

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SIMONE DE OLIVEIRA SANTOS

**EFEITOS *IN VITRO* DO TRATAMENTO COM CANABIDIOL (CBD) SOBRE A
MORFOLOGIA E ATIVIDADE DE ASTRÓCITOS EXPOSTOS A METIL-ÉSTER DE
ANIDROECGONINA (SUBPRODUTO DO CRACK/COCAÍNA)**

ALFENAS/MG

2025

SIMONE DE OLIVEIRA SANTOS

EFEITOS *IN VITRO* DO TRATAMENTO COM CANABIDIOL (CBD) SOBRE A MORFOLOGIA E ATIVIDADE DE ASTRÓCITOS EXPOSTOS A METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA (SUBPRODUTO DO CRACK/COCAÍNA)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicada Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silvia Graciela Ruginsk Leitão (Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde- UNIFAL-MG).

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Simone de Oliveira.

Efeitos in vitro do tratamento com canabidiol (CBD) sobre a morfologia e atividade de astrócitos expostos a metil-éster de anidroecgonina (subproduto do crack/cocaína) / Simone de Oliveira Santos. - Alfenas, MG, 2025.

45 f. : il. -

Orientador(a): Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Hipocampo. 2. Sinapse. 3. Cálcio. 4. Lactato. 5. GFAP. I. Leitão, Silvia Graciela Ruginsk, orient. II. Título.

SIMONE DE OLIVEIRA SANTOS

EFETOS IN VITRO DO TRATAMENTO COM CANABIDIOL (CBD) SOBRE A MORFOLOGIA E ATIVIDADE DE ASTRÓCITOS EXPOSTOS A METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA (SUBPRODUTO DO CRACK/COCAÍNA)

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: 14 de abril de 2025.

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Lívea Domela Godoy

Instituição: Universidade de São Paulo

USP

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Presidente**, em 14/04/2025, às 15:50, 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 **1478439** e o código CRC **AB1DAB4B**.

Dedico esta dissertação à memória da minha querida avó, mulher firme em seus princípios e independente em sua essência. Sua força e generosidade deixaram marcas profundas em todos que tiveram o privilégio de conhecê-la, sua lembrança continua sendo uma das minhas maiores fontes de inspiração.

Dedico também à minha mãe, uma verdadeira guerreira, que enfrentou a vida com bravura e venceu cada obstáculo com dignidade e amor. Tudo o que sou e conquistei tem muito de você.

A vocês, minha eterna gratidão, meu amor e esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A jornada até aqui foi repleta de muitos desafios, superação, aprendizados e conquistas, e não seria possível sem o apoio de pessoas fundamentais em minha vida.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha orientadora, Prof. Dra. Silvia, pela orientação, por sempre estar disponível a qualquer hora e dia, pela paciência e pela confiança no meu trabalho. Sua dedicação e seu conhecimento foram essenciais para a construção desta dissertação e para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço também à minha mãe, minha eterna fonte de força e inspiração, agradeço por todo o amor, apoio incondicional e por me ensinar, com seu exemplo, o valor da persistência e da dedicação. Sem o seu suporte em todos os momentos, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu esposo, meu companheiro de vida, meu porto seguro. Obrigada por estar ao meu lado em cada passo desta caminhada, pelos gestos de carinho nos momentos difíceis, pelas palavras de incentivo e, principalmente, por acreditar em mim mesma quando eu duvidei.

A cada um de vocês, meu mais sincero e profundo agradecimento.

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

RESUMO

Há décadas o abuso de drogas vem gerando complicações de impacto mundial para o setor de saúde pública. É fato que o uso de crack afeta a cognição, porém não está totalmente claro como o principal produto da droga, o metil-éster de anidroecgonina (MEAE), afeta a função cerebral. Dentro deste contexto, destaca-se o uso terapêutico dos fitocanabinóides, entre eles o canabidiol (CBD), para manejo de síndromes de abuso. Considerando os eventos críticos da neurotransmissão, os astrócitos (células da glia) vêm sendo consideradas possíveis alvos do crack, já que desempenham um papel fundamental na função sináptica. Diante disso, o presente estudo investigou os efeitos do tratamento in vitro com CBD sobre indicadores da função de astrócitos hipocámpais expostos a MEAE. Para tanto, foram estabelecidas culturas primárias de astrócitos a partir do hipocampo fresco coletado de ratos neonatos. As células foram pré-tratadas ou não com CBD, e expostas ao metabólito MEAE. Os resultados de viabilidade celular, avaliada pelo método MTT, demonstraram que a incubação com MEAE em três diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 mM) reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação ao grupo controle. O pré-tratamento com CBD (10 μ M) reverteu este efeito, particularmente no grupo exposto a MEAE 0,1 mM. A exposição à MEAE também aumentou a expressão de GFAP, indicando aumento da área celular. A incubação com CBD, por si só, aumentou a expressão de GFAP, a concentração citosólica de cálcio e a concentração extracelular de lactato, sendo que a exposição concomitante com MEAE inibiu somente os dois últimos efeitos. Portanto, os dados obtidos até o momento demonstram que o CBD tem ação glioprotetora na presença de MEAE, porém esta ação parece não estar relacionada com altos níveis de cálcio intracelular ou liberação aumentada de lactato. Além disso, os resultados indicam que a astrogliose pode estar relacionada não apenas à exposição aos MEAE, mas também aos potenciais efeitos benéficos do CBD.

Palavras-chave: hipocampo; sinapse; cálcio; lactato; GFAP.

ABSTRACT

For decades, drug abuse has been causing complications with a global impact on public health. It has already been evidenced that crack use affects cognition, but it is not entirely clear how the drug's main product, anhydroecgonine methyl ester (MEAE), affects brain function. In this context, the therapeutic use of phytocannabinoids, including cannabidiol (CBD), stands out for the management of abuse syndromes. Considering the critical events of neurotransmission, astrocytes (glial cells) have been considered possible targets of crack, since they play a fundamental role in synaptic function. Within this context, the present study investigated the effects of in vitro treatment with CBD on functional indicators of hippocampal astrocytes exposed to MEAE. In order to achieve this goal, primary astrocyte cell cultures were established from fresh hippocampus collected from neonatal rats. The cells were pretreated or not with CBD and exposed to the metabolite MEAE. The results of cell viability, assessed by the MTT method, demonstrated that incubation with MEAE at three different concentrations (0.1, 0.01 and 0.001 mM) significantly reduced cell viability compared to the control group. Pretreatment with CBD (10 μ M) reversed this effect, particularly in the group exposed to 0.1 mM MEAE. Exposure to MEAE also increased GFAP expression, indicating an increase in cell area. Incubation with CBD alone increased GFAP expression, cytosolic calcium concentrations and extracellular lactate levels, whereas concomitant exposure with MEAE reversed only the last two effects. Therefore, the data obtained to date demonstrate that CBD has a glioprotective action in the presence of MEAE, but this action does not appear to be related to high levels of intracellular calcium or increased lactate release. Furthermore, the results indicate that astrogliosis may be related not only to MEAE exposure, but also to the potential beneficial effects of CBD.

Keywords: hippocampus; synapse; calcium; lactate; GFAP.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
1.1	JUSTIFICATIVA.....	10
1.2	OBJETIVO GERAL.....	11
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2	DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1	DESENVOLVIMENTO DE DEPENDÊNCIA.....	12
2.2	O USO DO CRACK DURANTE A GRAVIDEZ.....	13
2.3	AS CÉLULAS GLIAIS COMO ALVOS EM POTENCIAL DA COCAÍNA/CRACK NO SNC.....	15
2.4	O CANABIDIOL COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA TRATAMENTO DA DEPENDÊNCIA.....	17
3	METODOLOGIA.....	20
3.1	ANIMAIS.....	20
3.2	CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS.....	20
3.3	PRÉ-INCUBAÇÃO E ESTIMULAÇÃO.....	20
3.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT....	21
3.5	IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA GFAP.....	22
3.6	DOSAGENS DE LACTATO E CÁLCIO.....	22
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5	RESULTADOS.....	25
5.1	VIABILIDADE CELULAR.....	25
5.2	EXPRESSÃO DE GFAP.....	26
5.3	CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE CÁLCIO.....	28
5.4	CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE LACTATO.....	29
6	DISCUSSÃO.....	31
7	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	APÊNDICES.....	44
	ANEXOS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Há décadas, as drogas de abuso constituem um problema de saúde pública no Brasil, sem mencionar o impacto deste consumo em nível mundial. Dentre todas as drogas de abuso, o crack tem ganhado destaque, particularmente nos países em desenvolvimento, tendo em vista seu relativo baixo custo em relação a outros tipos. O crack apresenta como princípio psicoativo a cocaína, porém contém uma mistura de compostos, o que permite disponibilizá-lo com valor mais acessível. Devido a isso, o seu consumo é maior em grupos economicamente menos favorecidos (Bittencourt *et al.*, 2021).

Segundo Castro *et al.* (2015), para se produzir o crack é necessário realizar a extração da cocaína, a partir da planta *Erythroxylum coca*, pelo processo de maceração das folhas com solventes, até que se obtenha a pasta de coca. Posteriormente, a pasta é tratada com ácido clorídrico, dando origem ao cloridrato de cocaína. Nesse processo, já é obtida a cocaína pura, o pó, o qual é inalado pelos usuários. Após essa etapa, o cloridrato de cocaína é transformado em crack quando diluído em água, acrescido de amônia ou bicarbonato de sódio e aquecido, dando origem à pedra de crack. Para se fazer uso da pedra, é necessário fumá-la por um cachimbo ou outro dispositivo improvisado.

O crack sempre dará origem a dois principais produtos: benzoilecgonina e metil-éster de anidroecgonina (MEAE), os quais são extremamente tóxicos. De acordo com Bittencourt *et al.* (2021), o mecanismo da neurotoxicidade desses produtos ainda é desconhecido. Contudo, estudos de ressonância magnética realizados em usuários de crack mostraram anormalidades importantes no sistema nervoso central (SNC), especificamente, na substância cinzenta.

De fato, a neurotoxicidade das drogas de abuso geralmente está associada ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial, levando à morte celular por apoptose e/ou necrose. Conforme descrito por Bradley *et al.* (2003), a toxicidade de MEAE em cultura neural pode estar relacionada a ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1, acoplados à proteína G1. Essa ativação resulta em um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, o que ativa vias de caspases, levando à morte por apoptose. Nesse contexto, Garcia *et al.* (2012) evidenciaram, em seu estudo, que a exposição a MEAE pode induzir apoptose por meio do aumento da atividade da caspase-3, sendo possível, portanto, sugerir que

essa via pode mediar a morte celular induzida por MEAE.

