

Rodrigo Zon Soares<sup>1</sup>, Francieli Vuolo<sup>1</sup>, Dhébora Mozena Dall'Igna<sup>1</sup>, Monique Michels<sup>1</sup>, José Alexandre de Souza Crippa<sup>2</sup>, Jaime Eduardo Cecílio Hallak<sup>2</sup>, Antonio Waldo Zuardi<sup>2</sup>, Felipe Dal-Pizzol<sup>1</sup>

# Avaliação do papel do sistema canabidiol em um modelo de lesão renal por isquemia/reperfusão em animais

*Evaluation of the role of the cannabidiol system in an animal model of ischemia/reperfusion kidney injury*

1. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Graduação em Ciências da Saúde, Unidade de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense - Criciúma (SC), Brasil.  
2. Departamento de Neurociências e Comportamento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

## RESUMO

**Objetivo:** Investigar os efeitos da administração de canabidiol em um modelo de isquemia/reperfusão renal em animais.

**Métodos:** Foi induzida uma lesão renal, por meio de 45 minutos de isquemia renal seguida por reperfusão. Administrou-se canabidiol (5mg/kg) imediatamente após a reperfusão.

**Resultados:** A isquemia/reperfusão aumentou os níveis de interleucina 1 e fator de necrose tumoral, o que foi atenuado pelo tratamento com canabidiol. Além disso, o canabidiol foi capaz de diminuir o dano oxidativo de lipídios e proteínas, mas não os níveis de

nitrito/nitrato. A lesão renal após isquemia/reperfusão pareceu ser independente da expressão dos receptores canabidiol-1 e canabidiol-2, já que não houve aumento significativo desses receptores após a reperfusão.

**Conclusão:** O tratamento com canabidiol teve um efeito protetor contra a inflamação e o dano oxidativo em um modelo de isquemia/reperfusão renal. Esses efeitos parecem não ocorrer via ativação dos receptores canabidiol-1/canabidiol-2.

**Descritores:** Canabidiol/uso terapêutico; Receptores de canabinoides; Isquemia/metabolismo; Traumatismo por reperfusão/metabolismo; Rim/lesões; Inflamação

## INTRODUÇÃO

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma condição clínica que se caracteriza por deterioração aguda da função renal.<sup>(1)</sup> A IRA tem elevada incidência e mortalidade, principalmente em pessoas mais idosas com doenças crônicas e em pacientes graves.<sup>(2)</sup> Uma das principais causas da IRA é a hipoperfusão renal, que tem como via final comum a morte das células tubulares.<sup>(1)</sup>

Durante a isquemia, ocorre uma resposta inflamatória. Neutrófilos infiltram o tecido renal e liberam diversas citocinas, e também está presente uma vasoconstrição renal.<sup>(3)</sup> Além disso, ocorrem dano às células tubulares e perda da polarização celular,<sup>(4)</sup> que, por sua vez, comprometem o transporte ativo de sódio e água, e são seguidos pela obstrução do lume tubular.<sup>(4)</sup> Além do mais, ocorre acúmulo de hipoxantina e, após a reperfusão, seu metabolismo gera a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).<sup>(3)</sup> Nesse contexto, diversos estudos tentaram demonstrar o papel protetor exercido por substâncias anti-inflamatórias na isquemia/reperfusão (I/R).<sup>(5-10)</sup>

O canabidiol (CBD) é um composto não psicotrópico da planta *Cannabis sativa*. Diversos dos efeitos farmacológicos do CBD são mediados por sua

**Conflitos de interesse:** Nenhum.

Submetido em 9 de novembro de 2015

Aceito em 30 de novembro de 2015

### Autor correspondente:

Felipe Dal-Pizzol

Laboratório de Fisiopatologia Experimental  
Universidade do Extremo Sul Catarinense  
CEP: 88806-000 - Criciúma (SC), Brasil  
E-mail: piz@unesoc.net

