animal de Eletrochoque Auricular Máximo (MES) para o desenvolvimento de crises epiléticas;

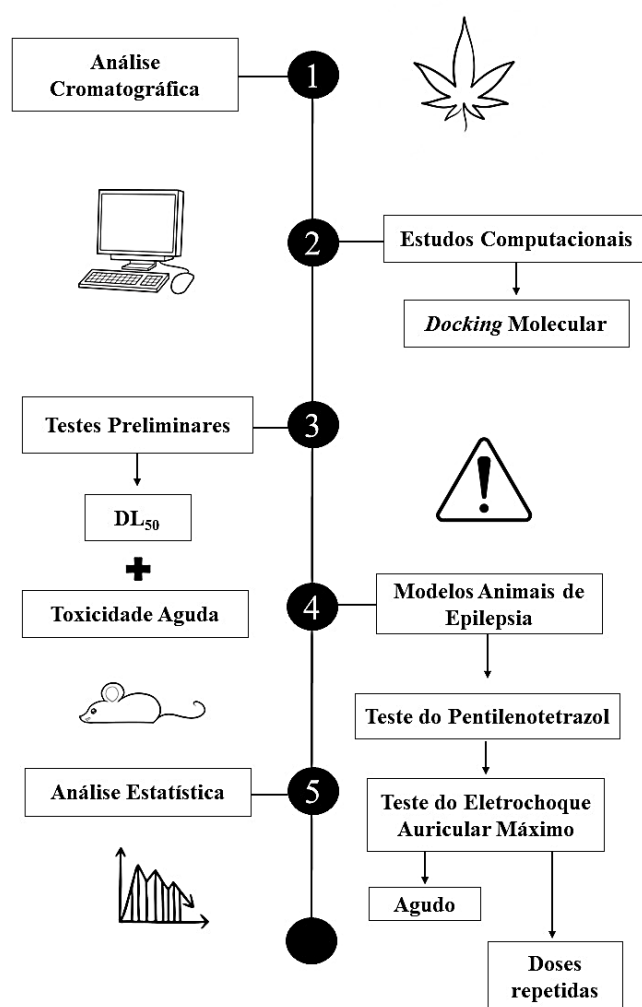
MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

As etapas de delineamento assim como a execução do trabalho encontram-se resumidas na figura 6 e descritas detalhadamente nos itens que se seguem.

Figura 6. Desenho experimental.



Fonte: autoria própria, 2023.

4.2 Modelo animal, procedência e aprovação ética

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), albinos Swiss (fig. 7), adultos, machos com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 20-35 gramas, fornecidos pelo Labetox (IPeFarM/UFPB). O projeto foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com certificado protocolado número: 3599040722/ID 001843.

Figura 7. Ilustração de Camundongo *Mus musculus*.



Fonte: autoria própria, 2023 (BioRender, 2023).

4.3 Condições de alimentação e alojamento dos animais

Os testes foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia/UFPB, onde os animais estiveram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à ração do tipo *pellets* (Purina®) e à água disponível em garrafas de polietileno. Os animais foram previamente pesados e alojados em gaiolas de polietileno, contendo 4 animais cada, com pelo menos 2 horas de antecedência à execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal, bem como permitir uma adaptação à sala de experimentação.

4.4 Vias de administração

Diversas vias de administração podem ser empregadas em estudos de farmacologia com animais de laboratório, de forma que a escolha da via deverá respeitar as características do fármaco a ser administrado em função do efeito que se deseja obter. Em modelos animais a via

de administração mais utilizada é a via oral (v.o.) e a via intraperitoneal (v.i.) e embora o volume da substância a ser administrado possa sofrer variações conforme a via escolhida, utilizam-se volumes fixos de 1 mL para cada 100g de peso em ratos e camundongos, ou 0,1 mL para cada 10g de peso em camundongos (Almeida, 2006; Carlini & Mendes, 2011).

Por via oral (fig. 8), a substância é introduzida na cavidade oral por meio de um tubo (agulha de gavagem) que é gentilmente introduzido até o estômago. No caso de camundongos, o tubo possui em média 4 cm e o volume máximo de administração de soluções é de 0,1mL a cada 100g de peso, já para as soluções aquosas esse volume pode chegar até 0,2mL a cada 100g de peso (Paiva et al., 2005). A via oral é a principal via de administração de extratos, por ser a via que mais mimetiza a via mais utilizada pela população na ingestão de chás e preparações populares, mas é importante ressaltar que esta via está sujeita a metabolização pelo trato gastrointestinal o que compromete a concentração e velocidade de absorção de determinadas substâncias e, conseqüentemente, a visualização de determinados efeitos farmacológicos (Carlini & Mendes, 2011).

Figura 8. Administração por via oral.



Fonte: autoria própria, 2023 (BioRender, 2023)

4.5 Investigação de toxicidade aguda

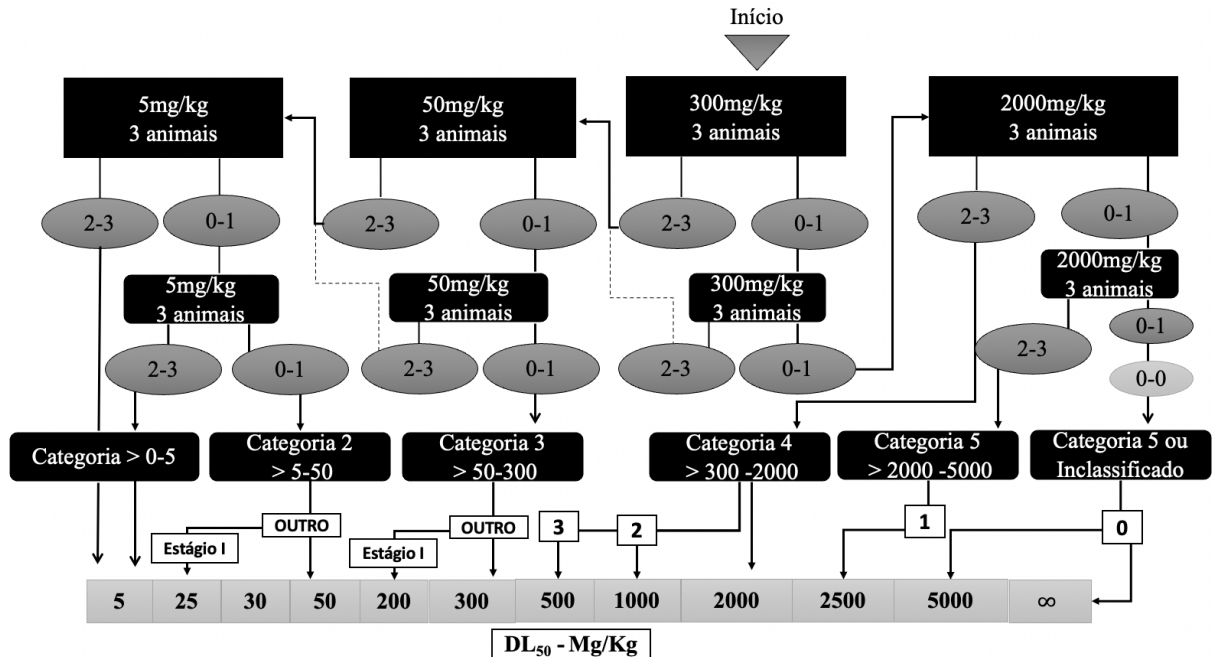
A determinação da toxicidade aguda é um antecedente fundamental aos testes farmacológicos. Através dela é possível obter informações a respeito do parâmetro comportamental de animais a nível de Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Autônomo após a administração da substância em estudo (Almeida, 2006).

A Dose Letal mediana (DL_{50}) é definida como a dose de determinada substância que sob administração aguda é capaz de matar 50% de uma população de animais, dentro de determinadas condições experimentais específicas. Tal avaliação é empregada para estimativa do grau de toxicidade de determinada substância (Carlini & Mendes, 2011) Neste estudo, adotamos a diretriz da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para Testes de Produtos Químicos de número 423 (fig.9), proposta inicialmente em 1996, mas que sofreu diversas atualizações ao longo dos anos, sendo um procedimento de boa reprodutibilidade e que utiliza um número pequeno de animais (Jonsson et al., 2013)

Conforme orientado pelo protocolo, a dose de partida foi de 300 mg/kg por tratar-se de um extrato produzido e comercializado e não do produto isolado, portanto sua toxicidade deve ser admitida como sendo desconhecida. A depender do índice de mortalidade e/ou da presença de sinais tóxicos dos animais, 2 ou 4 etapas podem ser necessárias para que se defina a toxicidade aguda da substância em questão (OECD, 2001).

Os animais (n=3) receberam então 300mg/kg do OERCBD (v.o.) e foram observados nos intervalos de tempo de 30, 60, 120, 180 e 240min e os parâmetros avaliados constam no Quadro 3 do item 4.6. Posteriormente, permaneceram em observação durante 14 dias seguidos para análise de possíveis sinais de toxicidade e/ou morte para que as orientações seguintes ao protocolo fossem seguidas. Ao final do décimo quarto dia, os animais foram eutanasiados e descartados.

Figura 9. Protocolo OECD.



Fonte: Adaptado da Oecd, 2001.

4.6 Avaliação comportamental e triagem farmacológica

O análise do parâmetro comportamental é baseado no protocolo experimental padronizado por Almeida e colaboradores (1999) e, desde então, é utilizado no Laboratório de Psicofarmacologia (UFPB) como antecedente fundamental aos demais testes comportamentais utilizando modelos animais (Almeida, 1999; H. H. N. de Andrade, 2019). Para sua execução foram utilizados um número mínimo de animais (camundongos Swiss) em cada etapa, divididos em 4 grupos (n=3/grupo). Um grupo controle recebeu o veículo (AZT) e três grupos foram tratados com o OERCBD nas doses de 15, 30 ou 60mg/kg (v.o.), obedecendo a proporção de 1 mL/10 g de peso corporal.

Anterior ao teste, os animais foram alocados em suas gaiolas por 5 dias para adaptação às condições laboratoriais e passaram por um período de jejum de 60 minutos, antes de receberem as substâncias. A água e ração foram repostas posteriormente. Os animais foram observados durante os primeiros 30; 60; 120; 180 e 240min após a administração das substâncias, utilizando como parâmetro as informações contidas no Anexo I. Eles

permaneceram em local adequado durante 14 dias para observação da ocorrência de mortes ou demais sinais de toxicidade.

4.7 Tratamentos

Os tratamentos foram realizados com o Óleo “*Doctor*” rico em CBD (OERCBD), proveniente da Apoio à Pesquisa e Pacientes de *Cannabis* Medicinal (APEPI). Sua apresentação contém alto teor de CBD (~33mg/mL) e baixo teor de Δ -9THC(<2,1mg/mL), além dos demais metabólitos secundários de origem canabinoide ou não, que compõem o extrato e que são veiculados através do azeite de oliva, excipiente da formulação. As doses de 15, 30 e 60mg/kg estabelecidas para os estudos foram calculadas com base na concentração de CBD padronizada pelo fabricante e informada anteriormente.

4.8 Análise cromatográfica do óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD)

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica de separação e análise que utiliza uma fase estacionária líquida ou sólida e uma fase móvel gasosa para analisar compostos voláteis ou semivoláteis. A CG pode ser feita de forma acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) onde ocorre a separação dos compostos pela cromatografia e a identificação e análise de massa dos componentes separados, tornando-a uma poderosa ferramenta para análise qualitativa e quantitativa de misturas, a exemplo dos extratos (Skoog et al., 2002).

O processo de CG-EM começa com a introdução da amostra no sistema de CG. A amostra será então, volatilizada e injetada em um injetor de alta temperatura, onde é rapidamente vaporizada e transportada por um gás de arraste (hélio), para a coluna de separação (CS). No interior da CS, ocorre a separação com base em suas características físico-químicas, como o ponto de ebulição, polaridade e interações com a fase estacionária da coluna. A medida que ocorre a eluição dos compostos, eles são direcionados para a fonte de ionização da espectrometria de massas onde serão ionizados, normalmente por ionização por impacto de elétrons (EI), resultando em íons fragmentados que são separados posteriormente de acordo com a sua relação massa/carga (m/z), tendo sua intensidade registrada gerando o espectro de massa característico para cada composto da amostra e os dados podem ser identificados através de comparação em bancos de dados ou analisados quantitativamente para a concentração de cada componente (Adams, 2017).

As análises de CG-EM foram realizadas no GCMS-QP2010*ultra* (Shimadzu®), equipado com uma coluna capilar RTX-5MS (5 % diphenyl/95 % dimethyl polysiloxane) com 30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro com espessura do filme de 0,25 µm. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL com *split* numa razão de 1:150. O hélio foi usado como gás carreador em 1 mL/min. A temperatura de entrada de amostras foi selecionada para 300 °C e a temperatura do injetor foi mantida em 280 °C. A temperatura do forno foi inicialmente programada para 100 °C, mantida por 5 minutos e depois aumentada para 280 °C numa taxa de 10 °C/minuto e mantido nessa temperatura por mais 5 minutos. Uma fonte de ionização por impacto de elétrons foi aplicada em 70 V, com uma completa varredura numa faixa de massa de 35-400 m/z (Suppajariyawat et al., 2019).

Todos os dados cromatográficos foram processados com o shimadzu GC-MS software (GC-MS solution) e o OpenChrom Community Edition 1.3.0 Dalton. Todos os compostos do espectro de massas foram identificados e comparados usando o software da shimadzu, no Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) 2008/NIST2008+Shimadzu, Espectro de Massas de Sabores e Fragrâncias de Compostos Naturais e Sintéticos – FFNSC 1.3.

4.9 *Docking* molecular

Após a análise de CG-EM, os componentes majoritários foram analisados via *docking* molecular. Para a realização do desenho das estruturas das moléculas presentes no OERCBD e dos fármacos padrões, foram utilizados os softwares Marvin Sketch 21.13 e otimizadas no software HyperChem 8.0.6 (RMS 0.1 kcal/mol/Å). As configurações adotadas foram os padrões, aplicando o método de força da mecânica molecular MM+ e o método quântico semiempírico AM1 (Austin Model 1) (Abbasi et al., 2022; C. H. P. Rodrigues et al., 2021; Scotti et al., 2009).

A obtenção das estruturas cristalinas das proteínas partiu do RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) sob código 6D6T, resolução de 3.86 Å e método de difração raios-X (DOI: 10.1038/s41586-018-0255-3), e NaV 1.7 sob código 5EK0, resolução de 3.53 Å e método de microscopia eletrônica (DOI: 10.1126/science.aac5464). Já a ancoragem das moléculas com os alvos foram executados no software Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) utilizando como parâmetros a configuração da função valores de escore de energia do *MolDock Score* e *Plant Score* seguido do consenso por meio da média aritmética dos dois

com valor de corte de para energia de ligação > -8 kcal/mol; para o GRID foi determinado com resolução de 0,3 Å e um raio esférico de 15 Å, as coordenadas usadas para determinar o sítio de ligação do GABA_A foram: X (151,47), Y (164,65) e Z (113,79) e para o NaV foram: X (-85,50), Y(-13,97) e Z(-14,72); para a avaliação do ligante foi selecionado a ES interno, HBond interno, torções Sp2–Sp2 no MolDock score e o hidrogênio em termos de torção no PLANTS score; foi utilizado algoritmo MolDock Simplex Evolution (MolDock SE) e o com um número de corridas de 10 e máximas iterações de 1500 (Thomsen & Christensen, 2006).

Quanto à validação técnica, foi realizado o redocking e analisado valores para o desvio quadrático médio (RMSD - Root Mean Square Deviation) < 2 Å para a determinação da distância média da sobreposição dos átomos do ligantes das proteínas (Schlosser & Rarey, 2009). Além disso, foram analisadas a energia de ancoragem e os tipos de interações com o sítio de ligação dos alvos. Por fim, as imagens tanto em 2D quanto em 3D das interações dos ligantes com os alvos foram visualizadas através do programa Biovia Discovery Studio Visualizer 19.1.0.18287 (Vijayakumar et al., 2020).