Apesar de seu reconhecido efeito tóxico sobre o SNC, o mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo crack não está completamente esclarecido. A princípio, a maior parte das alterações seria decorrente de déficits na neurotransmissão. Nesse sentido, as células gliais, ou também denominadas neuroglia, surgem na literatura como importantes alvos para o controle da neurotransmissão, uma vez que fazem parte do novo modelo de sinapse tripartite (Gomes *et al.*, 2013). Segundo Moreira *et al.* (2022), os astrócitos poderiam ser alvos em potencial para o crack, não somente por serem as células da glia mais abundantes, mas também por exercerem uma série de funções primordiais para a homeostase do SNC. Em vista destas evidências, especula-se, portanto, que uma disfunção dos astrócitos poderia, ao menos, mediar parte da injúria neuronal decorrente da exposição a cocaína/crack.

Infelizmente, até o momento não há farmacoterapia totalmente eficaz e isenta de efeitos adversos para o tratamento do abuso de drogas, assim como para manejo das complicações associadas. Nesse contexto, surgem os fitocanabinoides, os quais são empregados para manejo de diversas condições clínicas, incluindo algumas síndromes de abuso, principalmente a etanol e opióides (Fraguas-Sánchez *et al.*, 2018). O canabidiol (CBD), um potente fitocanabinoide, exibe propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras, sendo eficaz no tratamento pré-clínico e clínico de doenças que afetam o SNC. No entanto, os mecanismos pelos quais o CBD desempenha um papel anti-inflamatório e neuroprotetor nos astrócitos ainda não foram totalmente elucidados (Wu *et al.*, 2021).

1.1 JUSTIFICATIVA

Como argumentado anteriormente, até o momento não há farmacoterapia proposta que seja totalmente eficaz para o tratamento da dependência de drogas de abuso, assim como para os danos decorrentes do seu uso. Apesar de a literatura fornecer importantes evidências do papel do CBD e dos astrócitos na fisiologia sináptica, também não existem trabalhos que relacionem todos esses fatores, considerando o contexto do abuso de crack. Diante disso, o foco do presente estudo foi investigar, *in vitro*, os efeitos da exposição de astrócitos a MEAE, bem como analisar se o tratamento destas células com CBD seria capaz de reverter essas

potenciais alterações. Desta forma, esperamos que os presentes resultados contribuam para elucidar os efeitos danosos desta droga de abuso sobre o SNC, com foco particular para o impacto deste resultado sobre a diminuição da incidência de problemas cognitivos e de desenvolvimento na prole de mães expostas. Isso porque o presente projeto faz parte de uma rede colaborativa contemplada com fomento do CNPq (Processo: 406727/2021-0; Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 18/2021), cujo objetivo central é investigar os efeitos do CBD e do sistema endocanabinoide sobre as alterações neurotóxicas relacionadas a doenças neuropsicofarmacológicas e neurodegenerativas. Desta forma, os dados obtidos no presente projeto subsidiarão experimentos *in vivo* cujo foco está na transmissão vertical (pela gestação) dos potenciais malefícios do abuso do crack.

1.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto foi avaliar os efeitos do tratamento com CBD sobre as respostas morfológicas e de funcionamento celular induzidas pela exposição *in vitro* de astrócitos hipocâmpais a metil-éster de anidroecgonina (MEAE, subproduto do crack/cocaína).

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Especificamente, o presente estudo se propôs a avaliar, em cultura celular primária de astrócitos hipocâmpais expostos a MEAE, os efeitos do pré-tratamento com CBD, sobre:

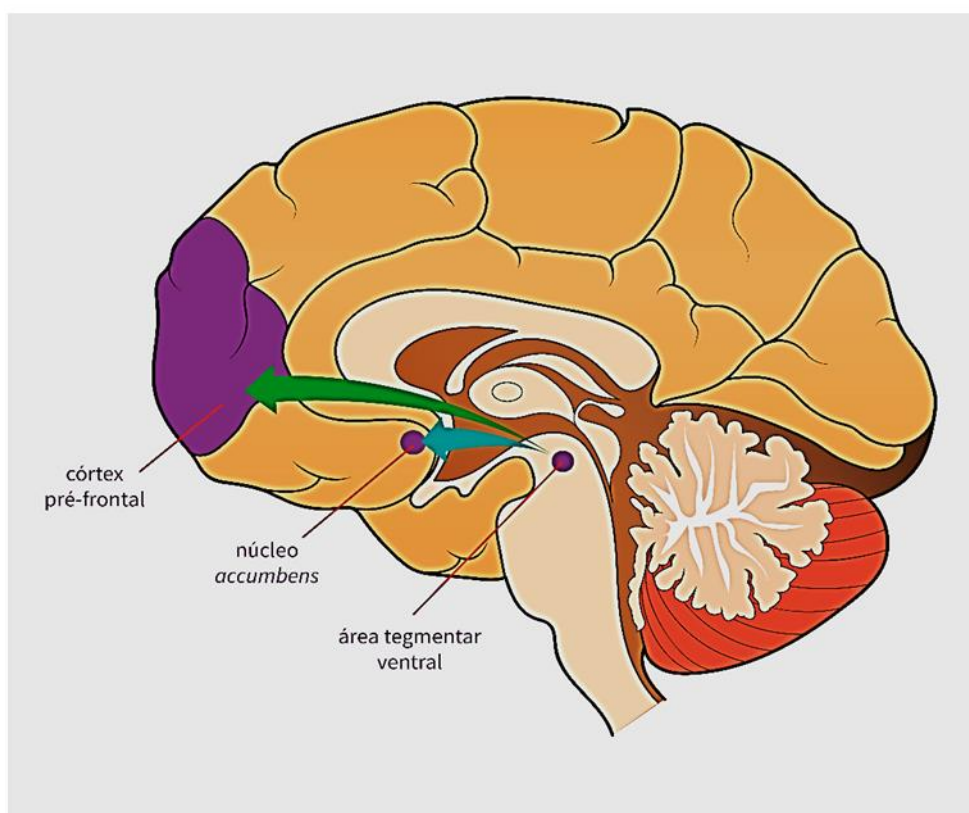
- a) a viabilidade celular, pelo método do MTT;
- b) a morfologia celular, por meio da análise qualitativa e quantitativa da expressão de GFAP;
- c) a concentração citosólica de cálcio;
- d) a liberação *in vitro* de lactato.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 DESENVOLVIMENTO DE DEPENDÊNCIA

Sabe-se que, em condições fisiológicas, as sensações agradáveis vivenciadas pelos seres humanos ativam determinadas áreas cerebrais, levando ao aumento da sinalização de dopamina. Segundo Serafini *et al.* (2020), o sistema de recompensa é o conjunto das estruturas cerebrais responsáveis por evocar a sensação de prazer ou de satisfação, ilustradas da figura Figura 1. Hoflich *et al.* (2019) detalham que o sistema de recompensa é composto pela área tegmental ventral (VTA) e o núcleo accumbens (NAc), assim como também compreende o hipotálamo e algumas estruturas do sistema límbico, tais como amígdala e hipocampo.

Figura 1 - Representação de um corte sagital médio do encéfalo humano com a marcação das principais áreas do sistema de recompensa.



Fonte: NUTE-UFSC (2016).

Segundo a literatura, o sentimento de prazer pode estar associado a hábitos

compulsivos, como, por exemplo, o abuso de drogas. Portanto, cada vez que uma substância psicoativa é utilizada pelo indivíduo, ocorre, no circuito de recompensa, a liberação exacerbada de dopamina, gerando a sensação de prazer. Em longo prazo, a exposição aumentada à dopamina regularia para baixo a produção endógena deste neurotransmissor, podendo gerar transtornos de humor e vulnerabilidade ao vício (Serafini *et al.*, 2020).

Corroborando essa ideia, Hetea *et al.* (2019) evidenciaram que o desenvolvimento da dependência ocorre porque o SNC se adapta ao aumento de dopamina a partir do estímulo exógeno (crack), produzindo quantidades progressivamente menores de dopamina endógena. Além do mais, ocorre também a diminuição do número de receptores de dopamina no circuito de recompensa. Por consequência, para que os usuários possam sentir prazer com o uso da droga, é necessário utilizar doses cada vez maiores de droga, pois somente assim irão conseguir superar o déficit de dopamina endógena e manter o alto nível exógeno desse neurotransmissor, relacionado à última dose utilizada.

2.2 O USO DO CRACK DURANTE A GRAVIDEZ

Um fator ainda mais alarmante é que, nos últimos anos, tem sido observado o uso crescente de crack em gestantes em situações de rua e marginalização, gerando não somente riscos para a saúde materna quanto também contribuindo para o aumento da taxa de mortalidade infantil (Bittencourt *et al.*, 2021). Segundo Benveniste *et al.* (2010), o uso de drogas de abuso tornou-se uma ocorrência comum para obstetras e neonatologistas. Em concordância, Barrys *et al.* (2021) demonstraram que é crescente o impacto do abuso de substâncias psicoativas na gestante e no feto.

De acordo com o levantamento de Hetea *et al.* (2019), a incidência de casos de consumo de drogas durante a gravidez vem aumentando globalmente, com taxas variando entre 0,4% a 27% da população. Como essas drogas levam à dependência, as usuárias utilizam doses cada vez maiores, resultando em danos, muitas vezes irreversíveis, à saúde da gestante e do feto.

O abuso de crack durante a gravidez pode afetar diretamente o feto por meio da transferência placentária. Após fumar a pedra de crack, a substância psicoativa é absorvida pela pequena circulação, através dos capilares pulmonares, até chegar a

grande circulação. É importante mencionar que por não se ligar às proteínas plasmáticas, durante o processo de distribuição, a quantidade encontrada no sangue corresponde fielmente à quantidade exposta aos receptores. Ademais devido à sua alta lipossolubilidade, o crack atravessa tanto a barreira placentária como a barreira hematoencefálica. A sua metabolização se inicia na corrente sanguínea, por meio da ação da colinesterase plasmática, sendo finalizada no fígado, pela colinesterase hepática, produzindo, assim, seus produtos principais, a benzoilecgonina e a metil-éster de ecgonina (Barry *et al.*, 2021).

Já foi demonstrado, no cérebro fetal de primatas não humanos, que a cocaína impacta com a mesma equivalência o SNC da gestante e do feto (Benveniste *et al.*, 2010). Contudo, Barry *et al.* (2021) pontuam que os efeitos psicoativos da droga são influenciados pela gestação, visto que o metabolismo do crack depende da ação da enzima colinesterase, a qual se encontra fisiologicamente diminuída durante a gravidez. Somando-se a isso, durante a gravidez também ocorrem alterações na hemodinâmica renal, órgão responsável por pelo menos 95% da excreção do crack. Por conta destes fatores, a exposição fetal à droga parece ser aumentada.

Como destacado anteriormente, o uso do crack por gestantes afeta duas gerações conjuntamente. As complicações maternas são relatadas na literatura como problemas cardiovasculares, como por exemplo, hipertensão, infarto do miocárdio, arritmia, ruptura da aorta descendente e morte súbita. Além disso, há relatos de complicações neurológicas, como hemorragia intracerebral pós-parto, convulsões e ruptura intracerebral pós-parto. Ademais, as usuárias também podem apresentar infecções sexualmente transmissíveis, visto que a maior parte das gestantes usuárias de crack encontra-se em situação de marginalização. E por fim, podem surgir também complicações obstétricas, tais como parto prematuro, morte fetal e descolamento prematuro da placenta (Barry *et al.*, 2021).