**Editor responsável:** Flávia Ribeiro Machado

DOI: 10.5935/0103-507X.20150064

interação com receptores canabinoides (CB1 e CB2). A expressão de CB1 ocorre predominantemente no sistema nervoso central (SNC), enquanto o CB2 é expresso principalmente nas células imunes. Foi demonstrado que o CBD é um potente agente anti-inflamatório e exerce seus efeitos por meio da indução de apoptose das células T, inibição da proliferação celular, supressão da produção de citocinas, e indução de células T reguladoras.<sup>(11-16)</sup> Além disto, demonstrou-se que a inibição dos receptores CB1 pode diminuir a liberação de mediadores inflamatórios e ERO, levando à diminuição da morte de células epiteliais renais.<sup>(15)</sup>

Considerando-se o grande número de estudos em animais que demonstraram a importância da inflamação no desenvolvimento da IRA isquêmica, e a falta de opções terapêuticas na clínica, há uma boa justificativa para se crer que novos agentes anti-inflamatórios podem ser um importante tratamento adjuvante para a IRA. Assim, formulamos a hipótese de que o receptor CB2 está suprarregulado durante um modelo de IRA em animais, e que a administração de CBD é capaz de diminuir a inflamação renal.

## MÉTODOS

Foram obtidos ratos Wistar adultos pertencentes à colônia do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), em Criciúma (SC). Os animais foram instalados em gaiolas apropriadas, ficando cinco animais por gaiola, com alimentos e água disponíveis à vontade. Os animais foram mantidos com ciclos de 12 horas de luz/escurecimento (iluminação ligada às 7h). Todos os procedimentos experimentais que envolveram animais foram realizados em conformidade com as diretrizes do *National Institutes of Health* (NIH) para cuidados e uso de animais laboratoriais e em conformidade com a aprovação do Comitê de Ética da UNESC, 112/2012.

O fármaco CBD (pureza 99,9%) foi gentilmente fornecido pela THC-Pharm (Frankfurt, Alemanha) e STI-Pharm (Brentwood, Reino Unido). O CBD foi preparado como suspensão em monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) 2%. A solução foi preparada imediatamente antes do uso e protegida da luz.

Trinta ratos machos Wistar, com pesos entre 350 e 400g, foram divididos em três grupos iguais: grupo controle/cirurgia falsa (Grupo 1), I/R renal (Grupo 2) e isquemia/reperfusão renal mais CBD (5mg/kg) (Grupo 3).

Os animais foram anestesiados com quetamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) por meio de injeção intraperitoneal. Após, foi realizada uma incisão na parede abdominal,

e o pedículo renal foi dissecado bilateralmente. Os Grupos 2 e 3 tiveram seu pedículo pinçado bilateralmente por 45 minutos. No Grupo 1, o pedículo foi manipulado, mas não pinçado. Imediatamente antes da liberação do pinçamento, administraram-se uma dose de CBD (5mg/kg)<sup>(12)</sup> ou o mesmo volume de solução salina, por punção da aorta. Após 24 horas, os animais foram sacrificados por decapitação, e os rins foram extraídos para exames.

As amostras de tecido renal (50mg/mL) foram homogeneizadas em brometo de hexadecil trimetil amônio a 0,5% e centrifugadas. A suspensão foi sonicada, e uma alíquota de sobrenadante foi misturada a uma solução 1,6mM de TMB e 1mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A atividade de mieloperoxidase (MPO) foi medida por espectrofotometria a 650nm, a 37°C. Os resultados foram expressos como mU/mg de proteína. A atividade de MPO foi avaliada como um indicador de infiltração neutrofílica.

## Níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico

As amostras foram homogeneizadas e incubadas em 60 mM Tris-HCl, pH 7,4 (0,1 mM DTPA) e ácido tiobarbitúrico 0,73% por 60 minutos a 100°C. Após, as amostras foram resfriadas por 15 minutos a 5°C e centrifugadas, e a absorbância foi medida a 535nm. Os níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram expressos como nmol de malondialdeído (MDA) por miligrama de proteína (nmol.g<sup>-1</sup>).<sup>(17)</sup>

As amostras homogenizadas foram precipitadas pela adição de ácido clorídrico e as proteínas foram dissolvidas por guanidina (6M). Acrescentou-se 2,4-dinitrofenilhidrazina, e a base de Schiff formada foi mensurada a 370nm. Os resultados foram expressos como nmol de carbonil por miligrama de carbonilação de proteínas.<sup>(18)</sup>

As amostras foram misturadas com uma solução de cloreto de vanadil e reagente Griess. Após 30 a 40 minutos, determinou-se a absorbância a 540nm.<sup>(19)</sup> Uma solução padrão de nitrato de sódio foi diluída de forma seriada (1,6mM a 200mM) e os níveis de nitrito e nitrato (óxidos de nitrogênio - NOx) foram expressos como mM/mg de proteína.

