

João Menéres Borges Nunes Hall

O papel do sistema endocanabinóide no controlo da dor neuropática.

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

João Menéres Borges Nunes Hall

O papel do sistema endocanabinoide no controlo da dor neuropática.

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

O papel do sistema endocanabinóide no controlo da dor neuropática.

João Menéres Borges Nunes Hall

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Professor Doutor João Paulo Soares Capela

Sumário

A utilização terapêutica da *Cannabis sativa*, desde a antiguidade, encontra-se bem documentada e foram-lhe desde sempre atribuídas propriedades curativas. Com a evolução da química e da medicina foi estudada de forma mais exaustiva esta planta, de forma a entender melhor a sua constituição química, o que levou à descoberta das substâncias ativas da planta. Posteriormente, descobriu-se um sistema canabinóide endógeno humano onde essas substâncias atuam por meio de recetores próprios.

Foram também descobertos ligandos endógenos com afinidade para esses recetores, denominados então de endocanabinóides, e compreendida a sua síntese e degradação, e as suas vias de sinalização. Essas descobertas levaram ao conhecimento atual do sistema endocanabinóide.

Esta revisão teve como objetivo compreender as bases mecânicas do sistema endocanabinóide e a sua relação com a dor neuropática, com recurso a ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos aleatorizados de duração superior a 2 semanas.

Foi efetuada uma análise ao número de publicações indexadas no “Pubmed” entre 1970 e 2018, com a pesquisa das palavras “cannabinoid in therapeutic” que demonstrou o crescente número de publicações sobre esta temática nos últimos anos.

Investigações pré-clínicas e clínicas vieram elucidar a relação deste sistema com as mais diversas patologias, entre elas a dor neuropática, contudo, nem sempre com resultados concordantes entre si.

Os resultados obtidos nos ensaios clínicos efetuados com substâncias que atuam no sistema endocanabinóide no âmbito da dor neuropática incluídos nesta revisão, demonstram o interesse em continuar a investigar esta ligação. No entanto, devido à discordância entre os ensaios, há a necessidade de serem efetuados ensaios de maior dimensão e duração para aferir a segurança e eficácia destes fármacos no tratamento da dor neuropática.

Palavras-chave: Sistema endocanabinóide; Canabinóides; Endocanabinóides; Recetores canabinóides; Dor neuropática; *Cannabis*; THC; Sativex®; Nabilona.

Abstract

The therapeutic use of *Cannabis sativa*, since antiquity, has been well documented and has always been attributed to healing properties. With the evolution of chemistry and medicine, this plant was studied in a more exhaustive way, in order to better understand its chemical constitution, which led to the discovery of the active substances of the plant. Subsequently, a human endogenous cannabinoid system was discovered where these substances would act through their own receptors.

Endogenous ligands with affinity for these receptors, then referred to as endocannabinoids, have been discovered, including their synthesis and degradation, and their signaling pathways. These findings led to the current knowledge of the endocannabinoid system.

This review aimed to understand the mechanistic bases of the endocannabinoid system and its relation to neuropathic pain, using pre-clinical trials and randomized clinical trials lasting more than 2 weeks.

An analysis was made of the number of publications indexed in Pubmed between 1970 and 2018, with the search for the words "cannabinoid in therapeutic", which demonstrated the growing number of publications on this subject in recent years.

Preclinical and clinical investigations have elucidated the relation of this system to the most diverse pathologies, among them neuropathic pain, however, not always with concordant results among them.

The results obtained in the clinical trials carried out with substances that act on the endocannabinoid system in the context of neuropathic pain included in this review, demonstrate the interest in continuing to investigate this connection. However, due to the disagreement between the trials, it is necessary to carry out tests of a larger size and duration to assess the safety and efficacy of these drugs in the treatment of neuropathic pain.

Key words: Endocannabinoid system; Cannabinoids; Endocannabinoids; Cannabinoid Receptors; Neuropathic pain; *Cannabis*; THC; Sativex®; Nabilone

Índice

Sumário.....	i
Abstract.....	ii
Índice de figuras.....	iv
Lista de abreviaturas.....	v
Introdução.....	1
I. Metodologia.....	3
II. Perspetiva histórica.....	4
III. Uso recreativo da <i>Cannabis sativa</i>	6
IV. Descoberta do Sistema Endocanabinóide.....	7
V. Síntese e inativação dos endocanabinóides.....	10
V.I. Anandamida.....	10
V.II. 2-Araquidonilglicerol.....	12
VI. Recetores canabinóides.....	15
VII. Vias de sinalização.....	18
VIII. Sistema endocanabinóide e dor neuropática.....	20
IX. Evidência clínica da eficácia dos fármacos canabinóides no tratamento da dor neuropática.....	26
Conclusão.....	31
Bibliografia.....	33

Índice de Figuras

Figura 1: Número de publicações indexadas na base de dados “Pubmed” entre 1970 e 2018 com a pesquisa das palavras “cannabinoid in therapeutic”.

Figura 2: Estrutura química do canabinol (I), canabidiol (II) e tetrahydrocannabinol (III).

Figura 3: Estrutura química da anandamida.

Figura 4: Estrutura química do 2-araquidonilglicerol.

Figura 5: Biossíntese e inativação dos endocanabinóides.

Figura 6: Principais funções associadas ao CB₁ na fisiologia humana (Adaptado de Zou *et al.*, 2018).

Figura 7: Sinalização endocanabinóide na sinapse (Adaptado de Castillo *et al.*, 2012).

Figura 8: Visão geral da terapêutica da dor e diretrizes utilizadas no seu tratamento (Adaptado de Guerrero-Alba *et al.*, 2019).

Figura 9: Papel do sistema endocanabinóide no controle da dor neuropática ao nível periférico, espinal e supraespinal (Adaptado de Maldonado *et al.*, 2016).

Lista de Abreviaturas

2-AG – 2-Araquidonilglicerol

AC – Adenilciclase

AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina

ATP – Adenosina trifosfato

CB₁ – Recetor canabinóide 1

CB₂ – Recetor canabinóide 2

CBD – Canabidiol

FAAH – Hidrolase de amidas de ácidos gordos

GPCR – Recetor acoplado à proteína G

IUPHAR – The International Union of Basic and Clinical Pharmacology

MAGL – Monoacil glicerol lipase

NArPE - N-araquidonil-fosfatidiletanolamina

NRS – *Numeric Rating Scale*

PKA – Proteína cínase A

PPAR – Recetores ativados por proliferadores de peroxissoma

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

THC – Tetrahydrocannabinol

TRP – Recetores de potencial transitório

TRPV₁ – Recetores de potencial transitório vanilóide tipo 1

TRPV₄ – Recetores de potencial transitório vanilóide tipo 4

VAS – *Visual Analogue Scale*

Introdução

Juntamente com a sua história de uso recreativo e medicinal, o interesse pela *Cannabis sativa* tem vindo a ser demonstrado com as atuais investigações para as mais diversas e crescentes aplicações terapêuticas, embora em grande parte anedóticas. Quando no século XX se identificaram os primeiros constituintes químicos da planta houve esforços crescentes para entender o mecanismo de ação dos mesmos e a sua interação com a fisiologia humana (Di Marzo, 2018).

Mais tarde, foram descobertos recetores específicos para os canabinóides e ligandos endógenos, denominados endocanabinóides, para estes recetores. Foram também identificadas as enzimas que estariam envolvidas no metabolismo destes endocanabinóides e também transportadores específicos. Estes endocanabinóides, os seus recetores e as suas vias metabólicas deram origem ao que hoje se conhece como sistema endocanabinóide (Di Marzo, 2018).

Posteriormente, alterações na sinalização, concentrações teciduais de endocanabinóides modificadas e alteração na expressão dos recetores canabinóides foram encontradas associadas a diversas patologias o que levou a um esforço em tentar modular este sistema com vista a obter resultados terapêuticos. Atualmente sabe-se que o sistema endocanabinóide desempenha um papel fundamental no controlo da dor e na sua fisiopatologia (Di Marzo, 2018; Maldonado *et al.*, 2016).

O interesse em perceber a relação entre o sistema endocanabinóide e a dor neuropática prende-se pelo facto de este tipo de dor, para além de ser uma condição complicada que diminui bastante a qualidade de vida, também está associada a um grande custo económico e a uma menor produtividade laboral. Os mecanismos fisiopatológicos da dor neuropática são complexos e existe atualmente uma falha de eficácia na terapêutica deste tipo de dor, o que leva à necessidade de descobrir novas estratégias terapêuticas para este tipo de dor (Donvito *et al.*, 2017; Maldonado *et al.*, 2016).

A realização deste trabalho de revisão prende-se pelo facto de as peculiaridades desta patologia serem múltiplas, nomeadamente pela sua complexidade e limitações terapêuticas, sendo esta abordagem ao sistema endocanabinóide uma possível nova visão de como intervir na fisiopatologia da doença.

Variadíssimas investigações pré-clínicas revelam o papel do sistema endocanabinóide na fisiopatologia da dor neuropática e demonstram a eficácia da modulação do sistema endocanabinóide em modelos de dor neuropática. Estes estudos pré-clínicos utilizam principalmente ratinhos geneticamente modificados com mutações seletivas em componentes específicos do sistema endocanabinóide e moléculas que modifiquem a atividade deste sistema. Em relação às pesquisas clínicas também têm sido observados resultados positivos na dor neuropática, ainda que a maioria dos ensaios clínicos tenham limitações e seja necessário realizar mais ensaios de melhor qualidade (Donvito *et al.*, 2017; Maldonado *et al.*, 2016).

Também é necessário ultrapassar a barreira do perfil de segurança muitas vezes associado negativamente ao uso recreativo da *Cannabis*. Existem preocupações crescentes sobre a segurança destas moléculas em uso crónico, nomeadamente pelo risco de dependência, transtornos psíquicos, entre outros problemas possíveis. Contudo, os ensaios realizados demonstram que os efeitos adversos não são mais graves do que os outros analgésicos utilizados e são maioritariamente transitórios (Maldonado *et al.*, 2016).

No decorrer desta revisão irá ser abordado do ponto de vista histórico, fisiológico e mecanicista o sistema endocanabinóide, e posteriormente as moléculas que intervêm nesse sistema com as suas eventuais potencialidades terapêuticas na dor neuropática com recurso a ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos aleatorizados de duração igual ou superior a 2 semanas.

I. Metodologia

Esta dissertação assenta numa revisão bibliográfica que teve como objetivo apresentar o estado do conhecimento atual do sistema endocanabinóide e o seu papel no controlo da dor neuropática, do ponto de vista mecanicista e clínico.

A elaboração deste trabalho teve por base os resultados de uma pesquisa bibliográfica, desde outubro de 2018 a junho de 2019, com recurso a bases de dados científicos como o PubMed, Science Direct e motores de busca como o Google Académico. Os artigos selecionados vão desde 1899 (pelo seu conteúdo histórico relevante) até 2019, e foram selecionados com base nas seguintes palavras-chave: Endocannabinoid system; Cannabinoids; Endocannabinoids; Cannabinoid Receptors; Neuropathic pain; *Cannabis*; THC; Sativex®; Nabilone.

II. Perspetiva Histórica

A *Cannabis sativa* foi uma das primeiras plantas a ser cultivadas e utilizadas pelo Homem, contudo a sua origem não reúne consenso. Embora se aponte para a sua origem asiática as referências são muito dispersas na literatura histórica e precisam de ser organizadas e melhor analisadas para eventualmente se definir uma origem etnobotânica para a planta (Li, 1974).