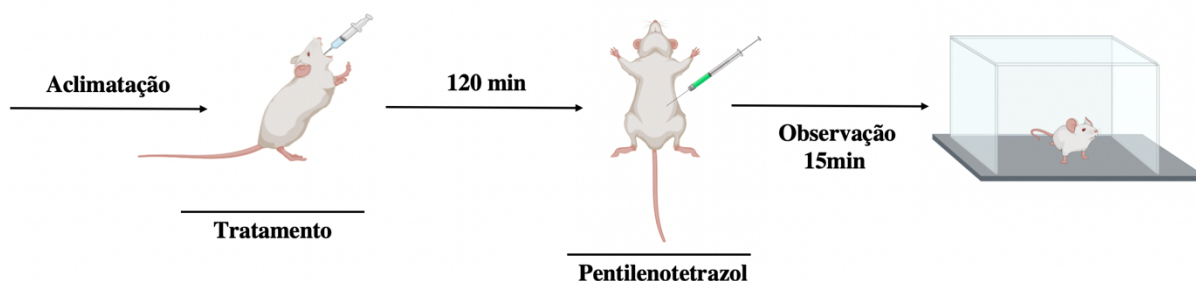
4.10 Avaliação da administração de OERCBD em modelos animais de crises epiléticas

4.10.1 Testes das crises epiléticas induzidas por Pentilenotetrazol

O Pentilenotetrazol (PTZ) é uma ferramenta farmacológica química, frequentemente utilizada como triagem preliminar, para induzir as crises epiléticas, e investigar drogas com potencial anticonvulsivante (Löscher, 1998; Sayyah et al., 2004). Sabe-se que o bloqueio das convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ, em roedores, é uma característica de algumas drogas depressoras do SNC que pertencem a classe dos anticonvulsivantes (Almeida, 2006).

Durante o teste, os animais foram pré-administrados (v.o.) com veículo (AZT), fármaco padrão Diazepam (DZP, Santisa, Brasil) 4 mg/kg, ou três doses (15, 30 ou 60 mg/kg) do OERCBD (v.o.). Decorridos 120 minutos, os animais receberam a administração do PTZ (Sigma-Aldrich, E.U.A.) 75 mg/kg (i.p.). Imediatamente após a injeção de PTZ, os animais foram observados por um período de 20 minutos quanto a latência para o aparecimento da primeira convulsão, duração das convulsões (Almeida, 2006). A intensidade das crises epiléticas foram classificadas de 0 a 6 conforme a escala adaptada de Racine (ANEXO II).

Figura 10. Experimento das crises epiléticas induzidas por PTZ em camundongos.

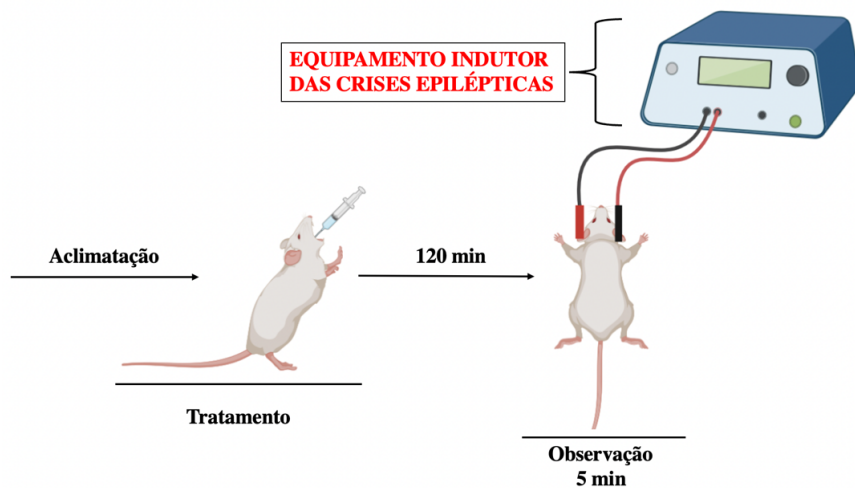


Fonte: autoria própria, 2023 (BioRender, 2023)

4.10.2 Testes das crises epiléticas induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)

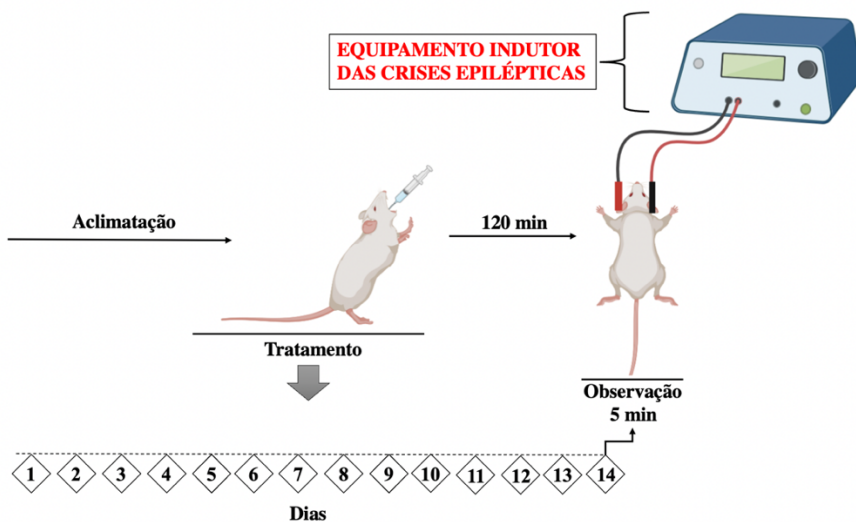
Descrito por Merritt e Putnam (1938), o teste das convulsões induzidas através do MES é bastante empregado para identificar e avaliar drogas com eficácia antiepiléticas. Tanto no tratamento agudo (figura 14A), quanto no tratamento com doses repetidas (figura 14B), foram utilizados grupos de oito animais, divididos em grupo controle Veículo (AZT), padrão fenitoína (FEN, 30 mg/kg), e três doses (15, 30 ou 60mg/kg) do OERCBD (v.o.). No tratamento agudo, decorridos 120 minutos das administrações, todos os animais foram submetidos a um choque auricular com corrente de 0,5 mA de intensidade, numa frequência de 15 pulsos/segundo e duração de 0,5 segundo. Já no tratamento com doses repetidas, os animais foram tratados durante 14 dias e submetidos ao mesmo teste, nas mesmas condições, no 14º dia. Os parâmetros que foram avaliados são: latência para o início e a duração da extensão tônica dos membros posteriores, ou ausência da extensão tônica dos membros posteriores, latência para recuperação da postura, tempo de duração da crise epilética e taxa de mortalidade (Almeida, 2006; Carlini & Mendes, 2011).

Figura 11A. Experimento das crises epiléticas induzidas por MES em camundongos após tratamento agudo com OERCBD.



Fonte: autoria própria, 2023 (BioRender, 2023).

Figura 11B. Experimento das crises epiléticas induzidas por MES em camundongos após tratamento com doses repetidas com OERCBD.



Fonte: autoria própria, 2023 (BioRender, 2023).

4.11 Análise Estatística

Previamente, foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, para verificar da normalidade dos dados de cada grupo, e de Bartlett, para verificar a homogeneidade das variâncias. Com base nos resultados dessas análises, concluiu-se que todos os parâmetros avaliados deveriam ser analisados por meio de testes não paramétricos. Sendo assim, para a análise estatística dos testes de crises epiléticas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, e os dados são apresentados graficamente como diagramas de caixa e bigodes (mostrando o intervalo do mínimo ao máximo e exibindo todos os pontos individuais). A porcentagem da mortalidade/sobrevivência foi analisada pelo teste exato de Fisher para comparar os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Investigação de toxicidade aguda

A administração via oral do OERCBD teve como ponto de partida a dose de 300mg/kg (Quadro 4) conforme descrito e orientado pelo protocolo 423 da OECD (item 4.5), de forma a não apresentar mortalidade nos camundongos (n=3), durante os 14 dias, período em que permaneceram sendo observados diariamente. Segundo as orientações do protocolo, deveríamos, em seguida, partir para a administração da dose de 2.000 mg/kg, porém, a apresentação do OERCBD, com concentração aproximada de 33mg/mL não nos permitiu dar prosseguimento. No entanto, o protocolo aconselha que seja observado não apenas a mortalidade, mas também as condições do animal, sabendo disso, sinais de toxicidade foram considerados importantes, tal qual a irritabilidade, saltos e o considerável nível de sedação observados mesmo após os 120 minutos decorridos da administração.

5.2 Avaliação comportamental e triagem farmacológica

Com a finalidade de reduzir os efeitos encontrados na dose de 300mg/kg (v.o.) no teste da DL₅₀ reduzimos as concentrações administradas para 15, 30 e 60mg/kg, não sendo observados sinais graves de toxicidade. Os animais apresentaram sinais de autolimpeza nas doses de 15 e 30 mg/kg (v.o.) ambos no tempo de 180 minutos; movimento exploratório de levantar-se, nas doses de 15 e 30mg/kg (v.o.) nos tempos de 60 e 180 minutos respectivamente, aumento da ambulação na dose de 30mg/kg (v.o) após 60 minutos. Ademais, na dose de 15mg/kg (v.o.), os animais apresentaram uma leve piloereção que não foi observada nos tempos posteriores, conforme podemos observar no quadro 4.

A atividade estimulante do SNC observada na dose de 300mg/kg, seguida de atividade depressora, ambulação diminuída mesmo após 240min de administração foi imprescindível para que as doses de 15, 30 e 60mg/kg fossem escolhidas no sentido de dar seguimento aos experimentos *in vivo* de avaliação do potencial antiepiléptico do OERCBD.

Quadro 3. Resultados dos sinais de toxicidade aguda observados.

Dose (mg/kg v.o)	Tempo de Observação	Efeitos Comportamentais
OERCBD 15 mg/kg	Até 30'	(+) Autolimpeza (+) Piloereção
	60'	(+) Levantar-se
	120'	(+) Defecação
	180'	(+) Autolimpeza
	240'	(+) Defecação
OERCBD 30 mg/kg	Até 30'	(+) Autolimpeza (+) Força para agarrar (+) Levantar-se (+) Defecação
	60'	(+) Ambulação (+) Força para agarrar (+) Autolimpeza
	120'	(+) Defecação
	180'	(+) Autolimpeza (+) Levantar-se
	240'	-
OERCBD 60 mg/kg	Até 30'	(+) Micção (+) Força para agarrar (+) Defecação
	60'	(+) Micção (+) Ambulação aumentada (+) Força para agarrar (++) Defecação
	120'	(+) Piloereção
	180'	(+) Sedação
	240'	(+) Defecação

Continuação...

Continuação...

OERCBD 300 mg/kg	Até 30'	(+) Irritabilidade (+) Sedação (+) Defecação (+) Força para agarrar
	60'	(+) Agressividade (++) Saltos (+) Ambulação diminuída (+) Sedação
	120'	(+) Defecação (+) Força para agarrar (++) Ambulação diminuída (++) Sedação
	180'	(++) Ambulação diminuída (+) Analgesia (+) Força para agarrar (+) Constipação (+) Micção
	240'	(++) Ambulação diminuída (+) Força para agarrar (+) Defecação (+) Micção

Fonte: autoria própria, 2023.

5.3 Análise cromatográfica do óleo de extrato da *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD)

Cada pico no cromatograma representa a detecção de íons específicos produzidos pela fragmentação dos compostos durante a ionização. A posição do pico no tempo de retenção indica quando o composto foi eluído da coluna cromatográfica, enquanto a altura ou área do pico representam a quantidade relativa do composto na amostra.

Quando o composto é identificado como majoritário, significa que ele está presente em uma quantidade significativamente maior em relação aos demais, e isso pode ser evidenciado pela intensidade do pico correspondente a esse composto no cromatograma de massa, como é o caso do pico correspondente ao CBD (figuras 12A e 12B) que indica sua predominância no óleo de extrato rico em fitocanabinoides analisado.

A análise de OERCBD em CG-EM resultou em um cromatograma no qual foram evidenciados 20 picos, sendo o pico 7 com tempo de retenção (TR) 67,489 min (fig. 12A) majoritário nesta análise. O espectro de massas correspondente a este pico (fig. 12B) apresentou sinal com relação massa-carga (m/z) 230,95 correspondentes a fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_2$, e quando comparado com os espectros de massas das bibliotecas WILEY9.LIB e NIST08.LIB foi possível identificar que a substância em análise seria o canabidiol com índice de similaridade (IS) de 95%.

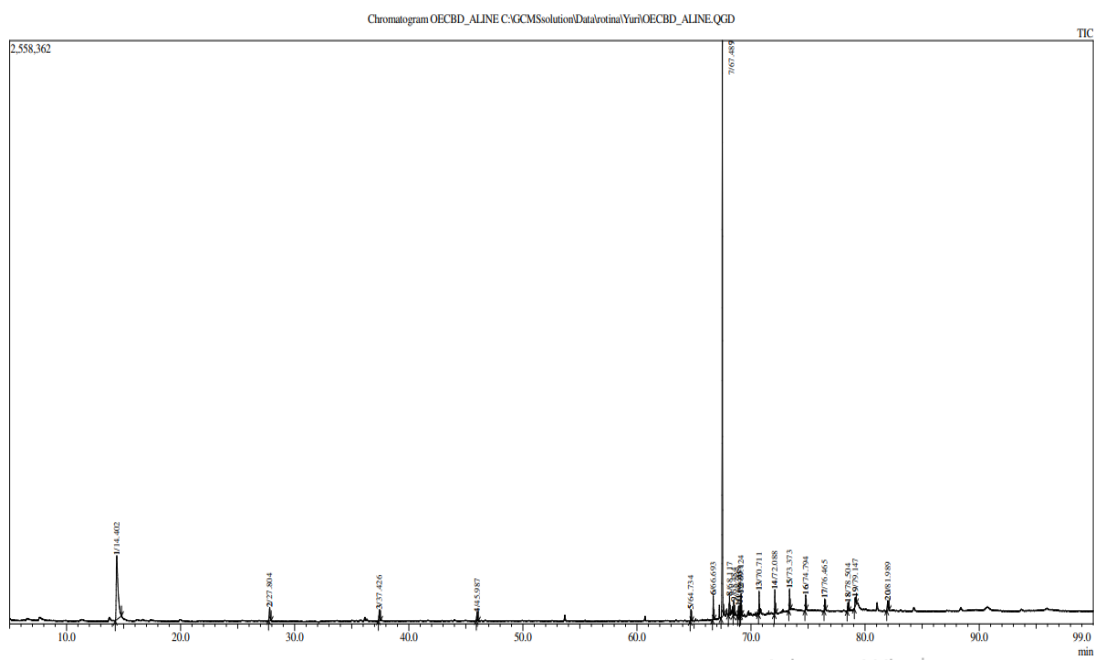
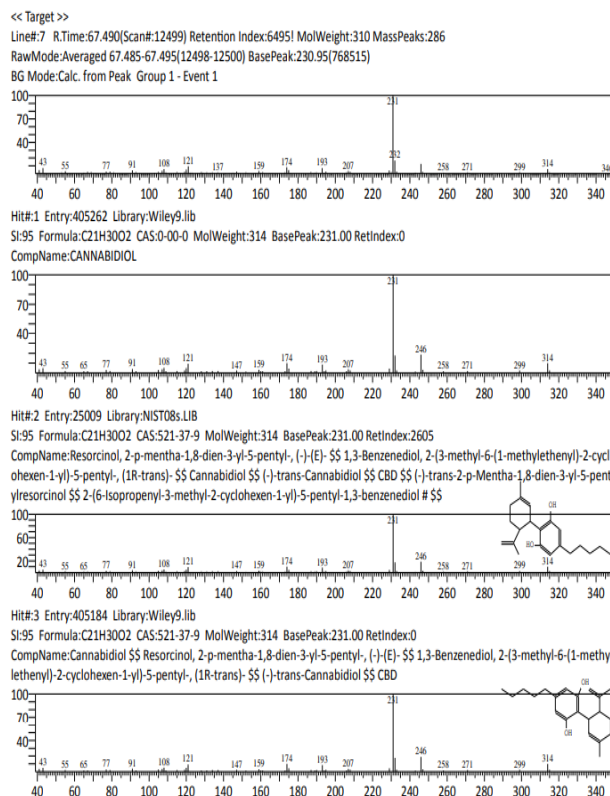


Figura 12B. Espectro de massas de OERBD (TR 67,489 min) e do canabidiol (bibliotecas WILEY9.LIB e NIST08.LIB).



Fonte: Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (UFPB, 2023).

Foram observados ainda no cromatograma de OERCBD outros picos com TR 66,693, 68,484 e 68,908, compatíveis com as substâncias canabinol (IS 88%), canabielsoin (IS 86%) e ▲-9THC (IS 92%), respectivamente (tabela 1).

Tabela 1. Dados da CG-EM do OERCBD.

Pico	TR (min)	%área	<i>m/z</i>	substância
1	67,489	51.44	230.95	Canabidiol
2	66,693	2.07	295.00	Canabinol
3	68,484	1.30	204.95	Canabielsoin
4	68,908	1.05	299.00	▲-9THC

Fonte: autoria própria, 2023.

