

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

TALITA BÁRBARA PATROCÍNIO

**EFEITOS *IN VITRO* DO CANABIDIOL NA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR
METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA EM ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS:
PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 E TRPV1**

ALFENAS/MG

2026

TALITA BÁRBARA PATROCÍNIO

**EFEITOS *IN VITRO* DO CANABIDIOL NA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR
METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA EM ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS:
PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 E TRPV1**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde
da Universidade Federal de Alfenas - MG.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde

Orientadora: Profª. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

ALFENAS/MG

2026

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Patrocínio, Talita Bárbara .

Efeitos *in vitro* do canabidiol na citotoxicidade induzida por metil-éster de anidroecgonina em astrócitos hipocâmpais: participação dos receptores cb1 e trpv1 / Talita Bárbara Patrocínio. - Alfenas, MG, 2026.

56 f. : il. -

Orientador(a): Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Astrócitos. 2. Metil-éster de anidroecgonina. 3. Canabidiol. I. Leitão, Silvia Graciela Ruginsk, orient. II. Título.

EFEITOS IN VITRO DO CANABIDIOL NA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA EM ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 E TRPV1

A presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências aplicadas à Saúde

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2026.

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Lívea Dornela Godoy

Instituição: Universidade federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Presidente**, em 27/02/2026, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1733311** e o código CRC **6BA7C103**.

Aos meus pais, irmãos e esposo, que me apoiam incondicionalmente. E a todos que acreditam na ciência e educação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Bosco e Maria Inês, pelo amor e apoio incondicional, pela educação, pelo exemplo de coragem e pelo esforço feito para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, Guilherme, Taís e Singer, pelo carinho, incentivo e exemplo de determinação.

Ao meu esposo, Matheus, por estar sempre ao meu lado em momentos tão importantes em minha vida.

À minha orientadora, a Professora Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, pelos ensinamentos, paciência, confiança e apoio durante estes anos. Meu respeito e admiração. Muito obrigada!

Aos técnicos, Marina e José, por todo suporte e conhecimento compartilhado.

Aos professores, que ao longo da pós-graduação contribuíram para minha formação com ensinamentos e como exemplos. Gratidão!

Aos professores convidados a comporem a Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, por aceitarem o nosso convite. Agradeço também pelas discussões e contribuições decorrentes dela.

À UNIFAL e ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas Aplicadas à Saúde, pela assistência na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O consumo de crack envolve a inalação da cocaína e de seu principal produto de pirólise, o metil-éster da anidroecgonina (AEME), um composto neurotóxico capaz de induzir estresse oxidativo e apoptose. No entanto, seus efeitos sobre células gliais permanecem pouco conhecidos. Considerando que os astrócitos são as células gliais mais abundantes do SNC e essenciais para a homeostase neuronal e o sistema antioxidante, este estudo avaliou os efeitos do AEME sobre a viabilidade, os níveis de cálcio intracelular, a reatividade e capacidade antioxidante de astrócitos hipocâmpais, bem como a possível modulação pelo canabidiol (CBD) e a participação dos receptores CB1 e TRPV1. Astrócitos hipocâmpais de ratos neonatos foram expostos, por 2 h 30 min, a CBD (10 μ M), rimonabanto (RIMO, 1 μ M), capsazepina (CAPS, 30 μ M) e AEME (0,1 mM), isoladamente ou em combinações. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, a reatividade pela expressão de GFAP, os níveis de cálcio por ensaio colorimétrico e a capacidade antioxidante pelos níveis de GSH. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFAL (protocolo 0024/2025). O AEME reduziu significativamente a viabilidade dos astrócitos em relação ao controle ($8,06 \pm 0,42\%$ vs. $99,99 \pm 2,52\%$; $p < 0,001$). O CBD ($66,75 \pm 4,43\%$; $p < 0,001$), RIMO ($77,62 \pm 4,94\%$; $p < 0,001$) e CAPS ($89,02 \pm 1,44\%$; $p < 0,001$) isoladamente também diminuíram a viabilidade. A co-incubação de CBD com AEME atenuou parcialmente a toxicidade induzida pelo AEME ($21,00 \pm 1,05\%$ vs. $8,06 \pm 0,42\%$; $p < 0,01$). Tanto o AEME ($p < 0,05$) quanto o CBD ($p < 0,01$) aumentaram a expressão de GFAP, sem alterações significativas pela presença de antagonistas. O AEME aumentou significativamente os níveis de cálcio intracelular em comparação ao controle ($114,58 \pm 4,54$ vs. $395,22 \pm 0,74$; $p < 0,001$). Esse aumento foi atenuado pela co-incubação com CBD + AEME ($213,97 \pm 3,50$; $p < 0,01$), RIMO + AEME ($155,46 \pm 8,70$; $p < 0,001$) e CAPS + AEME ($151,49 \pm 9,24$; $p < 0,001$). A presença dos antagonistas não aboliu o efeito redutor do CBD sobre os níveis de cálcio intracelular. Em relação ao GSH, a exposição ao AEME reduziu significativamente seus níveis em comparação ao grupo controle ($3,32 \pm 0,17$ vs. $1,47 \pm 0,36$; $p < 0,05$). De forma semelhante, o tratamento isolado com CBD também promoveu depleção do antioxidante ($3,32 \pm 0,17$ vs. $1,49 \pm 0,16$; $p < 0,05$). Por outro lado, a co-incubação de AEME com os antagonistas resultou em níveis de GSH significativamente maiores do que aqueles observados no grupo tratado apenas com AEME, tanto para RIMO + AEME ($3,46 \pm 0,16$ vs. $1,47 \pm 0,36$; $p < 0,05$) quanto para CAPS + AEME ($4,66 \pm 0,01$ vs. $1,47 \pm 0,36$; $p < 0,01$). Entretanto, a adição de CBD às combinações de AEME com os antagonistas resultou em uma redução significativa dos níveis de GSH em relação aos grupos tratados com AEME + CAPS ($4,66 \pm 0,01$ vs. $1,28 \pm 0,11$; $p < 0,01$) e AEME + RIMO ($3,46 \pm 0,16$ vs. $0,62 \pm 0,12$; $p < 0,01$). Portanto, os resultados indicam que o AEME reduz a viabilidade, aumenta os níveis intracelulares de cálcio, diminui os níveis de GSH e aumenta a expressão de GFAP nos astrócitos, enquanto o CBD isolado apresenta efeitos semelhantes. A combinação com CBD atenuou parcialmente a redução de viabilidade e o aumento de cálcio induzido pelo AEME, mas não preveniu alterações em GFAP ou GSH. A análise dos receptores CB1 e TRPV1 sugere que essas vias modulam principalmente os níveis de cálcio e a disponibilidade intracelular de GSH, sem impactar significativamente a viabilidade ou a reatividade astrocitária. Em síntese, nas condições empregadas, o CBD apresentou efeito dual, atenuando parcialmente a toxicidade induzida pelo AEME, mas impactando negativamente os astrócitos em condições basais.

Palavras-chave: astrócitos; canabidiol; metil-éster da anidroecgonina.

ABSTRACT

Crack consumption involves the inhalation of cocaine and its main pyrolysis product, anhydroecgonine methyl ester (AEME), a neurotoxic compound capable of inducing oxidative stress and apoptosis. However, its effects on glial cells remain poorly understood. Considering that astrocytes are the most abundant glial cells in the central nervous system and are essential for neuronal homeostasis and antioxidant defense, this study evaluated the effects of AEME on hippocampal astrocyte viability, intracellular calcium levels, reactivity, and antioxidant capacity, as well as the potential modulation by cannabidiol (CBD) and the involvement of CB1 and TRPV1 receptors. Hippocampal astrocytes from neonatal rats were exposed for 2 h 30 min to CBD (10 μ M), rimonabant (RIMO, 1 μ M), capsazepine (CAPS, 30 μ M), and AEME (0.1 mM), alone or in combination. Cell viability was assessed by the MTT assay, reactivity by GFAP expression, calcium levels by a colorimetric assay, and antioxidant capacity by GSH levels. All procedures were approved by the UNIFAL Animal Research Ethics Committee (protocol 0024/2025). AEME significantly reduced astrocyte viability compared with control ($8.06 \pm 0.42\%$ vs. $99.99 \pm 2.52\%$; $p < 0.001$). CBD ($66.75 \pm 4.43\%$; $p < 0.001$), RIMO ($77.62 \pm 4.94\%$; $p < 0.001$), and CAPS ($89.02 \pm 1.44\%$; $p < 0.001$) alone also decreased viability. Co-incubation of CBD with AEME partially attenuated AEME-induced toxicity ($21.00 \pm 1.05\%$ vs. $8.06 \pm 0.42\%$; $p < 0.01$). Both AEME ($p < 0.05$) and CBD ($p < 0.01$) increased GFAP expression, with no significant changes in the presence of antagonists. AEME significantly increased intracellular calcium levels compared with control (114.58 ± 4.54 vs. 395.22 ± 0.74 ; $p < 0.001$). This increase was attenuated by co-incubation with CBD + AEME (213.97 ± 3.50 ; $p < 0.01$), RIMO + AEME (155.46 ± 8.70 ; $p < 0.001$), and CAPS + AEME (151.49 ± 9.24 ; $p < 0.001$). The presence of antagonists did not abolish the calcium-lowering effect of CBD. Regarding GSH, AEME exposure significantly reduced its levels compared with control (3.32 ± 0.17 vs. 1.47 ± 0.36 ; $p < 0.05$). Similarly, CBD alone also depleted this antioxidant (3.32 ± 0.17 vs. 1.49 ± 0.16 ; $p < 0.05$). In contrast, co-incubation of AEME with antagonists resulted in significantly higher GSH levels than AEME alone, for both RIMO + AEME (3.46 ± 0.16 vs. 1.47 ± 0.36 ; $p < 0.05$) and CAPS + AEME (4.66 ± 0.01 vs. 1.47 ± 0.36 ; $p < 0.01$). However, the addition of CBD to AEME + antagonist combinations significantly reduced GSH levels compared with AEME + CAPS (4.66 ± 0.01 vs. 1.28 ± 0.11 ; $p < 0.01$) and AEME + RIMO (3.46 ± 0.16 vs. 0.62 ± 0.12 ; $p < 0.01$). Overall, the results indicate that AEME reduces viability, increases intracellular calcium, decreases GSH levels, and increases GFAP expression in astrocytes, while CBD alone produces similar effects. CBD co-treatment partially attenuated AEME-induced loss of viability and calcium elevation but did not prevent GFAP or GSH alterations. CB1 and TRPV1 receptor analysis suggests that these pathways mainly modulate intracellular calcium levels and GSH availability, without significantly affecting astrocyte viability or reactivity. Under the present experimental conditions, CBD showed a dual effect, partially attenuating AEME-induced toxicity while negatively impacting astrocytes under basal conditions.

Keywords: astrocytes; cannabidiol; anhydroecgonine methyl ester

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	12
3	JUSTIFICATIVA.....	13
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
4.1	METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA.....	14
4.2	CITOTOXICIDADE DO METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA.....	16
4.3	ASTRÓCITOS COMO ALVOS EM POTENCIAL DO AEME NO SNC.....	17
4.4	CBD COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA.....	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1	FÁRMACOS.....	26
5.2	ANIMAIS.....	26
5.3	CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS.....	26
5.4	TRATAMENTOS.....	27
5.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	27
5.6	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CELULAR.....	28
5.7	AVALIAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR.....	28
5.8	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE GSH.....	29
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6	RESULTADOS.....	31
6.1	EFEITO CITOTÓXICO DO AEME EM ASTRÓCITOS.....	31
6.2	EFEITO PARADOXAL DO CBD SOBRE ASTRÓCITOS.....	31
6.3	INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES CB1 SOBRE A VIABILIDADE ASTROCITÁRIA.....	32
6.4	INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES TRPV1 SOBRE VIABILIDADE ASTROCITÁRIA.....	33
6.5	O AEME INDUZ REATIVIDADE ASTROCITÁRIA.....	34
6.6	O CBD PROMOVE REATIVIDADE ASTROCITÁRIA.....	34
6.7	INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES CB1 E TRPV1 SOBRE A REATIVIDADE ASTROCITÁRIA.....	36
6.8	EFEITO DO AEME E DO CBD SOBRE O NÍVEIS DE GSH EM ASTRÓCITOS.....	38
6.9	INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES CB1 NOS NÍVEIS DE GSH.....	39
6.10	INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES TRPV1 NOS NÍVEIS DE GSH.....	40
6.11	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR.....	41
6.12	AVALIAÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR SOB TRATAMENTO COM AEME, CBD E CAPSAZEPINA.....	42
7	DISCUSSÃO.....	44
8	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O consumo de crack permanece como um grave problema de saúde pública, estando associado a elevadas taxas de morbidade neurológica, psiquiátrica e social (LENAD III, 2023). Diferentemente de outras formas de uso da cocaína, a inalação da fumaça resultante de sua pirólise expõe o organismo a uma série de subprodutos tóxicos, entre os quais se destaca o metil-éster de anidroecgonina (AEME, do inglês *Anhydroecgonine methyl ester*). Esse composto é formado exclusivamente durante a queima da cocaína e tem sido amplamente reconhecido como um marcador específico de exposição ao crack (Garcia *et al.*, 2012, 2015, 2019).

A literatura descreve que o AEME promove efeitos citotóxicos em células neuronais superiores aos observados para a própria cocaína, com destaque para regiões cerebrais envolvidas em processos cognitivos e emocionais, sobretudo no hipocampo, envolvendo alterações em vias relacionadas à homeostase do cálcio, ao estresse oxidativo e à disfunção neuronal (Romero-Noreña; Contreras-Martinez; Mendivil-Perez, 2024). Contudo, seus efeitos sobre as células gliais permanecem pouco explorados. Entre elas, destacam-se os astrócitos, que representam 30% da população glial do SNC. Essas células atuam na manutenção do equilíbrio do microambiente neural, bem como da defesa antioxidante (Verkhatsky *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023).

Nesse cenário, a exposição ao AEME configura um desafio relevante, uma vez que induz disfunções em neurônios e, possivelmente, em células gliais, contribuindo para os efeitos neurotóxicos associados ao consumo de crack. Conforme a Associação Médica Brasileira e o Conselho Federal de Medicina (2011), não existem terapias comprovadamente eficazes para prevenir ou reverter esses danos, torna-se fundamental explorar estratégias farmacológicas com potencial citoprotetor.

O canabidiol (CBD), um fitocanabinoide não psicoativo derivado da planta *Cannabis sativa*, tem despertado crescente interesse científico devido ao seu amplo espectro de propriedades farmacológicas, como atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras (Nelson *et al.*, 2020). Seus mecanismos de ação são multifatoriais e envolvem tanto a modulação do sistema endocanabinoide quanto a interação com outros alvos moleculares, incluindo os receptores CB1 e TRPV1, ambos expressos em astrócitos (Yousaf *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023).

Diante o exposto, o presente estudo propõe investigar os efeitos do CBD sobre a citotoxicidade induzida pelo AEME em astrócitos hipocampais, com ênfase na participação dos receptores CB1 e TRPV1. A compreensão desses mecanismos poderá esclarecer o papel dos astrócitos na toxicidade associada ao uso de crack e subsidiar estratégias terapêuticas direcionadas à proteção celular e à preservação da homeostase do SNC.

