

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Esther Marques Alves Maciel

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO CANABIDIOL SOBRE A REATIVIDADE EM  
ASTRÓCITOS HUMANOS DERIVADOS DE  
CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA**

Belo Horizonte  
2022

Esther Marques Alves Maciel

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO CANABIDIOL SOBRE A REATIVIDADE EM  
ASTRÓCITOS HUMANOS DERIVADOS DE  
CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA**

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Fabíola Mara Ribeiro

Belo Horizonte  
2022

043 Maciel, Esther Marques Alves.  
Investigação do efeito do canabidiol sobre a reatividade em astrócitos humanos derivados de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs) [manuscrito] / Esther Marques Alves Maciel. – 2022.  
62 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Fabíola Mara Ribeiro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Astrócitos. 3. Gliose. 4. Canabidiol. 5. Células-Tronco Pluripotentes Induzidas. 6. Interleucina-1beta. 7. Fator de Necrose Tumoral alfa. I. Ribeiro, Fabíola Mara. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ESTHER MARQUES ALVES MACIEL.** Aos vinte e dois dias do mês de julho de 2022 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Teams”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Investigação do efeito do canabidiol sobre a reatividade em astrócitos humanos derivados de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs)”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Fabíola Mara Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Fabrício de Araújo Moreira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de julho de 2022.

Dr. Fabrício de Araújo Moreira (UFMG)

Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho (UFMG)

Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (UFMG)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que me sustentou durante o mestrado e a Quem devo toda a honra, sempre.

Agradeço a meus familiares e amigos, que constantemente me fazem lembrar a grandeza da vida. À Nathália pelo companheirismo e pelas experiências compartilhadas, muito além da bancada.

Agradeço a todos os professores pelos aprendizados construídos até aqui.

Agradeço em especial à professora Fabíola pela orientação, desde o início da caminhada acadêmica, e ao Pablo pela diligência em transmitir seus conhecimentos técnicos e teóricos.

Agradeço à Anna Luíza, à professora Luciene e ao professor Fabrício, por contribuírem para a realização desse projeto.

Agradeço aos colegas do Lab. RNAi e Neuro, exemplos de perseverança na vida científica, pelo auxílio em tantos momentos.

Apesar das limitações, esse estudo representa um período de muito aprendizado e sou grata a todos que me transmitiram encorajamento.

## RESUMO

Os astrócitos são as células mais abundantes da glia e desempenham funções essenciais para a homeostase cerebral e a plasticidade sináptica. Em resposta a sinais extrínsecos, como mediadores inflamatórios, os astrócitos sofrem modificações transcricionais, morfológicas e funcionais, em um processo denominado astrogliose reativa ou reatividade astrocitária. De acordo com o fenótipo adotado, a reatividade pode contribuir para a manutenção ou para a resolução de condições patológicas, o que torna os astrócitos possíveis alvos farmacológicos. Nos últimos anos, diversas evidências têm demonstrado que o canabidiol exerce efeitos modulatórios sobre a ativação astrocitária em modelos animais. Entretanto, a investigação dos seus efeitos sobre astrócitos humanos ainda é bastante escassa devido à dificuldade de obtenção de células do sistema nervoso central humano. Recentemente, o desenvolvimento de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs) tornou-se uma alternativa para superar esse obstáculo, facilitando a obtenção de diferentes tipos celulares humanos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo verificar se o canabidiol exerce imunomodulação sobre astrócitos humanos, como já demonstrado em astrócitos de roedores. Para isso, analisou-se a ação *in vitro* do canabidiol sobre parâmetros moleculares e funcionais de astrócitos humanos derivados de iPSCs, bem como seu potencial em modular a resposta astrocitária ao estímulo inflamatório composto pelas citocinas interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Os resultados indicam que o estímulo inflamatório aumentou a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos astrócitos. Entretanto, não alterou a expressão da interleucina 6 (IL-6), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), da proteína progranulina e do transportador de aminoácido excitatório 1 (EAAT1). Além disso, o estímulo inflamatório não modificou a concentração extracelular de glutamato nas culturas astrocitárias. O tratamento com canabidiol inibiu o aumento de IL-1 $\beta$  em astrócitos estimulados e não alterou os demais parâmetros analisados em astrócitos quiescentes e estimulados. Experimentos de viabilidade celular indicaram que o canabidiol na concentração de 10  $\mu$ M, mas não de 1  $\mu$ M, promoveu a morte dos astrócitos. Em conjunto, esses dados apontam a importância de investigações mais detalhadas sobre a ação do canabidiol em células humanas do sistema nervoso central, tendo em vista sua utilização no tratamento de condições neuroinflamatórias.

**PALAVRAS-CHAVE:** astrogliose reativa; reatividade astrocitária; astrócitos humanos; iPSCs; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; canabidiol.

## ABSTRACT

Astrocytes are the most abundant glial cells and perform essential functions contributing for brain homeostasis and synaptic plasticity. In response to extrinsic signals, such as inflammatory mediators, astrocytes undergo transcriptional, morphological and functional modifications, in a process known as reactive astrogliosis or astrocytic reactivity. According to the adopted phenotype, reactivity can contribute to the maintenance or resolution of pathological conditions, making astrocytes potential pharmacological targets for the treatment of neurological diseases. In recent years, it has been shown that cannabidiol exerts modulatory effects on astrocyte activation in animal models. However, the investigation of its effects on human astrocytes is still quite scarce due to the difficulty in obtaining cells from the human central nervous system. Recently, the development of induced pluripotency stem cells (iPSCs) has arisen as an alternative to overcome this obstacle, facilitating the obtainment of different human cell types. Therefore, the present study aimed to verify whether cannabidiol exerts immunomodulation on human astrocytes, as already demonstrated in rodent astrocytes. For this, we analyzed the *in vitro* effects of cannabidiol on molecular and functional parameters of human astrocytes, as well as its potential to modulate the astrocytic response to the inflammatory cytokines interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). The results indicate that the inflammatory stimulus increased the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by astrocytes. However, it did not alter the expression of interleukin 6 (IL-6), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), progranulin protein and excitatory amino acid transport 1 (EAAT1). Furthermore, the inflammatory insult did not change the extracellular concentration of glutamate in astrocytic cultures. Treatment with cannabidiol inhibited the increase of IL-1 $\beta$  in stimulated astrocytes, but it did not change the other parameters analyzed in quiescent and stimulated astrocytes. Cell viability assay indicated that cannabidiol at the concentration of 10  $\mu$ M, but not 1  $\mu$ M, triggered astrocytic cell death. Taken together, these data point to the importance of more detailed investigations into the action of cannabidiol on human cells of the central nervous system, in view of its use in the treatment of neuroinflammatory conditions.

**KEYWORDS:** reactive astrogliosis; astrocyte reactivity; human astrocytes, iPSCs; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; cannabidiol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do canabidiol.....	20
Figura 2: Principais alvos moleculares relacionados ao efeito imunomodulatório do canabidiol em modelos pré-clínicos de desordens do SNC.....	24
Figura 3: Efeito do canabidiol sobre a viabilidade de astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	35
Figura 4: Expressão da citocina IL-1 $\beta$ em astrócitos humanos derivados de iPSCs....	39
Figura 5: Expressão da citocina TNF- $\alpha$ em astrócitos humanos derivados de iPSCs..	39
Figura 6: Expressão da citocina IL-6 em astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	40
Figura 7: Expressão de progranulina em astrócitos humanos derivados de iPSCs....	41
Figura 8: Expressão de BDNF em astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	42
Figura 9: Expressão de EAAT1 em astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	43
Figura 10: Concentração de glutamato no meio condicionado de astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura utilizados para a obtenção de astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	29
Tabela 2: Sequências dos iniciadores para a análise da expressão gênica.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: albumina de soro bovino  
C3: componente C3 do complemento  
CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio  
CB1: receptor canabinoide tipo 1  
CB2: receptor canabinoide tipo 2  
CBD: canabidiol  
cDNA: DNA complementar  
Cl<sup>-</sup>: íon cloro  
*c-MYC: MYC proto-oncogene*  
Δ9-THC: delta-9-tetrahydrocannabinol  
DMEM/F-12: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco/Mistura de Nutrientes F-12  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados  
DTT: 1,4-Ditiotreitol  
EAAT: transportador de aminoácido excitatório  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
ENT 1: transportador equilibrativo de nucleosídeos 1  
FAAH: amida hidrolase de ácido graxo  
FBS: soro fetal bovino  
GDH: glutamato desidrogenase  
GFAP: proteína acídica fibrilar glial  
GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos  
GPR55: receptor acoplado à proteína G 55  
H<sup>+</sup>: íon hidrogênio  
HEPES: ácido etanosilfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1  
K<sup>+</sup>: íon potássio  
IFN-β: interferon beta  
IL-1A: interleucina 1 alfa  
IL-1β: interleucina 1 beta  
IL-6: interleucina 6  
IL-12: interleucina 12

IL-23: interleucina 23  
iNOS: óxido nítrico sintase induzível  
IPO8: importina 8  
iPSCs: células-tronco de pluripotência induzida  
KCl: cloreto de potássio  
KLF4: *Krüppel-like factor 4*  
KRH: solução Krebs–Ringer–HEPES  
LDH: lactato desidrogenase  
µL: microlitros  
µM: micromolar  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
MgSO<sub>4</sub>: sulfato de magnésio  
mm: milímetros  
mM: milimolar  
m/v: massa/volume  
Na<sup>+</sup>: íon sódio  
NaCl: cloreto de sódio  
NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NAPE-PLD: N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D  
NF-κB: fator nuclear kappa B  
ng/mL: nanogramas por mililitro  
NLRP3: *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3*  
nm: nanômetros  
NSCs: células-tronco neurais  
Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2  
OCT3/4: *octamer-binding transcription factor 3/4*  
PBS: tampão fosfato-salino  
PPAR γ: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama  
PSCs: células-tronco pluripotentes  
PSD95: proteína de densidade pós-sináptica 95  
qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa  
rcf: força centrífuga relativa  
RNA: ácido ribonucleico  
RPLP0: proteína ribossômica ácida 60S P0

S100 $\beta$ : proteína B de ligação ao cálcio S100

SNC: sistema nervoso central

SOX2: *SRY-Box Transcription Factor 2*

STAT3: transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TR7: transcriptase reversa 7

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

Tris-HCl: cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano

TRPV1: receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1

VCAM-1: proteína de adesão de células vasculares 1

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Astrócitos: homeostasia e reatividade.....	14
1.2 Especificidades dos astrócitos humanos.....	17
1.3 Estudo da reatividade em astrócitos humanos.....	18
1.4 Aspectos gerais sobre o canabidiol.....	20
1.5 Modulação da reatividade astrocitária pelo canabidiol.....	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Manutenção de NSCs.....	28
3.2 Diferenciação de NSCs em astrócitos.....	28
3.3 Plaqueamento dos astrócitos.....	29
3.4 Ensaio de viabilidade celular.....	30
3.5 Estímulo e tratamento das culturas de astrócitos.....	30
3.6 Análise da expressão gênica.....	31
3.7 Quantificação do nível de glutamato nos meios condicionados dos astrócitos.....	32
3.8 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Efeito do canabidiol sobre a viabilidade de astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	34
4.2 Efeito do canabidiol sobre a expressão gênica em astrócitos humanos derivados de iPSCs.....	38
4.2.1 Citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6.....	38
4.2.2 Progranulina.....	40
4.2.3 Fator neurotrófico derivado do cérebro.....	41
4.3 Efeito do canabidiol sobre a manutenção da homeostase glutamatérgica.....	42
4.3.1 Expressão do transportador de aminoácido excitatório 1.....	42
4.3.2 Nível extracelular de glutamato.....	43
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

7.1 Bibliografia não indexada.....	50
7.2 Bibliografia indexada.....	50

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Astrócitos: homeostasia e reatividade

Os astrócitos são células da glia, residentes no sistema nervoso central (SNC), cuja morfologia é caracterizada pela abundância de processos citoplasmáticos, que se ramificam, formando arborizações complexas. Apesar de os astrócitos conectarem-se por meio de junções celulares, os territórios anatômicos formados por seus processos praticamente não se justapõem, de forma que os domínios funcionais dos astrócitos são considerados não sobrepostos (Nedergaard, M. *et al.*, 2003).

As funções astrocitárias são de fundamental importância para o equilíbrio metabólico e eletroquímico do SNC. Os astrócitos são responsáveis por armazenar a glicose, o principal substrato energético do tecido cerebral, sob a forma de glicogênio. O glicogênio é convertido a lactato pelos astrócitos, o qual, após ser liberado, é utilizado pelos neurônios em seu metabolismo (Pellerin, L. *et al.*, 1998). Por estarem em contato direto com os terminais sinápticos e os capilares sanguíneos, através de seus processos citoplasmáticos, os astrócitos detectam a atividade neuronal, ajustando o fornecimento energético e o fluxo sanguíneo à demanda metabólica dos neurônios, processo conhecido como acoplamento neurovascular (Tsacopoulos, M. e Magistretti P.J. 1996). Além disso, realizam a manutenção da homeostase osmótica e de íons, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{H}^+$ , fundamental para a ocorrência da transmissão sináptica (Simard, M. e Nedergaard, M. 2004).

Inicialmente vistos apenas como células de suporte, os astrócitos participam da formação, maturação e eliminação de sinapses, de modo essencial para o desenvolvimento e a manutenção adequados da conectividade neuronal (Allen N. J. 2014). Adicionalmente, respondem à atividade neuronal, gerando correntes intracelulares de cálcio, que podem ser propagadas por meio de junções celulares entre astrócitos adjacentes. As oscilações de cálcio induzem a liberação de neurotransmissores pelos astrócitos que, dessa forma, modulam a transmissão sináptica em circuitos neuronais. As moléculas liberadas pelos astrócitos, denominadas gliotransmissores, incluem glutamato, D-serina e ATP (Ren, B. e Dunaevsky, A. 2021). Além disso, os astrócitos realizam a captação de neurotransmissores da fenda sináptica, tais como ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina e glutamato (Mahmoud, S. *et al.*, 2019). Esta regulação astrocitária é um

mecanismo importante para a plasticidade sináptica, modulando a ativação e a intensidade da transmissão nos circuitos neuronais (Hamilton, N. B. e Attwell, D. 2010). A descoberta da participação astrocitária sobre a atividade neuronal levou ao surgimento do conceito da sinapse tripartite, formada por 3 elementos: terminal pré-sináptico, terminal pós-sináptico e astrócito (Araque, A. *et al.*, 1999).

Outras funções astrocitárias importantes relacionam-se à formação da barreira hematoencefálica e à regulação de sua permeabilidade, por meio de moléculas vasoativas, como por exemplo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), endotelina 1, óxido nítrico, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  (Abbott N. J. 2002). Por envolverem a microvasculatura cerebral, os processos astrocitários permitem que estas células participem da regulação da entrada e da atividade no SNC de células imunes provenientes da periferia (Soung, A. e Klein, R. S. 2019).

Em contextos patológicos, os astrócitos passam por modificações transcricionais, morfológicas e funcionais, como resposta aos sinais extracelulares, em um processo denominado reatividade astrocitária ou astrogliose reativa. Como resultado, pode ocorrer tanto a perda de funções homeostáticas quanto o ganho de funções, em alguns casos protetivas e, em outros, prejudiciais. Assim, o impacto geral da reatividade varia conforme o fenótipo adotado, que pode ser variável entre diferentes subpopulações astrocitárias (Escartin, C. *et al.*, 2021). Como exemplo de ganho de função, pode-se citar a formação de cicatrizes gliais ao redor dos tecidos afetados pela injúria. A cicatriz atua como barreira física para restringir, localmente, moléculas inflamatórias, células imunes ou patógenos, mecanismo importante para a resolução de diferentes tipos de injúria (He, Y. *et al.*, 2020).

Uma vez reativos, os astrócitos podem amplificar processos fisiopatológicos no SNC, atraindo e ativando células imunes por meio da expressão de quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão e vasoativas. A liberação de VEGF por astrócitos reativos, por exemplo, é um dos mecanismos pelos quais a citocina IL-1 $\beta$  provoca quebra da integridade da barreira hematoencefálica após injúria no SNC, contribuindo para a neuroinflamação (Burda, J. E. e Sofroniew, M. V. 2014). Interessantemente, os astrócitos podem estimular tanto fenótipos pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios em outras células, como linfócitos T e micróglia (Linnerbauer, M. *et al.*, 2020). Isto ocorre devido à diversidade de mediadores que podem ser produzidos pelos astrócitos durante a reatividade, a depender do contexto molecular em que estão inseridos (Han, R. T. *et al.*, 2021).

Nesse sentido, alguns fatores de transcrição são considerados essenciais para o fenótipo apresentado pelos astrócitos reativos. Dentre eles, destacam-se o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) (Anderson, M. A. *et al.*, 2014). O fator NF- $\kappa$ B pode ser ativado, em sua via canônica, por mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e citocinas da família IL-1. Quando ativo, transloca-se para o núcleo, a fim de induzir a expressão de diversos genes associados ao sistema imune, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Desta forma, NF- $\kappa$ B é um componente chave para a expressão de genes pró-inflamatórios (Liu, T. *et al.*, 2017). A ativação de NF- $\kappa$ B em astrócitos reativos contribui para o agravamento da neuroinflamação e para a neurotoxicidade em modelo pré-clínico de esclerose múltipla (Brambilla, R. *et al.*, 2009), lesão medular (Brambilla, R. *et al.*, 2005) e isquemia (Dvorientchikova, G. *et al.*, 2009).

STAT3 faz parte da família STAT de transdutores de sinais, cuja sinalização pode ser desencadeada por citocinas ou fatores de crescimento (Aaronson, D. S. e Horvath, C. M. 2002). A citocina IL-6, por exemplo, ativa de maneira robusta a via de STAT3, levando à regulação de diversos genes alvo, que modulam processos associados à proliferação celular e à resposta imune (Aaronson, D. S. e Horvath, C. M. 2002). Em astrócitos, STAT3 atua sobre mecanismos diretamente associados à reatividade, como proliferação, migração, expressão de filamentos intermediários, secreção de citocinas e quimiocinas (Ceyzériat, K. *et al.*, 2016). A sinalização mediada por STAT3 em astrócitos reativos contribui para a resolução de quadros neuroinflamatórios, conforme observado em modelos de lesão medular (Okada, S. *et al.*, 2006), doença autoimune (Haroon, F. *et al.*, 2011) e infecção (Drögemüller, K. *et al.*, 2008).

Em diversas condições patológicas do SNC, a secreção de fatores de crescimento e o suporte metabólico realizado por astrócitos reativos podem favorecer a sobrevivência neuronal. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), por exemplo, é sintetizado em baixos níveis pelos astrócitos, em contexto fisiológico, mas sua expressão pode aumentar em resposta a injúrias. Em modelos de desmielinização, a síntese do fator pelos astrócitos contribui para a melhora de sinais clínicos, para a preservação axonal e a remielinização (Linnerbauer, M. e Rothhammer, V. 2020).

Uma das moléculas capazes de modular o fenótipo reativo em astrócitos é a proteína imunorreguladora progranulina, secretada no SNC por neurônios, micróglia

e astrócitos. Sua ação sobre os astrócitos é sugerida em estudos que indicam a importância da progranulina para a regulação da reatividade astrocitária em modelos *in vivo* de deficiência da proteína e em pacientes com demência frontotemporal (Ghoshal, N. *et al.*, 2012; Heller, C. *et al.*, 2020; Yin, F. *et al.*, 2010). É possível que a progranulina exerça esse efeito por ser capaz de ligar a receptores da citocina TNF- $\alpha$  e inibir a via de sinalização que culmina com a ativação de NF- $\kappa$ B, fator importante na indução da astrogliose (Wang, B. C. *et al.*, 2015).

Considerando a variabilidade dos fenótipos astrocitários que podem ser adotados durante a reatividade, propõe-se o desenvolvimento de terapias que busquem atenuar o ganho de funções prejudiciais e potencializar as ações homeostáticas, modulatórias e citoprotetoras dos astrócitos (Escartin, C. *et al.*, 2021).

## 1.2 Especificidades dos astrócitos humanos

Embora compartilhem similaridades funcionais com outras espécies, os astrócitos humanos se distinguem por apresentarem características únicas, como maior abundância e diversidade populacional. Curiosamente, a proporção entre o número de astrócitos e neurônios é maior no cérebro humano do que em outros mamíferos. No córtex de roedores, por exemplo, estima-se que este valor seja cerca de 0,33, enquanto em córtex de humanos, cerca de 1,4 (Nedergaard, M. *et al.*, 2003).

As diferenças morfológicas também são significativas, pois os astrócitos humanos exibem processos citoplasmáticos com maior comprimento e mais ramificações. Estima-se que cada astrócito humano realize contato com cerca de 2 milhões de sinapses, enquanto que cada astrócito de roedor estabeleça contato com cerca de 90 mil sinapses (Oberheim, N. A. *et al.*, 2006). A maior complexidade dos astrócitos humanos permite a conexão com uma quantidade maior de sinapses, ampliando o alcance de integração da atividade neuronal. Em conjunto, estes fatores sugerem que a complexidade do cérebro humano deve-se, em parte, à maior capacidade astrocitária em modular os circuitos sinápticos (Oberheim, N. A. *et al.*, 2006).

Além disso, a comparação entre os transcriptomas de astrócitos humanos e murinos revelou diferenças significativas no perfil gênico entre as espécies (Zhang, Y. *et al.*, 2016). Foram identificados cerca de 600 genes diferencialmente expressos apenas por astrócitos humanos, que respondem de forma mais intensa ao glutamato,

através dos sinais de cálcio e, portanto, podem detectar e modular a atividade sináptica com maior sensibilidade (Zhang, Y. *et al.*, 2016). Na espécie humana, destaca-se a maior expressão astrocitária de genes relacionados à resposta imune, incluindo genes da família de IL-6. Interessantemente, a exposição à citocina inflamatória TNF- $\alpha$  ativa a via de apresentação de antígeno em astrócitos humanos, mas não em murinos (Li, J. *et al.*, 2021).

Recentemente, demonstrou-se que os astrócitos humanos são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, com menor taxa de sobrevivência à exposição ao peróxido de hidrogênio do que astrócitos murinos (Li, J. *et al.*, 2021). O fato de astrócitos humanos responderem de maneira diferente a sinais extrínsecos pode ser um dos fatores responsáveis pela baixa efetividade, em pacientes, de tratamentos farmacológicos que mostram-se promissores em modelos murinos de doenças neurológicas (Hay, M. *et al.*, 2014). Essa limitação é observada, por exemplo, em modelos murinos de isquemia, que são capazes de apresentar recuperação completa, sem nenhum tipo de sequela, o que não é verificado em pacientes. Um dos mecanismos moleculares responsáveis por essa discrepância é a indução de sinalizações estimuladoras de reparo neuronal, que ocorre de maneira robusta e sustentada em astrócitos murinos, mas transiente em astrócitos humanos (Li, J. *et al.*, 2021).

### 1.3 Estudo da reatividade em astrócitos humanos

A existência de particularidades genéticas e fenotípicas dos astrócitos humanos, tanto em estado fisiológico quanto reativo, aponta para a utilização dessas células como alternativa interessante para a pesquisa translacional. Astrócitos humanos em cultura exibem as principais características funcionais de sua linhagem celular, tais como captação de glutamato extracelular, propagação de ondas de cálcio, fagocitose, promoção de sinaptogênese e sobrevivência neuronal (Zhang, Y. *et al.*, 2016; Santos, R. *et al.*, 2017). Entretanto, a utilização de células provenientes de animais ainda é predominante, devido à dificuldade de obtenção de células do SNC humano.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs) tornou-se uma opção vantajosa de modelo *in vitro*, tendo em vista a

escassez de tecido humano disponível para realização de culturas primárias. A indução de pluripotência foi demonstrada mediante a expressão ectópica de 4 fatores de transcrição, OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-MYC, em células somáticas (Takahashi, K. e Yamanaka, S. 2006). Tais fatores contribuem para a manutenção da capacidade de proliferação e diferenciação das células-tronco embrionárias, onde são naturalmente expressos. Em células somáticas, que podem ser obtidas de maneira não invasiva, os fatores induzem um processo de reprogramação epigenética que leva à pluripotência. Assim, a reprogramação permite o fornecimento, em larga escala, de diferentes tipos celulares humanos (Karagiannis, P. *et al.*, 2019), incluindo células-tronco neurais (NSCs), que dão origem a neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Yan, Y. *et al.*, 2013). Além disso, as iPSCs podem ser provenientes de pacientes e, desta forma, possibilitar o desenvolvimento de modelos *in vitro* específicos para cada doença, o que é particularmente interessante para a avaliação da segurança e eficácia de novas drogas (Silva, M. C. e Haggarty, S. J. 2020).

A imunocompetência de astrócitos derivados de iPSCs foi demonstrada em diversos estudos, com linhagens obtidas de doadores diferentes e protocolos variados para a diferenciação e o estímulo inflamatório das células. Santos e colaboradores mostraram, por exemplo, que a resposta induzida por IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ , em astrócitos derivados de iPSCs, é semelhante à apresentada por astrócitos primários em cultura (Santos, R. *et al.*, 2017). Adicionalmente, demonstraram a alteração do perfil gênico astrocitário, com aumento da expressão de genes associados à resposta inflamatória, após 5 horas de exposição a 10 ng/mL de IL-1 $\beta$ . A adoção do fenótipo reativo pelos astrócitos reduziu a viabilidade e a arborização neuronais, alterações detectadas em co-culturas de neurônios e astrócitos reativos, após 48 horas de cultivo das células (Santos, R. *et al.*, 2017). Ambas as citocinas podem aumentar a liberação de glutamato e de ATP pelos astrócitos e, conseqüentemente, provocar morte neuronal, por influxo excessivo de cálcio e ativação de sinalizações neurotóxicas (Orellana, J. A. *et al.*, 2011).

A indução de reatividade em astrócitos por citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , é associada à ativação de NF- $\kappa$ B e tem sido demonstrada por diversos autores (Choi, S. S. *et al.*, 2014; Wheeler, M. A. *et al.*, 2020). As citocinas induzem a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, aumentando de maneira significativa, a ativação do fator. Como consequência, ocorre aumento da expressão de mediadores inflamatórios, como o componente C3 do sistema complemento, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e

quimiocinas (Hyvärinen, T. *et al.*, 2019). Trindade e colaboradores detectaram ativação expressiva de NF- $\kappa$ B em astrócitos derivados de iPSCs, 1 hora após estímulo com TNF- $\alpha$ , em doses a partir de 10 ng/mL. Associado a esta ativação, observou-se aumento sustentado do nível de mRNA de IL-1 $\beta$  e IL-6, no período entre 1,5 hora e 24 horas após o estímulo (Trindade, P. *et al.*, 2020). Foi sugerido que IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  apresentam efeito sinérgico sobre a atividade astrocitária, uma vez que o aumento da expressão de GM-CSF, IL-6, IL-1A, IL-12, IL-23 e IFN- $\beta$ , em astrócitos, foi significativamente maior após o estímulo com ambas as citocinas, em comparação ao efeito individual de cada uma (Perriot, S. *et al.*, 2018). Dessa forma, pode-se concluir que a exposição às citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  é eficaz em induzir a reatividade de astrócitos humanos derivados de iPSCs e que esse é um modelo *in vitro* vantajoso para o estudo da astrogliose reativa.

#### 1.4 Aspectos gerais sobre o canabidiol

O terpenofenol 2-[(6)-6-isopropil-3-metil-2-ciclohexil-1-il]-5-pentil-1,3-benzeno-diol, conhecido como canabidiol, foi identificado em 1940, após ser extraído da planta *Cannabis sativa* (Adams, R. *et al.*, 1940). Sua molécula, elucidada em 1963, é composta por um anel aromático, um terpeno e uma cadeia lateral pentil, que formam uma estrutura bicíclica não planar, de fórmula química  $C_{21}H_{30}O_2$ , apresentada na Figura 1 (Mechoulam, R. e Shvo, Y. 1963; Mechoulam, R., & Hanus, L. 2002). Um dos principais componentes da planta, o canabidiol é um fitocanabinoide que afeta o funcionamento do SNC. Todavia, o canabidiol não provoca nenhum dos efeitos alucinógenos comumente associados à utilização da *Cannabis*, que são desencadeados por outro composto, o delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) (Nichols, J. M. e Kaplan, B. 2020).

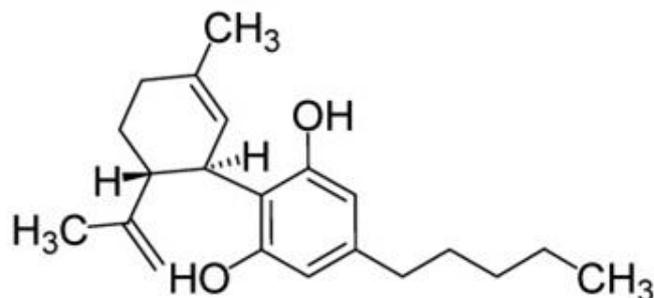


Figura 1: Estrutura química do canabidiol.

Embora existam relatos milenares documentando o uso medicinal da *Cannabis*, principalmente na China e na Índia (Touw M. 1981), o estudo sobre seus potenciais efeitos terapêuticos é relativamente recente. Resultados obtidos em pesquisas pré-clínicas são promissores acerca da efetividade da *Cannabis* ou seus derivados, em inúmeras condições patológicas (Huestis, M. A. *et al.*, 2019). Porém, até o momento, as evidências fornecidas por ensaios clínicos são conclusivas especificamente para o tratamento de dor crônica, náusea e vômitos induzidos por quimioterapia, epilepsia e espasticidade (*National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine et al.*, 2017). Para outras condições, como distúrbios do sono, síndrome de Tourette, ansiedade e estresse pós-traumático, as evidências da efetividade dos fitocanabinoides e da *Cannabis* são consideradas moderadas ou limitadas (*National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine et al.*, 2017).

Atualmente, o tratamento com solução oral de canabidiol a 98% pode ser prescrito para pacientes com epilepsia associada às síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut. O composto é denominado Epidiolex e sua utilização foi aprovada em 2018 (*Food and Drug Administration*, 2018). Além disto, a administração do composto Sativex, que consiste em mistura equimolar de canabidiol e  $\Delta$ 9-THC sob a forma de spray oromucoso, é aprovada em diversos países para tratar espasticidade relacionada à esclerose múltipla (Legare, C. A. *et al.*, 2022). Ambos os produtos têm comercialização aprovada no Brasil pela Anvisa, embora apenas o Sativex seja reconhecido como medicamento pela agência, registrado como Mevatyl no país (Gabardo, E. e Cabral, R. M. 2020).

Além dos tratamentos aprovados, propõe-se a utilização do canabidiol para outras condições patológicas. Atualmente, ensaios clínicos preliminares indicam eficácia do Epidiolex na redução da sintomatologia de colite ulcerativa, adição a opioides e à *Cannabis*, esquizofrenia, transtorno de ansiedade social e doença do enxerto versus hospedeiro, além de outras condições como psicose, insônia e dor crônica (Millar, S. A. *et al.*, 2019; Pauli, C. S. *et al.*, 2020; Peng, J. *et al.*, 2022). É importante ressaltar que o grau de eficácia é variável entre os estudos, bem como o protocolo experimental adotado. Em geral, a detecção de efeitos terapêuticos é mais frequente em estudos utilizando doses mais elevadas, que têm sido sugeridas para investigações posteriores, haja vista a alta tolerabilidade do canabidiol. Os efeitos adversos mais observados são fadiga, diarreia, náusea e hepatotoxicidade, considerados mais toleráveis do que os efeitos provocados por alguns medicamentos

psicotrópicos, como antiepiléticos (Huestis, M. A. *et al.*, 2019). Embora o canabidiol seja considerado seguro pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (*World Health Organization*, 2018), ainda é necessário determinar seus efeitos a longo prazo (Britch, S. C. *et al.*, 2021) e caracterizar, de maneira mais detalhada, sua influência sobre células humanas (Pagano, S. *et al.*, 2020).

Diversos estudos associam a ação terapêutica do canabidiol, em modelos pré-clínicos, à inibição de sinalizações inflamatórias. O canabidiol pode estimular a atividade de células imunossupressoras, como linfócitos T regulatórios (Dhital, S. *et al.*, 2017) e células supressoras derivadas mieloides (Hegde, V. L. *et al.*, 2011). Pode ocasionar também a supressão de células efectoras, tanto da imunidade inata quanto adaptativa, e induzir apoptose nessas células (Nichols, J. M. e Kaplan, B. 2020).

Recentemente, análises computacionais apontaram a sinalização de NF- $\kappa$ B como um dos principais alvos pelos quais o canabidiol exerce sua ação anti-inflamatória (Ma, H. *et al.*, 2021). De fato, Kozela e colaboradores demonstraram que o canabidiol regula a ativação microglial por inibir a via de NF- $\kappa$ B e, simultaneamente, ativar o fator STAT3. Como consequência, há redução dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\beta$  secretados pelas células (Kozela, E. *et al.*, 2010). Além disto, foi demonstrado o efeito inibitório do canabidiol sobre a via do inflamassoma NLRP3, responsável pela síntese das formas ativas das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Em cultura de células humanas, o canabidiol, a 10  $\mu$ M, foi capaz de atenuar a citotoxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultado que foi correlacionado à menor expressão de genes do inflamassoma NLRP3 (Liu, C. *et al.*, 2021).

Outro aspecto importante da ação do canabidiol refere-se ao seu efeito antioxidante direto, que é mediado pelas estruturas de ressonância eletrônica em sua molécula, formadas, em sua maioria, pelos grupos hidroxil presentes em seu anel fenólico (Borges, R. S. *et al.*, 2013). Desta forma, o canabidiol é capaz de interagir com radicais livres, transformando-os em moléculas menos reativas. Por quelar íons metálicos de transição, requeridos para a síntese de ROS, previne a oxidação de moléculas antioxidantes, como a glutatona. Hampson e colaboradores demonstraram que o canabidiol é mais efetivo que os antioxidantes alfa-tocoferol e ascorbato contra a toxicidade neuronal induzida por glutamato, que é mediada, em parte, por ROS (Hampson, A. J. *et al.*, 1998).

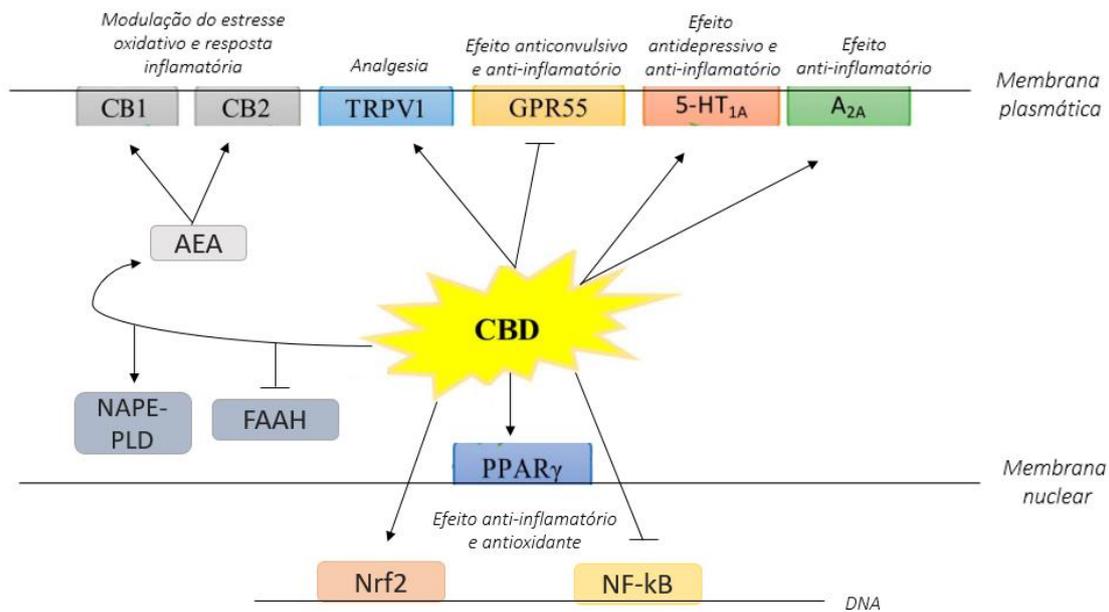
Em estudos *in vitro* com células humanas, os efeitos anti-inflamatórios são desencadeados por diferentes concentrações do canabidiol, embora seja relatada redução da viabilidade celular por doses, em geral, acima de 10  $\mu$ M. Tais resultados foram obtidos, principalmente, em células imunes, queratinócitos, fibroblastos, células-tronco, epiteliais e endoteliais (Pagano, S. *et al.*, 2020). Observa-se menor expressão de genes inflamatórios, levando à redução dos níveis de citocinas, moléculas de adesão, espécies reativas de nitrogênio (NOS), ROS, além de indução da apoptose em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (Pagano, S. *et al.*, 2020). Nesse contexto, Hobbs e colaboradores demonstraram que a ingestão, em dose única, de 30 mg de canabidiol, inibiu o aumento, induzido por lipopolissacarídeo (LPS), da secreção de TNF- $\alpha$  em culturas de PBMCs de indivíduos saudáveis (Hobbs, J. M. *et al.*, 2020). Entretanto, os efeitos imunomodulatórios do canabidiol sobre células gliais humanas, como astrócitos e micróglia, ainda não foram bem caracterizados (Nichols, J. M. e Kaplan, B. 2020).

### 1.5 Modulação da reatividade astrocitária pelo canabidiol

Alguns estudos indicam que o canabidiol pode inibir a resposta astrocitária a estímulos inflamatórios, atuando de maneira direta, ao interagir com alvos moleculares presentes nos astrócitos, e de maneira indireta, ao modular a atividade de células que induzem a reatividade astrocitária, como a micróglia (Kozela, E. *et al.*, 2017).

Os astrócitos expressam receptores e enzimas cuja regulação é associada aos efeitos terapêuticos do canabidiol em modelos pré-clínicos de desordens neurológicas e psiquiátricas. Dentre eles, destacam-se os receptores canabinoides tipo 1 (CB1) e 2 (CB2), receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 (TRPV1), receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), receptor de serotonina 1A (5-HT<sub>1A</sub>), receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>) e receptor acoplado à proteína G 55 (GPR55). As ações do canabidiol sobre enzimas expressas pelos astrócitos incluem ativação de N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD) e inibição da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), que participam respectivamente da síntese e da degradação do endocanabinoide anandamida (Atalay, S. *et al.*, 2019; Cristino, L. *et al.*, 2020; Nichols, J. M. e Kaplan, B. 2020; Peyravian, N. *et al.*, 2020; Scarante, F. F. *et al.*, 2021). Adicionalmente, o canabidiol também ativa o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (Pereira, S. R. *et al.*, 2021), que induz a transcrição de agentes

antioxidantes, como superóxido dismutase e glutatona peroxidase (Thimmulappa, R. *et al.*, 2002). A ativação de Nrf2 estimula a expressão de reguladores negativos do fator NF-kB em micróglia e astrócitos (Juknat, A. *et al.*, 2013; Wheeler, M. A. *et al.*, 2020), sendo, possivelmente, um dos mecanismos pelos quais o canabidiol modula a ativação dessas células. Os principais alvos moleculares relacionados ao efeito imunomodulatório do canabidiol, em modelos pré-clínicos de desordens do SNC, são apresentados na Figura 2.



**Figura 2: Principais alvos moleculares relacionados ao efeito imunomodulatório do canabidiol em modelos pré-clínicos de desordens do SNC.**

O canabidiol (CBD) regula a ação de diversos receptores plasmáticos, nucleares, enzimas e fatores de transcrição. Setas indicam ativação do alvo molecular e barras indicam inibição. CB1: receptor canabinoide tipo 1. CB2: receptor canabinoide tipo 2. TRPV1: receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1. GPR55: receptor acoplado à proteína G 55. 5-HT<sub>1A</sub>: receptor de serotonina 1A. A<sub>2A</sub>: receptor de adenosina A<sub>2A</sub>. AEA: anandamida. NAPE-PLD: N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D. FAAH: amida hidrolase de ácido graxo. PPAR<sub>γ</sub>: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$ . Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2. NF-kB: fator nuclear kappa B. Adaptado de Atalay, S. *et al.*, 2019.

Nesse contexto, a modulação *in vitro* da reatividade astrocitária pelo canabidiol foi demonstrada em astrócitos de roedores, estimulados com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Observou-se que o canabidiol, nas concentrações de 1 e 5  $\mu$ M, reduziu a secreção de CCL2 induzida pelas citocinas. Essa regulação é relevante em doenças caracterizadas pelo recrutamento de células imunes periféricas para o SNC, como a esclerose múltipla (Mecha, M. *et al.*, 2013). Além disso, em astrócitos murinos estimulados com

$\beta$ -amiloide, o canabidiol, em doses entre 0,001 e 0,1  $\mu$ M, reduziu a ativação de NF-kB e a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico e marcadores da reatividade, como a proteína acídica fibrilar glial (GFAP) e a proteína B de ligação ao cálcio S100 (S100 $\beta$ ). A modulação da astrogliose foi mediada pelo receptor PPAR- $\gamma$  e observada também em modelo *in vivo* da doença de Alzheimer (Esposito, G. *et al.*, 2011). De modo interessante, em co-cultura de células endoteliais e astrócitos humanos, o canabidiol a 10  $\mu$ M reverteu o aumento da expressão de lactato desidrogenase (LDH), IL-6, VCAM-1 e VEGF, induzido por privação de oxigênio e glicose. Esse resultado, dependente da ativação dos receptores PPAR- $\gamma$  e 5-HT<sub>1A</sub>, sugere que a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica seja um dos mecanismos de neuroproteção do canabidiol em modelos de isquemia cerebral (Hind, W. H. *et al.*, 2016).

A diversidade de seus alvos moleculares permite que o canabidiol atue sobre vários tipos celulares e, desta forma, regule mecanismos associados à inflamação, estresse oxidativo e neurodegeneração, o que poderia explicar a abrangência de seus potenciais efeitos terapêuticos.

Considerando a complexidade das ações moleculares do canabidiol, é fundamental elucidar seus efeitos sobre cada subpopulação do SNC, visando a melhor compreensão de como o canabidiol atua sobre diferentes processos patológicos. Isto se faz necessário especialmente para as células da glia, já que o enfoque da maioria dos estudos é sobre os neurônios (Scarante, F.F *et al.*, 2021). A investigação do efeito imunomodulatório do canabidiol sobre células do SNC foi realizada, até o momento, em modelos animais e em culturas de células de roedores. No caso dos astrócitos, a utilização de células humanas é mais adequada para a pesquisa translacional, já que as diferenças funcionais apresentadas pelos astrócitos de roedores constituem um obstáculo para o desenvolvimento de tratamentos para doenças neurológicas.

Embora ainda não exista terapia farmacológica desenvolvida para atuar especificamente sobre a astrogliose, estudos têm sugerido que o mecanismo de ação de algumas drogas inclui a modulação da reatividade astrocitária. Pode-se citar o imunomodulador Dimetilfumarato, utilizado no tratamento da esclerose múltipla, que estimula a atividade de Nrf2 e inibe a via de NF-kB em astrócitos (Ponath, G. *et al.*, 2018). Outro exemplo é a Memantina, utilizada no tratamento da doença de Alzheimer e responsável por elevar a expressão de BDNF em astrócitos (Rajasekar, N. *et al.*,

2016). De modo interessante, a atividade de Nrf2 e de NF- $\kappa$ B, bem como a produção de BDNF são alvos do canabidiol implicados em seu mecanismo de ação sobre o SNC (Silvestro, S. *et al.*, 2020).

Considerando a importância da astrogliose reativa em doenças neurológicas e a escassez de estudos que avaliem a ação do canabidiol sobre astrócitos humanos, o objetivo deste trabalho foi verificar se o canabidiol poderia modular parâmetros moleculares e funcionais nessas células.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial modulatório do canabidiol sobre a reatividade astrocitária *in vitro*, induzida por citocinas inflamatórias, em cultura de astrócitos humanos derivados de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs).

### 2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Verificar a influência do canabidiol sobre a viabilidade celular de astrócitos humanos derivados de iPSCs.

2.2.2 Induzir a reatividade em astrócitos humanos derivados de iPSCs, por meio de estímulo inflamatório com as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

2.2.3 Investigar o efeito do canabidiol sobre os seguintes parâmetros, em astrócitos estimulados e não estimulados:

- a. Expressão de RNA mensageiro (RNAm) dos mediadores inflamatórios IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, da proteína progranulina e do fator neurotrófico BDNF.
- b. Expressão de RNAm transportador de aminoácido excitatório 1 (EAAT1) e manutenção do nível extracelular de glutamato.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Manutenção de NSCs

Foram utilizadas NSCs obtidas a partir de fibroblastos da pele de indivíduo saudável, do sexo masculino e com idade de 31 anos. Esta linhagem celular, identificada como CF2, foi concedida pelo Prof. Dr. Stevens K. Rehen (UFRJ/Instituto D'Or) e criopreservada em nitrogênio líquido. Foi realizado o descongelamento de  $2,5 \times 10^6$  NSCs, seguido por ressuspensão em 3 mL de meio de expansão de NSCs (meio NEM) (Gibco) e plaqueamento em placas de 60 mm (Sarstedt) revestidas com Geltrex (Gibco). As NSCs foram cultivadas em estufa umidificada a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. A composição do meio NEM é apresentada na Tabela 1.

#### 3.2 Diferenciação de NSCs em astrócitos

A diferenciação foi realizada conforme protocolo descrito anteriormente por Yan e colaboradores (Yan, Y. *et al.*, 2013). Após atingir a confluência, as NSCs foram coletadas e ressuspensas em meio de diferenciação de astrócitos (MDA) e, em seguida,  $3,75 \times 10^6$  NSCs foram transferidas para garrafa de 75cm<sup>2</sup> (Sarstedt), revestida com Geltrex e contendo 10 mL de MDA. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com troca do meio de cultura a cada 2-3 dias. Ao atingirem a confluência, as células foram transferidas para garrafa de 175cm<sup>2</sup> (Sarstedt), revestida com Geltrex e contendo 20 mL de MDA. As células foram cultivadas em MDA pelo período de 3 semanas, sendo transferidas para novas garrafas de 175cm<sup>2</sup>, em proporção 1:3, ao atingirem a confluência. A partir da 4<sup>a</sup> semana, as células foram cultivadas, por período mínimo de 5 semanas, em meio de maturação de astrócitos (MMA), trocado a cada 2-3 dias. Durante este período, as transferências para garrafas novas foram realizadas em proporção 1:2. Ao longo das transferências, reduziu-se gradativamente a concentração de Geltrex nas garrafas, para selecionar positivamente células diferenciadas, que apresentam capacidade de aderência a superfícies não revestidas. Ao término das 5 semanas de maturação, os astrócitos foram utilizados em experimentos posteriores. O cultivo dos astrócitos maduros foi

realizado em MMA, trocado semanalmente. A composição dos meios MDA e MMA é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1: composição dos meios de cultura utilizados para a obtenção de astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

<b>Meio de expansão de NSC (NEM)</b>	<b>Meio de diferenciação de astrócitos (MDA)</b>	<b>Meio de maturação de astrócitos (MMA)</b>
DMEM/F12 avançado (com penicilina-estreptomicina a 1%) (Gibco)	DMEM/F12 (com penicilina-estreptomicina a 1%) (Gibco)	DMEM/F12 (com penicilina-estreptomicina a 1%) (Gibco)
Neurobasal (Gibco)	Soro fetal bovino a 1% (Gibco)	Soro fetal bovino a 10% (Gibco)
Suplemento de indução neural (PSC) a 2% (Gibco)	Suplemento N-2 a 1% (Gibco)	

### 3.3 Plaqueamento dos astrócitos

Astrócitos maduros foram cultivados em placas de 6 poços (Sarstedt), sendo plaqueados  $7 \times 10^4$  astrócitos por poço, em 1,5 mL de MMA. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, realizou-se a troca de meio, adicionando 2 mL de MMA em cada poço. No 5º dia de cultivo, foi realizado o carenciamento das células, retirando-se o meio de cultura, lavando por 3 vezes com tampão fosfato-salino (PBS) e adicionando, em cada poço, 2 mL de meio DMEM/F12 puro, sem a presença de soro fetal bovino. Após 24 horas de carenciamento, foram realizados o estímulo com as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  (proteína recombinante humana; Invitrogen) e TNF- $\alpha$  (proteína recombinante humana; Biolegend) e/ou o tratamento com canabidiol, concedido pelo Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira (UFMG).

### 3.4 Ensaio de viabilidade celular

Foram plaqueados 20.000 astrócitos maduros, em suspensão de 300  $\mu$ L de MMA por poço, em placas de 24 poços (Sarstedt). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, realizou-se a troca de meio, adicionando 350  $\mu$ L de MMA em cada poço. No 5º dia de cultivo, foi realizado o carenciamento das células, com a adição de 350  $\mu$ L de meio DMEM/F12 puro. Após 24 horas, realizou-se o tratamento com canabidiol, em concentração de 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ou 10  $\mu$ M por poço. As alíquotas de canabidiol foram preparadas por diluição seriada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), de forma que cada poço tratado recebeu o volume de 3,5  $\mu$ L de solução. Em cada poço do grupo controle, foram adicionados 3,5  $\mu$ L de DMSO. Após 24 horas de tratamento, foi utilizado o kit LIVE/DEAD Cell Viability Assays (Sigma-Aldrich), para avaliação da viabilidade celular, segundo protocolo descrito anteriormente por Doria e colaboradores (Doria, J. G. *et al.*, 2013). Realizou-se a retirada do meio de cultura dos poços e a lavagem com PBS. Em seguida, as células foram incubadas em solução de calceína-AM (Sigma-Aldrich) a 2  $\mu$ M e homodímero de etídeo (Sigma-Aldrich) a 2  $\mu$ M, diluídos em PBS, adicionando-se 200  $\mu$ L de solução por poço. A incubação foi realizada por 15 minutos em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Seguiu-se lavagem com PBS e obtenção de fotomicrografias capturadas pelo microscópio de fluorescência Fluid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific). Foram obtidas fotomicrografias em 3 campos de cada poço e as amostras foram analisadas em duplicata. Utilizando o software ImageJ, realizou-se a contagem das células viáveis e não viáveis, marcadas, respectivamente, em verde pela calceína-AM (faixa de excitação/emissão = 494/517 nm), e em vermelho pelo homodímero de etídeo (faixa de excitação/emissão = 528/617 nm). Calculou-se a porcentagem de células não viáveis, em relação ao total de células.

### 3.5 Estímulo e tratamento das culturas de astrócitos

A solução estoque de canabidiol foi diluída em DMSO e adicionada aos poços em concentração final de 1  $\mu$ M. As soluções estoque de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram diluídas em solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) a 0,1% (m/v) e adicionadas em concentração final de 10 ng/mL para cada citocina. Nos poços do grupo controle, foi adicionado volume equivalente de DMSO. Foi realizada a coleta

dos meios condicionados e a extração de RNA total das culturas não estimuladas, após o período de 24 h, e das culturas estimuladas, após os períodos de 4 e 24 h.

### 3.6 Análise da expressão gênica

Realizou-se a extração do RNA total das culturas de astrócitos, pelo método de TRIzol, segundo as orientações do fabricante (Thermo Fisher). Após a quantificação do RNA total, pelo software Multiskan GO Microplate (Thermo Scientific), seguiu-se a transcrição reversa. 1 µg de cada amostra de RNA foi incubada em mix de reação contendo 15 ng/µL de *primers* randômicos, 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 625 µM dNTPs, 10 µM DTT e transcriptase reversa em água livre de nucleases (volume total de reação igual a 20 µL). A transcrição reversa procedeu-se conforme o seguinte ajuste de temperatura: 70 °C por 10 minutos, 4 °C por 10 minutos, 42 °C por 1 hora e 70 °C por 15 minutos. O DNA complementar obtido foi diluído, na proporção 1:10, em água livre de nucleases e submetido à PCR quantitativa, no sistema QuantStudio 7 (Applied Biosystems), para análise da expressão dos genes de interesse, listados na Tabela 2. As amostras foram analisadas em triplicata, em 10 µL de reação contendo 5 µL de cDNA, 1 µL de tampão (200 mM Tris, 500 mM KCl, 10% de polietilenoglicol 400, 10% de formamida), 1,4 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 0,2 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL dos iniciadores (senso e anti-senso) a 10 µM cada, 2 µL de betaína a 5 M (Thermo Fisher), 0,1 µL de SyBr Green (Applied Biosystems) e 0,1 µL de Taq DNA Polimerase. A reação foi realizada sob as seguintes configurações: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72 °C por 15 segundos) e 95°C por 15 segundos. A expressão gênica foi calculada pelo método  $2^{-\Delta Ct}$ , utilizando-se os genes IPO8 e RPLP0 como normalizadores. As sequências dos iniciadores são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos iniciadores para a análise da expressão gênica.

Gene	Número de identificação (NCBI)	Orientação	Sequência
IL-1 $\beta$	NM_000576.2	Senso	5' CACGATGCACCTGTACGATCA 3'
		Antissenso	5' GTTGCTCCATATCCTGTCCCT 3'
TNF- $\alpha$	NM_000594.3	Senso	5' CTGCACTTTGGAGTGATCGG 3'
		Antissenso	5' TGAGGGTTTGCTACAACATGGG 3'
IL-6	NM_000600.5	Senso	5' AGAGGCACTGGCAGAAAAC 3'
		Antissenso	5' TGCAGGAAGTGGATCAGGAC 3'
BDNF	NG_011794.1	Senso	5' AGTTGGGAGCCTGAAATAGTGG 3'
		Antissenso	5' AGGATGCTGGTCCAAGTGGT 3'
EAAT1	NG_015890.1	Senso	5' GAATGGCGGCGCTAGATAGT 3'
		Antissenso	5' CCAGGCTTCTACCAGATTTG 3'
Progranulina	NM_002087.3	Senso	5' GGCCACTCCTGCATCTTTAC 3'
		Antissenso	5' GGAGCCATCGACCATAACAC 3'
<b>Normalizadores</b>			
IPO8	NM_006390.3	Senso	5' TCCGAACTATTATCGACAGGACC 3'
		Antissenso	5' GTTCAAAGAGCCGAGCTACAA 3'
RPLP0	NM_001002.3	Senso	5' TTAAACCCTGCGTGGCAATC 3'
		Antissenso	5' ATCTGCTTGGAGCCCACATT 3'

### 3.7 Quantificação do nível de glutamato nos meios condicionados dos astrócitos

O protocolo foi realizado conforme descrito anteriormente Gobira e colaboradores (Gobira, P. H. *et al.*, 2015), com adaptações. Os meios condicionados foram submetidos à centrifugação em velocidade de 3000 rcf por 5 minutos a 4°C, para coleta dos sobrenadantes e descarte dos *debris* celulares. A concentração de glutamato nos sobrenadantes foi determinada por espectrofluorimetria, utilizando-se o aparelho Synergy 2 (BioTek® Instruments). Em placa de 96 poços (Sarsted), 30  $\mu$ L de cada amostra foram incubados com 270  $\mu$ L de solução tampão KRH (solução Krebs–Ringer–HEPES: 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glicose, 25 mM HEPES, pH 7.4, Sigma-Aldrich), contendo CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) a 1 mM. Foi realizada a 1ª leitura e, em seguida, adicionou-se 0,6  $\mu$ L de NADP<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich), para a 2ª leitura. Foram adicionados 3,3  $\mu$ L de enzima glutamato desidrogenase tipo

II (GDH) (Sigma-Aldrich) e procedeu-se a 3ª leitura. Após a adição de 2 µL de glutamato padrão (Sigma-Aldrich), a 1mM, foi realizada a 4ª leitura. Em princípio, a concentração de glutamato em cada amostra é diretamente proporcional à reação catalisada pela enzima GDH, que leva à formação de NADPH, cujo nível de emissão de fluorescência é quantificado pelo aparelho. Foi construída uma curva de calibração, a partir dos valores de fluorescência fornecidos pelas 4 leituras sequenciais. As leituras foram realizadas a 37°C, com excitação em comprimento de onda de 360 nm e emissão em 450 nm. As amostras foram analisadas em triplicata. A quantificação de glutamato foi normalizada de acordo com a dosagem de RNA total das culturas celulares. Os valores obtidos referem-se à quantidade de glutamato, em nmol, por miligrama de RNA. Para a comparação entre os grupos, os resultados foram convertidos em porcentagem em relação ao valor referente ao grupo controle (DMSO).

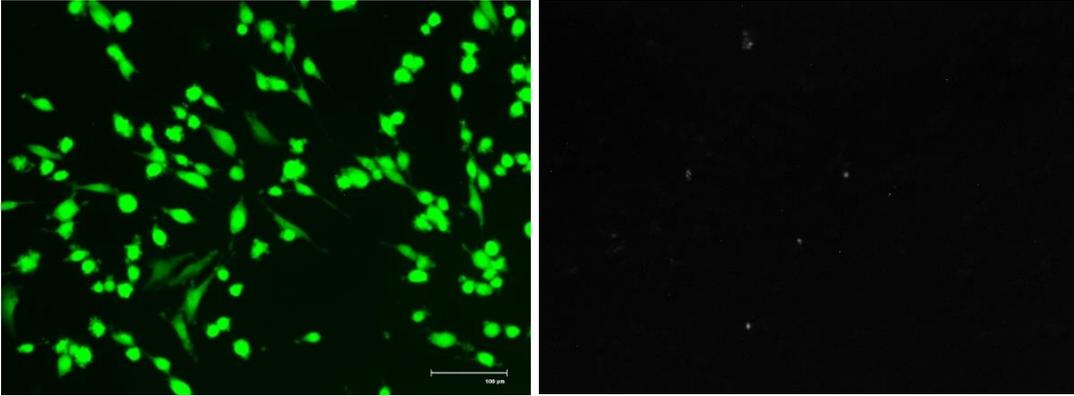
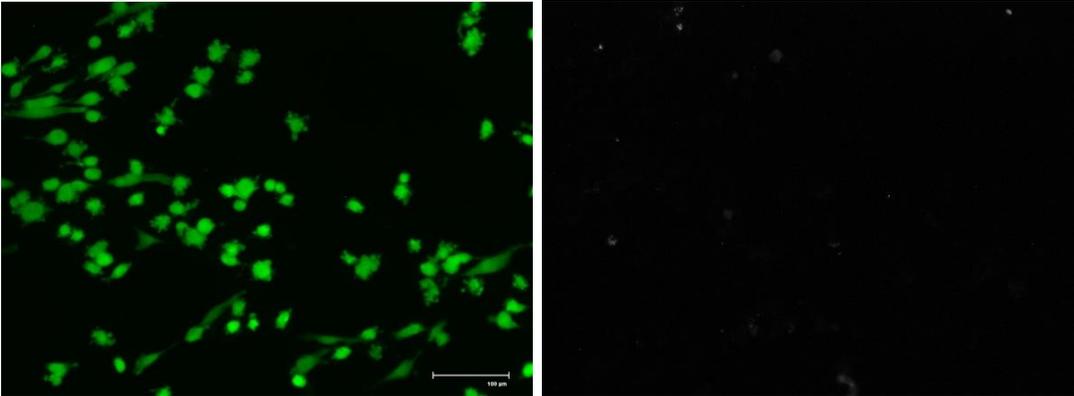
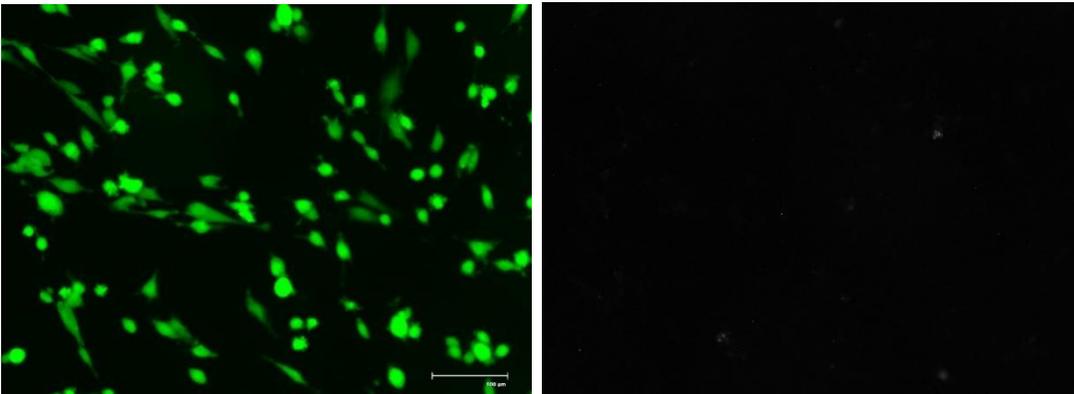
### 3.8 Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o software GraphPadPrism® (versão 6.01). Os resultados referentes ao ensaio de viabilidade celular foram submetidos a ANOVA de uma via. Os demais resultados foram submetidos a ANOVA de duas vias e teste de Dunnett para comparação em relação ao grupo controle. Para a análise de significância, foi considerado o valor de  $\alpha = 0,05$ .

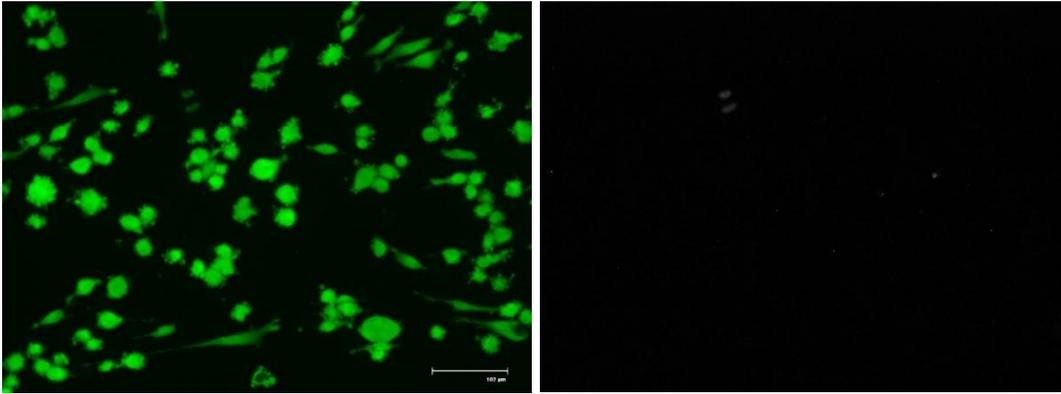
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito do canabidiol sobre a viabilidade de astrócitos humanos derivados de iPSCs

A fim de avaliar a ação do canabidiol sobre a viabilidade dos astrócitos derivados de iPSCs, após o período de diferenciação, as culturas foram tratadas com veículo (DMSO) ou com canabidiol, durante 24 horas e, em seguida, submetidas ao ensaio de morte celular. Conforme ilustrado na Figura 3, foram testadas 4 concentrações crescentes de canabidiol, 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ . Entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 3A a 3D), o canabidiol não alterou a densidade celular nas culturas, já que a média da contagem de células, em 3 campos de cada poço, não foi diferente do grupo controle não tratado (Fig. 3G). Além disso, dentro dessa faixa de concentração, o canabidiol não provocou aumento da morte de astrócitos, em relação ao grupo controle (Fig. 3H). Apesar de excluídas da análise estatística, devido ao tamanho amostral pequeno, as culturas expostas à concentração de 10  $\mu\text{M}$  do canabidiol apresentaram morte celular massiva (Fig. 3H), com perda significativa da adesão celular. Foi observado o destacamento dos astrócitos, anteriormente aderidos entre si e ao fundo da placa, o que prejudicou a realização do ensaio nessas culturas. A Figura 3E ilustra a diferença da densidade celular, entre os grupos controle e tratado com canabidiol a 10  $\mu\text{M}$ , após a lavagem do sobrenadante das culturas. Dessa forma, os resultados indicaram que o canabidiol alterou a viabilidade astrocitária de maneira concentração-dependente, já que a concentração de 10  $\mu\text{M}$  apresentou ação citotóxica. Como as culturas tratadas com concentrações de até 1  $\mu\text{M}$  não sofreram redução da viabilidade celular, os experimentos posteriores foram realizados utilizando-se o canabidiol em concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

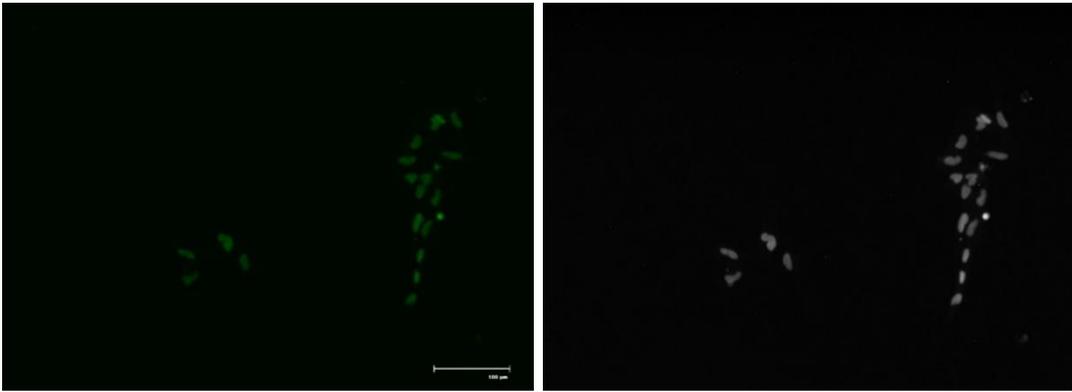
**A****Controle não tratado****B****0,01 μM****C****0,1 μM**

D



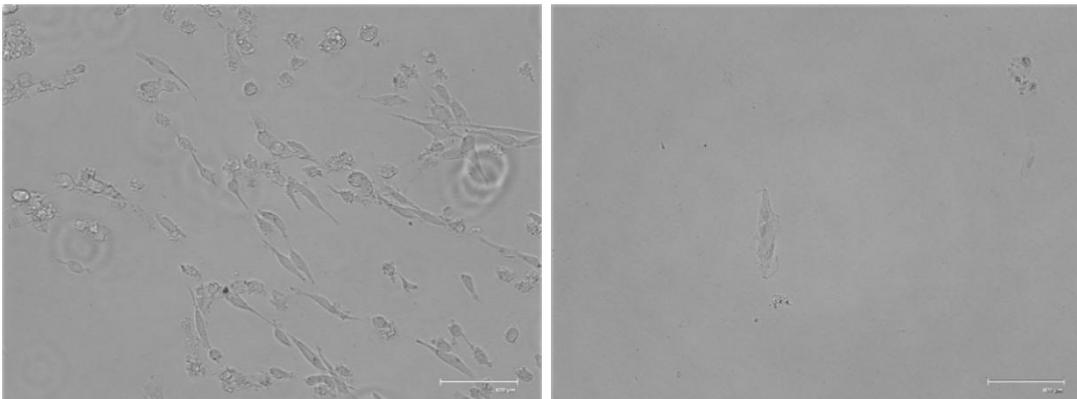
1  $\mu\text{M}$

E



10  $\mu\text{M}$

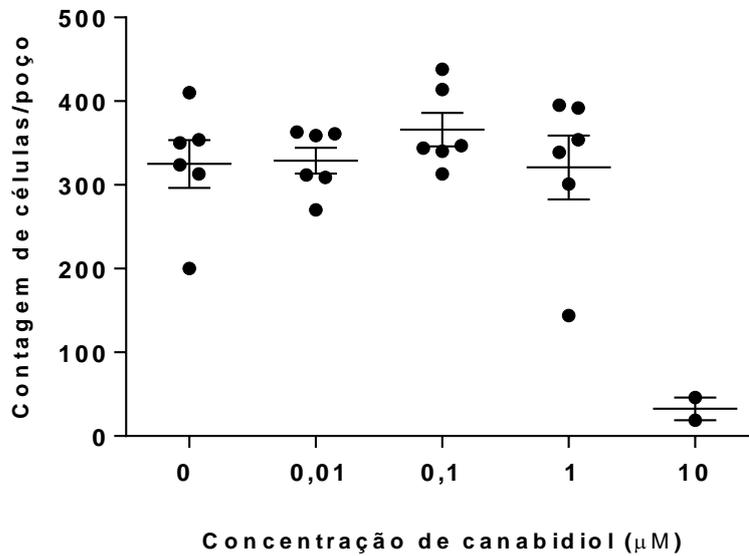
F



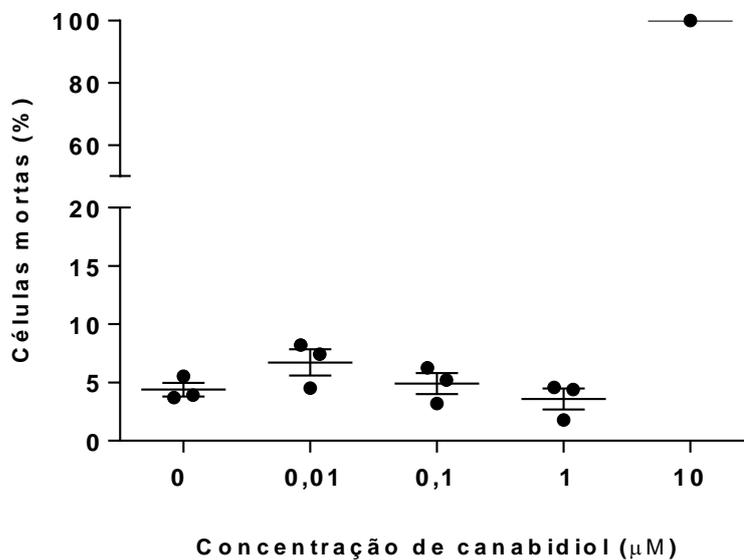
Controle não tratado

10  $\mu\text{M}$

G



H



**Figura 3: Efeito do canabidiol sobre a viabilidade de astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

A-E: Imagens representativas do ensaio de morte, realizado 24 horas após o tratamento das culturas com veículo (DMSO) ou concentrações crescentes de canabidiol (0,01 µM a 10 µM). À esquerda, células viáveis, em verde, marcadas pela calceína. À direita, células mortas, em branco, marcadas pelo homodímero de etídio. Barra de escala igual a 100 micrometros.

F: Imagens obtidas por microscopia de campo claro, 24 horas após o tratamento das culturas com veículo (à esquerda) ou 10 µM de canabidiol (à direita). Barra de escala igual a 100 micrometros.

G: Número de células contadas por poço.

H: Porcentagem de células mortas em relação ao total de células por grupo.

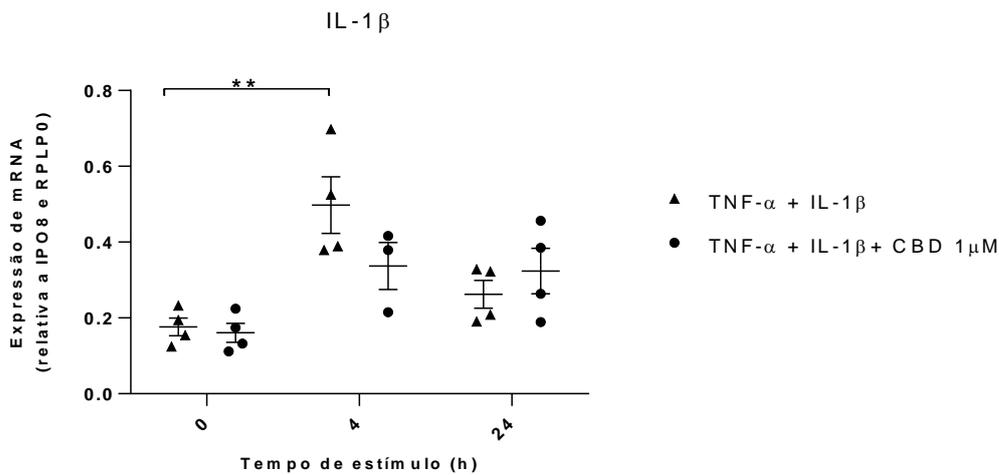
Em G e H, os resultados referem-se a replicatas biológicas e são expressos como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de uma via ( $\alpha = 0,05$ ).  $n=3$ . Para o grupo tratado com  $10 \mu\text{M}$ ,  $n=1$ .

## 4.2 Efeito do canabidiol sobre a expressão de fatores inflamatórios em astrócitos humanos derivados de iPSCs

### 4.2.1 Citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6

A indução da reatividade astrocitária foi realizada pelo estímulo dos astrócitos com TNF- $\alpha$   $10 \text{ ng/mL}$  e IL-1 $\beta$   $10 \text{ ng/mL}$  por 4 ou 24 horas. Para confirmar a indução, foram quantificados os níveis de RNAm de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, citocinas importantes em processos neuroinflamatórios e cuja expressão é elevada em astrócitos reativos derivados de iPSCs (Perriot, S. et al, 2018; Rothhammer, V., & Quintana, F. J. 2015; Trindade, P. *et al.*, 2020). Além disso, considerando-se o potencial imunomodulatório do canabidiol, foi verificado seu efeito sobre os níveis desses mediadores, tanto em astrócitos estimulados quanto não estimulados.

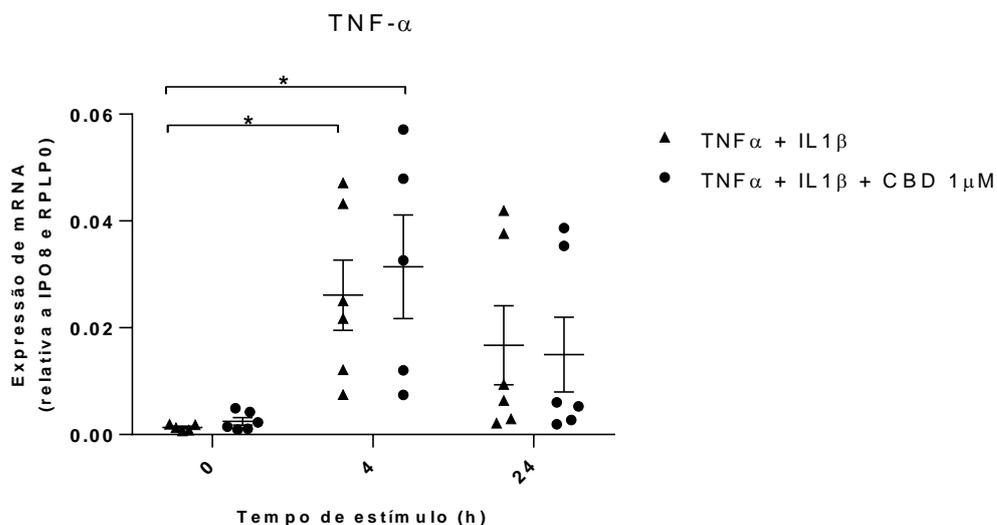
Conforme apresentado na Figura 4, a duração do estímulo inflamatório exerceu influência significativa sobre o nível de RNAm de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ). Em astrócitos quiescentes, o tratamento com canabidiol não alterou a expressão de IL-1 $\beta$  (Fig. 4). Já o estímulo inflamatório (TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ ) foi capaz de levar a um aumento da expressão de IL-1 $\beta$  após 4 h (Fig. 4). O tratamento com canabidiol foi capaz de alterar a expressão de IL-1 $\beta$  induzida pelo estímulo inflamatório no tempo de 4 h, visto que a expressão de IL-1 $\beta$  em astrócitos submetidos ao estímulo inflamatório e tratados com canabidiol não foi diferente de astrócitos controle não estimulados (Fig. 4). Entretanto, não houve diferença significativa quando se comparou a expressão de IL-1 $\beta$  em astrócitos expostos a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  daquela de astrócitos expostos a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e canabidiol (Fig. 4). Além disso, no tempo 24 h, a expressão de IL-1 $\beta$  em astrócitos submetidos ao estímulo inflamatório, na presença ou na ausência de canabidiol, não foi diferente de astrócitos não estimulados (Fig. 4).



**Figura 4: Expressão da citocina IL-1 $\beta$  em astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

Expressão relativa de RNAm de IL-1 $\beta$ , em função do tempo de estímulo, quantificada por RT-qPCR. Os valores referem-se a replicatas biológicas e são apresentados como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de duas vias ( $\alpha = 0,05$ ) e teste de Dunnett para comparações múltiplas. O símbolo \*\* indica diferença significativa, com  $\alpha = 0,01$ .  $n=4$ . Para o grupo TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ +CBD 1  $\mu$ M no tempo de 4 horas,  $n=3$ .

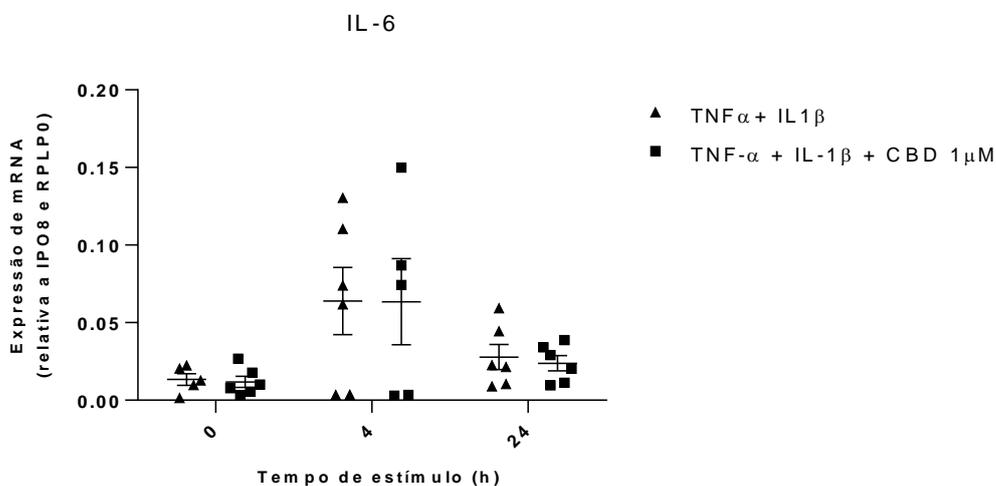
Em relação à citocina TNF- $\alpha$ , a análise estatística revelou efeito significativo do fator duração do estímulo inflamatório, sobre a expressão de RNAm ( $p<0,01$ ), como apresentado na Figura 5. O tratamento com canabidiol não alterou a expressão de TNF- $\alpha$  em astrócitos quiescentes (Fig. 5). O estímulo inflamatório (TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ ) provocou um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  após 4 h, mas não depois de 24 h (Fig. 5). Além disso, o tratamento com canabidiol não alterou a expressão de TNF- $\alpha$  em astrócitos sob estímulo inflamatório por 4 ou 24 h (Fig. 5).



**Figura 5: Expressão da citocina TNF- $\alpha$  em astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

Expressão relativa de RNAm de TNF- $\alpha$ , em função do tempo de estímulo, quantificada por RT-qPCR. Os valores referem-se a replicatas biológicas e são apresentados como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de duas vias ( $\alpha = 0,05$ ) e teste de Dunnett para comparações múltiplas. O símbolo \* indica diferença significativa, com  $\alpha = 0,05$ . n=6. Para o grupo TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ +CBD 1  $\mu$ M no tempo de 4 horas e para o grupo controle, n=5.

A expressão de IL-6 também sofreu efeito significativo da duração do estímulo ( $p < 0,01$ ). Entretanto, a comparação da média de todos os grupos em relação ao controle não indicou diferença significativa. Dessa forma, não foi detectada influência do estímulo inflamatório ou do tratamento com canabidiol sobre o nível de RNAm da citocina, conforme apresentado na Figura 6.



**Figura 6: Expressão da citocina IL-6 em astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

Expressão relativa de RNAm de IL-6, em função do tempo de estímulo, quantificada por RT-qPCR. Os valores referem-se a replicatas biológicas e são apresentados como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de duas vias ( $\alpha = 0,05$ ) e teste de Dunnett para comparações múltiplas. n=6. Para o grupo TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ +CBD 1  $\mu$ M no tempo de 4 horas e para o grupo controle, n=5.

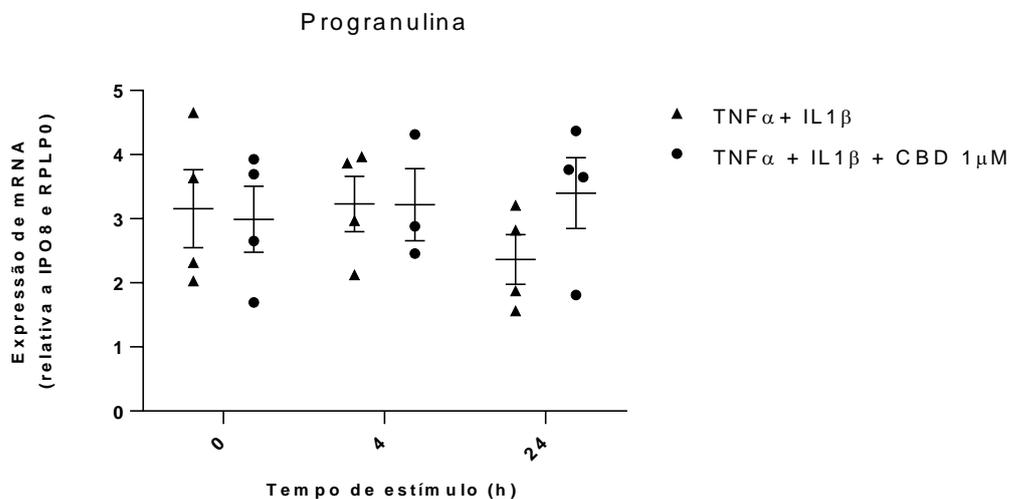
Em resumo, os níveis de RNAm de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , mas não de IL-6, sofreram alteração devido ao estímulo inflamatório após 4 h, mas não após 24 h. O canabidiol não alterou a expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 na ausência do estímulo inflamatório. Além disso, o canabidiol parece ser capaz de afetar a expressão de IL-1 $\beta$ , mas não de TNF- $\alpha$ , induzida pelo estímulo inflamatório em astrócitos humanos derivados de iPSCs.

#### 4.2.2 Progranulina

A proteína progranulina participa da regulação da função lisossomal, da inflamação e da sobrevivência neuronal (Rhinn, H. *et al.*, 2022). Resultados *in vitro*

demonstram que a progranulina reduz a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e iNOS em astrócitos murinos reativos (Menzel, L. *et al.*, 2017). Além disso, a ativação da resposta imune em astrócitos humanos pode levar ao aumento de sua produção (Suh, H. S. *et al.*, 2012).

Por isso, verificou-se a possibilidade das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  alterarem a expressão de progranulina em astrócitos humanos derivados de iPSCs. A expressão de seu RNAm é apresentada na Figura 7. Não foi observada diferença significativa entre os grupos, indicando que o estímulo inflamatório e o tratamento com canabidiol não afetaram a expressão dessa proteína (Fig. 7).



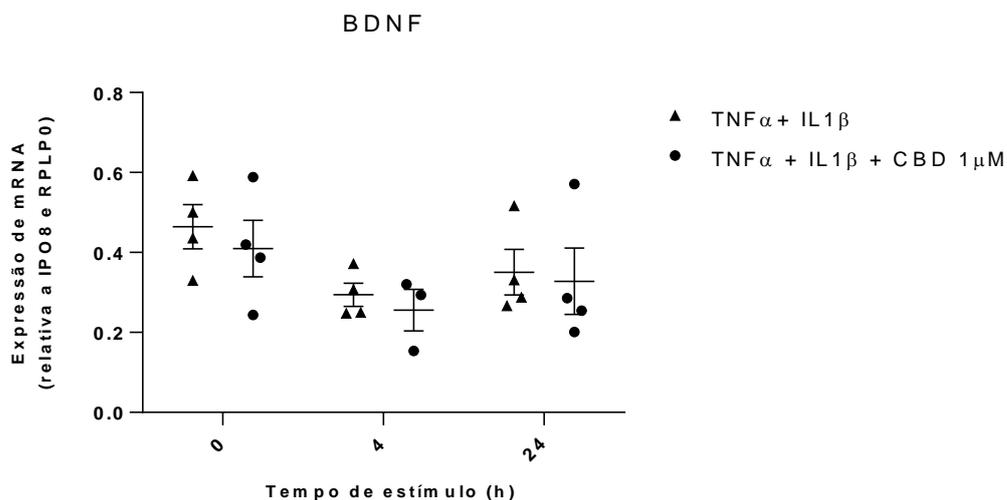
**Figura 7: Expressão de progranulina em astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

Expressão relativa de RNAm de progranulina, em função do tempo de estímulo, quantificada por RT-qPCR. Os valores referem-se a replicatas biológicas e são apresentados como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de duas vias ( $\alpha = 0,05$ ).  $n=4$ . Para o grupo TNF- $\alpha$ +IL-1 $\beta$ +CBD 1  $\mu$ M no tempo de 4 horas,  $n=3$ .

#### 4.2.3 Fator neurotrófico derivado do cérebro

Em algumas doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, caracterizadas por inflamação crônica, observa-se redução do nível de BDNF. A associação entre a síntese aumentada de citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , e a expressão reduzida do fator é relatada, por exemplo, em transtornos de humor, esquizofrenia, doença de Parkinson e Alzheimer (Lima Giacobbo, B. *et al.*, 2019). Nesse contexto, foi visto que o canabidiol estimula a síntese de BDNF ao inibir a ativação excessiva de vias inflamatórias e ao regular positivamente o fator Nrf2, que ativa a transcrição do gene (Yao, W. *et al.*, 2021).

A fim de avaliar se o estímulo inflamatório utilizado poderia alterar a expressão de BDNF nas culturas astrocíticas, quantificou-se o nível de RNAm do fator. Conforme apresentado na Figura 8, o estímulo inflamatório não alterou a expressão de BDNF. Além disso, o tratamento com canabidiol não foi capaz de alterar a expressão de BDNF em astrócitos quiescentes ou sob insulto inflamatório (Fig.8).



**Figura 8: Expressão de BDNF em astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

Expressão relativa de RNAm de BDNF, em função do tempo de estímulo, quantificada por RT-qPCR. Os valores referem-se a replicatas biológicas e são apresentados como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de duas vias ( $\alpha = 0,05$ ).  $n=4$ . Para o grupo TNF- $\alpha$ +IL-1 $\beta$ +CBD 1  $\mu$ M no tempo de 4 horas,  $n=3$ .

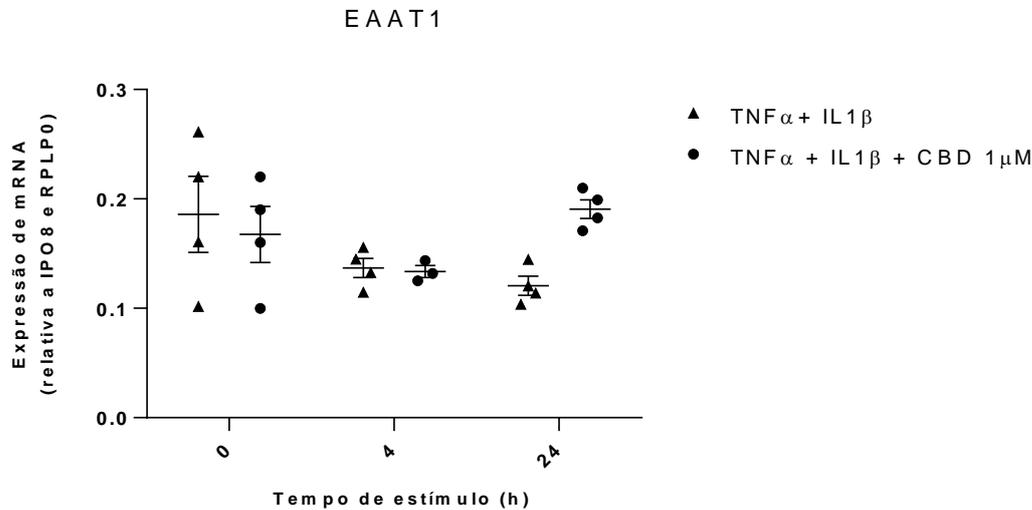
### 4.3 Efeito do canabidiol sobre a manutenção da homeostase glutamatérgica

#### 4.3.1 Expressão do transportador de aminoácido excitatório 1

Os astrócitos expressam, em sua membrana plasmática, transportadores de alta afinidade, responsáveis por captar glutamato extracelular. Tais proteínas são denominadas transportadores de aminoácido excitatório (EAATs), os quais existem em 5 subtipos, EAAT1 a 5, sendo as formas predominantes em astrócitos EAAT1 e 2 (Lehre, K. P. e Danbolt, N. C. 1998). Sabe-se que as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  exercem efeito inibitório sobre a captação de glutamato, em cultura primária de astrócitos humanos, associada à redução da expressão de RNAm do transportador EAAT1 (Hu, S. *et al.*, 2000).

Avaliou-se, portanto, a expressão de RNAm do EAAT1, nas culturas astrocíticas, por RT-qPCR. Como pode ser observado na Figura 9, o nível do RNAm

do transportador EAAT1 não sofreu alteração de expressão, seja em decorrência do estímulo inflamatório ou do tratamento com canabidiol (Fig. 9).

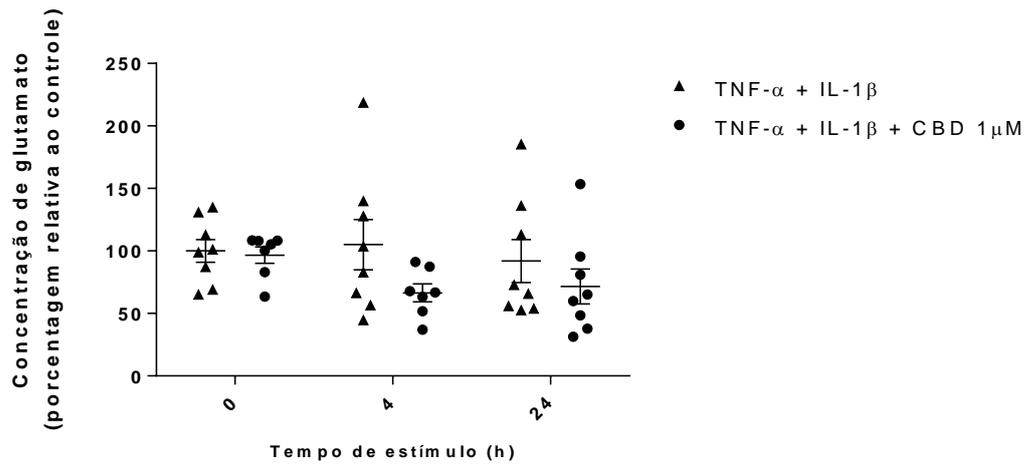


**Figura 9: Expressão de EAAT1 em astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

Expressão relativa de RNAm de EAAT1, em função do tempo de estímulo, quantificada por RT-qPCR. Os valores referem-se a replicatas biológicas e são apresentados como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de duas vias ( $\alpha = 0,05$ ).  $n=4$ . Para o grupo TNF- $\alpha$ +IL-1 $\beta$ +CBD 1  $\mu$ M no tempo de 4 horas,  $n=3$ .

#### 4.3.2 Nível extracelular de glutamato

Além da captação, a liberação astrocitária de glutamato também pode ser afetada em contextos patológicos. A citocina TNF- $\alpha$ , por exemplo, pode aumentar a liberação do neurotransmissor pelos astrócitos e promover neurotoxicidade (Bezzi, P. *et al.*, 2001). Portanto, a fim de avaliar a capacidade de manutenção da homeostase glutamatérgica pelos astrócitos, quantificou-se o nível extracelular do neurotransmissor. Para isto, as culturas foram submetidas ao estímulo inflamatório e/ou tratamento com canabidiol e, posteriormente, a concentração de glutamato nos meios condicionados foi quantificada, por espectrofluorimetria. O estímulo inflamatório não foi capaz de aumentar os níveis de glutamato. O tratamento com canabidiol também não alterou os níveis de glutamato, quer seja no meio condicionado de astrócitos quiescentes ou em astrócitos estimulados com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Fig. 10). Assim, os resultados indicam que nenhuma das condições testadas afetou a capacidade astrocitária de regulação do glutamato extracelular.



**Figura 10: Concentração de glutamato no meio condicionado de astrócitos humanos derivados de iPSCs.**

Concentração de glutamato, expressa como porcentagem relativa ao grupo controle, ao longo do tempo. Os resultados referem-se a replicatas biológicas e são expressos como média e erro padrão da média. Para a análise estatística, foi utilizada Anova de duas vias ( $\alpha = 0,05$ ).  $n = 8$ . Para o grupo TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$  + CBD 1  $\mu$ M, nos tempos de 0 e 4 horas,  $n = 7$ .

## 5. DISCUSSÃO

Considerando-se a importância da astrogliose reativa para as doenças neurológicas, a avaliação de potenciais tratamentos farmacológicos sobre os astrócitos é de grande relevância. Em vista disso, avaliou-se o efeito do canabidiol sobre astrócitos humanos derivados de iPSCs sob estímulo inflamatório composto por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os resultados indicam que o estímulo inflamatório aumentou a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos astrócitos. Porém, não alterou a expressão de IL-6, BDNF, progranulina e EAAT1. O canabidiol, na concentração de 1  $\mu$ M, teve um efeito marginal sobre a expressão de IL-1  $\beta$  induzida pelo estímulo inflamatório e não alterou os demais alvos analisados, quer seja em astrócitos quiescentes ou sob estímulo inflamatório.

O canabidiol na concentração de 10  $\mu$ M, mas não em concentração  $\leq 1$   $\mu$ M, afetou drasticamente a sobrevivência astrocitária. Assim, no presente estudo, verificou-se que o canabidiol altera, de forma concentração-dependente, a viabilidade celular em astrócitos humanos derivados de iPSCs. Resultados semelhantes foram descritos em precursores neurais humanos expostos ao canabidiol durante o processo de diferenciação, uma vez que se observou expressiva morte celular quando essas culturas foram expostas a canabidiol a 10  $\mu$ M por 48 horas (Miranda, C. C. *et al.*, 2020). Adicionalmente, o efeito parece ser tempo-dependente, pois a concentração de 1  $\mu$ M do canabidiol, após 10 dias de tratamento, provocou redução da densidade celular, acompanhada de maior expressão da forma ativa de caspase 3, o que sugere indução de apoptose (Miranda, C. C. *et al.*, 2020). Em concordância, Vrechi e colaboradores relatam efeito tempo-dependente do canabidiol em células neurais humanas, com redução da viabilidade após o tratamento com concentrações acima de 50  $\mu$ M, por 24 horas, ou acima de 25  $\mu$ M, por 48 horas (Vrechi, T. *et al.*, 2021). A indução de apoptose pelo canabidiol foi descoberta, inicialmente, em células tumorais, sendo associada à ativação da via intrínseca, regulada pela mitocôndria, e da via extrínseca, mediada pelos receptores de morte celular (Massi, P. *et al.*, 2013). Nos últimos anos, o potencial antitumoral do canabidiol tem sido bastante estudado, o que levou à descoberta, em células cancerígenas, de mecanismos como a indução de autofagia, parada do ciclo celular, estresse do retículo endoplasmático, alterações mitocondriais e síntese de ROS, com consequente morte celular por apoptose (Ożarowski, M. *et al.*, 2021).

Fatores metodológicos podem ter contribuído para a citotoxicidade observada nesse estudo. Nesse sentido, Hind e colaboradores demonstraram que astrócitos humanos respondem de maneira diferente ao canabidiol, caso sejam cultivados em monocultura ou co-cultura. Em monocultura, a concentração de 10  $\mu$ M provocou redução do nível total de proteínas, com simultânea elevação do nível de LDH, sugerindo efeito citotóxico. Curiosamente, esse resultado não se reproduziu quando os astrócitos foram cultivados com células endoteliais da microvasculatura cerebral humana (Hind, W. H. *et al.*, 2016). A co-cultura é considerada um ambiente mais relevante, do ponto de vista fisiológico, em comparação à monocultura, pois a comunicação intercelular influencia as respostas a fatores externos, como, por exemplo, tratamentos farmacológicos. Considerando que o canabidiol exerce seus efeitos terapêuticos atuando sobre diferentes células alvo, é importante avaliar a modulação da reatividade astrocitária em modelos *in vitro* que recapitem a comunicação existente entre as células do SNC. Para isso, propõe-se a utilização de modelos tridimensionais, como as neurosféricas derivadas de iPSCs, cujas características moleculares assemelham-se mais ao ambiente cerebral do que as culturas bidimensionais (Pagano, S. *et al.*, 2020; Kim, J. *et al.*, 2021).

No presente estudo, não foram observadas alterações no nível de progranulina, seja em decorrência do estímulo inflamatório ou do tratamento com canabidiol. Seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido, sabe-se, porém, que a progranulina é necessária para a ativação microglial adequada, pois sua deleção provoca exacerbação da resposta inflamatória e da poda sináptica por essas células (Lui, H. *et al.*, 2016; Tanaka, Y. *et al.*, 2013; Zhang, J. *et al.*, 2020). Embora sua regulação gênica seja pouco compreendida, sabe-se que a expressão da progranulina pode ser diferencialmente regulada por mediadores inflamatórios, em micróglia e astrócitos. Suh e colaboradores demonstraram redução de sua expressão em células microgliais humanas expostas a IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ , ao passo que, em cultura primária de astrócitos humanos, o nível de progranulina foi elevado pelas citocinas. Além disso, outros estímulos inflamatórios não alteraram a quantidade de progranulina produzida pelos astrócitos (Suh, H. S. *et al.*, 2012).

Outras moléculas importantes em doenças neurológicas, como o BDNF, também tem sua síntese regulada de maneira complexa por sinalizações inflamatórias. Essa neurotrofina é um dos genes alvo de NF- $\kappa$ B e sua síntese pode levar à ativação do

fator, em um mecanismo de retroalimentação positiva (Caviedes, A. *et al.*, 2017). Porém, a longo prazo, a ativação crônica de NF- $\kappa$ B reduz a quantidade de BDNF, aumentando a susceptibilidade neuronal a danos, já que o BDNF é responsável por estimular vias de sobrevivência celular e plasticidade sináptica (Lima Giacobbo, B. *et al.*, 2019). Em modelos animais, o efeito antidepressivo do canabidiol foi associado à maior expressão de BDNF, acompanhada de aumento do nível de sinaptofisina e PSD95, marcadores de terminais pré e pós sinápticos, respectivamente (Sales, A. J. *et al.*, 2019). Além disso, Magen e colaboradores relataram ação terapêutica do canabidiol sobre funções cognitivas e motoras, em modelo de neuroinflamação, que foi associada ao aumento de BDNF e à redução do nível hipocampal de RNAm do receptor de TNF- $\alpha$  (Magen, I. *et al.*, 2010). Resultados pré-clínicos indicam que o canabidiol é capaz de aumentar o nível de BDNF, mas essa relação ainda não foi corroborada por ensaios clínicos. Em pacientes com doença de Parkinson, não se observou alteração do nível do fator pelo tratamento com canabidiol (Chagas, M. *et al.*, 2014). Semelhantemente, o tratamento com Sativex, mistura equimolar de  $\Delta$ 9-THC e canabidiol, não alterou a concentração de BDNF no líquido cefalorraquidiano de pacientes com doença de Huntington (López-Sendón Moreno, J. L. *et al.*, 2016). Os estudos clínicos, de tamanho amostral ainda pequeno, ressaltam a necessidade de investigações mais abrangentes, avaliando os efeitos de tratamentos mais longos e concentrações mais elevadas de canabidiol. No presente trabalho, não se observou alteração da expressão do fator em resposta às citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em astrócitos humanos derivados de iPSCs. Ademais, verificou-se que o tratamento com canabidiol não afetou a expressão de BDNF.

Nesse estudo, não se observou influência do estímulo inflamatório sobre a capacidade astrocitária de manutenção do nível extracelular de glutamato. Em contextos de exitotoxicidade, o aumento do nível extracelular de glutamato pode ser provocado pela ativação exacerbada de neurônios excitatórios e por comunicação disfuncional entre as células da glia. Com a secreção excessiva de TNF- $\alpha$  por micróglia ativada, intensifica-se a liberação de glutamato pelos astrócitos (Bezzi, P. *et al.*, 2001). Além disso, a homeostase glutamatérgica pode ser prejudicada pela associação entre neuroinflamação e estresse oxidativo que, em conjunto, podem reduzir a captação do neurotransmissor, inibindo a expressão de EAATs ou modificando sua estrutura (Sitcheran, R. *et al.*, 2005; Trotti, D. *et al.*, 1997; Ye, Z. C. e

Sontheimer, H. 1996). Seria interessante, portanto, investigar a ação do canabidiol em modelos *in vitro* mais complexos, com amplificação das sinalizações inflamatórias, pela presença de outras células, como micróglia e neurônios, bem como a presença de estresse oxidativo.

É importante salientar que os resultados aqui apresentados referem-se à caracterização das respostas astrocitárias de apenas um indivíduo. Como cada linhagem celular derivada de iPSCs possui características genéticas próprias do doador, linhagens diferentes podem exibir variações transcricionais e fenotípicas (Karagiannis, P. *et al.*, 2019). Ademais, os astrócitos derivados de iPSCs exibem, em parte, similaridades gênicas aos astrócitos fetais, pois sua maturação completa é de difícil obtenção *in vitro* e requer, preferencialmente, cultivo prolongado em modelo tridimensional (Sloan, S. A. *et al.*, 2019). É possível que o canabidiol atue de forma variável ao longo dos diferentes estágios da diferenciação astrocitária, fenômeno observado em outros tipos celulares, como neurônios (Schönhofen, P. *et al.*, 2015) e oligodendrócitos (Mato, S. *et al.*, 2010; Mecha, M. *et al.*, 2012). De modo interessante, é possível que a exposição ao canabidiol seja prejudicial ao desenvolvimento, quando esta ocorre durante o período fetal (Miranda, C. C. *et al.*, 2020), mas, por outro lado, desempenhe funções neuroprotetoras na fase adulta ao atenuar o estresse oxidativo e a neuroinflamação (Cristino, L. *et al.*, 2020).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que os astrócitos derivados de iPSCs respondem às citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  com modificações transcricionais que podem interferir na funcionalidade dos próprios astrócitos e de outras células. Foi observado aumento da expressão de RNAm das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após 4 h de estímulo inflamatório. Apesar de não ter influenciado os níveis de TNF- $\alpha$  induzidos pelo estímulo, o tratamento com canabidiol a 1  $\mu$ M inibiu o aumento de IL-1 $\beta$ . O efeito sobre a citocina IL-1 $\beta$  sugere regulação da reatividade pelo canabidiol, a nível transcricional. Entretanto, os demais resultados não indicaram regulação significativa da resposta astrocitária ao estímulo inflamatório. Dessa forma, não foi confirmada, nesse estudo, a imunomodulação de astrócitos humanos pelo canabidiol. Ademais, verificou-se redução da viabilidade dos astrócitos induzida pelo canabidiol a 10  $\mu$ M, o que revela a importância de investigações mais detalhadas sobre seu mecanismo de ação nessas células.

Dessa forma, seria interessante que fossem avaliadas outras condições experimentais, testando o efeito de diferentes concentrações do canabidiol em mais contextos *in vitro*, a fim de ampliar as informações disponíveis sobre a modulação da reatividade astrocitária. Nesse sentido, devem ser priorizados modelos de co-cultura tridimensional, com células humanas, haja vista a maior similaridade ao ambiente fisiológico. Adicionalmente, é necessário investigar quais as sinalizações bioquímicas são reguladas pelo canabidiol em astrócitos humanos. Considerando a variedade de células e moléculas alvo do canabidiol, a abrangência dos possíveis impactos funcionais sobre a astrogliose reativa é extensa e, muito provavelmente, contribui para seus efeitos terapêuticos em desordens do SNC.

## 7. REFERÊNCIAS

### 7.1 Bibliografia não indexada

Cannabidiol (CBD) Critical Review Report. WHO Expert Committee on Drug Dependence, fortieth report. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO Technical Report Series, No. 1013). <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/279948/9789241210225-eng.pdf>

Full Cannabidiol Prescribing Information. Cannabidiol (Epidiolex). Food and Drug Administration: FDA; 2018. [https://www.epidiox.com/sites/default/files/EPIDIOLEX\\_Full\\_Prescribing\\_Information.pdf](https://www.epidiox.com/sites/default/files/EPIDIOLEX_Full_Prescribing_Information.pdf)

### 7.2 Bibliografia indexada

Aaronson, D. S., & Horvath, C. M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1653–1655. <https://doi.org/10.1126/science.1071545>

Abbott N. J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy*, 200(6), 629–638. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>

Adams, R., Hunt M., & Clark J. H. (1940). Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. *Journal of the American Chemical Society*, 62 (1), 196-200

Allen N. J. (2014). Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 439–463. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013053>

Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters*, 565, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)

Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>

Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., & Volterra, A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature neuroscience*, 4(7), 702–710. <https://doi.org/10.1038/89490>

Borges, R. S., Batista, J., Jr, Viana, R. B., Baetas, A. C., Orestes, E., Andrade, M. A., Honório, K. M., & da Silva, A. B. (2013). Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(10), 12663–12674. <https://doi.org/10.3390/molecules181012663>

Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W. H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J., & Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of experimental medicine*, 202(1), 145–156. <https://doi.org/10.1084/jem.20041918>

Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V. I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S. R., & Bethea, J. R. (2009). Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(5), 2628–2640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802954>

Britch, S. C., Babalonis, S., & Walsh, S. L. (2021). Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology*, 238(1), 9–28. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05712-8>

Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>

Caviedes, A., Lafourcade, C., Soto, C., & Wyneken, U. (2017). BDNF/NF-κB Signaling in the Neurobiology of Depression. *Current pharmaceutical design*, 23(21), 3154–3163. <https://doi.org/10.2174/138161282366617011141915>

Ceyzériat, K., Abjean, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ben Haim, L., & Escartin, C. (2016). The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway?. *Neuroscience*, 330, 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.043>

Chagas, M. H., Zuardi, A. W., Tumas, V., Pena-Pereira, M. A., Sobreira, E. T., Bergamaschi, M. M., dos Santos, A. C., Teixeira, A. L., Hallak, J. E., & Crippa, J. A. (2014). Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 28(11), 1088–1098. <https://doi.org/10.1177/0269881114550355>

Choi, S. S., Lee, H. J., Lim, I., Satoh, J., & Kim, S. U. (2014). Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PloS one*, 9(4), e92325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092325>

Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature reviews. Neurology*, 16(1), 9–29. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>

Dhital, S., Stokes, J. V., Park, N., Seo, K. S., & Kaplan, B. L. (2017). Cannabidiol (CBD) induces functional Tregs in response to low-level T cell activation. *Cellular immunology*, 312, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.11.006>

Doria, J. G., Silva, F. R., de Souza, J. M., Vieira, L. B., Carvalho, T. G., Reis, H. J., Pereira, G. S., Dobransky, T., & Ribeiro, F. M. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. *British journal of pharmacology*, 169(4), 909–921. <https://doi.org/10.1111/bph.12164>

- Drögemüller, K., Helmuth, U., Brunn, A., Sakowicz-Burkiewicz, M., Gutmann, D. H., Mueller, W., Deckert, M., & Schlüter, D. (2008). Astrocyte gp130 expression is critical for the control of Toxoplasma encephalitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(4), 2683–2693. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2683>
- Dvorianchikova, G., Barakat, D., Brambilla, R., Agudelo, C., Hernandez, E., Bethea, J. R., Shestopalov, V. I., & Ivanov, D. (2009). Inactivation of astroglial NF-kappa B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *The European journal of neuroscience*, *30*(2), 175–185. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06814.x>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, *24*(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Espósito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G. I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M. R., Iuvone, T., & Steardo, L. (2011). Cannabidiol reduces Aβ-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARγ involvement. *PLoS one*, *6*(12), e28668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028668>
- Gabardo, E. & Cabral, R. M. (2020). Autorização para uso de medicamentos com princípios ativos proscritos no Brasil. *Revista de Investigações Constitucionais*, *7* (473-515). <https://doi.org/10.5380/rinc.v7i2.76339>
- Ghoshal, N., Dearborn, J. T., Wozniak, D. F., & Cairns, N. J. (2012). Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice. *Neurobiology of disease*, *45*(1), 395–408. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.029>
- Gobira, P. H., Vilela, L. R., Gonçalves, B. D., Santos, R. P., de Oliveira, A. C., Vieira, L. B., Aguiar, D. C., Crippa, J. A., & Moreira, F. A. (2015). Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. *Neurotoxicology*, *50*, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.007>
- Hamilton, N. B., & Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters?. *Nature reviews. Neuroscience*, *11*(4), 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrn2803>
- Hampson, A. J., Grimaldi, M., Axelrod, J., & Wink, D. (1998). Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(14), 8268–8273. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8268>
- Han, R. T., Kim, R. D., Molofsky, A. V., & Liddelow, S. A. (2021). Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity*, *54*(2), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.013>
- Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., Economides, C., & Rosenthal, J. (2014). Clinical development success rates for investigational drugs. *Nature biotechnology*, *32*(1), 40–51. <https://doi.org/10.1038/nbt.2786>
- Haroon, F., Drögemüller, K., Händel, U., Brunn, A., Reinhold, D., Nishanth, G., Mueller, W., Trautwein, C., Ernst, M., Deckert, M., & Schlüter, D. (2011). Gp130-dependent

astrocytic survival is critical for the control of autoimmune central nervous system inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(11), 6521–6531. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001135>

He, Y., Liu, X., & Chen, Z. (2020). Glial Scar-a Promising Target for Improving Outcomes After CNS Injury. *Journal of molecular neuroscience : MN*, *70*(3), 340–352. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01417-6>

Hegde, V. L., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2011). Role of myeloid-derived suppressor cells in amelioration of experimental autoimmune hepatitis following activation of TRPV1 receptors by cannabidiol. *PloS one*, *6*(4), e18281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018281>

Heller, C., Foiani, M. S., Moore, K., Convery, R., Bocchetta, M., Neason, M., Cash, D. M., Thomas, D., Greaves, C. V., Woollacott, I. O., Shafei, R., Van Swieten, J. C., Moreno, F., Sanchez-Valle, R., Borroni, B., Laforce, R., Jr, Masellis, M., Tartaglia, M. C., Graff, C., Galimberti, D., ... GENFI (2020). Plasma glial fibrillary acidic protein is raised in progranulin-associated frontotemporal dementia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *91*(3), 263–270. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-321954>

Hind, W. H., England, T. J., & O'Sullivan, S. E. (2016). Cannabidiol protects an in vitro model of the blood-brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR $\gamma$  and 5-HT $1A$  receptors. *British journal of pharmacology*, *173*(5), 815–825. <https://doi.org/10.1111/bph.13368>

Hobbs, J. M., Vazquez, A. R., Remijan, N. D., Trotter, R. E., McMillan, T. V., Freedman, K. E., Wei, Y., Woelfel, K. A., Arnold, O. R., Wolfe, L. M., Johnson, S. A., & Weir, T. L. (2020). Evaluation of pharmacokinetics and acute anti-inflammatory potential of two oral cannabidiol preparations in healthy adults. *Phytotherapy research : PTR*, *34*(7), 1696–1703. <https://doi.org/10.1002/ptr.6651>

Hu, S., Sheng, W. S., Ehrlich, L. C., Peterson, P. K., & Chao, C. C. (2000). Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation*, *7*(3), 153–159. <https://doi.org/10.1159/000026433>

Huestis, M. A., Solimini, R., Pichini, S., Pacifici, R., Carlier, J., & Busardò, F. P. (2019). Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Current neuropharmacology*, *17*(10), 974–989. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190603171901>

Hyvärinen, T., Hagman, S., Ristola, M., Sukki, L., Veijula, K., Kreutzer, J., Kallio, P., & Narkilahti, S. (2019). Co-stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induces an inflammatory reactive astrocyte phenotype with neurosupportive characteristics in a human pluripotent stem cell model system. *Scientific reports*, *9*(1), 16944. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53414-9>

Juknat, A., Pietr, M., Kozela, E., Rimmerman, N., Levy, R., Gao, F., Coppola, G., Geschwind, D., & Vogel, Z. (2013). Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *PloS one*, *8*(4), e61462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061462>

Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J. K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka,

S., & Osafune, K. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiological reviews*, 99(1), 79–114. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017>

Kim, J., Choi, H., Kang, E. K., Ji, G. Y., Kim, Y., & Choi, I. S. (2021). In Vitro Studies on Therapeutic Effects of Cannabidiol in Neural Cells: Neurons, Glia, and Neural Stem Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(19), 6077. <https://doi.org/10.3390/molecules26196077>

Kozela, E., Pietr, M., Juknat, A., Rimmerman, N., Levy, R., & Vogel, Z. (2010). Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(3), 1616–1626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069294>

Kozela, E., Juknat, A., & Vogel, Z. (2017). Modulation of Astrocyte Activity by Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1669. <https://doi.org/10.3390/ijms18081669>

Legare, C. A., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2022). Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. *Pharmacology*, 107(3-4), 131–149. <https://doi.org/10.1159/000521683>

Lehre, K. P., & Danbolt, N. C. (1998). The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(21), 8751–8757. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08751.1998>

Li, J., Pan, L., Pembroke, W. G., Rexach, J. E., Godoy, M. I., Condro, M. C., Alvarado, A. G., Harteni, M., Chen, Y. W., Stiles, L., Chen, A. Y., Wanner, I. B., Yang, X., Goldman, S. A., Geschwind, D. H., Kornblum, H. I., & Zhang, Y. (2021). Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. *Nature communications*, 12(1), 3958. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24232-3>

Lima Giacobbo, B., Doorduyn, J., Klein, H. C., Dierckx, R., Bromberg, E., & de Vries, E. (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Molecular neurobiology*, 56(5), 3295–3312. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1283-6>

Linnerbauer, M., & Rothhammer, V. (2020). Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Frontiers in immunology*, 11, 573256. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.573256>

Linnerbauer, M., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*, 108(4), 608–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>

Liu, C., Li, H., Xu, F., Jiang, X., Ma, H., & Seeram, N. P. (2021). Cannabidiol Protects Human Skin Keratinocytes from Hydrogen-Peroxide-Induced Oxidative Stress via Modulation of the Caspase-1-IL-1 $\beta$  Axis. *Journal of natural products*, 84(5), 1563–1572. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00083>

- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023–. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- López-Sendón Moreno, J. L., García Caldentey, J., Trigo Cubillo, P., Ruiz Romero, C., García Ribas, G., Alonso Arias, M. A., García de Yébenes, M. J., Tolón, R. M., Galve-Roperh, I., Sagredo, O., Valdeolivas, S., Resel, E., Ortega-Gutierrez, S., García-Bermejo, M. L., Fernández Ruiz, J., Guzmán, M., & García de Yébenes Prous, J. (2016). A double-blind, randomized, cross-over, placebo-controlled, pilot trial with Sativex in Huntington's disease. *Journal of neurology*, 263(7), 1390–1400. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8145-9>
- Lui, H., Zhang, J., Makinson, S. R., Cahill, M. K., Kelley, K. W., Huang, H. Y., Shang, Y., Oldham, M. C., Martens, L. H., Gao, F., Coppola, G., Sloan, S. A., Hsieh, C. L., Kim, C. C., Bigio, E. H., Weintraub, S., Mesulam, M. M., Rademakers, R., Mackenzie, I. R., Seeley, W. W., ... Huang, E. J. (2016). Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell*, 165(4), 921–935. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.001>
- Ma, H., Xu, F., Liu, C., & Seeram, N. P. (2021). A Network Pharmacology Approach to Identify Potential Molecular Targets for Cannabidiol's Anti-Inflammatory Activity. *Cannabis and cannabinoid research*, 6(4), 288–299. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0025>
- Magen, I., Avraham, Y., Ackerman, Z., Vorobiev, L., Mechoulam, R., & Berry, E. M. (2010). Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *British journal of pharmacology*, 159(4), 950–957. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00589.x>
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*, 8(2), 184. <https://doi.org/10.3390/cells8020184>
- Massi, P., Solinas, M., Cinquina, V., & Parolaro, D. (2013). Cannabidiol as potential anticancer drug. *British journal of clinical pharmacology*, 75(2), 303–312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04298.x>
- Mato, S., Victoria Sánchez-Gómez, M., & Matute, C. (2010). Cannabidiol induces intracellular calcium elevation and cytotoxicity in oligodendrocytes. *Glia*, 58(14), 1739–1747. <https://doi.org/10.1002/glia.21044>
- Mecha, M., Torrao, A. S., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F. J., Mechoulam, R., & Guaza, C. (2012). Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Cell death & disease*, 3(6), e331. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.71>
- Mecha, M., Feliú, A., Iñigo, P. M., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F. J., & Guaza, C. (2013). Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A<sub>2A</sub> receptors. *Neurobiology of disease*, 59, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.016>
- Mechoulam, R., & Shvo, Y. (1963). Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*, 19(12), 2073–2078. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85022-x](https://doi.org/10.1016/0040-4020(63)85022-x)

- Mechoulam, R., & Hanus, L. (2002). Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. *Chemistry and physics of lipids*, 121(1-2), 35–43. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00144-5](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00144-5)
- Menzel, L., Kleber, L., Friedrich, C., Hummel, R., Dangel, L., Winter, J., Schmitz, K., Tegeder, I., & Schäfer, M. K. (2017). Progranulin protects against exaggerated axonal injury and astrogliosis following traumatic brain injury. *Glia*, 65(2), 278–292. <https://doi.org/10.1002/glia.23091>
- Millar, S. A., Stone, N. L., Bellman, Z. D., Yates, A. S., England, T. J., & O'Sullivan, S. E. (2019). A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. *British journal of clinical pharmacology*, 85(9), 1888–1900. <https://doi.org/10.1111/bcp.14038>
- Miranda, C. C., Barata, T., Vaz, S. H., Ferreira, C., Quintas, A., & Bekman, E. P. (2020). hiPSC-Based Model of Prenatal Exposure to Cannabinoids: Effect on Neuronal Differentiation. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 119. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00119>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Health and Medicine Division, Board on Population Health and Public Health Practice, & Committee on the Health Effects of Marijuana: An Evidence Review and Research Agenda. (2017). The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research. *National Academies Press (US)*. <https://doi.org/10.17226/24625>
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*, 26(10), 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>
- Nichols, J. M., & Kaplan, B. (2020). Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis and cannabinoid research*, 5(1), 12–31. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0073>
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in neurosciences*, 29(10), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>
- Orellana, J. A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J. X., Bennett, M. V., Naus, C. C., Giaume, C., & Sáez, J. C. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of neurochemistry*, 118(5), 826–840. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07210.x>
- Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., & Okano, H. (2006). Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature medicine*, 12(7), 829–834. <https://doi.org/10.1038/nm1425>
- Ożarowski, M., Karpiński, T. M., Zielińska, A., Souto, E. B., & Wielgus, K. (2021). Cannabidiol in Neurological and Neoplastic Diseases: Latest Developments on the Molecular Mechanism of Action. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4294. <https://doi.org/10.3390/ijms22094294>
- Pagano, S., Coniglio, M., Valenti, C., Federici, M. I., Lombardo, G., Cianetti, S., & Marinucci, L. (2020). Biological effects of Cannabidiol on normal human healthy cell

- populations: Systematic review of the literature. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 132, 110728. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110728>
- Pauli, C. S., Conroy, M., Vanden Heuvel, B. D., & Park, S. H. (2020). Cannabidiol Drugs Clinical Trial Outcomes and Adverse Effects. *Frontiers in pharmacology*, 11, 63. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00063>
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., Stella, N., & Magistretti, P. J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental neuroscience*, 20(4-5), 291–299. <https://doi.org/10.1159/000017324>
- Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., & Luo, J. (2022). A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 130(4), 439–456. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13710>
- Huestis, M. A., Solimini, R., Pichini, S., Pacifici, R., Carlier, J., & Busardò, F. P. (2019). Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Current neuropharmacology*, 17(10), 974–989. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190603171901>
- Pereira, S. R., Hackett, B., O'Driscoll, D. N., Sun, M. C., & Downer, E. J. (2021). Cannabidiol modulation of oxidative stress and signalling. *Neuronal signaling*, 5(3), NS20200080. <https://doi.org/10.1042/NS20200080>
- Perriot, S., Mathias, A., Perriard, G., Canales, M., Jonkmans, N., Merienne, N., Meunier, C., El Kassar, L., Perrier, A. L., Laplaud, D. A., Schlupe, M., Déglon, N., & Du Pasquier, R. (2018). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Astrocytes Are Differentially Activated by Multiple Sclerosis-Associated Cytokines. *Stem cell reports*, 11(5), 1199–1210. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.015>
- Peyravian, N., Deo, S., Daunert, S., & Jimenez, J. J. (2020). Cannabidiol as a Novel Therapeutic for Immune Modulation. *ImmunoTargets and therapy*, 9, 131–140. <https://doi.org/10.2147/ITT.S263690>
- Ponath, G., Park, C., & Pitt, D. (2018). The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology*, 9, 217. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00217>
- Rajasekar, N., Nath, C., Hanif, K., & Shukla, R. (2016). Inhibitory Effect of Memantine on Streptozotocin-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Neurotrophic Factor Decline in Astrocytes. *Molecular neurobiology*, 53(10), 6730–6744. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9576-5>
- Ren, B., & Dunaevsky, A. (2021). Modeling Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Diseases with Astrocytes Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1692. <https://doi.org/10.3390/ijms22041692>
- Rhinn, H., Tatton, N., McCaughey, S., Kurnellas, M., & Rosenthal, A. (2022). Progranulin as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Trends in pharmacological sciences*, S0165-6147(21)00232-7. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.11.015>
- Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2015). Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Seminars in immunopathology*, 37(6), 625–638. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0515-3>

Sales, A. J., Fogaça, M. V., Sartim, A. G., Pereira, V. S., Wegener, G., Guimarães, F. S., & Joca, S. (2019). Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Molecular neurobiology*, *56*(2), 1070–1081. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1143-4>

Santos, R., Vadodaria, K. C., Jaeger, B. N., Mei, A., Lefcochilos-Fogelquist, S., Mendes, A., Erikson, G., Shokhirev, M., Randolph-Moore, L., Fredlender, C., Dave, S., Oefner, R., Fitzpatrick, C., Pena, M., Barron, J. J., Ku, M., Denli, A. M., Kerman, B. E., Charnay, P., Kelsoe, J. R., ... Gage, F. H. (2017). Differentiation of Inflammation-Responsive Astrocytes from Glial Progenitors Generated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports*, *8*(6), 1757–1769. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.011>

Scarante, F. F., Ribeiro, M. A., Almeida-Santos, A. F., Guimarães, F. S., & Campos, A. C. (2021). Glial Cells and Their Contribution to the Mechanisms of Action of Cannabidiol in Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 618065. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.618065>

Schönhofen, P., de Medeiros, L. M., Bristot, I. J., Lopes, F. M., De Bastiani, M. A., Kapczinski, F., Crippa, J. A., Castro, M. A., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2015). Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins. *Molecular neurobiology*, *52*(1), 26–37. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8843-1>

Silva, M. C., & Haggarty, S. J. (2020). Human pluripotent stem cell-derived models and drug screening in CNS precision medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1471*(1), 18–56. <https://doi.org/10.1111/nyas.14012>

Silvestro, S., Schepici, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Molecular Targets of Cannabidiol in Experimental Models of Neurological Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(21), 5186. <https://doi.org/10.3390/molecules25215186>

Simard, M., & Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, *129*(4), 877–896. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.053>

Sitcheran, R., Gupta, P., Fisher, P. B., & Baldwin, A. S. (2005). Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *The EMBO journal*, *24*(3), 510–520. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600555>

Sloan, S. A., Darmanis, S., Huber, N., Khan, T. A., Birey, F., Caneda, C., Reimer, R., Quake, S. R., Barres, B. A., & Pasca, S. P. (2017). Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron*, *95*(4), 779–790.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.035>

Soung, A., & Klein, R. S. (2019). Astrocytes: Initiators of and Responders to Inflammation. In (Ed.), *Glia in Health and Disease*. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89760>

Suh, H. S., Choi, N., Tarassishin, L., & Lee, S. C. (2012). Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix

metalloproteinase-12 (MMP-12). *PloS one*, 7(4), e35115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035115>

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Tanaka, Y., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., & Nishihara, M. (2013). Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience*, 231, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.11.032>

Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer research*, 62(18), 5196–5203.

Touw M. (1981). The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of psychoactive drugs*, 13(1), 23–34. <https://doi.org/10.1080/02791072.1981.10471447>

Trindade, P., Loiola, E. C., Gasparotto, J., Ribeiro, C. T., Cardozo, P. L., Devalle, S., Salerno, J. A., Ornelas, I. M., Ledur, P. F., Ribeiro, F. M., Ventura, A., Moreira, J., Gelain, D. P., Porciúncula, L. O., & Rehen, S. K. (2020). Short and long TNF-alpha exposure recapitulates canonical astrogliosis events in human-induced pluripotent stem cells-derived astrocytes. *Glia*, 68(7), 1396–1409. <https://doi.org/10.1002/glia.23786>

Trotti, D., Rizzini, B. L., Rossi, D., Haugeto, O., Racagni, G., Danbolt, N. C., & Volterra, A. (1997). Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *The European journal of neuroscience*, 9(6), 1236–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01478.x>

Tsacopoulos, M., & Magistretti, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 877–885. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-00877.1996>

Vrechi, T., Leão, A., Morais, I., Abílio, V. C., Zuardi, A. W., Hallak, J., Crippa, J. A., Bincoletto, C., Ureshino, R. P., Smaili, S. S., & Pereira, G. (2021). Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells. *Scientific reports*, 11(1), 5434. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84879-2>

Wang, B. C., Liu, H., Talwar, A., & Jian, J. (2015). New discovery rarely runs smooth: an update on progranulin/TNFR interactions. *Protein & cell*, 6(11), 792–803. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0213-x>

Wheeler, M. A., Clark, I. C., Tjon, E. C., Li, Z., Zandee, S., Couturier, C. P., Watson, B. R., Scalisi, G., Alkwai, S., Rothhammer, V., Rotem, A., Heyman, J. A., Thaploo, S., Sanmarco, L. M., Ragoussis, J., Weitz, D. A., Petrecca, K., Moffitt, J. R., Becher, B., Antel, J. P., ... Quintana, F. J. (2020). MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*, 578(7796), 593–599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1999-0>

Yan, Y., Shin, S., Jha, B. S., Liu, Q., Sheng, J., Li, F., Zhan, M., Davis, J., Bharti, K., Zeng, X., Rao, M., Malik, N., & Vemuri, M. C. (2013). Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells. *Stem cells translational medicine*, 2(11), 862–870. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0080>

Yao, W., Lin, S., Su, J., Cao, Q., Chen, Y., Chen, J., Zhang, Z., Hashimoto, K., Qi, Q., & Zhang, J. C. (2021). Activation of BDNF by transcription factor Nrf2 contributes to antidepressant-like actions in rodents. *Translational psychiatry*, 11(1), 140. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01261-6>

Ye, Z. C., & Sontheimer, H. (1996). Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport*, 7(13), 2181–2185. <https://doi.org/10.1097/00001756-199609020-00025>

Yin, F., Banerjee, R., Thomas, B., Zhou, P., Qian, L., Jia, T., Ma, X., Ma, Y., Iadecola, C., Beal, M. F., Nathan, C., & Ding, A. (2010). Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 207(1), 117–128. <https://doi.org/10.1084/jem.20091568>

Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., Vogel, H., Steinberg, G. K., Edwards, M. S., Li, G., Duncan, J. A., 3rd, Cheshier, S. H., Shuer, L. M., Chang, E. F., Grant, G. A., Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, 89(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>

Zhang, J., Velmeshev, D., Hashimoto, K., Huang, Y. H., Hofmann, J. W., Shi, X., Chen, J., Leidal, A. M., Dishart, J. G., Cahill, M. K., Kelley, K. W., Liddel, S. A., Seeley, W. W., Miller, B. L., Walther, T. C., Farese, R. V., Jr, Taylor, J. P., Ullian, E. M., Huang, B., Debnath, J., ... Huang, E. J. (2020). Neurotoxic microglia promote TDP-43 proteinopathy in progranulin deficiency. *Nature*, 588(7838), 459–465. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2709-7>