Foi relatado o uso de *cannabis* na China desde o período neolítico, há cerca de 6000 anos, onde era uma importante fonte de fabrico de fibras, de cordas, redes de pesca, papel e tecidos de todos os tipos. A sua semente foi usada para consumo alimentar e o seu óleo para fritar alimentos (Li, 1974).

O uso terapêutico da *cannabis sativa* data de 2737 aC, na mais antiga farmacopeia, Pents'ao ching, escrita pelo imperador chinês Shen Nung. Desde essa época foram atribuídos vários efeitos terapêuticos à *cannabis*, alguns confirmados atualmente, sem que se pudesse imaginar que existiria um sistema endocanabinóide a nível fisiológico e qual o mecanismo de ação inerente aos constituintes da planta na fisiopatologia das doenças (Dach *et al.*, 1950).

Em 1938 foi descrito pela primeira vez na literatura médica ocidental o uso clínico da *cannabis*, pelo médico irlandês William Brooke O'Shaughnessy, após uma publicação sobre o uso da *cannabis* no tratamento de reumatismo, cólera, tétano e convulsões, no Bengal Medical Journal (Brown, 1998).

Desde finais do século XX até aos dias de hoje, as potencialidades clínicas da *cannabis* têm sido cada vez mais estudadas. Diversos fármacos à base de canabinóides naturais e sintéticos foram, entretanto, aprovados (alguns revogados posteriormente) em todo o mundo para os mais diversos fins (Fonseca *et al.*, 2013).

Após uma análise efetuada ao número de publicações indexadas no “Pubmed” entre 1970 e 2018, com a pesquisa das palavras “cannabinoid in therapeutic”, pode-se verificar que o número de publicações relativas ao uso terapêutico de canabinóides desde 2010 até 2018 quase duplicou, como se pode observar na Figura 1.

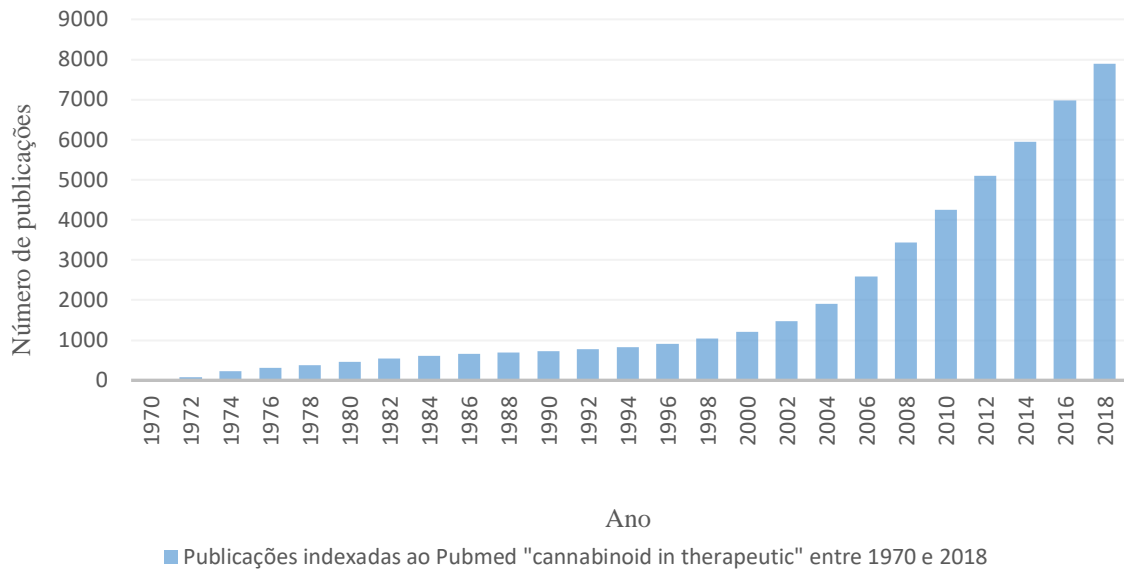


Figura 1 – Número de publicações indexadas na base de dados “Pubmed” entre 1970 e 2018 com a pesquisa das palavras “cannabinoid in therapeutic”.

Este aumento exponencial reflete a dedicação e o empenho atualmente investido pelos diversos cientistas de todo o mundo para aprofundar o conhecimento sobre a modulação farmacológica do sistema endocanabinóide e a síntese de novos canabinóides para encontrar novas abordagens terapêuticas.

III. Uso recreativo da *Cannabis sativa*

O uso de *cannabis sativa* ficou amplamente conhecido devido aos seus efeitos recreativos, principalmente a partir da década de 1960, na qual o seu consumo aumentou exponencialmente (Di Marzo *et al.*, 2004).

O uso continuado de *Cannabis* pode levar ao desenvolvimento de uma síndrome de dependência, semelhante à do álcool. De acordo com alguns dados epidemiológicos, 10% das pessoas que experimentam e 50% dos utilizadores diários, irão desenvolver dependência. A prevalência do risco encontra-se aumentada em jovens que experimentam *cannabis* pela primeira vez antes dos 15 anos (Hall *et al.*, 2007).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, atualmente a *Cannabis* é a droga ilícita mais cultivada, traficada e consumida em todo o mundo. Estima-se que cerca de 147 milhões de pessoas, 2.5% da população mundial, consomem *Cannabis* (prevalência anual) em comparação com 0.2% que consomem cocaína e 0.2% que consomem opióides (Who.int, 2018).

A Organização Mundial de Saúde advoga também os efeitos nefastos do uso recreativo da *Cannabis* (como efeitos ao nível do desenvolvimento cognitivo, coordenação motora, possibilidade de desenvolvimento de esquizofrenia, entre outros), tendo vários projetos de saúde pública que visam a consciencialização da população face ao consumo recreativo desta planta (Who.int, 2018).

Em Portugal atualmente a *Cannabis* é a substância ilícita mais consumida, seguida pelo “ecstasy” (3,4-metilenodioximetanfetamina) e a cocaína. O consumo da *Cannabis* é mais comum entre jovens adultos (entre 15 e 34 anos) segundo dados epidemiológicos recentes (Emcdda.europa.eu, 2018).

Devido aos dados apresentados, existe por vezes um preconceito infundado relativamente ao estudo do sistema endocanabinóide, muitas vezes associado ao uso recreativo da *Cannabis* e mesmo de outras drogas de abuso. Essa é uma barreira a ultrapassar, para que se consiga distanciar o uso recreativo da *Cannabis* do uso terapêutico de determinadas substâncias isoladas da planta (Maldonado *et al.*, 2016).

IV. Descoberta do Sistema Endocanabinóide

Embora se tenha vindo a usar a *cannabis* com fins terapêuticos desde há vários séculos, apenas recentemente se começaram a descobrir mais informações acerca do seu mecanismo fisiológico de atuação.

A *cannabis* é uma planta com alguma complexidade, com mais de 400 substâncias químicas descritas, das quais mais de 60 são canabinóides, alguns deles com efeitos opostos entre si (Atakan, 2012).

Após vários anos de tentativas de isolamento dos constituintes ativos da *cannabis*, o primeiro composto a ser isolado foi o canabinol, em 1899 (Wood *et al.*, 1899). No século seguinte, mais duas substâncias ativas foram isoladas, o canabidiol (CBD) em 1940 (Adams *et al.*, 1940) e o tetrahydrocannabinol (THC) em 1942 (Wollner *et al.*, 1942).

As estruturas químicas dos 3 principais canabinóides estão ilustradas na Figura 2.

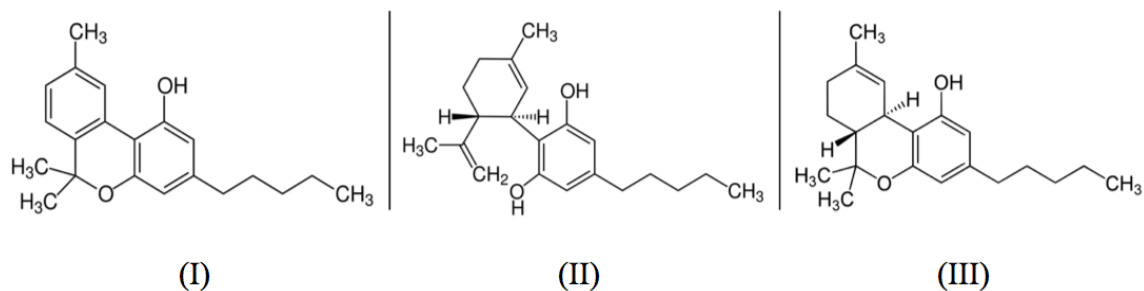


Figura 2 – Estrutura química do canabinol (I), canabidiol (II) e tetrahydrocannabinol (III).

Nas décadas seguintes foram desenvolvidos análogos e enantiómeros do THC de modo a demonstrar que este constituinte seria o responsável pelos efeitos psicotrópicos da *cannabis* no sistema nervoso central (SNC) (Di Marzo *et al.*, 2004). Este estudo contínuo da mecanística do tetrahydrocannabinol levou em 1988 à descoberta de recetores canabinóides na membrana plasmática (Devane *et al.*, 1988).

Em 1990 clonou-se o recetor canabinóide 1 (CB₁), que surgiu da triagem de um recetor metabotrópico (recetor acoplado à proteína G (GPCR)) (Matsuda *et al.*, 1990), e posteriormente, em 1993 foi clonado o recetor canabinóide 2 (CB₂), também ele acoplado à proteína G, que se pensava ser apenas um recetor periférico (Munro *et al.*, 1993).

A designação ‘CB’, significa ‘cannabinoid binding’, e foi atribuída pelo subcomité de nomenclatura e classificação de recetores canabinóides do IUPHAR (The International Union of Basic and Clinical Pharmacology) (Pertwee, 1997).

Existem atualmente evidências de que os alguns canabinóides sintéticos e endocanabinóides medeiam os seus efeitos de forma independente dos recetores clássicos CB₁ e CB₂. Vários trabalhos demonstram que há interação com outros recetores órfãos acoplados à proteína G, como o recetor GPR55 e o recetor GPR18 (Baker *et al.*, 2006; Kohno *et al.*, 2006). No entanto, os recetores GPR18 e GPR55, não foram considerados recetores canabinóides segundo a nomenclatura do IUPHAR, com a justificação de que todos os critérios para os considerar novos recetores canabinóides permanecem incompletos, e portanto, foram classificados novamente como recetores órfãos. Independentemente desta decisão oficial, estes recetores interagem evidentemente com os endocanabinóides direta ou indiretamente (Guerrero-Alba *et al.*, 2019).

Estão também descritos como alvos dos endocanabinóides alguns recetores de potencial transitório (TRP), como o TRP vanilóide tipo 1 (TRPV₁) e o TRP vanilóide tipo 4 (TRPV₄), e os recetores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) α , δ , γ . Estas constantes descobertas podem direcionar as pesquisas para um maior conhecimento do sistema endocanabinóide e também para o desenvolvimento de novas moléculas que atuem nestes recetores (Dainese *et al.*, 2010; Iannotti *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2003; Zygmunt *et al.*, 1999).

Mais recentemente, em 2017, foram identificados como novos alvos do CBD os recetores órfãos GPR3, GPR6 e GPR12, o que poderá fornecer uma nova perspetiva sobre as potencialidades do CBD em várias patologias, contudo será necessário efetuar mais pesquisas para compreender melhor os mecanismos moleculares destes recetores e as suas ações na fisiologia humana (Laun *et al.*, 2018).

É provável que os efeitos contraditórios observados nos ensaios clínicos possam ser devidos à alta promiscuidade dos canabinóides para os seus diferentes tipos de recetores (Guerrero-Alba *et al.*, 2019).

O primeiro ligando endógeno dos recetores canabinóides foi isolado do cérebro de suínos em 1992, e denominou-se araquidoniletanolamida (anandamida) (Devane *et al.*, 1992).