5.4 Docking Molecular

A ancoragem molecular através da energia de ligação e das interações entre as moléculas e os alvos, analisou a afinidade da proteína-ligante, pontuando um possível mecanismo de ação para o composto majoritário do óleo de *Cannabis sativa*. A validação da técnica foi realizada através do redocking em que foi verificado os valores de RMSD, no MolDock score, para o GABA_A de 0,253 Å e para o NaV de 0,575 Å. Para o PLANTS score, o RMSD obtido no redocking do GABA_A foi de 0,189, já o NaV obteve RMSD de 0,270 Å.

Foi realizado um consenso com MolDock score e PLANTS score para analisar a energia de ligação das moléculas com o alvo GABA_A. Desta forma, o canabinol apresentou um consenso score de -258,991 kcal/mol (tabela 2), sendo superior ao composto majoritário, o canabidiol, que possui no consenso a energia de ligação de -236,031 kcal/mol e ao fármaco padrão, diazepam, -239,947 kcal/mol.

Tabela 2. Resultados da energia de ligação por *docking* molecular com o alvo GABA_A.

Moléculas	GABA _A		
	<i>MolDock Score</i> (kcal/mol)	<i>Plants Score</i> (kcal/mol)	<i>Consenso Score</i> (kcal/mol)
Canabidiol	-71,151	-386,11	-228,631
Canabielsoin	-64,274	-407,788	-236,031
Canabinol	-89,612	-428,37	-258,991
▲-9THC	-26,797	-377,543	-202,17
Diazepam	-56,766	-423,127	-239,947

Fonte: autoria própria, 2023.

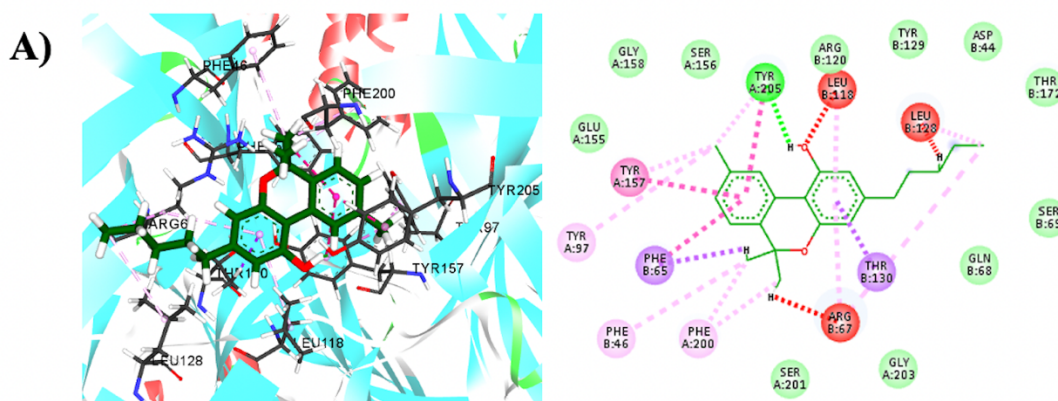
Desta forma, foram visualizadas as interações do canabinol com o alvo GABA_A. O canabinol (Figura 13A) interagiu por meio de ligação de hidrogênio convencional, empilhamento pi-pi e pi-alquil com resíduo de aminoácido TYR205, também realizou interações pi-sigma com os aminoácidos PHE65 e THR130; interações de emparelhamento pi-pi com TYR157 e PHE65; interações pi-alquil com ARG67, LEU118, TYR157, TYR97, PHE46, e duas ligações pi-alquil com PHE200; e interações alquil com os resíduos LEU128 e

ARG67. Por fim, fez interações de van der Waals com os aminoácidos SER201, GLY203, GLN68, SER69. THR172, ASP44, TYR129, ARG120, SER156, GLY156, GLY158 e GLU155. O canabinol apresentou três interações desfavoráveis com os aminoácidos LEU118, LEU128 E ARG67. Esse tipo de interação ocorre pois há um choque estérico intermolecular, colaborando com a diminuição da energia de ligação entre ligante-proteína.

Além disso, foram observadas as interações do canabidiol com o alvo. O canabidiol (Figura 13B), exibiu duas ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos TYR157 e ARG67, também foi possível observar outras interações estéricas como: uma interação pi-sigma com THR130; interações pi-alquil com TYR205, PHE200, PHE65 e PHE46; e interações de van der Waals com os aminoácidos SER156, GLU155, LEU99, THR172, SER201, ARG173, ASP44, LEU128, ARG120 e GLY158. O CBD também evidenciou interações desfavoráveis com o LEU118 e THR202.

O diazepam (Fig. 13C) apresentou duas interações do tipo ligação carbono-hidrogênio com os resíduos de aminoácidos THR130 e THR202; uma interação de halogênio com GLU155; uma interação alquil com LEU118; interações pi-alquil com os resíduos TYR157, TYR202, TYR97 e PHE200; interações de empilhamento pi-pi com PHE65, PHE200, TYR205 e TYR157. E por fim, exibiu interações de van der Waals com aminoácidos SER156, SER201, THR48 e LEU99. O diazepam também apresentou interações desfavoráveis com os resíduos de aminoácidos ARG67 e PHE46.

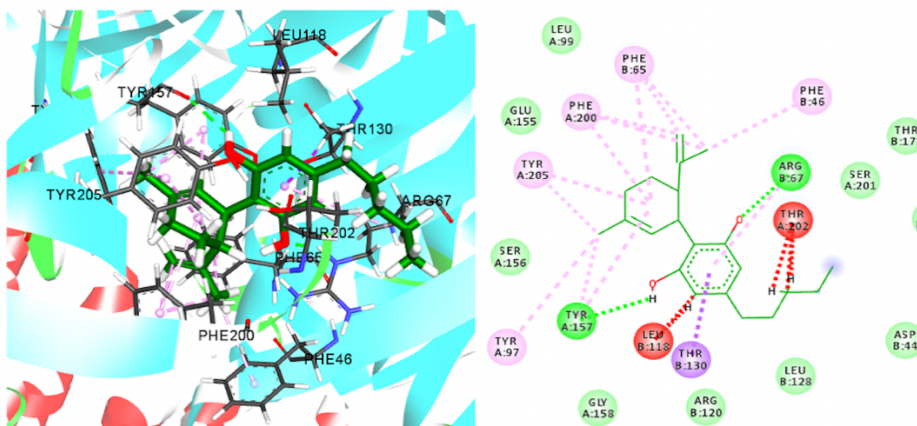
Figura 13. Interações em 3D e 2D do A) canabinol, B) canabidiol e C) diazepam com o GABA_A.



Nota: As interações favoráveis são as ligação de hidrogênio convencional, empilhamento pi-pi e pi-alquil com resíduo de aminoácido TYR205; pi-sigma com os aminoácidos PHE65 e THR130; interações de emparelhamento pi-pi com TYR157 e PHE65; interações pi-alquil com ARG67, LEU118, TYR157, TYR97, PHE46, e duas ligações pi-alquil com PHE200; interações alquil com os resíduos LEU128 e ARG67; e interações de van der Waals com os aminoácidos SER201, GLY203, GLN68, SER69. THR172, ASP44, TYR129, ARG120, SER156, GLY156,

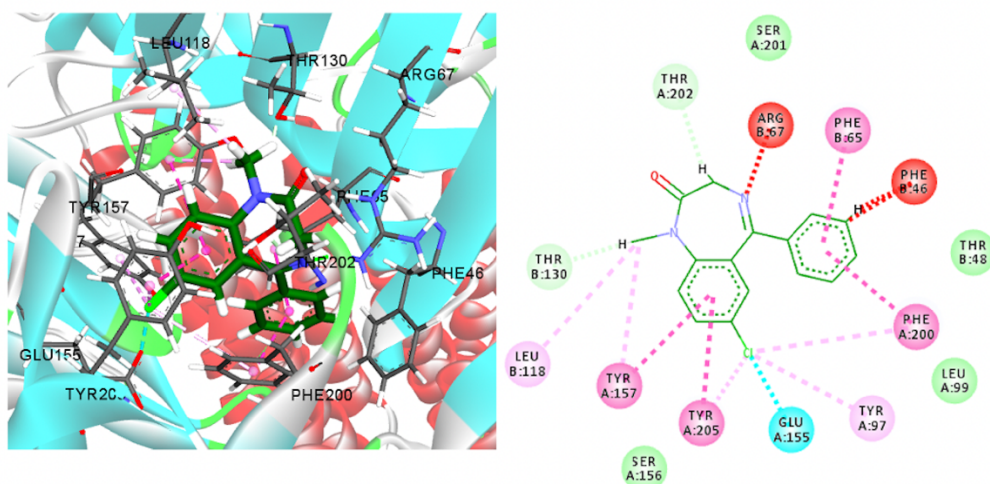
GLY158 e GLU155. As interações desfavoráveis são do tipo choque estérico intermolecular nos resíduos LEU118, LEU128 E ARG67.

B)



Nota: As interações favoráveis são duas ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos TYR157 e ARG67; interação pi-sigma com THR130; interações pi-alkil com TYR205, PHE200, PHE65 e PHE46; e interações de van der Waals com os aminoácidos SER156, GLU155, LEU99, THR172, SER201, ARG173, ASP44, LEU128, ARG120 e GLY158. Já as interações desfavoráveis ocorreram nos resíduos LEU118 e THR202.

C)



Nota: As interações favoráveis são duas interações do tipo ligação carbono-hidrogênio com os resíduos de aminoácidos THR130 e THR202; uma interação de halogênio com GLU155; uma interação alquil com LEU118; interações pi-alkil com os resíduos TYR157, TYR202, TYR97 e PHE200; interações de empilhamento pi-pi com PHE65, PHE200, TYR205 e TYR157; e interações de van der Waals com aminoácidos SER156, SER201, THR48 e LEU99. Já as interações desfavoráveis ocorreram com os resíduos ARG67 e PHE46.

Fonte: autoria própria, 2023.

No consenso score proveniente da média entre o MolDock score e PLANTS score para o alvo NaV, o canabidiol apresentou a maior energia de ligação de -221,462 kcal/mol (tabela

3), e ao fármaco padrão selecionado para esse alvo, fenitoína, exibiu um valor de -214,900 kcal/mol.

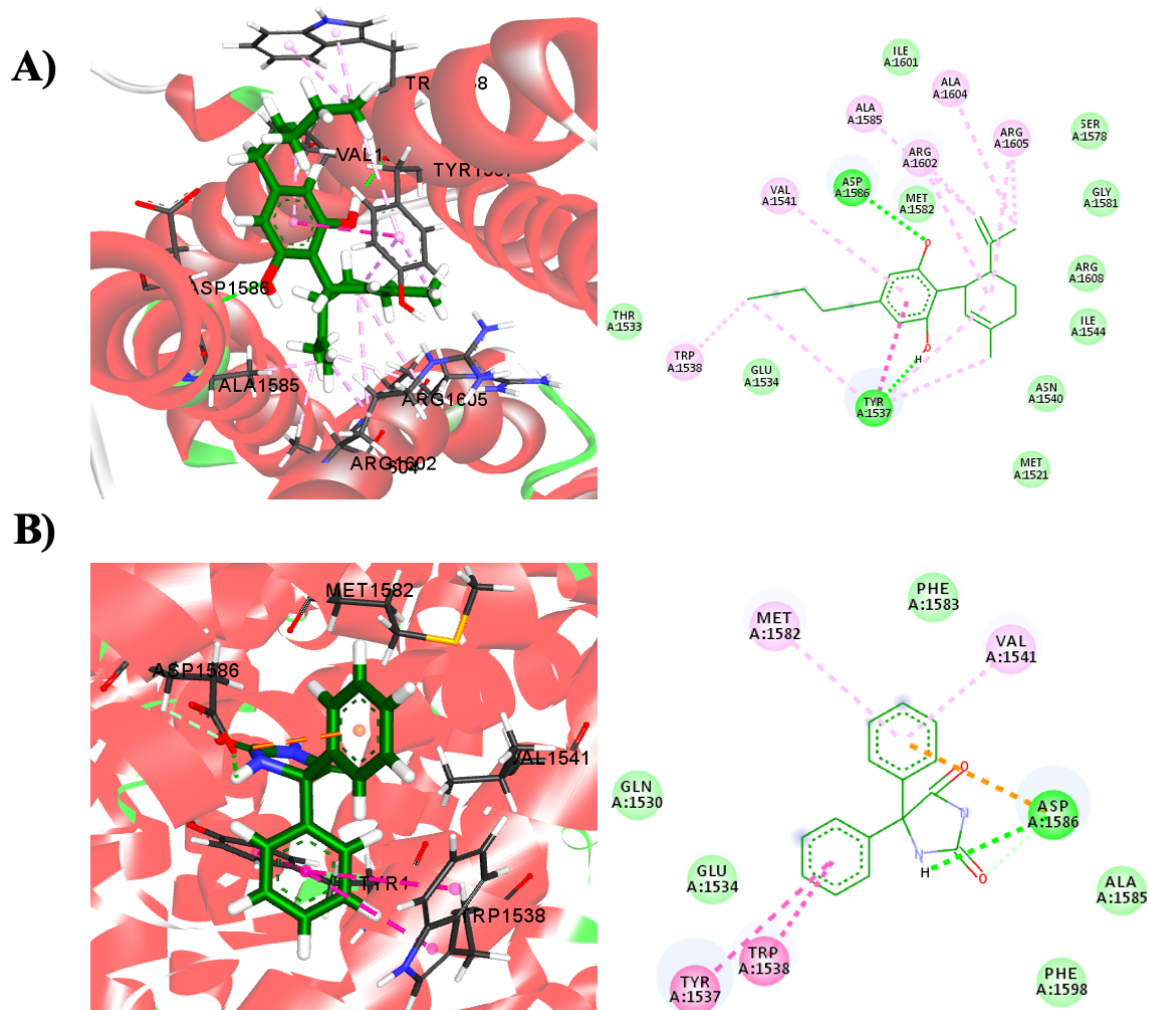
Tabela 3. Resultados da energia de ligação por *docking* molecular com o alvo NaV.

Moléculas	NaV		
	<i>MolDock Score</i> (kcal/mol)	<i>Plants Score</i> (kcal/mol)	<i>Consenso Score</i> (kcal/mol)
Canabidiol	-134,012	-308,912	-221,462
Canabielsoin	-126,016	-300,934	-213,475
Canabinol	-115,222	-310,356	-212,789
▲-9THC	-125,164	-295,892	-210,528
Fenitoína	-91,555	-338,245	-214,900

Fonte: autoria própria, 2023.

O canabidiol (Fig. 14A) interagiu através de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos ASP1586 e TYR1537 do alvo NaV. Também exibiu interações pi-alquil com TYR1537 e VAL1541, um empilhamento pi-pi com TYR1537 e interações alquil com os resíduos de aminoácidos TYR1537, TRP1538, VAL1541, ALA1585, ARG1602, ALA1604 e ARG1605, por fim apresentou interações de van der Waals com os resíduos de aminoácidos GLU1534, THR1533, MET1582, ILE1601, SER1578, GLY1581, ARG1608, ILE1544, ASN1540 e MET1521. A fenitoína (Fig. 14B) fez uma ligação de hidrogênio com o resíduo ASP1586, também realizou ligações estéricas como: empilhamento pi-pi em forma de T com os aminoácidos TYR1537 e TRP1538; pi-ânion e ligação carbono-hidrogênio com o aminoácido ASP1586; interações pi-alquil com MET1582 e VAL1541; e interações de van der Waals com os resíduos GLU1534, ALA1585, GLN1530, PHE1583 e PHE1598.

Figura 14. Interações em 3D e 2D do A) canabidiol e B) fenitoína com a NaV.



Nota A): As interações favoráveis são as ligações de hidrogênio com os resíduos ASP1586 e TYR1537; interações pi-alkil com TYR1537 e VAL1541; empilhamento pi-pi com TYR1537; interações alkil com os resíduos TYR1537, TRP1538, VAL1541, ALA1585, ARG1602, ALA1604 e ARG1605; e interações de van der Waals com os resíduos GLU1534, THR1533, MET1582, ILE1601, SER1578, GLY1581, ARG1608, ILE1544, ASN1540 e MET1521.

Nota B): As interações favoráveis são a ligação de hidrogênio com o resíduo ASP1586; empilhamento pi-pi em forma de T com os aminoácidos TYR1537 e TRP1538; pi-ânion e ligação carbono-hidrogênio com o aminoácido ASP1586; interações pi-alkil com MET1582 e VAL1541; e interações de van der Waals com os resíduos GLU1534, ALA1585, GLN1530, PHE1583 e PHE1598.

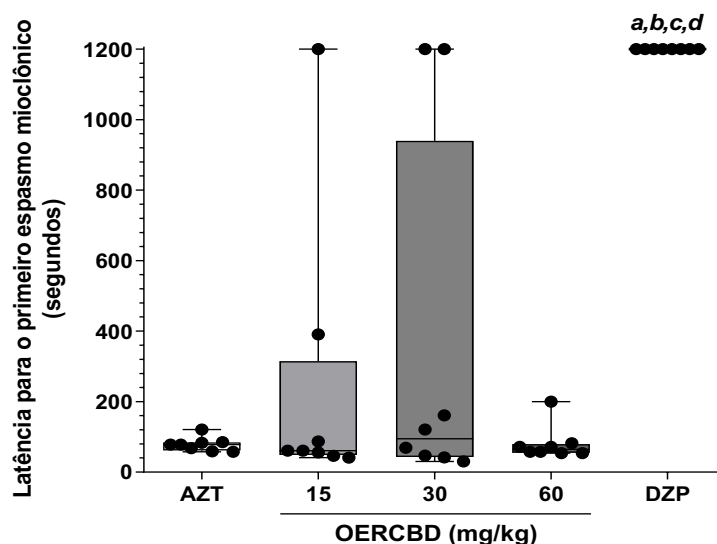
Fonte: autoria própria, 2023.

5.5 Avaliação da administração do OERCBD em modelos animais de crises epiléticas

5.5.1 Testes das crises epiléticas induzidas por Pentilenotetrazol

Em relação à latência para o primeiro espasmo (fig. 15), os três grupos que receberam o óleo enriquecido com CBD (OERCBD) na dose de 15 mg/kg ($242,9 \pm 142,9$), de 30 mg/kg ($358,8 \pm 184,2$) e de 60 mg/kg ($81,2 \pm 17,3$) não apresentaram diferença com significância estatística em comparação ao grupo controle negativo que recebeu via oral apenas o AZT ($78,7 \pm 7,0$). Em contrapartida, o grupo controle positivo que recebeu a administração oral de DZP ($1200 \pm 0,0$) apresentou diferença quando comparado ao controle negativo e às três doses avaliadas, uma vez que nenhum animal apresentou crises epiléticas.

Figura 15. Latência para o primeiro espasmo mioclônicos induzido pela administração de PTZ.



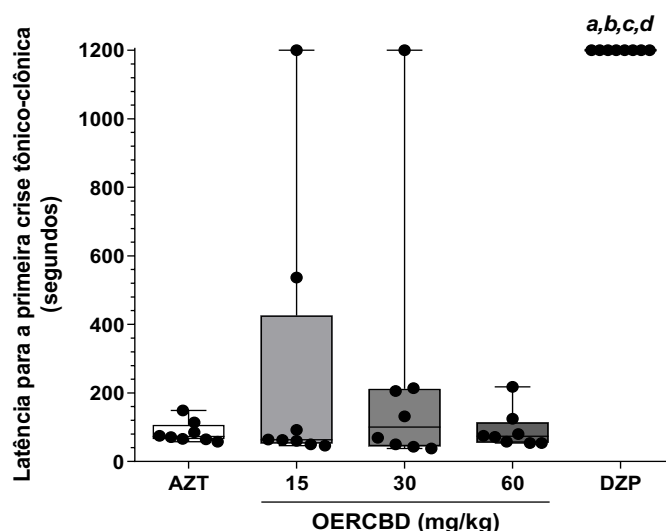
Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, *b*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com Azeite (AZT), óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) 15 mg/kg, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

Na avaliação quanto à latência para o primeiro espasmo mioclônico (figura 16), os três grupos que receberam o OERCBD na dose de 15 mg/kg ($264,0 \pm 146,1$), de 30 mg/kg ($244,0 \pm 138,9$) e de 60 mg/kg ($92,0 \pm 19,7$) também não apresentaram diferença com

significância estatística em comparação ao grupo controle negativo que recebeu por i.p. apenas o AZT ($85,3 \pm 10,9$). Em contrapartida, o grupo controle positivo que recebeu a administração oral de DZP ($1200 \pm 0,0$), da mesma forma da figura 15, apresentou diferença quando comparado ao controle negativo e às três doses avaliadas, uma vez que nenhum animal apresentou espasmos mioclônicos.

Figura 16. Latência para primeira crise tônico-clônica induzida pela administração de PTZ.

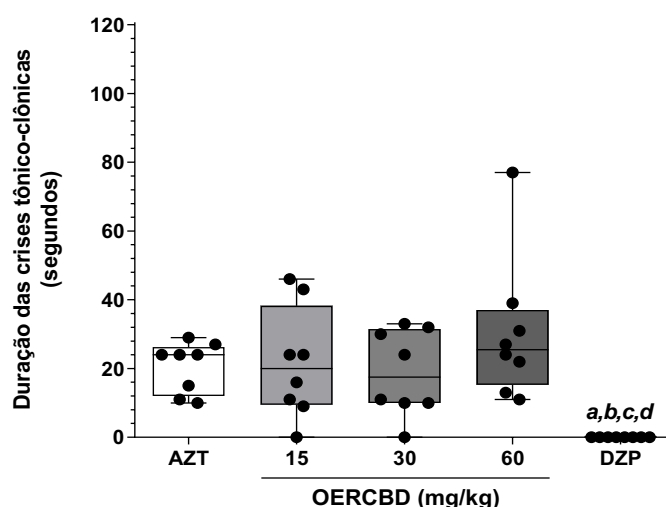


Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, *b*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com Azeite (AZT), óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) 15 mg/kg, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

Em relação à duração das crises tônico-clônicas (fig. 17), os três grupos que receberam o OERCBD na dose de 15 mg/kg ($21,63 \pm 5,72$), de 30 mg/kg ($18,7 \pm 4,4$) e de 60 mg/kg ($30,5 \pm 7,3$) também não apresentaram diferença com significância estatística em comparação ao grupo controle negativo que recebeu via oral apenas o AZT ($20,5 \pm 2,6$). O grupo que recebeu DZP ($0,0 \pm 0,0$) não apresentou crises epiléticas.

Figura 17. Duração das crises tônico-clônicas induzidas pela administração de PTZ.

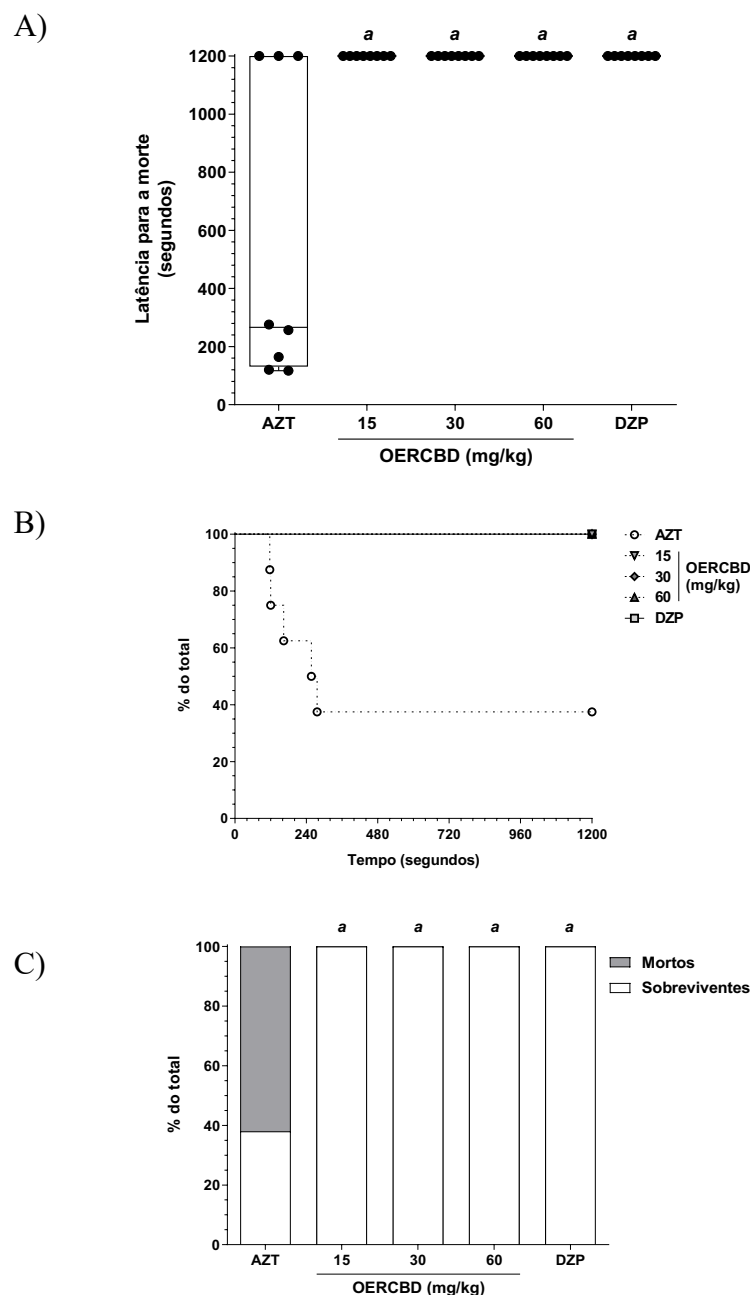


Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, *b*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com Azeite (AZT), óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) 15 mg/kg, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

Em relação à latência para morte (figura 18A), nenhum animal que recebeu OERCBD veio à óbito durante os 1200 segundos de observação do teste, assim como ocorreu com o grupo que recebeu o DZP. Portanto, todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (AZT) ($566,8 \pm 186,5$), o qual apresentou 5 mortes. Na figura 18B, observa-se que em todos os grupos com exceção do grupo AZT, todos os animais permaneceram vivos durante os 1200 s, enquanto a porcentagem de animais vivos do grupo AZT caiu para 75% após 120 s e para 50% em 240 s, permanecendo em 40% a partir de 270 s do teste até o final dos 1200 s. 60% dos animais do grupo AZT morreram (figura 18C), enquanto não houve óbitos nos demais grupos.

Figura 18. Latência para a morte, sobrevivência e mortalidade no modelo das crises epilépticas induzidas por PTZ.

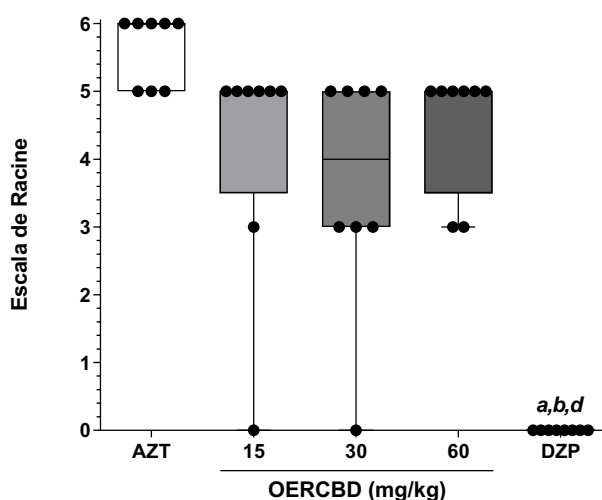


Nota: A figura mostra a latência para morte no modelo de convulsões induzidas por Petilenotetrazol (PTZ) (A), a porcentagem de sobrevivência dos animais no modelo (B) e porcentagem da mortalidade (C) durante o período de observação. Os dados da latência foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mínimo ao máximo, mostrando todos os pontos) (A). Os dados da sobrevivência foram apresentados como linhas ao longo do tempo (B) e os dados da mortalidade foram tratados pelo Teste Exato de Fisher e apresentados como barras de porcentagem do total de animais para cada grupo (C). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que a letra *a* representa uma diferença em relação ao grupo tratado com Azeite (AZT).

Fonte: autoria própria, 2023.

De forma similar, os grupos que receberam o OERCBD nas três doses (15 mg/kg: $4,125 \pm 0,64$; 30 mg/kg: $3,625 \pm 0,625$; e 60 mg/kg: $4,5 \pm 0,33$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle (AZT) ($5,625 \pm 0,18$) (fig. 19). Já o grupo que recebeu o DZP apresentou diferença com todos os grupos, uma vez que nenhum animal teve crises epiléticas e, portanto, todos permaneceram no nível zero da escala de Racine.

Figura 19. Intensidade das crises epiléticas de acordo com a Escala adaptada de Racine.



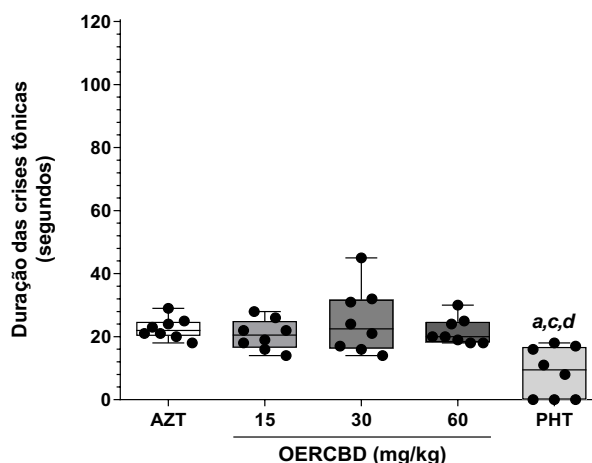
Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, *b* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com azeite (AZT), óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) 15 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

5.5.2 Testes das crises epiléticas induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES) após administração aguda do tratamento com OERCBD

Em relação à duração das crises tônicas (figura 20), nenhum dos grupos que receberam o OERCBD (15 mg/kg: $20,63 \pm 1,70$; 30 mg/kg: $25,0 \pm 3,70$; e 60 mg/kg: $21,75 \pm 1,50$) apresentou diferença com significância estatística em comparação ao grupo AZT ($22,63 \pm 1,21$). O grupo que recebeu fenitoína (FEN), o controle positivo ($8,75 \pm 2,80$), por sua vez apresentou diferença estatística quando comparado ao controle às doses.

Figura 20. Duração das crises tônicas no Teste do MES após administração aguda.

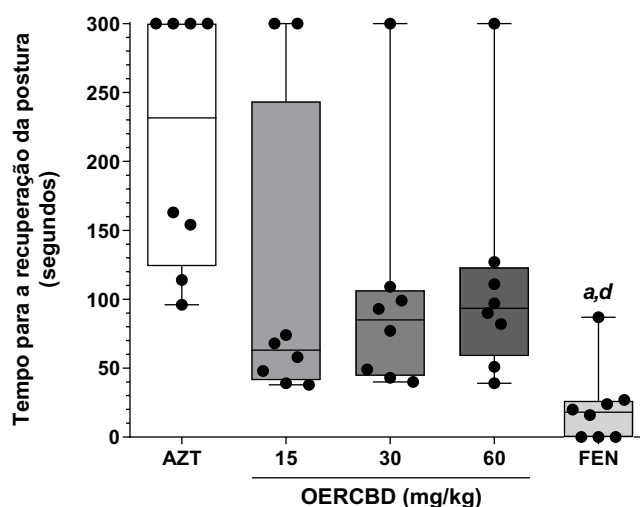


Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com AZT, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

Para a recuperação da postura (fig. 21), o resultado foi similar. Nenhum grupo que recebeu o OERCBD (15 mg/kg: $115,6 \pm 40,4$; 30 mg/kg: $101,3 \pm 29,9$; e 60 mg/kg: $112,1 \pm 28,7$) apresentou diferença com significância estatística em comparação à latência do grupo AZT ($215,9 \pm 32,6$). O grupo FEN ($21,75 \pm 10,13$), por sua vez apresentou diferença estatística quando comparado ao controle e às doses.

Figura 21. Latência para recuperação da postura no Teste do MES após administração aguda.



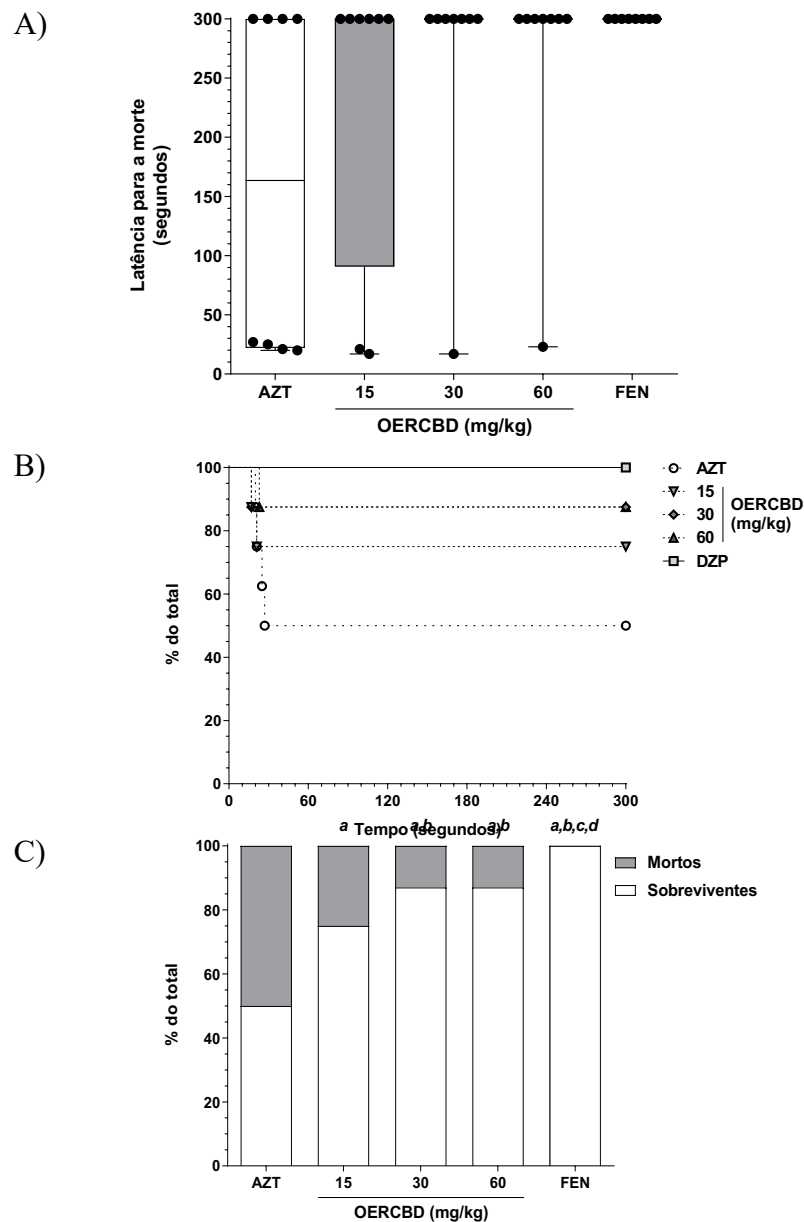
Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com AZT e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

Já em relação à latência para morte (fig. 22A), nenhum dos grupos que receberam o OERCBD (15 mg/kg: $229,8 \pm 45,9$; 30 mg/kg: $264,6 \pm 35,3$; e 60 mg/kg: $265,4 \pm 34,6$) apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle (AZT) ($161,6 \pm 52,3$). Entretanto, diferentemente dos outros parâmetros, o grupo controle positivo (FEN) ($300,0 \pm 0,0$), também não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao controle.

Nas figuras 22B e 22C, observa-se que o grupo que recebeu o OERCBD na dose de 15 mg/kg apresentou duas mortes até os 20s de teste, sobrevivendo apenas 75% dos animais, enquanto as doses de os que receberam as doses de 30 e 60 mg/kg apresentaram apenas uma morte após 20s do teste, sobrevivendo 87,5% dos animais nas duas doses. Dessa forma, os três grupos apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo AZT, que apresentou quatro mortes e uma sobrevivência de 50% após 30s de teste.

Figura 22. Latência para a morte, sobrevivência e mortalidade no Teste do MES após administração aguda.



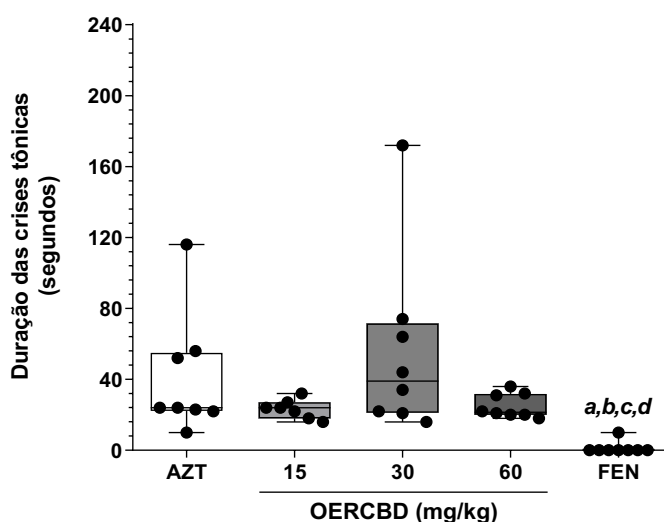
Nota: A figura mostra a latência para a morte, tempo e mortalidade no modelo de crises epilépticas induzidas por MES. (A) latência para a morte, sobrevivência dos animais (B) e a mortalidade (C). Os dados da latência foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mínimo ao máximo, mostrando todos os pontos). Os dados da sobrevivência foram apresentados como linhas ao longo do tempo e os dados da mortalidade foram tratados pelo Teste Exato de Fisher e apresentados como barras de porcentagem do total de animais para cada grupo. sendo que as letras *a*, *b*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com Azeite (AZT), óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) 15 mg/kg, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

5.5.3 Testes das crises epilépticas induzidas pelo MES após administração de doses repetidas de OERCBD

Em relação à duração das crises tônicas (fig. 23) após a administração de doses repetidas de OERCBD, o resultado foi similar ao observado no modelo agudo. Nenhum grupo que recebeu o OERCBD (15 mg/kg: $23,2 \pm 2,0$; 30 mg/kg: $55,8 \pm 18,1$; e 60 mg/kg: $25,0 \pm 2,4$) apresentou diferença em comparação com o grupo AZT ($40,8 \pm 12,1$). O grupo FEN ($1,25 \pm 1,2$), apresentou diferença estatística quando comparado ao controle e às doses.

Figura 23. Duração das crises tônicas no Teste do MES após administração de doses repetidas.

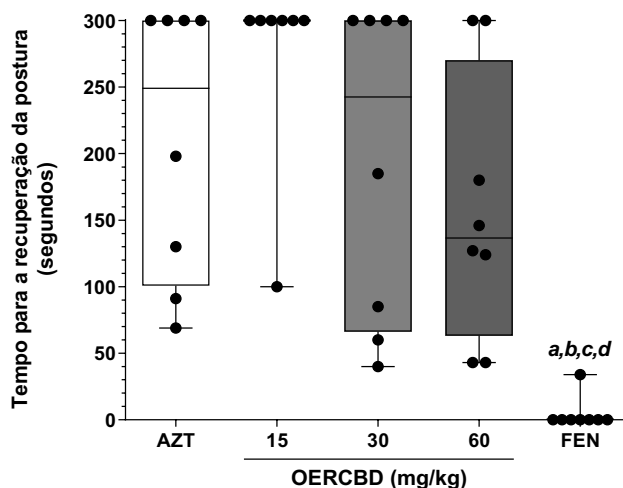


Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, *b*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com Azeite (AZT), óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) 15 mg/kg, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

Na latência para recuperação da postura (fig. 24) após a administração de doses repetidas de OERCBD, o resultado também foi similar. Nenhum grupo que recebeu o OERCBD (15 mg/kg: $271,4 \pm 28,5$; 30 mg/kg: $196,3 \pm 41,9$; e 60 mg/kg: $157,9 \pm 35,2$) apresentou diferença em comparação com o grupo AZT ($211,0 \pm 36,1$). O grupo FEN ($4,2 \pm 4,2$), apresentou diferença estatística quando comparado ao controle e às doses.

Figura 24. Latência para recuperação da postura no Teste do MES após administração de doses repetidas.



Nota: Os dados foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mostrando todos os pontos). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, sendo que as letras *a*, *b*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com Azeite (AZT), óleo de extrato de *Cannabis sativa* rico em CBD (OERCBD) 15 mg/kg, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

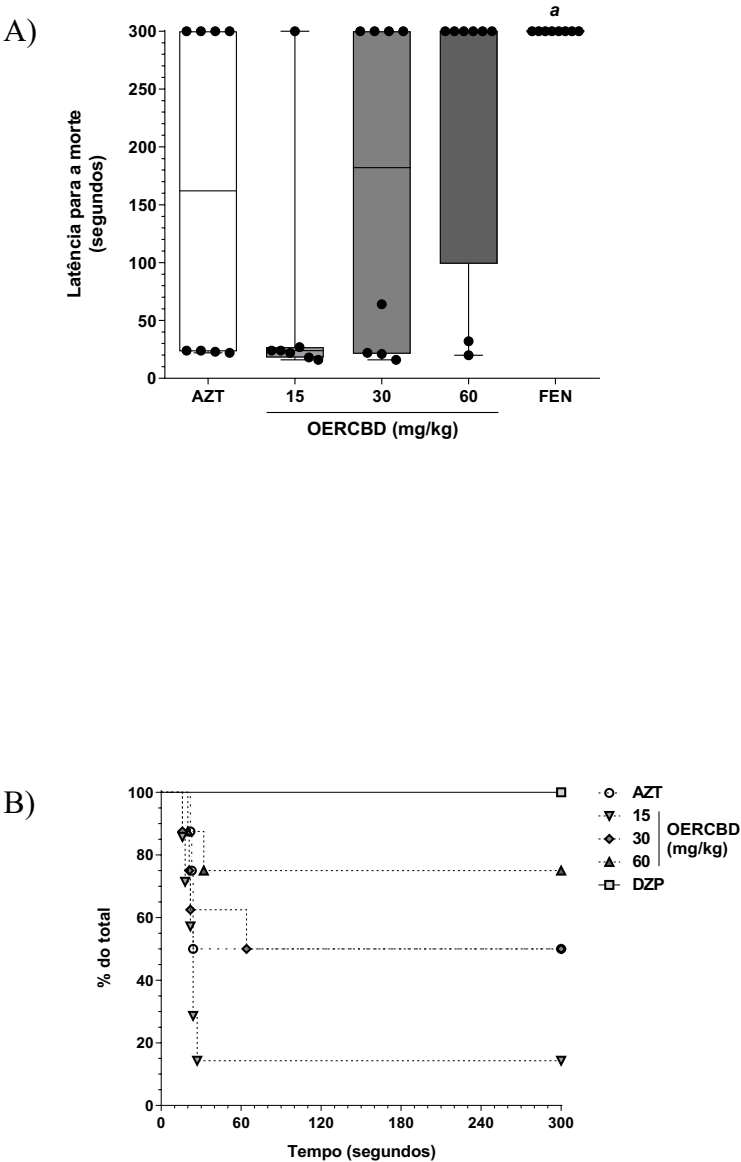
Fonte: autoria própria, 2023.

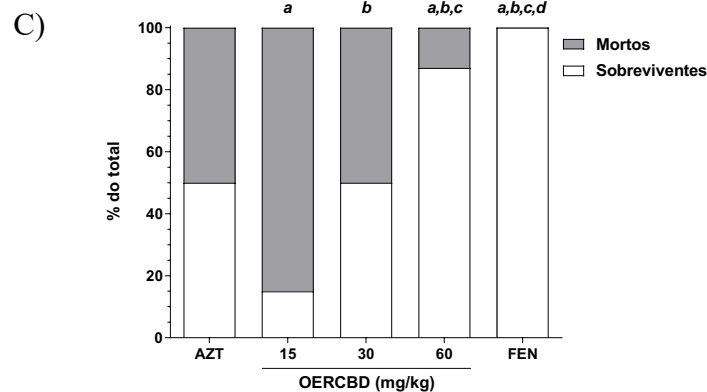
Por fim, em relação à latência para morte (figura 25A) no modelo de administração de doses repetidas, nenhum dos grupos que receberam o OERCBD (15 mg/kg: $61,5 \pm 39,7$; 30 mg/kg: $165,4 \pm 51,1$; e 60 mg/kg: $231,5 \pm 44,8$) apresentou diferença em relação ao grupo AZT ($161,6 \pm 52,3$). De forma similar ao observado com a administração aguda, aqui o grupo FEN ($300,0 \pm 0,0$), também não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao controle.

Na figura 25B, observa-se que, com a administração de doses repetidas de 15 mg/kg, sete mortes foram observadas, ocorrendo todas antes dos primeiros 30 s de teste, deixando uma sobrevivência de apenas 12,5% dos animais, como observado na figura 25C. Nas doses de 30 e 60 mg/kg, morreram quatro e dois animais, respectivamente. As mortes observadas com a dose de 30 mg/kg foram todas nos primeiros 60 s de teste, deixando uma sobrevivência de 50% dos animais, enquanto as duas mortes do grupo de 60 mg/kg ocorreram nos primeiros 40 s de teste, deixando uma sobrevivência de 75% dos animais do grupo. Dessa forma, portanto, em relação à mortalidade, as três doses apresentaram diferença estatística entre si e quando

comparadas ao grupo AZT. Já o grupo que recebeu a fenitoína não apresentou nenhuma morte e apresentou diferença com os outros grupos.

Figura 25. Latência para a morte, sobrevivência e mortalidade no Teste do MES após administração de doses repetidas.





Nota: A figura mostra a latência para a morte, tempo e mortalidade no modelo de crises epiléticas induzidas por MES. (A) latência para a morte, sobrevivência dos animais (B) e a mortalidade (C). Os dados da latência foram tratados por meio do Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn, e foram apresentados como diagramas de caixa e bigodes (mínimo ao máximo, mostrando todos os pontos). Os dados da sobrevivência foram apresentados como linhas ao longo do tempo e os dados da mortalidade foram tratados pelo Teste Exato de Fisher e apresentados como barras de porcentagem do total de animais para cada grupo. As letras *a*, *b*, *c* e *d* representam uma diferença em relação aos grupos tratados com AZT, OERCBD 15 mg/kg, OERCBD 30 mg/kg e OERCBD 60 mg/kg, respectivamente.

Fonte: autoria própria, 2023.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Uma das principais características, que tornam a *Cannabis* uma planta única, é justamente a sua riqueza em termos de constituintes químicos, em especial os fitocanabinoides. Tais substâncias não são encontradas em concentrações semelhantes em nenhuma outra planta e demonstram amplas propriedades farmacológicas. Uma revisão realizada por Radwan et al., (2021) elencou os mais de 300 componentes da planta, e demonstrou que estes vão além dos canabinoides, sendo composta também pelos terpenos, alcalóides e flavonóides. A união de tais compostos, ao invés do seu uso de forma isolada parece apresentar efeitos potencializados, o que pesquisadores como Anand et al., (2021) e Russo (2011) chamam de efeito comitiva ou “*entourage effect*”.

O estudo de Abdollahi et al., (2021) ressaltou que a presença e concentração dos compostos da planta são influenciados por vários fatores que vão de genéticos a variáveis ambientais, como latitude, altitude, clima, incluindo estágios de crescimento e a disponibilidade de umidade e oferta de nutrientes durante o seu cultivo. Sabendo que tal variação pode ocorrer, foi necessário que antecedente aos estudos *in vivo* fosse realizada uma análise por CG-EM do OERCBD, semelhante a que foi feita por Amirav et al., (2021), especialmente por tratar-se de um estudo com óleo de extrato, pois é importante que se entenda a composição, presença e concentração destes compostos para que, além de investigar o perfil da segurança e eficácia, também seja possível adequar doses e quem sabe, hipotetizar interações que possam estar influenciando nos efeitos terapêuticos e na resposta *in vivo*.

Como esperado, a análise por CG-EM revelou que o CBD era de fato a substância predominante no OERCBD, seguido do Δ -9THC, canabinol e canabielsoin presentes em concentrações menores. O CBD é reconhecido pelo seu potencial antiepiléptico, que vem sendo investigado desde a década de 70 em estudos com humanos como os de Carlini e Cunha, (1981), Trembly e Sherman, (1990) e Ames, (1986), e em estudos com animais, desenvolvidos por Jones et al., (2012) e Carlini et al., (1973). Desta forma, espera-se que os efeitos que foram observados neste estudo sejam relacionados a ação de tal molécula, que é considerada o principal fitocanabinoide não psicoativo, detentor de vasto potencial farmacológico e encontra-se em maior concentração no OERCBD. Para obtermos um melhor direcionamento nos estudos *in vivo*, avaliamos os principais compostos observados na análise de CG-EM através de um estudo *in silico* de *docking* molecular.

O estudo da ancoragem molecular evidenciou a possível atividade antiepiléptica do canabidiol. Os resultados apresentados demonstraram que o *docking* molecular foi validado pois o valor do RMSD foi baixo ($<3,0 \text{ \AA}$), além de ter fornecido apenas um valor para RMSD o que garante não haver falsos positivos, avaliando que o teste é reprodutível e que as moléculas testadas conseguiram se encaixar no sítio de ligação.

Quando analisados os resultados, foi possível observar que a energia de ligação do canabinol foi mais forte para o alvo GABA_A. Quando analisadas as interações intermoleculares obteve-se que tanto o canabinol quanto o CBD conseguiram interagir com o sítio de ligação, pois ambos conseguiram se conectar semelhantemente a molécula cristalina presente no alvo e ao diazepam.

Segundo Ahuja et al., (2015) o sítio de ligação do GABA_A para o neurotransmissor GABA é composto pela presença dos aminoácidos ARG67, THR202, PHE200, PHE65, TYR205 e TYR157. Da mesma forma, o CBD realizou interações de hidrogênio com ARG67 e a TYR157, além de ter realizados outras interações com os demais aminoácidos, e o canabinol apresentou interações com os mesmos aminoácidos e uma interação mais forte com o TYR205. No estudo de Andrade et al., (2021) a substância em análise também interagiu com os mesmos aminoácidos mencionados, corroborando a possível atividade antiepiléptica do canabidiol e canabinol via receptor GABA_A.

Em relação a ligação do CBD com o NaV 1.7, observou-se que a molécula conseguiu se ligar fortemente ao alvo, superando o valor da energia de ligação da fenitoína. Ahuja et al., (2015) determinaram que o sítio de ligação para a inibição da proteína NaV 1.7 apresenta como principais resíduos de aminoácidos TYR1537 e TRP1538, VAL1541, MET1582, GLY1581, GLU1534, ASP1586, e ALA1585. Igualmente, o CBD conseguiu realizar interações com os mesmos resíduos, apresentando interações mais fortes como as ligações de hidrogênios com ASP1586 e TY1537, enquanto a fenitoína interagiu fortemente com ASP1586 (ligação de hidrogênio).

O estudo de Emami et al., (2021), para a investigação da atividade antiepiléptica de derivados isatina aroilhidrazonas, corrobora com esse resultado, pois, no *docking* molecular, a molécula em estudo, o 6e, exibiu ligações análogas ao do CBD com os resíduos TYR1537 e VAL1541 e ALA1585. Outro estudo *in silico* que investigou a atividade antiepiléptica de derivados de 1,2,4-triazol no alvo NaV, demonstrou as mesmas interações com a proteína (Kapron et al., 2019).

Além disso, esse resultado é corroborado também pelo trabalho de Ghovanloo et al., (2018), que investigou através de estudos *in vitro* a atividade do CBD em canais de sódio dependentes de voltagem, sendo que o CBD conseguiu inibir Nav1.1–1.7. Em outro estudo, Ghovanloo et al., (2021) mostraram que a ancoragem molecular do CBD com o NaV 1.4, nos músculos esqueléticos, apresentou um bloqueio da excitabilidade do alvo e que foi confirmado corroborado nos estudos *in vitro* realizados pelos autores. Outro trabalho envolvendo o CBD e sua atividade com o canal NaV 1.4 descobriu que essa substância é capaz de ligar-se de forma favorável nestes canais em seu estado de inativação lenta nos músculos esqueléticos (Huang et al., 2021).

Tais resultados vão de encontro com o apontamento da possível atividade antiepiléptica do OERCBD, em especial ao observar a ação do seu principal composto, o CBD, nos alvos GABA_A e NaV. Dada esta hipótese, estudos *in vivo* foram realizados a fim de testar os achados obtidos nas análises realizadas *in silico*.

Estudos não-clínicos com modelos animais, exigem a realização de testes preliminares que investigam o perfil de toxicidade e determinam a DL₅₀ do composto estudado, neste caso o OERCBD. Inicialmente realizamos o estudo da toxicidade oral aguda conforme estabelecido pelo protocolo OECD (2001). Partindo da dose de 300mg/kg, nos primeiros 30 minutos pode-se observar efeitos indesejados, como a irritabilidade e presença de sedação, que seguiram presentes também na avaliação realizada 60 minutos após a administração. Decorridos 120 minutos, os animais não apresentaram mais sinais de irritabilidade, mas por sua vez, diminuíram de forma considerável a ambulação e aumentaram o nível de sedação. Tais efeitos são semelhantes aos encontrados por Rosenkrantz et al., (1981), que buscaram avaliar a toxicidade aguda de CBD em macacos rhesus. Na ocasião, com doses de 150, 200, 225, 250 ou 300mg/kg (i.v.) administradas durante 9 dias, tremores e sinais como depressão, sedação e prostração foram observados em todas as doses 30 minutos após as administrações, estabelecendo uma DL₅₀ de 212mg/kg de CBD.

Passados os 14 dias, embora não tenhamos observado mortes na dose de 300mg/kg, os sinais de toxicidade foram considerados importantes, principalmente se pensarmos que tal produto já é utilizado na clínica e quando projetamos tais efeitos em seres humanos eles podem representar um problema. Além disso, as doses de 2.000 e 5.000mg/kg não puderam ser obtidas através da apresentação que nos foi fornecida do OERCB (~33mg/mL de CBD), o que se tornou uma limitação na determinação da DL₅₀, mas não no perfil de toxicidade.

Um outro ponto importante é que estamos trabalhando com um produto que parte de um extrato bruto e que suas doses foram estabelecidas com base na concentração de CBD presente que está descrita na formulação, mas que ainda assim está associado aos demais constituintes. Logo, embora o CBD seja de forma geral bem tolerado, ao aumentar a dose do óleo, também é aumentada a concentração do Δ -9THC, que por sua vez apresenta propriedades psicoativas e efeitos muitas vezes opostos ao do CBD, e apresenta DL_{50} de 800mg/kg em ratos, até 3.000 mg/kg em cães e até 9.000 mg/kg em macacos. Ainda com base nestes dados, foi estimada que a dose letal do Δ -9THC para um humano de 70kg seria de aproximadamente 4g e que não é possível ser atingida através do consumo oral, fumo, ou vaporização de tal substância. Tais informações foram descritas no relatório do comitê de especialistas da OMS sobre dependência de drogas (Organization, 2016), cujos integrantes alertam ainda que há poucas informações disponíveis sobre a toxicologia de extratos, tinturas, óleos e chás de *Cannabis* e que resíduos de solventes podem potencializar a sua toxicidade.

Após discussão dos efeitos observados optamos por diminuir consideravelmente as doses a serem administradas, considerando 15, 30 e 60mg/kg de OERCBD como sendo ideais, pois além de não demonstrarem sinais graves de toxicidade, como observados pelos resultados, foram encontrados em estudos não-clínicos utilizando modelos animais e em doses usuais de tratamento de síndromes epilépticas raras em humanos.

Um dos estudos pioneiros da *Cannabis* buscou avaliar o potencial antiepiléptico de extrato rico em canabidiol em camundongos e ratos. Na ocasião, doses entre 10 e 100mg/kg foram utilizadas, porém ainda não havia tantas informações quanto a toxicidade dos componentes da planta (Carlini et al., 1973). Na mesma época, Izquierdo e Tannhauser avaliaram o efeito de doses de 1,5, 3, 6 e 12mg/kg do CBD frente ao modelo de eletrochoque em ratos (Izquierdo & Tannhauser, 1973).

Em um estudo mais recente sobre o potencial antiepiléptico, foi realizado o uso do CBD isolado em doses de 10, 20 e 50 mg/kg, foram consideradas altas de acordo com a metodologia (Mao et al., 2015). Além disso, a dose de 60 mg/kg do CBD isolado foi testada em relação ao modelo do PTZ por Vilela et al., (2017). Outro estudo, também utilizando o modelo do PTZ, avaliou tanto a dose de 60 mg/kg quanto a dose de 10 mg/kg de CBD (Uttl et al., 2021). Além disso, há trabalhos que utilizam doses de CBD de 1, 10 e 100mg/kg em modelos *in vivo* e *in vitro* da epilepsia do lobo temporal (Jones et al., 2010, 2012).

Quando analisamos a determinação das doses na clínica, observamos que assim como os estudos em animais, não há uma padronização ou consenso. Nesse sentido, a dose do extrato de *Cannabis* em formato de gotas, apresentação mais utilizada, não é determinada com base no peso ou na idade do indivíduo. Em vez disso, é necessário um aumento gradual até que a resposta desejada seja alcançada. Se necessário, ocorre um ajuste da dose como a redução, para manter a dosagem em que os benefícios adequados foram encontrados (MacCallum & Russo, 2018; Silva Junior, 2020).

Uma revisão sistemática avaliou as doses de CBD na clínica, observando que as doses variam entre 1 e 50mg/kg ao dia e dos estudos avaliados, 11 apontaram a dose de 15mg/kg com efeitos positivos do CBD na redução da frequência de crises epiléticas assim como a melhoria na gravidade destas crises (Millar et al., 2019). Além disso, dois estudos clínicos randomizados (ECRs) observacionais mostraram uma redução na ocorrência de eventos adversos de 25%, diminuição de 50% na frequência das crises e uma taxa de resposta de 75 a 100% na dose de 15mg/kg duas vezes ao dia, ou 30mg/kg em dose única (Devinsky et al., 2019; Thiele et al., 2019).

Tendo então realizado a análise da substância e de seus compostos, como também, a identificação de possíveis alvos moleculares através do docking e a avaliação de seu perfil de toxicidade, foi possível avançar em direção ao objetivo central deste estudo: investigar o potencial antiepilético do óleo de extrato rico em CBD (OERCBD). Essa etapa inicial de avaliação e seleção dos componentes do extrato permitiu direcionar nossos esforços para compreender melhor os efeitos terapêuticos específicos que podem estar relacionados ao CBD e suas possíveis aplicações no tratamento de epilepsia. Com as bases estabelecidas, prosseguimos com os estudos *in vivo* para investigar os efeitos farmacológicos do OERCBD na indução das crises epiléticas em modelos animais.

A validação robusta, facilidade de indução e reprodutibilidade dos resultados, tornam os modelos não-clínicos utilizando o PTZ (estímulo químico) e o MES (estímulo elétrico), os dois testes mais amplamente empregados para os estudos e investigação de possíveis novas substâncias com potencial antiepilético (Almeida, 2006).

No teste das crises epiléticas induzidas pelo pentilenotetrazol (75mg/kg), os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre as doses de 15, 30 e 60 mg/kg (v.o.) do OERCBD quando comparadas ao grupo controle tratado com o veículo (AZT). Em todas as doses testadas, não foram observadas alterações significativas relacionadas a latência para o

primeiro espasmo, a latência para a primeira crise tônico-clônica e na duração das crises, assim como na escala adaptada de Racine, a qual avalia a gravidade das crises. Esses resultados diferem dos apresentados pelo grupo tratado com DZP (4mg/kg; i.p.), droga padrão utilizada no tratamento de crises epiléticas, que foi eficaz em proteger os animais diante dos parâmetros avaliados. Quanto à avaliação da latência e ocorrência das mortes no teste do PTZ, os resultados revelaram que tanto o OERCBD quanto o DZP foram capazes de proteger os animais quando comparados ao grupo tratado com o veículo (AZT).

Os resultados observados na droga padrão DZP já eram esperados, isso porque o fármaco é amplamente reconhecido pelo seu efeito antiepilético, que está associado a potencialização da neurotransmissão mediada pelo GABA no SNC, por meio da ativação dos receptores GABA_A. Portanto, os desfechos obtidos corroboram com os conhecimentos prévios sobre seu mecanismo de ação e seu potencial em prevenir crises epiléticas.

Embora nosso estudo não tenha encontrado os mesmos resultados que os de estudos como o de Vilela et al., (2017), Mao et al., (2015) e Uttl et al., (2021), isso não significa que o OERCBD não possui atividade neuroprotetora. Deve ser lembrado que o CBD é o composto majoritário mas não é isolado, e o efeito antiepilético do CBD frente ao modelo de crises do PTZ parece estar relacionado a outros fatores, como investigou Assis Lima et al., (2022), demonstrando que a ação do CBD não possui mecanismo de ação claro e que a sua ação parece depender diretamente da via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Além disso, não encontramos na literatura estudo que, assim como o nosso, objetivasse testar OERCBD em modelo animal de crises epiléticas induzidas pelo PTZ, diferente da maioria dos trabalhos que testa o CBD de forma isolada.

Um outro ponto importante no âmbito da clínica é que o uso da *Cannabis* e, até mesmo, do CBD ocorre principalmente em epilepsias consideradas raras, como é o caso da Doença de Lafora (Aso et al., 2020), e na síndrome de Dravet (DEVINSKY ET AL., 2018). Além disso, o tratamento é feito de forma adjuvante, em associação com outros medicamentos, como demonstrado no estudo de Navarro, (2023) que concluiu que uma formulação a base de *Cannabis* é altamente eficaz como tratamento adjuvante de epilepsias refratárias em adultos. Corroborando com este estudo, Kochen et al., (2023) indicou o CBD como potencial adjuvante terapêutico também no tratamento de epilepsias focais resistentes ao tratamento medicamentoso usual. Por fim, a revisão de Wijnen et al., (2020) reforçou o uso do CBD na terapia adjuvante, desta vez no tratamento da síndrome de Lennox Gastaut, outra síndrome epilética rara, bem

como a síndrome de Dravet. Desta forma, o uso do CBD e dos extratos ricos são usualmente associados a outros medicamentos, não estando como primeira escolha quando falamos de tratamento de epilepsias.

Nossos dados oferecem uma base para a realização das próximas investigações que visam continuar explorando o potencial antiepiléptico do OERCBD em combinação com outros medicamentos. Uma abordagem interessante seria avaliar se a associação do extrato com um fármaco como o diazepam, em uma dose que, isoladamente, não seja capaz de proteger contra as crises frente ao modelo de indução com o PTZ, poderia resultar em um efeito sinérgico antiepiléptico. A realização de estudos adicionais pode fornecer evidências científicas para suportar essa abordagem terapêutica e ampliar as opções de tratamento para pacientes com epilepsia.

No teste de MES, após o tratamento agudo, não foram observadas diferenças significativas na duração das crises ou na latência para recuperação da postura entre o grupo tratado com o OERCBD e o grupo controle que recebeu o veículo. No entanto, em relação às taxas de mortalidade, o grupo tratado com a dose de 15mg/kg apresentou um índice de sobrevivência de 75%, enquanto os grupos tratados com as doses de 30mg/kg e 60mg/kg apresentaram taxas de sobrevivência de 87,5%, com apenas um óbito registrado após os primeiros 20 segundos de observação. Em contraste, o grupo controle, tratado com AZT apresentou uma taxa de sobrevivência de apenas 50%. Esses resultados indicam que o OERCBD pode conferir algum grau de proteção contra a ocorrência de mortes durante o referido modelo animal de indução de crises epiléticas, podendo ser mais eficaz nas doses mais elevadas. Como esperado, a fenitoína, droga padrão utilizada no teste, foi capaz de diminuir o tempo de crise epilética caracterizada por extensão dos membros, reduzir o tempo para recuperar a postura, assim como proteger os animais da ocorrência de morte.

Apesar da administração consecutiva do OERCBD ao longo de 14 dias com o objetivo de verificar se a neuroproteção poderia ser aprimorada, como realizou Carlini; Cunha, (1981), os resultados obtidos não demonstraram melhorias significativas na recuperação da postura e na duração das crises, o que pode ter ocorrido devido a uma sensibilidade adquirida, semelhante ao observado por Karler e Turkanis, (1980), no estudo com 3 ou 4 dias de tratamento. Pelo contrário, observou-se uma piora considerável na taxa de sobrevivência dos animais tratados com a dose de 15mg/kg, com apenas um animal sobrevivendo (n=8), o que representa uma taxa de aproximadamente 12,5%. Nas doses de 30mg/kg e 60mg/kg, as taxas de sobrevivência foram

de 50% e 75%, respectivamente. Esses achados sugerem que a administração do OERCBD não apresentou um efeito protetor efetivo nessas medidas de avaliação, e, de fato, a dose mais baixa parece ter sido associada a uma maior mortalidade.

Prenunciador na investigação do potencial antiepiléptico da *Cannabis* frente ao MES, o estudo de Izquierdo; Tannhauser, (1973) concluiu que o CBD parecia ser um potente agente anticonvulsivante. Os autores enfatizaram ainda que seu mecanismo de ação poderia estar relacionado a difenilhidantoína que, assim como a fenitoína, são compostos da hidantoína e possuem seu mecanismo relacionado a inibição dos canais de sódio, o que as tornam eficazes nas epilepsias de induções elétricas (Rang et al., 2015). Izquierdo e Tannhauser também comentaram que, além do potencial neuroprotetor, outros sintomas poderiam estar associados ao uso dos compostos da *Cannabis*, tal qual, alucinações e outros comprometimentos neurotóxicos típicos. Posteriormente o estudo de Ghosh e Bhattacharya, (1978), avaliou o papel das monoaminas cerebrais na ação anticonvulsivante de uma resina proveniente da *Cannabis indica*, concluindo que a capacidade neuroprotetora do produto poderia estar atrelada a serotonina.

Estudos mais recentes como o de Dlugosz et al., (2023) demonstraram que tanto o CBD sozinho quanto associado a doses baixas não terapêuticas de Δ -9THC podem ser eficazes na proteção de crises de indução elétrica. Dito isso, corroborando com o estudo de Milligan et al., (2022) nossos resultados *in silico* e *in vivo* dão possíveis indícios de que as propriedades antiepilépticas do CBD estão, de fato, atreladas aos canais de sódio do tipo NaV, já que a ação nos canais de potássio já foi investigada por de Shirazi-ZAND et al., (2013), que observaram não haver interações proeminentes. No entanto, de acordo com as evidências encontradas por Hill et al., (2014) bloquear os canais de sódio parece não ser a única forma de ação do CBD frente as crises epilépticas.

Uma substância pode ser considerada antiepiléptica quando possui a capacidade de inibir a ocorrência das crises e reduzir sua severidade em um determinado período de tempo (Yacubian, 2004). Contudo, muitas DAEs utilizadas atualmente não apresentaram resultados satisfatórios para serem aplicadas na prática clínica, como é o caso dos barbitúricos, que em estudos não-clínicos chegaram a piorar as crises em alguns modelos (Carlini & Mendes, 2011). Mais uma vez, é necessário reforçar que os produtos da *Cannabis* se mostram bons adjuvantes aos tratamentos convencionais, como observado no trabalho de Consroe e Wolkin, (1977), onde

o efeito antiepilético da fenitoína foi significativamente aumentada quando associada ao CBD sozinho ou ao CBD somado ao fenobarbital.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos firmados, podemos chegar as seguintes conclusões:

A análise fitoquímica por CG-EM revelou que o CBD foi o composto majoritário presente no OERCBD mas, por se tratar de um produto proveniente de extrato bruto, os demais metabólitos secundários também estão contidos na formulação e podem interferir na ação farmacológica.

Quanto ao estudo computacional de *docking* molecular, o CBD apresentou boa afinidade de ligação tanto com o receptor GABA_A quanto com o sítio de ligação do canal de sódio dependente de voltagem. No entanto, apesar das interações favoráveis observadas no *docking* molecular, os resultados comportamentais não corroboraram os efeitos benéficos do OERCBD nos modelos de crises epilépticas utilizados neste estudo. No caso do teste do PTZ, o OERCBD não foi capaz de postergar o início, diminuir a duração e nem a gravidade das crises, embora tenha protegido da ocorrência de morte.

Da mesma forma, a administração aguda do óleo não demonstrou melhora na recuperação da postura, nem na intensidade e duração das crises no MES. No entanto, observou-se uma redução na taxa de mortalidade durante o teste indicando um possível efeito neuroprotetor. Surpreendentemente, no tratamento com doses repetidas durante 14 dias, houve uma piora considerável na taxa de sobrevivência dos animais tratados com o OERCBD, especialmente na dose mais baixa testada, sugerindo atenção no uso prolongado do OERCBD.

Desse modo, apesar de haver uma boa interação do CBD aos receptores GABA_A e canais de sódio NaV, isso pode não ser suficiente para modular efetivamente a atividade epileptiforme nos modelos animais utilizados. Assim, mesmo sem serem observados benefícios significativos no tratamento agudo das crises *in vivo*, os resultados obtidos nesse estudo contribuem para a compreensão da complexidade da resposta do SNC aos fitocanabinoides, destacam a importância de investigações adicionais para determinar a eficácia terapêutica e os possíveis efeitos adversos dessas substâncias em modelos animais de epilepsia. Além disso, sugere o uso do OERCBD como possível bom adjuvante no tratamento das diversas epilepsias de modo a beneficiar o paciente com a melhora na sua qualidade de vida por meio do controle da refratariedade das suas crises epilépticas.

REFERÊNCIAS

- Abbasi, H., Fereidoonhezad, M., & Mirveis, Z. (2022). Vilazodone-Tacrine hybrids as potential anti-Alzheimer agents: QSAR, molecular docking, and molecular dynamic (MD) simulation studies. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(1), 588–607.
- Abdollahi, M., Sefidkon, F., Peirovi, A., Calagari, M., & Mousavi, A. (2021). Assessment of the Cannabinoid Content from Different Varieties of Cannabis sativa L. during the Growth Stages in Three Regions. *Chemistry & Biodiversity*, 18(12), e2100247.
- Adams, R. P. (2017). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed.* Texensis Publishing.
- Ahuja, S., Mukund, S., Deng, L., Khakh, K., Chang, E., Ho, H., Shriver, S., Young, C., Lin, S., & Johnson Jr, J. P. (2015). Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist. *Science*, 350(6267), aac5464.
- Almeida, R. N. de. (2006). Psicofarmacologia: fundamentos práticos. *Rio de Janeiro*, 357.
- Almeida, R. N. (1999). Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmácia*, 80, 72–76.
- ALVES, G. C. (2018). *Saúde, integridade e justiça: um estudo sobre a atual política de drogas no Brasil com enfoque na legalização do uso pessoal e medicinal da Cannabis sativa.*
- Ames, F. R. (1986). Anticonvulsant effect of cannabidiol. *S Afr Med J*, 69, 14.
- Amirav, A., Neumark, B., Margolin Eren, K. J., Fialkov, A. B., & Tal, N. (2021). Cannabis and its cannabinoids analysis by gas chromatography–mass spectrometry with Cold EI. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(6), e4726.
- Anand, U., Pacchetti, B., Anand, P., & Sodergren, M. H. (2021). Cannabis-based medicines and pain: a review of potential synergistic and entourage effects. *Pain Management*, 11(4), 395–403.
- Anderson, C. L., Evans, V. F., DeMarse, T. B., Febo, M., Johnson, C. R., & Carney, P. R. (2017). Cannabidiol for the treatment of drug-resistant epilepsy in children: current state of research. *Journal of Pediatric Neurology*, 15(04), 143–150.
- Andrade, H. H. N. de. (2019). *Estudo não clínico do perfil psicofarmacológico do álcool cinâmico.*
- Andrade, J. C., Monteiro, Á. B., Andrade, H. H. N., Gonzaga, T. K. S. N., Silva, P. R., Alves, D. N., Castro, R. D., Maia, M. S., Scotti, M. T., & Sousa, D. P. (2021). Involvement of GABAA receptors in the anxiolytic-like effect of hydroxycitronellal. *BioMed Research International*, 2021.
- Aso, E., Andrés-Benito, P., Grau-Escolano, J., Caltana, L., Brusco, A., Sanz, P., & Ferrer, I. (2020). Cannabidiol-enriched extract reduced the cognitive impairment but not the epileptic seizures in a Lafora disease animal model. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 5(2), 150–163.
- Barboza, J. H. (2019). *LEGALIZAÇÃO DA MACONHA PARA FINS MEDICINAIS E SEU ASPECTO JURÍDICO.*
- Biringer, R. G. (2021). The rise and fall of anandamide: processes that control synthesis, degradation, and storage. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(7), 2753–2775.
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of ethnopharmacology*, 227, 300–315.

- Booth, J. K., & Bohlmann, J. (2019). Terpenes in Cannabis sativa—From plant genome to humans. *Plant Science*, 284, 67–72.
- Braithwaite, I., Bhagavan, C., Doppen, M., Kung, S., Oldfield, K., & Newton-Howes, G. (2021). Medicinal applications of cannabis/cannabinoids. *Current Opinion in Psychology*, 38, 1–10.
- Bukiya, A. N. (2019). Physiology of the endocannabinoid system during development. *Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology*, 13–37.
- Carlini, E. A., & Cunha, J. M. (1981). Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 21(S1), 417S-427S.
- Carlini, E. A., Leite, J. R., Tannhauser, M., & Berardi, A. C. (1973). Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25(8), 664–665.
- Carlini, E. A., & Mendes, F. R. (2011). Protocolos em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais. *Fap-Unifesp, São Paulo*.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824.
- Catterall, W. A., Kalume, F., & Oakley, J. C. (2010). NaV1. 1 channels and epilepsy. *The Journal of physiology*, 588(11), 1849–1859.
- Charitos, I. A., Gagliano-Candela, R., Santacroce, L., & Bottalico, L. (2021). The Cannabis spread throughout the continents and its therapeutic use in history. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 21(3), 407–417.
- Cintra, C. H. M. (2019). O USO MEDICINAL DA CANNABIS E O CONFLITO ENTRE DIREITOS E NORMAS. *Revista Juris UniToledo*, 4(01).
- Consroe, P., & Wolkin, A. (1977). Cannabidiol--antiepileptic drug comparisons and interactions in experimentally induced seizures in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 201(1), 26–32.
- Crippa, J. A., Pereira Junior, L. C., Pereira, L. C., Zimmermann, P. M., Brum Junior, L., Rechia, L. M., Dias, I., Hallak, J. E., Campos, A. C., & Guimarães, F. S. (2021). Effect of two oral formulations of cannabidiol on responses to emotional stimuli in healthy human volunteers: pharmaceutical vehicle matters. *Brazilian Journal of Psychiatry*.
- Crocq, M.-A. (2022). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- Cunha, J. M., Carlini, E. A., Pereira, A. E., Ramos, O. L., Pimentel, C., Gagliardi, R., Sanvito, W. L., Lander, N., & Mechoulam, R. (1980). Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*, 21(3), 175–185.
- da Silva Junior, E. A., Medeiros, W. M. B., Dos Santos, J. P. M., de Sousa, J. M. M., da Costa, F. B., Pontes, K. M., Borges, T. C., Segundo, C. E. N., e Silva, A. H. A., & Nunes, E. L. G. (2022). Evaluation of the efficacy and safety of cannabidiol-rich cannabis extract in children with autism spectrum disorder: randomized, double-blind and controlled placebo clinical trial. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy, AheadOfPrint*, 0.
- Davis, J. P., & Ramsey, H. H. (1949). Antiepileptic action of marihuana active substances. *Fed. Proc*, 8, 284–285.

- de Assis Lima, I. V., Pinto, H. P. P., Bellozi, P. M. Q., da Silva, M. C. M., Vilela, L. R., Moreira, F. A., Moraes, M. F. D., & de Oliveira, A. C. P. (2022). Cannabidiol effect in pentylenetetrazole-induced seizures depends on PI3K. *Pharmacological Reports*, 74(5), 1099–1106.
- Dei Cas, M., Casagni, E., Casiraghi, A., Minghetti, P., Fornasari, D. M. M., Ferri, F., Arnoldi, S., Gambaro, V., & Roda, G. (2020). Phytocannabinoids profile in medicinal cannabis oils: the impact of plant varieties and preparation methods. *Frontiers in pharmacology*, 1752.
- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., & Notcutt, W. G. (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791–802.
- Devinsky, O., Marsh, E., Friedman, D., Thiele, E., Laux, L., Sullivan, J., Miller, I., Flamini, R., Wilfong, A., & Filloux, F. (2016). Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *The Lancet Neurology*, 15(3), 270–278.
- Devinsky, O., Nabbout, R., Miller, I., Laux, L., Zolnowska, M., Wright, S., & Roberts, C. (2019). Long-term cannabidiol treatment in patients with Dravet syndrome: An open-label extension trial. *Epilepsia*, 60(2), 294–302.
- Devinsky, O., Patel, A. D., Thiele, E. A., Wong, M. H., Appleton, R., Harden, C. L., Greenwood, S., Morrison, G., Sommerville, K., & Group, G. P. A. S. (2018). Randomized, dose-ranging safety trial of cannabidiol in Dravet syndrome. *Neurology*, 90(14), e1204–e1211.
- Dlugosz, L., Zhou, H. Z., Scott, B. W., & Burnham, M. (2023). The effects of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol, alone and in combination, in the maximal electroshock seizure model. *Epilepsy Research*, 107087.
- Emami, S., Valipour, M., Komishani, F. K., Sadati-Ashrafi, F., Rasouljan, M., Ghasemian, M., Tajbakhsh, M., Masihi, P. H., Shakiba, A., & Irannejad, H. (2021). Synthesis, in silico, in vitro and in vivo evaluations of isatin aroylhydrazones as highly potent anticonvulsant agents. *Bioorganic Chemistry*, 112, 104943.
- Faggion, S. A., Cunha, A. O. S., Fachim, H. A., Gavin, A. S., dos Santos, W. F., Pereira, A. M. S., & Beleboni, R. O. (2011). Anticonvulsant profile of the alkaloids (+)-erythravine and (+)-11- α -hydroxy-erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae–Papilionaceae). *Epilepsy & Behavior*, 20(3), 441–446.
- Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy—Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Seminars in Neurology*, 40(06), 617–623.
- Falco-Walter, J. J., Scheffer, I. E., & Fisher, R. S. (2018). The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy research*, 139, 73–79.
- Fernández-Ruiz, J., Galve-Roperh, I., Sagredo, O., & Guzmán, M. (2020). Possible therapeutic applications of cannabis in the neuropsychopharmacology field. *European Neuropsychopharmacology*, 36, 217–234.
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., & Roulet Perez, E. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530.
- Foster, B. C., Abramovici, H., & Harris, C. S. (2019). Cannabis and cannabinoids: kinetics and interactions. *The American journal of medicine*, 132(11), 1266–1270.

- French, J. A., Krauss, G. L., Wechsler, R. T., Wang, X.-F., DiVentura, B., Brandt, C., Trinka, E., O'Brien, T. J., Laurenza, A., & Patten, A. (2015). Perampanel for tonic-clonic seizures in idiopathic generalized epilepsy: a randomized trial. *Neurology*, 85(11), 950–957.
- Gedde, M., & Maa, E. (2013). Whole cannabis extract of high concentration cannabidiol may calm seizures in highly refractory pediatric epilepsies. *Washington, DC: American Epilepsy Society Annual Meeting*.
- Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S., & Hussein, D. E. E. (2021). GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1–15.
- Ghosh, P., & Bhattacharya, S. K. (1978). Anticonvulsant action of cannabis in the rat: role of brain monoamines. *Psychopharmacology*, 59, 293–297.
- Ghovanloo, M.-R., Choudhury, K., Bandaru, T. S., Fouda, M. A., Rayani, K., Rusinova, R., Phaterpekar, T., Nelkenbrecher, K., Watkins, A. R., & Poburko, D. (2021). Cannabidiol inhibits the skeletal muscle Nav1. 4 by blocking its pore and by altering membrane elasticity. *Journal of General Physiology*, 153(5), e202012701.
- Ghovanloo, M.-R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C., & Goodchild, S. J. (2018). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16546–16558.
- Giuffrida, A., & Piomelli, D. (2000). The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chemistry and physics of lipids*, 108(1–2), 151–158.
- Glauser, T. A., Dlugos, D. J., Dodson, W. E., Grinspan, A., Wang, S., Wu, S.-C., & Investigators, E.-106/INT-28. (2007). Topiramate monotherapy in newly diagnosed epilepsy in children and adolescents. *Journal of Child Neurology*, 22(6), 693–699.
- Golub, V., & Reddy, D. (2021). Cannabidiol therapy for refractory epilepsy and seizure disorders. *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders*, 93–110.
- Gray, R. A., & Whalley, B. J. (2020). The proposed mechanisms of action of CBD in epilepsy. *Epileptic Disorders*, 22, S10–S15.
- Gross, C., & Tiwari, D. (2018). Regulation of ion channels by microRNAs and the implication for epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 18(9), 1–11.
- Grotenhermen, F., & Müller-Vahl, K. (2012a). The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Deutsches Ärzteblatt International*, 109(29–30), 495.
- Grotenhermen, F., & Müller-Vahl, K. (2012b). The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Deutsches Ärzteblatt International*, 109(29–30), 495.
- Haj-Mirzaian, A., Ramezanzadeh, K., Afshari, K., Mousapour, P., Abbasi, N., Haj-Mirzaian, A., Nikbakhsh, R., Haddadi, N., & Dehpour, A. R. (2019). Activation of ATP-sensitive K-channel promotes the anticonvulsant properties of cannabinoid receptor agonist through mitochondrial ATP level reduction. *Epilepsy & Behavior*, 93, 1–6.
- Hanada, T. (2020). Ionotropic glutamate receptors in epilepsy: a review focusing on AMPA and NMDA receptors. *Biomolecules*, 10(3), 464.
- Hill, A. J., Jones, N. A., Smith, I., Hill, C. L., Williams, C. M., Stephens, G. J., & Whalley, B. J. (2014). Voltage-gated sodium (Nav) channel blockade by plant cannabinoids does not confer anticonvulsant effects per se. *Neuroscience Letters*, 566, 269–274.
- Huang, C.-W., Lin, P.-C., Chen, J.-L., & Lee, M.-J. (2021). Cannabidiol selectively binds to the voltage-gated sodium channel Nav1. 4 in its slow-inactivated state and inhibits sodium current. *Biomedicine*, 9(9), 1141.

- Izquierdo, I., & Tannhauser, M. (1973). The effect of cannabidiol on maximal electroshock seizures in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25(11), 916–917.
- Ji, X., Zeng, Y., & Wu, J. (2021). The CB2 receptor as a novel therapeutic target for epilepsy treatment. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8961.
- Jones, N. A., Glyn, S. E., Akiyama, S., Hill, T. D. M., Hill, A. J., Weston, S. E., Burnett, M. D. A., Yamasaki, Y., Stephens, G. J., & Whalley, B. J. (2012). Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure*, 21(5), 344–352.
- Jones, N. A., Hill, A. J., Smith, I., Bevan, S. A., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2010). Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 569–577.
- Jonsson, M., Jestoi, M., Nathanail, A. V, Kokkonen, U.-M., Anttila, M., Koivisto, P., Karhunen, P., & Peltonen, K. (2013). Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. *Food and chemical toxicology*, 53, 27–32.
- Kaeberle, J. (2018). Epilepsy disorders and treatment modalities. *NASN School Nurse*, 33(6), 342–344.
- Kaproń, B., Łuszczki, J. J., Płazińska, A., Siwek, A., Karcz, T., Gryboś, A., Nowak, G., Makuch-Kocka, A., Walczak, K., & Langner, E. (2019). Development of the 1, 2, 4-triazole-based anticonvulsant drug candidates acting on the voltage-gated sodium channels. Insights from in-vivo, in-vitro, and in-silico studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 129, 42–57.
- Karler, R., & Turkanis, S. A. (1980). Subacute cannabinoid treatment: anticonvulsant activity and withdrawal excitability in mice. *British journal of pharmacology*, 68(3), 479.
- Kim, S. H., Yang, J. W., Kim, K. H., Kim, J. U., & Yook, T. H. (2019). A Review on Studies of Marijuana for Alzheimer's Disease—Focusing on CBD, THC. *Journal of pharmacopuncture*, 22(4), 225.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11), 935–949.
- Kochen, S., Villanueva, M., Bayarres, L., Daza-Restrepo, A., Martinez, S. G., & Oddo, S. (2023). Cannabidiol as an adjuvant treatment in adults with drug-resistant focal epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 144, 109210.
- Loizon, M., & Rheims, S. (2018). Management of drug-resistant epilepsy. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, 47(3), 234–242.
- Löscher, W. (1998). Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy. *Progress in neurobiology*, 54(6), 721–741.
- Löscher, W. (2017). Animal models of seizures and epilepsy: past, present, and future role for the discovery of antiseizure drugs. *Neurochemical research*, 42(7), 1873–1888.
- Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S. M., & Vezzani, A. (2020). Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. *Pharmacological reviews*, 72(3), 606–638.
- Lowin, T., & Straub, R. H. (2015). Cannabinoid-based drugs targeting CB1 and TRPV1, the sympathetic nervous system, and arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1), 1–13.
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological psychiatry*, 79(7), 516–525.
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2021). Review of the endocannabinoid system. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615.

- Maa, E., & Figi, P. (2014). The case for medical marijuana in epilepsy. *Epilepsia*, 55(6), 783–786.
- MacCallum, C. A., & Russo, E. B. (2018a). Practical considerations in medical cannabis administration and dosing. *European journal of internal medicine*, 49, 12–19.
- MacCallum, C. A., & Russo, E. B. (2018b). Practical considerations in medical cannabis administration and dosing. *European journal of internal medicine*, 49, 12–19.
- Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of neuroendocrinology*, 20, 10–14.
- Mao, K., You, C., Lei, D., & Zhang, H. (2015). High dosage of cannabidiol (CBD) alleviates pentylenetetrazole-induced epilepsy in rats by exerting an anticonvulsive effect. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(6), 8820.
- Marinho, C. A. G., & Neves, I. F. (2022). REGULAMENTAÇÃO DO USO MEDICINAL E CIENTÍFICO DA CANNABIS NO BRASIL. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 8(11), 1264–1283.
- Marzo, V. Di, & Petrocellis, L. De. (2006). Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu. Rev. Med.*, 57, 553–574.
- Mechoulam, R., & Carlini, E. A. (1978). Toward drugs derived from cannabis. *Naturwissenschaften*, 65(4), 174–179.
- Mechoulam, R., Hanuš, L. O., Pertwee, R., & Howlett, A. C. (2014). Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), 757–764.
- Melo, C. G. F. de. (2017). *Efeito anticonvulsivante do monoterpene sintético (1S)-(-)-verbenona em animais de laboratório por metodologias específicas comportamentais*.
- Millar, S. A., Stone, N. L., Bellman, Z. D., Yates, A. S., England, T. J., & O’Sullivan, S. E. (2019). A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. *British journal of clinical pharmacology*, 85(9), 1888–1900.
- Milligan, C. J., Anderson, L. L., Bowen, M. T., Banister, S. D., McGregor, I. S., Arnold, J. C., & Petrou, S. (2022). A nutraceutical product, extracted from Cannabis sativa, modulates voltage-gated sodium channel function. *Journal of Cannabis Research*, 4(1), 30.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639–1662.
- Muller, C., Morales, P., & Reggio, P. H. (2019). Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 487.
- Naidoo, V., Karanian, D. A., Vadivel, S. K., Locklear, J. R., Wood, J. T., Nasr, M., Quizon, P. M. P., Graves, E. E., Shukla, V., & Makriyannis, A. (2012). Equipotent inhibition of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase—dual targets of the endocannabinoid system to protect against seizure pathology. *Neurotherapeutics*, 9(4), 801–813.
- Namdar, D., Voet, H., Ajjampura, V., Nadarajan, S., Mayzlish-Gati, E., Mazuz, M., Shalev, N., & Koltai, H. (2019). Terpenoids and phytocannabinoids co-produced in Cannabis sativa strains show specific interaction for cell cytotoxic activity. *Molecules*, 24(17), 3031.
- Navarrete, M., & Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, 57(6), 883–893.
- Navarro, C. E. (2023). Cannabis-based magistral formulation is highly effective as an adjuvant treatment in drug-resistant focal epilepsy in adult patients: an open-label prospective cohort study. *Neurological Sciences*, 44(1), 297–304.

- O'Connell, B. K., Gloss, D., & Devinsky, O. (2017). Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: a review. *Epilepsy & Behavior*, 70, 341–348.
- Oecd, O. (2001). Guidelines for the Testing of Chemicals. *Acute oral toxicity—acute toxic class method: test no-423. Organization for Economic Co-operation and Development*.
- Oliva, M., Berkovic, S. F., & Petrou, S. (2012). Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. *Epilepsia*, 53(11), 1849–1859.
- Organization, W. H. (2016). WHO expert committee on drug dependence. *World Health Organization technical report series*, 998, 1–34.
- Organization, W. H. (2023). *Epilepsy*.
- Osafo, N., Yeboah, O. K., & Antwi, A. O. (2021). Endocannabinoid system and its modulation of brain, gut, joint and skin inflammation. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3665–3680.
- Paiva, F. P. de, Maffili, V. V., & Santos, A. C. S. (2005). Curso de manipulação de animais de laboratório. *Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz*.
- Perucca, P., Scheffer, I. E., & Kiley, M. (2018). The management of epilepsy in children and adults. *Medical Journal of Australia*, 208(5), 226–233.
- Pimentel, A. A. B. (2021a). *Avaliação do risco de salinização e sodificação do solo para cultivo de Cannabis sp.*
- Pimentel, A. A. B. (2021b). *Avaliação do risco de salinização e sodificação do solo para cultivo de Cannabis sp.*
- Porter, A. C., & Felder, C. C. (2001). The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacology & therapeutics*, 90(1), 45–60.
- Press, C. A., Knupp, K. G., & Chapman, K. E. (2015). Parental reporting of response to oral cannabis extracts for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 45, 49–52.
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & ElSohly, M. A. (2021). Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. *Molecules*, 26(9), 2774.
- Rang, R., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2015). *Rang & dale farmacologia*. Elsevier Brasil.
- Rodrigues, C. H. P., Hernández-González, J. E., Pedrina, N. J., Leite, V. B. P., & Bruni, A. T. (2021). In silico Evaluation of Cucurbit [6] uril as a Potential Detector for Cocaine and Its Adulterants Lidocaine, Caffeine, and Procaine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 32, 800–810.
- Rodrigues, T. C. M. L., de Moura, J. P., dos Santos, A. M. F., Monteiro, A. F. M., Lopes, S. M., Scotti, M. T., & Scotti, L. (2023). Epileptic Targets and Drugs: A Mini-Review. *Current Drug Targets*, 24(3), 212–224.
- Rosenkrantz, H., Fleischman, R. W., & Grant, R. J. (1981). Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicology and applied pharmacology*, 58(1), 118–131.
- Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1344–1364.
- Sarlo, G. L., & Holton, K. F. (2021). Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review. *Seizure*, 91, 213–227.
- Sayyah, M., Nadjafnia, L., & Kamalinejad, M. (2004). Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2–3), 283–287.

- Schlosser, J., & Rarey, M. (2009). Beyond the virtual screening paradigm: structure-based searching for new lead compounds. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(4), 800–809.
- Schmidt, D., & Löscher, W. (2005). Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*, 46(6), 858–877.
- Scotti, L., Scotti, M. T., Pasqualoto, K. F. M., Bolzani, V. da S., & Ferreira, E. I. (2009). Molecular physicochemical parameters predicting antioxidant activity of Brazilian natural products. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 908–913.
- Shirazi-Zand, Z., Ahmad-Molaei, L., Motamedi, F., & Naderi, N. (2013). The role of potassium BK channels in anticonvulsant effect of cannabidiol in pentylenetetrazole and maximal electroshock models of seizure in mice. *Epilepsy & Behavior*, 28(1), 1–7.
- Sierra-Paredes, G., & Sierra-Marcuño, G. (2007). Extrasynaptic GABA and glutamate receptors in epilepsy. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 6(4), 288–300.
- Sills, G. J., & Rogawski, M. A. (2020). Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*, 168, 107966.
- Silva Junior, E. A. da. (2020). *Avaliação da eficácia e segurança do extrato de Cannabis rico em canabidiol em crianças com o transtorno do espectro autista: “ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo controlado”*.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2016). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., & Caracelli, I. (2002). *Princípios de análise instrumental*.
- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The cannabis terpenes. *Molecules*, 25(24), 5792.
- Stasiłowicz, A., Tomala, A., Podolak, I., & Cielecka-Piontek, J. (2021). Cannabis sativa L. as a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 778.
- Suppajariyawat, P., Andrade, A. F. B. de, Elie, M., Baron, M., & Gonzalez-Rodriguez, J. (2019). The use of chemical composition and additives to classify petrol and diesel using gas chromatography–mass spectrometry and chemometric analysis: A UK study. *Open chemistry*, 17(1), 183–197.
- Thiele, E., Marsh, E., Mazurkiewicz-Beldzinska, M., Halford, J. J., Gunning, B., Devinsky, O., Checketts, D., & Roberts, C. (2019). Cannabidiol in patients with Lennox-Gastaut syndrome: Interim analysis of an open-label extension study. *Epilepsia*, 60(3), 419–428.
- Thijs, R. D., Surges, R., O’Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, 393(10172), 689–701.
- Thomas, R. H., & Cunningham, M. O. (2018). Cannabis and epilepsy. *Practical Neurology*, 18(6), 465–471.
- Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*, 49(11), 3315–3321.
- Treiman, D. M. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*, 42, 8–12.
- Tremblay, B., & Sherman, M. (1990). Double-blind clinical study of cannabidiol as a secondary anticonvulsant, presented at: Marijuana’90 International Conference on Cannabis and Cannabinoids; 1990 July 8–11, Kolymbari, Crete. *International Association for Cannabinoid Medicines*.

- Uttl, L., Hložek, T., Mareš, P., Páleníček, T., & Kubová, H. (2021). Anticonvulsive effects and pharmacokinetic profile of cannabidiol (Cbd) in the pentylenetetrazol (ptz) or n-methyl-d-aspartate (nmda) models of seizures in infantile rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 94.
- Venâncio, E. T. (2015). *Avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de Justicia pectoralis (Chambá): estudo de neuroproteção e mecanismo de ação*.
- Vijayakumar, B. G., Ramesh, D., Joji, A., & Kannan, T. (2020). In silico pharmacokinetic and molecular docking studies of natural flavonoids and synthetic indole chalcones against essential proteins of SARS-CoV-2. *European journal of pharmacology*, 886, 173448.
- Vilela, L. R., Lima, I. V., Kunsch, É. B., Pinto, H. P. P., de Miranda, A. S., Vieira, É. L. M., de Oliveira, A. C. P., Moraes, M. F. D., Teixeira, A. L., & Moreira, F. A. (2017). Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy & Behavior*, 75, 29–35.
- Watt, G., & Karl, T. (2017). In vivo evidence for therapeutic properties of cannabidiol (CBD) for Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 8, 20.
- Wijnen, B., Armstrong, N., Ramaekers, B., Witlox, W., Westwood, M., Fayter, D., Ryder, S., Buksnys, T., Worthy, G., & Misso, K. (2020). Cannabidiol for adjuvant treatment of seizures associated with Lennox–Gastaut syndrome and Dravet syndrome: an evidence review group perspective of a NICE single technology appraisal. *Pharmacoeconomics*, 38, 1043–1053.
- Wyrofsky, R. R., Reyes, B. A. S., Zhang, X.-Y., Bhatnagar, S., Kirby, L. G., & Van Bockstaele, E. J. (2019). Endocannabinoids, stress signaling, and the locus coeruleus-norepinephrine system. *Neurobiology of stress*, 11, 100176.
- Yacubian, E. M. T. (2004). Tratamento medicamentoso das epilepsias. Em *Tratamento medicamentoso das epilepsias* (p. 318).
- Yuen, A. W. C., Keezer, M. R., & Sander, J. W. (2018). Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. *Epilepsy & Behavior*, 78, 57–61.
- Zhou, J., Noori, H., Burkovskiy, I., Lafreniere, J. D., Kelly, M. E. M., & Lehmann, C. (2019). Modulation of the endocannabinoid system following central nervous system injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 388.
- Zhu, X., Liu, J., Huang, S., Zhu, W., Wang, Y., Chen, O., & Xue, J. (2019). Neuroprotective effects of isoliquiritigenin against cognitive impairment via suppression of synaptic dysfunction, neuronal injury, and neuroinflammation in rats with kainic acid-induced seizures. *International Immunopharmacology*, 72, 358–366.
- Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I – QUADRO CONTENDO DOS PARÂMETROS AVALIADOS NA TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL.

	Quantificação dos Efeitos				
	Sem Feito, (-) Efeito diminuído, (+) Efeito presente, (++) Efeito aumentado				
Tempo	Até 30'	60'	120'	180'	240'
1. Sistema Nervoso Central					
Estimulante					
Agressividade					
Ambulação Diminuída					
Andar em círculo					
Autolimpeza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Irritabilidade					
Levantar-se					
Movimentação Intensa de Vibrissas					
Pedalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
Depressores					
Abdução das patas posteriores					
Ambulação diminuída					
Alagesia					
Anestesia					
Ataxia					
Catatonía					
Cauda de Straub					
Hipnose					
Perda do reflexo auricular					
Perda do reflexo corneal					
Ptose palpebral					
Reflexo do endireitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
2. Sistema Nervoso Autônomo					
Cianose					
Constipação					
Defecação					
Diarreia					
Força para agarrar					
Lacrimejamento					
Micção					
Piloereção					
Respiração					
Salivação					
Tônus muscular					
3. Mortes					

Fonte: Adaptado de Almeida, 2006.

ANEXO II - ESCALA ADAPTADA DE RACINE

Experimento: _____ **Avaliador:** _____ **Data:** ____/____/____

RACINE	COMPORTAMENTOS CARACTERÍSTICOS
0	Animal explorando normalmente, sem alteração comportamental
1	Imobilidade súbita, deitado de barriga (sobre o ventre), olhar imóvel
2	Automatismos faciais (vibrissas e/ou boca), cauda enrijecida, mioclonia de membros/pescoço (espasmo)
3	Convulsão clônica na postura sentada, sacudidas mioclônicas (<i>dog shake</i>), possível crise de ausência
4	<i>Rearing</i> com convulsão clônica/tônico-clônica seguida de queda de frente (queda sobre o ventre, sem perda do equilíbrio)
5	Convulsão tônico-clônica com queda de costas ou de lado (perda do equilíbrio), corridas e saltos “selvagens”, convulsão tônica com recuperação
6	Morte por convulsão tônica (extensão de membros anteriores/posteriores e parada respiratória)

Nº	ANIMAL	LATÊNCIA P/ 1º ESPASMO MIOCLÔNICO	LATÊNCIA P/ 1ª CRISE TÔNICO- CLÔNICA	DURAÇÃO DAS CRISES TÔNICO- CLÔNICAS (minuto de início e de fim)	Escala Máxima atingida 1-6	COMENTÁRIOS (comportamentos atípicos, latência p/ morte, outros)
1						
2						
3						
4						
5						
6						