Já no feto, podem ser observadas alterações teratogênicas, como malformações, microcefalia, restrição de crescimento intrauterino e hemorragias cerebrais. Além disso, o crack pode ainda induzir complicações no período neonatal, assim como ao longo do desenvolvimento, como, por exemplo, síndrome de abstinência neonatal, atraso no desenvolvimento da linguagem e problemas cognitivos relacionados à memória e aprendizagem (Moreira *et al.*, 2022). Nesse sentido, Barry *et al.* (2021) relataram que a síndrome de abstinência neonatal, que ocorre em decorrência da descontinuação da exposição a algumas substâncias

psicoativas, pode ocorrer até 48h após o parto. Além disso, foi demonstrado que crianças expostas no período pré-natal à cocaína apresentaram maior vulnerabilidade para apresentar déficits cognitivos. Diante do exposto, é possível inferir que a toxicidade induzida pela exposição a MEAE leva a danos tanto no SNC adulto quanto no fetal (em desenvolvimento).

2.3 AS CÉLULAS GLIAIS COMO ALVOS EM POTENCIAL DA COCAÍNA/CRACK NO SNC

Mesmo sabendo que a maior parte das complicações decorrentes do uso do crack é decorrente de danos ao SNC, ainda não está completamente clara na literatura a forma como os principais produtos do crack afeta a função cerebral. A princípio, a maior parte das alterações seria decorrente de déficits na neurotransmissão.

Nesse sentido, sabe-se que, para que ocorra a manutenção e o desenvolvimento cerebral normal, é necessária a produção de fatores neurotróficos, os quais são essenciais para a formação das sinapses. Segundo Mardini *et al.* (2017), a diminuição da produção de fatores neurotróficos poderia ser um dos mecanismos pelos quais o crack gera os danos ao SNC, além do aumento local do estresse oxidativo.

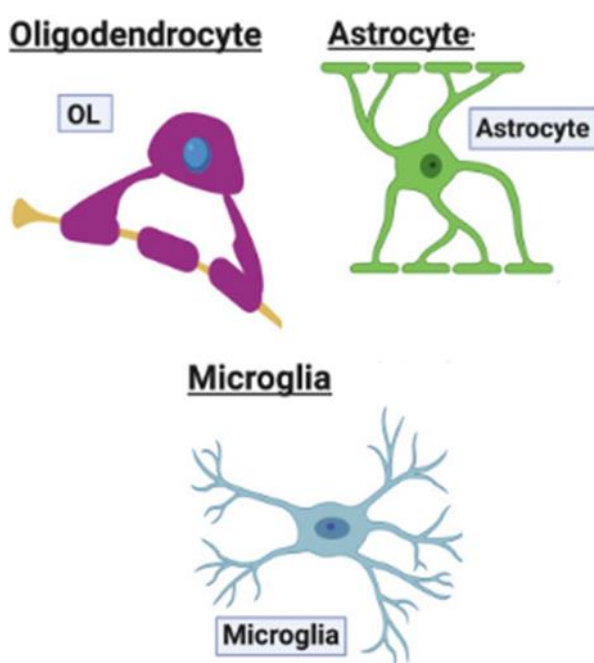
Além do mais, atualmente já se sabe que os neurônios não são as únicas células responsáveis pela formação e eficácia das sinapses. As células gliais ou também denominadas neuroglia, descritas há mais de 150 anos, estão surgindo na literatura como importantes alvos para controle da neurotransmissão, uma vez que fazem parte do novo modelo de sinapse tripartite.

Segundo Gomes *et al.* (2013), a neuroglia foi considerada, até pouco tempo atrás, como células passivas, que exerciam apenas a função de suporte aos neurônios. Porém, nas últimas décadas, têm sido reveladas diversas funções para as células gliais, incluindo a sua participação na modulação da sinapse e na liberação de fatores tróficos, tornando-as protagonistas em muitos achados neuropatológicos antes atribuídos somente à disfunção neuronal.

A neuroglia pode ser classificada em dois grupos, de acordo com diferenças em sua morfologia e função: a *microglia* e a *macroglia*, apresentadas na Figura 2. A *microglia* exerce função de defesa do SNC, sendo recrutadas normalmente após

acometimento por infecções, lesões ou doenças degenerativas. Já a *macroglia* é dividida em subclasses: 1) *oligodendroglia*, 2) *ependimoglia* e 3) *astroglia* (astrócitos, glia de Bergmann, glia de Müller, tanicitos e pituicitos), as quais exercem várias funções, como mielinização dos axônios, revestimento de cavidades (ventrículos cerebrais), produção do líquido cefalorraquidiano, dentre outras (Gomes *et al.*, 2013).

Figura 2 – Células Neurogliais, sendo os oligodendrócitos (OL) e os astrócitos pertencentes à macroglia.



Fonte: ELSEVIER (2020).

No presente trabalho, demos especial atenção à função dos astrócitos. Estas células exercem uma série de funções primordiais para a homeostase do SNC, como por exemplo, a produção e secreção de fatores neurotróficos, bem como participação na formação da BHE e na captação e liberação de diversos neurotransmissores (em especial, glutamato). Nesse sentido, Gomes *et al.* (2013) destacam ainda a função dos astrócitos em fornecer o suprimento energético necessário para o funcionamento neuronal normal, além da participação destas células na defesa do SNC frente ao estresse oxidativo.

No que tange a sua estrutura, os astrócitos possuem em sua superfície as fibrilas gliais, as quais são constituídas de alguns componentes, sendo o principal a

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Cardoso *et al.*, 2019). De acordo com Kasimu *et al.* (2022), a proteína GFAP contribui para que os astrócitos mantenham a força mecânica, além de assegurar estrutura ao seu citoesqueleto. Segundo os mesmos autores, uma lesão no SNC induz uma resposta dos astrócitos, processo o qual é denominado reatividade astrocitária. Essa resposta é responsável por realizar alterações funcionais e morfológicas nos astrócitos, além de resultar no aumento da expressão da GFAP, o qual é considerado o principal marcador molecular dessa célula.

Em vista destas recentes evidências, especula-se, portanto, que uma disfunção dos astrócitos poderia, ao menos, mediar parte da injúria neuronal decorrente da exposição a cocaína/crack.

2.4 O CANABIDIOL COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA TRATAMENTO DA DEPENDÊNCIA

Infelizmente, até o momento não há farmacoterapia totalmente eficaz e isenta de efeitos adversos para o tratamento do vício de drogas de abuso, assim como para manejo das complicações decorrentes do seu uso, seja no organismo materno ou fetal.

Em se tratando de efeitos sobre o SNC, observou-se, nas últimas décadas, um aumento significativo do uso terapêutico dos fitocanabinóides (Fraguas-Sánchez *et al.*, 2018). Esses compostos são originários da planta *Cannabis*, a qual possui três diferentes tipos: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis*. Contudo, a *Cannabis sativa* é a planta mais utilizada para uso medicinal. Ela contém mais de 400 compostos, dos quais 80 se classificam na categoria de canabinóides. O tetra-hidrocarbinol (THC) é conhecido como o principal fitocanabinoide entre os 80 presentes na planta, que possui propriedade psicotrópica. Já o Canabidiol (CBD), outro canabinóide oriundo da planta, tem sido relatado como um potente princípio ativo que interrompe ou diminui as alterações no SNC (Devinsky *et al.*, 2014).

Os fitocanabinóides já são empregados para manejo de diversas condições clínicas, como por exemplo, náuseas e vômitos relacionados à quimioterapia, anorexia, assim como para a dor oncológica, e também há registro de seu uso como tratamentos alternativo ou coadjuvante em algumas síndromes de abuso, principalmente a etanol e opióides (Fraguas-Sánchez *et al.*, 2018). Segundo Wu *et*

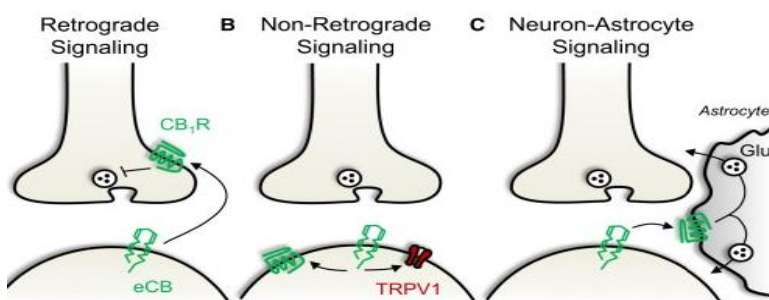
al. (2021) o CBD exibe propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras e é sugerido como eficaz no tratamento pré-clínico e clínico de doenças do sistema nervoso central (SNC). Nesse sentido, Smith *et al.* (2021) sugeriram o CBD como uma estratégia para atenuar os sintomas de abstinência, impedindo o surgimento de sintomas, tanto agudamente quanto de maneira mais prolongada.

Para entender como os fitocannabinóides atuam no organismo, é necessário primeiramente entender o sistema endocanabinóide. De acordo com Castillo *et al.* (2012), o sistema de sinalização endocanabinoide é constituído por agonistas, Anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), pelas enzimas responsáveis pela biossíntese e degradação destes compostos, e também por duas isoformas de receptores aos quais se ligam essas substâncias, denominados CB1 e CB2.

Segundo Devinsky *et al.* (2014), os receptores CB1 são encontrados majoritariamente no SNC e são ricamente expressos no hipocampo, núcleos da base, cerebelo e córtex cerebral. Já os receptores CB2 são encontrados principalmente em células imunes e hematopoiéticas. Já vem sendo demonstrado na literatura que o sistema canabinóide endógeno atua em vários processos fisiológicos como balanço energético, modulação da dor, formação de memória, aprendizagem e resposta imune.

Além do mais, esse sistema é considerado um modulador chave da neurotransmissão. Segundo Castillo *et al.* (2012), os endocanabinóides regulariam a função sináptica de 3 formas, as quais estão ilustradas na Figura 3: A) por meio de sinalização retrógrada, B) de maneira convencional (não retrógrada) e C) via astrócitos, modulando indiretamente a função pré-sináptica ou pós-sináptica. Na sinalização retrógrada, o endocanabinoide liberado pelo neurônio pós-sináptico se movimenta de forma reversa, ou seja, em direção ao neurônio pré-sináptico, para se ligar ao receptor CB1, interferindo com a liberação de neurotransmissores. Por meio da sinalização de maneira não retrógrada ou convencional, por sua vez, o endocanabinoide liberado pelo neurônio pré-sináptico se liga a um receptor vanilóide de potencial transiente tipo 1 (TRPV1) ou ao receptor CB1 pós-sinápticos.

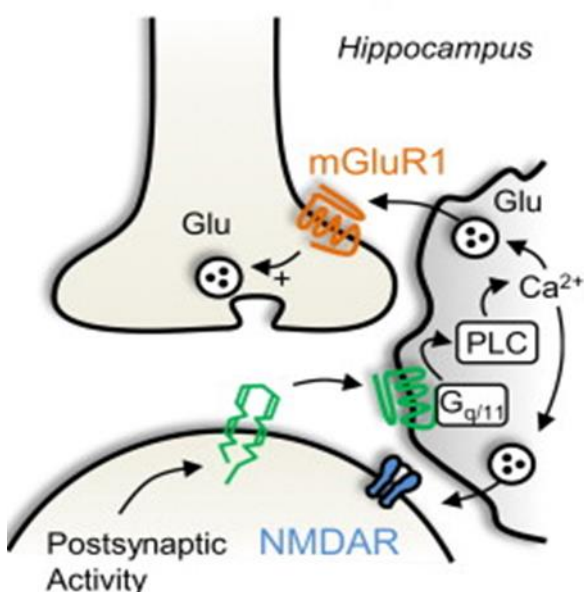
Figura 3 - Sinalização endocanabinoide nas sinapses.



Fonte: NEURON (2012).

Nesse sentido, também já foi relatado que os astrócitos estimulam a liberação do neurotransmissor glutamato em neurônios pré-sinápticos hipocámpais, demonstrado na Figura 4 (Castillo *et al.*, 2012). Portanto, esses achados sugerem um potencial para essas células em mediar, ao menos em parte, as respostas induzidas pelos endocanabinoides e fitocanabinóides na neurotransmissão.

Figura 4 - Sinalização endocanabinoide no hipocampo, com destaque para a participação dos astrócitos



Fonte: NEURON (2012)

Legenda: A atividade neuronal pós-sináptica leva à liberação de endocanabinoides, os quais visam os receptores G_{q/11} CB₁ localizados nos astrócitos. A atividade da fosfolipase C (PLC) facilita a liberação de Ca²⁺, com conseqüente liberação de glutamato pelos astrócitos. O glutamato liberado pelo astrócito ativa os receptores mGluR1 pré sinápticos para potencializar a liberação de glutamato por neurônios, além de ativar receptores NMDA pós sinápticos.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 52 ratos Wistar, machos ou fêmeas, neonatos, obtidos diretamente a partir do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas-MG. Os filhotes foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos foram utilizados para obtenção do hipocampo.

Todos os procedimentos foram realizados no período compreendido entre 7h00 e 12h00 e conduzidos em acordo ao “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996) e aos princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL; acessado de <http://www.cobea.org.br> em 26/11/2013). Todos os protocolos foram submetidos à avaliação em Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFAL/MG, sendo o parecer posteriormente anexado ao presente projeto.

3.2 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS

A cultura primária de astrócitos foi realizada a partir do hipocampo fresco coletado de ratos neonatos (2 a 4 dias de vida). As amostras de tecido foram então dissociadas com tripsina 0,05% e as células foram cultivadas em solução de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose, Sigma®, código D5648) contendo soro fetal bovino (10%) e 1% de solução de penicilina (10,000 IU/ml)-streptomicina (10,000 µg/ml) (PS; Mediatech) por um período de 7 a 15 dias. Em seguida, as células foram submetidas à agitação (200 rpm) por um período de 2h a 37°C, a fim de separar os diferentes tipos celulares. As células em suspensão foram desprezadas e as células aderidas ao frasco (astrócitos) foram novamente tripsinizadas e cultivadas em placas de 12 ou 96 poços (1 x 10⁵ células/poço), a depender do protocolo experimental.

3.3 PRÉ-INCUBAÇÃO E ESTIMULAÇÃO

No dia do experimento, o meio de cultura convencional foi substituído por meio fresco contendo ou não Canabidiol (CBD, 10 µM, Wu *et al.*, 2021). As placas

de cultura foram, então, mantidas nesta solução a 37° C por 30 minutos, sendo em seguida submetidas à estimulação com metil-éster de anidroecgonina (MEAE, 0,1 mM, Sigma Aldrich) (Garcia *et al.*, 2012 e 2019) por um período adicional de 2h, na presença ou não de CBD). Desta forma, foram originados os grupos experimentais expressos no quadro:

Quadro 1 - Grupos experimentais

Grupo experimental	Pré-incubação (30 min)	Estimulação (2h)
1	Meio de cultura convencional	Meio de cultura convencional
2		Meio de cultura convencional + MEAE
3	Meio de cultura convencional + CBD	Meio de cultura convencional
4		Meio de cultura convencional + MEAE

Fonte: da Autora

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Para se avaliar a viabilidade celular após a exposição aos diferentes tratamentos, os astrócitos hipocâmpais foram cultivados em placa 96 poços (1 x 10⁵ células/poço), conforme descrito anteriormente, e submetidos ao período de pré-incubação por 30 minutos e estimulação por 2h. O presente ensaio é baseado na metabolização do brometo de tetrazólio (MTT, 5 mg/mL, Sigma®), realizada somente por células metabolicamente viáveis, as quais reduzem o MTT a sal de formazan, que é insolúvel e apresenta coloração roxa. Para que esta reação aconteça, é necessária a atividade de uma enzima mitocondrial (da cadeia respiratória). Assim, o formazan solubilizado em DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) pode ser quantificado espectrofotometricamente (540 nm) e possui correlação direta com o número de células viáveis. Para este ensaio, foi realizado um controle positivo para morte celular (incubação pelo mesmo período de tempo com DMSO 50%, que tem função detergente sobre membranas lipídicas).

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA GFAP

Os astrócitos crescidos sobre lamínulas pré-tratadas com poli-D-lisina e submetidos aos procedimentos de pré-incubação e estimulação descritos anteriormente, foram inicialmente fixados com metanol puro por 3 minutos. Em seguida, os poços foram incubados com Normal Donkey Serum 10% em PBS (0,01M, Triton 0,1%, NaN₃ 0,04%) por 1 hora. Após esse período as células foram incubadas (overnight) com o anticorpo primário anti-GFAP (rabbit, 1:1.000, Cell Signaling Technology®). Após período de incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas (3x) em PBS (0,01M) e na sequência foi realizada a incubação com o anticorpo secundário Cy3 donkey anti-rabbit (1:250, Jackson ImmunoResearch®) por um período de 2 horas. Após incubação com os anticorpos secundários, as células foram lavadas (3x) com PBS (0,01M). Em seguida, as lamínulas contendo as células foram novamente lavadas e fixadas com meio de montagem (Fluormount®) sobre uma lâmina para visualização em microscópio e captura das imagens. As imagens foram adquiridas com o mesmo nível de exposição em todos os grupos. A quantificação do sinal fluorescente foi realizada por meio do software Image J®, delimitando-se como parâmetros os valores RGB (*red, green, blue*) encontrados em cada ensaio para a situação controle (meio de cultura convencional). Os resultados foram inicialmente determinados em μm^2 , sendo posteriormente normalizados em porcentagem (%) pela situação basal, ou seja, pelo grupo exposto somente a meio de cultura convencional. Neste grupo, a área celular média foi de 26864 μm^2 , equivalente a 100%. O total de células analisadas foi de 75 para o grupo experimental 1, 77 para o grupo experimental 2, 79 para o grupo experimental 3, e 88 para o grupo experimental 4.

3.6 DOSAGENS DE LACTATO E CÁLCIO

As concentrações de lactato no meio de incubação e de cálcio no meio intracelular foram determinadas por método enzimático colorimétrico (Labtest). Para lactato, foram coletadas amostras após 1 ou 2h de estimulação. Para cálcio, as dosagens foram realizadas somente para a coleta *end-point* (2h de estimulação). Em resumo, os ensaios colorimétricos foram realizados por meio de uma mini reação em placa de 96 poços. Foram pipetados 3 μL (microlitros) de meio de incubação (para

lactato) ou do homogenato de células (para cálcio) mais 300 μ L do reagente. As amostras foram incubadas a 37^o C e lidas em espectrofotômetro, utilizando comprimentos de onda específicos para cada ensaio, conforme instruções do fabricante. O valor de absorbância das amostras de meio foi inicialmente corrigido pela absorbância do padrão, e posteriormente normalizado pela massa de proteína correspondente de cada amostra, determinada pelo método colorimétrico de Bradford.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM). A análise foi realizada por meio do teste de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido do pós-teste de Sidak. Para a análise de duas vias, foram utilizadas como variáveis a incubação com MEAE e o tratamento com CBD. O nível de significância adotado de 5% ($p < 0,05$, bicaudal). Os valores de F e p para cada comparação encontram-se apresentados no Apêndice A.

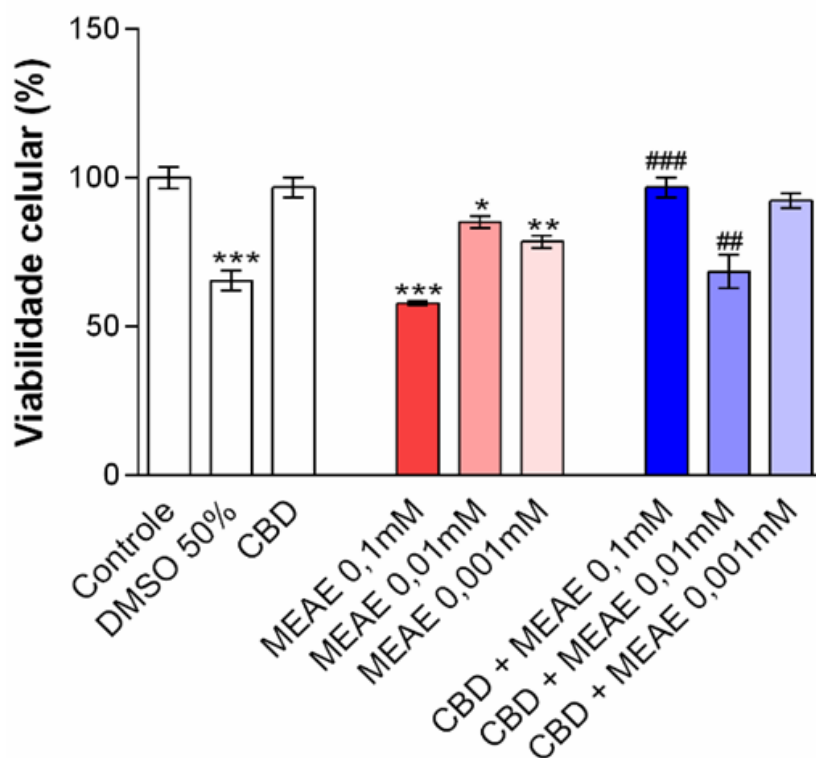
5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular de astrócitos hipocâmpais expostos a MEAE e pré-tratados com CBD está apresentada na Figura 5. De acordo com os resultados, o tratamento com DMSO 50% (controle positivo para morte celular) diminuiu significativamente a viabilidade em comparação ao grupo Controle ($65,46 \pm 3,36$ versus $100,00 \pm 3,51$ %, $p < 0,001$).