Em 1995 o segundo ligando endógeno dos recetores canabinóides foi isolado do intestino de cães, o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995).

Estes dois ligandos são os mais extensivamente estudados e são atualmente denominados de ‘endocanabinóides’. Esta denominação foi descrita na literatura pela primeira vez em 1995, por Vicent Di Marzo e Angelo Fontana (Di Marzo *et al.*, 1995).

A partir de 2000 foram identificados outros ligandos endógenos dos recetores canabinóides que permitiram uma melhor compreensão do sistema endocanabinóide, embora sejam menos relevantes que a anandamida e o 2-araquidonilglicerol. Em 2000, foi sintetizada a N-acil-dopamina (NADA), que posteriormente em 2002 demonstrou ser uma ligando endógeno do recetor CB₁ e TRPV₁ (Bisogno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002).

Em 2001 foi identificado o 2-araquidonilglicerol éter (noladina), que tem um perfil de atividade quase exclusivo da ligação com o recetor CB₁, pois liga-se fracamente ao recetor CB₂ (Hanus *et al.*, 2001).

Um ano mais tarde, em 2002 foi identificado a O-araquidoniletanolamida (virodamina), o primeiro endocanabinóide identificado como antagonista do recetor CB₁, e agonista do recetor CB₂ (Porter *et al.*, 2002).

V. Síntese e inativação dos endocanabinóides

Os endocanabinóides constituem uma família de moléculas lipídicas que são tipicamente sintetizadas a partir de fosfolípidos da membrana após estimulação, querendo isto dizer que não são armazenados em vesículas ao contrário dos neurotransmissores clássicos (Basavarajappa *et al.*, 2017). Os estímulos que levam à sua síntese podem ser fisiológicos e também patológicos (Araque *et al.*, 2017). No entanto, existem alguns dados que revelam que a anandamida poderá ser também armazenada dentro da célula em vesículas lipídicas, que são denominadas de adipossomas (Oddi *et al.*, 2008). A sua síntese é desencadeada pelo incremento do cálcio ao nível intracelular pós-sinápticamente em resposta à atividade sináptica (Kendall *et al.*, 2017).

Apesar do elevado conhecimento sobre o metabolismo dos endocanabinóides, ainda não está claro como estes se movem através da membrana plasmática. Diversos mecanismos distintos têm sido propostos, em que a hipótese mais aceite baseia-se num transporte de endocanabinóides através da membrana plasmática por um ou mais transportadores membranares de endocanabinóides (EMT). No entanto, ainda precisa de ser esclarecida a complexidade molecular destas proteínas transportadoras e sua existência (Di Marzo, 2008; Iannotti *et al.*, 2016).

V.I. Anandamida

A biossíntese da anandamida (estrutura química na Figura 3) é semelhante à de outras N-acetiletanolaminas, como podemos observar na Figura 5, a anandamida é biossintetizada a partir de precursores de fosfolípidos da membrana.

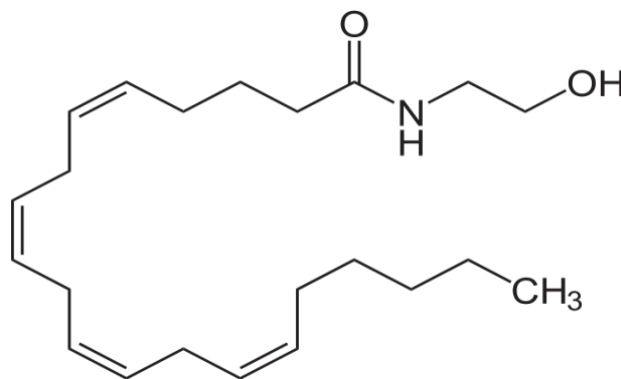


Figura 3: Estrutura química da anandamida.

A biossíntese é iniciada após despolarização pós-sináptica, havendo mobilização do cálcio para dentro da célula, o que vai ativar enzimas sensíveis ao cálcio que participam na síntese da anandamida. Também a ativação de receptores do glutamato metabotrópicos pós-sinápticos leva à produção de anandamida (Di Marzo, 2010).

Há a transferência de um grupo araquidonil de um fosfolípido para a amina primária da fosfatidiletanolamina, pela enzima N-acetiltransferase (NAT), por um mecanismo dependente de cálcio, originando a N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NArPE) (Di Marzo, 2008; Hillard, 2000; McFarland, *et al.*, 2004).

Posteriormente a NArPE pode seguir pelo menos por três vias biossintéticas (Di Marzo, 2011; Hillard, 2000), como demonstrado na Figura 5:

- Diretamente, por ação da fosfolípase D específica de N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), que catalisa a hidrólise do grupo fosfato e etanolamina da NArPE, resultando na formação de anandamida e ácido fosfatídico;
- Através da desacilação de NArPE pela enzima α/β -hidrolase 4 (ABHD4) originando glicerofosfoanandamida, e a posterior hidrólise desta pela glicerofosfodiesterase 1 (GDE1);
- Por via de hidrólise da NArPE mediada pela fosfolípase C (PLC), que irá formar fosfoanandamida, a qual por sua vez será desfosforilada em anandamida por uma fosfatase, como por exemplo a proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22) ou inositol fosfatase (IP).

Foi demonstrado em diversos ensaios em animais geneticamente modificados que estas vias biossintéticas podem compensar-se entre elas, pois na ausência de determinada enzima responsável pela síntese de anandamida, os níveis deste endocanabinóide não se alteraram, com algumas exceções que merecem ser devidamente estudadas e compreendidas (Di Marzo, 2011).

Em relação à degradação da anandamida, o maior responsável pela sua hidrólise é a hidrolase de amidas de ácidos gordos (FAAH), que faz a clivagem da anandamida em ácido araquidônico e etanolamina. O papel desta enzima no catabolismo da anandamida foi confirmado com recurso a ensaios com inibidores seletivos de FAAH e ratinhos “knockout” FAAH (Iannotti *et al.*, 2016).

Outras vias para o catabolismo da anandamida são a oxidação por ação da enzima cicloxigenase 2 (COX2), originando prostaglandina H2 (PGH2), e oxidação por ação da 15-lipoxigenase (15 LOX), originando o 15-ácido-hidroxi-eicosatetraenóico-etanolamina (15 HAEA) (Iannotti et al., 2016).

A anandamida é um agonista parcial do recetor CB₁ e CB₂, tendo elevada afinidade para o recetor CB₁ e baixa afinidade para o recetor CB₂ (Di Marzo *et al.*, 2012).

V.II. 2-Araquidonilglicerol

À semelhança da biossíntese da anandamida, o 2-AG (estrutura química na Figura 4) forma-se também a partir de componentes lipídicos da membrana celular por ação enzimática (Castillo *et al.*, 2012).

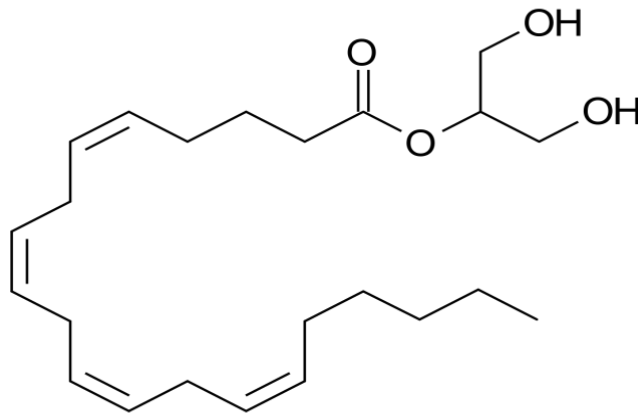


Figura 4: Estrutura química do 2-araquidonilglicerol.

Após despolarização neuronal pós-sináptica os canais de cálcio vão ser ativados e consequentemente aumentar a concentração intracelular deste, o que vai levar à ativação de enzimas sensíveis ao cálcio que irão participar na produção de 2-AG. Também a libertação de glutamato em recetores do glutamato metabotrópicos pós-sinápticos pode resultar na síntese de 2-AG por ativação enzimática (Castillo *et al.*, 2012).

As enzimas que vão ser ativadas e iniciar a biossíntese são a fosfolípase C β (PLCβ), que irá hidrolisar fosfolípidos da membrana, e o ácido fosfatídico fosfohidrolase (PAP), que vai hidrolisar o ácido fosfatídico, originando 2-araquidonildiacilglicerol por ambas as vias, como demonstrado na Figura 5 (Iannotti *et al.*, 2016; Murataeva *et al.*, 2014).

Este 2-araquidonildiacilglicerol é posteriormente hidrolisado pelas lipases de diacilglicerol α/β (DAGL α/β), a 2-AG. A diacilglicerol α (DAGL α) é maioritariamente expressa no cérebro, e a diacilglicerol β (DAGL β) ao nível periférico, embora esteja também presente no cérebro (Di Marzo, 2008; Iannotti *et al.*, 2016).

Quanto á inativação do 2-AG, a monoacil glicerol lipase (MAGL) é a principal responsável pela sua hidrólise em ácido araquidónico e glicerol, e é encontrada pré-sinápticamente. Contudo, existem outras vias para o catabolismo do 2-AG, com menor expressão (Castillo *et al.*, 2012; Iannotti *et al.*, 2016; Murataeva *et al.*, 2014), tais como:

- Metabolização em ácido araquidónico e glicerol, pela FAAH, ou por lipases que foram recentemente descobertas, α/β hidrolase 6 e 12 (ABHD6 e ABHD12);
- Oxidação por ação da cicloxigenase 2 (COX2) a prostaglandina H2 (PGH2);
- Fosforilação em ácido lisofosfatídico pela cínase do monoacilglicerol;
- Acilação em diacilglicerol por monoacilglicerol aciltransferase;
- Ação de enzimas do citocromo P450 e lipoxigenases.

Embora o 2-AG seja degradado fundamentalmente nos neurónios pré-sinápticos, quando é produzido em quantidades elevadas pode ser degradado pós-sinápticamente pela α/β hidrolase 6 (ABHD6) em ácido araquidónico e glicerol (Castillo *et al.*, 2012; Murataeva *et al.*, 2014).

Ao contrário da anandamida, o 2-AG é um agonista total do recetor CB₁ e CB₂, embora tenha afinidade baixa a moderada. Contudo, como o seu nível no cérebro se estima ser bastante superior ao da anandamida, pensa-se que seja o principal ligando endógeno dos recetores canabinóides no SNC (Di Marzo *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2018).