## Expressão dos receptores CB1 e CB2

O nível proteico de CB1 e CB2 foi mensurado com uma técnica Western blotting, com uso de anticorpos específicos. As amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (w/v) sulfato dodecil de sódio - SDS, 10% (v/v) glicerol), e quantidades iguais de proteína (30mg) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sódico (SDS-PAGE)

e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose. A eficiência da eletroforese foi verificada por coloração de Ponceau S, e as membranas foram bloqueadas em solução salina com tamponamento Tris (TTBS: 100mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo NaCl 0,9% e Tween 20 0,1%) com albumina 5%. As membranas foram incubadas por uma noite a 4°C com anticorpos policlonais de coelho anti-CB1 e anti-CB2 (1:1000). IgG secundária anti-IgG de coelho foi incubada a 1:10.000 por 2 horas e, subsequentemente, as membranas foram lavadas em TTBS e a imunorreatividade foi detectada por quimiluminescência, com uso de quimiluminescência amplificada por geração elétrica. A análise densitométrica foi realizada com uso do programa de computador ImageJ versão 1.34<sup>®</sup>. Todos os resultados são expressos como proporção relativa entre o *blot* e o conteúdo imune de beta-actina.

### Níveis de citocinas

As concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1beta (IL-1 $\beta$ ) foram determinadas utilizando um método ELISA (acrônimo de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em um leitor de microplaca utilizando um *kit* comercial (Peprotech, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

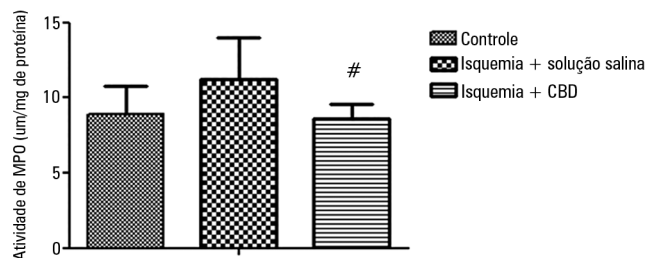
### Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas por uma análise de variância de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de computador *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 21.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). As diferenças foram consideradas significantes quando níveis de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A inflamação renal foi investigada inicialmente pela mensuração da atividade de MPO. Após a I/R, ocorreu um aumento não significativo da atividade de MPO no rim, e os animais tratados com CBD apresentaram um nível mais baixo de atividade de MPO em comparação aos animais com I/R ( $F = 4,15$ ;  $p = 0,03$ ) (Figura 1). Em suporte a este efeito, os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram mais baixos nos animais tratados com CBD quando comparados aos animais tratados com solução salina (IL-1 $\beta$ :  $F = 548$ ;  $p = 0,004$ ; TNF- $\alpha$ :  $F = 8$ ;  $p = 0,001$ ) (Figuras 2A e 2B).

Como inflamação e dano oxidativo são eventos concomitantes, avaliou-se o dano oxidativo aos lipídios e às proteínas. Ambas as mensurações demonstraram aumento



**Figura 1** - Efeitos do tratamento com canabidiol na atividade de mieloperoxidase após lesão renal por isquemia e reperfusão. Os animais sofreram cirurgia falsa ou tiveram o pedículo renal pinçado bilateralmente por 45 minutos. Imediatamente antes de liberar o pinçamento, foi administrada uma dose única de canabidiol (5mg/kg) ou solução salina. Após 24 horas, mediu-se nos rins a atividade de mieloperoxidase. MPO - mieloperoxidase; CBD - canabidiol. Dados expressos como  $\mu\text{m/mg}$  de proteínas. \* Diferente de isquemia/solução salina.  $p < 0,05$ .

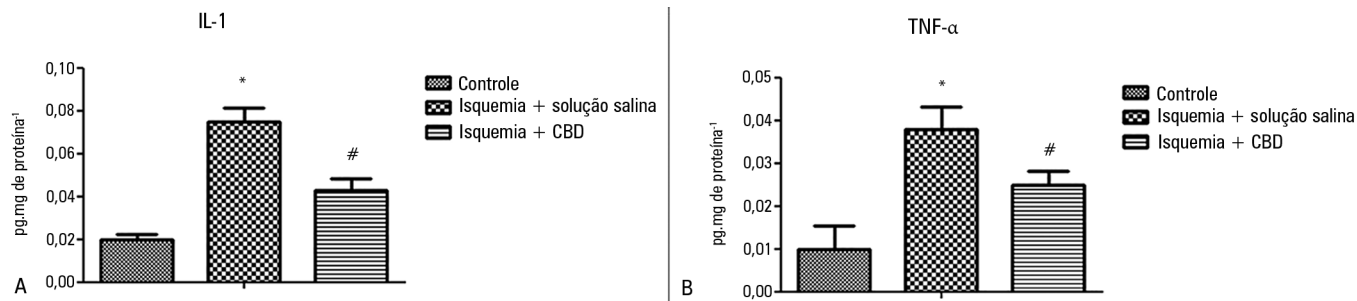
após I/R (Figuras 3A e 3B). Mais ainda, observou-se diminuição destes parâmetros oxidativos nos animais tratados com CBD (MDA:  $F = 6,56$ ;  $p = 0,005$ ; carbonil:  $F = 20,57$ ;  $p = 0,0001$ ). Outro importante mediador do estresse oxidativo e inflamação foi o óxido nítrico (NO). A produção de NO foi determinada de forma indireta pela quantificação de NOx. Conforme demonstrado para os parâmetros de dano oxidativo, houve aumento significativo dos níveis de NOx após a I/R. Em contraste, os animais tratados com CBD apresentaram níveis de NOx similares aos animais controle ( $F = 4,01$ ;  $p = 0,03$ ) (Figura 4).

Como o CBD apresentou efeitos protetores contra a IRA neste modelo em animais, realizamos uma caracterização adicional da expressão de receptores canabinoides. A indução de I/R não modificou o padrão de expressão de CB1 e CB2 (Figuras 5A e 5B). Ocorreu apenas uma tendência à maior expressão de CB1, que não foi revertida pelo tratamento com CBD (CB1:  $F = 2,09$ ;  $p = 0,174$ ; CB2:  $F = 3,93$ ;  $p = 0,94$ ).

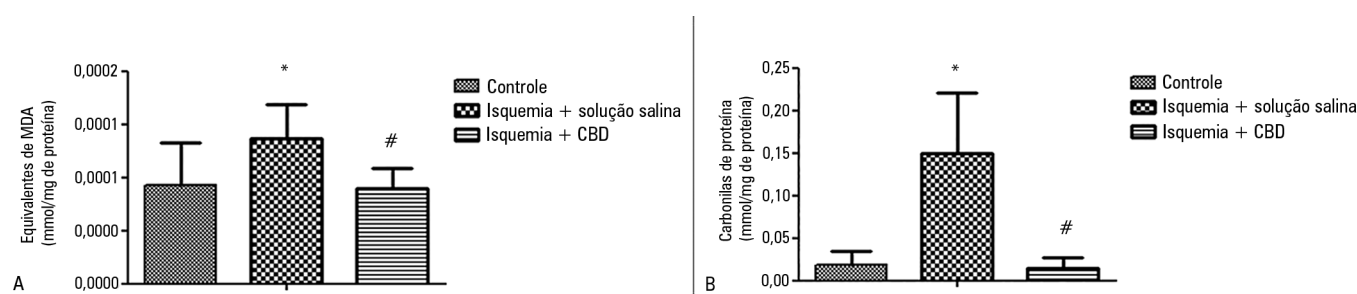
## DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que o tratamento com CBD após a lesão foi capaz de diminuir o dano oxidativo e a inflamação dos rins em um modelo I/R em animais. Não ocorreu variação significativa na expressão de CB1 e CB2 após a reperfusão, sugerindo que não há uma suprarregulação da sinalização de CBD no desenvolvimento da lesão renal após I/R, embora o benefício terapêutico tenha permanecido.

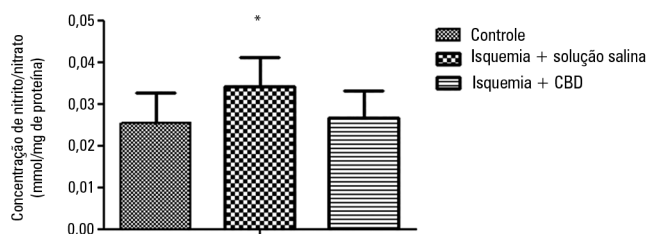
A atividade de MPO é proporcional ao dano renal após I/R.<sup>(20)</sup> Além disso, uma vez ocorrido o dano, há um aumento de diversos mediadores inflamatórios. Isso amplifica a resposta inflamatória inicial, induzindo a expressão de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), que desempenha



**Figura 2** - Efeito do tratamento com canabidiol nos níveis de citocinas após lesão renal por isquemia e reperfusão. Os animais passaram por cirurgia falsa, ou tiveram seus pedículos renais pinçados bilateralmente por 45 minutos. Imediatamente antes de liberar o pinçamento, foi administrada uma dose única de canabidiol (5mg/kg) ou solução salina. Após 24 horas, foram medidos os níveis de interleucina 1 (A) e fator de necrose tumoral alfa (B) nos rins. IL-1 - interleucina 1; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa; CBD - canabidiol. Os dados são expressos como pg/mg de proteína. \* Diferente do controle; # diferente de isquemia/solução salina.  $p < 0,05$ .



**Figura 3** - Efeitos do tratamento com canabidiol nos níveis dos parâmetros de dano oxidativo após lesão renal por isquemia e reperfusão. Os animais passaram por cirurgia falsa ou tiveram seu pedículo renal pinçado bilateralmente por 45 minutos. Imediatamente antes da liberação do pinçamento, foi administrada uma dose única de canabidiol (5mg/kg) ou solução salina. Após 24 horas, foram mensurados nos rins os níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (A) e carbonilas de proteína (B). MDA - malondialdeído; CBD - canabidiol. Os dados são expressos como nmol/mg de proteína. \* Diferente do controle; # diferente de isquemia/solução salina.  $p < 0,05$ .



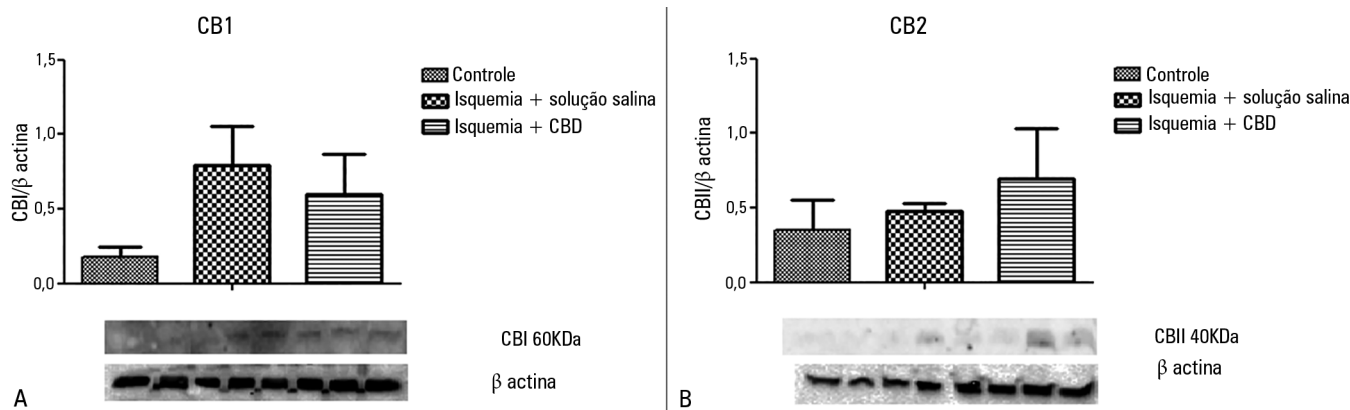
**Figura 4** - Efeitos do tratamento com canabidiol nos níveis de nitrito/nitrato após lesão renal por isquemia e reperfusão. Os animais passaram por cirurgia falsa ou tiveram seu pedículo renal pinçado bilateralmente por 45 minutos. Imediatamente antes da liberação do pinçamento, foi administrada uma dose única de canabidiol (5mg/kg) ou solução salina. Após 24 horas, foram mensurados nos rins os níveis de nitrito/nitrato. CBD - canabidiol. Os dados são expressos como pg/mg de proteína. \* Diferente do controle.  $p < 0,05$ .

um relevante papel na propagação da inflamação e do dano oxidativo.<sup>(21-23)</sup> Como o sistema CBD foi inicialmente demonstrado no sistema nervoso central, existem numerosas descrições de um efeito anti-inflamatório do CBD neste contexto.<sup>(24)</sup> Os efeitos sobre o SNC parecem ser parcialmente dependentes de receptores de adenosina<sup>(25)</sup> e CB2.<sup>(26)</sup> Apesar disso, alguns dos efeitos anti-inflamatórios

do CBD parecem ser dependentes de seu efeito antioxidante.<sup>(27)</sup> O CBD afeta os genes classicamente associados com a regulação da resposta ao estresse, como Nrf2, o que concorda com nossos resultados.

Há pouca informação disponível a respeito dos efeitos protetores do CBD fora do sistema nervoso central. Mais ainda, mesmo os efeitos protetores periféricos do CBD poderiam ser mediados pelo controle do eixo neuroimune.<sup>(26)</sup> No entanto, observou-se recentemente que o CBD poderia, na verdade, piorar a lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo LPS.<sup>(28)</sup> O pré-tratamento com CBD parece ser capaz de melhorar a função renal em um modelo de I/R em animais.<sup>(29)</sup> Aqui, demonstramos, administrando o fármaco após a lesão, que o CBD diminui o dano oxidativo renal e a inflamação, em um modelo em animais, ou seja, com o uso de um modelo mais relevante, do ponto de vista clínico.

Diferentemente de outros canabinoides, o CBD tem pouca afinidade com os receptores CB1 e CB2. Os efeitos anti-inflamatório e antioxidante deste composto podem ser secundários por uma ação direta, ou por eventuais novos receptores diferentes de CB1/CB2.<sup>(27)</sup> Por outro lado,



**Figura 5** - Efeitos do canabidiol nos níveis de CB1 e CB2 após lesão renal por isquemia e reperfusão. Os animais passaram por cirurgia falsa ou tiveram seu pedículo renal pinçado bilateralmente por 45 minutos. Imediatamente antes da liberação do pinçamento, foi administrada uma dose única de canabidiol (5mg/kg) ou solução salina. Após 24 horas, foram mensurados nos rins os níveis de CB1 (A) e CB2 (B). CBD - canabidiol. Os resultados são expressos como proporção relativa entre o *blot* e o imunoc conteúdo de beta-actina. Ordem das bandas: duas bandas, controle; três bandas, isquemia + solução salina; três bandas isquemia + CBD.

há evidências que sugerem que, apesar da baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2, o CBD antagoniza os agonistas dos receptores CB1/CB2, mesmo em baixas concentrações.<sup>(30)</sup> Demonstramos que os receptores CB1 e CB2 não são suprarregulados após I/R renal, sugerindo que os mecanismos de lesão renal não são relacionados com essa via. Estes achados concordam com a ideia de que o CBD não age por via dos receptores CB1/CB2, pelo menos no contexto da lesão renal.

Demonstramos previamente que o CBD exerce efeitos protetores contra a lesão pulmonar induzida por LPS, o que foi parcialmente regulado por receptores de adenosina.<sup>(14)</sup> Mais ainda, as ações anti-inflamatórias de análogos de canabinoides, como o NAGly24 e o ácido ajulêmico, foram atribuídas à sua capacidade de promover a liberação de ácido araquidônico livre. Nestes exemplos, um resultado desta ação foi a formação de lipídios inflamatórios como lipoxina A4 e 15d-PGJ2.<sup>(31,32)</sup> Um mecanismo similar poderia explicar algumas das ações anti-inflamatórias do CBD. Foi também identificado que o envolvimento de receptores A2A poderia infrarregular as células imunes hiper-reativas, resultando em proteção dos tecidos de danos inflamatórios colaterais. Foi também relatado que o CBD tem a capacidade de acentuar a sinalização de adenosina por meio da inibição da captação e fornecer um mecanismo de receptor não canabinoide por meio do qual o CBD pode diminuir a inflamação.<sup>(33,34)</sup> O tratamento com CBD atenuou a expressão de NOX4 e NOX1 induzida por cisplatina, e do conseqüente estresse oxidativo renal. Além disso, o CBD também diminuiu a resposta inflamatória induzida por cisplatina, a superexpressão de iNOS, e a formação de nitrotirosina.<sup>(35)</sup> Os efeitos benéficos do tratamento com CBD em um modelo de

lesão hepática por I/R em camundongos foram mantidos em camundongos *knockout* CB2, e não foram reduzidos *in vitro* por antagonistas de CB1 ou CB2, sugerindo um efeito independente da ativação de receptor.<sup>(15)</sup>

Nossos resultados devem ser interpretados à luz de algumas limitações. Primeiramente, não medimos marcadores da função renal, de forma que não podemos afirmar se os efeitos anti-inflamatórios terão um impacto direto na função renal. Apesar disso, como a inflamação renal se relaciona de forma próxima com a disfunção, e os efeitos protetores aqui demonstrados são robustos, cremos que esta limitação seja menos importante. Em segundo lugar, não apresentamos uma curva de resposta à dose e ao tempo, uma vez que alguns autores demonstraram um efeito deletério do CBD<sup>(27)</sup> de forma que não é possível excluir um efeito do CBD em uma curva com forma de “U” em nosso modelo.

## CONCLUSÃO

O tratamento com canabidiol aparentemente teve efeito protetor contra a inflamação e o dano oxidativo em um modelo de isquemia/reperfusão do rim. Estes efeitos não parecem ocorrerem por via de ativação dos receptores CB1/CB2. Novos estudos, que tratem dos novos canabinoides e outros receptores, podem ajudar a elucidar o mecanismo exato de ação do canabidiol em condições inflamatórias, fora do sistema nervoso central.

## AGRADECIMENTOS

Financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

## ABSTRACT

**Objective:** This work aimed to investigate the effects of the administration of cannabidiol in a kidney ischemia/reperfusion animal model.

**Methods:** Kidney injury was induced by 45 minutes of renal ischemia followed by reperfusion. Cannabidiol (5mg/kg) was administered immediately after reperfusion.

**Results:** Ischemia/reperfusion increased the IL-1 and TNF levels, and these levels were attenuated by cannabidiol treatment. Additionally, cannabidiol was able to decrease lipid and protein oxidative damage, but not the nitrite/nitrate levels. Kidney

injury after ischemia/reperfusion seemed to be independent of the cannabidiol receptor 1 and cannabidiol receptor 2 (CB1 and CB2) expression levels, as there was no significant increase in these receptors after reperfusion.

**Conclusion:** The cannabidiol treatment had a protective effect against inflammation and oxidative damage in the kidney ischemia/reperfusion model. These effects seemed to be independent of CB1/CB2 receptor activation.

**Keywords:** Cannabidiol/therapeutic use; Receptors, cannabinoid; Ischemia/metabolism; Reperfusion injury/metabolism; Kidney/injuries; Inflammation

## REFERÊNCIAS

- Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4210-21.
- Cruz MG, Dantas JG, Levi TM, Rocha Mde S, de Souza SP, Boa-Sorte N, et al. Septic versus non-septic acute kidney injury in critically ill patients: characteristics and clinical outcomes. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2014;26(4):384-91.
- Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol*. 2007;123(1):7-13. Review.
- Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the post-ischemic rat kidney. *Am J Physiol*. 1998;275(3 Pt 1):C711-31.
- Bernardi RM, Constantino L, Machado RA, Vuolo F, Budni P, Ritter C, et al. N-acetylcysteine and deferrioxamine protects against acute renal failure induced by ischemia/reperfusion in rats. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012;24(3):219-23.
- Ventura CG, Coimbra TM, de Campos SB, de Castro I, Yu L, Seguro AC. Mycophenolate mofetil attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(10):2524-33.
- Demirbilek S, Karaman A, Baykarabulut A, Akin M, Gürünluoglu K, Türkmen E, et al. Polenylphosphatidylcholine pretreatment ameliorates ischemic acute renal injury in rats. *Int J Urol*. 2006;13(6):747-53.
- Yang N, Luo M, Li R, Huang Y, Zhang R, Wu Q, et al. Blockage of JAK/STAT signaling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(1):91-100.
- Asaga T, Uek M, Chujo K, Taie S. JTE-607, an inflammatory cytokine synthesis inhibitor, attenuates ischemia/reperfusion - induced renal injury by reducing neutrophil activation in rats. *J Biosci Bioeng*. 2008;106(1):22-6.
- Tucci Junior S, Carvalho RM, Celini FM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tirapelli LF, et al. Renal ischemia and reperfusion injury: influence of chlorpromazine on renal function and lipid peroxidation. *Acta Cir Bras*. 2008;23 Suppl 1:42-6; discussion 46.
- Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hedge VL, Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem*. 2009;1(7):1333-49.
- Vuolo F, Petronilho F, Sonai B, Ritter C, Hallak JE, Zuardi AW, et al. Evaluation of serum cytokines levels and the role of cannabidiol treatment in animal model of asthma. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:538670.
- Cassol-Jr OJ, Comim CM, Silva BR, Hermani FV, Constantino LS, Felisberto F, et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res*. 2010;1348:128-38.
- Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretto LB, Mariano-Souza DP, Quintero-Filho WM, et al. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine (A2A) receptor. *Eur J Pharmacol*. 2012;678(1-3):78-85.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Horváth B, Bátkai S, Park O, Tanchian G, et al. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitritative stress, and cell death. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(10):1368-81.
- Mukhopadhyay P, Pan H, Rajesh M, Bátkai S, Patel V, Harvey-White J, et al. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):657-68.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71.
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. 2000;7(1):53-8. Review.
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):389-406.
- Fritz KS, Petersen DR. Exploring the biology of lipid peroxidation - derived protein carbonylation. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(9):1411-9.
- Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(4):277-89.
- Valvassori SS, Elias G, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, et al. Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychopharmacol*. 2011;25(2):274-80.
- Mecha M, Feliú A, Iñigo PM, Mestre L, Carrillo-Salinas FJ, Guaza C. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. *Neurobiol Dis*. 2013;59:141-50.
- Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, Santos M, Martínez-Pinilla E, Moreno E, et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology*. 2013;71:282-91.
- Juknat A, Pietr M, Kozela E, Rimmerman N, Levy R, Gao F, et al. Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *PLoS One*. 2013;8(4):e61462.
- Karmaus PW, Wagner JG, Harkema JR, Kaminski NE, Kaplan BL. Cannabidiol (CBD) enhances lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunotoxicol*. 2013;10(3):321-8.

29. Fouad AA, Al-Mulhim AS, Jresat I. Cannabidiol treatment ameliorates ischemia/reperfusion renal injury in rats. *Life Sci.* 2012;91(7-8):284-92.
30. Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007;150(5):613-23.
31. Stebulis JA, Johnson DR, Rossetti RG, Burstein SH, Zurier RB. Ajulemic acid, a synthetic cannabinoid acid, induces an antiinflammatory profile of eicosanoids in human synovial cells. *Life Sci.* 2008;83(19-20):666-70.
32. Gilroy DW. Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(4):524-8.
33. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 2001;414(6866):916-20.
34. Carrie EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(20):7895-900.
35. Pan H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Patel V, Mukhopadhyay B, Gao B, et al. Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328(3):708-14.