Também é possível observar que a incubação com MEAE em três diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 mM) reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação ao grupo Controle ($57,87 \pm 0,69$ / $85,04 \pm 1,99$ / $78,60 \pm 2,12$ versus $100,00 \pm 3,51$ %, $p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente). Além disso, o pré-tratamento com CBD (10 μ M) preveniu a queda da viabilidade celular induzida pela exposição a MEAE 0,1 mM, quando comparado ao sem o pré-tratamento ($96,77 \pm 3,46$ versus $57,87 \pm 0,69$ %, $p < 0,001$). Contudo, de maneira surpreendente, o pré-tratamento com CBD intensificou a morte celular no grupo exposto a MEAE 0,01 mM quando comparado ao sem o pré-tratamento ($68,46 \pm 5,67$ versus $85,04 \pm 1,99$, $p < 0,01$).

Figura 5 - Efeitos do pré-tratamento com canabidiol (CBD, 10 μ M) sobre a viabilidade celular (%) de astrócitos hipocampais expostos a metiléster de anidroecgonina (MEAE) em diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 mM).



Fonte: Autora

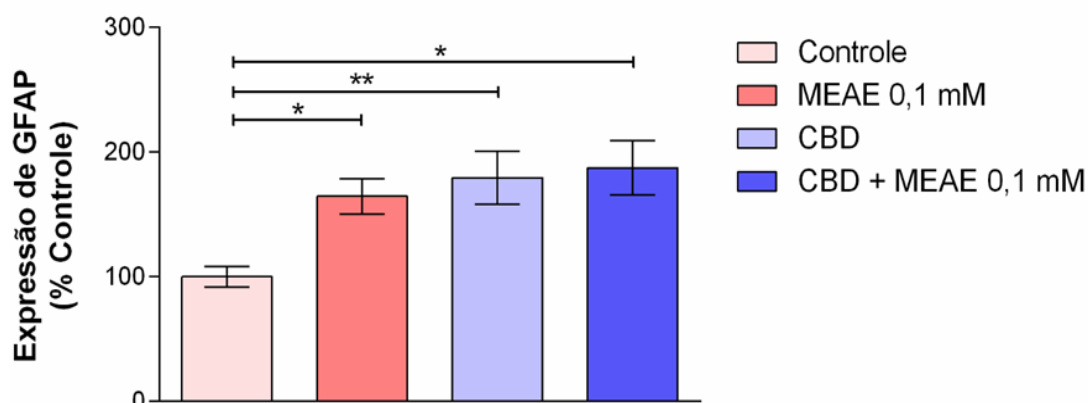
Legenda: Resultados expressos em médias \pm EPM. Análise por teste One way ANOVA, seguido do pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus o grupo Controle; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus o respectivo grupo MEAE. DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo.

5.2 EXPRESSÃO DE GFAP

A expressão da GFAP de astrócitos hipocampais expostos a MEAE e pré-tratados com CBD está apresentada na Figura 6. De acordo com os resultados, a exposição ao MEAE aumentou significativamente a expressão da GFAP em comparação ao grupo Controle ($164,70 \pm 14,15$ versus $100,10 \pm 8,18$ %, $p < 0,05$). De forma semelhante, o grupo tratado somente com CBD apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, aumentando a expressão da GFAP ($179,40 \pm 21,36$ versus $100,10 \pm 8,18$ %, $p < 0,01$). Igualmente, o grupo pré-tratado com CBD e posteriormente exposto ao MEAE também apresentou aumento da

expressão da GFAP em comparação ao grupo controle ($187,40 \pm 21,75$ versus $100,10 \pm 8,18$ %, $p < 0,01$).

Figura 6 - Efeitos do pré-tratamento com canabidiol (CBD, 10 μ M) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipocampais expostos a metiléster de anidroecgonina (MEAE, 0,1 mM).

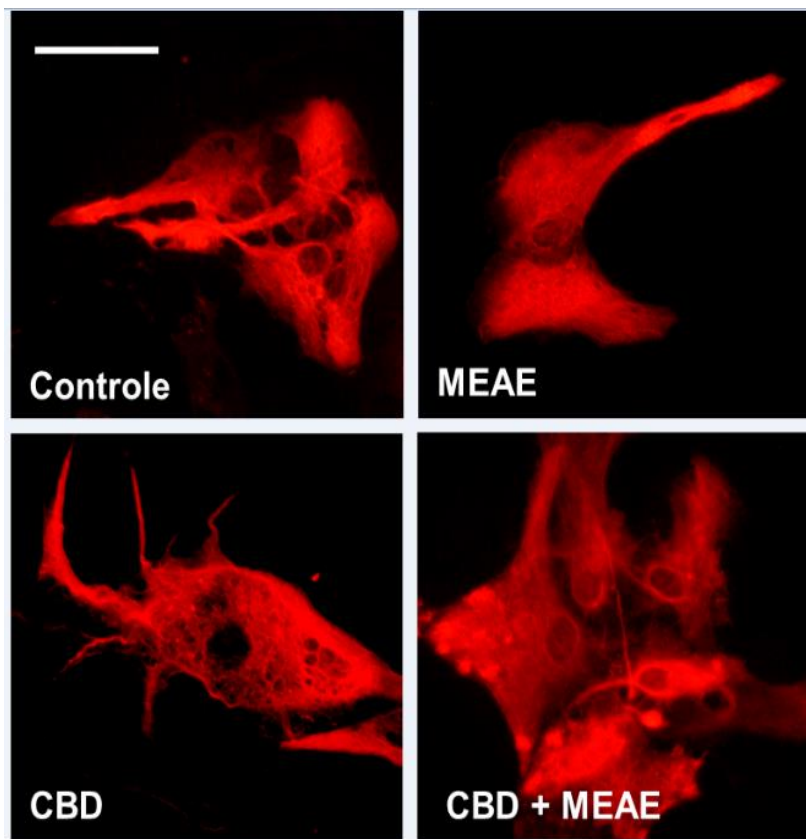


Fonte: Autora

Legenda: Resultados expressos em médias \pm EPM. Análise por teste Two way ANOVA, seguido do pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Os resultados numéricos apresentados na Figura 6 podem ser visualizados qualitativamente nas fotomicrografias apresentadas na Figura 7, que demonstra, mais uma vez, que todos os tratamentos induziram aumentos significativos da área celular, em comparação ao grupo controle (DMEM).

Figura 7 - Efeitos do pré-tratamento com canabidiol (CBD, 10 μ M) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipocampais expostos a metiléster de anidroecgonina (MEAE, 0,1 mM).



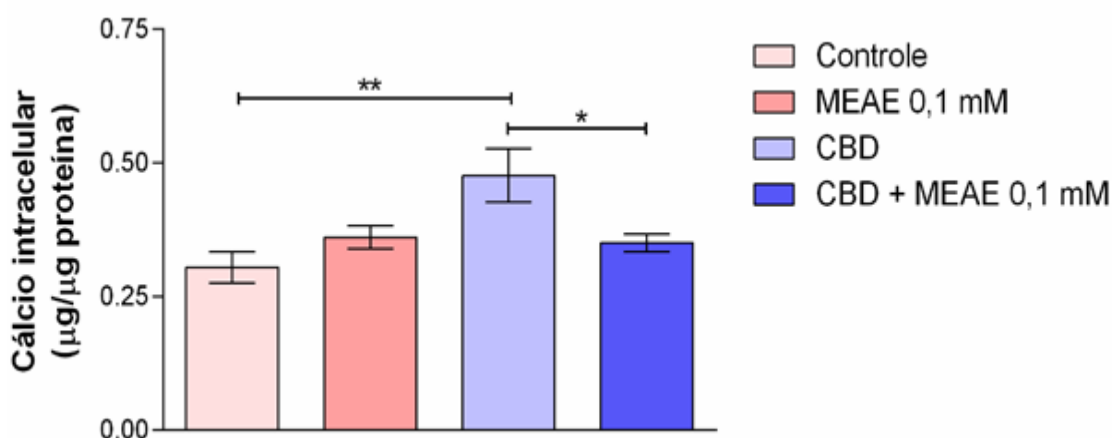
Fonte: Autora

Legenda: Fotomicrografias representativas das diversas condições experimentais. MEAE: metil-éster de anidroecgonina; CBD: canabidiol.

5.3 CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE CÁLCIO

A concentração de cálcio intracelular de astrócitos hipocampais expostos a MEAE (0,1 mM) e pré-tratados ou não com CBD (10 μ M) está apresentada na Figura 8. De acordo com os resultados, o pré-tratamento com CBD aumentou, por si só, as concentrações intracelulares de cálcio nos astrócitos, quando comparado ao grupo controle ($0,47 \pm 0,05$ versus $0,30 \pm 0,02$ μ g/ μ g de proteína, $p < 0,01$). Embora a exposição a MEAE não tenha produzido efeito significativo, o pré-tratamento com CBD reduziu significativamente as concentrações intracelulares de cálcio no grupo exposto a MEAE, quando comparado ao grupo controle pré-tratado apenas com CBD ($0,35 \pm 0,016$ versus $0,47 \pm 0,05$ μ g/ μ g de proteína, $p < 0,05$).

Figura 8 - Efeitos do pré-tratamento com canabidiol (CBD, 10 μ M) sobre a concentração de cálcio intracelular de astrócitos hipocampais expostos a metil-éster de anidroecgonina (MEAE 0,1 mM).



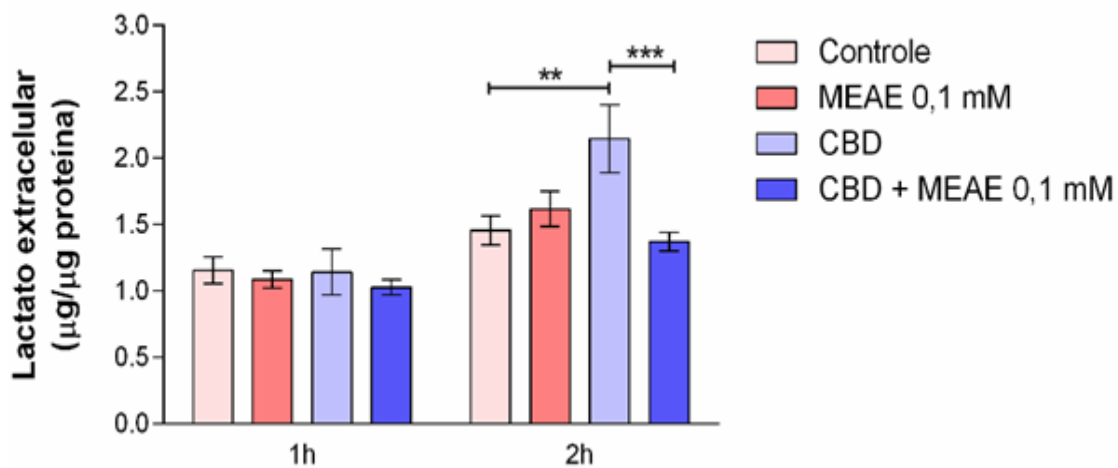
Fonte: Autora

Legenda: Resultados expressos em médias \pm EPM. Análise por teste Two way ANOVA, seguido do pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.4 CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE LACTATO

A concentração de lactato extracelular de astrócitos hipocampais expostos a MEAE (0,1 mM) e pré-tratados ou não com CBD (10 μ M) está apresentada na Figura 9. De acordo com os resultados, não houve efeitos de nenhuma das manipulações sobre a liberação *in vitro* de lactato avaliada com 1h de estimulação. Por outro lado, após 2h, o pré-tratamento com CBD, por si só, aumentou significativamente a concentração extracelular de lactato quando comparado ao grupo controle ($2,14 \pm 0,25$ versus $1,45 \pm 0,10$ μ g/ μ g de proteína, $p < 0,01$). Interessantemente, o efeito do CBD foi revertido no grupo exposto a MEAE, em comparação ao grupo somente pré-tratado com CBD ($1,37 \pm 0,06$ versus $2,14 \pm 0,25$ μ g/ μ g de proteína, $p < 0,001$).