2 OBJETIVOS

O presente estudo apresenta os seguintes objetivos:

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto foi avaliar o potencial efeito neuroprotetor do CBD sobre culturas primárias de astrócitos hipocampais submetidos à toxicidade induzida pelo AEME.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Especificamente, o presente estudo se propôs a avaliar, em cultura celular primária de astrócitos hipocampais expostos ao AEME, na presença ou ausência de canabidiol, bem como na presença de antagonistas dos receptores TRPV1 e CB1:

- a viabilidade celular;
- a reatividade astrocitária;
- a concentração citosólica de cálcio;
- o nível intracelular de GSH.

3 JUSTIFICATIVA

O consumo de crack no Brasil configura um importante problema de saúde pública, com repercussões profundas nos âmbitos social e econômico (Bastos; Bertoni, 2014; Perrenoud et al., 2019). No âmbito social, a dependência está associada ao aumento da criminalidade, incluindo furtos, roubos e homicídios. Dados do Terceiro Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD III, 2023) indicam que aproximadamente de 0,72% da população brasileira, o que corresponde a cerca de 1,2 milhão de pessoas, apresenta dependência de cocaína e/ou crack. Uma parcela expressiva desses usuários convive com comorbidades psiquiátricas, como depressão e transtornos de ansiedade. No âmbito econômico os impactos também são significativos. Segundo dados do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA, 2023), seis unidades federativas (Bahia, Distrito Federal, Pará, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo) destinaram, em conjunto, cerca de R\$7,7 bilhões para ações relacionadas ao enfrentamento das drogas, incluindo gastos com segurança pública, sistema de justiça, Ministério Público, defensoria e sistema penitenciário.

Sabe-se que os usuários de crack estão expostos não apenas à cocaína, mas também ao AEME (Garcia et al., 2012, 2015, 2019). Embora os efeitos da cocaína sobre o SNC sejam amplamente descritos na literatura, os impactos do AEME permanecem pouco explorados, especialmente no que se refere às células gliais, como os astrócitos. Considerando as funções essenciais dessas células na manutenção da homeostase neural, no metabolismo energético, na defesa antioxidante, a escassez de estudos direcionados aos efeitos do AEME sobre astrócitos configura uma lacuna relevante na compreensão dos mecanismos de neurotoxicidade associados ao uso do crack.

A escolha do CBD como possível alternativa terapêutica fundamenta-se em seu amplo espectro de ações neuroprotetoras, anti-inflamatórias e moduladoras da homeostase celular, amplamente descritas na literatura (Nelson et al., 2020; Singh et al., 2023). Diferentemente do THC, o CBD não apresenta efeitos psicoativos, o que favorece seu perfil de segurança para aplicações clínicas (Nelson et al., 2020; Yousaf et al., 2022). Ainda, estudos experimentais demonstraram que o CBD é capaz de modular múltiplas vias moleculares envolvidas na neurotoxicidade, como a regulação do estresse oxidativo, da resposta inflamatória, bem como da homeostase do cálcio intracelular (Martinez et al., 2023). Dessa forma, o CBD pode representar uma estratégia promissora para mitigar os efeitos neurotóxicos induzidos pelo AEME.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

A presente revisão aborda, inicialmente, a formação, as características farmacológicas e a relevância toxicológica do AEME. São abordados os principais mecanismos envolvidos na toxicidade do AEME, incluindo estresse oxidativo. Na sequência, a revisão explora os astrócitos como alvos centrais desses processos, considerando suas funções na homeostase cerebral e defesa antioxidante. Por fim, serão apresentados os aspectos farmacológicos do CBD, com ênfase na modulação dos receptores CB1 e TRPV1 em astrócitos.

4.1 METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA

O AEME, também denominado metilecgonidina, é um composto tóxico formado exclusivamente durante a pirólise da cocaína, processo que ocorre quando a droga é submetida a altas temperaturas, como no consumo do crack. Em temperaturas superiores a 250 °C, a molécula de cocaína sofre clivagem do grupo benzoílo, originando o AEME. Estima-se que aproximadamente 50 a 80% da cocaína original possa ser convertida nesse subproduto durante a queima, ressaltando sua importância química e toxicológica (Garcia *et al.*, 2012, 2015, 2019).

Por ser gerado exclusivamente nesse contexto, o AEME é considerado um marcador específico de exposição ao crack, distinguindo-se da cocaína inalterada em outros padrões de uso (Steenbeek *et al.*, 2022; Romero-Noreña; Contreras-Martinez; Mendivil-Perez, 2024). Dessa forma, usuários de crack estão expostos não apenas à cocaína, mas também a esse composto adicional, que contribui para os efeitos deletérios observados no SNC (Garcia *et al.*, 2012; Oliveira; Dinis-Oliveira, 2018; Bravo-Gomez *et al.*, 2019).

Durante a inalação da fumaça do crack, o AEME é absorvido na forma de aerossol, cujas partículas apresentam diâmetro aerodinâmico médio inferior a 1 µm, favorecendo sua deposição nos alvéolos pulmonares (Wood *et al.*, 1996). Após a absorção pulmonar, o AEME alcança rapidamente a circulação sistêmica e apresenta amplo volume de distribuição (6–10 L/kg), aproximadamente três vezes superior ao da cocaína (1–3 L/kg), sugerindo maior penetração tecidual, especialmente no SNC. Cabe destacar que as concentrações plasmáticas de AEME não refletem diretamente sua biodisponibilidade cerebral, uma vez que o composto tende a se acumular preferencialmente no tecido nervoso (Fandiño, Toennes e Kauert, 2002). Além disso, o AEME é capaz de atravessar a barreira placentária, embora os efeitos sobre o

desenvolvimento embrionário ainda não estejam totalmente elucidados (Kintz *et al.*, 1997; Romero-Noreña; Contreras-Martinez; Mendivil-Perez, 2024).

É importante destacar que as concentrações plasmáticas de AEME não refletem diretamente sua biodisponibilidade cerebral, uma vez que o composto tende a se acumular preferencialmente no tecido nervoso (Fandiño, Toennes e Kauert, 2002). Além disso, o AEME é capaz de atravessar a barreira placentária, embora os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário ainda não estejam totalmente elucidados (Kintz *et al.*, 1997; Romero-Noreña; Contreras-Martinez; Mendivil-Perez, 2024).

O metabolismo do AEME ocorre predominantemente no fígado, embora diferentes órgãos apresentem capacidades oxidativas distintas. Estudos com microsomas de fígado, pulmão, rim e cérebro de ratos demonstraram que, no fígado e nos pulmões, o AEME é convertido em múltiplos metabólitos, incluindo ecgonidina (AE), anhidronorecgonina metil éster (ANEME) e AEME não oxidado (AEMENO). Em contraste, nos rins e no cérebro foi detectada apenas a formação de AE, indicando capacidade metabólica mais limitada nesses tecidos. A hidrólise hepática, por sua vez, mostrou-se cerca de 100 vezes mais eficiente do que nos demais órgãos, reforçando o papel central do fígado na biotransformação do AEME (Fandiño; Toennes; Kauert, 2002).

A eliminação do AEME ocorre de forma relativamente rápida, com meia-vida plasmática aproximada de uma hora, sendo a excreção predominantemente urinária. Tanto o composto inalterado quanto seus metabólitos podem ser detectados na urina. De acordo com Cone *et al.* (1998), as concentrações urinárias de AEME em usuários de crack atingem um pico aproximadamente 2,25 horas após a inalação, com valores médios de 23 ± 15 ng/mL. Entre os metabólitos, a ecgonidina (AE) apresenta maior persistência, podendo ser detectada por até 54 horas após o consumo, sendo considerada um marcador confiável de exposição ao crack. Em razão da curta meia-vida plasmática, a detecção do AEME no sangue é frequentemente limitada e suscetível a resultados falso-negativos (Kintz *et al.*, 1997). No entanto, o composto pode ser identificado em outros fluidos e tecidos biológicos, como saliva, suor e cabelo, o que reforça sua utilidade como biomarcador de exposição (Steenbeek *et al.*, 2022; Romero-Noreña; Contreras-Martinez; Mendivil-Perez, 2024).

4.2 CITOTOXICIDADE DO METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA

Nas últimas décadas, os estudos têm se concentrado na caracterização das propriedades toxicodinâmicas do AEME, com ênfase em regiões cerebrais associadas ao circuito de recompensa, como o hipocampo, o córtex pré-frontal e os núcleos da base (Romero-Noreña; Contreras-Martinez; Mendivil-Perez, 2024).

Garcia *et al.* (2012) foram pioneiros ao investigar os efeitos do AEME em culturas primárias de neurônios hipocámpais de ratos, demonstrando redução significativa da viabilidade celular, com toxicidade superior à observada para a cocaína. Em estudos subsequentes, Garcia *et al.* (2015) aprofundaram esses achados e evidenciaram que parte desse efeito deletério está associada à modulação do sistema colinérgico. O AEME atua como agonista parcial dos receptores muscarínicos M1 e M3, promovendo o aumento do cálcio intracelular e a ativação da fosfolipase C, eventos que culminam em excitotoxicidade neuronal. A utilização de antagonistas seletivos, como a pirenzepina (M1) e o p-F-HHSiD (M3), reduziu significativamente a citotoxicidade, confirmando o envolvimento desses receptores na mediação da neurotoxicidade induzida pelo composto.

Além da ativação colinérgica, evidências indicam que o AEME também desencadeia estresse oxidativo. Esse processo resulta do desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas e a capacidade limitada dos sistemas antioxidantes endógenos em neutralizá-las (Romero-Noreña; Contreras-Martinez; Mendivil-Perez, 2024).

As espécies reativas são moléculas ou átomos altamente instáveis, caracterizados pela presença de elétrons desemparelhados, o que lhes confere elevada reatividade química. Em sistemas biológicos, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o ânion hipoclorito (OCl^-), além das espécies reativas de nitrogênio (ERNs), representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}) e pelo peroxinitrito ($ONOO^-$) (Ionescu-Tucker; Cotman, 2021; Teleanu *et al.*, 2022). A produção exacerbada dessas espécies reativas rompe o equilíbrio redox celular, sobrecarrega os sistemas antioxidantes endógenos e favorece a oxidação de biomoléculas essenciais, como lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, contribuindo para disfunções celulares (Papachristoforou *et al.*, 2020; Teleanu *et al.*, 2022).

A defesa antioxidante endógena envolve a atuação coordenada de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), associadas a

moléculas não enzimáticas, entre as quais se destaca a glutathiona reduzida (GSH) (Ighodaro; Akinloye, 2018; Soll *et al.*, 2021; Saxena *et al.*, 2022). Nesse sistema, a GSH atua como doadora de elétrons em reações catalisadas pela GPx, promovendo a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outros peróxidos orgânicos, com consequente formação de glutathiona dissulfeto (GSSG). A GSSG é posteriormente regenerada a GSH pela ação da glutathiona redutase (GR), assegurando a manutenção do equilíbrio redox intracelular. No entanto, sob condições de estresse oxidativo intenso, a capacidade de regeneração da GSH pode ser superada, resultando na depleção desse tripeptídeo e no comprometimento das defesas antioxidantes (Pérez-Sala; Pajares, 2023; Zhang *et al.*, 2023). Corroborando esse mecanismo, Garcia *et al.* (2019) demonstraram que a exposição de neurônios hipocâmpais ao AEME, isoladamente ou em associação com a cocaína, promoveu redução significativa da atividade de GPx e GR após três horas, acompanhada por aumento expressivo da peroxidação lipídica, evidenciando dano oxidativo e um efeito neurotóxico aditivo.

4.3 ASTRÓCITOS COMO ALVOS EM POTENCIAL DO AEME NO SNC

Os astrócitos apresentam-se como as células gliais em maior quantidade no SNC, representando cerca de 30% do total destas (Verkhratsky *et al.*, 2021; Escartin *et al.*, 2021). Essas células exibem marcada diversidade morfológica e funcional, permitindo sua classificação em diferentes subtipos conforme a localização e as características estruturais. Entre os principais, destacam-se os astrócitos protoplasmáticos, predominantes na substância cinzenta; os astrócitos fibrosos, localizados na substância branca; e os astrócitos velados, encontrados na camada granular do córtex cerebelar e no bulbo olfatório (Verkhratsky *et al.*, 2021; Won *et al.*, 2025). Somam-se a esses os astrócitos perivascularres, que revestem a superfície externa da membrana basal dos capilares cerebrais, contribuindo para a integridade da barreira hematoencefálica (Falcone *et al.*, 2019; 2022).

Do ponto de vista molecular, os astrócitos são caracterizados pela presença de prolongamentos com numerosos filamentos intermediários, conhecidos como fibrilas gliais, compostos predominantemente pela proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um dos marcadores clássicos dessa linhagem celular. Além disso, expressam outras proteínas e enzimas específicas, como a S-100 β , envolvida na ligação de cálcio (Ca^{2+}); e a glutamina sintetase, responsável pela conversão de glutamato em glutamina (Lee *et al.*, 2021; 2022; 2023).

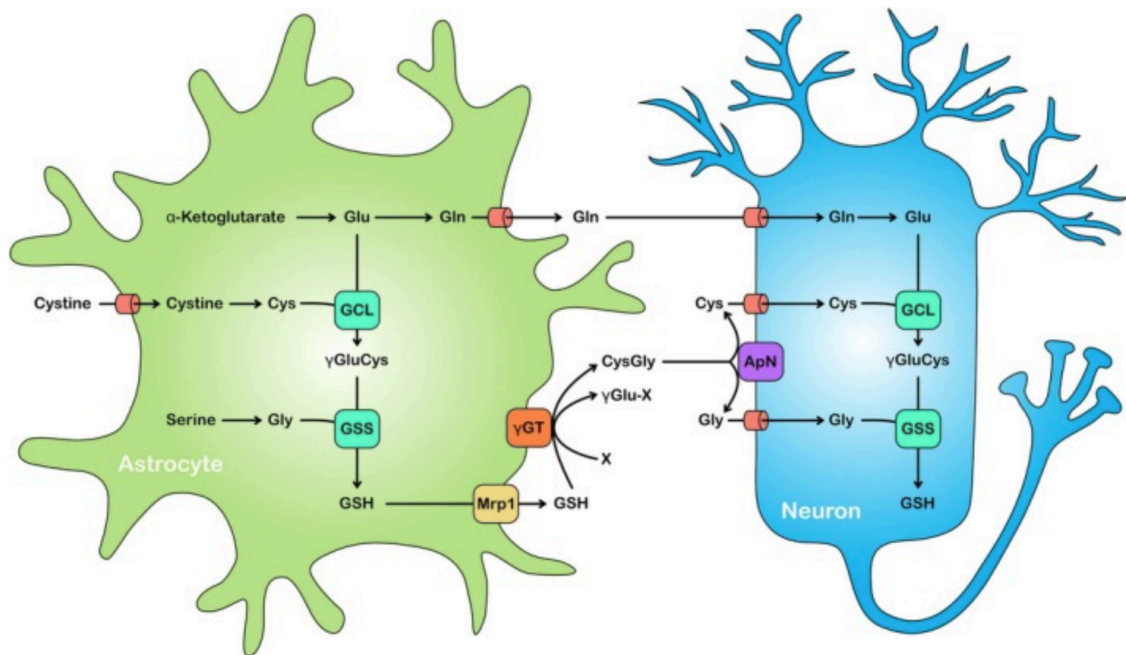
No que tange às funções, os astrócitos são fundamentais na manutenção do equilíbrio do microambiente neural. Essas células atuam no controle iônico e na regulação do pH extracelular, contribuindo para a estabilidade das condições necessárias ao funcionamento neuronal. Para exercer essas funções, os astrócitos expressam diversos canais e transportadores de membrana, incluindo a aquaporina-4 (AQP4), canais de potássio (K^+) e trocadores sódio/hidrogênio (Na^+/H^+). Embora compartilhem a presença de canais iônicos com os neurônios, os astrócitos não geram potenciais de ação, respondendo aos estímulos extracelulares principalmente por meio de variações nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , que atuam como um importante mecanismo de sinalização celular (Zhang *et al.*, 2023; Won *et al.*, 2025).

Ademais, os astrócitos sintetizam, degradam, liberam e captam gliotransmissores como GABA, glutamato, d-serina, lactato, ATP/adenosina proBDNF/BDNF (Won *et al.*, 2025). Entre esses mediadores, o lactato astrocitário destaca-se por sua dupla função, atuando tanto como substrato energético para os neurônios quanto como molécula sinalizadora (Murat; García-Cáceres, 2021; Zhang *et al.*, 2023). Sua síntese ocorre por meio da glicólise e da glicogenólise astrocitária, processos ajustados dinamicamente à atividade neuronal. A glicogenólise é estimulada por noradrenalina, peptídeo intestinal vasoativo, adenosina e elevação de K^+ extracelular, enquanto a glicólise aeróbica é desencadeada por glutamato, amônio e óxido nítrico (Magistretti; Allaman, 2018).

Outra função de destaque dos astrócitos é sua participação na defesa antioxidante cerebral, especialmente por meio da síntese e regulação da GSH. Essas células produzem a GSH a partir do glutamato, cisteína e glicina, em reações catalisadas pelas enzimas glutamato cisteína ligase (GCL) e GSH sintetase (GSS) (Zhang *et al.*, 2023; Dringen; Arend, 2025).

Nos astrócitos, o glutamato e a glicina são derivados do α -cetoglutarato e da serina, respectivamente, enquanto a cisteína é obtida principalmente da cistina extracelular. O GSH produzido pode ser liberado no espaço extracelular e, então, absorvido diretamente pelos neurônios ou hidrolisado pela ectoenzima γ -glutamil transpeptidase (γ GT), resultando na liberação de CysGly, posteriormente degradado pela aminopeptidase N (ApN) em cisteína e glicina, que servem de substratos para a síntese neuronal de GSH (Figura 1) (Pérez-Sala; Pajares, 2023; Zhang *et al.*, 2023; Dringen; Arend, 2025).

Figura 1 – Síntese e reciclagem da glutatona em astrócitos e neurônios



Legenda: A GSH é sintetizada em astrócitos e neurônios a partir dos aminoácidos glutamato (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly), por meio das enzimas glutamato-cisteína ligase (GCL) e glutatona sintetase (GSS). Nos astrócitos, a Cys provém principalmente da captação de cistina via antiporte cistina–glutamato (sistema X^{c-}), enquanto glutamato e glicina derivam de α -cetoglutarato e da serina. Nos neurônios, a síntese de GSH depende do fornecimento desses precursores pelos astrócitos. A GSH sintetizada nos astrócitos é exportada para o meio extracelular, via transportadores Mrp1 e metabolizada por γ -glutamil transpeptidase (γ GT) e aminopeptidase N (ApN), liberando Cys e Gly para os neurônios. Adicionalmente, o glutamato astroglial pode ser em glutamina (Gln), que é captada pelos neurônios para produção de Glu e GSH. **Fonte:** Dringen; Arend (2025).

Os astrócitos também são capazes de responder a estímulos patológicos por meio do processo de reatividade astrocitária, uma resposta defensiva complexa, heterogênea e dependente do contexto. Essa reatividade pode resultar no surgimento de múltiplos fenótipos astrocitários reativos, os quais estão associados tanto a funções neuroprotetoras quanto a efeitos potencialmente deletérios (Verkhatsky *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023).

Em situações de lesão aguda ou inflamação inicial, os astrócitos reativos atuam de forma benéfica, incluindo o isolamento da área lesionada, a limitação da propagação de mediadores inflamatórios e o fornecendo de suporte metabólico e trófico aos neurônios (Tejeda *et al.*, 2019; Chun *et al.*, 2020; Escartin *et al.*, 2021). Por outro lado, quando essa ativação se torna crônica ou desregulada, os astrócitos podem adquirir um fenótipo neurotóxico, caracterizado pela liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e EROs (Liddelow *et al.*, 2017; Chun *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). Esse estado contribui para a progressão de diversas doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias, promovendo disfunção sináptica e dano neuronal progressivo (Chun *et al.*, 2020; Chiareli *et al.*, 2021). Os

mecanismos que determinam a transição entre os diferentes estados funcionais dos astrócitos reativos ainda não são completamente elucidados, mas podem ser caracterizados por meio de marcadores moleculares específicos (Tabela 1), os quais refletem alterações estruturais, metabólicas e secretórias dessas células (Shan *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2025).

Tabela 1 – Principais marcadores e alterações associadas à reatividade astrocitária

Marcador	Função	Tipo de alteração
GFAP	Proteína estrutural de filamentos intermediários, citoesqueleto	Aumentada
Vimentina (VIM)	Proteína de filamentos intermediários	Aumentada
Nestina (NES)	Proteína de filamentos intermediários, marcador de progenitores	Aumentada
Aldh11	Enzima metabólica, marcador de astrócitos	Estável / sem alteração
S100 β	Proteína ligadora de cálcio, sinalização celular	Aumentada
C3	Componente do complemento, resposta imune	Aumentada
IL-6	Citocina, mediador inflamatório	Aumentada
Lcn2	Proteína secretada, modula sobrevivência neuronal	Aumentada
CXCL10	Quimiocina, recrutamento de células imunes	Aumentada
CCL2	Quimiocina, recrutamento de monócitos	Aumentada
TNF	Citocina pró-inflamatória	Aumentada
iNOS (NOS2)	Óxido nítrico sintase, resposta inflamatória	Aumentada
CD44	Adesão celular, migração	Aumentada
Nfkbia	Inibidor de NF- κ B, regulação inflamatória	Aumentada

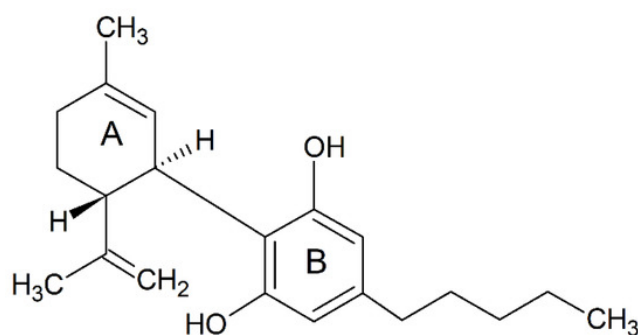
Fonte: Adaptado de Liddelow; Barres (2021).

4.4 CBD COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA

Os fitocanabinoides, compostos naturais da planta *Cannabis sativa* (comumente conhecida como cânhamo), são utilizados há muito tempo como medicamento para o tratamento de dor, náusea e insônia. Eles constituem um amplo grupo de fitoquímicos, composto por aproximadamente 70 substâncias, incluindo o conhecido composto psicoativo tetraidrocanabinol (THC), bem como os compostos não psicoativos canabigerol (CBG), canabinol (CBN), canabicromeno (CBC) e canabidiol (CBD). A planta de cannabis também contém outros compostos naturais, como flavonoides, alcaloides e terpenos, que podem influenciar a atividade biológica da planta (Nelson *et al.*, 2020).

O CBD destaca-se como um composto promissor devido à sua natureza não psicoativa e ao amplo potencial terapêutico, apresentando propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras (Yousaf *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023). Originalmente, foi isolado do extrato de *Cannabis sativa* na década de 1940 pelo químico Roger Adams, embora sua estrutura química tenha sido elucidada apenas em 1963 pelos cientistas Mechoulam e Shvo (Silvestro *et al.*, 2020). Estruturalmente, o CBD é constituído por um anel cicloexênico (A), um anel fenólico (B) e uma cadeia lateral pentílica, com os domínios fenólico e terpênico dispostos em planos quase perpendiculares, conforme ilustrado na Figura 2 (Silvestro *et al.*, 2020).

Figura 2 – Estrutura química do CBD



Fonte: Yousaf et al. (2022).

De acordo com a revisão sistemática conduzida por Millar et al. (2018), a farmacocinética do CBD é influenciada por diversos fatores, incluindo via de administração, formulação, dose e presença de alimentos. Após administração oral, o CBD apresenta baixa biodisponibilidade, estimada entre 6 e 19%, devido principalmente ao extenso metabolismo de primeira passagem hepática. Sua absorção ocorre no trato gastrointestinal, sendo favorecida por refeições ricas em lipídios, que podem aumentar significativamente a concentração plasmática máxima (C_{max}) e a área sob a curva (AUC). Esse efeito é atribuído ao aumento da solubilização do composto e à possível absorção via sistema linfático, reduzindo o metabolismo hepático inicial (Zgair *et al.*, 2016; Millar *et al.*, 2018).

O CBD apresenta alta lipofilicidade, o que favorece sua ampla distribuição tecidual, especialmente em tecidos ricos em lipídios, como cérebro e tecido adiposo (Millar *et al.*, 2018; Sperry *et al.*, 2021). Estudos demonstram que o composto atravessa a barreira hematoencefálica, o que é essencial para seus efeitos no SNC (Martinez *et al.*, 2024; Kowalski *et al.*, 2025).

O metabolismo do CBD ocorre predominantemente no fígado, sendo mediado principalmente pelas enzimas do citocromo P450, especialmente CYP3A4 e CYP2C19. Esse processo resulta na formação de diversos metabólitos, incluindo o 7-hidroxi-CBD, considerado farmacologicamente ativo. Posteriormente, os metabólitos sofrem reações de conjugação (fase II), facilitando sua excreção. A eliminação do CBD ocorre pelas fezes, com menor proporção excretada pela urina. A meia-vida terminal varia amplamente conforme o regime de administração, podendo oscilar entre 18 e 32 horas após doses únicas, e podendo se estender após uso crônico, devido ao acúmulo tecidual (Millar *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2024).

O mecanismo de ação do CBD envolve, principalmente, o sistema endocanabinoide (SEC), composto por receptores canabinoides, endocanabinoides e pelas enzimas responsáveis por sua síntese e degradação (Martinez *et al.*, 2024; Mujahid *et al.*, 2025).

Os receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) são amplamente distribuídos no SNC, com elevada expressão em regiões como hipocampo, córtex cerebral e gânglios da base, onde participam diretamente da regulação da memória, do aprendizado e da plasticidade sináptica (Finn *et al.*, 2021). Em comparação, os receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) são encontrados predominantemente em células do sistema imune, atuando na modulação de respostas inflamatórias, sobretudo em macrófagos e células B (Peyravian *et al.*, 2020; Mujahid *et al.*, 2025).

Os principais endocanabinoides descritos são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). A AEA é sintetizada majoritariamente a partir da hidrólise do precursor fosfolipídico N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), enquanto o 2-AG é formado a partir do 1,2-diacilglicerol (DAG), por ação da diacilglicerol lipase (DAGL). A degradação desses mediadores ocorre principalmente por meio da amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), no caso da AEA, e da lipase monoacilglicerol (MAGL), responsável pela hidrólise do 2-AG (Finn *et al.*, 2021; Kamaruzzaman *et al.*, 2023). Diferentemente dos neurotransmissores clássicos, os endocanabinoides são armazenados em vesículas sinápticas, sendo sintetizados sob demanda no compartimento pós-sináptico, sobretudo em resposta ao aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} . Após sua produção, atuam de forma retrógrada sobre os receptores canabinoides localizados no terminal pré-sináptico. A ativação do receptor CB1 pré-sináptico leva à inibição da adenilato ciclase e dos canais de cálcio dependentes de voltagem, reduzindo a liberação de neurotransmissores e modulando a transcrição sináptica (Figura 3) (Fernández-Moncada *et al.*, 2024).

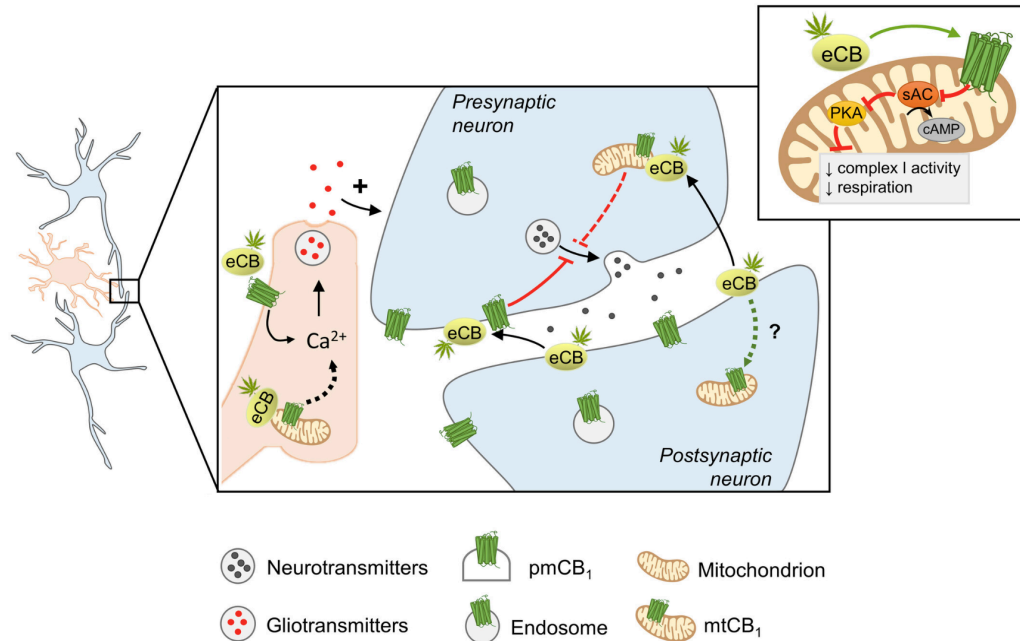
Além da expressão neuronal, os receptores CB1 também estão presentes em astrócitos, onde exibem distribuição heterogênea. Eles podem ser encontrados tanto na membrana plasmática, especialmente em regiões perissinápticas, quanto associado à membrana externa das mitocôndrias, formando os chamados receptores CB1 mitocondriais (mtCB1) (Figura 3) (Scarante *et al.*, 2021; Hempel; Xi, 2022; Lee; Mak; Verheijen, 2023).

Conforme demonstrado por Navarrete e Araque (2010), a ativação dos receptores CB1 astrocitários na membrana plasmática promove elevação transiente do Ca^{2+} intracelular, mediado pelo acoplamento à proteína Gq/11 e pela ativação da fosfolipase C (PLC), com consequente geração de diacilglicerol (DAG), inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático. Esse aumento intracelular de Ca^{2+} regula a liberação de gliotransmissores, como glutamato e ATP, permitindo aos astrócitos modular a excitabilidade neuronal e a comunicação sináptica.

De acordo com Fernández-Moncada *et al.* (2024), a ativação dos receptores mtCB1 reduzem os níveis de cAMP mitocondrial e a atividade da proteína quinase A, resultando em diminuição da função do complexo I da cadeia respiratória. Como consequência, ocorre redução da respiração mitocondrial e da produção de ATP. Nos astrócitos, esse comprometimento energético associa-se à diminuição da produção de lactato, um substrato essencial para o metabolismo neuronal. Dessa forma, os mtCB1 estabelecem uma conexão

direta entre sinalização canabinoide, metabolismo energético astrocitário e funcionamento sináptico no SNC (Figura 3).

Figura 3 — Participação dos receptores CB1 na modulação sináptica e metabólica no SNC



Legenda: Durante a transmissão sináptica, neurônios pós-sinápticos liberam endocanabinoides (eCBs), que atuam de forma retrógrada sobre receptores CB1 localizados na membrana plasmática de neurônios pré-sinápticos (pmCB1), reduzindo a liberação de neurotransmissores. Além dessa ação clássica, os eCBs também podem ativar receptores CB1 associados à membrana mitocondrial (mtCB1), levando à inibição da adenilato ciclase solúvel (sAC), à redução dos níveis mitocondriais de cAMP e da atividade da proteína quinase A (PKA). Como consequência, ocorre diminuição da atividade do complexo I da cadeia respiratória, com impacto negativo sobre a respiração mitocondrial e a produção de energia, o que contribui para a modulação da transmissão sináptica. Paralelamente, a ativação de receptores CB1 em astrócitos vizinhos favorece a liberação de gliotransmissores, permitindo uma modulação lateral da atividade sináptica e da excitabilidade neuronal.

Fonte: Fernández-Moncada et al. (2024).

Nesse contexto, os efeitos do CBD mediados pelo sistema endocanabinoide decorrem, majoritariamente, da modulação dos receptores CB1 (Fernández-Moncada *et al.*, 2024). O CBD atua como modulador alostérico negativo desse receptor, ligando-se a um sítio distinto do ocupado pelos agonistas endógenos e reduzindo a eficácia e/ou a afinidade desses ligantes (Tham *et al.*, 2019; Manzoni; Manduca; Trezza, 2025; Mujahid *et al.*, 2025). Além disso, o CBD pode exercer um efeito agonista indireto do receptor CB1 ao modular a disponibilidade da AEA. Esse efeito decorre, principalmente, da inibição da FAAH e da redução da recaptação da AEA, o que resulta em aumento de seus níveis extracelulares e favorece a ativação sustentada dos receptores CB1. Esse mecanismo ocorre de forma independente da ligação direta do CBD ao sítio ortostérico do receptor, caracterizando uma modulação indireta da sinalização endocanabinoide (Blando *et al.*, 2022; Mujahid *et al.*, 2025).

Além dos receptores canabinoides clássicos, o TRPV1, um receptor ionotrópico pertencente à família dos canais de potencial receptor transitório (TRPs), é reconhecido como um alvo funcional relevante no SEC (Yau *et al.*, 2023; Manzoni; Manduca; Trezza, 2025). O TRPV1 apresenta elevada permeabilidade ao Ca^{2+} e é tradicionalmente associado à detecção de estímulos nocivos, como altas temperaturas ($>43\text{ }^{\circ}\text{C}$) e pH ácido (<6). No entanto, evidências indicam que endocanabinoides, especialmente a AEA, são capazes de ativar diretamente o receptor TRPV1 por meio da ligação ao sítio vaniloide, forma análoga à ativação pelo agonista clássico capsaicina (Yau *et al.*, 2023).

No SNC, o receptor TRPV1 é expresso em células da glia, particularmente em astrócitos. A ativação desse receptor nessas células está associada à modulação de respostas gliais, incluindo a expressão de marcadores associados à reatividade astrocitária (Kong; Peng; Peng, 2017; Jiang *et al.*, 2018; Eraso-Pichot *et al.* 2023). Conforme demonstrado por Yang *et al.* (2019) em um modelo de hipóxia-isquemia, o influxo de Ca^{2+} mediado pelo TRPV1 está associado à ativação da via JAK2/STAT3, com aumento da expressão de GFAP e IL-1 β . Adicionalmente, a ativação desse receptor foi relacionada ao recrutamento do inflamassoma NLRP3 e à liberação da forma ativa de IL-1 β .

O CBD pode modular diretamente a atividade do receptor TRPV1 (Kalsoom *et al.*, 2024; Mujahid *et al.*, 2025). Estudos indicam que o CBD exerce efeitos neuroprotetores, ao menos em parte, por meio da ativação inicial seguida de rápida dessensibilização do TRPV1, de maneira dependente da dose, culminando em sua inativação funcional. Esse mecanismo contribui para a limitação do influxo exacerbado de Ca^{2+} , reduzindo a hiperexcitabilidade celular e inibindo a ativação de vias pró-degenerativas dependentes de cálcio (Yang *et al.* 2019; Peyravian *et al.*, 2020; Wang; Sun, 2023).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 FÁRMACOS

O CBD foi fornecido pelo grupo parceiro da UFMG. O RIMO (Cayman, #9000484), antagonista seletivo do receptor CB1, e a CAPS (Tocris Bioscience, #0464), antagonista do canal TRPV1, foram gentilmente doados pelo Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP/USP. O AEME foi adquirido pela Supelco (Supelco, Sigma-Aldrich).

5.2 ANIMAIS

Para a realização do estudo, foram utilizados ratos Wistar neonatos, com idade entre 1 e 4 dias, de ambos os sexos, provenientes de casais mantidos no Biotério Central da UNIFAL/MG. Os animais foram mantidos em condições laboratoriais padronizadas (22–24 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 h), com acesso a água filtrada e dieta padrão.

Os procedimentos com animais obedeceram às diretrizes do Conselho Nacional de Controle em Experimentos Animais (CONCEA), do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health)* e os princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL-MG (Protocolo CEUA nº 0024/2025) (Anexo A).

5.3 CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS

As culturas primárias de astrócitos foram obtidas conforme previamente descrito por Gottfried et al. (1999). Aproximadamente 5 a 10 animais foram eutanasiados por decapitação, utilizando tesoura cirúrgica esterilizada, sem a administração de anestésicos, conforme recomendado para animais nessa faixa etária. Após a decapitação, os hipocampos foram cuidadosamente removidos e submetidos à dissociação enzimática com solução de tripsina a 0,05%. Em seguida, as células foram centrifugadas, e o pellet celular ressuspensionado em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose, Sigma®, #D5648) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 unidades/mL e 10.000 µg/mL, respectivamente; Mediatech). Posteriormente, as células foram semeadas em frascos de cultivo celular e mantidas em incubadora a 37 °C, sob atmosfera

controlada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar até atingirem a confluência adequada para os experimentos.

Após atingirem aproximadamente 80% de confluência (7 a 15 dias), as culturas foram submetidas à agitação orbital a 200 rpm, por 2 h, a 37 °C, com o objetivo de promover a remoção de células não astrocíticas. As células em suspensão foram descartadas, enquanto as células aderidas aos frascos, constituídas predominantemente por astrócitos, foram submetidas a um novo processo de dissociação enzimática com solução de tripsina a 0,05%. Em seguida, os astrócitos viáveis foram quantificados na câmara de Neubauer pelo método de exclusão com Azul de Tripán. Em seguida, as células foram semeadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de cultivo de 24 ou 96 poços, conforme o delineamento experimental.

5.4 TRATAMENTOS

Após o estabelecimento da cultura celular, as células foram tratadas com AEME (0,1 µM), diluída no meio de cultura, conforme padronização prévia em dissertação de mestrado do grupo (Simone de Oliveira Santos). Ademais, as culturas foram tratadas com CBD, diluído no meio de cultura, na concentração de 10 µM, previamente estabelecida em experimento piloto de curva dose-resposta. Para a investigação dos mecanismos envolvidos, foram utilizados os antagonistas rimonabanto (1 µM) e capsazepina (30 µM), conforme descrito por Ibork et al. (2023) e Vrechi et al. (2021), respectivamente.

5.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico de redução do MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). Este ensaio se baseia na se baseia na clivagem dos sais de tetrazólio (cor amarelo), pelas células viáveis a partir da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, em cristais de formazan (cor púrpura). Dessa maneira, a fração de formazan formada está diretamente relacionada com a quantidade de células metabolicamente ativas, no qual determina a atividade mitocondrial e assim a quantidade de células vivas (Bahuguna *et al.*, 2017).

Após os tratamentos, com duração de 2 horas e 30 minutos, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado, e 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço, seguidos de incubação de 4 horas a 37 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e os cristais de formazan formados foram solubilizados com 50 µL de dimetilsulfóxido

(DMSO) a 100%. A leitura da absorbância foi realizada em comprimentos de onda de 540 e 570 nm, utilizando leitor de microplacas.

5.6 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CELULAR

A reatividade astrocitária foi avaliada por meio da quantificação da expressão da proteína GFAP (Verkhatsky *et al.*, 2021, 2023). Para isso, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, previamente recobertas com poli-L-lisina, na densidade de 1×10^5 células/poço, utilizando 150 μ L de meio de manutenção. Após os tratamentos, com duração de 2 horas e 30 minutos, os astrócitos foram fixados com solução de paraformaldeído a 4% (PFA), por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 0,01 M e, em seguida, incubadas com solução de bloqueio contendo 10% de soro normal de jumento (Normal Donkey Serum) em PBS acrescido de Triton X-100 a 0,1% e azida sódica (NaN_3) a 0,04%, por 1 hora à temperatura ambiente.

As culturas foram incubadas *overnight* (16–18 horas) com o anticorpo primário coelho anti-GFAP feito em coelho (Cell Signaling Technology®, 1:1.000), seguido de incubação com anticorpo secundário fluorescente donkey anti-rabbit (AlexaFluor®594, 1:250, Jackson ImmunoResearch®) por 2 horas em temperatura ambiente protegido da luz. Subsequentemente à incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (0,01 M) e montadas com meio de montagem Fluoromount® para aquisição das imagens. A análise morfológica e a quantificação do sinal fluorescente de GFAP foram realizadas no software ImageJ®, com os resultados expressos como área celular positiva para GFAP (μm^2).

5.7 AVALIAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR

Os níveis de cálcio intracelular em astrócitos hipocâmpais foram determinados por meio de ensaio colorimétrico. Para isso, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço, em 150 μ L de meio de manutenção. Após os tratamentos com duração de 15, 30 e 60 minutos, o meio foi descartado e as células foram coletadas e homogeneizadas. Alíquotas de 3 μ L do homogenato celular foram pipetadas em cada poço de uma placa de 96 poços, seguidas da adição de 300 μ L do reagente colorimétrico comercial (Labtest®), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas a 37 °C para permitir a ocorrência da reação enzimática. Posteriormente, a absorbância foi determinada em

espectrofotômetro no comprimento de onda recomendado pelo fabricante. As concentrações de cálcio foram calculadas a partir de curva padrão e expressas em μg de proteína.

5.8 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE GSH

Após os tratamentos, com duração de 2 horas e 30 minutos, o meio de cultura foi removido, e as células lavadas duas vezes com PBS gelado (0,01 M; pH 7,4). Em seguida, adicionou-se 30 μL de coquetel de lise contendo tampão RIPA, inibidores de protease e ortovanadato de sódio diretamente em cada poço. Após incubação no gelo por 10 min, o material foi centrifugado (14.000 rpm, 4 °C, 10 min), e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para análises bioquímicas.

A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford, utilizando curva padrão de BSA, com leitura da absorbância a 595 nm. O conteúdo de GSH foi determinado por método colorimétrico baseado na reação com o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), conforme Rahman, Kode e Biswas (2006). Em meio alcalino, o DTNB reage com grupos sulfidríla, produzindo o composto 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), de coloração amarela, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de GSH na amostra. Para o ensaio, 100 μL das amostras foram misturados a 100 μL de ácido tricloroacético (0,0125%), homogeneizados em vortex e mantidos em gelo por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado para a reação com DTNB.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução estoque de GSH (1 mg/mL) em tampão Tris 0,4 M (pH 8,0), seguida de diluição seriadas (100 a 0,195 $\mu\text{L}/\text{mL}$). A reação colorimétrica foi realizada em microplaca de 96 poços, adicionando-se 300 μL de cada ponto da curva, 80 μL das amostras, 200 μL de tampão Tris (pH 8,0) e, por fim, 5 μL da solução de DTNB recém-preparada. A formação do produto amarelo (TNB) foi quantificada imediatamente a 415 nm em leitor de microplacas. A concentração de GSH foi determinada com base na curva padrão e expressa em μg de GSH por mg de proteína. Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total de cada amostra, permitindo a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$, com teste bicaudal.

6 RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os resultados do presente trabalho.

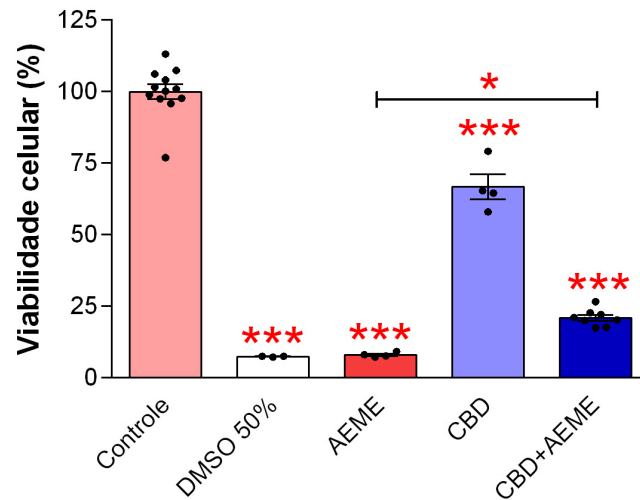
6.1 EFEITO CITOTÓXICO DO AEME EM ASTRÓCITOS

A exposição das culturas primárias de astrócitos hipocampais de ratos neonatos ao AEME por 2 h e 30 min promoveu uma redução significativa da viabilidade celular. Nesse período, os valores decresceram de $99,99 \pm 2,52\%$ no grupo controle para $8,06 \pm 0,42\%$ nas culturas tratadas ($p < 0,001$), conforme demonstrado pelo ensaio de MTT (Figura 4). Esses dados indicam que o AEME exerce ação citotóxica sobre astrócitos mesmo após um curto intervalo de incubação.

6.2 EFEITO PARADOXAL DO CBD SOBRE ASTRÓCITOS

A exposição isolada ao CBD resultou em redução significativa na porcentagem de células viáveis quando comparada ao grupo controle ($99,99 \pm 2,52\%$ vs. $66,75 \pm 4,43\%$; $p < 0,001$), indicando que o composto, em determinadas condições, pode exercer efeito citotóxico sobre os astrócitos. Por outro lado, a co-incubação de CBD com AEME atenuou parcialmente a citotoxicidade induzida por este último, elevando a viabilidade celular de $8,06 \pm 0,42\%$ para $21,00 \pm 1,05\%$ ($p < 0,05$), quando comparada ao tratamento com AEME isolado. Esse achado sugere que o CBD exerce uma ação paradoxal, embora reduza a viabilidade astrocitária quando administrado isoladamente, demonstra um efeito citoprotetor em contexto de agressão tóxica induzida pelo AEME, mitigando, embora não revertendo completamente, o dano celular observado (Figura 4).

Figura 4 — Efeito do AEME e do CBD na viabilidade astrocitária

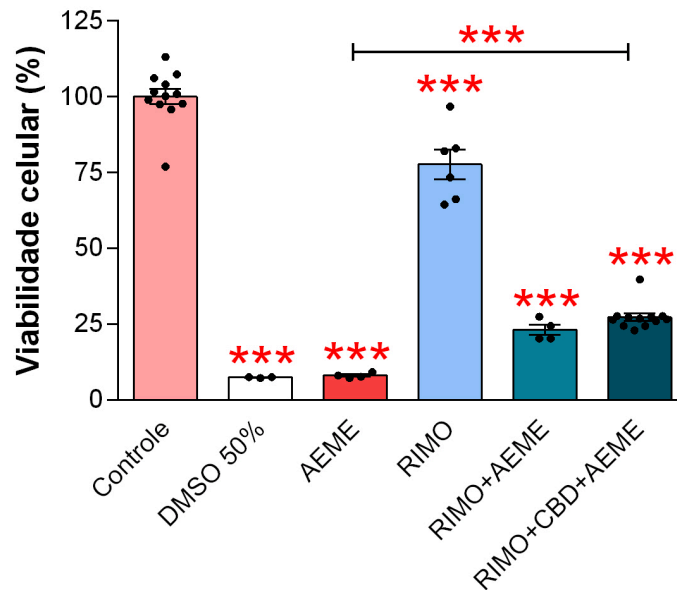


Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$. N = 5 a 10 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Controle (DMEM Base); DMSO: dimetilsulfóxido. **Fonte:** da autora.

6.3 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES CB1 SOBRE A VIABILIDADE ASTROCITÁRIA

A incubação com rimonabanto isolado reduziu significativamente a porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle ($99,99 \pm 2,52\%$ vs. $77,62 \pm 4,94\%$; $p < 0,001$). Entretanto, a co-incubação de rimonabanto, CBD e AEME resultou em aumento significativo da viabilidade celular quando comparada ao tratamento exclusivo com AEME ($8,06 \pm 0,42\%$ vs. $27,30 \pm 1,21\%$; $p < 0,001$) (Figura 5). Esse achado indica que o CBD exerce efeito citoprotetor por vias alternativas ao receptor CB1.

Figura 5 — Efeito do bloqueio do receptor CB1 sobre viabilidade astrocitária

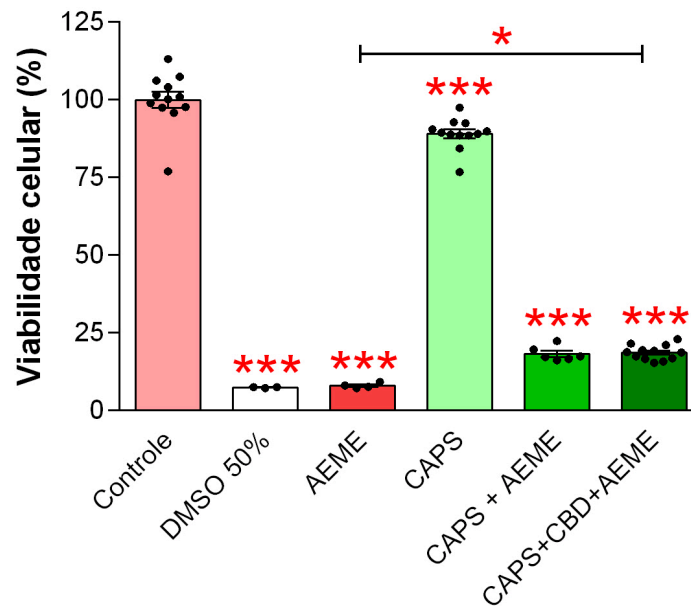


Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$. N = 5 a 10 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Rimonabanto (RIMO, 1 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Controle (DMEM Base); DMSO: dimetilsulfóxido. **Fonte:** da autora.

6.4 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES TRPV1 SOBRE VIABILIDADE ASTROCITÁRIA

A exposição isolada com a capsazepina reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação ao grupo controle ($99,99 \pm 2,52\%$ vs. $89,02 \pm 1,44\%$; $p < 0,001$). A co-incubação com capsazepina, CBD e AEME, por sua vez, aumentou significativamente a viabilidade quando comparada ao tratamento exclusivo com AEME ($8,06 \pm 0,42\%$ vs. $18,65 \pm 0,68\%$; $p < 0,05$). Esses achados indicam que o CBD preserva seu efeito citoprotetor mesmo na presença do bloqueio do receptor TRPV1 (Figura 6).

Figura 6 — Efeito do bloqueio do receptor TRPV1 sobre a viabilidade astrocitária



Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$. N = 5 a 10 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Capsazepina (CAPS, 30 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Controle (DMEM Base); DMSO: dimetilsulfóxido. **Fonte:** da autora.

6.5 O AEME INDUZ REATIVIDADE ASTROCITÁRIA

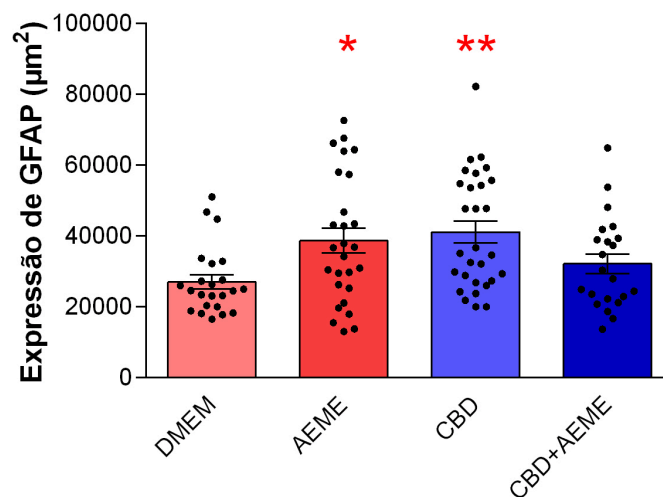
A exposição das culturas primárias de astrócitos hipocâmpais ao AEME por 2 h e 30 min resultou em um aumento significativo da expressão de GFAP, marcador clássico de reatividade astrocitária. Em comparação à condição basal (DMEM), o tratamento com AEME elevou a área média de expressão da proteína de $27078 \pm 1966 \mu\text{m}^2$ para $38725 \pm 3472 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$), evidenciando a capacidade desse composto em desencadear um fenótipo reativo mesmo em um curto intervalo de exposição (Figura 7). Esse incremento na expressão de GFAP sugere que o AEME atua como um agente indutor de alterações morfofuncionais nos astrócitos, reforçando seu potencial neurotóxico e sua influência direta na homeostase glial.

6.6 O CBD PROMOVE REATIVIDADE ASTROCITÁRIA

A exposição isolada com o CBD resultou em alterações robustas no fenótipo astrocitário. Observou-se um aumento significativo na expressão de GFAP em comparação ao grupo controle mantido em DMEM ($27078 \pm 1966 \mu\text{m}^2$ vs. $41140 \pm 3030 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$), indicando que, mesmo na ausência de qualquer estímulo citotóxico, o CBD é capaz de

desencadear um estado reativo nos astrócitos (Figura 7). Esse achado sugere que o composto modula componentes estruturais gliais, elevando a expressão do principal filamento intermediário do citoesqueleto astrogliar, o que sugere uma reprogramação funcional dessas células em condições basais.

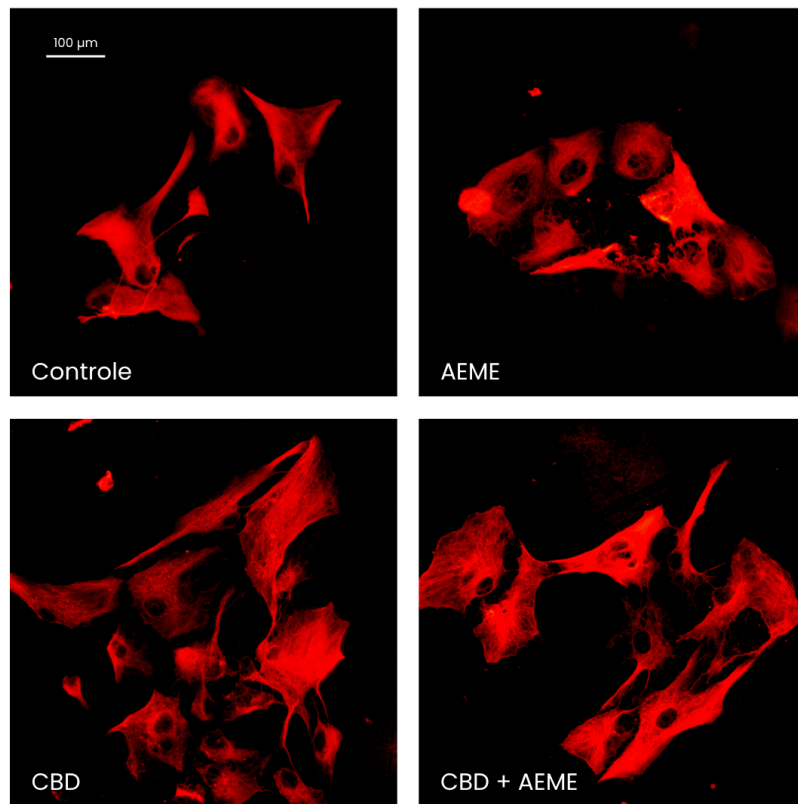
Figura 7 — Efeito do AEME e do CBD na expressão de GFAP



Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$. * $p < 0,05$ N = 50 a 64 células por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); (Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Controle (DMEM). **Fonte:** da autora.

A imunomarcção da proteína GFAP em astrócitos hipocámpais cultivados sob as diferentes condições experimentais, apresentada na figura 8, evidencia alterações morfológicas associadas aos tratamentos testados. A imagem permite visualizar, de forma qualitativa, a intensidade e a organização das fibras intermediárias gliais, complementando os resultados quantitativos previamente demonstrados na Figura 7. Observa-se que as modificações na expressão de GFAP decorrentes da exposição ao AEME, ao CBD ou às combinações farmacológicas refletem-se diretamente no arranjo estrutural dos astrócitos, reforçando o envolvimento desses compostos na modulação do fenótipo reativo astrocitário.

Figura 8 — Imagens representativas de imunofluorescência para GFAP em astrócitos hipocampais

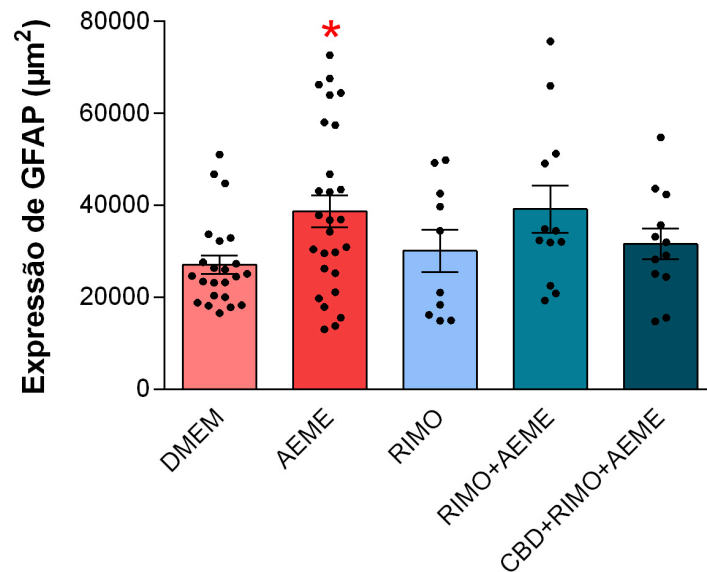


Legenda: Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Controle (DMEM). Escala: 100 μ m. **Fonte:** da autora.

6.7 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES CB1 E TRPV1 SOBRE A REATIVIDADE ASTROCITÁRIA

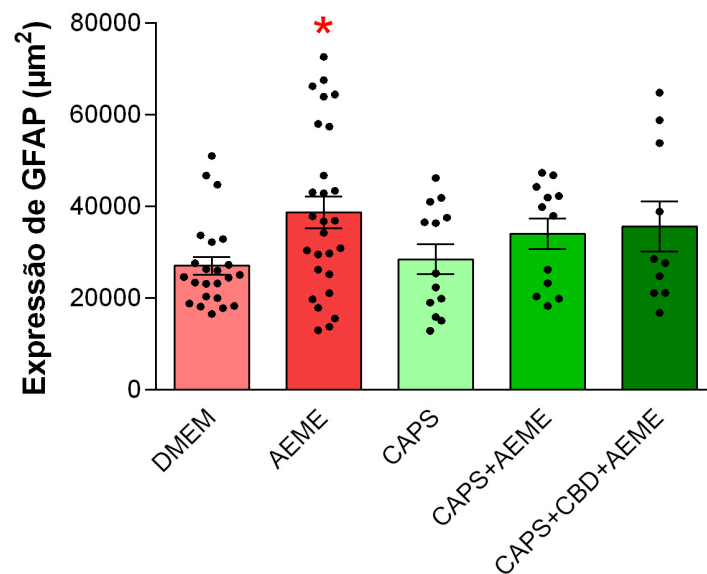
Os resultados apresentados a seguir nas Figuras 9 e 10 evidenciam que o bloqueio isolado dos receptores CB1 ou TRPV1, por meio do rimonabanto ou da capsazepina, respectivamente, não foi capaz de alterar significativamente a expressão da proteína GFAP quando comparado ao grupo controle. De forma consistente, as culturas expostas à co-incubação desses antagonistas com AEME, bem como ao co-tratamento AEME + CBD, também não apresentaram modificações estatisticamente significativas nos níveis de GFAP.

Figura 9 — Efeito do bloqueio do receptor CB1 sobre a expressão de GFAP



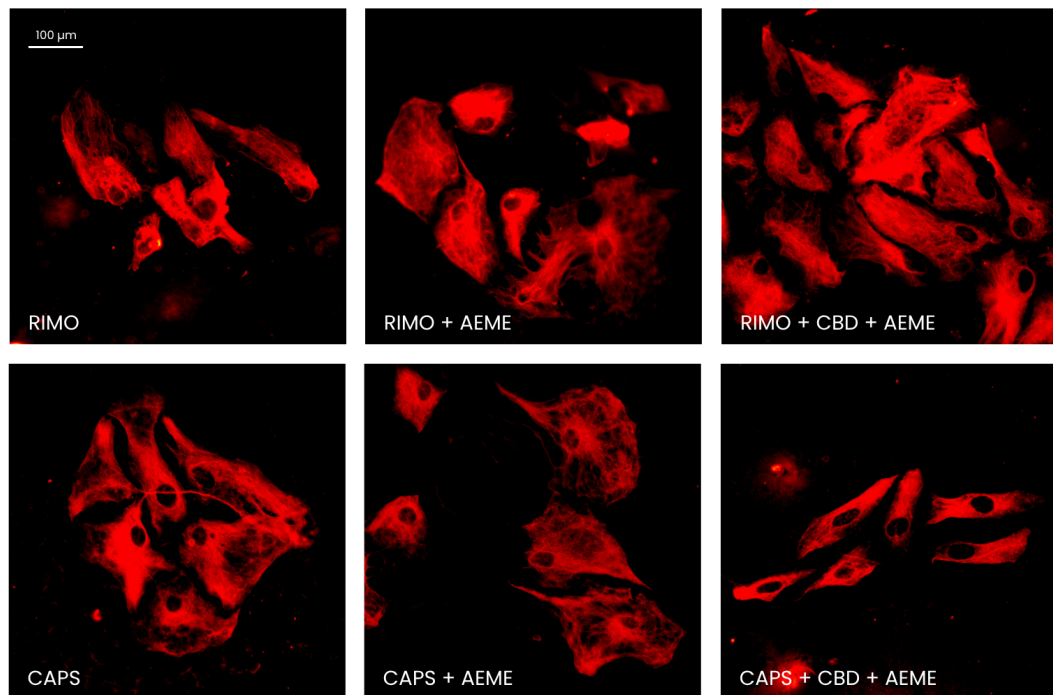
Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$. N = 50 a 64 células por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Rimonabanto (RIMO, 1 μ M); Controle (DMEM). **Fonte:** da autora.

Figura 10 — Efeito do bloqueio do receptor TRPV1 sobre a expressão de GFAP



Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$. N = 50 a 64 células por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); capsazepina (CAPS, 30 μ M); Controle (DMEM). **Fonte:** da autora.

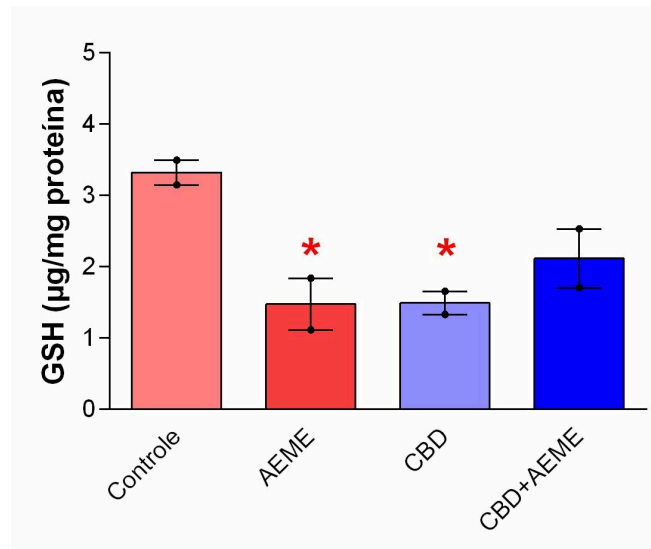
Figura 11 — Efeitos do Rimonabanto e da Capsazepina, isolados ou combinados com CBD, na expressão de GFAP



Legenda: Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Rimonabanto (RIMO, 1 μ M); Capsazepina (CAPS, 30 μ M); Controle (DMEM). Escala: 100 μ m. **Fonte:** da autora

6.8 EFEITO DO AEME E DO CBD SOBRE O NÍVEIS DE GSH EM ASTRÓCITOS

A exposição a AEME promoveu redução significativa dos níveis de GSH em comparação ao controle ($3,32 \pm 0,17$ vs. $1,47 \pm 0,36$, $p < 0,05$), indicando comprometimento do sistema antioxidante nesses astrócitos. De forma semelhante, o tratamento com CBD isolado também resultou em uma redução significativa nos níveis intracelulares de GSH em comparação ao grupo controle ($3,32 \pm 0,17$ vs. $1,49 \pm 0,16$; $p < 0,05$), sugerindo que o composto mesmo na ausência de insulto tóxico, pode interferir na disponibilidade do antioxidante intracelular. Por outro lado, a coadministração de CBD com AEME não apresentou redução adicional significativa dos níveis de GSH em comparação aos grupos tratados isoladamente (Figura 12).

Figura 12 — Efeito do CBD e do AEME sobre os níveis intracelulares de GSH

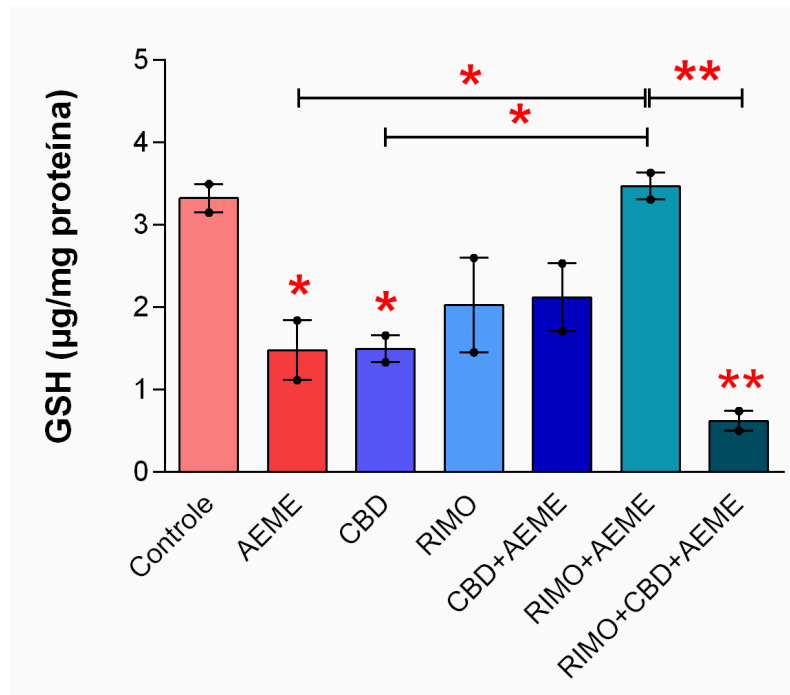
Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$. N = 2 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Controle (DMEM Base); **Fonte:** da autora.

6.9 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES CB1 NOS NÍVEIS DE GSH

O grupo tratado com rimonabanto (RIMO) apresentou níveis intermediários de GSH, sem diferença significativa em relação ao grupo controle, sugerindo que o bloqueio farmacológico de CB1 isoladamente não altera a homeostase basal de GSH nos astrócitos. Em contraste, a coadministração de RIMO + AEME resultou em níveis significativamente maiores de GSH em comparação ao grupo tratado exclusivamente com AEME ($3,46 \pm 0,16$ vs. $1,47 \pm 0,36$; $p < 0,05$), indicando que o bloqueio do receptor CB1 pode atenuar parcialmente a depleção de GSH induzida pelo AEME (Figura 13).

Curiosamente, a associação de RIMO + CBD + AEME resultou em uma redução significativa dos níveis de GSH em comparação ao grupo RIMO + AEME ($3,46 \pm 0,16$ vs. $0,62 \pm 0,12$; $p < 0,01$), sugerindo que a presença do CBD anula parcialmente o efeito protetor do bloqueio de CB1 sobre a disponibilidade de GSH nos astrócitos hipocâmpais (Figura 13).

Além disso, os níveis de GSH no grupo tratado com RIMO + AEME foram significativamente maiores do que os observados no grupo tratado com CBD isolado ($3,46 \pm 0,16$ vs. $1,49 \pm 0,16$; $p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13 — Efeito do bloqueio do receptor CB1 sobre os níveis intracelulares de GSH

Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. N = 2 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Rimonabanto (RIMO, 1 μ M); Controle (DMEM Base). **Fonte:** da autora.

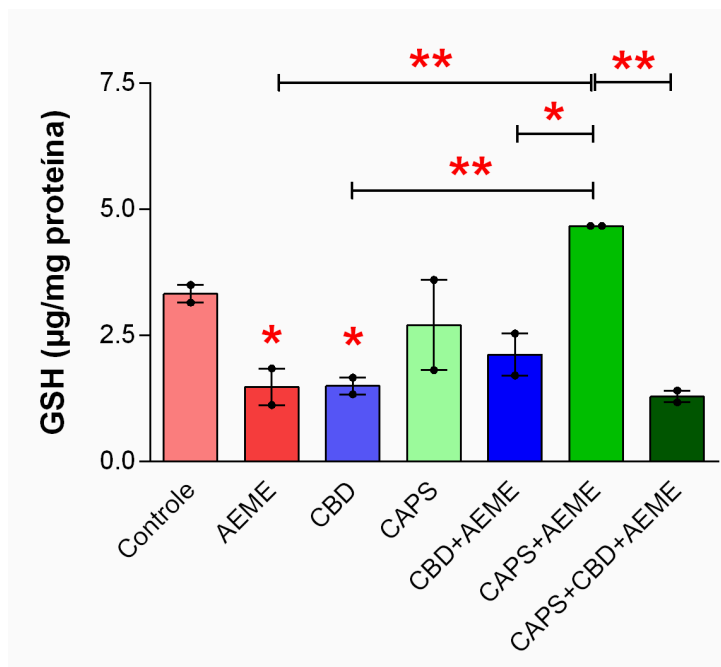
6.10 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES TRPV1 NOS NÍVEIS DE GSH

Resultados semelhantes aos observados com o bloqueio farmacológico de CB1 foram obtidos com o antagonismo de TRPV1. O grupo tratado com capsazepina (CAPS) apresentou níveis intermediários de GSH, sem diferença significativa em relação ao grupo controle. Em contraste, a coadministração de CAPS + AEME resultou em níveis significativamente mais elevados de GSH em comparação ao grupo tratado apenas com AEME ($4,66 \pm 0,01$ vs. $1,47 \pm 0,36$; $p < 0,01$), indicando que o bloqueio do receptor TRPV1 também pode atenuar parcialmente a depleção de GSH induzida pelo AEME.

Curiosamente, a associação de CAPS + CBD + AEME resultou em uma redução significativa dos níveis de GSH em comparação ao grupo CAPS + AEME ($4,66 \pm 0,01$ vs. $1,28 \pm 0,11$; $p < 0,01$), indicando perda do efeito observado com a CAPS na presença do CBD. Além disso, os níveis de GSH no grupo tratado com CAPS + AEME foram significativamente maiores do que os observados no grupo CBD isolado ($4,66 \pm 0,01$ vs. $1,49$

$\pm 0,16$; $p < 0,01$) e no grupo CBD + AEME ($4,66 \pm 0,01$ vs. $2,11 \pm 0,41$; $p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14 — Efeito do bloqueio do receptor TRPV1 sobre os níveis intracelulares de GSH

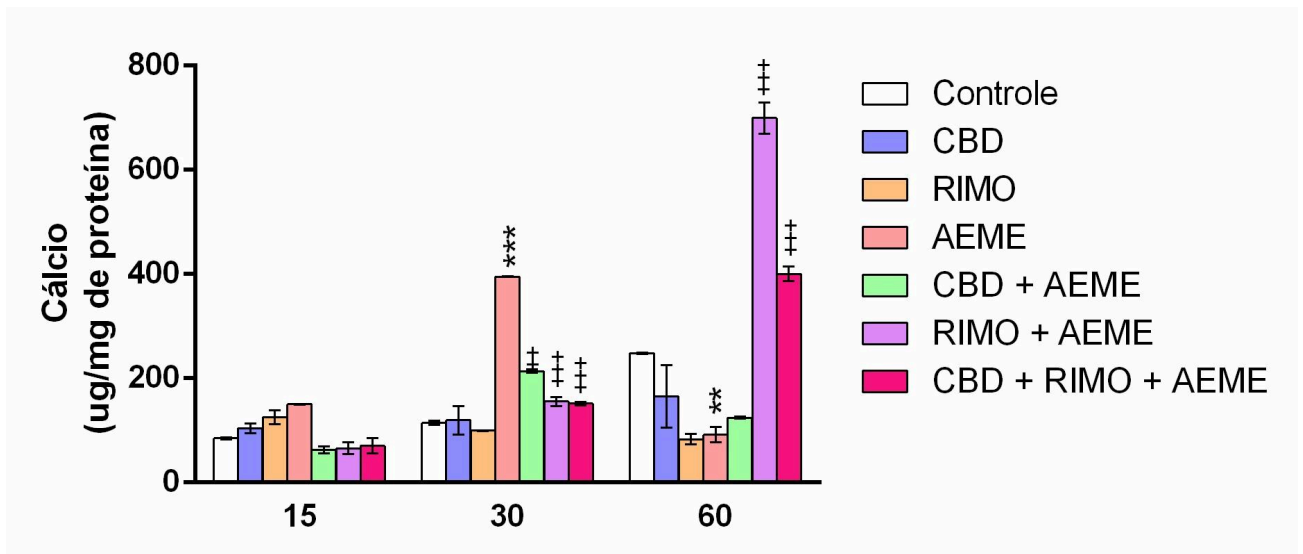


Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. N = 2 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Rimonabanto (RIMO, 1 μ M); Capsazepina (CAPS, 30 μ M); Controle (DMEM Base). **Fonte:** da autora.

6.11 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR

Aos 15 minutos, os níveis intracelulares de cálcio em astrócitos não diferiram entre os grupos. Aos 30 minutos, o AEME aumentou significativamente o cálcio em relação ao controle ($114,58 \pm 4,54$ vs $395,22 \pm 0,74$; $p < 0,001$), efeito atenuado pela co-incubação com CBD + AEME ($395,22 \pm 0,74$ vs $213,97 \pm 3,50$; $p < 0,01$), RIMO + AEME ($395,22 \pm 0,74$ vs $155,46 \pm 8,70$; $p < 0,001$) e CBD + RIMO + AEME ($395,22 \pm 0,74$ vs $151,46 \pm 3,12$; $p < 0,001$). Curiosamente, após 60 minutos, o AEME reduziu significativamente o cálcio em comparação ao grupo controle ($248,04 \pm 0,90$ vs $91,90 \pm 15,01$; $p < 0,01$), enquanto a co-incubação com RIMO + AEME ($91,90 \pm 15,01$ vs $699,52 \pm 30,26$; $p < 0,001$) e CBD + RIMO + AEME ($91,90 \pm 15,01$ vs $400,63 \pm 14,22$; $p < 0,001$) elevou os níveis em relação ao AEME isolado (Figura 15).

Figura 15 — Efeito do CBD e do antagonista de CB1 sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo AEME

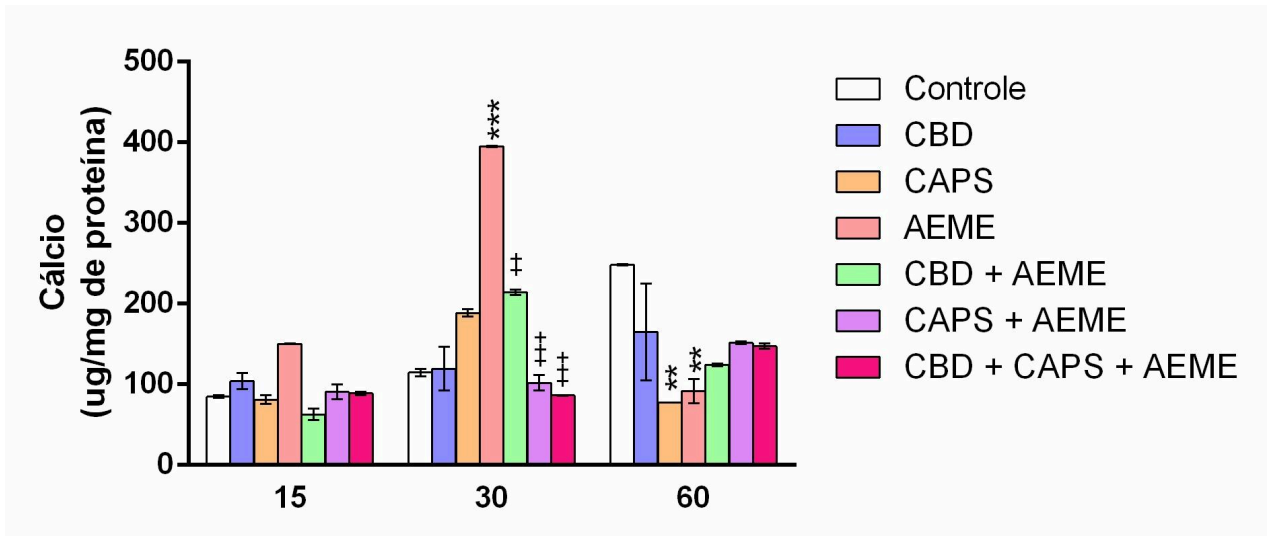


Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$. N = 2 a 5 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 μ M); Metil-éster de anidroeconina (AEME, 0,1 mM); Rimonabanto (RIMO, 1 μ M); Controle (DMEM Base). **Fonte:** da autora.

6.12 AVALIAÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR SOB TRATAMENTO COM AEME, CBD E CAPSAZEPINA

Aos 15 minutos não houve diferenças entre os grupos. Aos 30 minutos, o AEME aumentou significativamente o cálcio intracelular ($114,58 \pm 0,91$ vs $395,22 \pm 0,74$; $p < 0,001$). Esse efeito atenuado pela co-incubação com CBD + AEME ($395,22 \pm 0,74$ vs $213,97 \pm 3,50$; $p < 0,01$), CAPS + AEME ($395,22 \pm 0,74$ vs $151,49 \pm 9,24$; $p < 0,001$) e CBD + CAPS + AEME ($395,22 \pm 0,74$ vs $147,46 \pm 3,10$; $p < 0,001$). Aos 60 minutos, os grupos AEME e CAPS apresentaram redução significativa dos níveis de cálcio intracelular em comparação ao grupo controle ($248,04 \pm 0,90$ vs. $91,90 \pm 15,06$; $248,04 \pm 0,90$ vs. $77,41 \pm 0,14$; $p < 0,01$) (Figura 16).

Figura 16 – Efeito do CBD e do antagonista de TRPV1 sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo AEME



Legenda: Resultados expressos em médias ± erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. *** p<0,001 e ** p<0,01. N = 2 a 5 poços por grupo experimental. Canabidiol (CBD, 10 µM); Metil-éster de anidroecgonina (AEME, 0,1 mM); Capsazepina (CAPS, 30 µM); Controle (DMEM Base). **Fonte:** da autora.

7 DISCUSSÃO

O AEME tem sido descrito na literatura como um composto neurotóxico derivado da cocaína, com efeitos deletérios diretos sobre células do SNC. Estudos conduzidos por Garcia et al. (2019) demonstraram que a exposição ao AEME induz citotoxicidade acentuada em culturas neuronais, caracterizada por redução da viabilidade celular, disfunção mitocondrial, comprometimento do metabolismo energético e aumento do estresse oxidativo. À luz desses achados, os resultados do presente estudo ampliam o entendimento da toxicidade do AEME ao demonstrar que os astrocíticos também constituem alvos diretos desse composto. A redução expressiva da viabilidade astrocitária após curto período de exposição indica que o AEME compromete rapidamente a integridade funcional dessas células, sugerindo que sua ação tóxica no SNC não se restringe aos neurônios.

Além disso, os resultados de cálcio intracelular observados neste estudo reforçam o perfil citotóxico do AEME e contribuem para a compreensão de seus possíveis mecanismos de ação deletéria. A desregulação da homeostase de cálcio é reconhecida como um evento central em processos de lesão celular, uma vez que a sobrecarga de cálcio pode comprometer a produção de ATP, favorecer a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e intensificar a geração de EROs, culminando em dano oxidativo e ativação de vias de morte celular (Chun *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). Dessa forma, o aumento de cálcio observado aos 30 minutos pode representar o evento inicial de uma cascata de toxicidade intracelular. Por sua vez, a redução aos 60 minutos não necessariamente reflete recuperação funcional, podendo indicar perda de viabilidade celular ou colapso metabólico. Em astrócitos, essas alterações são particularmente críticas, pois a sinalização de cálcio regula funções essenciais como suporte metabólico aos neurônios e modulação da neurotransmissão (Lee *et al.*, 2021; 2022; 2023).

Adicionalmente, observou-se que o AEME promoveu redução significativa dos níveis de GSH após 2 horas e 30 minutos de exposição. De forma consistente com nossos achados, Garcia et al. (2019) demonstraram que o AEME promove uma disfunção precoce do sistema antioxidante dependente da GSH em culturas primárias mistas de células hipocâmpais, evidenciada pela redução das atividades de GPx, GR e GST em períodos anteriores à perda de viabilidade celular (3 horas). Esse comprometimento antecede o aumento da peroxidação lipídica, detectado apenas em tempos mais tardios, reforçando que a depleção de GSH e a falha da resposta antioxidante constituem eventos iniciais no mecanismo de neurotoxicidade

induzido pelo AEME. Considerando que os astrócitos desempenham papel central no fornecimento de precursores de GSH aos neurônios (Magistretti; Allaman, 2018), a disfunção antioxidante glial induzida pelo AEME, observada no presente estudo, pode intensificar o estresse oxidativo no microambiente neuronal, contribuindo para a amplificação do dano neurotóxico associado à exposição a esse composto.

Além disso, a indução de reatividade astrocitária pelo AEME, evidenciada pelo aumento da expressão de GFAP, indica que essas células respondem ativamente ao insulto tóxico. Essa reatividade pode ser interpretada como astrocitária mal-adaptativa, descrito por Escartin et al. (2021), na qual a ativação estrutural ocorre em paralelo ao comprometimento funcional. Nesse contexto, a acentuada redução da viabilidade celular e a depleção do sistema antioxidante observadas no presente estudo sugerem que a ativação astrocitária induzida pelo AEME não está associada a um perfil protetor, mas possivelmente a um estado disfuncional. As alterações morfológicas observadas por imunofluorescência para GFAP corroboram essa interpretação, sugerindo reorganização do citoesqueleto astrocitário, evento frequentemente associado a disfunções metabólicas, alterações na sinalização intracelular e prejuízo da comunicação glioneuronal.

Dessa maneira, a integração dos dados do presente estudo com as evidências prévias sugere que o AEME exerce seus efeitos neurotóxicos por meio de um mecanismo multicelular, envolvendo não apenas neurônios, mas também astrócitos. À luz desses achados, que indicam disfunção antioxidante precoce, desregulação da homeostase de cálcio e reatividade astrocitária mal-adaptativa induzidas pelo AEME, o presente estudo avaliou se o CBD poderia exercer efeito modulador e potencialmente protetor sobre esses eventos celulares, considerando sua reconhecida atuação sobre vias redox e mecanismos de sinalização intracelular dependentes de cálcio.

Curiosamente, o tratamento com CBD isolado (10 μ M) também induziu alterações celulares semelhantes às observadas com o AEME. Especificamente, a exposição ao CBD resultou em redução significativa da viabilidade celular, depleção dos níveis intracelulares de GSH e aumento robusto da expressão de GFAP, indicando que esse composto atua como um modulador ativo do estado funcional astrocitário, e não apenas como um agente passivo. Esses achados são consistentes com os descritos por Jurič et al. (2022), que demonstraram que o CBD, mesmo em concentrações submicromolares, reduz a viabilidade tanto de neurônios quanto de astrócitos corticais, efeito atribuído pelos autores à disfunção mitocondrial e à depleção de ATP.

Adicionalmente, o tratamento com CBD isolado esteve associado à redução dos níveis intracelulares de GSH, indicando possível comprometimento da capacidade antioxidante astrocitária. Considerando que os astrócitos constituem o principal compartimento celular responsável pela síntese, regeneração e homeostase da GSH no SNC (Dringen *et al.*, 2025), alterações nesse sistema podem ter impacto relevante sobre o equilíbrio redox cerebral.

A síntese de GSH nos astrócitos ocorre no citosol por um processo dependente de ATP, envolvendo duas etapas enzimáticas sequenciais catalisadas pela γ -glutamilcisteína sintetase (ou glutamato-cisteína ligase) e pela glutationa sintetase. Além do aporte energético, a disponibilidade dos precursores metabólicos, especialmente cisteína, glutamato e glicina, constitui um fator limitante crítico para a produção desse tripeptídeo. Nesse contexto, Urič *et al.* (2022) demonstraram que o CBD pode induzir disfunção mitocondrial, com alterações na dinâmica mitocondrial e comprometimento da bioenergética celular. Uma vez que a mitocôndria é a principal fonte de ATP, sua disfunção pode reduzir a disponibilidade energética necessária para a síntese de GSH, contribuindo, ao menos em parte, para a diminuição observada nos níveis intracelulares desse antioxidante. Assim, os resultados do presente estudo sugerem que, nas condições experimentais empregadas, o CBD pode ter impactado o metabolismo energético astrocitário, refletindo-se na redução da GSH.

O aumento da expressão de GFAP complementa esses achados, indicando que as alterações metabólicas e antioxidantes induzidas pelo CBD estão associadas a uma resposta reativa dos astrócitos, na qual a ativação estrutural pode ocorrer em paralelo ao comprometimento funcional dessas células, conforme descrito por Escartin *et al.* (2021). Nesse âmbito, a convergência entre os dados do presente estudo e as evidências da literatura contribui para a compreensão de que os efeitos do CBD são fortemente dependentes do contexto celular e metabólico, não se restringindo a um perfil exclusivamente citoprotetor.

Em contraste com os efeitos observados na exposição isolada, a co-administração do CBD com o AEME resultou em uma atenuação parcial da toxicidade induzida por esse composto, evidenciada pelo aumento da viabilidade celular em relação ao tratamento com AEME isolado. Resultados semelhantes foram descritos por Branca *et al.* (2019) em modelo de toxicidade induzida por cádmio, no qual o pré-tratamento com CBD (1 μ M) atenuou a perda de viabilidade celular, em culturas neuronais expostas ao metal pesado. Embora os modelos experimentais apresentem diferenças relevantes, como o tipo celular e a natureza do agente agressor, ambos os estudos indicam que o CBD é capaz de reduzir a magnitude do dano celular provocado por insultos químicos. Em ambos os contextos, o CBD não promoveu

proteção completa, mas modulou a intensidade da toxicidade, reforçando o caráter dependente do contexto de seus efeitos celulares.

De forma similar, os dados de cálcio intracelular do presente estudo demonstram que a co-incubação CBD + AEME atenuou significativamente a elevação de cálcio induzida pelo AEME, especialmente aos 30 minutos, período em que o pico de sobrecarga foi observado no tratamento isolado. Essa modulação sugere que o CBD limita a magnitude da alteração na sinalização intracelular desencadeada pelo AEME. Tal efeito é compatível com evidências de que o CBD interage com múltiplos alvos moleculares capazes de influenciar a dinâmica do cálcio intracelular, modulando vias de sinalização dependentes de cálcio (Almeida; Devi, 2020).

Diante disso, investigou-se a participação dos receptores CB1 e TRPV1, ambos amplamente expressos no SNC e reconhecidos como alvos funcionais do CBD (Manzoni; Manduca; Trezza, 2025; Mujahid *et al.*, 2025). Os resultados mostraram que a modulação desses receptores não alterou significativamente os efeitos do CBD sobre a viabilidade celular ou a expressão de GFAP, sugerindo que essas respostas ocorrem de maneira independente da sinalização mediada por CB1 e TRPV1.

No que se refere à dinâmica de cálcio intracelular, a investigação farmacológica indicou participação diferencial de CB1 e TRPV1 na elevação induzida pelo AEME. Segundo Fernández-Moncada *et al.* (2024), os receptores CB1 em astrócitos são acoplados à proteína Gi/o, cuja ativação inibe a adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc e modulando a atividade de canais iônicos, incluindo os canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim, essa via regula a mobilização de cálcio intracelular, controlando tanto o influxo pela membrana plasmática quanto a liberação de estoques intracelulares. Em consonância com esse mecanismo, nossos resultados mostraram que o bloqueio de CB1 com rimonabanto reduziu a elevação de cálcio induzida pelo AEME aos 30 minutos, indicando que a ativação do CB1 contribuiria para a sobrecarga inicial de cálcio observada nesse tratamento. No entanto, aos 60 minutos, os níveis de cálcio aumentaram no grupo RIMO + AEME em comparação ao AEME isolado, sugerindo que, na ausência da sinalização CB1, a célula ativa mecanismos compensatórios de mobilização de cálcio, como canais alternativos de influxo ou liberação a partir de estoques intracelulares, resultando na elevação tardia observada. Além disso, a co-incubação de CBD + RIMO + AEME resultou em níveis de cálcio menores do que os observados no AEME isolado, indicando que o CBD exerce efeito modulador sobre a sobrecarga de cálcio por mecanismos independentes da sinalização CB1.

De acordo com Wang et al. (2023), a ativação dos receptores TRPV1 promove a entrada de cálcio através da membrana plasmática, aumentando rapidamente os níveis intracelulares de cálcio. Assim, o bloqueio de TRPV1 atenuou a elevação de cálcio intracelular induzida pelo AEME aos 30 minutos, indicando a participação desse canal na resposta desencadeada pelo composto. Por outro lado, na co-incubação com CBD + CAPS + AEME, os níveis de cálcio intracelular permaneceram reduzidos em relação ao AEME isolado, indicando que o efeito modulador do CBD sobre a sobrecarga de cálcio não depende da ativação do TRPV1, nas condições testadas.

Em relação à homeostase antioxidante, o bloqueio do receptor CB1 com rimonabanto atenuou a redução de GSH induzida pelo AEME. De acordo com Cosentino et al. (2024), a ativação de receptores CB1 em astrócitos está associada ao aumento da produção de EROs, possivelmente por meio de alterações na função mitocondrial e da ativação de vias de sinalização MAP relacionadas ao estresse oxidativo. Nesse contexto, a ativação desse receptor pode intensificar o desequilíbrio redox celular e, conseqüentemente, aumentar o consumo intracelular de GSH. Dessa forma, a inibição da sinalização via CB1 pode ter limitado a produção de EROs e a disfunção mitocondrial associada, diminuindo a demanda antioxidante celular, o que se reflete no aumento de GSH detectado nos nossos resultados após o bloqueio do receptor. No entanto, a associação de RIMO + CBD + AEME aboliu esse efeito protetor, resultando em uma exacerbação da depleção de GSH. Esse achado sugere que, embora o bloqueio de CB1 seja capaz de atenuar a disfunção antioxidante induzida pelo AEME, a presença do CBD interfere nessa proteção, possivelmente por acionar vias celulares independentes de CB1 que convergem para a modulação da homeostase da GSH.

De maneira semelhante, o bloqueio do TRPV1 com capsazepina atenuou a redução de GSH induzida pelo AEME. Segundo Hastrate et al. (2020) a ativação de receptores TRPV1 pode promover aumento do cálcio citosólico tanto por influxo de membrana quanto por mobilização de estoques do retículo endoplasmático, contribuindo para a desregulação da homeostase de cálcio e para ativação de vias associadas ao estresse oxidativo. Nesse contexto, o bloqueio do TRPV1 pode atenuar essa cascata e, conseqüentemente, contribuir para a preservação dos níveis de GSH observado em nossos resultados. Contudo, a co-administração de CAPS + CBD + AEME também aboliu o efeito protetor, resultando em acentuada depleção de GSH.

8 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o AEME exerce efeitos citotóxicos sobre os astrócitos hipocampais, caracterizados pela redução da viabilidade celular, desregulação dos níveis intracelulares de cálcio, depleção de GSH e indução de reatividade astrocitária. O CBD modulou parcialmente esses efeitos, atenuando a toxicidade do AEME sobre a viabilidade celular, bem como pela elevação dos níveis de cálcio. Entretanto, o CBD também apresentou efeitos diretos sobre astrócitos em condições basais, incluindo diminuição da viabilidade, depleção de GSH e aumento da expressão de GFAP.

A análise da participação dos receptores CB1 e TRPV1 indica o envolvimento dessas vias na modulação da resposta ao AEME, especialmente na regulação dos níveis intracelulares de cálcio e da depleção de GSH, uma vez que o bloqueio farmacológico desses receptores atenuou a elevação de cálcio e reduziu o comprometimento antioxidante. Em contraste, os efeitos observados do CBD, tanto em condição basal quanto na co-administração com o AEME, não puderam ser explicados pela modulação isolada de CB1 ou TRPV1, não tendo sido observados impactos significativos dessas vias sobre a viabilidade celular ou a reatividade astrocitária nas condições experimentais avaliadas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. L; DEVI, L. A. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. **Pharmacology research & perspectives**, v. 8, n. 6, p. e00682, 2020.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA. Projeto Diretrizes: Abuso e Dependência: Crack. São Paulo: Associação Brasileira de Psiquiatria; 2011. Disponível em: https://www.tjsp.jus.br/Download/EPM/pdf/AbusoeDependencia-Crack.pdf?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: dez, 2025.

BAHUGUNA, A. *et al.* MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, 2017.

BASTOS, F. I. B; BERTONI, N. **Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras?. In: Pesquisa Nacional sobre o Uso de Crack: Quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras?.** p. 221, 2014.

BLANDO, S. *et al.* Cannabidiol promotes neuronal differentiation using Akt and Erk pathways triggered by Cb1 signaling. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5644, 2022.

BRANCA, J. J. V. *et al.* Cannabidiol protects dopaminergic neuronal cells from cadmium. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 22, p. 4420, 2019.

CHIARELI, R. A. *et al.* The role of astrocytes in the neurorepair process. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 665795, 2021.

CHUN, H. *et al.* Severe reactive astrocytes precipitate pathological hallmarks of Alzheimer's disease via H₂O₂– production. **Nature neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 1555-1566, 2020.

CONE, E. J. *et al.* Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration. **Therapeutic drug monitoring**, v. 20, n. 5, p. 556-560, 1998.

COSENTINO, L. *et al.* Pharmacological inhibition of the CB1 cannabinoid receptor restores abnormal brain mitochondrial CB1 receptor expression and rescues bioenergetic and cognitive defects in a female mouse model of Rett syndrome. **Molecular Autism**, v. 15, n. 1, p. 39, 2024.

DRINGEN, R; AREND, C. Glutathione Metabolism of the Brain—The Role of Astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 169, n. 5, p. e70073, 2025.

ESCARTIN, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 312-325, 2021.

ERASO-PICHOT, A. *et al.* Endocannabinoid signaling in astrocytes. **Glia**, v. 71, n. 1, p. 44–59, 2023.

FALCONE, C. *et al.* Cortical interlaminar astrocytes across the therian mammal radiation', **The Journal of comparative neurology**, v. 527, n. 10, p. 1654–1674, 2019.

FALCONE, C. *et al.* Redefining varicose projection astrocytes in primates', **Glia**, v. 70, n. 1, 2022.

FANDIÑO, A. S; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on in vitro degradation of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) in human plasma. **Journal of analytical toxicology**, v. 26, n. 8, p. 567-570, 2002.

FERNÁNDEZ-MONCADA, I. *et al.* Type-1 cannabinoid receptors and their ever-expanding roles in brain energy processes. **Journal of Neurochemistry**, v. 168, n. 5, p. 693-703, 2024.

FINN, D. P. *et al.* Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. **Pain**, v. 162, p. S5-S25, 2021.

GARCIA, R. C. T. *et al.* Anhydroecgonine methyl ester (AEME), a cocaine pyrolysis product, impairs glutathione-related enzymes response and increases lipid peroxidation in the hippocampal cell culture. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1223–1229, 2019.

GARCIA, R. C. T. *et al.* M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. **Scientific Reports**, v. 7555, 2015.

GARCIA, R. C. T. *et al.* Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicological Sciences**, v. 128, n. 1, p. 223–234, 2012.

GOTTFRIED, C. *et al.* Role of the adenosine A1 receptor in the modulation of astrocyte glutamate uptake. **Neurochemistry International**, 1999.

HEMPEL, B; XI, Z. Receptor mechanisms underlying the CNS effects of cannabinoids: CB1 receptor and beyond. In: Advances in Pharmacology. **Academic Press**, p. 275-333, 2022.

IBORK, H. *et al.* Effect of Cannabidiol in LPS-induced toxicity in astrocytes: Possible role for cannabinoid type-1 receptors. **Neurotoxicity Research**, v. 41, n. 6, p. 615-626, 2023.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

IONESCU-TUCKER, A; COTMAN, C. W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 107, p. 86-95, 2021.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). Custos sociais e econômicos das drogas no Brasil. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/portal/>. Acesso em: dez, 2025.

JIANG, X. *et al.*, Activation of transient receptor potential vanilloid 1 protects the heart against apoptosis in ischemia/reperfusion injury through upregulating the PI3K/Akt signaling pathway. **International journal of molecular medicine**, n. 3, p. 1724-1730, 2018.

JURIČ, D. M. *et al.* Cytotoxic effects of cannabidiol on neonatal rat cortical neurons and astrocytes: Potential danger to brain development. **Toxins**, v. 14, n. 10, p. 720, 2022.

KALSOOM, I. *et al.* Unraveling the Mechanisms of Cannabidiol's Pharmacological Actions: A Comprehensive Research Overview. **Topics in Current Chemistry**, v. 382, n. 2, p. 20, 2024.

KAMARUZZAMAN, M. A. *et al.* Regulatory role of the endocannabinoid system on glial cells toward cognitive function in Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of animal studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1053680, 2023.

KINTZ, P. *et al.* Evidence of crack use by anhydroecgonine methylester identification. **Human & experimental toxicology**, v. 16, n. 2, p. 123-127, 1997.

KONG, W; PENG, Y; PENG, B. Modulation of neuroinflammation: role and therapeutic potential of TRPV1 in the neuro-immune axis. **Brain, behavior, and immunity**, v. 64, p. 354-366, 2017.

KOWALSKI, L. **Efeitos neuroprotetores do canabidiol e do canabigerol sobre interrupções inflamatórias em um modelo de déficit de memória induzido pela sobrecarga de ferro no período neonatal em ratos.** 2025.

LEE, H. G. *et al.* Neuroinflammation: an astrocyte perspective. **Science Translational Medicine**, v. 15, n. 721, p. 7828, 2023.

LEE, J. H. *et al.* Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis. **Nature**, v. 590, n. 7847, p. 612-617, 2022.

LEE, S. E. *et al.* The emerging roles of antioxidant enzymes by dietary phytochemicals in vascular diseases. **Life**, v. 11, n. 3, p. 199, 2021.

LENAD III. **Terceiro Levantamento Nacional de Álcool e Drogas.** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2023.

LI, L. *et al.* The specific role of reactive astrocytes in stroke. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 16, p. 850866, 2022.

LIDDELOW, S. A. *et al.* Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 957-967, 2017.

MAGISTRETTI, P. J; ALLAMAN, I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. **Nature reviews neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 235-249, 2018.

- MANZONI, O J.; MANDUCA, A; TREZZA, V. Therapeutic potential of cannabidiol polypharmacology in neuropsychiatric disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 46, n. 2, p. 145-162, 2025.
- MARTINEZ NAYA, N. *et al.* Molecular and cellular mechanisms of action of cannabidiol. **Molecules**, v. 28, n. 16, p. 5980, 2023.
- MARTINEZ, N. N. *et al.*, An overview of cannabidiol as a multifunctional drug: pharmacokinetics and cellular effects. **Molecules**, v. 29, n. 2, p.473, 2024.
- MILLAR, S. A. *et al.* A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 425858, 2018.
- MUJAHID, K. *et al.* Cannabidiol as an immune modulator: A comprehensive review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 33, n. 3, p. 11, 2025.
- MURAT, C. B; GARCÍA-CÁCERES, C. Astrocyte gliotransmission in the regulation of systemic metabolism. **Metabolites**, v. 11, n. 11, p. 732, 2021.
- NAVARRETE, M; ARAQUE, A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. **Neuron**. v. 6, n. 68, p. 113-26, 2010.
- NELSON, K. M. *et al.* The essential medicinal chemistry of cannabidiol (CBD). **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12137-12155, 2020.
- OLIVEIRA, N. G; DINIS-OLIVEIRA, R. J. Drugs of abuse from a different toxicological perspective: an updated review of cocaine genotoxicity. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 10, p. 2987-3006, 2018.
- PAPACHRISTOFOROU, E. *et al.* Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Journal of Diabetes Research**, p.1–17, 2020.
- PÉREZ-SALA, D; PAJARES, M. A. Appraising the role of astrocytes as suppliers of neuronal glutathione precursors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8059, 2023.
- PERRENOUD, L. O. *et al.* Profile of help-seeking crack cocaine users in Brazil: a comparison of 2 cross-sectional studies from 1997 and 2013. **Addictive Disorders & Their Treatment**, v. 18, n. 4, p. 238-245, 2019.
- PEYRAVIAN, N. *et al.* Cannabidiol as a novel therapeutic for immune modulation. **ImmunoTargets and therapy**, p. 131-140, 2020.
- RAHMAN, I; KODE, A; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006.

ROMERO-NOREÑA, A; CONTRERAS-MARTINEZ, H. J; MENDIVIL-PEREZ, M. Toxicology of anhydroecgonine methyl ester: A systematic review of a cocaine pyrolysis product. **Toxicology Reports**, p. 101690, 2024.

SAXENA, P. *et al.* Superoxide dismutase as multipotent therapeutic antioxidant enzyme: Role in human diseases. **Biotechnology letters**, v. 44, n. 1, p. 1-22, 2022.

SCARANTE, F. F. *et al.*, Glial Cells and Their Contribution to the Mechanisms of Action of Cannabidiol in Neuropsychiatric Disorders. **Front. Pharmacol.** v. 11, p. 618065, 2021.

SHAN, L. *et al.* Astrocyte-neuron signaling in synaptogenesis. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 680301, 2021.

SILVESTRO, S. *et al.* Molecular targets of cannabidiol in experimental models of neurological disease. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5186, 2020.

SINGH, K. *et al.* Emerging therapeutic potential of cannabidiol (CBD) in neurological disorders: a comprehensive review. **Behavioural neurology**, v. 2023, n. 1, p. 8825358, 2023.

SOLL, M. *et al.* A synthetic sod/catalase mimic compound for the treatment of ALS. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 827, 2021.

SPERRY, A. J. *et al.* A systematic review of cannabidiol based dosage forms. **Precis Nanomed**, v. 4, n. 4, p. 851-878, 2021.

STEENBEEK, R. *et al.* Spatial and temporal assessment of crack cocaine use in 13 European cities through wastewater-based epidemiology. **Science of the Total Environment**, v. 847, p. 157222, 2022.

THAM, M. *et al.* Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1455-1469, 2019.

TEJEDA, G. S. *et al.* Prevention of excitotoxicity-induced processing of BDNF receptor TrkB-FL leads to stroke neuroprotection. **EMBO molecular medicine**, v. 11, n. 7, p. e9950, 2019.

TELEANU, D. M. *et al.* An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, p. 5938, 2022.

VERKHRATSKY, A. *et al.* Principles of astroglipathology. **Advances in Neurobiology**, v. 26, p. 55-73, 2021.

VERKHRATSKY, A. *et al.* Astrocytes in human central nervous system diseases: a frontier for new therapies. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 8, n. 1, p. 396, 2023.

VRECHI, T. A.M. *et al.* Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 5434, 2021.

WANG, W; SUN, T. Impact of TRPV1 on pathogenesis and therapy of neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 29, n. 1, p. 181, 2023.

WOOD, R. W. *et al.* Methylecgonidine coats the crack particle. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 1, p. 57-66, 1996.

WON, W. *et al.* Astrocytes as Key Regulators of Neural Signaling in Health and Disease. **Annual Review of Neuroscience**, v. 48, 2025.

YAU, G. T. Y. *et al.* Cannabidiol for the treatment of brain disorders: therapeutic potential and routes of administration. **Pharmaceutical Research**, v. 40, n. 5, p. 1087-1114, 2023.

YANG, X. *et al.* TRPV1 mediates astrocyte activation and interleukin-1 β release induced by hypoxic ischemia (HI). **Journal of neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 114, 2019.

YOUSAF, M. *et al.* Neuroprotection of cannabidiol, its synthetic derivatives and combination preparations against microglia-mediated neuroinflammation in neurological disorders. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4961, 2022.

YUAN, Y. *et al.* From physiology to pathology of astrocytes: highlighting their potential as therapeutic targets for CNS injury. **Neuroscience Bulletin**, v. 41, n. 1, p. 131-154, 2025.

ZGAIR, A. *et al.* Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. **American journal of translational research**, v. 8, n. 8, p. 3448, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Astrocyte metabolism and signaling pathways in the CNS. **Frontiers in neuroscience**, v. 17, p. 1217451, 2023.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **PARTICIPAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS E RECEPTORES CANABINOIDES NAS AÇÕES DO CANABIDIOL EM ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS EXPOSTOS A METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA (MEAE)**, registrada com o nº **0024/2025**, sob a responsabilidade de **Silvia Graciela Ruginsk Leitão**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **03/11/2025 a 02/11/2027**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	50	25	25	Biotério central da unifal-mg

Alfenas, 06 de Outubro de 2025

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 6c71aaca3be8fa1154a6e2bb754f3263