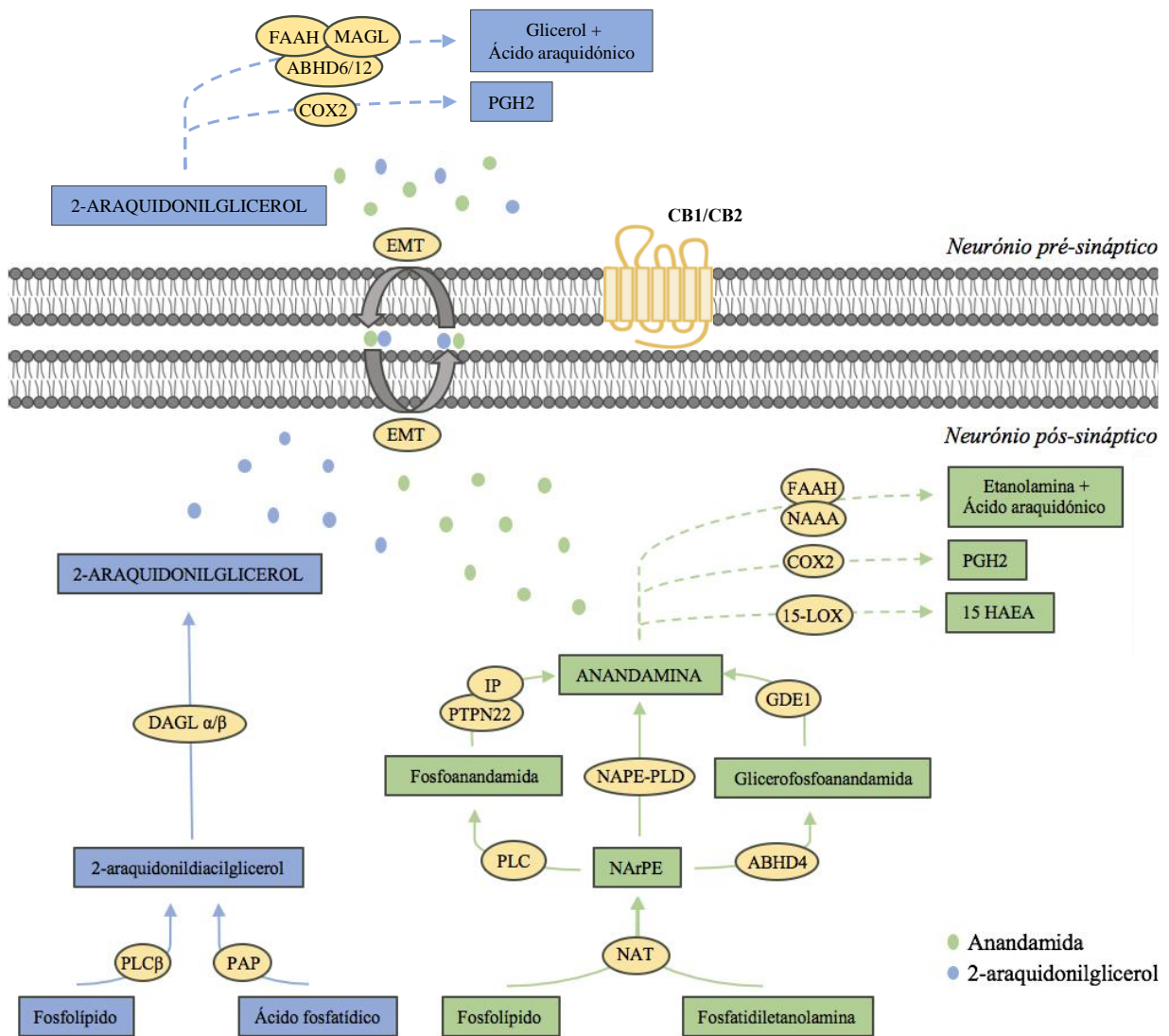


Figura 5 – Biossíntese e inativação dos endocanabinóides a nível neuronal.

Lista de abreviaturas usadas na figura: 15 HAEA, 15-ácido-hidroxiieicosatetraenóico-etanolamina; 15 LOX, 15-lipoxigenase; ABHD4, α/β -hidrolase 4; ABHD6/12, α/β -hidrolase 6/12; CB1/CB2, recetor canabinóide 1/2; COX2, cicloxigenase 2; DAGL α/β , lipase de diacilglicerol α/β ; EMT, transportador endocanabinóide de membrana; FAAH, hidrolase de amidas de ácidos gordos; GDE1, glicerofosfodiesterase-1; IP, inositol fosfatase; MAGL, monoacil glicerol lipase; NAAA, N-acetiletanolamina amidase ácida hidrolase; NAPE-PLD, fosfolipase D específica de N-acil-fosfatidiletanolamina; NArPE, N-araquidonil-fosfatidiletanolamina; NAT, N-acetiltransferase; PAP, ácido fosfátidico fosfohidrolase; PGH2, prostaglandina H2; PLC, fosfolípase C; PLC β , fosfolípase C β ; PTPN22, proteína tirosina fosfatase N22.

VI. Recetores canabinóides

Sabe-se agora que os recetores CB₁ e CB₂ são distribuídos numa forma mais ampla do que se supunha inicialmente. Com a evolução do conhecimento do sistema endocanabinóide, a ideia rudimentar de que os recetores CB₁ têm um papel exclusivo no sistema nervoso, e os recetores CB₂ no sistema imunológico, evoluiu para a noção atual de que ambos os recetores estariam envolvidos em funções fisiológicas centrais e periféricas (Di Marzo, 2009).

Ambos os recetores estão acoplados à proteína G_{i/o}, portanto a sua ativação irá levar à inibição da adenilciclase (AC), o que irá resultar em determinados efeitos como será explicado brevemente. É descrito também, ocasionalmente, a ativação de AC pela ativação de recetores CB₁ (mas não por ativação de CB₂). Estes efeitos duais de inibição e ativação da AC pelo recetor CB₁ têm sido atribuídos pelos diferentes ligandos deste recetor (Lu *et al.*, 2017).

Os recetores CB₁ são uns dos mais abundantes GPCR no SNC, principalmente no córtex cerebral, no hipocampo, nos gânglios da base e no cerebelo, mas ausentes nos centros recetivos do tronco encefálico. A distribuição deste recetor no SNC correlaciona-se com o seu papel no controlo da função motora, cognição, memória e analgesia (Howlett *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017).

São também expressos no sistema nervoso periférico (SNP) (nervos aferentes sensoriais) e no sistema nervoso autónomo. Adicionalmente, os recetores CB₁ encontram-se em níveis consideráveis noutros locais do organismo, tal como no baço, fígado, pulmão, timo, sistema cardiovascular, sistema gastrointestinal, sistema reprodutivo, músculos, ossos e pele (Le Boisselier *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2017).

A ativação do recetor CB₁ de acordo com ensaios pré-clínicos e clínicos poderá ser benéfica na dor neuropática e inflamatória, depressão, ansiedade, stress pós-traumático, esclerose múltipla, doença de Huntington e doenças inflamatórias intestinais. Em contraste, o uso de antagonistas do recetor CB₁ poderá ser útil em doenças como a obesidade, diabetes tipo 2, hepatopatias, nefropatias, doença de Alzheimer e esquizofrenia (Di Marzo, 2018).

As principais funções associadas ao CB₁ estão ilustradas na Figura 6.

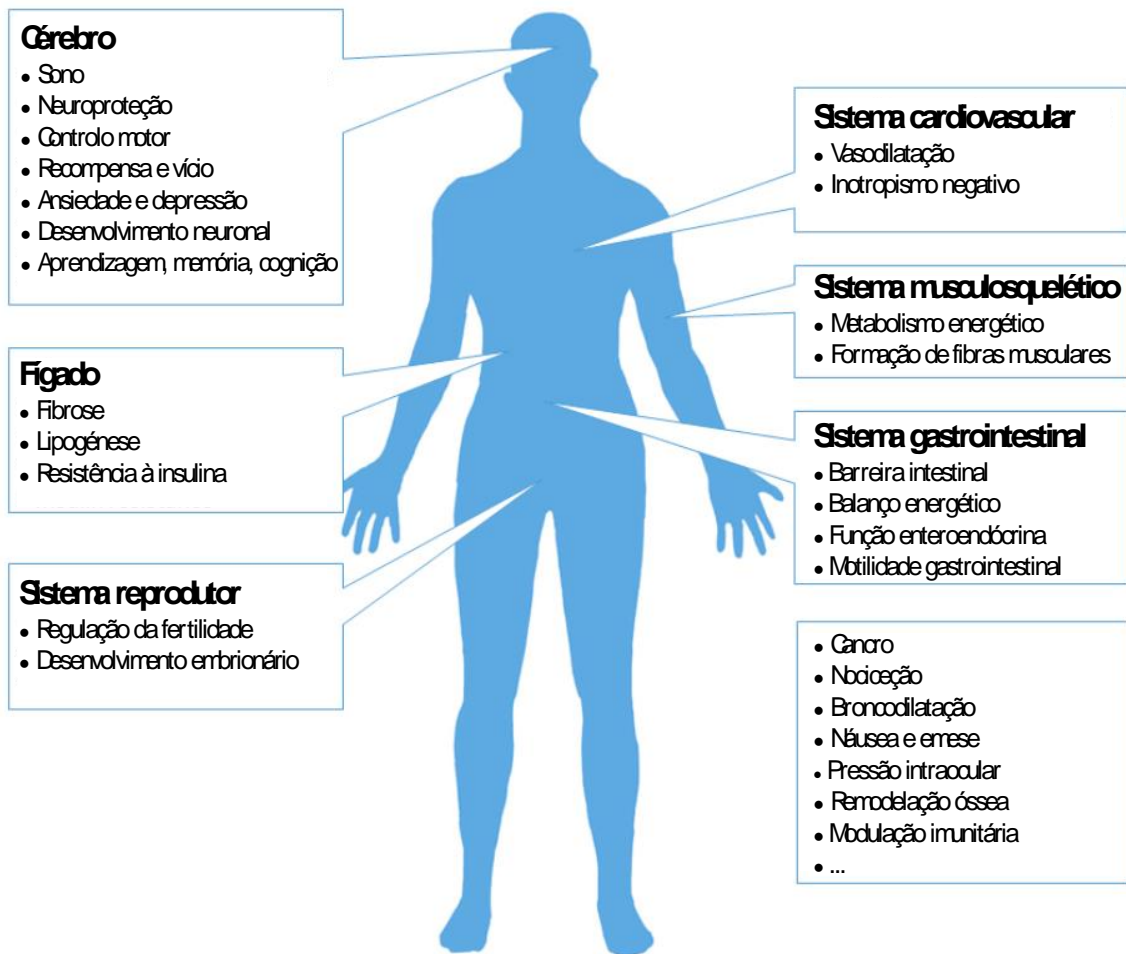


Figura 6 – Principais funções associadas ao CB₁ na fisiologia humana (Adaptado de Zou *et al.*, 2018).

Os recetores CB₂ são abundantemente expressos em células hematopoiéticas e no sistema imunológico (baço, amígdalas, medula óssea e leucócitos), onde têm um papel mais relevante do ponto de vista funcional. A teoria retrograda de que os recetores CB₂ estariam ausentes do cérebro foi desmitificada por vários estudos que revelaram a presença de recetores CB₂ no SNC, embora num nível bastante inferior comparativamente aos recetores CB₁. Também são encontrados no fígado, pâncreas, osso, pulmão e testículos, contudo, com um papel menos significativo (Howlett *et al.*, 2017; Le Boisselier *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2017).

A modulação farmacológica do recetor CB₂ tem sido descrita como um alvo promissor para doenças inflamatórias, doenças autoimunes, fibrose hepática e renal, nociceção, dependência de drogas e doenças neurodegenerativas (Di Marzo, 2018; Zou *et al.*, 2018).

Devido aos obstáculos decorrentes da ativação do recetor CB₁, como por exemplo os seus efeitos psicoativos, os investigadores têm prestado mais atenção ao recetor CB₂, até então muitas vezes ignorado, principalmente nos locais periféricos onde estudos têm demonstrado os seus efeitos benéficos em várias condições patológicas (Zou *et al.*, 2018).

Contudo, como já referido, o sistema endocanabinóide é ativado mediante determinados estímulos de uma maneira específica para exercer uma função de homeostasia. Assim, a utilização de agonistas ou antagonistas, que ativam ou inibem indiscriminadamente todos os recetores canabinóides, pode interferir na função normal destes recetores em células não-alvo. A título de exemplo, o rimonabant (antagonista do recetor CB₁), que era comercializado na Europa em 2006 para o tratamento da obesidade e da síndrome metabólica, foi retirado do mercado em 2008 porque observou-se que induzia depressão e ideação suicida em alguns pacientes (Christensen *et al.*, 2007; Di Marzo, 2018).

VII. Vias de sinalização

Os recetores CB₁ estão localizados fundamentalmente em locais pré-sinápticos, onde medeiam o estímulo inibitório da libertação de neurotransmissores (excitatórios ou inibitórios), o que lhes confere um papel neuromodulador no SNC, agindo como um sistema de sinalização retrógrada que regula a plasticidade sináptica. Foram descritas 3 formas para explicar este sistema de sinalização retrógrada, e são apresentadas na Figura 7 (Howlett *et al.*, 2017; Le Boisselier *et al.*, 2016).

A demonstração deste fenómeno de sinalização retrógrada foi postulada inicialmente quando se descobriu que os endocanabinóides estariam envolvidos em fenómenos de plasticidade sináptica de curto prazo, como a supressão da inibição induzida por despolarização e a supressão da excitação induzida por despolarização, e em fenómenos de plasticidade sináptica de longo prazo, como a depressão de longo prazo (LTD) ou a potenciação de longo prazo (LTP), tanto nas sinapses excitatórias quanto nas inibitórias. A supressão da libertação dos neurotransmissores nas sinapses poderá ser explicada através de dois mecanismos distintos, explicados de seguida (Castillo *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2018).

O primeiro mecanismo, retrata a plasticidade de curto prazo, em que os recetores CB₁ após serem ativados, vão levar à inibição dos canais de cálcio do tipo N e do tipo P/Q, inibindo assim o influxo intracelular pré-sináptico de cálcio, o que leva a uma diminuição da concentração intracelular deste. Irá também haver ativação dos canais de potássio, aumentando assim o efluxo do potássio para fora da célula e diminuindo consequentemente a sua concentração intracelular. Como consequência destas ações, ocorre um aumento do limiar de disparo neuronal, com a consequente supressão da libertação dos neurotransmissores (Castillo *et al.*, 2012, Le Boisselier *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2017).

O segundo mecanismo, incide na plasticidade a longo prazo, em que após os recetores canabinóides serem ativados, ocorre a inibição da AC o que leva consequentemente à inibição da conversão da adenosina trifosfato (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), com a correspondente inativação da via de fosforilação da proteína cínase A (PKA) (Castillo *et al.*, 2012, Lu *et al.*, 2017).

Todavia, nos últimos anos, um número crescente de publicações tem vindo a demonstrar a presença do recetor CB₁ em outras estruturas do SNC, como em neurónios pós-sinápticos onde a sinalização será autócrina (Figura 7), e em astrócitos onde a sinalização poderá ser indiretamente pré-sináptica ou pós-sináptica (Figura 7). Contudo, estes mecanismos não estão totalmente conhecidos, sendo a sinalização retrógrada a teoria mais robusta para a mecânica dos endocanabinóides (Castillo *et al.*, 2012; Le Boisselier *et al.*, 2016).

Além dos recetores canabinóides CB₁ e CB₂, hoje em dia sabe-se que a anandamida é agonista dos recetores TRPV₁, sendo considerada então um ‘endovanilóide’. Estes recetores são expressos em neurónios periféricos aferentes (nociceptores), onde a sua ativação regula a transmissão sináptica associada à nociceção (Castillo *et al.*, 2012; Ross, 2003).

Os recetores TRPV₁ são também expressos em neurónios pós-sinápticos no SNC (Figura 7), onde regulam fenómenos de plasticidade sináptica de longa duração, como a depressão de longo prazo (LTD) e potenciação de longo prazo (LTP). Contudo os efeitos da ação da anandamida no TRPV₁ são controversos e é descrito na literatura que os efeitos conjuntos do TRPV₁ e CB₁ podem ser sinérgicos ou opostos, dependendo de determinadas condições (Di Marzo, 2010).

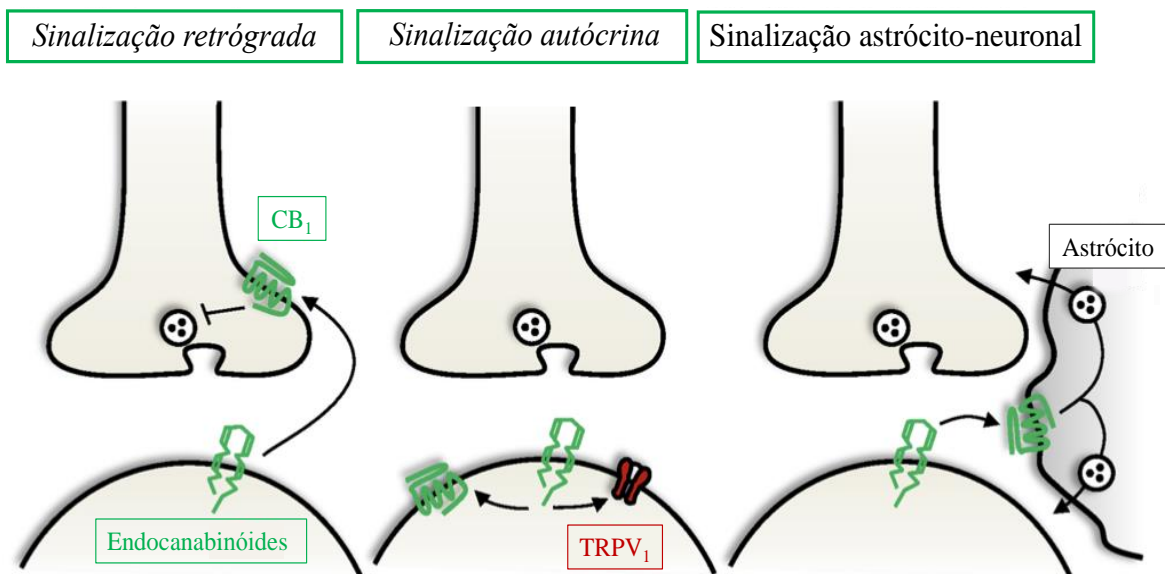


Figura 7 – Sinalização endocanabinóide na sinapse (Adaptado de Castillo *et al.*, 2012).

VIII. Sistema endocanabinóide e dor neuropática

A dor é um sintoma presente em diversas patologias e há uma variedade de alvos farmacológicos no SNC e SNP para o seu tratamento, sendo os analgésicos a classe principal. Segundo alguns autores os analgésicos são classificados como não opióides, opióides, e adjuvantes, como podemos observar na Figura 8 (Guerrero-Alba *et al.*, 2019).

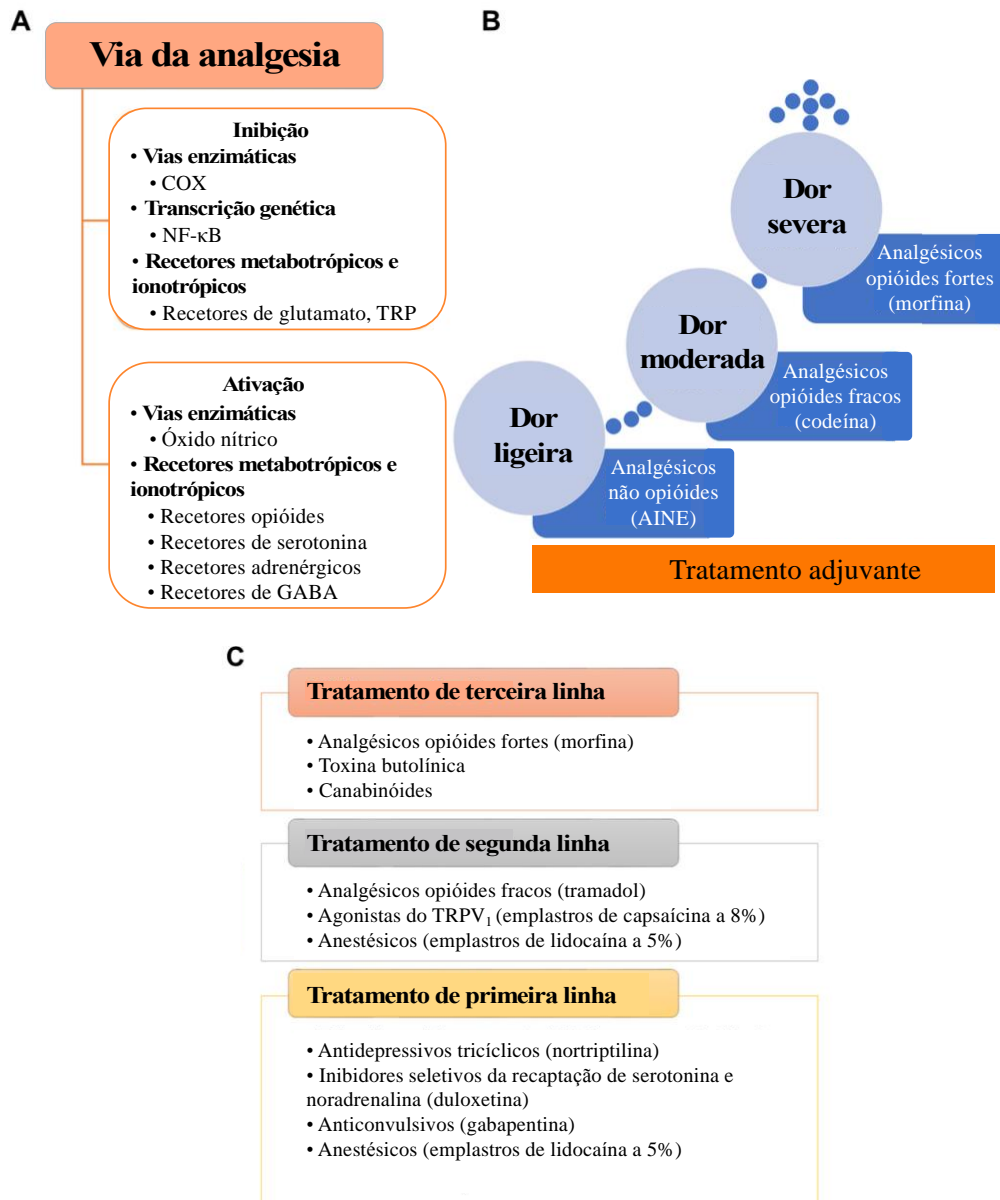


Figura 8 – Visão geral da terapêutica da dor e diretrizes utilizadas no seu tratamento (Adaptado de Guerrero-Alba *et al.*, 2019).

(A) Vias principais pelas quais os fármacos induzem o alívio da dor.

(B) Escada analgésica proposta pela Organização Mundial de Saúde.

(C) Diretrizes clínicas específicas para a dor neuropática.

A dor é caracterizada pela deteção de estímulos nocivos pelos recetores sensoriais específicos, os nociceptores. Estes nociceptores são anatomicamente apresentados como terminações nervosas livres de fibras axoniais A δ e C, cada uma com as suas particularidades, com a capacidade de detetar estímulos dolorosos e conduzi-los até ao córtex cerebral onde são interpretados como dor (Steeds, 2016).

Em relação à dor neuropática, é uma patologia frequentemente desafiadora de tratar, o que é uma limitação importante, uma vez que os mecanismos da mesma não são totalmente elucidados e o tratamento atual apresenta resultados apenas modestos e nem sempre satisfatórios. Geralmente manifesta-se como uma sensação espontânea de queimação ou formigueiro, que pode ser aumentada por estímulos nocivos (pressão, calor ou frio) e estímulos que à partida não seriam nocivos (tato, calor ou frio) (Finnerup *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2014).

Muitos tratamentos desenvolvidos com base em mecanismos identificados *in vitro* e em animais falham em ensaios clínicos e, portanto, há uma necessidade crescente de pesquisar novas abordagens terapêuticas para esta patologia (Attal *et al.*, 2019).

A sua prevalência varia entre 6,9% e 10% da população geral e os pacientes que sofrem desta condição apresentam menor produtividade laboral, usam mais recursos de saúde e têm maior probabilidade de desenvolver transtornos mentais. Mesmo entre pacientes com a mesma causa subjacente de dor neuropática, os sintomas e sinais dolorosos geralmente são diferentes. Lesões ou doenças que envolvem o sistema nervoso somatossensorial podem levar à dor neuropática. A causa pode ser uma doença metabólica, por exemplo, neuropatia diabética, uma condição neurodegenerativa, por exemplo, esclerose múltipla, entre outras causas (vascular, autoimune, trauma, infeção) (Langley *et al.*, 2013; Scholz *et al.*, 2019).

As bases mecanicistas da hipersensibilidade à dor e da dor espontânea nestas condições são complexas, e a sua relação com o processo patológico subjacente geralmente permanece incerta. Atualmente, as investigações neurofisiológicas têm vindo a revelar algumas pistas na fisiopatologia da doença, como por exemplo, o aumento de atividade nas fibras nervosas somatossensitivas ou mudanças no controlo endógeno da nociceção (Scholz *et al.*, 2019).

Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à dor neuropática incluem processos complexos de sensibilização periférica e central. A lesão do nervo periférico envolve

danos aos neurónios aferentes primários e também recrutamento de células imunitárias que libertam citoquinas, fator de crescimento nervoso e outras substâncias sinalizadoras (Scholz *et al.*, 2007).

A lesão do nervo faz com que as fibras nervosas se tornem hiperexcitáveis e farmacologicamente disfuncionais. Várias alterações específicas ao nível periférico podem estar por trás dessa sensibilização nervosa, incluindo desregulação ou redistribuição de canais de sódio e potássio dependentes de voltagem (Laedermann *et al.*, 2013; Tsantoulas *et al.*, 2012).

Ações antinociceptivas periféricas a partir do sistema endocanabinóide foram demonstradas em numerosos modelos de dor animal. Esta ação na periferia constitui uma promessa considerável para separar os efeitos terapêuticos dos efeitos adversos indesejados no SNC (Guindon *et al.*, 2009).

Na periferia, o CB₁ localizado em terminais nociceptivos inibe a transmissão nociceptiva, enquanto que o CB₂ localizado em células imunitárias e queratinócitos intervém na libertação de endorfinas, que atuam nos recetores opióides nos neurónios aferentes primários, inibindo assim a nociceção (Ibrahim *et al.*, 2005; Nadal *et al.*, 2013).

Além disso, o CB₁ é expresso nos gânglios da raiz dorsal e nos terminais nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal, onde inibe a libertação de neurotransmissores envolvidos na transmissão da dor (Nadal *et al.*, 2013).

O CB₂ na medula espinhal parece modular as respostas imunes centrais, o que foi implicado no desenvolvimento e sensibilização neuronal durante a dor neuropática (Racz *et al.*, 2008).

Ao nível supraespinhal diversos estudos têm implicado um papel importante do sistema endocanabinóide para a ação analgésica. Os locais supraespinhais responsáveis pelas propriedades antinociceptivas foram identificados com recurso a estudos em animais que injetaram agonistas dos recetores canabinóides em determinadas regiões cerebrais e intraventricularmente (Guindon *et al.*, 2009).

A esse nível o CB₁ inibe a transmissão nociceptiva ascendente, principalmente ao nível do tálamo, modifica a interpretação subjetiva da dor pela modulação da atividade neuronal no sistema límbico (mais especificamente na amígdala) e nas áreas corticais, e ativam a

via inibitória descendente através da inibição da libertação de ácido gama-aminobutírico (GABA) na substância cinzenta e núcleos do rafe (Nadal *et al.*, 2013).

O GPR18 e o GPR55 são também expressos nos sistemas nociceptivos centrais e periféricos de roedores e humanos, sugerindo um papel potencial na modulação de vias nociceptivas. O GPR18 é menos estudado comparativamente ao GPR55 e isso deve-se em parte ao facto dos mecanismos de sinalização e ligandos endógenos ainda serem controversos (Guerrero-Alba *et al.*, 2019).

O papel do sistema endocanabinóide no controlo da nociceção ao nível periférico, medular e supra-espinhal é ilustrado na Figura 9.

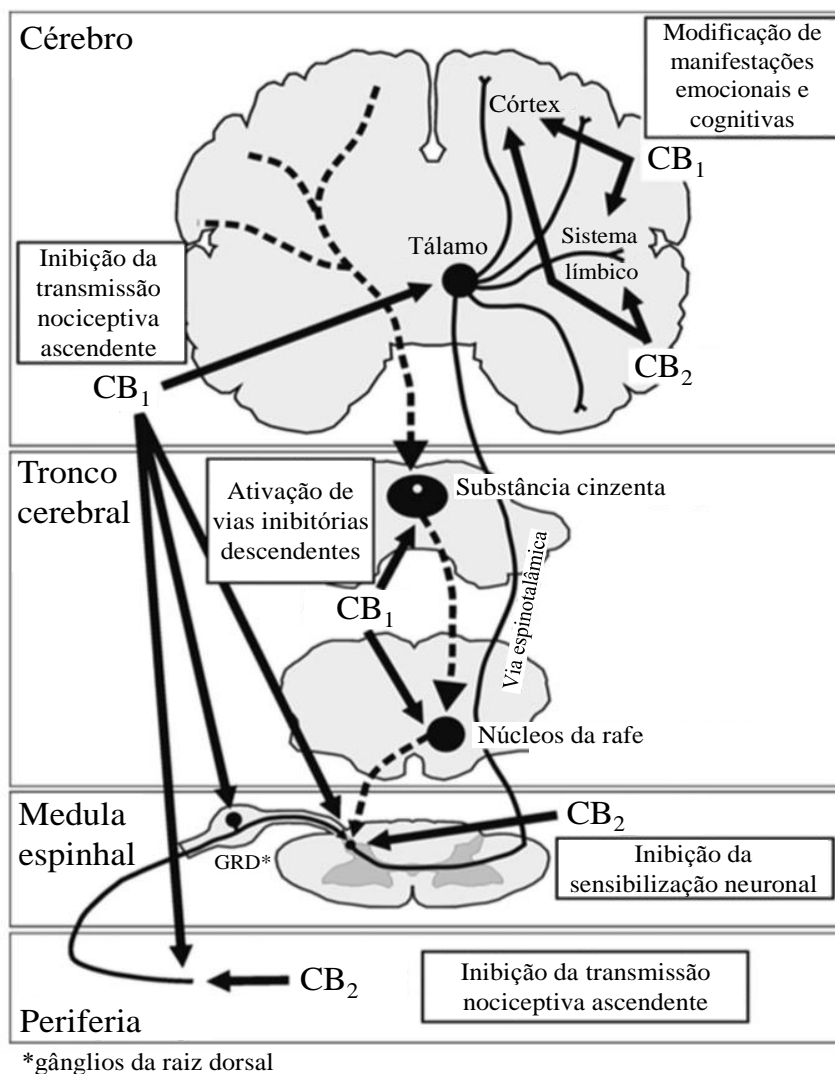


Figura 9 – Papel do sistema endocanabinóide no controlo da dor neuropática ao nível periférico, espinhal e supraespinhal (Adaptado de Maldonado *et al.*, 2016).

Vários ensaios pré-clínicos fornecem descobertas importantes sobre o papel do sistema endocanabinóide na fisiopatologia da dor neuropática e o seu potencial interesse em identificar novas ferramentas farmacológicas para o tratamento desta patologia. Estes estudos utilizam fundamentalmente ratinhos geneticamente modificados com mutações seletivas em componentes específicos do sistema endocanabinóide e substâncias que modificam a bioquímica do sistema endocanabinóide.

Um grupo de investigadores avaliou o envolvimento dos recetores CB₁ no desenvolvimento e expressão da dor neuropática em ratinhos que sofreram eliminação constitutiva deste recetor. Os autores observaram que esta deleção dos recetores CB₁ não aumentou nem diminuiu significativamente as manifestações da dor neuropática induzida, sugerindo que estes recetores não estejam intimamente envolvidos no desenvolvimento deste tipo de dor (Castañé *et al.*, 2006).

Outro grupo de investigadores avaliou a eliminação seletiva dos recetores CB₁ em nociceptores localizados no SNP, preservando a sua expressão no SNC. Em contraste com os resultados de Castañé *et al.*, os autores observaram um aumento das manifestações da dor neuropática e uma redução dos efeitos analgésicos de agonistas canabinóides sistêmicos, o que demonstra o papel do CB₁ expresso em nociceptores periféricos na dor neuropática e o interesse em investigar agonistas de ação periférica deste recetor para a produção de analgesia, diminuindo assim os efeitos psicoativos ao nível do SNC dos agonistas de CB₁ de ação central (Agarwal *et al.*, 2007).

Em relação aos recetores CB₂, para tentar perceber o seu papel na regulação das respostas imunes centrais que levam ao desenvolvimento da dor neuropática, um grupo de investigadores utilizou ratinhos geneticamente modificados sem expressão de CB₂ e com superexpressão de CB₂ num modelo de dor neuropática induzida. A eliminação dos recetores CB₂ gerou um aumento das manifestações (hiperalgesia e alodinia) da dor neuropática e a superexpressão dos recetores CB₂ atenuou estas manifestações. Estas descobertas levam ao interesse em estudar agonistas deste recetor para o tratamento da dor neuropática (Racz *et al.*, 2008).

Para compreender o papel das enzimas que metabolizam os endocanabinóides, um grupo de investigadores estudou o papel da inibição farmacológica da MAGL e da FAAH num modelo animal de dor neuropática e na produção de tolerância aos canabinóides (Schlosburg *et al.*, 2010).

Os autores observaram que as elevações do 2-AG no cérebro causadas pela inibição repetida e crónica da MAGL (principal enzima responsável pela degradação do 2-AG) levam à produção de tolerância aos efeitos analgésicos de agonistas CB₁. Em contraste, as elevações contínuas de anandamida no cérebro pelo bloqueio da FAAH (principal enzima que degrada a anandamida), produziram analgesia sustentada sem produzir tolerância ou alterações na função do recetor CB₁, o que leva a crer que os inibidores da FAAH possam produzir analgesia sem risco de dependência (Schlosburg *et al.*, 2010).

Mais recentemente, outro estudo veio a confirmar a tolerância/dessensibilização do recetor CB₁ produzida por doses crónicas de inibidores da MAGL, embora com resultados satisfatórios na dor neuropática em utilizações de curtos espaços de tempo. No entanto, mais estudos são necessários para determinar se a regulação negativa do receptor CB₁ ocorre diferencialmente em regiões distintas do cérebro e da medula espinhal, e também se o impacto da inibição prolongada da MAGL altera a expressão e função do recetor CB₂ (Ignatowska-Jankowska *et al.*, 2014).

O aumento de endocanabinóides específicos (por exemplo, anandamida) pode ativar outros recetores não canabinóides (por exemplo, TRPV₁). Assim, nem todos os efeitos destes moduladores podem ser atribuídos a ações nos recetores canabinóides, e a avaliação da especificidade farmacológica é crítica para a interpretação de ações *in vivo* de qualquer composto (Guindon *et al.*, 2009).

Nos últimos anos tem sido também estudada a interação entre os recetores canabinóides e os recetores opióides, uma vez que são encontrados em localizações próximas em todo o circuito cerebral. Um estudo realizado em 2012 observou uma interação direta entre o recetor CB₁ e o recetor opióide δ na dor neuropática. Uma melhor compreensão das interações entre estes sistemas pode fornecer novas estratégias e sinergismos (Bushlin *et al.*, 2012; Katia, 2015).

Os ensaios pré-clínicos têm sublinhado o interesse nesta nova abordagem da modulação do sistema endocanabinóide para o tratamento da dor neuropática, e identificam constantemente novas abordagens possíveis para obter respostas analgésicas eficazes, minimizando os efeitos adversos. No entanto, os resultados destes ensaios devem ser analisados com cautela e confirmados futuramente em ensaios clínicos.

IX. Evidência clínica da eficácia dos fármacos canabinóides no tratamento da dor neuropática

Para esta revisão foram considerados apenas ensaios clínicos aleatorizados que comparassem o efeito de canabinóides versus placebo ou tratamento padrão. Foram incluídos apenas ensaios com a duração de pelo menos 2 semanas após início do tratamento (Tabela 1).

As principais medidas de avaliação da intensidade da dor nos ensaios foram uma escala denominada em inglês “*Numeric Rating Scale*” (NRS) que consiste numa avaliação que os pacientes fazem sobre a intensidade da sua dor numa escala de 0 a 10, em que o 0 representa “nenhuma dor” e o 10 representa “a pior dor imaginável”, e uma escala denominada em inglês “*Visual Analogue Scale*” (VAS) que consiste numa linha de 10 centímetros em que numa extremidade tem a indicação de “nenhuma dor” e na outra extremidade tem a indicação de “a pior dor imaginável” e a magnitude da intensidade da dor é indicada marcando a linha e posteriormente quantificando a marcação numa escala de 0 a 100 milímetros.

A grande maioria dos ensaios clínicos que avaliaram os efeitos dos canabinóides (naturais e sintéticos) na dor neuropática apenas surgiram nas últimas 2 décadas, sendo uma área de estudos em claro crescimento (Blanton *et al.*, 2019).

Refira-se a título de exemplo, que 7 ensaios clínicos foram realizados com o Sativex®, um medicamento que está autorizado em Portugal para o tratamento da rigidez muscular associada à esclerose múltipla e que se encontra em solução para pulverização bucal. É constituído por 27 mg/ml de THC e 25 mg/ml de CBD (Infarmed.int, 2018). Três ensaios clínicos encontraram no Sativex® eficácia na redução da dor neuropática, associada à esclerose múltipla (Rog *et al.*, 2005) e de origem periférica (Berman *et al.*, 2004; Nurmikko *et al.*, 2007). Por outro lado, outros 3 ensaios que avaliaram o Sativex®, não observaram uma redução significativa da dor neuropática induzida por quimioterapia (Lynch, *et al.*, 2014) e associada à esclerose múltipla (Langford *et al.*, 2012; Wade *et al.*, 2004). Foi ainda realizado em 2014 um ensaio clínico que avaliou a eficácia do Sativex® na dor neuropática de origem periférica. Observaram-se resultados significativos na melhoria de pelo menos 30% da dor (indicador de eficácia clínica), mas não obteve diferença significativa face ao placebo na redução da dor no final do estudo (Serpell *et al.*, 2014). Estas diferenças nos resultados clínicos podem ser atribuídas à baixa dose nos

ensaios que falharam, comparativamente aos outros ensaios, sendo necessário perceber melhor qual o papel do Sativex® na dor neuropática.

Em relação à nabilona, um canabinóide sintético (agonista parcial do recetor CB₁ e CB₂), foram realizados 3 ensaios clínicos. Um dos ensaios, que comparou a nabilona com a diidrocodeína no tratamento da dor neuropática de origem mista, concluiu que a diidrocodeína era superior à nabilona e apresentava menos efeitos adversos (Frank *et al.*, 2008). Um outro ensaio, que avaliou a eficácia da nabilona como coadjuvante da gabapentina no tratamento da dor neuropática associada à esclerose múltipla, observou uma redução estatisticamente significativa da dor neuropática no grupo da nabilona e gabapentina face ao grupo da gabapentina e placebo (Turcotte *et al.*, 2014). Por fim, um ensaio que avaliou a eficácia da nabilona na dor neuropática periférica diabética, encontrou diferenças significativas na redução da dor neuropática face ao placebo no final do ensaio (Toth *et al.*, 2012).

Quanto ao Δ 9-THC (também referido como dronabinol) foram realizados 3 ensaios clínicos. Dois ensaios avaliaram a eficácia do Δ 9-THC em pacientes com dor neuropática associada à esclerose múltipla e ambos observaram uma redução estatisticamente significativa da dor neuropática no grupo de intervenção face ao grupo placebo (Svendsen *et al.*, 2004; van Amerongen *et al.*, 2018). Contudo, houve um ensaio que avaliou o Δ 9-THC também na dor neuropática associada à esclerose múltipla, que não obteve resultados positivos. Os autores observaram que embora tenha sido clinicamente relevante a diminuição da dor, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de intervenção e placebo no que diz respeito à redução da dor neuropática (Schimrigk *et al.*, 2017). É importante referir que o número de participantes avaliados no ensaio que não obteve sucesso foi bastante superior ao número de participantes dos ensaios que obtiveram resultados positivos.

Tabela 1 - Ensaios clínicos com canabinóides na dor neuropática

Tipo de dor neuropática	Medida principal de avaliação	Desenho do estudo	Duração (semanas)	Fármaco	Dose máxima diária	Número de participantes	Redução da dor	Efeitos adversos	Referência
Associada à esclerose múltipla	NRS	Paralelo	4	Sativex®	48 pulverizações	64	Sim	Tonturas; Sonolência; Confusão; Boca seca; Náuseas; Fraqueza	Rog <i>et al.</i> , 2005
Associada à esclerose múltipla	VAS	Paralelo	6	Sativex®	44 pulverizações	154	Não	Tonturas; Fadiga; Cefaleias; Confusão; Desconforto no local da aplicação; Úlceras na cavidade oral	Wade <i>et al.</i> , 2004
Origem periférica	NRS	Paralelo	5	Sativex®	48 pulverizações	105	Sim	Tonturas; Náuseas; Fadiga; Boca seca	Nurmikko <i>et al.</i> , 2007
Induzida por quimioterapia	NRS	Cruzado	4	Sativex®	12 pulverizações	16	Não	Tonturas; Náuseas; Fadiga; Boca seca	Lynch <i>et al.</i> , 2014
Associada à esclerose múltipla	NRS	Paralelo	14	Sativex®	12 pulverizações	297	Não	Tonturas; Náuseas; Fadiga; Sonolência; Vertigens	Langford <i>et al.</i> , 2012
Origem periférica	NRS	Cruzado	2	Sativex®	48 pulverizações	45	Sim	Tonturas; Sonolência; Alterações no paladar	Berman <i>et al.</i> , 2004
Origem periférica	NRS	Paralelo	14	Sativex®	24 pulverizações	173	Não	Tonturas; Náuseas; Fadiga; Alterações no paladar	Serpell <i>et al.</i> , 2014

Tabela 1 - (Continuação)

Tipo de dor neuropática	Medida principal de avaliação	Desenho do estudo	Duração (semanas)	Fármaco	Dose máxima diária	Número de participantes	Redução da dor	Efeitos adversos	Referência
Origem mista	VAS	Cruzado	14	Nabilona	2 mg	96	Não	Fadiga; Sonolência; Cefaleias	Frank <i>et al.</i> , 2008
Associada à esclerose múltipla	VAS	Paralelo	9	Nabilona	2 mg	14	Sim	Tonturas; Sonolência; Boca seca	Turcotte <i>et al.</i> , 2014
Periférica diabética	NRS	Paralelo	4	Nabilona	4 mg	25	Sim	Tonturas; Sonolência; Boca seca; Confusão	Toth <i>et al.</i> , 2012
Associada à esclerose múltipla	NRS	Cruzado	6	$\Delta 9$ -THC	10 mg	24	Sim	Tonturas; Fadiga; Mialgias; Cefaleias; Boca seca	Svendsen <i>et al.</i> , 2004
Associada à esclerose múltipla	NRS	Paralelo	4	$\Delta 9$ -THC	24 mg	24	Sim	Tonturas; Cefaleias; Euforia	van Amerongen <i>et al.</i> , 2018
Associada à esclerose múltipla	NRS	Paralelo	16	$\Delta 9$ -THC	15 mg	209	Não	Tonturas; Fadiga; Vertigens; Boca seca; Diarreia	Schimrigk <i>et al.</i> , 2017

Nesta revisão que incluiu 13 ensaios clínicos, 7 demonstraram um efeito positivo na redução da dor neuropática com recurso a diferentes canabinóides naturais e sintéticos, contudo, parece que os canabinóides apenas podem reduzir a intensidade da dor neuropática num grau modesto. Houve também melhorias em outras variáveis, como por exemplo o sono, contudo não é o objetivo desta revisão avaliá-las.

Os resultados contraditórios nos ensaios podem dever-se a diversos fatores, tal como o facto da maioria dos ensaios ter poucos participantes, heterogeneidade entre os participantes e os tipos de dor neuropática, duração reduzida dos ensaios, pelo que é de grande importância o rigor na metodologia dos próximos ensaios clínicos a ser efetuados neste âmbito. É necessário realizar mais ensaios de maior escala e duração para aferir a segurança (incluindo o potencial de abuso) e a eficácia dos canabinóides no tratamento da dor neuropática a longo prazo e num número maior de pacientes.

No geral não houve efeitos adversos graves e estes foram bem tolerados e descritos como transitórios. Os efeitos adversos mais comuns foram a sonolência, tonturas, boca seca, náusea e fadiga.

Os ensaios clínicos, ainda que com resultados irregulares, demonstram potencial para continuar o estudo da modulação farmacológica do sistema endocanabinóide para o tratamento da dor neuropática.

Conclusão

Com base na literatura atualmente disponível, pode-se constatar que têm sido reconhecidos potenciais terapêuticos da *Cannabis* desde há vários séculos nas mais diversas patologias. Também o aumento exponencial das publicações sobre este tema revela o crescente interesse nesta nova abordagem de tratamento, contudo, com alguns entraves como por exemplo o preconceito no estudo devido à dificuldade de diferenciação por vezes do uso recreativo versus o uso terapêutico.

O isolamento dos constituintes ativos da planta, como o THC e o CBD, impulsionou o estudo de como estas substâncias poderiam atuar na fisiologia e fisiopatologia humana, o que levou a anos mais tarde se identificar os recetores endógenos para os canabinóides (CB₁ e CB₂) e os seus ligandos endógenos, denominados então de endocanabinóides. Foi também possível identificar outros novos recetores para os canabinóides como o GPR55, GPR18, TRPV₁, TRPV₄, PPAR, GRP3, GPR6 e GPR12, o que demonstra que há ainda variadíssimos alvos para estudar. A localização e expressão fisiológica e em situações patológicas dos recetores têm vindo a ser uma área importante de estudo. Tem sido também estudado, cada vez com mais detalhe, o metabolismo destes endocanabinóides, ou seja, as suas vias enzimáticas de síntese, inativação e transporte, e as suas vias de sinalização, principalmente a via de sinalização retrógrada que permitiu o melhor entendimento deste sistema.

Os ensaios pré-clínicos demonstram amplamente o potencial interesse do sistema endocanabinóide no tratamento da dor neuropática, realçando que os recetores como o CB₁, CB₂, e as enzimas FAAH e MAGL, entre outros, têm sido identificados como possíveis novos alvos para desenvolver fármacos mais seletivos desprovidos dos efeitos adversos clássicos.

Em relação aos ensaios clínicos, embora nem sempre demonstrem eficácia, demonstram que é possível que os fármacos que atuem no sistema endocanabinóide tenham um efeito no controlo da dor neuropática, contudo a evidência atual não é suficiente para a introdução dos mesmos na prática clínica, o que revela a necessidade de efetuar mais ensaios clínicos de melhor qualidade para eventualmente se poderem introduzir estes fármacos na terapêutica com segurança e eficácia. É de salientar que os fármacos utilizados nos ensaios clínicos de duração de pelo menos 2 semanas na dor neuropática foram todos agonistas dos recetores canabinóides, pelo que outras abordagens, como por

exemplo, inibidores da FAAH devem ser estudados uma vez que apresentaram resultados promissores nos ensaios pré-clínicos.

No futuro, espera-se que este sistema continue a ser estudado para uma melhor compreensão das suas vias de sinalização e metabolismo, e também que se realizem mais ensaios pré-clínicos e clínicos de qualidade para compreender até que ponto esta abordagem poderá ser benéfica ou não no tratamento da dor neuropática.

Bibliografia

- Adams, R., Pease, D. and Clark, J. (1940). Isolation of Cannabinol, Cannabidiol and Quebrachitol from Red Oil of Minnesota Wild Hemp. *Journal of the American Chemical Society*, 62(8), pp.2194-2196.
- Agarwal, N., *et al.* (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature Neuroscience*, 10(7), pp.870-879.
- Araque, A., *et al.* (2017). Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology*, 124, pp.13-24.
- Atakan, Z. (2012). Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2(6), pp.241-254.
- Attal, N. and Bouhassira, D. (2019). Translational neuropathic pain research. *PAIN*, 160, pp.S23-S28.
- Baker, D., *et al.* (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), pp.1-4.
- Basavarajappa, B., *et al.* (2017). Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*, 142(5), pp.624-648.
- Berman, J., Symonds, C. and Birch, R. (2004). Efficacy of two cannabis based medicinal extracts for relief of central neuropathic pain from brachial plexus avulsion: results of a randomised controlled trial. *Pain*, 112(3), pp.299-306.
- Bisogno, T., *et al.* (2000). N-acyl-dopamines: novel synthetic CB1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*, 351(3), pp.817-824.
- Blanton, H., *et al.* (2019). Cannabinoids: Current and Future Options to Treat Chronic and Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Drugs*, 79(9), pp.969-995.
- Brown, D. (1998). *Cannabis*. London, CRC Press.

- Bushlin, I., *et al.* (2012). Dimerization with Cannabinoid Receptors Allosterically Modulates Delta Opioid Receptor Activity during Neuropathic Pain. *PLoS ONE*, 7(12), p.e49789.
- Castañé, A., *et al.* (2006). Development and expression of neuropathic pain in CB1 knockout mice. *Neuropharmacology*, 50(1), pp.111-122.
- Castillo, P., *et al.* (2012). Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron*, 76(1), pp.70-81.
- Christensen, R., *et al.* (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, 370(9600), pp.1706-1713.
- Dach, J., Moore, E. and Kander, J. (2015). *Cannabis extracts in medicine*. Jefferson, McFarland & Company, Inc., Publishers.
- Dainese, E., Oddi, S. and Maccarrone, M. (2010). Interaction of Endocannabinoid Receptors with Biological Membranes. *Current Medicinal Chemistry*, 17(14), pp.1487-1499.
- Devane, W., *et al.* (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), pp. 605-613.
- Devane, W., *et al.* (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), pp.1946-1949.
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(5), pp.438-455.
- Di Marzo, V. (2009). The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological Research*, 60(2), pp.77-84.
- Di Marzo, V. (2010). Anandamide serves two masters in the brain. *Nature Neuroscience*, 13(12), pp.1446-1448.

- Di Marzo, V. (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nature Neuroscience*, 14(1), pp.9-15.
- Di Marzo, V. (2018). New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(9), pp.623-639.
- Di Marzo, V., Bifulco, M. and Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(9), pp.771-784.
- Di Marzo, V. and De Petrocellis, L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1607), pp.3216-3228.
- Di Marzo, V. and Fontana, A. (1995). Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'Killing two birds with one stone'. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 53(1), pp.1-11.
- Donvito, G., et al. (2017). The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology*, 43(1), pp.52-79.
- Emcdda.europa.eu. (2018). *Drug use in Portugal 2018*. [Em linha] Disponível em <http://www.emcdda.europa.eu/countries/drug-reports/2018/portugal/drug-use_en>. [Consultado em 10/11/2018].
- Finnerup, N., Attal, N. and Haroutounian, S. (2015). Pharmacotherapy for Neuropathic Pain in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Vascular Surgery*, 62(4), p.1091.
- Fonseca, B. M., et al. (2013). The Endocannabinoid system - a therapeutic perspective. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 2(2), pp. 97-104.

- Frank, B., *et al.* (2008). Comparison of analgesic effects and patient tolerability of nabilone and dihydrocodeine for chronic neuropathic pain: randomised, crossover, double blind study. *BMJ*, 336(7637), pp.199-201.
- Guerrero-Alba, R., *et al.* (2019). Some Prospective Alternatives for Treating Pain: The Endocannabinoid System and Its Putative Receptors GPR18 and GPR55. *Frontiers in Pharmacology*, 9(1496).
- Guindon, J. and Hohmann, A. (2009). The Endocannabinoid System and Pain. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 8(6), pp.403-421.
- Hall, W. and Degenhardt, L. (2007). Prevalence and correlates of cannabis use in developed and developing countries. *Current Opinion in Psychiatry*, 20(4), pp.393-397.
- Hanus, L., *et al.* (2001). 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), pp.3662-3665.
- Hillard, C. (2000). Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 61(1-2), pp.3-18.
- Howlett, A. and Abood, M. (2017). CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. *Cannabinoid Pharmacology*, 80, pp.169-206.
- Huang, S., *et al.* (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), pp.8400-8405.
- Iannotti, F., Di Marzo, V. and Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research*, 62, pp.107-128.

- Ibrahim, M., *et al.* (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), pp.3093-3098.
- Ignatowska-Jankowska, B., *et al.* (2014). In vivo characterization of the highly selective monoacylglycerol lipase inhibitor KML29: antinociceptive activity without cannabimimetic side effects. *British Journal of Pharmacology*, 171(6), pp.1392-1407.
- Infarmed [Em linha]. Disponível em <
http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=55492&tipo_documento=rcm>. [Consultado em 13/06/2019].
- Jensen, T. and Finnerup, N. (2014). Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology*, 13(9), pp.924-935.
- Katia, B. (2015). Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Frontiers in Pharmacology*, 6(6).
- Kendall, D. and Yudowski, G. (2017). Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(294).
- Kohno, M., *et al.* (2006). Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(3), pp.827-832.
- Laedermann, C., *et al.* (2013). Dysregulation of voltage-gated sodium channels by ubiquitin ligase NEDD4-2 in neuropathic pain. *Journal of Clinical Investigation*, 123(7), pp.3002-3013.

- Langford, R., *et al.* (2012). A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 260(4), pp.984-997.
- Langley, P., *et al.* (2013). The burden associated with neuropathic pain in Western Europe. *Journal of Medical Economics*, 16(1), pp.85-95.
- Laun, A., *et al.* (2018). GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3), pp.300-308.
- Le Boisselier, R., *et al.* (2016). Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101(2), pp.220-229.
- Li, H. (1974). *An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China*. *Economic Botany*, 28(4), pp.437-448.
- Lu, Y. and Anderson, H. (2017). Cannabinoid signaling in health and disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(4), pp.311-327.
- Lynch, M., Cesar-Rittenberg, P. and Hohmann, A. (2014). A Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Pilot Trial With Extension Using an Oral Mucosal Cannabinoid Extract for Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Journal of Pain and Symptom Management*, 47(1), pp.166-173.
- Maldonado, R., Baños, J. and Cabañero, D. (2016). The endocannabinoid system and neuropathic pain. *PAIN*, 157, pp.S23-S32.
- Matsuda, L., *et al.* (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), pp.561-564.
- McFarland, M. and Barker, E. (2004). Anandamide transport. *Pharmacology & Therapeutics*, 104(2), pp.117-135.

- Mechoulam, R., *et al.* (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), pp.83-90.
- Munro, S., Thomas, K. and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), pp.61-65.
- Murataeva, N., Straiker, A. and Mackie, K. (2014). Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *British Journal of Pharmacology*, 171(6), pp.1379-1391.
- Nadal, X., *et al.* (2013). Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: New insights from knockout studies. *European Journal of Pharmacology*, 716(1-3), pp.142-157.
- Nurmikko, T., *et al.* (2007). Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain*, 133(1), pp.210-220.
- Oddi, S., *et al.* (2008). Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), pp.840-850.
- Pertwee, R. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(2), pp.129-180.
- Porter, A., *et al.* (2002). Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the CB1 Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), pp.1020-1024.
- Racz, I., *et al.* (2008). Crucial Role of CB2 Cannabinoid Receptor in the Regulation of Central Immune Responses during Neuropathic Pain. *Journal of Neuroscience*, 28(46), pp.12125-12135.

- Rog, D., *et al.* (2005). Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology*, 65(6), pp.812-819.
- Ross, R. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 140(5), pp.790-801.
- Schimrigk, S., *et al.* (2017). Dronabinol Is a Safe Long-Term Treatment Option for Neuropathic Pain Patients. *European Neurology*, 78(5-6), pp.320-329.
- Schlosburg, J., *et al.* (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nature Neuroscience*, 13(9), pp.1113-1119.
- Scholz, J., *et al.* (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11. *PAIN*, 160(1), pp.53-59.
- Serpell, M., *et al.* (2014). A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group study of THC/CBD spray in peripheral neuropathic pain treatment. *European Journal of Pain*, 18(7), pp.999-1012.
- Steeds, C. (2016). The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*, 34(2), pp.55-59
- Svendsen, K., Jensen, T. and Bach, F. (2004). Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ*, 329(7460), p.253.
- Toth, C., *et al.* (2012). An enriched-enrolment, randomized withdrawal, flexible-dose, double-blind, placebo-controlled, parallel assignment efficacy study of nabilone as adjuvant in the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain*, 153(10), pp.2073-2082.

- Tsantoulas, *et al.* (2012). Sensory Neuron Downregulation of the Kv9.1 Potassium Channel Subunit Mediates Neuropathic Pain following Nerve Injury. *Journal of Neuroscience*, 32(48), pp.17502-17513.
- Turcotte, D., *et al.* (2015). Nabilone as an Adjunctive to Gabapentin for Multiple Sclerosis-Induced Neuropathic Pain: A Randomized Controlled Trial. *Pain Medicine*, 16(1), pp.149-159.
- van Amerongen, G., *et al.* (2018). Effects on Spasticity and Neuropathic Pain of an Oral Formulation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in Patients With Progressive Multiple Sclerosis. *Clinical Therapeutics*, 40(9), pp.1467-1482.
- Wade, D., *et al.* (2004). Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. *Multiple Sclerosis Journal*, 10(4), pp.434-441.
- Watanabe, H., *et al.* (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, 424(6947), pp.434-438.
- WHO (2018). *Cannabis*. [Em linha] Disponível em <http://www.who.int/substance_abuse/facts/cannabis/en/>. [Consultado em 10/11/2018]
- Wollner, H., *et al.* (1942). Isolation of a Physiologically Active Tetrahydrocannabinol from Cannabis Sativa Resin. *Journal of the American Chemical Society*, 64(1), pp.26-29.
- Wood, T., Spivey, W. and Easterfield, T. (1899). III.—Cannabinol. Part I. *J. Chem. Soc., Trans.*, 75(0), pp.20-36.

Zou, S. and Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), p.833.

Zygmunt, P., *et al.* (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), pp.452-457.