Figura 9 - Efeitos do pré-tratamento com canabidiol (CBD, 10 μ M) sobre a concentração de lactato extracelular de astrócitos hipocampais expostos a metil-éster de anidroecgonina (MEAE 0,1 mM).



Fonte: Autora

Legenda: Resultados expressos em médias \pm EPM. Análise por teste Two way ANOVA, seguido do pós-teste de Sidak. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

Considerando as evidências recentes, especula-se que uma disfunção dos astrócitos possa, pelo menos em parte, mediar a lesão neuronal resultante da exposição à cocaína e ao crack. Os resultados apresentados demonstraram de forma clara o impacto da exposição a MEAE sobre a viabilidade celular de astrócitos hipocampais, produzindo, em sua maior dose, efeitos de magnitude comparada ao DMSO 50%.

Como se sabe, o DMSO é amplamente utilizado como controle positivo para morte celular no ensaio de MTT. Segundo Horcharoensuk *et al.* (2022), utilizando células tronco neurais de suínos, o DMSO induz alterações morfológicas nas células, alterando as propriedades da membrana celular e induzindo a morte celular, como consequência dos estágios apoptóticos iniciais. A toxicidade de DMSO é dependente da concentração, sendo que concentrações maiores que 5% de DMSO já são capazes de induzir sinais claros de alta toxicidade após 24h de exposição (Gallardo-Villagrán *et al.*, 2022). Em nosso estudo, a exposição por 2h30 a DMSO induziu cerca de 25% de redução na viabilidade celular.

Em relação à toxicidade induzida por MEAE e cocaína, Garcia *et al.* (2012, 2019) incubaram culturas neuronais com essas substâncias por períodos de 24 e 48 horas e, também por meio do ensaio de MTT, demonstraram redução significativa no metabolismo mitocondrial, capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% após a exposição concomitante a MEAE 0,1 mM e cocaína 0,2 mM. Nesse contexto, nosso estudo demonstrou que a exposição ao MEAE em diferentes concentrações reduziu significativamente a viabilidade celular, indicando que astrócitos podem ser afetados pelos efeitos tóxicos desta substância, especialmente em concentrações mais elevadas (MEAE 0,1 mM). Porém, o perfil demonstrado em nosso estudo não caracteriza claramente um efeito dose-dependente.

De fato, a neurotoxicidade das drogas de abuso geralmente está associada ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial, levando à morte celular por apoptose e/ou necrose. Em vista disso, Garcia *et al.* (2012) evidenciaram que o MEAE parece agir como um indutor de apoptose, pois a atividade da caspase-3 foi aumentada pela exposição ao MEAE. Portanto, a indução da morte celular por MEAE parece envolver apoptose mediada pela ativação da caspase-3, a partir da sinalização de cálcio intracelular.

Como intervenções para se evitar a neurotoxicidade, observou-se, nas últimas décadas, um aumento significativo do uso terapêutico dos fitocanabinóides, como o CBD, para inúmeras patologias (Fraguas-Sánchez *et al.*, 2018). Os resultados obtidos em três estudos distintos com camundongos indicaram um potencial significativo do CBD na modulação dos efeitos adversos da administração de cocaína. Um estudo realizou a administração de 30 mg/kg de CBD em camundongos, 15–60 minutos antes da administração induzida por cocaína (40–80 mg/kg). Os resultados mostraram aumento da latência das convulsões, ou seja, o CBD prolongou o intervalo entre as convulsões, evidenciando sua ação neuroprotetora (Vilela *et al.*, 2015). A administração única de CBD em doses variando de 30 a 90 mg/kg, administrada 15 a 60 minutos antes da exposição a cocaína também produziu uma redução notável na duração das convulsões. Este achado também sugere que o CBD pode atuar como um agente neuroprotetor em contexto de convulsões induzidas por substâncias estimulantes. Além disso, o aumento da latência das crises observado com a dose de 30 mg/kg reforça a hipótese de que o CBD pode não apenas reduzir a intensidade dos episódios convulsivos, mas também retardar seu início, o que pode ter implicações clínicas significativas na prevenção de crises epiléticas induzidas por drogas de abuso (Daldegan-bueno *et al.*, 2021).

Outro estudo, realizado por Zou *et al.* (2020) complementa esses achados ao mostrar que doses de 10 e 30 mg/kg de CBD não apenas diminuíram a latência das convulsões, mas também reduziram a duração e a gravidade das mesmas de forma dose-dependente. Esta variabilidade na resposta sugere que o efeito protetor do CBD pode ser maximizado em doses otimizadas, ressaltando a importância de ajustes terapêuticos avaliados de maneira individualizada.

Esses dados coletivos posicionam o CBD como um forte neuroprotetor e glioprotetor, tornando-o um candidato promissor para intervenções terapêuticas em contextos de intoxicação por drogas de abuso como a cocaína e o crack, visto que ambas as drogas possuem o mesmo princípio ativo. Neste contexto, Daldegan-Bueno *et al.* (2021) evidenciaram alguns efeitos benéficos relacionados ao uso do CBD para tratar o vício em cocaína, dentre eles podemos citar: controle da alteração dopaminérgica induzida pela cocaína, ajudando assim a combater a dependência; alívio de comorbidades, como, por exemplo, ansiedade gerada pelo uso indiscriminado de cocaína, atuando no sistema neurotransmissor de serotonina, etc.

Tais evidências podem abrir caminho para o desenvolvimento de estratégias de tratamento baseadas no CBD para usuários de drogas de abuso, contribuindo para um entendimento mais abrangente do seu potencial terapêutico.

Em concordância, nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com CBD resultou em um efeito protetor significativo contra a toxicidade induzida por MEAE na concentração de 0,1 mM, com restauração dos níveis basais de viabilidade celular. No entanto, o resultado discrepante observado no grupo pré-tratado com CBD e exposto ao MEAE 0,01 mM levantou questões sobre a complexidade das interações entre esses compostos, uma vez que não foi caracterizado um efeito dose-dependente claro, particularmente quando CBD e MEAE são associados. Este efeito pode indicar que, em concentrações mais baixas do MEAE, o CBD pode não exercer um efeito protetor, ou até mesmo potencializar sua toxicidade. Em suma, enquanto o CBD mostra potencial como agente protetor em certas condições, a variabilidade observada em resposta a diferentes concentrações do extrato MEAE, indica a necessidade de cautela em sua aplicação terapêutica.

O aumento da expressão da GFAP é manifestado pelo aumento da área celular. Nesse contexto, nossos resultados evidenciaram que o tratamento com MEAE aumentou significativamente a área celular, um efeito conhecido como reatividade astrocitária, que está subjacente ao quadro de astrogliose. A astrogliose é atualmente definida como um processo complexo pelo qual os astrócitos, em resposta a uma injúria, podem promover mudanças como remodelação bioquímica, morfológica, metabólica e fisiológica, que, em última análise, resultam no ganho ou perda de novas funções. Ou seja, a princípio, esse processo pode ser protetor ou prejudicial (Linnerbaue e Rothhammer, 2020). De fato, a exposição isolada ao CBD, bem como sua associação com MEAE, promoveram efeitos muito semelhantes, ou seja, também aumentaram significativamente a área celular, indiretamente avaliada no presente estudo pela expressão de GFAP. Contudo, ao associarmos esses dados aos resultados de viabilidade celular, veremos que o aumento da reatividade astrocitária induzido pelo CBD ocorreu em paralelo a uma ação glioprotetora, enquanto o mesmo efeito induzido pela MEAE na morfologia esteve associado a uma resposta citotóxica.

Os achados quantitativos da morfologia podem ser facilmente visualizados na Figura 7. Segundo Linnerbaue e Rothhammer (2020), o aumento da área celular em

astrócitos produz uma barreira física que pode levar a prejuízos na sua resposta imune, assim como na função sináptica. Em sentido inverso, Eraso-Pichot *et al.* (2022) sugerem que os astrócitos reativos possam não somente mediar as respostas anti-inflamatórias do CBD, mas também contribuir para a homeostase cerebral produzindo e liberando endocanabinoides em resposta a determinados insultos. Estes autores destacam que o aumento da atividade destas células em resposta a canabinóides reduz a liberação local de fatores como óxido nítrico e interleucinas, bem como reduz a síntese cerebral de prostaglandinas, diminuindo a inflamação.

Assim, no que tange à análise da proteína GFAP, observamos efeitos dos tratamentos tanto no padrão quantitativo (Figura 6), quanto no perfil qualitativo (Figura 7) de expressão. Além de terem induzido um efeito claro de reatividade astrocitária, aumentando a área celular, conforme já discutido, os tratamentos alteraram o padrão de distribuição intracelular dos filamentos de GFAP. No grupo controle, a expressão desta proteína de citoesqueleto apresenta uma maior densidade perinuclear, tendo uma expressão mais discreta nas regiões distais (processos). Nos grupos tratados, por outro lado, a expressão de GFAP encontra-se mais difusa, sendo também evidente a aparição de vacúolos citoplasmáticos, que podem estar associados, eventualmente, a fenômenos intracelulares como renovação de organelas. Nesse sentido, uma revisão recente sugere que, na verdade, o astrócito pode gerar diferentes isoformas de GFAP em resposta a diversos estímulos, impactando na ancoragem de outras proteínas celulares e na qualidade da interação astrócito-neurônio. Estas isoformas podem, inclusive, serem expressas ao mesmo tempo em diferentes subcompartimentos celulares, participando em funções distintas na saúde e na doença (Reus *et al.*, 2024).

Já é bem sabido que a função dos astrócitos também está intimamente relacionada ao balanço de cálcio nestas células. De acordo com Bindocci *et al.* (2017), os astrócitos desempenham um papel fundamental na modulação da atividade neural por meio da sinalização intracelular de cálcio. Essas células transmitem sinais utilizando variações nos níveis de cálcio para gerar respostas funcionais que influenciam vários processos fisiológicos. A sinalização de cálcio nos astrócitos permite que eles modifiquem a atividade das sinapses, impactando diretamente em funções neurofisiológicas, assim como na regulação da hemodinâmica cerebral.

Nesse contexto, os dados apresentados na Figura 8 revelam que o pré-

tratamento com CBD, por si só, aumentou as concentrações intracelulares de cálcio em astrócitos hipocâmpais, enquanto estes valores foram reduzidos ao basal no grupo exposto a MEAE 0,1 mM e pré-tratado com CBD. Além do retículo endoplasmático, tem sido demonstrado que as mitocôndrias participam ativamente da mobilização do cálcio intracelular em astrócitos, contribuindo para a modelagem da dinâmica do cálcio citosólico. A absorção de cálcio pela mitocôndria é geralmente considerada um mecanismo passivo controlado pelos níveis de cálcio citosólico, embora evidências recentes sugiram que esse processo pode ser regulado ativamente. De acordo com Serrat *et al.* (2021), os canabinóides se ligam entre os contatos mitocôndrias-retículo endoplasmático (MERCs) astrogliais, em particular, nos receptores mtCB 1 em astrócitos e regula a dinâmica do cálcio celular astroglial, mediando a transmissão sináptica. Em outras palavras, a ligação de um canabinóide a receptores mtCB 1 pode ativar de maneira direta as respostas astrocíticas mediadas pela sinalização de cálcio.

Segundo Pulgar *et al.* (2022) o receptor canabinoide do tipo 1 (CB1R), um dos principais alvos de ação do CBD, e o receptor de detecção de cálcio (CaSR) estimulado por cálcio extracelular podem exercer sinalização celular conjunta para modular os níveis de cálcio intracelular. Assim, fitocanabinoides, endocanabinoides e canabinoides sintéticos também podem regular a dinâmica do cálcio astrocítico por meio da ativação do CB1R. Tadjan *et al.* (2022) também argumentam que os CB1R participam diretamente dos efeitos neuroprotetores dos canabinoides, regulando a liberação de glutamato, os níveis de cálcio citosólico e excitotoxicidade, bem como exercendo efeitos antioxidantes diretos e indiretos, propriedades anti-inflamatórias e a estimulação da neurogênese.

Além do mais, há indícios também da atuação do CBD sobre os receptores ionotrópicos do tipo TRPV1. Os receptores TRPV1, ao serem ativados pelo ligante, abrem na membrana celular um canal permeável a cátion, notadamente cálcio. Após a ativação, o cálcio se move preferencialmente através do poro, entra na célula e estimula uma série de processos relacionados. Nesse contexto, Muller *et al.* (2017) sugerem o CBD como o ligante canabinóide mais potente testado atualmente para os canais TRPV1. Independentemente do mecanismo envolvido na mobilização de cálcio a partir do meio intra ou extracelular, é fato que essas flutuações consistem de eventos bastante rápidos. Portanto, entendemos que avaliações realizadas em intervalos menores de tempo seriam essenciais para compreender de maneira

decisiva essa dinâmica. Contudo, devido ao tempo de duração dos experimentos, no presente trabalho só pudemos obter as amostras de células no momento final das estimulações (end-point de 2h), sendo uma limitação do estudo. Assim, é possível que flutuações ocorridas em intervalos menores não tenham sido corretamente detectadas.

Uma das muitas respostas efectoras induzidas pelo aumento do cálcio intracelular em astrócitos diz respeito à participação destas células no balanço cerebral de lactato. De acordo com Bonvento e Bolaños (2021), os astrócitos participam ativamente da regulação do metabolismo energético do SNC, contribuindo para a manutenção da função sináptica. Isso porque o lactato liberado pelos astrócitos pode ser absorvido pelos neurônios, os quais utilizam esse metabólito como combustível mitocondrial para obter energia para o transporte ativo, essencial, por exemplo, para a manutenção do funcionamento das bombas iônicas e também do transporte vesicular de neurotransmissores. Nesse contexto, Wu *et al.* (2023) relataram que o lactato desempenha um papel fundamental em vários processos fisiológicos, podendo exercer ação como um substrato metabólico, ou também como uma molécula de sinalização.

De acordo com nossos resultados, apresentados na Figura 9, o pré-tratamento com CBD por 2h, por si só, aumentou a liberação *in vitro* de lactato, enquanto estes valores foram diminuídos significativamente no grupo pré-tratado com CBD e exposto a MEAE. Os resultados obtidos recentemente por Fernández-Moncada *et al.* (2024) corroboram com os nossos achados e demonstram que a ativação em curto prazo dos CB1R resulta em um aumento transitório do lactato intracelular, o que não é verificado após ativação prolongada (24h), em que se observa diminuição da produção de lactato e aumento do estresse bioenergético neuronal. Em nosso estudo, os resultados de viabilidade celular demonstraram que o CBD tem ação glioprotetora na presença de MEAE, porém esta ação parece não estar relacionada com altos níveis de cálcio intracelular ou liberação aumentada de lactato. Visto que a incubação com CBD, por si só, aumenta a concentração de cálcio, e que na presença do MEAE esse efeito foi inibido, mesmo havendo prevenção da morte celular, é possível sugerir, a partir destes dados, que o CBD não exerce sua função glioprotetora por meio do aumento dos níveis intracelulares de cálcio ou da liberação de lactato.

Por fim, Xu *et al.* (2022) demonstraram que o lactato liberado pelo astrócito

desempenha um papel inibitório na resposta inflamatória, o que também poderia contribuir para a ação neuroprotetora do CBD, uma vez que o aumento do status inflamatório cerebral subsidia o desenvolvimento de muitas doenças neurodegenerativas. Assim, é relevante investigar mais a fundo os mecanismos moleculares por detrás dessas observações. Estudos futuros devem se concentrar em elucidar como o CBD influencia as vias de sinalização que regulam a homeostase do cálcio e lactato, bem como explorar os efeitos em diferentes tipos celulares em diferentes condições experimentais. O entendimento mais aprofundado dessas interações poderá abrir novas perspectivas para o uso do CBD em terapias destinadas a proteger as células neurais e não neurais de condições tóxicas e, potencialmente, fornecer uma base para a utilização clínica do CBD em distúrbios relacionados ao estresse oxidativo e à neuroinflamação.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram de forma clara que a exposição ao MEAE reduziu significativamente a viabilidade celular, principalmente na dose de 0,1 mM, assim como aumentou a reatividade astrocitária, evidenciada pelo aumento da expressão da proteína GFAP, mantendo inalterados os níveis de cálcio intracelular e a liberação de lactato. Nossos achados também proporcionaram importantes evidências do papel glioprotetor do CBD, que também esteve associado a uma maior expressão de GFAP e a um aumento da concentração citosólica de cálcio e da liberação *in vitro* de lactato, contudo, os dois últimos efeitos foram revertidos na presença do MEAE. Ou seja, os dados obtidos nos permitem supor que o CBD possui ação glioprotetora, protegendo os astrócitos hipocampais dos efeitos citotóxicos do MEAE. Porém, com base nestes resultados, não é possível traçar uma correlação clara de causa e efeito entre a função glioprotetora do CBD e seus efeitos sobre o balanço de cálcio e lactato na presença de MEAE.

REFERÊNCIAS

- BARRY, Jessica M.; BIRNBAUM, Angela K.; JASIN, Lisa R.; SHERWIN, Catherine M. **Exposição materna e efeitos neonatais de drogas de abuso**. 2. ed. [S. l.] : The American College of Clinical Pharmacology, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcph.1928>. Acesso em: 11 Dez. 2024.
- BENVENISTE, Helene; FOWLER, Joanna S.; ROONEY, William D.; SCHARF Bruce A.; BACKUS, W. Walter; IZRAILTYAN, Igor; KNUDSEN, Gitte M.; HASSELBALCH, Steen G.; VOLKOW, Nora D. **A cocaína é farmacologicamente ativa no cérebro fetal de primatas não humanos**. 2. ed. Nova York : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909585107>. Acesso em: 11 Dez. 2024.
- BINDOCCI, Érika; SAVTCHOUK, Iaroslav; LIAUDET, Nicolas; BECKER, Denise; CARRERO, Giovanni; VOLTERRA, Andrea. **Imagens tridimensionais de Ca²⁺ avançam na compreensão da biologia dos astrócitos**. 6339. ed. [S. l.] : Science, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aai8185>. Acesso em: 08 Nov. 2024.
- BITTENCOURT, Augusto Martins Lucas; BAMPI, Vinicius Faccin; SOMMER, Rafael Canani; SCHAKER, Vanessa; JURUENA, Mario Francisco Pereira; SODER, Ricardo Bernardi; FRANCO, Alexandre Rosa; SANVICENTE-VIEIRA, Breno; GRASSI-OLIVEIRA, Rodrigo; FERREIRA, Pedro Eugenio Mazzucchi Santana. **Anormalidades na espessura cortical e no volume subcortical em usuários masculinos de crack e cocaína**. 310. ed. Rio Grande do Sul : Psychiatry Research: Neuroimaging, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.111232>. Acesso em: 08 Nov. 2024.
- BONDAN, Eduardo Fernandes; CARDOSO, Carolina Vieira; MARTINS, Maria de Fátima Monteiro; OTTON, Rosemari. **Prejuízos de memória e aumento da expressão de GFAP em astrócitos hipocámpais após dieta hipercalórica em ratos**. 77. ed. [S. l.] : Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0004-282X20190091>. Acesso em: 04 Abr. 2025.
- BONVENTO, Gilles; BOLAÑOS, Juan P. **A cooperação metabólica entre astrócitos e neurônios molda a atividade cerebral**. 8. ed. [S. l.] : Cell Metabolism, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.006>. Acesso em: 06 Dez. 2024.
- BRADLEY, Karen N.; ROWAN, Edward G.; HARVEY, Alan L. **Efeitos das toxinas muscarínicas MT2 e MT7, do veneno da mamba verde, sobre [...]**. 2. ed. [S. l.] : *Toxicon*, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00278-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00278-7). Acesso em: 06 Abr. 2025.
- CASTILLO, Pablo E.; YOUNTS, Thomas J.; CHÁVEZ, Andrés E.; HASHIMOTODANI, Yuki. **Sinalização endocanabinoide e função sináptica**. 1. ed. Nova York : Neuron, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>. Acesso em: 06 Abr. 2025.

CASTRO, Raquel Augusta de; RUAS, Raquel Neves; ABREU, Renan Costa; ROCHA, Renata Bernardi; FERREIRA, Renata de Figueiredo; LASMAR, Renato Cançado; AMARAL, Sofia Andrade do; JOSÉ, Antônio; XAVIER, Daniel. **Crack: farmacocinética, farmacodinâmica, efeitos clínicos e tóxicos**. 2. ed. Belo Horizonte: Revista Médica de Minas Gerais, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20150045>. Acesso em: 16 Abr. 2025.

DALDEGAN-BUENO, Dimitri; MAIA, Lucas O.; GLASS, Michelle; JUTRAS-ASWAD, Didier; FISCHER, Benedikt. **Coexposição de cocaína e canabinoides e sua associação com resultados biológicos, comportamentais [...]**. 51. ed. [S. l.] : European Neuropsychopharmacology, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.06.002>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

DEVINSKY, Orrin; CILIO, Maria Roberta; CROSS, Helen; FERNANDEZ-RUIZ, Javier; FRENCH, Jacqueline; CHARLOTTE, Hill; KATZ, Russell. **Canabidiol: Farmacologia e Potencial Papel Terapêutico na Epilepsia e outros [...]**. 6. ed. [S. l.] : Epilepsia, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.12631>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

ERASO-PICHOT, Abel; POUVREAU, Sandrine; OLIVERA-PINTO, Alexandre; GOMEZ-SOTRES, Paula; SKUPIO, Urszula; MARSICANO, Giovanni. **Sinalização endocanabinoide em astrócitos**. 1. ed. Bordeaux : Glia, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.24246>. Acesso em: 02 Abr. 2025.

FERNÁNDEZ-MONCADA, Ignacio; LAVANCO, Gianluca; FUNDAZURI, Unai B.; BOLLMOHR, Nasrin; MOUNTADEM, Sarah; TOR, Tommaso Dalla; HACHAGUER, Pauline. **Uma mudança dependente de lactato na glicólise media processos sinápticos e cognitivos em camundongos machos**. 15. ed. [S. l.] : Nature Communications, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51008-2>. Acesso em: 06 Dez. 2024.

FRAGUAS-SÁNCHEZ, Ana Isabel; TORRES-SUÁREZ, Ana Isabel. **Uso médico de canabinoides**. 16. ed. [S. l.] : Drugs, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0996-1>. Acesso em: 06 Dez. 2024.

GALLARDO-VILLAGRÁN, Manuel; PAULUSL, Lucie; LEGER, David Yannick; THERRIENB, Bruno; LIAGREB, Bertrand. **Dimetilsulfóxido: um produto químico biocompatível ou perigoso? O efeito do DMSO em [...]**. 14. ed. [S. l.] : Molecules, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27144472>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

GARCIA, Raphael Caio Tamborelli; TORRES, Larissa Lobo; DATI, Livia Mendonça Munhoz; LOUREIRO, Ana Paula De Melo; AFECHE, Solange Castro; SANDOVAL, Maria Regina Lopes; MARCOURAKIS, Tania. **Éster metílico de anidroecgonina (AEME), um produto de pirólise de cocaína, prejudica [...]**. 6. ed. [S. l.] : Toxicology Reports, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.001>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

GARCIA, Raphael Caio Tamborelli; DATI, Livia Mendonça Munhoz; FUKUDA, Suelen; TORRES, Larissa Helena Lobo; MOURA, Sidnei; CARVALHO, Nathalia Delazeri de; CARRETTIERO, Daniel Carneiro. **Neurotoxicidade do éster metílico de anidroecgonina, um produto de pirólise de crack**. 1. ed. [S. l.] : Toxicological Sciences, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs140>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. **Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão**. 27. ed. Rio de Janeiro : Estudos Avançados, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100006>. Acesso em: 12 Dez. 2024.

HETEA, Andreea; COSCONEL, Cristiana; STANESCU, Ana Alexandra Maria; SIMIONESCUA, Anca A. **Álcool e drogas psicoativas na gravidez**. 4. ed. [S. l.] : Mædica, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.26574/maedica.2019.14.4.397>. Acesso em: 12 Dez. 2024.

HÖFLICH, Anna; MICHENTHALE, Paul; KASPER, Siegfried; LANZENBERGER, Rupert. **Mecanismos de circuito de recompensa, anedonia e depressão**. 2. ed. [S. l.] : The International Journal of Neuropsychopharmacology, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy081>. Acesso em: 04 Abr. 2025.

HORCHAROENSUK, Pongsatorn; YANG-EN, Sunantha; CHAKRITBUDSABONG, Warunya; SAMATIWAT, Papavee; PRAMONG, Ratchadaporn; RUNGARUNLER, Sasitorn; RUNGSIWIWUT, Ruttachuk. **A melatonina atenua a degeneração induzida por dimetilsulfóxido e vírus Zika em células-tronco neurais suínas**. 3. ed. [S. l.] : In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11626-022-00648-z>. Acesso em: 04 Abr. 2025.

KASIMU, Aziguli; APIZI, Xierenguli; TALIFUJIANG, Dilibaier; MA, Xin; FANG, Liping; ZHOU, Xiangling. **MiR-125a-5p em astrócitos atenua neuropatia periférica em camundongos diabéticos tipo 2 por meio do direcionamento do TRAF6**. 1. ed. [S. l.] : Endocrinologia, Diabetes Y Nutricion, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.endien.2022.01.006>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

LINNERBAUER, Mathias; ROTHHAMMER, Veit. **Funções protetoras de astrócitos reativos após lesão do sistema nervoso central**. 11. ed. Munich : Frontiers in Immunology, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.573256>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

MARDINI, Victor; ROHDE, Luis A.; CERESÉR, Keila M.; GUBERT, Carolina M.; SILVA, Emily G. Da; XAVIER, Fernando; PARCIANELLO, Rodrigo; RÖHSIG, Liane M. **Níveis de TBARS e BDNF em recém-nascidos expostos ao crack/cocaína durante a gestação: um estudo comparativo**. 3. ed. [S. l.] : Brazilian Journal of Psychiatry, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2016-2035>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

MOREIRA, Dara Julia Silva; SANTOS, Ivete Maria; DUNNINGHAM, William Azevedo. **A exposição ao crack durante a gestação e suas repercussões maternas, fetais e neonatais: uma revisão sistemática**. 3. ed. Salvador : Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria, 2022.

MULLER, Chanté; MORALES, Paula; REGGIO, Patricia H. **Ligantes canabinoides direcionados aos canais TRP**. 11. ed. [S. l.] : Frontiers in Molecular Neuroscience, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

PULGAR, Victor M.; HOWLETT, Allyn C.; ELDEEB, Khalil. **WIN55212-2 modula o cálcio intracelular por meio de mecanismos dependentes e [...]**. 11. ed. [S. l.] : Cells, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11192947>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

REUS, Alexandra J. E. M. De; BASAK, Onur; DYKSTRA, Werner; ASPEREN, Jessy V. Van; BODEGRAVEN, Emma J. Van; HOL, Elly M. **Isoformas de GFAP no sistema nervoso: entendendo a necessidade de diversidade [...]**. 28. ed. [S. l.] : Current Opinion in Cell Biology, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102340>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

SERAFINI, Randal A.; KERRI, D. Pryce; ZACHARIOU, Venetia. **O sistema dopaminérgico mesolímbico na dor crônica e comorbidades afetivas associadas**. 1. ed. [S. l.] : Biological psychiatry, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.10.018>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

SERRAT, Roman; COVELO, Ana; KOUSKOFF, Vladimir; DELCASSO, Sebastien; RUIZ-CALVO, Andrea; CHENOUIARD, Nicolas; STELLA, Carol. **A transferência de cálcio do RE-mitocôndria astrogliar media a integração sináptica [...]**. 12. ed. [S. l.] : Cell Reports, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110133>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

SMITH, Lauren C.; TIEU, Lani; SUHANDYNATA, Raymond T.; BOOMHOWER, Brent. **O canabidiol reduz os sintomas de abstinência em ratos dependentes de nicotina**. 8. ed. [S. l.] : Psychopharmacology, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05845-4>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

TADIJAN, Ana; VLAŠIĆ, Ignacija; VLAINIĆ, Josipa; ĐIKIĆ, Domagoj; ORŠOLIC, Nada; JEMBREK, Maja Jazvinščak. **Alvos moleculares intracelulares e vias de sinalização envolvidas nos efeitos antioxidantes e neuroprotetores dos [...]**. 10. ed. [S. l.] : Antioxidants, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox11102049>. Acesso em: 06 Dez. 2024.

VILELA, Luciano Rezende; LINDISLEY, Ferreira Gomides; DAVIDB, runa Araújo; ANTUNES, Máisa Mota; DINIZ, Ariane Barros; MOREIRA, Fabrício de Araújo; MENEZES, Gustavo Batista. **O canabidiol alivia a toxicidade hepática aguda e as convulsões induzidas pela cocaína**. 1. ed. [S. l.] : Mediators of Inflammation, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/523418>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

WU, Anika; LEE, Daehoon; XIONG, Wen-Cheng. **Metabolismo, sinalização e função do lactato no desenvolvimento cerebral, plasticidade sináptica, angiogênese e doenças neurodegenerativas**. 17. ed. [S. l.] : International Journal of Molecular Sciences, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms241713398>. Acesso em: 06 Dez. 2024.

WU, Jun; CHEN, Nu; LIU, Yongqing; GODLEWSKIG, rzegorz; KAPLAN, Henry J.; SHRADER, Sarah H. **Estudos do envolvimento do receptor-3 acoplado à proteína G nos efeitos do canabidiol nas respostas inflamatórias de [...]**. 5. ed. [S. l.] : PLOS ONE, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251677>. Acesso em: 08 Nov. 2024.

XU, Jinying; JI, Tong; LI, Guichen; ZHANG, Haiying; ZHENG, Yangyang; LI, Meiyong. **O lactato atenua a inflamação astrocítica ao inibir a ubiquitinação e a degradação do NDRG2 em condições de privação de oxigênio-glicose**. 1. ed. [S. l.] : Journal of Neuroinflammation, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02678-6>. Acesso em: 06 Dez. 2024.

ZOU, Guichang; ZOU, Xin; CHEN, Kai; GE, Yushu; WANG, Xiaoqun. **Canabinoides aliviam convulsões induzidas por cocaína ao restaurar a disfunção do receptor de glicina no cérebro**. 12. ed. [S. l.] : Cell Reports, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.106>. Acesso em: 04 Jan. 2024.

APÊNDICE A – Tabela dos Valores de F e p para cada comparação

Variável	Fatores	F	p
Viabilidade celular *	Tratamento	19,45	<0,001
Expressão de GFAP	Interação	F (1, 63) = 2,30	=0,13
	CBD	F (1, 63) = 7,48	<0,01
	MEAE	F (1, 63) = 3,78	=0,056
Cálcio intracelular	Interação	F (1, 39) = 9,47	<0,05
	CBD	F (1, 39) = 7,52	<0,01
	MEAE	F (1, 39) = 1,38	=0,24
Lactato extracelular	Interação	F (3, 80) = 3,10	<0,05
	CBD	F (1, 80) = 38,37	<0,001
	MEAE	F (3, 80) = 4,39	<0,01

Legenda: CBD: Canabidiol; MEAE: metil-éster de anidroecgonina. * Análise por One-Way ANOVA. ** Análise por Two-Way ANOVA.

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 **EFEITOS IN VITRO DO TRATAMENTO COM CANABIDIOL (CBD) SOBRE A MORFOLOGIA E ATIVIDADE DE ASTRÓCITOS EXPOSTOS A METIL-ÉSTER DE ANIDROECGONINA (SUBPRODUTO DO CRACK/COCAÍNA)**, registrada com o nº **0032/2023**, 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 **01/02/2024 a 31/01/2026**, 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
Rato / Wistar	52	26	26	Biotério central da unifal/mg

Alfenas, 26 de Janeiro de 2024

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG