

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Pollyana Mendonça de Assis

Óleo de Cannabis de amplo espectro alivia sintomas comportamentais tipo-depressivo e tipo-ansioso em camundongos expostos a eventos traumáticos

Juiz de Fora

2024

Pollyana Mendonça de Assis

Óleo de Cannabis de amplo espectro alivia sintomas comportamentais tipo-depressivo e tipo-ansioso em camundongos expostos a eventos traumáticos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do grau de Doutora em Saúde. Área de concentração: Inovação Tecnológica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Assis, Pollyana Mendonça de.

Óleo de Cannabis de amplo espectro alivia sintomas comportamentais tipo-depressivo e tipo-ansioso em camundongos expostos a eventos traumáticos / Pollyana Mendonça de Assis. -- 2024.

76 f. : il.

Orientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2024.

1. Transtorno do estresse traumático. 2. Ansiedade. 3. Depressão. 4. Sistema endocanabinóide. 5. Óleo de Cannabis de amplo espectro. I. Raposo, Nádia Rezende Barbosa, orient. II. Título.

Pollyana Mendonça de Assis

Óleo de Cannabis de amplo espectro alivia sintomas comportamentais tipo-depressivo e tipo-ansioso em camundongos expostos a eventos traumáticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em 18 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Marcela Mota

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Roberta Passos do Espírito Santo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Laura Alves Cota e Souza

Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Alexandre Augusto Barros Lataliza

Panvel Farmácias

Juiz de Fora, 26/11/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Nadia Rezende Barbosa Raposo, Professor(a)**, em 18/12/2024, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALEXANDRE AUGUSTO BARROS LATALIZA, Usuário Externo**, em 18/12/2024, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Laura Alves Cota e Souza, Usuário Externo**, em 19/12/2024, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Passos do Espirito Santo, Professor(a)**, em 19/12/2024, às 14:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela Mota, Técnico Administrativo em Educação**, em 09/01/2025, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2121456** e o código CRC **74B97E37**.

AGRADECIMENTOS

À professora orientadora Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo, pelos ensinamentos e apoio ao longo desses últimos sete anos.

Ao professor Dr. Rafael Dutra, Eduarda Ferrarini e demais membros do Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF) da Universidade Federal de Santa Catarina que ofereceram todo o suporte para a realização da parte de experimentação *in vivo* deste trabalho, bem como apoio para a análise de dados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo suporte para a realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Associação Brasileira de Apoio Cannabis e Esperança (ABRACE), pela doação do óleo de cannabis utilizado neste estudo.

A todos os colegas do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), pela amizade, suporte e ensinamentos ao longo de todos esses anos.

À Helena: eu não teria chegado até aqui sem o suporte dela.

Ao Arthur, por ter sido meu ombro amigo e meu maior incentivador nessa jornada.

Por fim, deixo os meus sinceros agradecimentos à minha família, amigos, e todas e todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é uma condição psiquiátrica complexa, com sintomas semelhantes aos de ansiedade e depressão. Para cerca de 20% a 30% dos pacientes, os tratamentos convencionais são ineficazes. Na busca por alternativas mais eficazes, a compreensão crescente do papel do sistema endocanabinoide (SEC) nos processos emocionais tem levado à investigação do potencial terapêutico da Cannabis. Nesse contexto, foram investigados os efeitos do óleo de Cannabis de amplo espectro em comportamentos tipo- depressivo e tipo-ansioso, desencadeados por estresse agudo e crônico, bem como seu impacto a nível central e nos níveis séricos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Camundongos machos *Swiss* foram randomizados em diferentes grupos de tratamento (veículo, fluoxetina e óleo de Cannabis – 0,1, 1, 3 e 10 mg/kg, via oral) e submetidos a estresse agudo por restrição dos movimentos e estresse crônico de origem imprevisível. Estes animais foram então avaliados comportamentalmente através do teste do labirinto elevado em cruz (EPMT), teste do nado forçado (FST), teste de borrifagem da sacarose (ST) e teste do campo aberto (OFT). A tétrede canabinoide avaliou os efeitos centrais do óleo, enquanto os níveis séricos de biomarcadores foram estimados por meio de ensaio magnético multiplex com leitura por sistema de fluorescência. O óleo de Cannabis (0,1 mg/kg) reduziu significativamente o comportamento semelhante à ansiedade no EPMT nos animais induzidos ao estresse agudo de restrição dos movimentos ($p < 0,05$) em comparação com o veículo. Além disso, o óleo de Cannabis reverteu significativamente comportamentos de desespero e anedônicos no FST ($p < 0,05$) e ST ($p < 0,05$), respectivamente, em camundongos estressados cronicamente em comparação com o veículo. Ainda, o óleo de Cannabis não desencadeou os efeitos da tétrede canabinoide ($p < 0,0001$); reduziu os níveis séricos de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF; $p < 0,01$) e do receptor RAGE ($p < 0,0001$), e aumentou os níveis séricos de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF; $p < 0,01$). Coletivamente, nossos dados sugerem o potencial do óleo de Cannabis de amplo espectro em melhorar sintomas relacionados à ansiedade e depressão resultantes de eventos traumáticos.

Palavras-chave: Transtorno do estresse traumático; ansiedade; depressão; sistema endocanabinóide; óleo de Cannabis de amplo espectro.

ABSTRACT

Posttraumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric condition that presents a broad range of symptoms and shares phenotypic similarities with anxiety and depression. Refractory PTSD affects 10–30% of patients, underscoring the necessity for alternative pharmacotherapy. The emerging understanding of the involvement of the endocannabinoid system (ECS) in emotional processes has prompted exploration into the therapeutic potential of Cannabis. Therefore, this study aimed to assess the therapeutic effects of broad-spectrum Cannabis oil on anxiety- and depressive-like behaviors induced by combined stressors. Additionally, the study investigated the impact of the oil on central cannabinoid receptor 1 and serum levels of cytokines, chemokines, and growth factors. Mice were randomly assigned to five groups (vehicle, fluoxetine, and Cannabis oil (0.1, 1, 3, and 10 mg/kg, oral dose) and subjected to acute restraint and chronic unpredictable stress. They were then behaviorally evaluated using the elevated plus-maze test (EPMT), forced swimming test (FST), splash test (ST), and open field test (OFT). The tetrad cannabinoid assay assessed the central effects of the oil, while serum biomarker levels were measured using a multiplex bead-based assay. Cannabis oil (0.1 mg/kg, p.o.) significantly decreased anxiety-like behavior in the EPMT under acute restraint stress ($p < 0.05$) compared to the vehicle. Moreover, Cannabis oil significantly reversed despair and anhedonic-like behaviors in the FST ($p < 0.05$) and ST ($p < 0.05$), respectively, in chronically stressed mice compared to the vehicle. Additionally, therapy with Cannabis oil, compared to the vehicle, did not induce cannabinoid-tetrad effects ($p < 0.0001$); it downregulated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; $p < 0.01$) and advanced glycation end-products (RAGE; $p < 0.0001$), and upregulated vascular endothelial growth factor (VEGF; $p < 0.01$) serum levels. Collectively, our data suggest the potential of broad-spectrum Cannabis oil to ameliorate symptoms related to anxiety and depression resulting from traumatic events.

Keywords: Post-traumatic stress disorder; anxiety; depression; endocannabinoid system; broad-spectrum Cannabis oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição dos receptores canabinoides tipos 1 e 2 pelo organismo humano	20
Figura 2 - Mecanismo geral da sinalização endocanabinoide	21
Figura 3 - O envolvimento do sistema endocanabinoide na resposta aguda ao estresse	23
Figura 4 - Estrutura química dos principais canabinoides da Cannabis	24
Figura 5 - Resumo gráfico das etapas experimentais e testes realizados	38
Figura 6 – Detalhamento dos protocolos experimentais para a indução do estresse e avaliação do comportamento em camundongos	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes do sistema endocanabinoide	18
Tabela 2 - Modelos de indução ao estresse no estudo do transtorno do estresse pós-traumático	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
2-AG	2-Araquidonoil Glicerol
5-HT _{1A}	Receptores de Serotonina 1A
AA	Ácido Araquidônico
ABHD12	Domínio de AB-hidrolase contendo 12, lisofosfolipase
ABHD6	Domínio de AB-hidrolase contendo 6, lipase de acilglicerol
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AEA	Anandamida
AMT	Transportadores de Membrana de Anandamida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ca ²⁺	Cálcio
CB ₁ R	Receptores Canabinoides Tipo 1
CB ₂ R	Receptores Canabinoides Tipo 2
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBDV	Canabidivarina
CBG	Canabigerol
CBN	Canabinol
CID-11	Classificação Internacional da Doenças – 11 ^a revisão
cm	Centímetros
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Lipase do Diacilglicerol
DSM-5	Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais – 5 ^a edição
EMT	Transportadores de Membrana de Endocanabinoides
EOTX	Eotaxina
EPMT	<i>Elevated Plus Maze Test</i> – Teste do Labirinto em Cruz Elevado
FAAH	Hidrolase de Amida de Ácido Graxo
FABPs	Proteínas de Ligação a Ácidos Graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLAT	Transportador de Anandamida Semelhante à FAAH-1
FST	<i>Forced Swimming Test</i> – Teste do Nado Forçado
g	Gramas
GIRKs	Canais de Potássio Retificadores Internamente
GM-CSF	Fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos
GPR119	Receptor Acoplado à Proteína G119
GPR18	Receptor Acoplado à Proteína G18
GPR55	Receptor Acoplado à Proteína G55
h	Hora(s)
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HSP70s	Proteínas de Choque Térmico de 70kDa
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL-17A	Interleucina-17A

IL-17E	Interleucina-17E
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina-2
IL-33	Interleucina-33
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IRSNs	Inibidores da Recaptação da Serotonina-Norepinefrina
ISRSs	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
kg	Kilogramas
MAGL	Monoacilglicerol Lipase
MAP quinases	Proteínas Ativadas por Mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
mg	Miligramas
min	Minuto(s)
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos
mL	Mililitro(s)
NAAA	Ácido Amidase de N-aciletanolamina
NAPE-PLD	Enzima Fosfolipase D Específica para N-acil-fosfatidiletanolamina
OEA	N-oleoiletanolamida
OFT	<i>Open Field Test</i> – Teste do Campo Aberto
PCR	Proteína C Reativa
PEA	N-palmitoiletanolamida
pg	Picograma
PPAR γ	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SEA	N-estearoiletanolamida
SEC	Sistema Endocanabinoide
SNC	Sistema Nervoso Central
ST	<i>Splash Test</i> – Teste de Borrifagem da Sacarose
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
TEPT	Transtorno do Estresse Pós-Traumático
THC	Δ^9 - Tetrahydrocannabinol
TRPV1	Receptor Vaniloide Transitório Subtipo 1
v.o.	Via Oral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
$\Delta 8$ -THC	$\Delta 8$ -Tetrahydrocannabinol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO	15
2.2	POTENCIAIS BIOMARCADORES	16
2.3	TRATAMENTO	17
2.4	O SISTEMA ENDOCANABINOIDE	18
2.5	SISTEMA ENDOCANABINOIDE E O TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO	22
2.6	<i>Cannabis</i> sp.	23
2.7	MODELOS EXPERIMENTAIS DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO	27
2.7.1	Estresse agudo por restrição dos movimentos	30
2.7.2	Estresse crônico de origem imprevisível	30
2.7.3	Tétrade canabinoide	31
2.8	POTENCIAIS APLICAÇÕES CLÍNICAS	32
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	GERAIS	35
4.2	ESPECÍFICOS	35
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	ÓLEO DE CANNABIS DE AMPLO ESPECTRO	36
5.2	ANIMAIS	36
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
5.4	MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO AO ESTRESSE	40
5.4.1	Estresse único por restrição	40
5.4.2	Estresse crônico de origem imprevisível	41
5.5	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	42
5.5.1	Teste do nado forçado (FST, “<i>Forced Swimming Test</i>”)	42
5.5.2	Teste de borrifagem da sacarose (ST, “<i>Splash Test</i>”)	42
5.5.3	Teste do labirinto em cruz elevado (EPMT, “<i>Elevated Plus Maze Test</i>”)	43
5.5.4	Teste do campo aberto (OFT, “<i>Open Field Test</i>”)	43
5.6	TÉTRADE CANABINOIDE	43

5.7	ANÁLISE DE BIOMARCADORES SÉRICOS POR ENSAIO MULTIPLEX/LUMINEX	44
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO I - Critérios DSM-5 para TEPT	68
	ANEXO 2 – Análise cromatográfica	70
	ANEXO II – Análise microbiológica	72
	ANEXO III – Certificado do CEUA	74

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) é uma condição mental que pode surgir após a exposição do indivíduo a eventos traumáticos de natureza extrema, como agressões físicas e/ou sexuais, situações de risco de morte e desastres naturais (Bisson et al., 2015; Mann; Marwaha, 2024). No mundo, a prevalência de exposição a tais eventos varia de 61% a 80%, com uma taxa de desenvolvimento de TEPT de aproximadamente 5% a 10% entre os expostos (Mann; Marwaha, 2024). Estudos recentes na região metropolitana de São Paulo mostraram que 1,6% da população relatou sofrer de TEPT nos últimos 12 meses e 3,2% ao longo da vida (Coelho *et al.*, 2022), com taxas mais elevadas observadas em grupos socialmente vulneráveis, jovens, mulheres e militares (Shalev; Liberzon; Marmar, 2017).

A psicoterapia focada no trauma é considerada o tratamento de escolha para o TEPT em crianças e adultos, com opções farmacológicas como a sertralina e a paroxetina também sendo consideradas de primeira linha (Mann; Marwaha, 2024). No entanto, menos de 60% dos pacientes respondem significativamente aos antidepressivos, e a remissão completa ocorre em apenas 20% - 30% dos casos (Akiki; Abdallah, 2019), destacando a necessidade de estratégias alternativas. Nesse contexto, o Sistema Endocanabinoide (SEC) desperta interesse devido à sua associação com a modulação dos sintomas do TEPT relacionados à ansiedade, cognição e emoção, bem como com a extinção de memórias aversivas (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Hill *et al.*, 2018).

A Cannabis, com sua longa história medicinal, contém fitocanabinoides como o Δ^9 – tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD), que interagem com receptores do SEC e têm potencial terapêutico para o TEPT (Paes-Colli *et al.*, 2022). No entanto, desafios como a baixa biodisponibilidade e estabilidade do CBD podem afetar sua eficácia terapêutica (Larsen; Shahinas, 2020; Millar *et al.*, 2020), destacando a importância da escolha da forma farmacêutica, como o óleo de Cannabis de amplo espectro, que pode explorar o potencial do "efeito entourage", fenômeno que sugere que a interação entre múltiplos compostos da planta, como outros fitocanabinoides e terpenos, pode potencializar os efeitos terapêuticos do CBD e do THC, promovendo uma ação sinérgica que vai além do efeito isolado de cada composto (Ferber *et al.*, 2020).

Os modelos animais desempenham um papel crucial na pesquisa do TEPT, fornecendo *insights* valiosos sobre sua neuropatofisiologia e identificando possíveis alvos terapêuticos (Verbitsky; Dopfel; Zhang, 2020a). Entre esses modelos, o estresse agudo

por restrição dos movimentos e o estresse crônico de origem imprevisível são comumente utilizados, permitindo uma análise detalhada das mudanças comportamentais e neurobiológicas associadas ao TEPT (Deslauriers *et al.*, 2018; Török *et al.*, 2019).

Assim, considerando a alta prevalência do TEPT, a refratariedade aos tratamentos disponíveis e o potencial terapêutico sugerido da Cannabis, este estudo busca explorar o potencial terapêutico do óleo de Cannabis de amplo espectro em comportamentos do tipo-depressivo e do tipo-ansioso em camundongos expostos ao estresse combinado, além de investigar sua segurança e influência em marcadores séricos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) é uma condição mental que pode se desenvolver após exposição pontual ou contínua do indivíduo a eventos traumáticos de natureza extrema, incluído agressões físicas e/ou sexuais; situações que ofereçam risco de morte, tais como guerras e acidentes; e desastres naturais (Bisson *et al.*, 2015; Mann; Marwaha, 2024). Por definição, entende-se por exposição vivenciar diretamente ou testemunhar um evento traumático, ou ser notificado de que um familiar ou amigo próximo sofreu algum trauma (Lancaster *et al.*, 2016). De acordo com as estatísticas globais, os eventos traumáticos frequentemente relatados são acidentes/injúrias, com uma prevalência ao longo da vida de 36%, enquanto nos Estados Unidos da América (EUA), as agressões físicas e sexuais (52%) e os acidentes ou incêndios (50%) são os mais prevalentes (Benjet *et al.*, 2016). No Brasil, mais especificamente na região metropolitana de São Paulo, um estudo de 2022 mostrou que 1,6% da população relatou já ter sofrido de TEPT em algum período dos últimos 12 meses e 3,2% já vivenciou a condição ao longo da vida (Coêlho *et al.*, 2022). De maneira geral, a prevalência de exposição a eventos traumáticos ao longo da vida dos indivíduos varia de 61% a 80%, e dentre a população exposta, o TEPT se desenvolverá em 5% a 10%, aproximadamente (Mann; Marwaha, 2024). Taxas maiores de TEPT têm sido relatadas entre indivíduos vulneráveis socialmente, jovens, mulheres, militares (forças armadas, policiais e bombeiros)(Shalev; Liberzon; Marmar, 2017).

O primeiro passo para o diagnóstico do TEPT consiste na obtenção de um histórico detalhado, o que pode ser desafiador para o paciente no momento de descrever a natureza e a severidade do trauma vivido, levando-o a optar por evitar mencionar certos detalhes (Mann; Marwaha, 2024). Há duas diretrizes principais que definem o diagnóstico do TEPT: o Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais – 5ª edição (DSM-5) e a Classificação Internacional da Doenças – 11ª revisão (CID-11) (Bryant, 2019). Foi a partir da definição adotada pelo DSM-5 que o TEPT foi removido do grupo de transtorno de ansiedade para uma nova categoria de “transtornos relacionados ao trauma e estresse” (Miao *et al.*, 2018), e os critérios adotados por essa classificação encontram-se descritos no Anexo I. Porém, muitas áreas ao redor do mundo adotam os parâmetros da CID-11 (Maercker *et al.*, 2013). A CID geralmente adota uma abordagem mais descomplicada para o diagnóstico psiquiátrico (Bryant, 2019), simplificando os sintomas

do TEPT em seis, que se enquadram em três grupos, a saber: re-experiência constante do evento traumático, esquiva de lembranças traumáticas e sensação de ameaça. Para o diagnóstico, é necessário ao menos um sintoma de cada grupo que seja persistente por muitas semanas após exposição ao agente traumático (Miao *et al.*, 2018).

Apesar de numerosas investigações e diversas revisões nos critérios de diagnóstico do TEPT, permanece incerto qual tipo de trauma e qual grau de extensão é necessário para induzir o transtorno (Miao *et al.*, 2018). Ademais, testes laboratoriais que possam confirmar a exposição ao trauma ou o TEPT ainda não estão disponíveis, apesar do grande interesse no desenvolvimento de tais ferramentas (Yehuda *et al.*, 2015a).

2.1.1 POTENCIAIS BIOMARCADORES

Apesar da prevalência e do impacto socioeconômico do TEPT, os mediadores moleculares de sua patogênese ainda não estão totalmente compreendidos. Identificar assinaturas moleculares ao longo do tempo e da gravidade é crucial para entender melhor sua origem e curso (Muhie *et al.*, 2023). Uma gama de biomarcadores está sendo pesquisada para o TEPT. Os biomarcadores do TEPT abordam disfunções do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), sistemas monoaminérgicos, inflamação, bem como mudanças genéticas e epigenéticas. A disfunção do eixo HPA se manifesta por níveis reduzidos de cortisol salivar e uma resposta atenuada ao estresse agudo. A disfunção monoaminérgica envolve níveis elevados de noradrenalina e alterações no sistema serotoninérgico. Marcadores inflamatórios, como interleucina (IL)-6, IL-2 e proteína C reativa (PCR), estão correlacionados com a sintomatologia do TEPT, mas não são específicos devido à sua ocorrência em outras condições. Embora polimorfismo do gene FKBP5 tenha sido relacionado ao desenvolvimento do transtorno, sua associação com outras condições psiquiátricas, como a depressão, limita sua utilidade como marcador específico para o TEPT (Scholl *et al.*, 2022).

Apesar de serem utilizados principalmente para fins de pesquisa, os biomarcadores do TEPT em breve poderão desempenhar um papel crucial na triagem e na detecção precoce do transtorno, o que poderá resultar em intervenções mais oportunas e com melhores resultados para os pacientes. Esses biomarcadores abrangem uma variedade de indicadores, incluindo alterações estruturais, substâncias circulantes e respostas biológicas, que são fundamentais para avaliar diversos aspectos do TEPT, desde o risco da doença até o diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento (Yang; Wynn;

Ursano, 2018). Apesar de ainda não serem utilizados rotineiramente na prática clínica para o diagnóstico do transtorno bem como para o monitoramento da resposta ao tratamento, os avanços científicos indicam um potencial promissor para sua futura implementação diagnóstica. No entanto, apesar das descobertas encorajadoras, é crucial realizar mais pesquisas para esclarecer sua utilidade clínica e confiabilidade (Al Jowf *et al.*, 2023).

2.1.2 TRATAMENTO

A psicoterapia focada no trauma é considerada a primeira linha de tratamento para o TEPT em crianças e adultos (Mann; Marwaha, 2024). Além disso, os pacientes também têm a possibilidade do tratamento farmacológico que, segundo as diretrizes da Associação Psiquiátrica Americana e da Associação Britânica de Psicofarmacologia, também é considerado como sendo de primeira linha (Baldwin *et al.*, 2014).

Atualmente, apenas a sertralina e a paroxetina, dois inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs), são aprovados pela *US Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do TEPT (Mann; Marwaha, 2024). Porém, não parece haver diferença significativa entre os ISRSs e os inibidores da recaptação de serotonina-norepinefrina (IRSNs) (Akiki; Abdallah, 2019). Inclusive, outros antidepressivos comumente utilizados fora da indicação (*off-label*) incluem a fluoxetina e a venlafaxina (Huang *et al.*, 2020). No Brasil, além dos medicamentos supracitados, algumas Práticas Integrativas e Complementares em Saúde são sugeridas como auxiliares no manejo do TEPT ao lado da psicoterapia. A saber, incluem-se a acupuntura, meditação, yoga e *reiki* (Albuquerque, 2019).

Apesar de certa eficácia dos antidepressivos para o tratamento do TEPT, menos de 60% dos pacientes atingem uma resposta clínica significativa, enquanto a remissão completa é observada em apenas 20% - 30%. Além disso, os efeitos terapêuticos geralmente são observados semanas após o início do tratamento (Akiki; Abdallah, 2019). Neste contexto, a busca por estratégias alternativas que sejam seguras e eficazes torna-se relevante.

2.2 O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O Sistema Endocanabinoide (SEC) é um sistema neuromodulatório complexo que foi descrito pela primeira vez no final dos anos de 1980. A palavra endocanabinoide surgiu após o descobrimento dos receptores de membrana para o Δ^9 -tetrahydrocannabinol, ou simplesmente THC, em 1988 (Devane *et al.*, 1988; Lowe *et al.*, 2021). Composto por endocanabinoides endógenos (ligantes), receptores e proteínas que transportam, sintetizam e degradam esses ligantes (Tabela 2), o SEC apresenta-se como um sistema multifuncional, influenciando e sendo influenciado por diversas outras vias de sinalização (Lu; Mackie, 2021). Assim, o SEC exerce funções cruciais em diversos processos fisiológicos, incluindo homeostase, regulação emocional, neuroproteção, memória e aprendizado, dentre outros (Lowe *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Componentes do sistema endocanabinoide

Ligantes	Enzimas		Receptores	Proteínas Transportadoras
	Síntese	Degradação		
2-AG	DAGL (2-AG)	FAAH (AEA)	CB ₁ R/CB ₂ R (2-AG e AEA)	FABPs
AEA	NAPE-PLD (AEA)	NAAA (AEA)	GPR18	HSP70s
PEA		ABHD6 e ABHD12 (2-AG)	GPR55	Albumina sérica
OEA		MAGL (2-AG)	GPR119	FLAT
SEA			TRPV1 (AEA) PPAR γ	AMT ou EMT

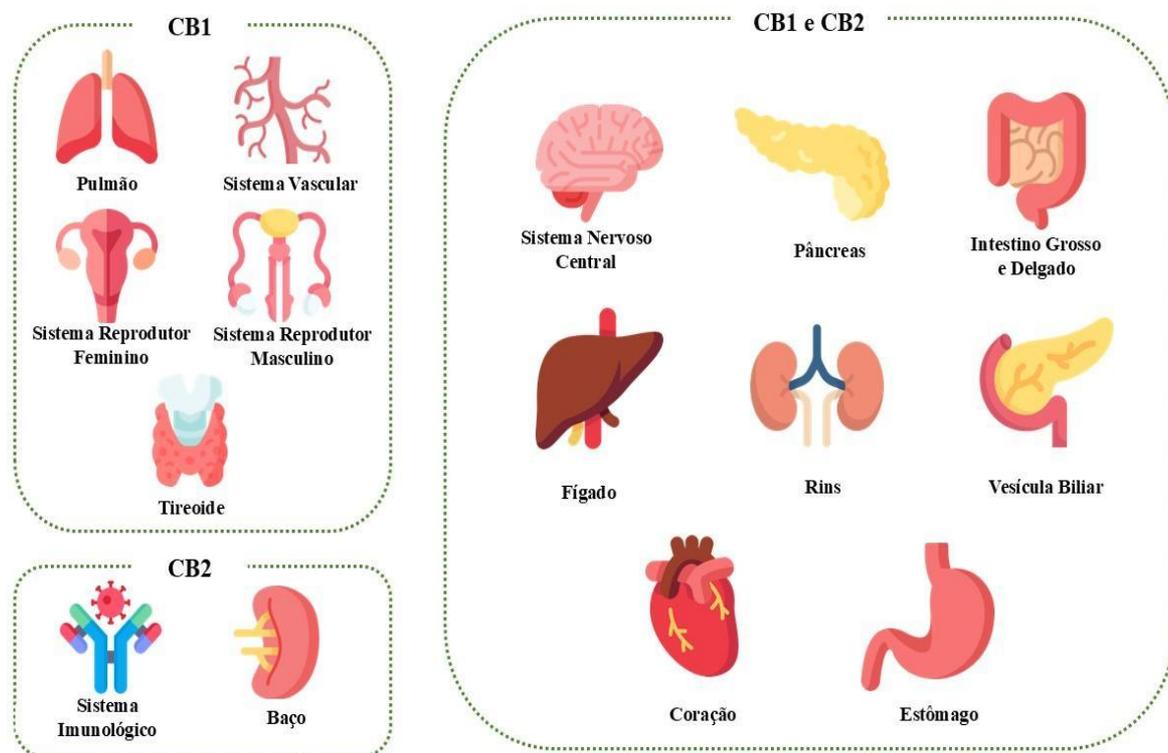
Fonte: Adaptado de (Lowe *et al.*, 2021). 2-AG: 2-araquidonoil glicerol; AEA: anandamida; PEA: N-palmitoiletanolamida; OEA: N-oleoiletanolamida; SEA: N-estearoiletanolamida; DAGL: lipase do diacilglicerol; NAPE-PLD: enzima fosfolipase D específica para N-acilfosfatidiletanolamina; FAAH: hidrolase de amida de ácido graxo; NAAA: ácido amidase de N-aciletanolamina; ABHD6: domínio de AB-hidrolase contendo 6, lipase de acilglicerol; ABHD12: domínio de AB-hidrolase contendo 12, lisofosfolipase; MAGL: monoacilglicerol lipase; CB₁R: receptores canabinoides tipo 1; CB₂R: receptores canabinoides tipo 2; GPR18: receptor acoplado à proteína G18; GPR55: receptor acoplado à proteína G55; GPR119: receptor acoplado à proteína

G119; TRPV1: receptor vaniloide transitório subtipo 1; PPAR γ : receptores ativados por proliferadores de peroxissoma; FABPs: proteínas de ligação a ácidos graxos; HSP70s: proteínas de choque térmico de 70kDa; FLAT: transportador de anandamida semelhante à FAAH-1; AMT: transportadores de membrana de anandamida; EMT: transportadores de membrana de endocanabinoides.

Até o presente momento, foram descritas três principais classes de receptores com os quais os ligantes endocanabinoides interagem: 1) receptores acoplados à proteína G, incluindo os receptores canabinoides tipo 1 (CB₁R) e tipo 2 (CB₂R); 2) receptores de canais iônicos sensíveis ao ligante, compreendendo o receptor vaniloide transitório subtipo 1 (TRPV1); 3) e receptores nucleares, abarcando os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) (Iannotti; Vitale, 2021; Lowe *et al.*, 2021).

CB₁R e CB₂R são os receptores canabinoides mais estudados e mais bem caracterizados até o momento. Ambos se acoplam à proteína G, principalmente às proteínas G inibitórias, inibindo a adenilil ciclase e certos canais de cálcio sensíveis à voltagem. Consequentemente, estimulam quinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAP quinases) e canais de potássio retificadores internamente (GIRKs), recrutam beta-arrestinas, entre outras ações (Lu; Mackie, 2021). Conforme ilustrado pela Figura 1, CB₁Rs localizam-se primariamente no sistema nervoso central (SNC), expressos predominantemente no cérebro, principalmente no córtex cerebral, hipocampo, gânglios basais e cerebelo. Sugere-se, ainda, que esses receptores estejam expressos em vários tecidos periféricos, incluindo o coração, baço, vasos sanguíneos e pulmões (Ye *et al.*, 2019). Por outro lado, os CB₂R são detectados majoritariamente no sistema periférico e em células do sistema imunológico (Lu; Mackie, 2021). Além disso, uma revisão recente da literatura discutiu a presença do CB₂R em diversas regiões cerebrais e em diferentes tipos celulares, como neurônios e células gliais, sugerindo a participação destes receptores em circuitos neurais que regulam não apenas a neuroinflamação, mas também o humor e funções cognitivas. No entanto, de acordo com os autores, mais estudos são necessários para uma maior compreensão do papel do CB₂R nas cascatas de sinalização a nível central (Morcuende *et al.*, 2022).

Figura 1 - Distribuição dos receptores canabinoides tipos 1 e 2 pelo organismo humano

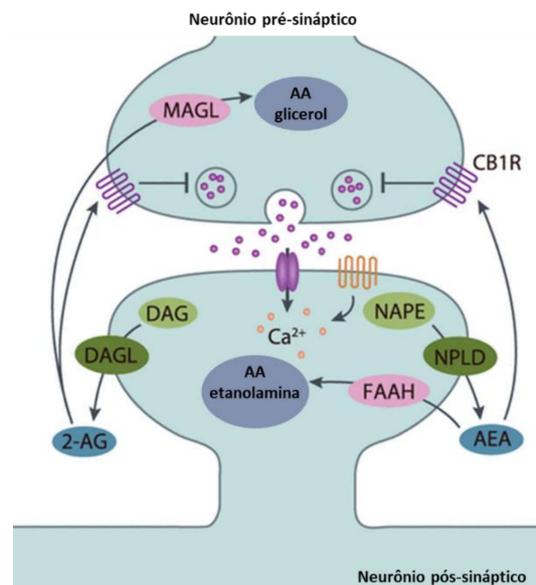


Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os ligantes canabinoides endógenos, ou simplesmente endocanabinoides, são moléculas lipídicas que ativam os receptores canabinoides. Enquanto os agonistas mais estudados compreendem a anandamida (AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG), outros endocanabinoides que podem representar possibilidades de alvos terapêuticos incluem a N-estearoiletanolamida (SEA), N-palmitoiletanolamida (PEA), e N-oleoiletanolamida (OEA) (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019). Enquanto o 2-AG se apresenta como um agonista total para CB1R e CB2R, a AEA atua como agonista parcial para ambos os receptores (Haspula; Clark, 2020). A AEA é sintetizada a partir de N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) pela enzima fosfolipase D específica para NAPE (NAPE-PLD); outras vias não-dependentes de NAPE-PLD também podem estar envolvidas. O 2-AG, por outro lado, é produzido a partir do diacilglicerol (DAG) pelas enzimas lipase do DAG (DAGL) α ou β , embora a maior parte do 2-AG envolvido na transmissão sináptica no cérebro adulto seja produzida pela DAGL α (Zou; Kumar, 2018).

A ativação dos receptores canabinoides depende da síntese dos endocanabinoides que ocorre sob demanda, em resposta ao aumento da concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular. Os endocanabinoides são produzidos nos terminais de neurônios pós-sinápticos, seguindo retrogradamente para o terminais pré-sinápticos, onde se ligarão a seus receptores para dar início à cascata de sinalização (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019). O encerramento da sinalização ocorre através da degradação dos endocanabinoides por hidrólise e/ou oxidação. A AEA é degradada pela hidrolase de amida de ácido graxo (FAAH) em ácido araquidônico livre e etanolamina, enquanto o 2-AG é hidrolisado pela monoacilglicerol lipase (MAGL) em ácido araquidônico e glicerol. Outras enzimas podem estar envolvidas nesse processo. Além disso, a oxidação tanto da AEA quanto do 2-AG aparenta ter o envolvimento da ciclo-oxigenase-2 e de várias lipoxigenases (Zou; Kumar, 2018). A seguir, a Figura 2 ilustra o processo de sinalização endocanabinoide.

Figura 2 - Mecanismo geral da sinalização endocanabinoide



Fonte: Adaptado de (Zlebnik; Cheer, 2016). Quando neurotransmissores são liberados (como o glutamato e o GABA), a despolarização pós-sináptica eleva os níveis de cálcio intracelular. Ao contrário de outros neurotransmissores, os endocanabinoides anandamida (AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG) são sintetizados sob demanda a partir de precursores fosfolipídicos. A N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) é quebrada em AEA pela ação da fosfolipase D específica para NAPE (NAPE-PLD), enquanto o diacilglicerol (DAG) é convertido em 2-AG pela ação da enzima lipase do DAG (DAGL). AEA e 2-AG atravessam a fenda sináptica e ativam os CB_1R acoplados à proteína G_i/o , localizados na porção pré-sináptica. Isso resulta na inibição da adenilil ciclase, na regulação dos canais iônicos e, conseqüentemente, na supressão da liberação de neurotransmissores. A sinalização endocanabinoide é encerrada quando enzimas hidrolíticas

degradam essas substâncias nos compartimentos pré-sináptico e pós-sináptico. Em detalhes, a AEA é convertida em ácido araquidônico (AA) e etanolamina pela ação da hidrolase de amida de ácido graxo (FAAH), localizada na célula pós-sináptica. Enquanto isso, o 2-AG é degradado em AA e glicerol pela ação da monoacilglicerol lipase (MAGL), localizada na porção pré-sináptica.

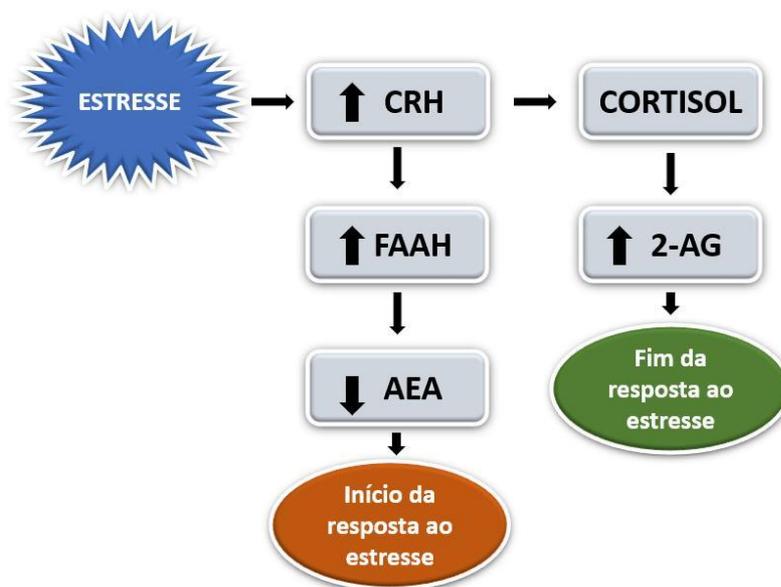
Em resumo, o SEC representa uma rede neuroquímica intrincada e que desempenha funções críticas em diversos processos fisiológicos. A compreensão dos elementos desse sistema serve como base para explorar a sua relação e participação em diversos contextos psicopatológicos, a exemplo do TEPT, e suas implicações terapêuticas.

2.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E O TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O SEC tem sido relacionado com a modulação de sintomas fisiológicos e comportamentais oriundos da exposição ao estresse, principalmente no que diz respeito ao aspecto neuroendócrino dessa resposta. As evidências apontam dois padrões de efeitos bem estabelecidos: 1) redução dos níveis de AEA e 2) aumento dos níveis de 2-AG (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Hill et al., 2018).

A exposição aguda e repetida ao estresse aparenta reduzir os níveis de AEA em diversas regiões cerebrais, incluindo a amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo. Essa redução de AEA é mediada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), provavelmente por meio do aumento da hidrólise da AEA pela FAAH. Interessantemente, hormônios glicocorticoides como o cortisol aumentam temporariamente os níveis de AEA, normalizando-o após o estresse. Isso sugere uma diminuição da AEA pelo CRH, enquanto o cortisol a aumenta, afetando a resposta ao estresse no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Hill *et al.*, 2018). Um segundo padrão de alteração do SEC induzido pelo estresse envolve o aumento temporário nos níveis de 2-AG, principalmente na amígdala e no córtex pré-frontal. Esse aumento é impulsionado pela liberação de hormônios glicocorticoides e serve para regular a resposta ao estresse, promovendo o *feedback* negativo mediado pelos glicocorticoides e facilitando a adaptação a estressores repetidos (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Hill *et al.*, 2018). A Figura 3 esquematiza o papel do SEC na resposta ao estresse, conforme explicado acima.

Figura 3 - O envolvimento do sistema endocanabinoide na resposta aguda ao estresse



Fonte: Elaborado pela autora (2023) em adaptação a (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019). O estresse agudo e repetido reduz a AEA em regiões cerebrais chave, efeito mediado pelo CRH, enquanto o cortisol pode normalizar esses níveis. Paralelamente, o estresse aumenta temporariamente o 2-AG, auxiliando no feedback negativo e na adaptação a estressores. Dessa forma, o SEC ajusta a resposta ao estresse e contribui para o equilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. CRH: hormônio liberador de corticotrofina; FAAH: hidrolase de amida de ácido graxo; AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquidonoil glicerol.

No longo prazo, o trauma aparenta ter efeitos duradouros no SEC e os impactos diferem a depender do momento de ocorrência (infância, adolescência ou idade adulta) e da cronicidade do estresse. Assim, essas alterações do SEC podem contribuir para sintomas do TEPT (NIA et al., 2019).

Considerando, a ligação entre o SEC e a resposta ao estresse, emerge a perspectiva de explorar agentes externos com potencial efeito modulador sobre esse sistema. Nesse contexto, os fitocanabinoides e demais compostos derivados da Cannabis surgem como uma alternativa promissora, oferecendo potencial terapêutico para mitigar os efeitos correlatos ao TEPT.

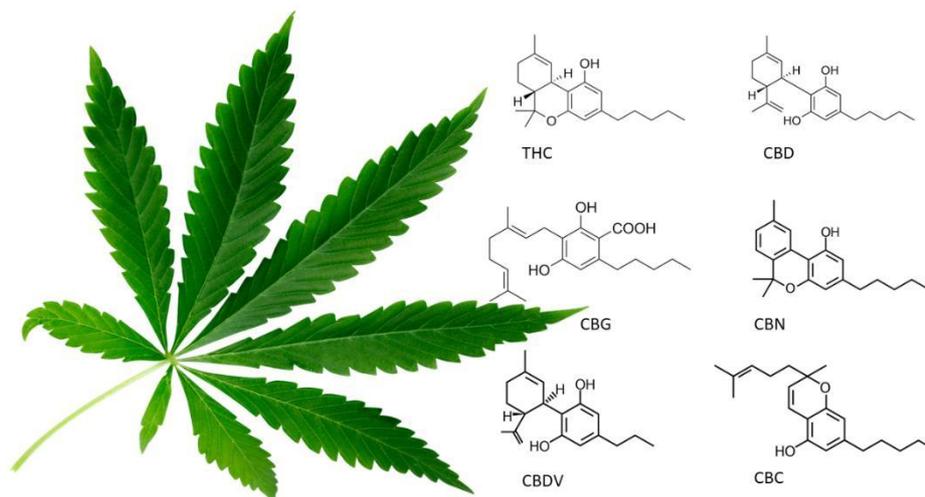
2.4 *Cannabis* sp.

Registros datados em mais de cinco mil anos atestam que a Cannabis possui uma longa história como planta medicinal (Bridgeman; Abazia, 2017). Porém, foi somente no

ano de 1964 que o grupo liderado pelo professor Raphael Mechoulam definiu a estrutura química do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), o principal fitocomponente da Cannabis (Gaoni; Mechoulam, 1964). Desde então, mais de 550 compostos químicos foram identificados na planta; desse total, mais de 100 são fitocanabinoides (Rock; Parker, 2021).

Predominantes, mas não exclusivos, nas espécies de Cannabis, os canabinoides são produtos do metabolismo vegetal que interagem como agonistas e antagonistas dos receptores do SEC (Paes-Colli et al., 2022). Na Figura 4, encontram-se representadas as estruturas químicas dos principais canabinoides descritos até o momento.

Figura 4 - Estrutura química dos principais canabinoides da Cannabis



Fonte: Elaborado pela autora (2023). THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol; CBD: canabidiol; CBG: canabigerol; CBN: canabinol; CBDV: canabidivarina; CBC: canabicromeno.

Desde a elucidação de suas estruturas, o THC e o canabidiol (CBD) são os fitocanabinoides mais investigados com relação aos seus respectivos potenciais terapêuticos. Ao THC são associados os efeitos de sedação, analgesia, modulação do apetite e do humor, possivelmente correlacionados com a ativação de CB2R. Além disso, devido à sua ação agonista no CB1R, o THC também é reconhecido como o principal componente psicoativo da Cannabis (Bridgeman; Abazia, 2017; Paes-Colli et al., 2022). Em modelos animais, a ativação do CB1R pelo THC induz quatro características comportamentais que sustentam seu efeito psicotrópico, conhecidas como tétrade

canabinoide. São elas: hipolocomoção, hipotermia, catalepsia e antinocicepção (Paes-Colli et al., 2022). A atividade psicoativa do THC configura no principal limitante do seu uso medicinal devido aos efeitos adversos a ele associados. Nesse contexto, outros canabinoides, cuja ação a nível central é fraca ou inexistente, emergem como potenciais agentes terapêuticos para uso humano, a exemplo do CBD.

Inicialmente, o CBD foi proposto como antagonista dos receptores CB1R e CB2R. No entanto, sabe-se atualmente que o CBD demonstra uma notável promiscuidade farmacológica, tornando impossível chegar a conclusões definitivas sobre o seu mecanismo de ação (Boggs et al., 2018a). De fato, diversas evidências sugerem que muitos dos efeitos do CBD ocorrem via interação com os receptores de serotonina 1A (5-HT1A) em cérebros de roedores (Linge et al., 2016; Resstel et al., 2009) e de humanos (Martínez-Aguirre et al., 2020). Além disso, há indícios de que o CBD também atue nos receptores opioides μ e δ (Kathmann et al., 2006), bem como nos receptores TRPV1 (Etemad et al., 2022). Anteriormente, o CBD demonstrou a capacidade de aumentar os níveis de AEA através da inibição da recaptação deste ligante, juntamente com a inibição da enzima FAAH (Elmes et al., 2015). Ao contrário do THC, é possível que o CBD tenha efeitos antipsicóticos, além de se mostrar potencialmente eficaz no tratamento da ansiedade, da dor neuropática, da epilepsia, do câncer, e de transtornos de movimento (Boggs et al., 2018a).

A complexidade farmacológica do CBD e sua ampla interação com diferentes receptores destacam a necessidade de uma abordagem cuidadosa na administração deste composto a fim de serem alcançados resultados clínicos significantes. Neste contexto, a escolha da forma farmacêutica para administração do CBD é fundamental uma vez que diferentes formulações podem afetar sua biodisponibilidade e perfil terapêutico (Larsen; Shahinas, 2020). A via de administração oral, apesar de ser amplamente aceita pelos pacientes, apresenta desafios significativos para uma entrega eficaz do CBD. Entre os principais obstáculos estão a baixa biodisponibilidade e perfis farmacocinéticos variáveis (Millar et al., 2020). Quando administrado pela via oral, estima-se uma biodisponibilidade de 6%, com uma taxa lenta de absorção e pico plasmático alcançado entre uma e quatro horas após a ingestão. A ingestão de refeições ricas em gordura pode aumentar consideravelmente a biodisponibilidade do CBD, provavelmente através da melhora do transporte linfático e da inibição de transportadores de efluxo de

medicamentos. No entanto, o metabolismo de primeira passagem ainda se apresenta como uma barreira significativa para o aumento da biodisponibilidade oral (Millar et al., 2020).

A estabilidade do CBD é outro fator relevante que pode variar de acordo com a formulação. A estabilidade da molécula é influenciada por fatores como temperatura, exposição à luz e oxidação. Estudos indicam que a exposição à luz a temperatura ambiente pode resultar em uma degradação média de 13% in CBD E-líquido em 30 dias, ao passo que o armazenamento no escuro em temperatura ambiente provoca apenas 4% de degradação (MAZZETTI et al., 2020). Além disso, amostras de CBD armazenadas na ausência de luz, em temperatura ambiente por três meses, podem apresentar impurezas como Δ^9 -THC e Δ^8 -THC (Citti et al., 2021). O impacto de diferentes tipos de formulações na estabilidade do CBD permanece incerto; contudo, o CBD dissolvido em triglicerídeos de cadeia média (TCM) aparenta ser menos suscetível à oxidação do que quando dissolvido em óleo de oliva ou óleo de semente de Cannabis (Calvi et al., 2018).

A extração de canabinoides é uma etapa crítica que envolve a concentração dos componentes alvos de interesse para o desenvolvimento de um produto (Lazarjani et al., 2021). Nesse contexto, compreende-se o método de extração terá impacto significativo na composição final do produto de Cannabis, influenciando não apenas a concentração de canabinoides, mas também a presença de terpenos e outros fitoquímicos. Assim, a depender da extração empregada, os extratos de Cannabis podem ser categorizados como amplo espectro, espectro completo, ou extrato isolado (Cather; Cather, 2020). Enquanto o extrato isolado é composto por um canabinoide específico, mais comumente CBD ou THC, nos extratos de espectro amplo e de espectro completo são preservados todos os componentes da Cannabis, incluindo uma variedade de fitocanabinoides, terpenos, flavonoides, entre outros fitoquímicos. Nota-se que, no extrato amplo espectro, a concentração de THC é mínima (Cather; Cather, 2020). No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 327/2019, que, entre outras providências, estabelece os requisitos para a comercialização de produtos de Cannabis para fins terapêuticos no país, destaca em seu artigo 4° que “os produtos de Cannabis contendo como ativos exclusivamente derivados vegetais ou fitofármacos da Cannabis sativa, devem possuir predominantemente, canabidiol (CBD) e não mais que 0,2% de tetrahydrocannabinol (THC).” Especifica, ainda, que “os produtos de Cannabis poderão conter teor de THC acima de 0,2%, desde que sejam destinados a cuidados paliativos exclusivamente para

pacientes sem outras alternativas terapêuticas e em situações clínicas irreversíveis ou terminais” (Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019).

Nesse contexto, o óleo de Cannabis de amplo espectro apresenta-se como uma alternativa viável, respaldada por dois motivos importante. O primeiro envolve a redução da presença do THC a níveis traços, sugerindo, assim, uma redução dos eventos adversos associados a esse composto. O segundo motivo, mas não menos importante, envolve o fenômeno conhecido como "efeito comitiva" ou "efeito entourage", inicialmente proposto por Mechoulam e Ben-Shabat (Ben-Shabat et al., 1998). Este efeito sugere que a presença conjunta de diferentes classes de fitocompostos em formulações à base de Cannabis pode conferir um efeito terapêutico ampliado em comparação com compostos isolados. De acordo com a literatura disponível, os terpenos desempenhariam o papel de coativadores do efeito comitiva, inclusive dentro do contexto do manejo de distúrbios psiquiátricos (Ferber et al., 2020). No entanto, embora existam estudos promissores que investigam a sinergia entre fitocannabinoides e terpenos, compreensão a respeito dos mecanismos subjacentes ainda é um limitante e mais estudos são necessários para investigar os benefícios da adição de terpenos e outros compostos ao tratamento com CBD, com ou sem THC (Ferber et al., 2020). Tais descobertas têm implicações significativas, e podem oferecer potencialidades terapêuticas únicas, especialmente para os pacientes que não respondem adequadamente às terapias convencionais.

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

Assim como para qualquer outra condição psiquiátrica, os modelos animais desempenham um papel fundamental na compreensão da neuropatofisiologia do TEPT. Eles ajudam a compreender os mecanismos de indução, facilitando a identificação de alvos terapêuticos bem como testando potenciais candidatos a fármacos (Verbitsky; Dopfel; Zhang, 2020a). Tradicionalmente, a possibilidade de estudar condições psiquiátricas através de modelos animais é avaliada pelos três critérios seguintes: 1) validade de construção, ou seja, a capacidade que o modelo tem de capturar a etiologia do TEPT; 2) validade de face, relacionada com a conformidade do modelo em representar a sintomatologia do transtorno; e 3) a validade preditiva, referente à resposta do modelo ao tratamento (Bienvenu *et al.*, 2021; Willner, 1986).

Apesar de todo o progresso recente na compreensão da neurobiologia do TEPT ter facilitado o desenvolvimento de modelos experimentais de indução do estresse, o TEPT ainda é um transtorno sem tratamento farmacológico específico, sem biomarcadores confiáveis estabelecidos, e os modelos animais reproduzem a neurobiologia do transtorno de forma limitada (Pinna, 2019). Considerando os critérios de diagnóstico adotados pelo DSM-5 (ver tópico 2.1. *Transtorno de estresse pós-traumático*), alguns sintomas, como memórias intrusivas, não são possíveis ou são difíceis de serem avaliadas (Richter-Levin; Stork; Schmidt, 2019). Assim, é provável que uma abordagem animal que melhor reflita a condição humana seja aquela que considere a aplicação do estresse crônico em combinação com algum evento traumático agudo que desencadeie o comportamento do tipo-TEPT (Aspesi; Pinna, 2019).

Neste contexto, a Tabela 3 oferece uma síntese de dois modelos distintos de indução ao estresse utilizados na investigação do TEPT: a restrição aguda dos movimentos e o estresse crônico de origem imprevisível. Essa síntese foi elaborada com base nos critérios tradicionais de avaliação dos modelos animais e incorporando marcadores inflamatórios como parte da análise. Adicionalmente, são destacados os testes comportamentais associados a cada modelo, juntamente com os parâmetros utilizados para avaliar sua eficácia e relevância na pesquisa do TEPT.

Tabela 2 - Modelos de indução ao estresse no estudo do transtorno do estresse pós-traumático

Modelo de Estresse	Validade de Construção	Validade de Face	Validade Preditiva	Marcador Inflamatório	Critério	Teste Comportamental	Parâmetro
Restrição de Movimento	Aumento do feedback negativo do eixo HPA Disfunção do córtex pré-frontal e amígdala	Comportamento tipo-depressivo Anedonia	Sensível aos ISRSs	Não-reportado	D (alterações negativas de humor e cognição)	1) Teste do nado forçado 2) Preferência de sacarose 3) Teste de suspensão pela cauda	1) Tempo de imobilidade 2) % ingestão de sacarose; % ingestão de água 3) Tempo de imobilidade
Crônico de Origem Imprevisível	Aumento do feedback negativo do eixo HPA Alteração da morfologia do hipocampo	Evitação geral	Sensível aos ISRSs	Plasma e SNC	C (evitação)	1) Labirinto em cruz elevado 2) Campo aberto	1) % tempo gasto nos braços abertos; % entradas feitas nos braços abertos 2) Tempo gasto no centro do campo; latência para entrar no centro do campo

Fonte: Elaborado pela autora, 2024, em adaptação a (Aspesi; Pinna, 2019; Deslauriers *et al.*, 2018; Török *et al.*, 2019; Verbitsky; Dopfel; Zhang, 2020a). HPA: Hipotálamo-Pituitária-Adrenal; ISRSs: Inibidores seletivos da recaptação de serotonina; SNC: sistema nervoso central.

2.5.1 Estresse agudo por restrição dos movimentos

No modelo de indução ao estresse pela restrição dos movimentos, os animais são posicionados dentro de um aparato cilíndrico onde os movimentos são mínimos ou inexistentes (Flandreau; Toth, 2018). O tempo de permanência varia entre os protocolos, podendo durar entre 15 min e 24 h (Chu *et al.*, 2016; Molina; Andero; Armario, 2023). Duas horas de imobilização completa foi relacionada com um aumento do comportamento tipo-ansioso avaliado pelos testes do labirinto em cruz elevada e do campo aberto (Andero *et al.*, 2013; Mitra *et al.*, 2005). Além disso, animais submetidos ao protocolo de restrição apresentaram anedonia e comportamento tipo-depressivo (Chu *et al.*, 2016). Em concordância com dados endócrinos observados em pacientes com TEPT, quando o estresse por imobilização foi seguido por um lembrete de restrição de 20 min após 1, 7 ou 13 dias, foi induzida uma hipoatividade significativa do eixo HPA, medida pela diminuição do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona (Harvey *et al.*, 2006).

No contexto do TEPT, os pontos fortes do modelo de indução do estresse agudo pela restrição do movimento incluem 1) extensa observação sobre mudanças relacionadas ao eixo HPA e sua evolução ao longo do tempo, (2) análise detalhada e diferencial de mudanças estruturais e funcionais na rede pré-frontal-hipocampal-amigdalar, (3) dados disponíveis para ambos os sexos (embora as fêmeas se mostrem resilientes) (4) efeitos muito confiáveis em processos específicos do medo. Por outro lado, as seguintes limitações são destacadas: 1) dados limitados sobre outros resultados comportamentais ou biológicos relevantes para o TEPT; 2) poucos estudos disponíveis que utilizem uma única exposição em combinação com medições de longo prazo; e 3) uso limitado de abordagens de subdivisão de subgrupos vulneráveis e resilientes (Deslauriers *et al.*, 2018).

2.5.2 Estresse crônico de origem imprevisível

Neste modelo, os animais são expostos diariamente a diferentes estressores, durante um período que pode variar de 1 a 8 semanas (Deslauriers *et al.*, 2018). Apesar de o estresse crônico de origem imprevisível ser amplamente utilizado para mimetizar comportamento do tipo-depressivo, este paradigma apresenta validade de face e validade preditiva para pelo menos algumas formas de TEPT. Além disso, essas alterações

comportamentais respondem ao tratamento com inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) ou ketamina (Aspesi; Pinna, 2019; Deslauriers *et al.*, 2018).

Anteriormente foi demonstrado que o estresse crônico de origem imprevisível induz a um aumento do *feedback* negativo do eixo HPA após exposição (Yehuda *et al.*, 2015b), mimetizando alterações observadas em pacientes com TEPT, além de alterar o volume do hipocampo (Isgor *et al.*, 2004). Além disso, ratos cronicamente estressados por meio deste paradigma demonstraram uma regulação negativa da expressão do receptor CB₁ e uma diminuição do endocanabinoide 2-AG também no hipocampo (Hill *et al.*, 2005).

As principais limitações do estresse crônico de origem imprevisível incluem a dificuldade de reprodutibilidade, uma vez que não está claro quais variações de estressores são capazes de induzir mudanças de longo prazo. Além disso, não se sabe se os mecanismos neurobiológicos envolvidos na alteração comportamental são os mesmos em todas as variações de estressores. Por fim, dados relacionados a roedores fêmeas ainda são limitados (Deslauriers *et al.*, 2018).

2.5.3 Tétrade canabinoide

A tétrede canabinoide é um modelo pré-clínico clássico utilizado para avaliar os efeitos comportamentais de canabinoides naturais ou sintéticos nos receptores CB₁ (Metna-Laurent *et al.*, 2017). Além disso, há indícios de que receptores CB₂ e GPR55 possam estar relacionados com os efeitos da tétrede; porém, a forma pela qual esse envolvimento acontece ainda não é totalmente compreendida (Wang *et al.*, 2020). Este paradigma comportamental é caracterizado por quatro fenótipos distintos que emergem após a administração aguda de CB₁ agonistas, inicialmente observados após a administração do THC em roedores. Tais fenótipos incluem hipolocomoção (diminuição da atividade motora espontânea), hipotermia (diminuição da temperatura corporal), analgesia (diminuição da sensibilidade à dor), e catalepsia (limitação da capacidade de iniciar movimentos) (Metna-Laurent *et al.*, 2017). Cabe ressaltar que esses comportamentos são mediados por diferentes regiões cerebrais (Kim *et al.*, 2022). Além disso, os efeitos do CBD avaliados pela tétrede canabinoide ainda são pouco descritos na literatura científica. Um estudo publicado em 2021 utilizou ratos machos e fêmeas para avaliar os efeitos do CBD oral em três dos quatro parâmetros da tétrede: analgesia,

temperatura corporal e atividade locomotora. Os resultados indicaram um aumento modesto na sensibilidade à dor mecânica com a maior dose de CBD testada (30 mg/kg), junto com uma alteração mínima na temperatura corporal dos animais machos ($< 0,1$ °C). Quanto à atividade locomotora, observou-se hipolocomoção 30 min após a administração oral de 10-30 mg/kg de CBD, com modulação dependente do sexo após 270 min. No entanto, não foi identificada uma dose específica de CBD para os efeitos dependentes do sexo (Moore; Weerts, 2022). Esses efeitos parecem variar de acordo com a espécie, dose e via de administração (Boggs *et al.*, 2018b; Moore; Weerts, 2022). Tais achados sugerem que o CBD pode agir por meio de interações com receptores distintos do CB₁, apontando para sua administração oral como uma alternativa aos efeitos psicomiméticos frequentemente associados ao THC.

2.6 POTENCIAIS APLICAÇÕES CLÍNICAS

O TEPT é uma neuropatologia complexa e debilitante, com frequente sobreposição de sintomas e comorbidades, incluindo ansiedade, depressão, ideação suicida e abuso de drogas. Devido à sua complexidade e heterogeneidade, estabelecer um único modelo animal que recapitule as diversas alterações bioquímicas e comportamentais observadas nos pacientes ainda é desafiador (Aspesi; Pinna, 2019). Porém, os modelos disponíveis oferecem valiosa contribuição no que tange uma maior compreensão da neuropatofisiologia subjacente ao transtorno, bem como na identificação de alvo terapêuticos e biomarcadores. Ainda, dentro do contexto deste presente trabalho, os modelos animais despontam como uma plataforma para a avaliação de potenciais tratamentos e como eles impactam os sintomas e as alterações neurobiológicas associadas ao TEPT. Através da análise dos dados gerados por estes modelos e subsequente tradução destes resultados em ensaios clínicos, potenciais avanços relacionados ao tratamento e manejo do TEPT podem melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Em consulta realizada em dezembro de 2024 na plataforma ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>), foram identificados os registros de 4 ensaios clínicos que buscam avaliar o potencial terapêutico da Cannabis para o TEPT. Dentre estes ensaios, um ensaio de Fase 2 iniciado pela Universidade do Texas em Austin, [NCT04197102](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04197102), tinha o objetivo de avaliar a eficácia de um óleo de CBD de amplo espectro (rico em CBD) ou do CBD isolado, ambos a 99,9%, em comparação a um óleo placebo. O desenho

experimental propunha que, ao todo, 150 pacientes que atendessem aos critérios de diagnóstico para o TEPT preconizados pelo DSM-5 recebessem uma dose diária de 300 mg de uma das duas formulações de CBD durante oito semanas. Dentro das medidas de resultado avaliadas pós-tratamento, incluíam-se avaliações da alteração em relação ao estado inicial dos sintomas de depressão e ansiedade. Um outro estudo da mesma universidade ([NCT05892276](#)) propunha o recrutamento de adultos com histórico de exposição a traumas com a finalidade de investigar os efeitos do óleo de CBD de amplo espectro (300 mg) sobre a reconsolidação da memória traumática e sintomas relacionados ao trauma. A principal justificativa para este trabalho foi o fato de ensaios pré-clínicos sugerirem que o CBD possa ser clinicamente útil para prevenir ou tratar o TEPT. Em ratos *Sprague-Dawley*, CBD (50 mg/kg, dose única via oral), mas não THC, atenuou significativamente a reconsolidação da memória de medo quando administrado imediatamente após a lembrança por, pelo menos, sete dias (Murkar *et al.*, 2019). Por razões legais que tangem o entendimento do FDA para o que é um medicamento, ambos os estudos foram suspensos.

Como exemplificado acima, ensaios pré-clínicos podem sugerir estratégias para a investigação clínica a fim de validar os resultados observados em animais e gerar dados relevantes para a população humana, além de oferecer a possibilidade de que terapias eficazes e seguras para o tratamento do TEPT sejam confirmadas.

3 JUSTIFICATIVA

Com uma prevalência que pode variar de 5 a 10%, o TEPT é uma condição psiquiátrica globalmente distribuída (Mann; Marwaha, 2024). Devido ao seu caráter multifacetado, este transtorno requer tratamentos longos e dispendiosos (Amedu; Dwarika, 2024). Embora disponíveis, os tratamentos psicológicos e farmacológicos se mostram refratários em aproximadamente 30% dos pacientes (Akiki; Abdallah, 2019), evidenciando a necessidade urgente de alternativas terapêuticas mais eficazes. Nesse contexto, o sistema endocanabinoide se destaca como um relevante modulador dos sintomas fisiológicos e comportamentais decorrentes da exposição ao estresse, mostrando potencial para interferir positivamente na regulação emocional e na resposta ao trauma (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Hill *et al.*, 2018).

Sob essa perspectiva, o crescente interesse no uso de canabinoides para o tratamento de condições neuropsiquiátricas tem gerado discussões sobre sua eficácia e segurança, especialmente em relação aos efeitos dos produtos derivados da Cannabis – incluindo o óleo que se tem origina dessa espécie vegetal (Lynskey *et al.*, 2024). Este óleo tem sido considerado uma opção terapêutica promissora para transtornos relacionados ao estresse. Tal potencial advém do fato de ser rico em compostos como o CBD, possibilitando sua interação com o sistema endocanabinoide e, conseqüentemente, a promoção de efeitos moduladores sobre a ansiedade (Bolsoni *et al.*, 2022) e a depressão (Mangoo *et al.*, 2022).

Com isso em mente, o presente estudo utilizou modelos experimentais para avaliar os efeitos do óleo de Cannabis de amplo espectro em camundongos, investigando sua eficácia na modulação de comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso, além de analisar a segurança farmacológica a nível central (de Assis *et al.*, 2021). Com isso, visou-se preencher a lacuna existente na literatura, explorando o impacto desse óleo em dois modelos distintos de estresse: agudo por restrição dos movimentos e crônico de origem imprevisível, com a expectativa de fornecer dados relevantes sobre sua aplicabilidade terapêutica no tratamento do TEPT e condições relacionadas.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a eficácia terapêutica de um óleo de Cannabis de amplo espectro em comportamentos do tipo-depressivo e tipo-ansioso desencadeados por estressores de natureza traumática, combinada, além de avaliar a segurança farmacológica do óleo e o seu potencial de modulação de uma série de moléculas sinalizadoras.

4.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do óleo de Cannabis de amplo espectro no comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso induzidos pelo estresse agudo de restrição dos movimentos;
- Verificar o efeito do óleo de Cannabis de amplo espectro no comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso induzidos pelo estresse crônico de origem imprevisível;
- Investigar o efeito do óleo de Cannabis de amplo espectro no comportamento tipo-depressivo por meio do teste de nado forçado;
- Investigar o efeito do óleo de Cannabis de amplo espectro no comportamento tipo-anedonia por meio do teste de borrifagem de sacarose;
- Examinar o efeito do óleo de Cannabis de amplo espectro no comportamento tipo-ansioso através do teste de labirinto em cruz elevado;
- Avaliar o efeito motor do óleo de Cannabis de amplo espectro por meio do teste do campo aberto;
- Verificar o efeito central do óleo de Cannabis de amplo espectro por meio da tétrade canabinoide;
- Investigar os efeitos do óleo de Cannabis de amplo espectro sobre os níveis séricos de uma série de citocinas, quimiocinas, e fatores de crescimento.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÓLEO DE CANNABIS DE AMPLO ESPECTRO

O óleo de Cannabis de amplo espectro foi produzido e analisado pela Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança, Paraíba - Brasil, inscrita no Cadastro Nacional de Pessoas Jurídicas (CNPJ) sob o número 23.877.015 / 0001-38. A análise cromatográfica (Anexo I) demonstrou uma proporção de CBD: THC de 11:1 (THC: 3,5%; CBD: 36,8%) e canabinoides totais de 40,2%. Em relação à avaliação microbiológica (Anexo II), o laudo emitido pela empresa atesta que o produto se enquadra ao padrão de qualidade esperado.

5.2 ANIMAIS

Todos os ensaios foram realizados utilizando 120 camundongos *Swiss* machos pesando entre 30-50 g, com idade de 50 a 90 dias, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os camundongos foram alojados em gaiolas de plástico transparentes forradas com maravalha (até 12 animais por caixa) e mantidos sob condições controladas que incluíam ciclo de luz (12 h luz / 12 h escuro; período claro iniciando às 07:00 h), temperatura (22 ± 2 °C) e umidade controladas, água e comida *ad libitum*. Todos os testes foram realizados entre 8:00 h e 17:00 h, sendo que os animais foram ambientados ao laboratório por pelo menos 1 h antes do início. Cada camundongo foi usado apenas uma vez e todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento bem como reduzir o número de animais necessários para os testes. Os experimentos aqui descritos foram relatados em conformidade com as diretrizes ARRIVE (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath; Lilley, 2015; Percie du Sert *et al.*, 2020) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA-UFSC) sob o protocolo 7176240920 (Anexo III). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e CEUA-UFSC, baseando-se nos princípios dos 4Rs: *replacement* (substituição), *reduction* (redução), *refinement* (refinamento), e *responsability* (responsabilidade) (Lee; Lee; Kang, 2020).

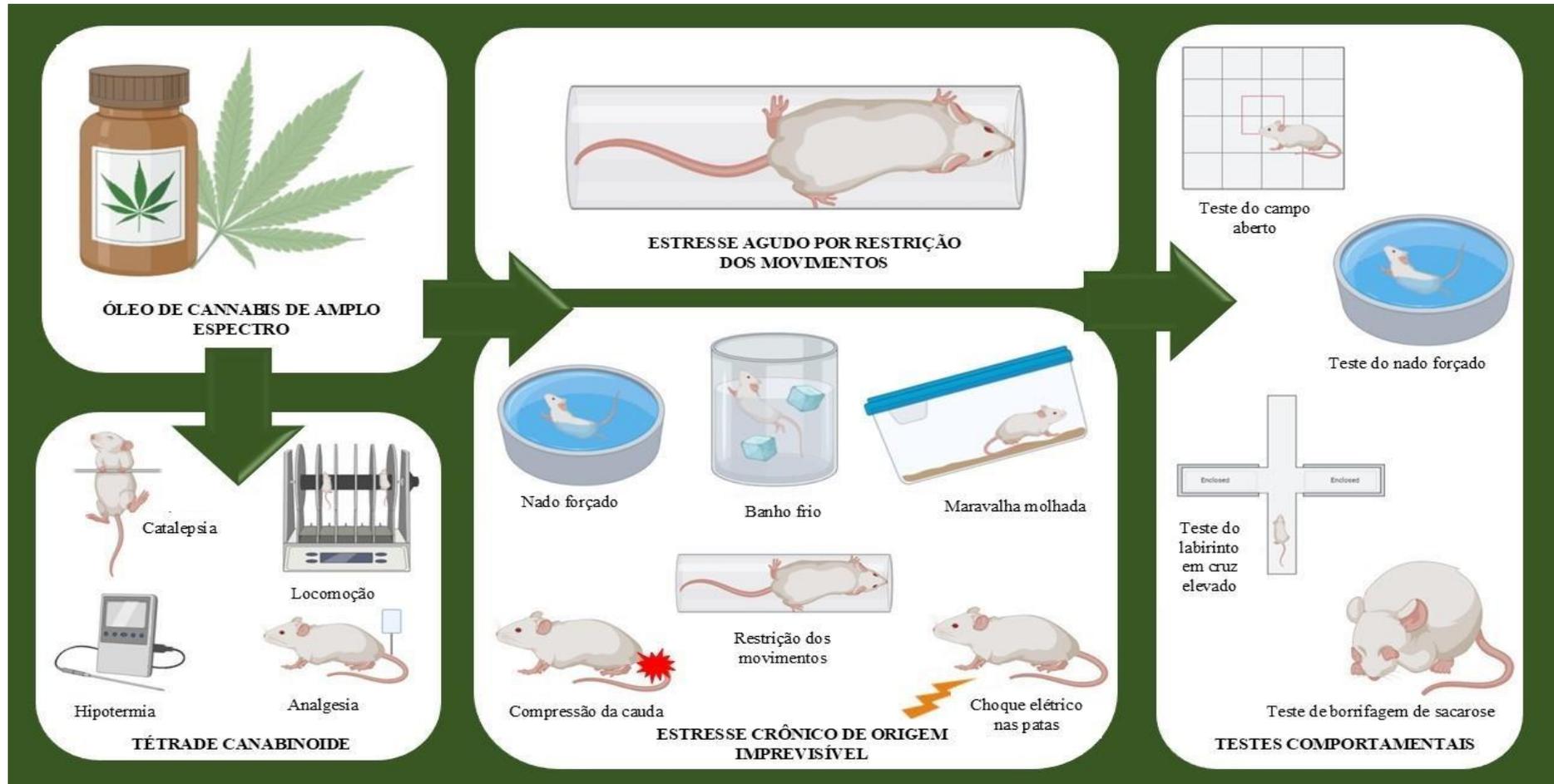
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Dois blocos experimentais foram utilizados para avaliar a eficácia do óleo de Cannabis de amplo espectro em comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso. Em

ambos os blocos, o óleo de Cannabis e a fluoxetina, inibidor seletivo da recaptção de serotonina e utilizada como controle positivo, foram dissolvidos em triglicerídeos de cadeia média (TCM, Vitafor®, Brasil) e solução salina, respectivamente. Apesar da indicação para uma condição adversa (*off-label*), a fluoxetina tem sido utilizada em modelos pré-clínicos e ensaios clínicos de TEPT, demonstrando eficácia (Ariel *et al.*, 2017; Kao *et al.*, 2016; Martenyi *et al.*, 2002; Van der Kolk *et al.*, 1994; Verbitsky; Dopfel; Zhang, 2020b). Ambos os tratamentos foram preparados imediatamente antes do uso e administrados uma única vez pela via oral (v.o.) no volume de 10 mL/kg. A escolha das doses utilizadas foi baseada em um experimento piloto e em trabalhos anteriores (Long *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2013; Schiavon *et al.*, 2016). Os animais foram alocados aleatoriamente para cada um dos grupos e o tratamento foi administrado por um pesquisador que estava cego quanto ao conteúdo manipulado para cada grupo.

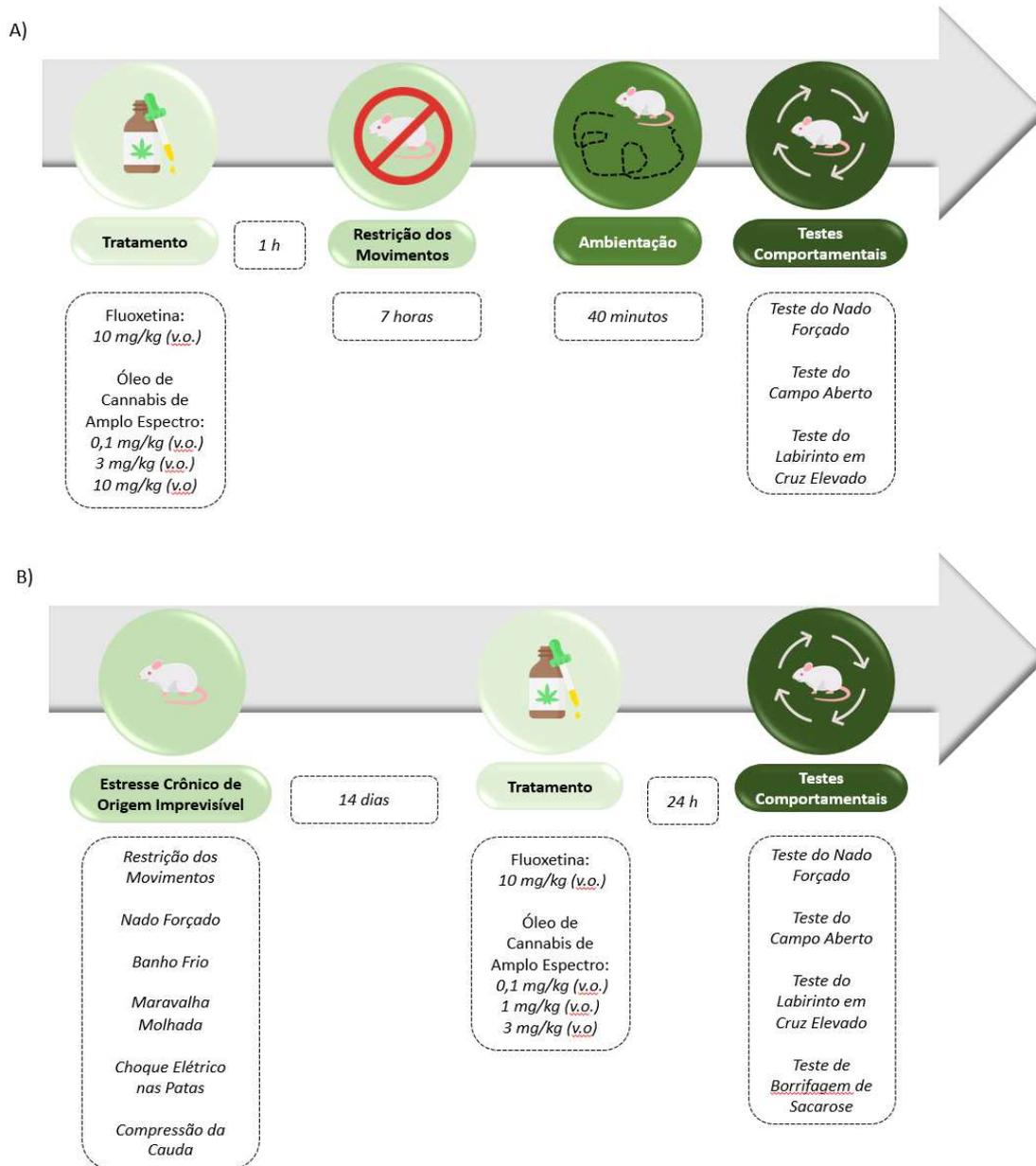
Como ilustrado pelas Figuras 5 e 6, dois modelos distintos foram propostos para simular a indução do estresse e o desenvolvimento dessa condição nos camundongos, descritos detalhadamente abaixo. No primeiro bloco de experimentos, os animais foram induzidos ao estresse agudo por meio do modelo de restrição dos movimentos. Este protocolo consistiu na administração do óleo de Cannabis de amplo espectro (0,1; 3 e 10 mg/kg), do controle positivo (10 mg/kg) ou veículo (TCM) 1 h antes do início do estresse. No segundo bloco experimental, os camundongos foram submetidos ao modelo de estresse crônico de origem imprevisível e tratado com o óleo de Cannabis de amplo espectro (0,1, 1 e 3 mg/kg), controle positivo (10 mg/kg) ou veículo (TCM) no 14º dia do protocolo, 1 h após o término do estresse. Ainda dentro do modelo crônico, um grupo de camundongos foi tratado com o óleo de Cannabis (0,1 mg/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg) durante os últimos cinco dias do protocolo (do 10º ao 14º dia). A administração ocorreu 1 h após o término do estresse naqueles dias.

Figura 5 - Resumo gráfico das etapas experimentais e testes realizados

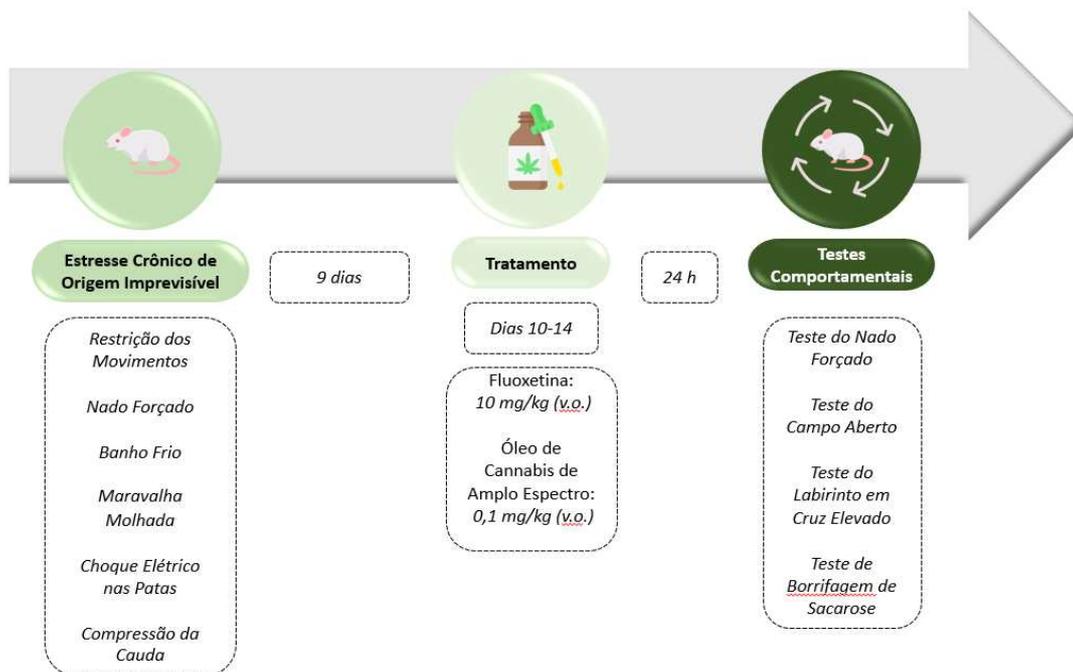


Fonte: Adaptado de (de Assis *et al.*, 2021). Os camundongos foram submetidos a estresse utilizando modelos de restrição aguda de movimentos e estresse crônico de origem imprevisível, sendo posteriormente avaliados em termos comportamentais. Além disso, a segurança farmacológica do óleo de Cannabis de amplo espectro foi avaliada por meio da téttrade canabinoide.

Figura 6 – Detalhamento dos protocolos experimentais para a indução do estresse e avaliação do comportamento em camundongos



c)



Fonte: Elaborado pela autora (2024). Desenho experimental. A) O protocolo de indução ao estresse por meio da restrição aguda dos movimentos iniciou-se com o tratamento dos camundongos com fluoxetina ou óleo de Cannabis de amplo espectro. Após 1 h, os animais permaneceram sob restrição dos movimentos por 7 h e, em seguida, foram submetidos aos testes comportamentais do labirinto em cruz elevado e do campo aberto. B) No protocolo de estresse crônico imprevisível, aplicado por 15 dias, os estímulos estressantes consistiram em contenção, natação forçada, banho frio, aparas de lâ molhadas, choque e compressão da cauda em dias e horas alternados, sempre de forma imprevisível. Neste protocolo, o medicamento foi administrado uma única vez, no 14º dia do protocolo, e os animais foram avaliados 24 h depois por meio dos testes de borrifagem de sacarose, nado forçado, labirinto em cruz elevado e campo aberto. C) Camundongos submetidos ao modelo de estresse crônico de origem imprevisível foram tratados cronicamente com óleo de Cannabis do 10º ao 14º dia. No 15º dia, foram avaliados comportamentalmente por meio dos testes de nado forçado, borrifagem de sacarose, labirinto em cruz elevado e campo aberto.

5.4 MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO AO ESTRESSE

5.4.1 Estresse único por restrição

Os camundongos foram randomizados em cinco grupos diferentes, a saber: veículo (TCM), fluoxetina (10 mg/kg, via oral, administração única), e óleo de Cannabis de amplo espectro nas doses de 0,1, 3 e 10 mg/kg, via oral, administração única). Inicialmente, os camundongos foram mantidos dentro de suas gaiolas em grupos, com livre acesso à água e comida, durante a administração dos tratamentos e no período anterior à restrição (1 h). Na sequência, um animal por vez foi retirado de sua gaiola e introduzido em um tubo de plástico fenestrado (18 cm × 4 cm). Este tubo foi, então,

mantido em posição horizontal a fim de manter a orientação normal do corpo do animal, que assim foi mantido pelas próximas 7 h. Todos os movimentos corporais foram contidos, porém sem indução de dor. Além disso, durante estas 7 h, nem água nem comida foi ofertada aos camundongos. Após a liberação, os animais aguardaram 40 min até o início da avaliação comportamental (Budni *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2014; Gáll *et al.*, 2020; Poleszak *et al.*, 2006). Essa dinâmica experimental está ilustrada pela Figura 6A.

5.4.2 Estresse crônico de origem imprevisível

Neste protocolo, foram avaliados camundongos randomizados em cinco grupos diferentes, a saber: veículo (MCT), fluoxetina (10 mg/kg, via oral, administração única), e óleo de Cannabis de amplo espectro (0.1, 1 e 3 mg/kg, via oral, administração única). Durante 14 dias, os animais foram submetidos a estímulos estressantes aleatórios que foram projetados de maneira a maximizar a natureza imprevisível do estresse: os estressores variaram em sua natureza, cronologia e duração, sendo que nenhum deles envolveu a privação de água e comida. Do 1° ao 13° dia do protocolo, os animais submetidos ao protocolo de tratamento único foram imediatamente alocados para suas gaiolas e transferidos de volta às condições-padrão do laboratório após o fim de cada estressor. No 14° dia, eles foram tratados 1 h após o fim do estresse e, 24 h depois, foram avaliados quanto ao seu comportamento (Figura 6B). Quanto aos animais que receberam tratamento contínuo (Figura 6C), estes foram igualmente alocados e reestabelecidos às condições laboratoriais imediatamente após o término do estressor durante os nove primeiros dias do protocolo. Do 10° ao 14° dia, os animais foram tratados 1 h após o fim do estresse com o óleo de Cannabis de amplo espectro na dose de 10 mg/kg. No 15° dia, 24 h após o último tratamento, eles foram avaliados comportamentalmente (Lu *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2012).

Os estressores utilizados ao longo dos dias foram:

1) Restrição dos movimentos – individualmente, o animal foi alocado em tubo plástico fenestrado (18 cm × 4 cm). A restrição dos movimentos ocorreu no 1° e no 7° dia do protocolo.

2) Nado forçado – no 6° do protocolo, um camundongo por vez foi colocado em um recipiente cilíndrico (10 cm × 25 cm) contendo 19 cm de água. Neste momento, o

objetivo do nado forçado não foi avaliar o comportamento do animal; ele foi considerado apenas um estímulo à natação.

3) Banho frio – os animais foram alocados em uma gaiola contendo 2 cm de água fria no 2º e no 9º do experimento.

4) Maravalha molhada – os animais foram alocados em uma gaiola inclinada 45º contendo maravalha molhada com 400 mL de água. Água e comida foram ofertadas *ad libitum*. Este estímulo aconteceu no 3º e 12º dia.

5) Choque elétrico nas patas – os animais foram alocados na esquia passiva (Insight® - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) e receberam choques (0,7 mA; 0,5 s/min) a cada 30 s durante 3 min no 8º, 10º e 14º dia.

6) Compressão da cauda – no 4º e 13º dia, um prendedor de roupas posicionado a 1 cm da base da cauda foi utilizado para o estímulo de compressão.

5.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

5.5.1 Teste do nado forçado (FST, “*Forced Swimming Test*”)

O FST avaliou o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse e seguiu o método previamente descrito por Porsolt e colaboradores (1977). Um por vez, os camundongos foram colocados em um tanque cilíndrico e transparente (30 cm × 20 cm) contendo 15 cm de água a uma temperatura de 22-25 °C, que foi trocada a cada animal. O teste teve duração de 6 min, com um período prévio de habituação de 2 min. Os efeitos antidepressivos dos tratamentos foram avaliados em função da latência para a imobilidade (SLATTERY; CRYAN, 2012; VERBITSKY; DOPFEL; ZHANG, 2020). Neste modelo, os estressores tendem a aumentar o tempo de imobilidade dos animais, enquanto substâncias com potencial antidepressivo tendem a diminuí-lo (Molendijk; de Kloet, 2022). O FST foi conduzido apenas no protocolo de estresse crônico de origem imprevisível.

5.5.2 Teste de borrifagem da sacarose (ST, “*Splash Test*”)

O ST foi utilizado para avaliar o estado de anedonia dos animais e consistiu em borrifar 200 µL de uma solução de sacarose (20%) no dorso dos animais. Devido à alta viscosidade desta solução, os animais normalmente iniciam sua autolimpeza

imediatamente, e este comportamento foi observado por 5 min. Animais que apresentam um comportamento tipo-depressivo apresentam um tempo menor de autolimpeza em comparação aos animais-controle. Por sua vez, substâncias com potencial antidepressivo aumentam o tempo despendido a este autocuidado (Diaz *et al.*, 2016; Quintans-Júnior *et al.*, 2011). O ST foi conduzido apenas no protocolo de estresse crônico de origem imprevisível.

5.5.3 Teste do labirinto em cruz elevado (EPMT, “*Elevated Plus Maze Test*”)

O EPMT avaliou o comportamento tipo-ansiosgênico no grupo de camundongos expostos previamente ao estresse. O aparato é constituído por dois braços abertos (36 cm × 5 cm) e dois braços fechados (36 cm × 5 cm × 18 cm) que se conectam por meio de uma plataforma central (5 cm × 5 cm) e que estão elevados a 50 cm do solo. Para a execução do teste, cada animal foi posicionado no centro da plataforma voltado para o braço fechado e obteve permissão para se mover livremente entre os braços. Durante 5 min, foram registradas o número de entradas bem como o tempo gasto nos braços abertos. Posteriormente, calculou-se a porcentagem de tempo gasto e de entradas nos braços abertos, parâmetros relacionados à ansiedade. No EPMT, o estresse tende a diminuir a frequência e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto uma substância com potencial efeito ansiolítico tendem a aumentá-los (Sulakhiya *et al.*, 2016). O EPMT foi utilizado para avaliar os animais submetidos tanto ao protocolo agudo quanto crônico.

5.5.4 Teste do campo aberto (OFT, “*Open Field Test*”)

O OFT foi conduzido a fim de excluir a possibilidade de que algum possível comportamento tipo-depressivo ou tipo-ansiosgênico tivesse relação com o aumento ou diminuição da atividade motora provocado pela administração dos tratamentos. Um a um, os animais foram posicionados no centro de uma caixa de acrílico (30 cm × 30 cm) cujo solo é dividido igualmente em nove quadrados (Insight® - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O número de quadrantes cruzados totalmente pelas quatro patas do animal foi registrado durante 5 min. O aparato foi higienizado com etanol 10% ao fim de cada avaliação (MACHADO *et al.*, 2012).

5.6 TÉTRADE CANABINOIDE

A tétrede canabinoide é um protocolo pré-clínico clássico que avalia a segurança farmacológica de moléculas, cujo alvo seja relacionado ao SEC (Metna-Laurent *et al.*, 2017). O principal objetivo deste ensaio foi monitorar os efeitos centrais do óleo de Cannabis de amplo espectro nos receptores canabinoides através de quatro parâmetros principais: hipolomoção, hipotermia, catalepsia e analgesia. Foram avaliados quatro grupos para cada um dos quatro parâmetros supracitados, a saber: veículo (TCM), óleo de Cannabis de amplo espectro (3 e 30 mg/kg, via oral) e WIN 55.212-2 (1,5 mg/kg, via intraperitoneal), um potente agonista dos receptores canabinoides. Após a administração dos tratamentos, os camundongos foram avaliados no período basal e a cada 1 h, por um período de 6 h após o tratamento.

- Atividade locomotora: O aparato *Rotarod* (Ugo Basile, Itália) foi utilizado a uma velocidade rotacional fixa de 4 rotações por min (rpm) a fim de verificar a mudanças no desempenho motor dos animais. Os camundongos foram treinados por 60 s durante os dois dias que antecederam o experimento. A latência foi determinada nos casos em que os animais caíram do aparato.
- Analgesia: Os animais foram colocados sobre uma placa quente com temperatura fixa de 45°C para a avaliação do limiar nociceptivo. O teste teve um ponto de corte de 15 s.
- Catalepsia: Um a um, os camundongos foram posicionados de modo que suas patas dianteiras ficassem sobre uma haste de plástico (12 cm de diâmetro) fixada horizontalmente a uma altura de 2-3 cm da superfície de uma caixa. Mediu-se, então, o tempo que o animal passou movendo-se e tocando o fundo da caixa. O ponto de corte do teste foi de 180 s.
- Hipotermia: A temperatura interna dos animais foi medida com o auxílio de um termômetro digital clínico (BD Basics, Nova Jersey, EUA). O termômetro foi lubrificado com gel íntimo e, logo em seguida, inserido no reto a uma profundidade constante de 3 cm.

5.7 ANÁLISE DE BIOMARCADORES SÉRICOS POR ENSAIO MULTIPLEX/LUMINEX

A quantificação sérica de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foi realizada através do método MULTIPLEX/LUMINEX com o kit de esferas Luminex (R&D Systems, Minneapolis, EUA). O ensaio avaliou os níveis de 15 diferentes

proteínas, a saber: proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), eotaxina (EOTX), fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL-) 1 β , IL-4, IL-17A, IL-33, IL-2, IL-6, IL-17E, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -1 α , quimiocina derivada de queratinócito (KC), molécula de adesão intercelular (ICAM) e receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). O ensaio foi realizado conforme as instruções do fabricante.

A amostra foi obtida a partir do sangue dos camundongos no 15^o e último dia do protocolo de estresse crônico imprevisível. Após a coleta, o sangue foi centrifugado para a separação do soro e armazenado a -80°C até a realização do ensaio. Esse procedimento foi realizado tanto para os animais tratados com uma dose única quanto para aqueles que receberam doses repetidas. Brevemente, 50 μ L de amostra foram adicionados à placa contendo 50 μ L dos padrões e 50 μ L do coquetel de micropartículas. Após 2 h de incubação em temperatura ambiente e sob agitação constante (800 rpm), o sobrenadante foi removido e a placa foi lavada com tampão (100 μ L, 3 vezes). Em seguida, foram adicionados 50 μ L do coquetel de anticorpo biotilado em cada poço, e a placa foi novamente incubada por 1 h sob as mesmas condições da incubação anterior. Na sequência, a placa foi novamente lavada conforme descrito acima. Então, foram adicionados 50 μ L de estreptavidina-PE. A placa foi incubada por mais 30 min (temperatura ambiente, 800 rpm). Finalmente, a placa foi lavada uma última vez e, então, foram adicionados 100 μ L do tampão de lavagem em cada poço. Após 2 min de agitação (800 rpm), foi realizada a leitura da placa (Luminex® 100/200™ System, Texas, EUA). Os resultados foram expressos como pg/mL.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Tanto para os parâmetros comportamentais quanto para os parâmetros bioquímicos, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Newman-Keuls ou Bonferroni e teste *t* de Student's, quando apropriado. A normalidade e a homogeneidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O nível de significância estatística adotado foi de 95% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.2.1 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO



Pharmaceutical Sciences, 2022, 28(2), 239-250
doi:10.34172/PS.2021.59
https://ps.tbzmed.ac.ir/



Research Article



Broad-Spectrum *Cannabis* Oil Alleviates Behavioral Symptoms Associated with Stress-Related Anxiety and Depression in Mice

Pollyana Mendonça de Assis¹, Eduarda Gomes Ferrarini^{2,3}, Gabriela Mantovani Baldasso², Rodrigo Sebben Paes², Murilo Chaves Gouvêa⁴, Carlos Espinola Neto Segundo⁴, Francesca Borrelli⁵, Marcos Antônio Fernandes Brandão¹, Raffaele Capasso^{6,7}, Rafael Cypriano Dutra^{2,3}, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹

¹Center of Research and Innovation in Health Sciences (NUPICS), School of Pharmacy, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-330, Brazil.

²Laboratory of Autoimmunity and Immunopharmacology (LAIF), Department of Health Sciences, Campus Araranguá, Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá 88906-072, Brazil.

³Post-Graduate Program of Neuroscience, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil.

⁴Associação Brasileira de Apoio Cannabis e Esperança – ABRACE, Parque Sólun de Lucena, 697, João Pessoa 58028-470, Brazil.

⁵Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, 80131 Naples, Italy.

⁶Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, 80055 Portici, Italy.

⁷Endocannabinoid Research Group, Naples, Italy.

Article Info

Article History:

Received: 11 June 2021

Accepted: 2 September 2021

ePublished: 10 September 2021

Keywords:

-Anxiety
-Broad-spectrum *Cannabis* oil
-*Cannabis* sp
-Depression
-Posttraumatic stress disorder

Abstract

Background: Posttraumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric condition that manifests through a broad range of symptoms and shares several phenotypes with anxiety and depression. Refractory PTSD affects 10–30% of the patients and highlights the need for alternative pharmacotherapy. The suggested involvement of the endocannabinoid system (ECS) with the emotional processes has enlightened the use of *Cannabis* sp. Then, this study aimed to evaluate the therapeutic effects of a broad-spectrum *Cannabis* oil on anxiety- and depressive-like behaviors triggered by stressors from combined nature. In addition, this study investigated the effect of the oil on central cannabinoid receptor 1 and serum levels of cytokines, chemokines, and growth factors.

Methods: Mice were randomized into five groups (vehicle; *Cannabis* oil; fluoxetine; single oral dose) and submitted to acute restraint and chronic unpredictable stress. Then, they were behaviorally assessed in the elevated plus-maze test (EPMT), forced swimming test (FST), splash test (ST), and open field test (OFT). The tetrad cannabinoid assay evaluated the central effect of the oil. Serum biomarkers levels were measured by a multiplex bead-based assay.

Results: *Cannabis* oil (0.1 mg/kg, p.o.) significantly reduced the anxiety-like behavior in EPMT in the acute restraint stress model ($p < 0.05$) as compared to vehicle. Moreover, compared to the vehicle, *Cannabis* oil significantly reverted the despair and anhedonic-like behaviors in FST ($p < 0.05$) and ST ($p < 0.05$), respectively, in chronically stressed mice. Yet, compared to vehicle, therapy with *Cannabis* oil did not induce cannabinoid-tetrad ($p < 0.0001$); downregulated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; $p < 0.01$) and advanced glycation end-products (RAGE; $p < 0.0001$); and upregulated vascular endothelial growth factor (VEGF; $p < 0.01$) serum levels.

Conclusion: Altogether, our data suggest the potential of the broad-spectrum *Cannabis* oil to improve symptoms related to anxiety and depression caused by traumatic events.

Introduction

Globally, the knowledge of the real prevalence of posttraumatic stress disorder (PTSD) is unclear.¹ It has been estimated that 61% to 80% of individuals are going to experience some type of traumatic event during their lifetime.² From those individuals, approximately 5% to 10% will develop PTSD.³ This psychiatric ailment affects the self and social functions of individuals by a broad range

of symptoms, including the involvement of cognition, emotion, and mood.⁴ In these people, PTSD is frequently comorbid with depression and anxiety. According to the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions, 59% and 35.2% of those who met the criteria for PTSD also met the criteria for anxiety and depression, respectively.⁵

Although there are significant proportions of people

*Corresponding Author: Rafael Cypriano Dutra, E-mail: rafaelcdutra@gmail.com & Nádia Rezende Barbosa Raposo, E-mail: nadia.barbosa@ufjf.br ©2021 The Author(s). This is an open access article and applies the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

suffering from PTSD and its comorbidities, such as depression and anxiety, the molecular mechanisms underlying the pathophysiology are still poorly understood. The current knowledge suggests alterations in neurogenesis, neurohormonal, and neurotransmitter functioning.⁶ Another aspect that has attracted attention is the probable involvement of the immune system and its dysregulation in PTSD⁷⁻⁹ and PTSD-related disorders – anxiety and depression.¹⁰ Then, a better understanding of the molecular basis of PTSD is worth for future development of diagnosis, prognosis, and therapeutic strategies.

Thinking about new pharmacotherapy options is particularly important if considering the challenges faced by patients with the available drugs. To date, the US Food and Drug Administration (FDA) has only approved two selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of PTSD: sertraline and paroxetine.¹¹ Off-label pharmacotherapy includes fluoxetine and venlafaxine.¹² However, 10 – 30% of the patients are still refractory to the conventional prescriptions,¹³ highlighting the demand for alternative strategies that are safe and have good tolerability. In this scenario, the endocannabinoid system (ECS) has emerged as a promising pharmaceutical target for the modulation of the synaptic transmission involved with cognition, stress responses, and emotional stability,¹⁴ besides its connection with the immune system and neurogenesis.¹⁵ Consequently, the therapeutic role of *Cannabis* sp. has attracted more attention.

Among the more than 400 compounds identified in *Cannabis* sp. so far, delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD) are the most studied phytocannabinoids. The psychomimetic effects of *Cannabis* sp. have been attributed mainly to Δ^9 -THC, which is an agonist for central cannabinoid receptor type 1 (CB1R). CBD, instead, does not elicit euphoria.¹⁶ Indeed, CBD is known for its pharmacological properties, which include analgesic and anti-inflammatory actions.¹⁷ Additionally, this phytocannabinoid has proved to have neuroprotective, anxiolytic, antipsychotic, antiemetic, and antioxidant properties through a multi-target mechanism.¹⁸⁻²¹ Despite all the pieces of evidence suggesting the effectiveness of *Cannabis* sp. on psychiatric disorders, the FDA has only approved this compound for children who suffer from Lennox-Gastaut Syndrome and Dravet syndromes.^{22,23} It is worth mentioning that the approved drugs consist of derivatives of isolated phytocannabinoids, which are way different from *Cannabis* oil. According to the extraction techniques, broad-spectrum *Cannabis* oil can be almost free of Δ^9 -THC but contains all the phytochemicals found in the plant, including terpenes, flavonoids, and other phytocannabinoids, such as CBD.²⁴ This composition is said to contribute to the synergistic effects of *Cannabis* sp. and might be an alternative treatment for complex psychiatric diseases.

Animal models are widely used to research new treatments for PTSD. It helps to comprehend the

molecular basis of the disease and, consequently, identify potential targets for new drugs or even drug repositioning. Using animals in pre-clinical research is also a strategy for screening new potential drugs to treat PTSD.²⁵ Recently, Deslauriers *et al.*²⁶ have reviewed >600 articles to examine the ability of current rodent models to probe biological and behavioral phenotypes of PTSD. The authors have evaluated several paradigms, including the restraint stress and the chronic unpredictable stress, for their efficacy in stimulating PTSD-like constructs (learned fear and extinction, avoidance, reduced motivation/reward, arousal, and cognitive deficits) in addition to biological and physiological phenotypes associated with PTSD. All the reviewed paradigms produced lasting effects on general depression- and/or anxiety measures.²⁶ That said, behavioral tests are methodological tools that represent the best approach to measure anxiety- and depressive-like phenotypes in a PTSD model.²⁷

Thus, considering the high prevalence of PTSD; the patients' refractory to medical treatment; and the suggested therapeutic potential of *Cannabis* sp. on psychiatric illness, this study aimed to evaluate in mice the effects of a broad-spectrum *Cannabis* oil on anxiety- and depressive-like behaviors triggered by stressors from combined nature. Further, it was investigated the central effects of the oil on CB1R, as well as its influence on the serum levels of cytokines, chemokines, and growth factors.

Materials and Methods

Broad-spectrum Cannabis oil

The broad-spectrum *Cannabis* oil was produced and analyzed by the Brazilian Association ABRACE (Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança, Paraíba - Brazil) that is enrolled with the National Register of Legal Entities (CNPJ) under the number 23.877.015/0001-38. The chromatographic analysis reported a CBD: Δ^9 -THC proportion of 11:1 and total cannabinoids of 40.2% (Figure 1). Regarding the microbiological assessment, the oil was under the current quality parameters.

Animals

A total of 120 male Swiss mice (30-50 g, 50-90 days of age) were provided by the breeding unit of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). The animals (maximum of 12 mice group-housed in clear-transparent plastic cages with dust-free sawdust bedding) were housed under regulated conditions that included a 12-h-light/-dark cycle (artificial light at 07:00 a.m. to 07:00 p.m.), controlled temperature (22 ± 2 °C), and standard food and water *ad libitum*. All of the tests were conducted between 8:00 a.m. and 5:00 p.m., and the animals were acclimatized to the laboratory settings for at least 1 h before testing. Each animal was used only once throughout the experiments. They were randomly assigned before treatment or behavioral evaluation. All efforts were made to minimize their suffering and reduce the number of animals required for the experiments. The experiments herein described were

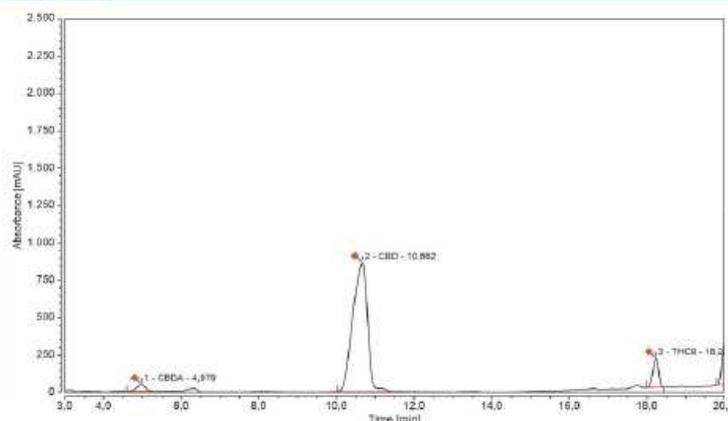


Figure 1. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of broad-spectrum Cannabis oil. THC (retention time = 18.2 min); CBD (retention time = 10.8 min). THC: tetrahydrocannabinol; CBD: cannabidiol.

reported in compliance with the ARRIVE guidelines²⁸⁻³⁰ and approved by the Animal Ethics Committee of the UFSC (CEUA-UFSC) under protocol 7176240920. All the experimental procedures were conducted according to the guidelines of CONCEA and CEUA/UFSC, based on the 3R's principles: replacement, reduction, and refinement. A blind operator performed both the nociception assessments and the statistical analysis.

Experimental design

Broad-spectrum Cannabis oil (0.1, 1, 3 and 10 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg), a selective inhibitor of serotonin used as the positive control, were dissolved in medium-chain triglycerides (MCT) (Vitafor®, Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brazil) and saline, respectively, and administered by oral gavage (p.o.). Fluoxetine has been used and proved to be effective on pre-clinical models of PTSD^{27,31,32} and clinical studies.^{33,34}

The chronic protocol was also featured with an additional group treated continuously with Cannabis oil at 0.1 mg/kg (p.o.; 1x/administration; 5-day treatment). This extra group aimed to verify if repeated treatment could result in a long-lasting anxiolytic-/antidepressant-like effect. All drugs were prepared right before the treatment, and the volume of the administration was 10 ml/kg, 1 h before the constraint stress or immediately after the last stressful stimulus (14-day protocol). The choice of the doses used was based on pilot experiments (Supplemental Data) or on previous data described in the literature.³⁵⁻³⁷

Acute restraint stress-induced paradigm

Five groups of randomized mice were tested through this protocol: vehicle, fluoxetine (10 mg/kg, p.o., 1x/administration), or broad-spectrum Cannabis oil (0.1, 3, and 10 mg/kg, p.o., 1x/administration), as shown in Figure 2A. For the acute restraint stress-induced protocol, mice

were first maintained inside their home cages, with free access to water and food, during the drug administration and the period before the restriction (1 h). Then, each animal was removed from the group-house and introduced into a fenestrated punctured plastic tube (18 cm × 4 cm) placed in a horizontal, so the normal orientation of the animal's body was kept. The animal remained in that position for 7 h, with all physical movements restrained but without any pain. No food or water was offered to the animal during the 7-hour period. After release, the animals waited for 40 min before being behaviorally assessed.³⁸⁻⁴¹ The researcher was blind for the treatments, and the behavioral tests were manually scored.

Chronic unpredictable stress (CUS) paradigm

Five groups of randomized mice were evaluated: vehicle, fluoxetine (10 mg/kg, p.o., 1x/administration), or broad-spectrum Cannabis oil (0.1, 1 and 3 mg/kg, p.o., 1x/administration), as shown in Figure 2B. This protocol was also featured with an additional group that was continuously treated with Cannabis oil at 0.1 mg/kg (p.o.) – administered in the last 5 days of the protocol. The stressful stimuli were designed to maximize the unpredictable nature of the stressor. Therefore, several stressors varying in duration and time were randomly applied for 14 days, and food and water were offered *ad libitum*. As soon as mice were exposed to the stressor, they returned to their home cage and were kept under laboratorial standard conditions. Mice received the aforementioned treatments on the 14th and last day of the protocol and were behaviorally assessed 24 h after the treatment.^{42,43}

Briefly, the CUS paradigm consisted of exposure, once daily, to one of the following aversive stressors: restraint – mice were placed into a plastic tube (18 cm × 4 cm) sealed at the extremities and properly perforated to promote air circulation. This stimulus occurred on the 1st and 7th

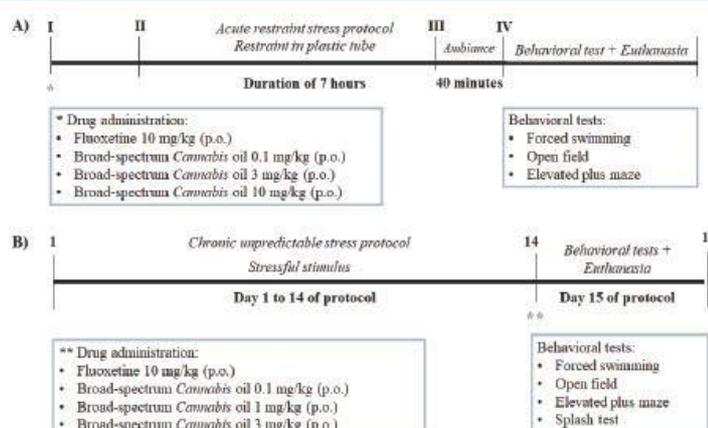


Figure 2. Experimental design. (A) The acute restraint stress-induced protocol was conducted in four different stages as illustrated above (I-IV), which included the drug administration 1 h before the restraint, the containment in tubes for 7 h, the ambiance of 40 min, and the behavioral tests followed by euthanasia. Behavioral tasks were evaluated by the elevated plus-maze and open field tests. (B) The chronic unpredictable stress (CUS) protocol, applied for 15 days, was divided into periods of stressful stimuli and behavioral tests/euthanasia. The stressful stimuli consisted of containment, forced swimming, cold bath, wet wool shavings, shock, and tail compression in alternated days and hours, always unpredictably. In this protocol, the drug was administered on the last day (14) or daily for the group under continuous treatment. Behavioral tasks were assessed by the forced swimming (FST), open field (OFT), elevated plus-maze (EPMT), and splash (ST) tests.

days of the protocol; forced swimming – mice were into a cylindrical recipient (10 cm × 25 cm) containing 19 cm of water on the 6th day of the protocol; cold bath – mice were placed inside a group-house with 2 cm of water on the 2nd and 9th days of the protocol; wet wood shaving – wood shavings were wet with 400 ml of water, and the group-house was tilted at 45° angle. This stimulus occurred on the 3rd and 12th days of the protocol; footshock – test took place at the passive avoidance apparatus (Insight® – Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). Mice were placed on the bars and received paw shocks (0.7 mA; 0.5 s/min) every 30 sec for 3 min on the 8th, 10th, and 14th days of the protocol; tail compression – on the 4th and 13th days, the tail compression stimulus was conducted by positioning a clothespin 1 cm from the base of the animal's tail. Figure 2B summarizes all the steps aforementioned.

Behavioral tests

Forced swimming test

The FST assessed antidepressant-like behavior and followed the method described by Porsolt *et al.*⁴⁴ Each one of the animals was placed into a transparent cylindrical tank (30 cm × 20 cm) with 15 cm of water at a temperature of 22-25 °C. The test was conducted for 6 min, with a habituation period of 2 min. The antidepressant-like effects of the treatments were assessed in the function of the latency to immobility.^{45,46} The FST was only executed in the chronic protocol.

Splash test

The splash test (ST) was used to measure the anhedonia-like state. It consisted of squirting a sucrose solution (200 µl, 20%) on the dorsal coat of the animals. Because of the high viscosity of sucrose in this concentration, the animals initiate the self-cleaning behavior, a typical symptom of anhedonia used to a depression diagnosis. After squirting, the latency to grooming was recorded for 5 min as an indicator of self-care and motivational behavior.^{27,47} The ST was only executed in the chronic protocol.

Elevated plus-maze test

The elevated plus-maze test (EPMT) assessed anxiety-like behavior in mice. The apparatus comprises two open arms (36 cm × 5 cm) and two closed arms (36 cm × 5 cm × 18 cm) that are connected to a central platform (5 cm × 5 cm) and elevated 50 cm from the ground. For the test, an animal per time was placed at the center of the platform, facing toward the closed arm, and allowed to move through the arms. The time spent in the open arms and the number of entries made into the open arms were recorded for 5 min. Subsequently, the percentage of time spent in open arms was calculated from the total spent there divided by the total time spent in both open and closed arms. The percentage of entries made into the open arms was given from the total entries made into these arms divided by the total entries made in both open and closed arms.⁴⁸

Open field test

The open-field test (OFT) evaluated whether the animals

had any locomotor impairment during the experimental protocols and treatments. Each one of the mice was placed in the center of an acrylic box (30 cm × 30 cm) that possess nine square areas equally divided (Insight* – Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). The crossing number (scored by the number of segments crossed with the four paws) was used to assess locomotor activity. The test lasted 5 min per animal, and the apparatus was cleaned with a solution of ethanol 10% after each test to avoid clues and smells from the predecessor animal.⁴⁹

Cannabinoid-induced tetrad

The classical cannabinoid-induced tetrad is a preclinical model that evaluates the “safety-pharmacology” of new cannabinoid-related molecules.⁵⁰ The main purpose of the test was to monitor the central effects of broad-spectrum *Cannabis* oil on cannabinoids by measuring the following parameters: spontaneous locomotor activity, rectal temperature, catalepsy, and antinociception.⁵¹ Four groups were assessed for each parameter aforementioned: vehicle (MCT); broad-spectrum *Cannabis* oil (3 or 30 mg/kg, p.o.); or WIN 55,212 (1.5 mg/kg, i.p. – a potent cannabinoid receptor agonist). Tests were conducted every 1 h, during the period of 6 h following the drug or vehicle administration.

Spontaneous locomotor activity was evaluated using the rotarod apparatus (Ugo Basile, Italy). It was fixed at a rotational speed of 4 revolutions per minute (rpm). Before the experiment, mice had been trained for 60 sec on two consecutive days. Latencies were determined in the case the animals had fallen off the apparatus.

Core temperatures were measured using a clinic digital thermometer (BD Basics, New Jersey, USA) that was lubricated with intimate gel before inserting it into the rectum to a constant depth of 3 cm.

To measure catalepsy mice were hung by their frontal paws from a plastic stem (12 cm of diameter) fixed horizontally at a height of 2-3 cm, allowing them to stay standing. This test measured the time that the animal spent moving and touching the bottom of the box. The test cut-off point was 180 sec.

To evaluate antinociception, the tail-flick apparatus with a fixed temperature of 45 °C. The test had a cut-off point of 15 sec.

Serum biomarkers

Blood was collected from each animal on the 15th and last day of CUS protocol, and serum was separated by centrifugation (5500 × g for two 15-min cycles) and stored until further analysis. Briefly, 50 µl of the sample was processed with a multiplex bead-based assay (R&D Systems, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's instructions. The assay determined the serum levels of different cytokines, chemokines, and growth factors [for instance, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), eotaxin (EOTX), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin- (IL-) 1β, IL-4,

IL-17A, IL-33, IL-2, IL-6, IL-17E, vascular endothelial growth factor (VEGF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1α, keratinocytes-derived chemokine (KC), intercellular adhesion molecule (ICAM), and receptor for advanced glycation end products (RAGE)]. Measurements and analysis were performed by the Luminex platform (Luminex* 100/200™ System, Texas, EUA). Each multiplex immunoassay was performed in quintuplicate, and results were expressed as pg/ml serum.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of 4 – 10 animals/group. A statistical comparison of the data was performed by one- or two-way ANOVA followed by Bonferroni to multiple comparisons *post hoc* test. $P < 0.05$, 0.01, and 0.001 were considered significant. Statistical analyses were performing using GraphPad Prism 8.2.1 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Effects of single administration doses of broad-spectrum Cannabis oil on acute restraint stress-induced behaviors in the EPMT and OFT

The EPMT assessed the anxiolytic effect of the treatment with a single dose of broad-spectrum *Cannabis* oil (0.1, 3, and 10 mg/kg, p.o.) during acute restraint stress-induced behaviors. As shown in Figure 3A, the oil significantly increased the time spent in open arms at 0.1 mg/kg as compared to vehicle ($p < 0.05$). Figure 3B shows that the more entries made into the open arms by the animals from the groups treated with *Cannabis* oil were not significantly different from the vehicle ($p > 0.05$). Finally, no changes were observed in the locomotor activity ($p > 0.05$) in the OFT (Figure 3C), confirming that the anxiolytic effect of *Cannabis* oil occurs independently of any motor changes. Compared to the positive group, no significant changes were observed.

Effects of the treatment with broad-spectrum Cannabis oil on CUS-induced behaviors

As shown in Figure 4A, the treatment with broad-spectrum *Cannabis* oil at 0.1 mg/kg significantly diminished the latency to immobility in the FST as compared to the vehicle group ($p < 0.05$), similarly to the effect seen in the fluoxetine group ($p < 0.05$). Moreover, Figure 4B showed that mice treated with *Cannabis* oil (0.1, 1, and 3 mg/kg) started grooming significantly faster than animals treated with vehicle ($p < 0.05$) in the ST. Relevantly, the OFT (Figure 4C) showed no change in the locomotor behavior of the animals ($p > 0.05$). Regarding the EPMT (Figure 4D, E) no significant differences were observed in the time spent in the open arms ($p > 0.05$), although mice treated with *Cannabis* oil (0.1 mg/kg) significantly demonstrated more entries into the open arms ($p < 0.01$). Finally, mice under CUS protocol were continuously treated with broad-spectrum *Cannabis* oil (0.1 mg/kg) for 5 days and then

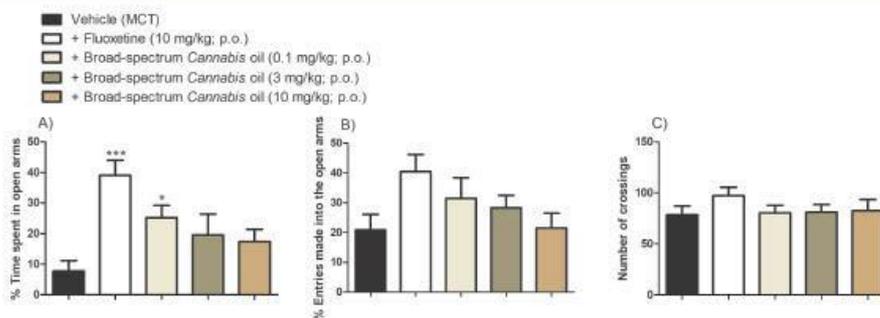


Figure 3. Effect of the treatment with broad-spectrum Cannabis oil (0.1, 3, and 10 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) on mice induced to acute restraint stress and submitted to EPMT (A and B) and OFT (C). Values are expressed as mean \pm SEM of 7-10 animals per column. *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc*-test). EPMT: elevated plus-maze test; OFT: open field test.

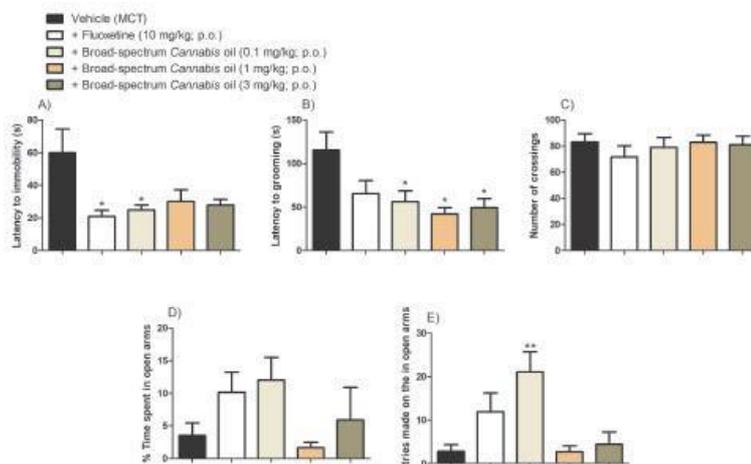


Figure 4. Effects of the treatment with broad-spectrum Cannabis oil (0.1, 1 and 3 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) on mice chronically stressed by unpredictable stressors and submitted to the FST (A), ST (B), OFT (C), and EPMT (D and E). Treatments were administered 24 h before behavioral assessments. Values are expressed as mean \pm SEM of 7-10 animals per column. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus vehicle (one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc*-test). FST: forced swimming test; ST: splash test; OFT: open field test; EPMT: elevated plus-maze test.

behaviorally compared to vehicle and fluoxetine groups, although no significant changes were observed (data not shown).

Broad-spectrum Cannabis oil did not induce cannabinoid-like effects on tetrad assay

The effects of treatment with broad-spectrum Cannabis oil (3 and 30 mg/kg, p.o.) on locomotion, nociception, catalepsy, and body temperature are shown in Figure 5. As expected, WIN 52,212-2 (1.5 mg/kg, i.p.), a potent CB1R agonist, induced cannabinoid-like effects during tetrad

assay. This agonist reduced significantly the locomotor activity ($p < 0.0001$; Figure 5A), increased the threshold sensitivity ($p < 0.0001$, Figure 5B), induced catalepsy ($p < 0.0001$; Figure 5C), and decreased the body temperature ($p < 0.0001$; Figure 5D) as compared to the vehicle. Otherwise, no significant behavior changes were observed following the oral administration of Cannabis oil ($p > 0.05$).

Serum biomarkers

Table 1 shows the cytokines, chemokines, and growth factors levels following a single dose or continuous

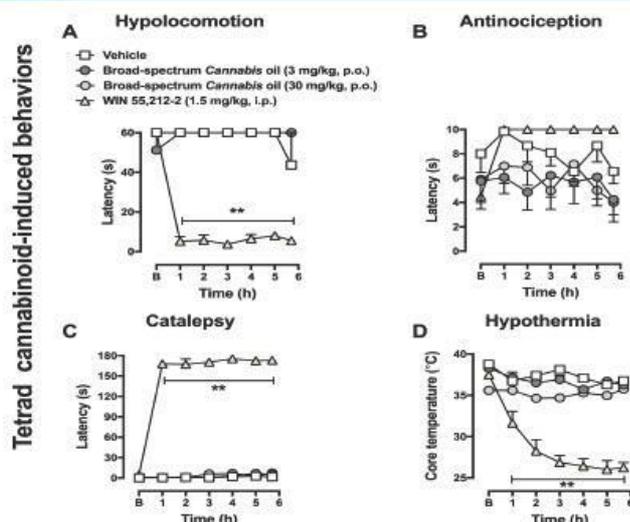


Figure 5. Evaluation of the treatment with broad-spectrum *Cannabis* oil on cannabinoid tetrad assay. The tests included locomotor activity (A), threshold hyperalgesia (B), catalepsy-like behavior (C), and thermal body measurement (D). WIN 55,212-2 (1.5 mg/kg, i.p.) – a potent cannabinoid receptor agonist – was used as the positive control. Data are presented as mean \pm SEM of 4–5 mice per group. ** $p < 0.001$ versus naïve (two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc*-test). B: baseline withdrawal threshold refers to the evaluation performed before treatment.

treatment with broad-spectrum *Cannabis* oil (0.1 mg/kg, p.o.) during CUS protocol. Serum levels of GM-CSF were significantly reduced ($p < 0.01$) when compared to vehicle, after single-dose administration. Under continuous treatment and compared to the vehicle group, serum levels of VEGF were significantly upregulated ($p < 0.01$), and RAGE levels were significantly downregulated ($p < 0.0001$). No statistically significant differences were found

for the other measurements. The level of IL-4 could not be detected in the assay.

Discussion

The present results showed that broad-spectrum *Cannabis* oil reduced the anxiety-like behavior triggered by the acute restraint paradigm. The oil also reverted despair and anhedonic-like behaviors triggered by unpredictable stress.

Table 1. Cytokines, chemokines, and growth factors serum levels following single and continuous treatment with broad-spectrum *Cannabis* oil (0.1 mg/kg, p.o.).

Measurement	Vehicle	Fluoxetine	Single Dose	Continuous Treatment	P-value
MCP-1	281.5 (12.42)	294.8 (14.27)	340.8 (28.88)	294.9 (24.54)	0.2354
EOTX	255.7 (35.97)	249.9 (18.88)	282.1 (11.32)	256.7 (18.84)	0.7447
GM-CSF	4.525 (0.10)	4.289 (0.10)	4.018 (0.09)**	4.304 (0.08)	0.0081
IL-1 β	49.78 (8.89)	51.49 (8.82)	45.40 (9.03)	44.98 (7.39)	0.9244
IL-4	ND	ND	ND	ND	-
IL-17A	7.789 (1.55)	6.971 (0.95)	10.55 (2.43)	10.37 (3.43)	0.8031
IL-33	54.88 (1.57)	47.57 (2.10)	58.12 (2.88)	52.04 (2.75)	0.0775
VEGF	12.88 (0.37)	12.77 (0.85)	13.68 (0.54)	22.26 (4.06)**	0.0075
MIP-1 α	0.2138 (0.04)	0.2583 (0.08)	0.3688 (0.08)	0.3550 (0.03)	0.1943
KC	65.79 (3.41)	54.06 (2.27)	80.59 (1.82)	68.88 (6.25)	0.0590
ICAM	25450 (2138)	24210 (900.7)	20710 (1517)	22380 (1420)	0.1734
IL-2	3.630 (0.13)	3.423 (0.27)	3.718 (0.22)	3.208 (0.15)	0.3012
IL-6	3.370	4.430 (1.12)	5.810 (1.22)	7.030	0.1598
IL-17E	5.298 (5.298)	5.298 (5.298)	8.408 (5.389)	15.84 (8.925)	0.6198
RAGE	36.40 (1.97)	18.13 (2.12)*	38.62 (1.18)	20.19 (2.98)***	<0.0001

Measurements were in ng/ml. Values are reported as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test). ND: not detected.

Importantly, cannabinoid-like effects were not observed at the doses of 3 and 30 mg/kg of *Cannabis* oil during tetrad assay. Lastly, oral administration of the oil downregulated the serum levels of GM-CSF and RAGE, whereas VEGF serum levels were found to be upregulated.

Cannabis sativa, a botanical plant with a millenary history of medicinal use, and its phytocannabinoids have been under investigation by their potential effects on a wide range of conditions, including psychiatric illnesses.⁵² Stressful episodes influence homeostasis by changing the physiological and neurobehavioral profiles throughout adaptive processes. Stress is one of the external causes of anxiety and depression, the two of the most common psychiatric illnesses, and is known for playing critical roles in the pathophysiology of these conditions.^{45,53} Interestingly, the involvement of the ECS with emotional processing has gained attention in the last few years, suggesting the use of *Cannabis* sp. as a therapeutic alternative for the treatment of symptoms related to PTSD.⁵²

In the first set of experiments, mice were treated with broad-spectrum *Cannabis* oil and then submitted to the acute restraint stress protocol. Substantial findings have supported this model as able to evoke PTSD-like constructs, including depressive- and anxiety-like symptoms.^{26,28,53-56} Moreover, this protocol has been employed to screen the therapeutic potential of drugs to manage mood symptoms related to PTSD since behavioral changes in mice can be monitored. Herein, we found that *Cannabis* oil (0.1 mg/kg, p.o.), rich in CBD, showed an anxiolytic effect while it did not change depressive-like symptoms. Previously, Resstel *et al.*⁵⁷ also demonstrated that a single dose of CBD (10 mg/kg, i.p.) increased the percentage of open arm entries in the EPMT of rats that have had their movements restrained. This anxiolytic action was attributed to the activation of 5-HT1A receptors. Yet, a recent study showed that mice exposed to traumatic brain injury had the anxiety- and depressive-like behaviors reestablished by a commercially available 10% CBD oil.⁵⁸ Contradicting these data and the study of Sales *et al.*⁵⁹, which demonstrated the antidepressant-like effect of CBD (10 mg/kg, i.p.) on mice in the FST, we found that *Cannabis* oil was ineffective to revert the depressive-like symptom in the FST. It is worth mentioning that those studies evaluated depressant-like symptoms triggered by other protocols as compared to ours. Yet, we are comparing the results of isolated CBD with a broad-spectrum oil, even though the pieces of evidence suggest that there is a positive contribution from the combination of phytocannabinoid and other molecules, such as terpenes, also called as "entourage effect".⁶⁰

Otherwise, neuropsychiatric alterations related to anxiety- and depressive-like behaviors are also described as consequences of exposure to chronic unpredictable stress.^{43,61,62} In the second set of experiments, different types of stressors applied to mice for 14 days significantly altered the parameters related to latency to immobility in the FST and grooming behavior in the ST. In rodents, a reduced persistence of swimming and a sucrose

indifference are commonly associated with depressive-like symptoms.³⁹ Since we observed an improvement of the anhedonia and depressive patterns, we could interpret these data as a consequence of the treatment with broad-spectrum *Cannabis* oil. Previously, isolated CBD (10 mg/kg, i.p.) had exerted pro-hedonic effects on rats subjected to chronic unpredictable mild stress by increasing their sucrose preference.³⁹ Still, other reports demonstrated that CBD isolated (30 and 200 mg/kg) significantly diminished depressive-like behavior in mice during FST.^{63,64} Taken together, one may conclude that *Cannabis* and *Cannabis* derivatives reduce depressant-like behaviors in rodents in a large range of dosages.

When evaluating the potential psychoactive effects of cannabinoids, the tetrad assay is very useful to characterize their biological activity. Mainly, the cannabinoid tetrad reveals cannabimimetic effects related to those elicited by CB1R agonist Δ^9 -THC.⁶⁵ Our findings showed no effects of broad-spectrum *Cannabis* oil at 3 and 30 mg/kg in the tetrad assay, confirming the analytical parameters of quality attested by the supplier (CBD: Δ^9 -THC proportion of 11:1 and total cannabinoids of 40.2%). CBD is well known for its low affinity by CB1R and as expected, it does not activate the cannabinoid tetrad.⁶⁶ Our findings are in accordance with these previous data since the *Cannabis* oil we tested is rich in CBD, but it is not the only compound. Thus, the psychoactive effects on mood-related symptoms appear to be independent of CB1R activation, although further experiments are needed to confirm this hypothesis.

Earlier experiments have suggested the psychoactive action of phytocannabinoids, mainly CBD, throughout the 5-HT1A signaling pathway.^{57,67} Besides, the pieces of evidence suggesting the anti-inflammatory properties of *Cannabis*^{68,69} contributed to the increasing interest in its therapeutic potential in mood disorders. Earlier experiments have demonstrated that GM-CSF levels are downregulated with phytocannabinoids treatment.^{70,71} We also found a significant decrease of GM-CSF serum levels following a single dose administration of broad-spectrum *Cannabis* oil (0.1 mg/kg, p.o.). This chemokine plays a critical role in regulating leukocyte counts,⁷² of which are elevated in PTSD patients.^{73,74} Another finding of our study was the significant downregulation of RAGE following continuous treatment with broad-spectrum *Cannabis* oil (0.1 mg/kg, p.o.). To the light of our current knowledge, there are no previous reports regarding the influence of *Cannabis*, or any isolated phytocannabinoid, upon RAGE expression. This receptor is known for its ability to recognize danger-associated molecular patterns (DAMPs) that can be released on a larger scale because of psychological and physical stress.⁷⁵ A recent review showed that several DAMPs, including the high mobility group box-1 (HMGB-1), may trigger depressive-like behaviors in the stress-induced depression model.⁷⁶ HMGB-1 is a well-known ligand of RAGE and, interestingly, a prospective study had associated the high plasma levels of HMGB-1 with the more likely to develop PTSD.⁷⁷ Taken together,

the accumulating data suggest the role of the HMGB-1/RAGE signaling in mood processes, and the effects observed in our study suggest that *Cannabis* may mediate immunomodulatory effects through this cellular pathway.

Last, but not least, the continuous treatment with broad-spectrum *Cannabis* oil (0.1 mg/kg, p.o.) significantly upregulated the serum levels of VEGF. In different cells and tissues, VEGF plays key roles in physiologic vascular homeostasis but is also associated with the molecular pathogenesis of tumor growth and metastasis.⁷⁸ Previously, Wheal *et al.*⁷⁹ showed the increase of the circulating levels of VEGF in ZDF diabetic rats treated with CBD, while Leishman *et al.*⁸⁰ showed a significant lowering of the mRNA encoding for VEGF in mice following acute Δ^9 -THC administration (3 mg/kg; i.p.). We are not aware of any studies that have investigated the effects of *Cannabis* oil, and not only isolated phytocannabinoids, on VEGF levels in stress-induced mice, thus justifying additional investigation.

Conclusion

In summary, our data showed the potential of broad-spectrum *Cannabis* oil to change behavioral patterns related to stress-induced anxiety- and depressive-like symptoms. Importantly, the oil did not trigger psychomimetic effects related to CB1R activation, as shown by the tetrad assay. Moreover, our data suggest the potential of the oil to regulate biomarkers involved with inflammation and angiogenesis, although further investigations are required to confirm these hypotheses.

Ethical Issues

The experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the UFSC (CEUA-UFSC) under protocol 7176240920.

Acknowledgments

Grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Programa INCT-INOVMED (Grant no. 465430/2014-7) and Programa de Pós-Graduação em Neurociências (PPG NEURO), all from Brazil, supported this work. P.M.A. and E.G.F. are PhD student on the Health and Neuroscience Program, respectively, receiving grants from the CAPES. G.M.B. and R.S.P. are graduate student receiving grant from the CNPq. R.C.D. is recipient of a research productivity fellowship from the CNPq. The authors are grateful to the ABRACE association in Paraíba - Brazil for providing the broad-spectrum CBD oil obtained from *Cannabis* sp. used in this study.

Author Contributions

RCD, NRBR, MAFB, and RC contributed to the conception and design of the experiments. MCG,

CENS, and FB contributed to the acquisition and analysis of data. EGF, GMB, and RSP contributed to the acquisition, analysis, and interpretation of data. PMA contributed to the analysis and interpretation of data; writing the manuscript with input from all authors. RC and NRBR supervised the project and revised it critically for important intellectual content.

Conflict of Interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- Ophuis RH, Olij BE, Polinder S, Haagsma JA. Prevalence of post-traumatic stress disorder, acute stress disorder and depression following violence related injury treated at the emergency department: a systematic review. *BMC Psychiatry*. 2018;18:311. doi:10.1186/s12888-018-1890-9
- Wang Z, Zhu H, Yuan M, Li Y, Qiu C, Ren Z, Yuan C, Lui S, Gong Q, Zhang W. The resting-state functional connectivity of amygdala subregions associated with post-traumatic stress symptom and sleep quality in trauma survivors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2021;271(6):1053-64. doi: 10.1007/s00406-020-01104-3
- Mann SK, Marwaha R. Posttraumatic Stress Disorder. [Updated 2021 Jul 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559129/>
- Lisieski MJ, Eagle AL, Conti AC, Liberzon I, Perrine SA. Single-Prolonged Stress: A Review of Two Decades of Progress in a Rodent Model of Post-traumatic Stress Disorder. *Front Psychiatry*. 2018;9:196. doi:10.3389/fpsy.2018.0019
- Orsolini L, Chiappini S, Volpe U, Volpe U, Berardis D, Latini R, et al. Use of medicinal cannabis and synthetic cannabinoids in post-traumatic stress disorder (PTSD): A systematic review. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55:525. doi:10.3390/medicina55090525
- Aliev G, Beeraka NM, Nikolenko VN, Svistunov AA, Rozhnova T, Kostyuk S, et al. Neurophysiology and Psychopathology Underlying PTSD and Recent Insights into the PTSD Therapies-A Comprehensive Review. *J Clin Med*. 2020;9(9):2951. doi:10.3390/jcm9092951
- Wang Z, Caughron B, Young MRI. Posttraumatic stress disorder: An immunological disorder? *Front Psychiatry*. 2017;8:222. doi:10.3389/fpsy.2017.00222
- Hori H, Kim Y. Inflammation and post-traumatic stress disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019; 73(4):143-53. doi: 10.1111/pcn.12820
- Kim TD, Lee S, Yoon S. Inflammation in post-traumatic stress disorder (PTSD): A Review of potential correlates of PTSD with a neurological perspective. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(2):107. doi:10.3390/antiox9020107
- Felger JC. Imaging the role of inflammation in mood and anxiety-related disorders. *Curr*

- Neuropharmacol. 2018;16(5):533-58. doi:10.2174/1570159X15666171123201142
11. Sareen J. Posttraumatic stress disorder in adults: impact, comorbidity, risk factors, and treatment. *Can J Psychiatry*. 2014;29:460-7. doi:10.1177/070674371405900902
 12. VA/DoD Management of Post-Traumatic Stress Working Group. VA / DoD Clinical Practice Guideline For The Management Of Posttraumatic Stress Disorder and Acute Stress Disorder. <https://www.healthquality.va.gov/guidelines/MH/ptsd/VADoDPTSDCPGFinal012418.pdf>
 13. Akiki TJ, Abdallah CG. Are there effective psychopharmacologic treatments for PTSD? *J Clin Psychiatry*. 2018;80:18ac12473. doi:10.4088/JCP.18ac12473
 14. Vimalanathan A, Gidyk DC, Diwan M, Gouveia FV, Lipsman N, Giacobbe P, et al. Endocannabinoid modulating drugs improve anxiety but not the expression of conditioned fear in a rodent model of post-traumatic stress disorder. *Neuropharmacology*. 2020;166:107965. doi:10.1016/j.neuropharm.2020.107965
 15. Botsford SL, Yang S, George TP. Cannabis and cannabinoids in mood and anxiety disorders: Impact on illness onset and course, and assessment of therapeutic potential. *Am J Addict*. 2020;29:9-26. doi:10.1111/ajad.12963
 16. Giacobbe J, Marrocu A, Di Benedetto MG, Pariante CM, Borsini A. A systematic, integrative review of the effects of the endocannabinoid system on inflammation and neurogenesis in animal models of affective disorders. *Brain Behav Immun*. 2021;93:353-67. doi: 10.1016/j.bbi.2020.12.024
 17. Maroon J, Bost J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. *Surg Neurol Int*. 2018;9:91. doi:10.4103/sni.sni_45_18
 18. Meissner H, Cascella M. Cannabidiol (CBD). In *StatPearls*, StatPearls Publishing, United States of America; 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556048/>
 19. Chen J, Hou C, Chen X, Wang D, Yang P, He X, et al. Protective effect of cannabidiol on hydrogen peroxide induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in nucleus pulposus cells. *Mol Med Rep*. 2016;14:2321-7. doi:10.3892/mmr.2016.5513
 20. Limebeer CL, Rock EM, Sharkey KA, Parker LA. Nausea-induced 5-HT release in the interoceptive insular cortex and regulation by monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibition and cannabidiol. *eNeuro*. 2018;5(4):ENEURO.0256-18. doi:10.1523/ENEURO.0256-18.2018
 21. Davies C, Bhattacharyya S. Cannabidiol as a potential treatment for psychosis. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2019;9:2045125319881916. doi:10.1177/2045125319881916
 22. Li H, Liu Y, Tian D, Tian L, Ju X, Qi L, et al. Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2020;192:112163. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112163
 23. Silvestro S, Mammama S, Cavalli E, Bramanti P, Mazzoni E. Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: Efficacy and security in clinical trials. *Molecules*. 2019;14:1459. doi:10.3390/molecules24081459
 24. Lattanzi S, Brigo F, Trinka E, Zaccara G, Striano P, Giovane CD, et al. Adjunctive Cannabidiol in Patients with Dravet Syndrome: A systematic review and meta-analysis of efficacy and safety. *CNS Drugs*. 2020;34:229-41. doi:10.1007/s40263-020-00708-6
 25. Flandreau EI, Toth M. Animal models of PTSD: A critical review. *Curr Top Behav Neurosci*. 2018;38:47-68. doi:10.1007/7854_2016_65.
 26. Deslauriers J, Toth M, Der-Avakian A, Risbrough VB. Current status of animal models of posttraumatic stress disorder: Behavioral and biological phenotypes, and future challenges in improving translation. *Biol Psychiatry*. 2018;83(10):895-907. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.11.019
 27. Verbitsky A, Dopfel D, Zhang N. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. *Transl Psychiatry*. 2020; 6;10(1):132. doi: 10.1038/s41398-020-0806-x
 28. Killkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160:1577-9. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x
 29. McGrath JC, Lilley E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP*. *Br J Pharmacol*. 2015;172:3189-93. doi:10.1111/bph.12955
 30. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Br J Pharmacol*. 2020;177:3617-24. doi:10.1111/bph.15193
 31. Kao CY, He Z, Zannas AS, Hahn O, Kühn C, Reichel JM, et al. Fluoxetine treatment prevents the inflammatory response in a mouse model of posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res*. 2016;76:74-83. doi:10.1016/j.jpsychires.2016.02.003
 32. Ariel L, Inbar S, Edut S, Richter-Levin G. Fluoxetine treatment is effective in a rat model of childhood-induced post-traumatic stress disorder. *Transl Psychiatry*. 2017;30;7(11):1260. doi: 10.1038/s41398-017-0014-5
 33. van der Kolk BA, Dreyfuss D, Michaels M, Shera D, Berkowitz R, Fislis R, et al. Fluoxetine in posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*. 1994;55(12):517-22.
 34. Martenyi F, Brown EB, Zhang H, Prakash A, Koke SC. Fluoxetine versus placebo in posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*. 2002;63(3):199-206. doi: 10.4088/jcp.v63n0305
 35. Long LE, Chesworth R, Huang XF, McGregor IS, Arnold JC, Karl T. A behavioral comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol

- in C57BL/6J Arc mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010;13:861-76. doi:10.1017/S1461145709990605
36. Moretti M, Budni J, Dos Santos DB, Antunes A, Daufenbach JF, Manosso LM, et al. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. *J Mol Neurosci*. 2013;49:68-79. doi:10.1007/s12031-012-9892-4
 37. Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimarães FS, Weffort de Oliveira RM. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;64:27-34. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.06.017
 38. Freitas AE, Bettio LE, Neis VB, Santos DB, Ribeiro CM, Rosa PB, et al. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;50:143-50. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.12.012
 39. Gáll Z, Farkas S, Albert Á, Ferencz E, Vancea S, Urkon M, et al. Effects of chronic cannabidiol treatment in the rat chronic unpredictable mild stress model of depression. *Biomolecules*. 2020;10:801. doi:10.3390/biom10050801
 40. Poleszak E, Właż P, Kedzierska E, Nieoczym D, Wyska E, Szymura-Oleksiak J, et al. Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. *Pharmacol Rep*. 2006;58:746-52.
 41. Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, Santos AA, Moretti M, et al. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol*. 2013;240:112-21. doi:10.1016/j.expneurol.2012.10.024
 42. Lu XY, Kim CS, Frazer A, Zhang W. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1593-8. doi:10.1073/pnas.0508901103
 43. Moretti M, Colla A, Balen GO, Santos DB, Bufni J, Freitas AE, et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res*. 2012;46:331-40. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.11.009
 44. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977;266:730-2. doi:10.1038/266730a0
 45. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*. 2012;7:1009-14. doi:10.1038/nprot.2012.044
 46. Quintans-Júnior LJ, Oliveira MG, Santana ME, Santana MT, Guimarães AG, Siqueira JS, et al. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. *Pharm Biol*. 2011;49:583-6. doi:10.3109/13880209.2010.529616
 47. Diaz SL, Narboux-Nême N, Boutourlinsky K, Doly S, Maroteaux L. Mice lacking the serotonin 5-HT_{2B} receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016;26:265-79. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.12.012
 48. Sulakhiya K, Patel VK, Saxena R, Dashore J, Srivastava AK, Rathore M. Effect of *Beta vulgaris* Linn. leaves extract on anxiety- and depressive-like behavior and oxidative stress in mice after acute restraint stress. *Pharmacognosy Res*. 2016;8(1):1-7. doi:10.4103/0974-8490.171100
 49. Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla A, Grando J, et al. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;103:220-9. doi:10.1016/j.pbb.2012.08.024
 50. Metna-Laurent M, Mondésir M, Grel A, Vallée M, Piazza PV. Cannabinoid-Induced Tetrad in Mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2017;80:9.59.1-9.59.10. doi:10.1002/cpns.31
 51. Vera G, Cabezas PA, Martín MI, Abalo R. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013;105:205-12. doi:10.1016/j.pbb.2013.02.008
 52. Abizaid A, Merali Z, Anisman H. Cannabis: A potential efficacious intervention for PTSD or simply snake oil? *J Psychiatry Neurosci*. 2019;44:75-8. doi:10.1503/jpn.190021
 53. Vazhayil BK, Rajagopal SS, Thangavelu T, Swaminathan G, Rajagounder E. Neuroprotective effect of *Clerodendrum serratum* Linn. leaves extract against acute restraint stress-induced depressive-like behavioral symptoms in adult mice. *Indian J Pharmacol*. 2017;49:34-41. doi:10.4103/0253-7613.201028
 54. Lezak KR, Missig G, Carlezon WA Jr. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19:181-91. doi:10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon
 55. Flandreau EI, Toth M. Animal models of PTSD: A critical review. *Curr Top Behav Neurosci*. 2018;38:47-68. doi:10.1007/7854_2016_65
 56. Zhu M, Shi J, Chen Y, Huang G, Zhu XW, Zhang S, et al. Phosphodiesterase 2 inhibitor Hcyb1 reverses corticosterone-induced neurotoxicity and depression-like behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020;237:215-3224. doi:10.1007/s00213-019-05401-1
 57. Resstel LB, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SR, Corrêa FM, Guimarães FS. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol*. 2009;156:181-8. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00046.x
 58. Belardo C, Iannotta M, Boccella S, Rubino RC, Ricciardi F, Infantino R, et al. Oral cannabidiol prevents allodynia and neurological dysfunctions in a mouse model of mild traumatic brain injury. *Front Pharmacol*. 2019;16:352. doi:10.3389/fphar.2019.00352.

59. Sales AJ, Crestani CC, Guimarães FS, Joca SRL. Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;86:255-61. doi:10.1016/j.pnpbp.2018.06.002
60. Ferber SG, Namdar D, Hen-Shoval D, Eger G, Koltai H, Shoval G, et al. The "entourage effect": terpenes coupled with cannabinoids for the treatment of mood disorders and anxiety disorders. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18:87-96. doi:10.2174/1570159X17666190903103923
61. McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*. 2012;62:3-12. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.07.014
62. Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M, Cerqueira JJ. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Front Psychiatry*. 2015;6:6. doi:10.3389/fpsy.2015.00006
63. El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, et al. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010;95:434-42. doi:10.1016/j.pbb.2010.03.004
64. Schubart CD, Sommer IE, van Gastel WA, Goetgebuuer RL, Kahn RS, Boks MP. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizophr Res*. 2011;130:216-21. doi:10.1016/j.schres.2011.04.017
65. Tai S, Fantegrossi WE. Synthetic Cannabinoids: Pharmacology, Behavioral Effects, and Abuse Potential. *Curr Addict Rep*. 2014;1:129-136. doi:10.1007/s40429-014-0014-y
66. Zagzoog A, Mohamed KA, Kim HJ, Kim ED, Frank CS, Black T, et al. In vitro and in vivo pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Sci Rep*. 2020;10:20405. doi:10.1038/s41598-020-77175-y
67. Linge R, Jiménez-Sánchez L, Campa L, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A, et al. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology*. 2016;103:16-26. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.12.017
68. Bonaccorso S, Ricciardi A, Zangani C, Chiappini S, Schifano E. Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review. *Neurotoxicology*. 2019;74:282-98. doi:10.1016/j.neuro.2019.08.002
69. Sarris J, Sinclair J, Karamacoska D, Davidson M, Firth J. Medicinal cannabis for psychiatric disorders: a clinically-focused systematic review. *BMC Psychiatry*. 2020;20:24. doi:10.1186/s12888-019-2409-8
70. Srivastava MD, Srivastava BI, Brouhard B. Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology*. 1998;40:179-85. doi:10.1016/s0162-3109(98)00041-1
71. Hegde VL, Singh UP, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Critical role of mast cells and peroxisome proliferator-activated receptor γ in the induction of myeloid-derived suppressor cells by marijuana cannabidiol in vivo. *J Immunol*. 2015;194:5211-22. doi:10.4049/jimmunol.1401844
72. Vincent L, Vang D, Nguyen J, Benson B, Lei J, Gupta K. Cannabinoid receptor-specific mechanisms to alleviate pain in sickle cell anemia via inhibition of mast cell activation and neurogenic inflammation. *Haematologica*. 2016;101:566-77. doi:10.3324/haematol.2015.136523
73. Lindqvist D, Mellon SH, Dhabhar FS, Yehuda R, Grenon SM, Flory JD, et al. Increased circulating blood cell counts in combat-related PTSD: Associations with inflammation and PTSD severity. *Psychiatry Res*. 2017;258:330-6. doi:10.1016/j.psychres.2017.08.052
74. Koraishy FM, Salas J, Neylan TC, Cohen BE, Schnurr PP, Clouston S, et al. Association of severity of posttraumatic stress disorder with inflammation: using total white blood cell count as a marker. *Chronic stress (thousand oaks)*. 2019;3:2470547019877651. doi:10.1177/2470547019877651
75. Zhang H, Ding L, Shen T, Peng D. HMGB1 involved in stress-induced depression and its neuroinflammatory priming role: a systematic review. *Gen Psychiatr*. 2019;32:e100084. doi:10.1136/gpsych-2019-100084
76. Franklin TC, Xu C, Duman RS. Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. *Brain Behav Immun*. 2018;72:2-13. doi:10.1016/j.bbi.2017.10.025
77. Wang XW, Karki A, Du DY, Zhao XJ, Xiang XY, Lu ZQ. Plasma levels of high mobility group box 1 increase in patients with posttraumatic stress disorder after severe blunt chest trauma: a prospective cohort study. *J Surg Res*. 2015;193:308-15. doi:10.1016/j.jss.2014.06.020
78. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176:1248-64. doi:10.1016/j.cell.2019.01.021
79. Wheal AJ, Jadoon K, Randall MD, O'Sullivan SE. In Vivo cannabidiol treatment improves endothelium-dependent vasorelaxation in mesenteric arteries of Zucker diabetic fatty rats. *Front Pharmacol*. 2017;18(8):248. doi:10.3389/fphar.2017.00248
80. Leishman E, Murphy M, Mackie K, Bradshaw HB. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol changes the brain lipidome and transcriptome differentially in the adolescent and the adult. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863:479-92. doi:10.1016/j.bbalip.2018.02.001

7 CONCLUSÃO

Como qualquer outro estudo, o nosso também apresenta algumas limitações, e aqui destacamos algumas delas. Primeiro, a utilização de uma faixa de dose limitada (0,1, 1, 3 e 10 mg/kg) restringiu nossa capacidade de determinar uma curva completa de dose-resposta. Isso nos impediu de identificar a dose mínima e a dose máxima eficaz, bem como de compreender melhor como os efeitos do óleo variam com a dose. Outra limitação foi a falta de avaliações em diferentes períodos após a administração do óleo de *Cannabis*. Essa lacuna dificultou a compreensão do início, do pico e da duração do efeito, informações essenciais para otimizar os regimes de dosagem. Além disso, não exploramos a possibilidade de uma combinação com a fluoxetina, um antidepressivo padrão. Essa abordagem poderia ter revelado uma potencial sinergia, oferecendo novas estratégias terapêuticas. Por fim, apesar dos resultados comportamentais promissores, eles não elucidam os mecanismos de ação do óleo de *Cannabis*. Uma investigação mais detalhada seria necessária para entender os processos biológicos envolvidos nesses efeitos.

Diante do exposto, conclui-se que o óleo de *Cannabis* de amplo espectro demonstrou eficácia em prevenir e/ou reverter padrões comportamentais relacionados a comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso desencadeados pelo estresse agudo de restrição do movimento e pelo estresse crônico de origem imprevisível combinados. Especificamente:

- O comportamento tipo-ansioso desencadeado pela restrição aguda dos movimentos foi significativamente reduzido.
- O comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico de origem imprevisível foi significativamente reduzido, conforme demonstrado pelo teste do nado forçado e pelo teste de borrifagem de sacarose.
- Não foram observadas mudanças locomotoras após a administração oral do óleo de *Cannabis* de amplo espectro.
- O óleo de *Cannabis* de amplo espectro mostrou-se seguro, não desencadeando efeitos associados à ativação dos receptores CB1 centrais, conforme avaliado pela tétrade canabinoide.

- Os resultados também sugerem o potencial do óleo de *Cannabis* para regular biomarcadores envolvidos com a inflamação e a angiogênese, embora estudos adicionais sejam necessários para investigar a relação desses marcadores com o TEPT.

REFERÊNCIAS

- AKIKI, T. J.; ABDALLAH, C. G. Are there effective psychopharmacologic treatments for PTSD?. **The Journal of clinical psychiatry**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 1309, 2019.
- AL JOWF, G. I. *et al.* To predict, prevent, and manage post-traumatic stress disorder (PTSD): A review of pathophysiology, treatment, and biomarkers. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 5238, 2023.
- ALBUQUERQUE, A. S. Caderno técnico de tratamento do transtorno de estresse pós-traumático–TEPT. **Brasília: Ministério da Justiça e Segurança Pública**, [s. l.], 2019.
- AMEDU, A. N.; DWARIKA, V. Investigating the economic burden and social support in individuals with post-traumatic stress disorder: A scoping review. **Journal of Research and Health**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 299–312, 2024.
- ANDERO, R. *et al.* Amygdala-dependent fear is regulated by Oprl1 in mice and humans with PTSD. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 5, n. 188, p. 188ra73-188ra73, 2013.
- ARIEL, L. *et al.* Fluoxetine treatment is effective in a rat model of childhood-induced post-traumatic stress disorder. **Translational psychiatry**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 1260, 2017.
- ASPESI, D.; PINNA, G. Animal models of post-traumatic stress disorder and novel treatment targets. **Behavioural pharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 2 and 3, p. 130–150, 2019.
- BALDWIN, D. S. *et al.* Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 403–439, 2014.
- BASSIR NIA, A.; BENDER, R.; HARPAZ-ROTEM, I. Endocannabinoid system alterations in posttraumatic stress disorder: a review of developmental and accumulative effects of trauma. **Chronic Stress**, [s. l.], v. 3, p. 2470547019864096, 2019.
- BENJET, C. *et al.* The epidemiology of traumatic event exposure worldwide: results from the World Mental Health Survey Consortium. **Psychological medicine**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 327–343, 2016.
- BEN-SHABAT, S. *et al.* An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 353, n. 1, p. 23–31, 1998.
- BIENVENU, T. C. M. *et al.* The advent of fear conditioning as an animal model of post-traumatic stress disorder: Learning from the past to shape the future of PTSD research. **Neuron**, [s. l.], v. 109, n. 15, p. 2380–2397, 2021.
- BISSON, J. I. *et al.* Post-traumatic stress disorder. **BMJ**, [s. l.], v. 351, p. h6161, 2015. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/351/bmj.h6161.abstract>.

BOGGS, D. L. *et al.* Clinical and preclinical evidence for functional interactions of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 142–154, 2018a.

BOGGS, D. L. *et al.* Clinical and preclinical evidence for functional interactions of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 142–154, 2018b.

BOLSONI, L. M. *et al.* The anxiolytic effect of cannabidiol depends on the nature of the trauma when patients with post-traumatic stress disorder recall their trigger event. **Brazilian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 298–307, 2022. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462022000300298&tlng=en. Acesso em: 10 nov. 2024.

BRASIL AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), M. da S. Resolução da Diretoria Colegiada–RDC nº 327, de 9 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, [s. l.], 2019.

BRIDGEMAN, M. B.; ABAZIA, D. T. Medicinal cannabis: history, pharmacology, and implications for the acute care setting. **Pharmacy and therapeutics**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 180, 2017.

BRYANT, R. A. Post-traumatic stress disorder: a state-of-the-art review of evidence and challenges. **World psychiatry**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 259–269, 2019.

BUDNI, J. *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 240, p. 112–121, 2013.

CALVI, L. *et al.* Comprehensive quality evaluation of medical Cannabis sativa L. inflorescence and macerated oils based on HS-SPME coupled to GC–MS and LC-HRMS (q-exactive orbitrap®) approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, [s. l.], v. 150, p. 208–219, 2018.

CATHER, Jennifer Clay; CATHER, J Christian. Cannabidiol primer for healthcare professionals. *In:* , 2020. **Baylor University Medical Center Proceedings**. [S. l.]: Taylor & Francis, 2020. p. 376–379

CHU, X. *et al.* 24-hour-restraint stress induces long-term depressive-like phenotypes in mice. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 32935, 2016.

CITTI, C. *et al.* Origin of Δ^9 -tetrahydrocannabinol impurity in synthetic cannabidiol. **Cannabis and cannabinoid research**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 28–39, 2021.

COÊLHO, B. M. *et al.* Correlates and prevalence of post-traumatic stress disorders in the São Paulo metropolitan area, Brazil. **Journal of Psychiatric Research**, [s. l.], v. 156, p. 168–176, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395622005386>.

DE ASSIS, P. M. *et al.* Broad-spectrum Cannabis oil alleviates behavioral symptoms associated with stress-related anxiety and depression in mice. **Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], 2021.

DESLAURIERS, J. *et al.* Current status of animal models of posttraumatic stress disorder: behavioral and biological phenotypes, and future challenges in improving translation. **Biological psychiatry**, [s. l.], v. 83, n. 10, p. 895–907, 2018.

DEVANE, W. A. *et al.* Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular pharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 605–613, 1988.

DIAZ, S. L. *et al.* Mice lacking the serotonin 5-HT_{2B} receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 265–279, 2016.

ELMES, M. W. *et al.* Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 14, p. 8711–8721, 2015.

ETEMAD, L. *et al.* Pharmacological effects of cannabidiol by transient receptor potential channels. **Life Sciences**, [s. l.], v. 300, p. 120582, 2022.

FERBER, S. G. *et al.* The “entourage effect”: terpenes coupled with cannabinoids for the treatment of mood disorders and anxiety disorders. **Current neuropharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 87–96, 2020.

FLANDREAU, E. I.; TOTH, M. Animal models of PTSD: a critical review. **Behavioral Neurobiology of PTSD**, [s. l.], p. 47–68, 2018.

FREITAS, A. E. *et al.* Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 50, p. 143–150, 2014.

GÁLL, Z. *et al.* Effects of chronic cannabidiol treatment in the rat chronic unpredictable mild stress model of depression. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 801, 2020.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American chemical society**, [s. l.], v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964.

HARVEY, B. H. *et al.* Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and restress in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 881–890, 2006.

HASPULA, D.; CLARK, M. A. Cannabinoid receptors: An update on cell signaling, pathophysiological roles and therapeutic opportunities in neurological, cardiovascular, and inflammatory diseases. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 20, p. 7693, 2020.

HILL, M. N. *et al.* Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 508–515, 2005.

HILL, M. N. *et al.* Integrating endocannabinoid signaling and cannabinoids into the biology and treatment of posttraumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 80–102, 2018.

HUANG, Z.-D. *et al.* Comparative efficacy and acceptability of pharmaceutical management for adults with post-traumatic stress disorder: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in pharmacology**, [s. l.], v. 11, p. 559, 2020.

IANNOTTI, F. A.; VITALE, R. M. The endocannabinoid system and PPARs: Focus on their signalling crosstalk, action and transcriptional regulation. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 586, 2021.

ISGOR, C. *et al.* Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. **Hippocampus**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 636–648, 2004.

KAO, C.-Y. *et al.* Fluoxetine treatment rescues energy metabolism pathway alterations in a posttraumatic stress disorder mouse model. **Complex Psychiatry**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 46–59, 2016.

KATHMANN, M. *et al.* Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [s. l.], v. 372, p. 354–361, 2006.

KILKENNY, C. *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 160, n. 7, p. 1577, 2010.

KIM, H. J. J. *et al.* Impact of the mouse estrus cycle on cannabinoid receptor agonist-induced molecular and behavioral outcomes. **Pharmacology research & perspectives**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e00950, 2022.

LANCASTER, C. L. *et al.* Posttraumatic stress disorder: overview of evidence-based assessment and treatment. **Journal of clinical medicine**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 105, 2016.

LARSEN, C.; SHAHINAS, J. Dosage, efficacy and safety of cannabidiol administration in adults: a systematic review of human trials. **Journal of clinical medicine research**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 129, 2020.

LAZARJANI, M. P. *et al.* Processing and extraction methods of medicinal cannabis: A narrative review. **Journal of cannabis research**, [s. l.], v. 3, p. 1–15, 2021.

LEE, K. H.; LEE, D. W.; KANG, B. C. The 'R' principles in laboratory animal experiments. **Laboratory Animal Research**, [s. l.], v. 36, p. 1–3, 2020.

LINGE, R. *et al.* Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT_{1A} receptors. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 103, p. 16–26, 2016.

LONG, L. E. *et al.* A behavioural comparison of acute and chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 861–876, 2010.

LOWE, H. *et al.* The endocannabinoid system: a potential target for the treatment of various diseases. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 17, p. 9472, 2021.

LU, X.-Y. *et al.* Leptin: a potential novel antidepressant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 5, p. 1593–1598, 2006.

LU, H.-C.; MACKIE, K. Review of the endocannabinoid system. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 607–615, 2021.

LYNSKEY, M. T. *et al.* Medicinal cannabis for treating post-traumatic stress disorder and comorbid depression: real-world evidence. **BJPsych Open**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e62, 2024. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/F88B15F3E00576E757ADF4915F9874A6>.

MAERCKER, A. *et al.* Diagnosis and classification of disorders specifically associated with stress: Proposals for ICD-11. **World Psychiatry**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 198–206, 2013.

MANGO, S. *et al.* Assessment of clinical outcomes of medicinal cannabis therapy for depression: analysis from the UK Medical Cannabis Registry. **Expert Review of Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 22, n. 11–12, p. 995–1008, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737175.2022.2161894>.

MANN, S. K.; MARWAHA, R. **Posttraumatic Stress Disorder**. [S. l.]: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

MARTENYI, F. *et al.* Fluoxetine versus placebo in posttraumatic stress disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 199–206, 2002.

MARTÍNEZ-AGUIRRE, C. *et al.* Cannabidiol acts at 5-HT_{1A} receptors in the human brain: relevance for treating temporal lobe epilepsy. **Frontiers in behavioral neuroscience**, [s. l.], v. 14, p. 611278, 2020.

MAZZETTI, C. *et al.* Quantification of the content of cannabidiol in commercially available e-liquids and studies on their thermal and photo-stability. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 3697, 2020.

MCGRATH, J. C.; LILLEY, E. **Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP**. [S. l.]: Wiley Online Library, 2015.

METNA-LAURENT, M. *et al.* Cannabinoid-induced tetrad in mice. **Current protocols in neuroscience**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 9–59, 2017.

MIAO, X.-R. *et al.* Posttraumatic stress disorder: from diagnosis to prevention. **Military Medical Research**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 32, 2018.

MILLAR, S. A. *et al.* Towards better delivery of cannabidiol (CBD). **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 219, 2020.

MITRA, R. *et al.* Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 26, p. 9371–9376, 2005.

MOLENDIJK, M. L.; DE KLOET, E. R. Forced swim stressor: Trends in usage and mechanistic consideration. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 55, n. 9–10, p. 2813–2831, 2022.

- MOLINA, P.; ANDERO, R.; ARMARIO, A. Restraint or immobilization: a comparison of methodologies for restricting free movement in rodents and their potential impact on physiology and behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], p. 105224, 2023.
- MOORE, C. F.; WEERTS, E. M. Cannabinoid tetrad effects of oral Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in male and female rats: sex, dose-effects and time course evaluations. **Psychopharmacology**, [s. l.], p. 1–12, 2022.
- MORCUENDE, A. *et al.* Immunomodulatory role of CB2 receptors in emotional and cognitive disorders. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 13, p. 866052, 2022.
- MORETTI, M. *et al.* Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of psychiatric research**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 331–340, 2012.
- MORETTI, M. *et al.* Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 49, p. 68–79, 2013.
- MUHIE, S. *et al.* Molecular signatures of post-traumatic stress disorder in war-zone-exposed veteran and active-duty soldiers. **Cell Reports Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 5, 2023.
- MURKAR, A. *et al.* Cannabidiol and the remainder of the plant extract modulate the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on fear memory reconsolidation. **Frontiers in behavioral neuroscience**, [s. l.], v. 13, p. 174, 2019.
- PAES-COLLI, Y. *et al.* Phytocannabinoids and cannabis-based products as alternative pharmacotherapy in neurodegenerative diseases: From hypothesis to clinical practice. **Frontiers in cellular neuroscience**, [s. l.], v. 16, p. 917164, 2022.
- PERCIE DU SERT, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 1769–1777, 2020.
- PINNA, G. Animal models of PTSD: the socially isolated mouse and the biomarker role of allopregnanolone. **Frontiers in behavioral neuroscience**, [s. l.], v. 13, p. 114, 2019.
- POLESZAK, E. *et al.* Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. **Pharmacological reports**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 746, 2006.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *et al.* α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. **Pharmaceutical biology**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 583–586, 2011.
- RESSTEL, L. B. M. *et al.* 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 181–188, 2009.
- RICHTER-LEVIN, G.; STORK, O.; SCHMIDT, M. V. Animal models of PTSD: a challenge to be met. **Molecular psychiatry**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1135–1156, 2019.

ROCK, E. M.; PARKER, L. A. Constituents of Cannabis sativa. **Cannabinoids and neuropsychiatric disorders**, [s. l.], p. 1–13, 2021.

SCHIAVON, A. P. *et al.* Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 64, p. 27–34, 2016.

SCHOLL, J. L. *et al.* Current Understanding of Biomarkers in Post Traumatic Stress Disorder and Mild Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Implications for Research and Treatment. **Stress-Related Disorders**, [s. l.], 2022.

SHALEV, A.; LIBERZON, I.; MARMAR, C. Post-traumatic stress disorder. **New England journal of medicine**, [s. l.], v. 376, n. 25, p. 2459–2469, 2017.

SULAKHIYA, K. *et al.* Effect of Beta vulgaris Linn. leaves extract on anxiety-and depressive-like behavior and oxidative stress in mice after acute restraint stress. **Pharmacognosy research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1, 2016.

TÖRÖK, B. *et al.* Modelling posttraumatic stress disorders in animals. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 90, p. 117–133, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584618304524>.

VAN DER KOLK, B. A. *et al.* Fluoxetine in posttraumatic stress disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, [s. l.], v. 55, n. 12, p. 517–522, 1994.

VERBITSKY, A.; DOPFEL, D.; ZHANG, N. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. **Translational psychiatry**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 132, 2020a.

VERBITSKY, A.; DOPFEL, D.; ZHANG, N. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. **Translational psychiatry**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 132, 2020b.

WANG, X. *et al.* Different receptor mechanisms underlying phytocannabinoid-versus synthetic cannabinoid-induced tetrad effects: Opposite roles of CB1/CB2 versus GPR55 receptors. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 177, n. 8, p. 1865–1880, 2020.

WILLNER, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 677–690, 1986.

YANG, S.; WYNN, G. H.; URSANO, R. J. A clinician's guide to PTSD biomarkers and their potential future use. **Focus**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 143–152, 2018.

YE, L. *et al.* New insights in cannabinoid receptor structure and signaling. **Current molecular pharmacology**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 239–248, 2019.

YEHUDA, R. *et al.* Post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 15057, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.57>.

YEHUDA, R. *et al.* Post-traumatic stress disorder. **Nature reviews Disease primers**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–22, 2015b.

ZLEBNIK, N. E.; CHEER, J. F. Drug-induced alterations of endocannabinoid-mediated plasticity in brain reward regions. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 36, n. 40, p. 10230–10238, 2016.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 833, 2018.

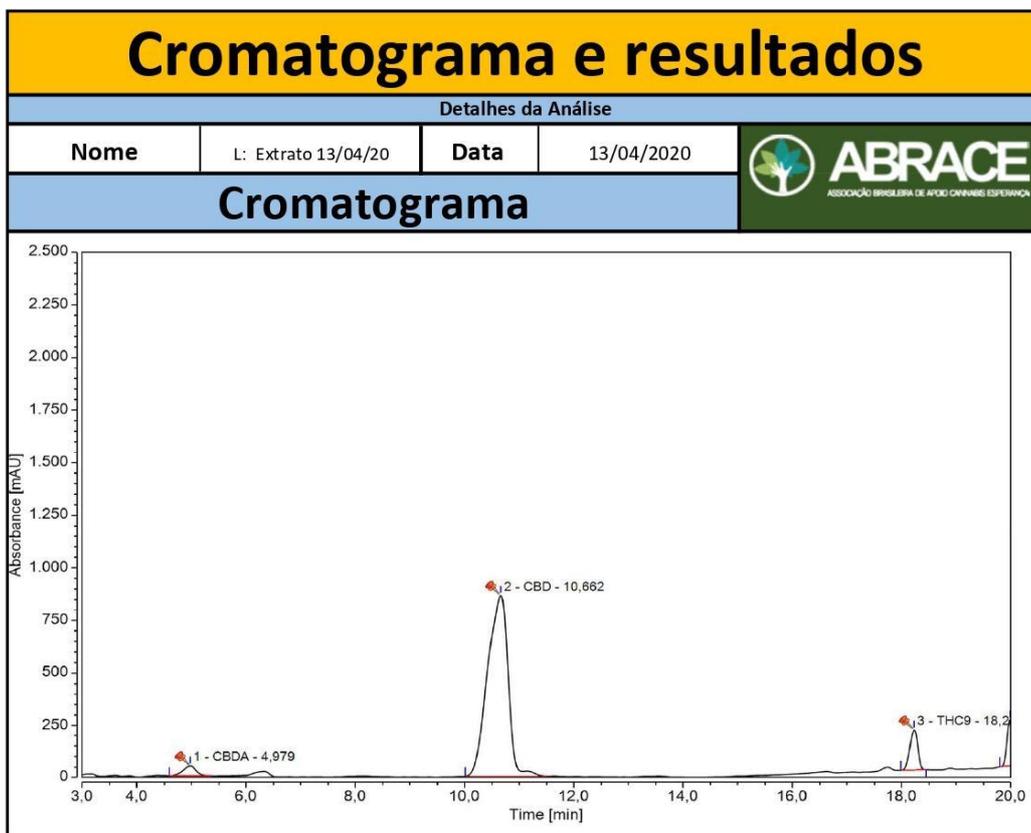
ANEXO I - Critérios DSM-5 para TEPT

Critério	Descrição	Exemplos específicos	Requisito
Critério A	Exposição ao trauma	<ul style="list-style-type: none"> • Exposição direta • Testemunhando o trauma • Ouvir sobre o trauma • Repetição ou exposição indireta extrema a detalhes aversivos 	O DSM-5 reconhece que a exposição ao evento traumático extremo pode ocorrer tanto indireta quanto diretamente
Critério B	Revivência do trauma	<ul style="list-style-type: none"> • Memórias recorrentes • Pesadelos traumáticos • Reações dissociativas • Sofrimento psicológico em lembranças traumáticas • Reatividade psicológica evidente em lembranças 	Ao menos um destes cinco eventos são requisitados
Critério C	Esquiva persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Pensamentos ou sentimentos relacionados ao trauma • Lembretes externos relacionados ao trauma, como pessoas, lugares ou atividades 	Ao menos um destes dois eventos são requisitados
Critério D	Alterações negativas de	<ul style="list-style-type: none"> • Amnésia dissociativa • Crenças e expectativas negativas persistentes 	Ao menos dois destes sete eventos são requisitados

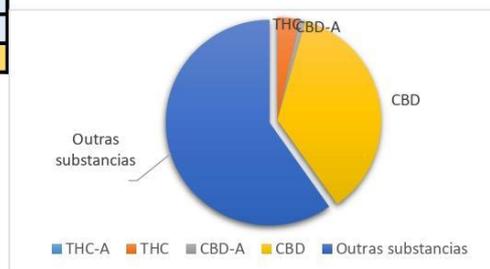
	cognição e humor	<ul style="list-style-type: none"> • Culpa persistente distorcida de si ou de outros por causar trauma • Emoções negativas relacionadas ao trauma: medo, horror, culpa, vergonha e raiva • Diminuição do interesse pelas atividades • Desapego ou afastamento dos outros • Incapacidade de experimentar emoções positivas 	
Critério E	Alterações de excitação e reatividade	<ul style="list-style-type: none"> • Comportamento irritante e agressivo • Comportamento autodestrutivo e imprudente • Hipervigilância • Sobressalto exagerado • Problemas de concentração • Distúrbios de sono 	Ao menos dois destes seis eventos são requisitados
Critério F	Duração	Critérios B, C, D e F devem ser experienciados por mais de um mês	Transtorno de estresse agudo é diagnosticado para sintomas que ocorrem por menos de um mês após trauma
Critério G	Significado funcional	Prejuízo nos domínios social, ocupacional ou outros	Prejuízo em pelo menos um desses domínios é requisitado
Critério H	Exclusão	Sintomas não são atribuídos ao uso de medicamentos, substâncias de abuso ou outra enfermidade	Sintomas não devem ser secundários a outras causas

Fonte: Adaptado de (YEHUDA et al., 2015).DSM-5, Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais – 5ª edição; TEPT, transtorno do estresse pós-traumático.

ANEXO II – Análise cromatográfica



Resultados			
Substância	Concentração (mg/g)	% (planta)	Proporção CBD/THC
THC-A	0,00	0,0%	11:1
THC	34,60	3,5%	
CBD-A	8,54	0,9%	
CBD	359,06	35,9%	
CBN	0,00	0,0%	
THC total	34,6	3,5%	
CBD total	367,6	36,8%	
Canabinóides total	402,2	40,2%	



Quantidades de Fitocannabinóides por produto						
Garrafas de 100 mL						
Valor total	0,5% (mg)	mg/mL	1% (mg)	mg/mL	2% (mg)	mg/mL
THC-A	0,0	0	0,0	0	0,0	0
THC	17,3	0,1729905	34,6	0,345981	69,2	0,691962
CBD-A	4,3	0,042691	8,5	0,085382	17,1	0,170764
CBD	179,5	1,7952965	359,1	3,590593	718,1	7,181186
THC total	17,3	0,1729905	34,6	0,345981	69,2	0,691962
CBD total	183,8	1,8379875	367,6	3,675975	735,2	7,35195

Garrafas de 60 mL						
Valor total	0,5% (mg)	mg/mL	1% (mg)	mg/mL	2% (mg)	mg/mL
THC-A	0,0	0	0,0	0	0,0	0
THC	10,5	0,1729905	21,0	0,345981	41,9	0,691962
CBD-A	2,6	0,042691	5,2	0,085382	10,3	0,170764
CBD	108,8	1,7952965	217,6	3,590593	435,2	7,181186
THC total	10,5	0,1729905	21,0	0,345981	41,9	0,691962
CBD total	111,4	1,8379875	222,8	3,675975	445,6	7,35195

Spray 25 mL		
Valor total	0,5% (mg)	mg/mL
THC-A	0	0
THC	4,3247625	0,1729905
CBD-A	1,067275	0,042691
CBD	44,882413	1,7952965
THC total	4,3247625	0,1729905
CBD total	45,949688	1,8379875

Vaporizador 10 mL		
Valor total	6% (mg)	mg/mL
THC-A	0	0
THC	20,75886	2,075886
CBD-A	5,12292	0,512292
CBD	215,43558	21,543558
THC total	20,75886	2,075886
CBD total	220,5585	22,05585

Pomadas				
Valor total	3% (15g)	mg/g	3% (30g)	mg/g
THC-A	0	0	0	0
THC	15,57	1,038	31,14	1,038
CBD-A	3,843	0,2562	7,686	0,2562
CBD	161,577	10,7718	323,154	10,7718
THC total	15,57	1,038	31,14	1,038
CBD total	165,42	11,028	330,84	11,028

0,5% = 5mg/mL
1% = 10mg/mL
2% = 20mg/mL

Caetano Espinola Neto Siqueira

Farmacêutico Responsável Técnico

ANEXO III – Análise microbiológica



ortofarma.com.br



Laboratório de ensaios acreditado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025

O escopo da acreditação pode ser visto em: <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL0513.pdf>

Relatório de Ensaios OrtoFarma Nº 8014/20-1

Revisão 00

Cliente Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança **Telefone** (32) 98507-3044
Endereço Rua José Vanildo de Oliveira, 170, Cristo Redentor, João Pessoa-PB, CEP 58070-480 **Contato(s)**
e-Mail(s) murilo.gouvea@hotmail.com **CNPJ/CPF** 23.877.015/0001-38
Amostra(s) Produto para Microbiologia **Recepção** 12/05/20

Amostra	Solução Oleosa de Canabidiol 15mg/mL	Código	8014/20-01	Coleta em	NA
Fornecedor	Não se aplica	Lote		S01.6	
Quantidade de amostra	2 x 60 mL	Data de fabricação		26/03/2020	
Data de validade	6 meses				

Ensaio	Resultado	Unidade	Limite aceitável (L1)	LQ	Método	Data do Ensaio
Contagem de bolores e leveduras pelo método de profundidade (RBLE)	<1,0 x 10	UFC/mL	Máx. 10 ² UFC/mL	1,0 UFC	F. Bras., 6ª ed., 2019, volume 1, método 5.5.3.1.2	14/05/20
Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos pelo método de profundidade (RBLE)	<1,0 x 10	UFC/mL	Máx. 10 ² UFC/mL	1,0 UFC	F. Bras., 6ª ed., 2019, Volume 1, método 5.5.3.1.2	14/05/20
<i>Escherichia coli</i> : Pesquisa de micro-organismos patogênicos pela técnica de Pre/Aus. (RBLE)	Ausente	/mL	Ausência em 1mL	--	F. Bras., 6ª ed., 2019, Volume 1, método 5.5.3.1.3	14/05/20
<i>Salmonella sp.</i> : Pesquisa de micro-organismos patogênicos pela técnica de Pre/Aus. (RBLE)	Ausente	/10mL	Ausência em 10mL	--	F. Bras., 6ª ed., 2019, Volume 1, método 5.5.3.1.3	14/05/20
<i>Staphylococcus aureus</i> : Pesquisa de micro-organismos patogênicos pela técnica de Pre/Aus. (RBLE)	Ausente	/mL	Ausência em 1mL	--	F. Bras., 6ª ed., 2019, Volume 1, método 5.5.3.1.3	14/05/20

Os pareceres, interpretações e opiniões expressos não fazem parte do escopo do sistema de qualidade deste laboratório.

Conclusão dos Ensaios: Amostra de acordo com o padrão legal vigente para os ensaios acima descritos, conforme parâmetros analisados.

Legenda

(L1): Produto de origem vegetal para uso oral, com insumo ativo que foi submetido a pré-tratamento que reduz a carga microbiana - Farmacopeia Brasileira 6ª edição, p.413, 2019.

(RBLE): Ensaio acreditado. Laboratório de Ensaio acreditado pela Cgcre de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob o número CRL 0513.

UFC: Unidade formadora de colônia.

NA: Não se aplica.

LQ: Limite de Quantificação.

Observações

Os resultados somente se referem aos itens ensaiados e são restritos à amostra recebida na OrtoFarma. A reprodução deste documento somente poderá ser feita integralmente e com aprovação prévia e por escrito da mesma. A definição do ponto de coleta/plano de amostragem é de exclusiva responsabilidade do cliente.

Ensaios realizados: instalações permanentes da OrtoFarma Laboratório de Controle da Qualidade LTDA.

Informações de Coleta

Coleta efetuada pelo cliente.

Matias Barbosa, 19 de maio de 2020 (data de emissão).

Paulo Vitor Cardoso Araujo
Biomédico
CRBM 12950
Microbiologia

Documento verificado e aprovado por meios eletrônicos

A verificação da autenticidade deste documento pode ser feita baixando o documento original em www.Labwin.net/OrtoFarma usando o código LUQDZ C.JZ 490.

RF-LBW-004, Rev. 00

Página: 1/1

OrtoFarma Laboratório de Controle de Qualidade Ltda
CRF-MG: 18266 | CNPJ: 20.796.741/0001-98
BR 040 KM 420, N. 591 FARM. SUL CEP: 55120-000 - MATIAS BARBOSA - MG
CAIXA POSTAL 20.005 | CEP: 58019-970 ☎ +55 32 3273-5560 FAX: +55 32 3273-5532



Relatório de Ensaios OrtoFarma N° 8014/20-2

Revisão 00

Cliente Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança **Telefone** (32) 98507-3044
Endereço Rua José Vanildo de Oliveira, 170, Cristo Redentor, João Pessoa-PB, CEP 58070-480 **Contato(s)**
e-Mail(s) murilo.gouvea@hotmail.com **CNPJ/CPF** 23.877.015/0001-38
Amostra(s) Produto para Microbiologia **Recepção** 12/05/20

Os Resultados relatados abaixo não fazem parte do escopo da acreditação deste Laboratório

Amostra	Solução Oleosa de Canabidiol 15mg/mL	Código	8014/20-01	Coleta em	NA
Fornecedor	Não se aplica	Lote	S01.6		
Quantidade de amostra	2 x 60 mL	Data de fabricação	26/03/2020		
Data de validade	6 meses				

Ensaio	Resultado	Unidade	Limite aceitável (L1)	LQ	Método	Data do Ensaio
Bactérias Gram-negativas bile tolerantes: Pesq. de micro-organismos patogênicos pela téc. Pre/Aus	<1,0 x 10	UFC/mL	Máx. 10 ² UFC/mL	1,0 UFC	F. Bras., 6ª ed., 2019, Volume 1, método 5.5.3.1.3	14/05/20

Os pareceres, interpretações e opiniões expressos não fazem parte do escopo do sistema de qualidade deste laboratório.

Conclusão dos Ensaios: Amostra de acordo com o padrão legal vigente para o ensaio acima descrito, conforme parâmetro analisado.

Legenda

(L1): Produto de origem vegetal para uso oral, com insumo ativo que foi submetido a pré-tratamento que reduz a carga microbiana - Farmacopeia Brasileira 6ª edição, p.413, 2019.

UFC: Unidade formadora de colônia.

NA: Não se aplica.

LQ: Limite de Quantificação.

Observações

Os resultados somente se referem aos itens ensaiados e são restritos à amostra recebida na OrtoFarma. A reprodução deste documento somente poderá ser feita integralmente e com aprovação prévia e por escrito da mesma. A definição do ponto de coleta/plano de amostragem é de exclusiva responsabilidade do cliente.

Ensaios realizados: instalações permanentes da OrtoFarma Laboratório de Controle da Qualidade LTDA.

Informações de Coleta

Coleta efetuada pelo cliente.

Matias Barbosa, 19 de maio de 2020 (data de emissão).



Paulo Vitor Cardoso Araujo
Biomédico
CRBM 12950
Microbiologia

Documento verificado e aprovado por meios eletrônicos

A verificação da autenticidade deste documento pode ser feita baixando o documento original em www.Labwin.net/OrtoFarma usando o código LUQZ C.JZ 490.

ANEXO IV – Certificado do CEUA



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do efeito de fitocanabinoides e ligantes canabimiméticos em modelos de dor crônica não inflamatória e transtornos de humor", protocolada sob o CEUA nº 7176240920 (ID 001730), sob a responsabilidade de **Rafael Cypriano Dutra e equipe; Eduarda Gomes Ferrarini; Elaine Cristina Dalazen Gonçalves; Alexandre Augusto Barros Lataliza; Gabriela Mantovani Baldasso; Rodrigo Sebben Paes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 08/12/2020.

We certify that the proposal "Investigation of the effect of phytocannabinoids and cannabimimetic ligands in chronic non-inflammatory pain and mood disorders models", utilizing 1248 Heterogenics mice (624 males and 624 females), protocol number CEUA 7176240920 (ID 001730), under the responsibility of **Rafael Cypriano Dutra and team; Eduarda Gomes Ferrarini; Elaine Cristina Dalazen Gonçalves; Alexandre Augusto Barros Lataliza; Gabriela Mantovani Baldasso; Rodrigo Sebben Paes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/08/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **12/2020 a 11/2024** Área: **Ciências da Saúde**

Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos	idade:	60 a 120 dias	N:	624
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	25 a 50 g		
Linhagem:	Camundongos Swiss						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 120 dias	N:	624
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	25 a 50 g		
Linhagem:	Camundongos Swiss						

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF).

Florianópolis, 08 de dezembro de 2020

Maurício Laterça Martins
Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina