



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Laura Luciana de Melo Moreira Silva

**Ação do óleo de *Cannabis sativa* na expressão de genes e proteínas
envolvidas na via inflamatória PTGS2**

São José do Rio Preto
2023

Laura Luciana de Melo Moreira Silva

**Ação do óleo de *Cannabis sativa* na expressão de genes e proteínas
envolvidas na via inflamatória PTGS2**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES
FAPERP

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini
Domingos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues
Lisoni

São José do Rio Preto
2023

S586a

Silva, Laura Luciana de Melo Moreira

Ação do óleo de Cannabis sativa na expressão de genes e proteínas envolvidas na via inflamatória PTGS2 / Laura Luciana de Melo Moreira Silva. -- São José do Rio Preto, 2023

55 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientadora: Flavia Cristina Rodrigues-Lisoni

1. Inflamação. 2. PTGS2. 3. Canabis medicinal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Laura Luciana de Melo Moreira Silva

**Ação do óleo de *Cannabis sativa* na expressão de genes e proteínas
envolvidas na via inflamatória PTGS2**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES
FAPERP

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Tiago Henrique
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ana Paula Girol
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
28 de agosto de 2023

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, sendo meu suporte e acreditando no meu potencial. À minha mãe Leonice, minha base, maior incentivadora e inspiração. Aos meus irmãos, Luan e Leonardo, companheiros em todas as fases da vida. E, ao meu noivo Guilherme, por todo o amor, compreensão e por cada sonho que nos move.

Dedico este trabalho a todos que entendem
ciência e educação como ferramentas para
construção de uma sociedade igualitária.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, à qual agradeço, a bolsa de estudos foi imprescindível durante toda a minha trajetória de formação.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP) pelo custeio de materiais de insumo essenciais para a execução do trabalho.

Ao IBILCE, não só pela estrutura física, mas também pela rede de profissionais que tornam a ciência possível, como a equipe do restaurante universitário, os técnicos-administrativos, e os profissionais de limpeza.

Ao programa de pós-graduação em Biociências, que me proporcionou tanto aprendizado, o contato com professores incríveis, e a participação em eventos científicos.

Às minhas orientadoras, Prof^a. Dr^a Cláudia Bonini e Prof^a. Dr^a Flávia Lisoni, que gentilmente me receberam e encararam esse desafio comigo, por todos os ensinamentos e por terem aberto esse caminho da genética humana na minha formação.

Aos orientadores que tive durante a graduação, Fabrício do Nascimento e Karina Martins, por estarem comigo nos meus primeiros passos acadêmicos, sempre farão parte do que me constrói como educadora e cientista.

À todos os meus amigos. Aos amigos de longa data que mesmo à distância me proporcionam todo suporte e amor, especialmente Natália Woppe, Tainara Holanda, Vitor Talaia, Sheila Nepomuceno e Lucas Waughan, que já compartilharam comigo tantas fases nessa vida. Às amigas que fiz durante esse percurso, Dayla Geraldini e Vitória Soares, por cada conversa e momento.

Ao grupo de pesquisa, Luana Cardoso, Juliana Gusson, Stefanie Sousa, Julia Ricci e Ingrid Iris, que para além de todas as discussões científicas também serão lindas amizades, fizeram parte de cada nova técnica e análise que aprendi e do meu crescimento profissional com cada comentário e discussão. A cada membro do Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas pelas reuniões científicas semanais e por todo suporte.

A todos que possibilitaram a realização desse trabalho, como a Associação Para Pesquisa e Desenvolvimento da Cannabis medicinal no Brasil (CANNAB) e o laboratório Grüne Labs Uruguai, que participaram de todos os trâmites para a obtenção do óleo de *Cannabis*.

À Prof^a. Dr^a Sonia Oliani, por permitir a execução da pesquisa no laboratório de Imunomorfologia, e pelas reuniões científicas semanais.

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da UFSCar e à Prof^a. Dr^a. Nicola Conran da UNICAMP, que gentilmente cederam alíquotas da linhagem celular K562. E à Dr^a. Carla Peres de Paula que me deu orientações sobre como trabalhar com células em suspensão.

À Prof^a. Dr^a Cláudia Carareto, por permitir a utilização do NanoDrop para quantificação de ácidos nucleicos, além do uso da sala escura para revelação das membranas de *western blotting*.

RESUMO

Inflamação é um mecanismo acionado por complexas vias como resposta protetiva ao organismo, contudo, a inflamação crônica gera uma desregulação no metabolismo. O uso medicinal da *Cannabis* ganhou notoriedade devido ao conhecimento sobre Sistema Endocanabinoide (ECS), sistema endógeno relacionado à homeostasia. Os canabinoides da planta (fitocanabinoides) interagem com o ECS em receptores associados ao sistema nervoso e imunológico; dois desses fitocanabinoides são o Canabidiol (CBD) e o Tetrahydrocannabinol (THC). Há correlação entre ligantes do ECS e a via da Ciclooxygenase (PTGS2), mediadora de processos inflamatórios. Sendo assim, pode-se explorar essa relação e a potencial ação anti-inflamatória. Neste trabalho, analisamos o óleo de *Cannabis full spectrum* atuando nas linhagens celulares HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana), e K562 (células eritroecêmicas humanas). Foi utilizado o óleo na proporção de 2:1 de CBD/THC, calculando concentrações entre 1 e 100 μM a partir dos dados do THC, por 4, 24, 48 e 72 horas nos ensaios de morfologia, proliferação celular e viabilidade. Nos ensaios de apoptose; migração; análise de citocinas; expressão dos genes da via inflamatória (*PTGS2*, *MMP2*, *MMP9*) e dos receptores canabinoides (*CNR1* e *CNR2*); e expressão proteica (*PTGS2*), foi utilizado [10 μM] por 24 horas. Observou-se que, o tratamento não alterou a morfologia da HUVEC no tempo de 24 horas, mas para K562 houve uma redução da proliferação à [10 μM]. Para o ensaio de migração, as células K562 tratadas apresentaram aumento na migração. Enquanto para análise de citocinas, foi reduzida IL-8 para K562 e IL-1 β para a linhagem HUVEC. Não houve alteração significativa na análise da apoptose e na expressão dos genes *PTGS2*, *MMP2* e *MMP9*, mas os genes *CNR1* e *CNR2* encontram-se negativamente expressos para K562 tratada. Quanto à expressão proteica, foi demonstrado aumento de *PTGS2* para as duas linhagens. Nosso trabalho evidenciou os benefícios da utilização do óleo de *Cannabis sativa full spectrum* em baixas concentrações ao demonstrar que, esse não alterou a morfologia, proliferação e viabilidade da célula normal, mas teve ação na K562. Sabe-se que o uso de compostos isolados ou sintéticos da *Cannabis* induz à apoptose, e o resultado de não indução traz indícios da ação sinérgica de óleos *full spectrum*, bem como a redução encontrada na expressão de *CNR1* e *CNR2*, super expressos em condições de doença. Portanto, há perspectiva futura para aplicação do óleo de *Cannabis sativa full spectrum* em doenças inflamatórias. Contudo, mais estudos são necessários, para entender os efeitos cumulativos, residuais e de tempo de exposição.

Palavras-chave: Inflamação. *PTGS2*. *Cannabis* medicinal.

ABSTRACT

Inflammation is a mechanism triggered by complex pathways as a protective response to the body; however, chronic inflammation generates a dysregulation in metabolism. The medicinal use of cannabis has gained notoriety due to knowledge about the Endocannabinoid System (ECS), an endogenous system related to homeostasis. The plant's cannabinoids (phytocannabinoids) interact with the ECS at receptors associated with the nervous and immune systems; two of these phytocannabinoids are Cannabidiol (CBD) and Tetrahydrocannabinol (THC). There is a correlation between ECS ligands and the Cyclooxygenase (PTGS2) pathway, which mediates inflammatory processes. Therefore, this relationship and potential anti-inflammatory action could be explored. In this study, we analyzed the effects of *full spectrum Cannabis* oil on HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) and K562 (human erythroid leukemia cells) cell lines. The oil was used in a ratio of 2:1 CBD/THC, calculating concentrations between 1 and 100 μ M from the THC data, for 4, 24, 48 and 72 hours in the morphology, cell proliferation and viability assays. In the apoptosis; migration; cytokine analysis; expression of inflammatory pathway genes (*PTGS2*, *MMP2*, *MMP9*) and cannabinoid receptors (*CNR1* and *CNR2*); and protein expression (*PTGS2*) assays, [10 μ M] was used for 24 hours. It was observed that the treatment did not alter HUVEC morphology at 24 hours, but for K562 there was a reduction in proliferation at [10 μ M]. For the migration assay, treated K562 cells showed increased migration. While for cytokine analysis, IL-8 was reduced for K562 and IL-1 β for the HUVEC strain. There was no significant change in the analysis of apoptosis and in the expression of the *PTGS2*, *MMP2* and *MMP9* genes, but the *CNR1* and *CNR2* genes were downregulated for treated K562. As for protein expression, an increase in *PTGS2* was demonstrated for both strains. Our work showed the benefits of using *Cannabis sativa full spectrum* oil in low concentrations by demonstrating that it did not alter the morphology, proliferation and viability of the normal cell, but did act on K562. The use of isolated or synthetic *Cannabis* compounds is known to induce apoptosis, and the result of non-induction is indicative of the synergistic action of *full spectrum* oils, as well as the reduction found in the expression of *CNR1* and *CNR2*, which are upregulated in disease conditions. Therefore, there are future prospects for the application of *full spectrum Cannabis sativa* oil in inflammatory diseases. However, more studies are needed to understand the cumulative, residual and exposure time effects.

Keywords: Inflammation. *PTGS2*. Medicinal *Cannabis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema da ação dos receptores canabinoides	17
Figura 2- Representação da estrutura química do Canabidiol e Tetrahidrocanabinol	18
Figura 3- Fitocanabinoides e PTGS2	19
Figura 4- Fotomicrografia de morfologia celular de HUVEC e K562	29
Figura 5- Gráfico de proliferação celular das linhagens HUVEC e K562	30
Figura 6- Gráfico do ensaio de viabilidade celular das linhagens HUVEC e K562	32
Figura 7- Gráficos da análise de morte celular apoptótica	34
Figura 8- Ensaios de Migração celular <i>Transwell</i> HUVEC e K562.	36
Figura 9- Gráficos do ensaio colorimétrico ELISA das células HUVEC e K562.	38
Figura 10- Gráficos de expressão gênica e proteica em HUVEC e K562	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- *Primers* utilizados na qPCR

26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-Araquidonilglicerol
AEA	Anandamida
ANOVA	Análise de variância a dois critérios
ATCC	<i>American Tissue Cell Culture</i>
Ca⁺	Cálcio
CBG	cannabigerol
CBVN	Cannabidivarin
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica (do inglês, <i>Cyclicadenosine monophosphate</i>)
CBD	Canabidiol
CB1	Receptor Canabinoide 1
CB2	Receptor Canabinoide 2
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cDNA	DNA complementar
CNR1	Gene do Receptor Canabinoide 1
CNR2	Gene do Receptor Canabinoide 2
DAMP'S	Padrões moleculares associados ao dano (do inglês, <i>Damage associated molecular pattern</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECL	Kit quimioluminescente
ECS	Sistema endocanabinoide (do inglês, <i>Endocannabinoid system</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAAH	Amida hidrolase de ácido graxo (do inglês, <i>Fatty acid amide hydrolase</i>)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPCR	Receptores acoplados à proteína G (do inglês, <i>G protein coupled receptor</i>)
HRP	Peroxidase Horseradish

HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana (do inglês, <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LCM	Leucemia mieloide Crônica
K562	Células eritroleucêmicas humanas
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MAPK	Proteínas quinase dependentes de mitógeno (do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1 (do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfofenil) -2H-tetrazólio)
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -3,5-diphenylformazan
PAMP'S	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, <i>Phatogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Tampão salino-fosfato (do inglês, <i>Phosphate buffer saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína quinase A (do inglês, <i>Protein kinasse A activity</i>)
POS	Preparação para o estresse oxidativo (do inglês, <i>Preparation for oxidative stress</i>)
PTGS2	Ciclooxigenase-2 (do inglês, <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase</i>)
PTGER	Receptor de prostaglandina E (do inglês, <i>Prostaglandin E Receptor</i>)
RCF	Força centrífuga relativa (do inglês, <i>Relative centrifugal force</i>)

ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>)
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real (do inglês, <i>Real Time Quantitative PCR</i>)
RIPA	Radioimunoprecipitação
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
TBS-T	TBS-T com tween
TCM	Triglicerídeo de cadeia média
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF-α	Fator de necrose tumoral α (do inglês, <i>Tumor necrosis factor α</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

μM Micromolar

μL Microlitro

μm Micrômetro

μg Micrograma

M Molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Inflamação	13
1.2 Inflamação crônica e tratamentos	14
1.3 Cannabis e Sistema Endocanabinoide	15
1.4 PTGS2 e Sistema endocanabinoide	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Materiais	22
3.1.1 Linhagens celulares	22
3.1.2 Óleo de Cannabis	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Cultivo e análise da morfologia celular	23
3.2.2 Ensaio de proliferação	23
3.2.3 Viabilidade celular	24
3.2.4 Análise de Apoptose	24
3.2.5 Ensaio de migração	24
3.2.6 Ensaio de imun absorção enzimática (ELISA)	25
3.2.7 Análise da expressão gênica	25
3.2.7.1 Extração de RNAs	25
3.2.7.2 Genes escolhidos	25
3.2.7.3 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	26
3.2.8 Análise da expressão proteica	26
3.2.8.1 Extração e quantificação de proteínas	26
3.2.8.2 Western Blotting	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1 Morfologia, proliferação, e viabilidade celular	28

4.2 Ensaio de Apoptose	34
4.3 Ensaio de migração	35
4.4 Ensaio colorimétrico ELISA	37
4.5 Expressão de genes e proteínas	38
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é um mecanismo de proteção aos danos causados no organismo, onde há o acionamento de complexas vias de sinalização. De forma geral, é desencadeada devido a lesões das células/tecidos ou quando há invasão por microrganismos, resultando no envio de células e moléculas de defesa para os locais onde é necessária a reação. Compõem o processo inflamatório as células do sistema imune, os mediadores inflamatórios e a interação desses com os vasos sanguíneos. Além disso, existe o papel de balanço da resposta inflamatória realizado pela classe de moléculas denominadas de lipídeos bioativos, entre eles os eicosanoides e os endocanabinoides (ABBAS, 2019; LEUTI *et al.*, 2020). São células do sistema imunológico os fagócitos, os mastócitos, os basófilos, os eosinófilos, os linfócitos, as células *natural killer* e as células linfoides inatas, secretoras de citocinas. Entre os mediadores estão as prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. O papel do sistema circulatório é dado pela dilatação das vênulas e arteríolas, com a necessidade do aumento do fluxo e permeabilidade dos vasos sanguíneos (ABBAS, 2019).

Contudo, os quadros inflamatórios podem ser classificados entre agudos ou crônicos. A inflamação aguda é uma resposta em curto prazo, seu acionamento ocorre via resposta imune inata. Esse tipo de reação ocorre quando há o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) ou de padrões moleculares associados a danos (*Damage-associated molecular pattern*, DAMPs). Essa cascata envolve a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β), o fator de necrose tumoral α (*Tumor necrosis factor*, TNF- α) e eicosanoides pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico, essas moléculas amplificam o sinal inflamatório e recrutam células do sistema imune. Para finalização dessa resposta as células endoteliais e imunes param a produção de eicosanoides e passam a produzir mediadores lipídicos pró-resolução (LEVY *et al.*, 2001; MEDZHITOV *et al.*, 2008; DENNIS, NORRIS, 2015; LEUTI *et al.*, 2020).

Entretanto, quando a inflamação progride de forma exacerbada ou há a permanência do estímulo inflamatório, ocorre o desequilíbrio dos sinais anti e pró-inflamatórios levando ao cenário precedente da inflamação crônica, sendo este um estado geralmente associado e/ou precursor de doenças. Esse processo pode ser caracterizado pela produção ininterrupta de citocinas e eicosanoides pró-inflamatórios, pela insuficiência da biossíntese de lipídeos pró-resolução ou ainda pela produção desbalanceada de esfingolipídios e endocanabinoides

(CHIURCHIÙ, LEUTI, MACCARRONE, 2018; LEUTI *et al.*, 2020). Desse modo, ocorre o contínuo recrutamento de células imunes como, por exemplo, os macrófagos pró-inflamatórios, células T efectoras, linfócitos B, ou ainda a inativação de células T regulatórias (LEUTI *et al.*, 2020). Nesse caso a resposta desregulada e prolongada ocasiona o dano tecidual. Alguns exemplos de doenças e condições associadas a inflamação crônica são: Alergias, aterosclerose, câncer, artrite, doenças autoimunes (WEISS, 2008), diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios oculares, obesidade, doença inflamatória intestinal (ARULSELVAN *et al.*, 2015) e doença falciforme (KATO, 2018; SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

Porém, doenças como a anemia falciforme apresentam uma forma específica de inflamação crônica, denominada de inflamação estéril. Esse tipo de inflamação ocorre no lúmen dos vasos sanguíneos em razão da alteração da reologia dos eritrócitos, é caracterizada pela agregação de neutrófilos, plaquetas e hemácias ao endotélio dos vasos; causando danos por reperfusão e o quadro de dor pela crise vaso-oclusiva (BUNN, 1997; RESS, WILLIAMS, GLADIN, 2010; NOVELLI, GLADWIN, 2016; SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

Os mediadores inflamatórios estão intimamente relacionados à indução da nocicepção, ou seja, sinalizam o estímulo nocivo aos neurônios sensoriais ocasionando dor. O estímulo à dor quando crônico é prejudicial, sendo este mais um dos componentes agravantes do estado inflamatório crônico (MATSUDA; HUH; JI, 2019). Portanto, é recorrente a busca por medicações que atenuem as manifestações de inflamação crônica, com a necessidade de maior qualidade de vida para pacientes com doenças associadas, considerando um menor efeito colateral possível e maior efetividade de ação.

1.2 Inflamação crônica e tratamentos

Como exemplo da busca por novas medicações em doenças associadas ao estado inflamatório crônico, destaca-se a anemia falciforme. Esses pacientes podem sofrer crises agudas de dor como consequência da inflamação, e até o momento, as melhores medicações disponíveis para o controle dessas crises são a base de opioides, sendo esses pacientes erroneamente associados com a epidemia do uso de opioides (BALLAS, 2020). Conforme Brousseau e colaboradores (2010), a população afro-americana é a mais afetada pela anemia falciforme, e segundo Crowley-Matoka (2013), é a faixa mais estigmatizada diante da epidemia de opioides.

Sinha *et al.* (2019) trazem a problemática da epidemia em decorrência do uso abusivo de medicamentos opioides nos Estados Unidos e quais as implicações para pacientes que necessitam dessas medicações. Os autores observaram que, para os entrevistados, o impacto

das novas diretrizes estabelecidas pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos, diante da epidemia de uso de opioides no país, tem seus pontos de impacto negativos. São mencionadas, a dificuldade na aquisição dos medicamentos, a estigmatização dos pacientes em atendimentos públicos e o crescente interesse na busca por terapias alternativas. Discute-se quanto ao uso de compostos oriundos da *Cannabis sativa* como uma das possibilidades. Zhang & Ho (2015), apontam que, apesar da necessidade de mais estudos, são obtidas cada vez mais evidências sobre os benefícios do uso clínico da *Cannabis*, e mencionam a viabilidade de compostos da planta aplicados ao tratamento de alguns tipos de transtornos de desenvolvimento e comportamento (HADLAND; KNIGHT; HARRIS, 2015), e certas condições neurológicas (BENBADIS, 2014).

A medicina tradicional tem sido uma fonte para busca de novos fármacos investigando as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos produtos naturais (CHOPRA; DHINGRA, 2021). Os medicamentos fitoterápicos tradicionais foram utilizados em diferentes culturas, sendo a *Cannabis sativa* um dos mais antigos; esses não necessariamente substituem o tratamento convencional, mas possibilitam o alívio dos sintomas com redução dos efeitos colaterais, e melhora na qualidade de vida dos pacientes (RUSSO, 2011; ZHANG *et al.*, 2021) O uso terapêutico da *Cannabis* é proposto nesse sentido.

1.3 Cannabis e Sistema Endocanabinoide

Apesar de haver registros milenares sobre seu uso em diversas culturas, em países como Índia e China (MECHOULAM, 1986; RUSSO, 2008), o potencial medicinal da *Cannabis* está em maior evidência nas últimas décadas, principalmente pelo destaque obtido a partir da descoberta do Sistema Endocanabinoide (*Endocannabinoid system*, ECS). O ECS é um sistema endógeno, que forma uma rede intracelular de sinalização, sua ação está relacionada a homeostasia do organismo e processos fisiológicos como a dor e inflamação. Possui três componentes principais: (a) Os receptores canabinoides; (b) os canabinoides endógenos, com seus dois exemplos mais bem descritos sendo a anandamida (*N-arachidonylethanolamine*, AEA) e a 2-araquidonilglicerol (2-AG), pequenos lipídeos derivados do ácido araquidônico; (c) e o aparato enzimático de degradação e síntese, com destaque para a amida hidrolase de ácido graxo (*Fatty acid amide hydrolase*, FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL) (MARZO, BIFULCO, PETROCELLIS, 2004; AGGARWAL, 2009; BRUSTON, WOODHAMS, 2014; JARVIS, RASSMUSSEN, WINTERS, 2017).

Quanto aos receptores, os dois subtipos mais estudados são os canabinoides do tipo 1 (CB1) e canabinoides do tipo 2 (CB2), dos quais são distintos tanto pelas sequências de

aminoácidos como pela ação e proporção na qual estão distribuídos nos diferentes tecidos. Os receptores CB1 encontram-se no cérebro, sistema cardiovascular, pulmões, músculos, trato gastrointestinal, sistema reprodutivo, fígado, medula óssea e pâncreas; enquanto os receptores CB2 prevalecem no sistema imune, ossos, baço, pele, fígado, medula óssea e pâncreas (PERTWEE, 1997; KHANOLKAR, PALMER, MAKRIYANNIS, 2000; HOWLETT, ABOOD, 2017, REZENDE, 2023).

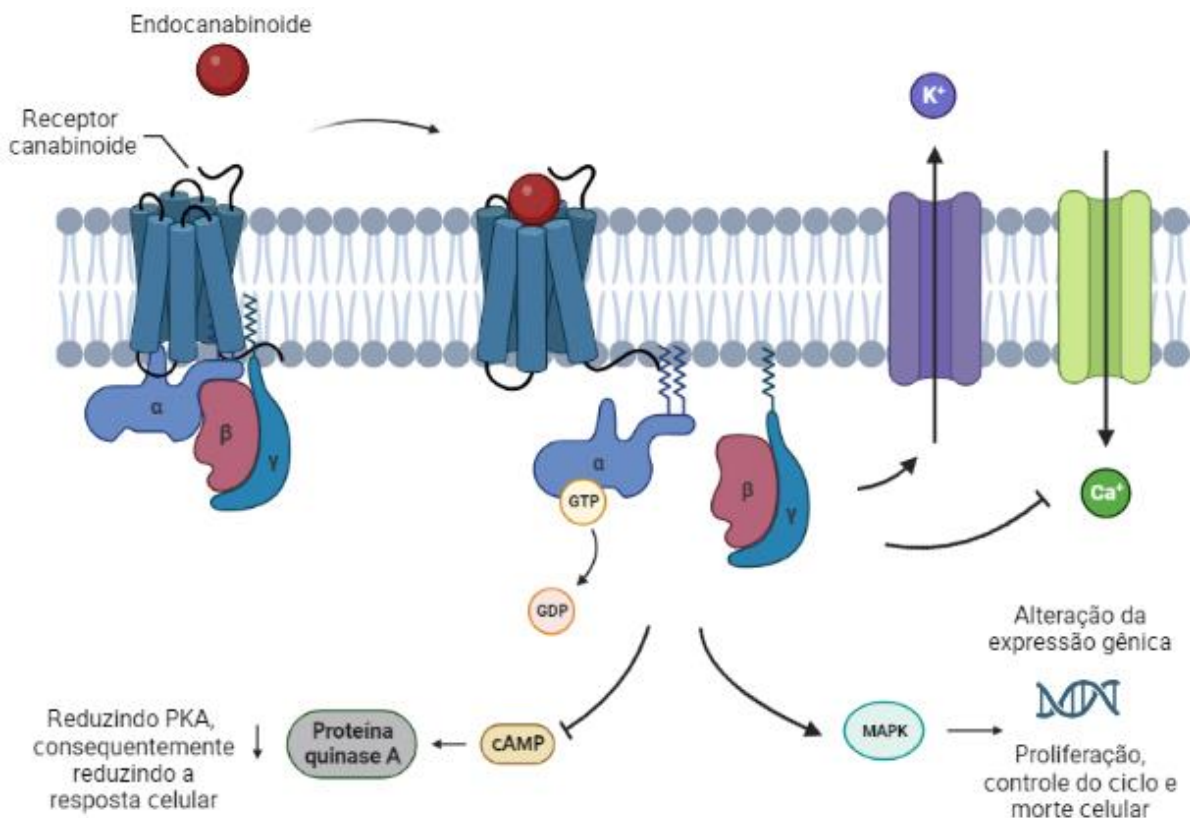
Ambos fazem parte da família de receptores acoplados ao complexo de proteínas G (*G protein-coupled receptors*, GPCR), geralmente encontrados na membrana plasmática. Esses receptores inibem a adenilato ciclase, diminuindo a disponibilidade de monofosfato cíclico de adenosina (*Cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) e de proteína quinase A (*Protein kinase A activity*, PKA), e, conseqüentemente, atuam na resposta celular (MCCARBERG; BARKIN, 2007; PERTWEE *et al.* 2010). Além disso, outros efeitos são o acúmulo de cálcio (Ca^{+}) intracelular (KANO *et al.*, 2009) e o estímulo a via de sinalização por proteínas quinase dependentes de mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), sendo este último, um mecanismo associado majoritariamente aos receptores CB1 (TURU; HUNYADY, 2010; ZOU; KUMAR, 2018).

O receptor CB1 foi clonado em 1990, inicialmente encontrado em ratos e somente depois foi descrito em tecidos humanos (MATSUDA *et al.*, 1990; GÉRARD *et al.*, 1990; GÉRARD *et al.*, 1991); é ativado pelo gene *CNR1*, sendo expressos principalmente nos neurônios, e em menor proporção nos astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (HERKENHAM *et al.*, 1991; TAO *et al.*, 2020).

Quanto ao receptor CB2, foi primeiramente clonado em 1993, em linhagem celular de leucemia promielocítica (HL-60) (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993); é expresso pelo gene *CNR2*, e sua sequência de aminoácidos possui cerca de 44% de homologia à sequência de CB1 (ZHANG *et al.*, 2015a); modulam analgesia e nocicepção, e ocorrem principalmente em células do sistema imune, como neutrófilos, eosinófilos, *natural killer*, linfócitos, mas podem ser encontrados em neurônios, microglia, macrófagos e em células endoteliais vasculares (RAJESH *et al.*, 2007; RAJESH, *et al.* 2008; CHIURCHIÙ, BATTISTINI, MACCARRONE, 2015; ZOU; KUMAR, 2018; LI *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação dos receptores é evidenciado na Figura 1:

Figura 1- Esquema da ação dos receptores canabinoides.



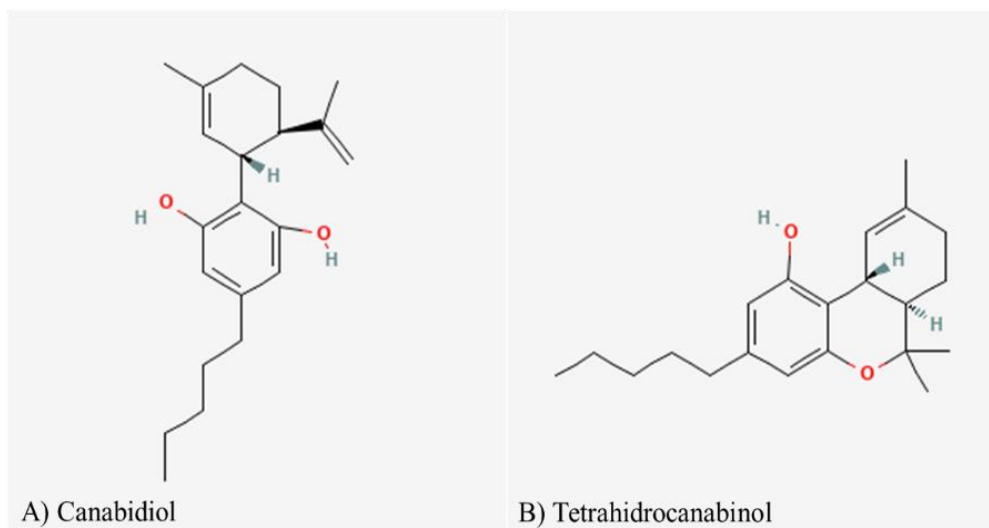
Subtítulo: Os receptores endógenos ou endocanabinoides (AEA e 2-AG), interagem com seus receptores (respectivamente, CB1 e CB2), acionando GPCR, o que acarreta no desprendimento das subunidades α de β/γ , desencadeando na inibição de cAMP, reduzindo a resposta celular pela redução de PKA. Esse mecanismo nos receptores CB1 associados ao sistema nervoso interrompe a liberação de neurotransmissores. O desprendimento da subunidade β/γ altera o balanço de canais iônicos, levando ao acúmulo de Ca^{2+} nas células. Além disso, essa cascata aciona a via MAPK, envolvida no controle de ciclo e morte celular. Fonte: ELABORADA PELA AUTORA, 2023.

Trabalhos sugerem a ação de moléculas do ECS em outros receptores além de CB1 e CB2, como em receptores vaniloides (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 e TRPM8) e em receptores metabotrópicos (GPR55, GPR3, GPR6, GPR12 e GPR19) (PETROCELLIS, 2011; MULLER, MORALES, REGGIO, 2019; YE, 2019; REZENDE, 2023). Recentemente foi proposto o termo endocanabinoidoma para abranger todo o conjunto de enzimas, proteínas e lipídios que estejam envolvidos na modulação do ECS (LEUTI *et al.*, 2020)

A *Cannabis* contém moléculas denominadas fitocanabinoides, essas possuem afinidade aos receptores do ECS. Dois desses fitocanabinoides mais amplamente descritos e estudados são o canabidiol (CBD) e o tetrahydrocannabinol (THC), sendo que o segundo possui propriedades psicoativas. O THC teve sua estrutura descoberta em 1964, sendo essencial na descoberta do ECS em razão da proposição de um receptor para essa molécula (MCCARBERG,

BARKIN, 2007; CRISTINO, BECKER, MARZO, 2014; REZENDE, 2023). Suas estruturas são representadas a seguir:

Figura 2- Representação da estrutura química do Canabidiol e Tetrahydrocannabinol.



Fonte: NCBI, 2023a; NCBI, 2023b.

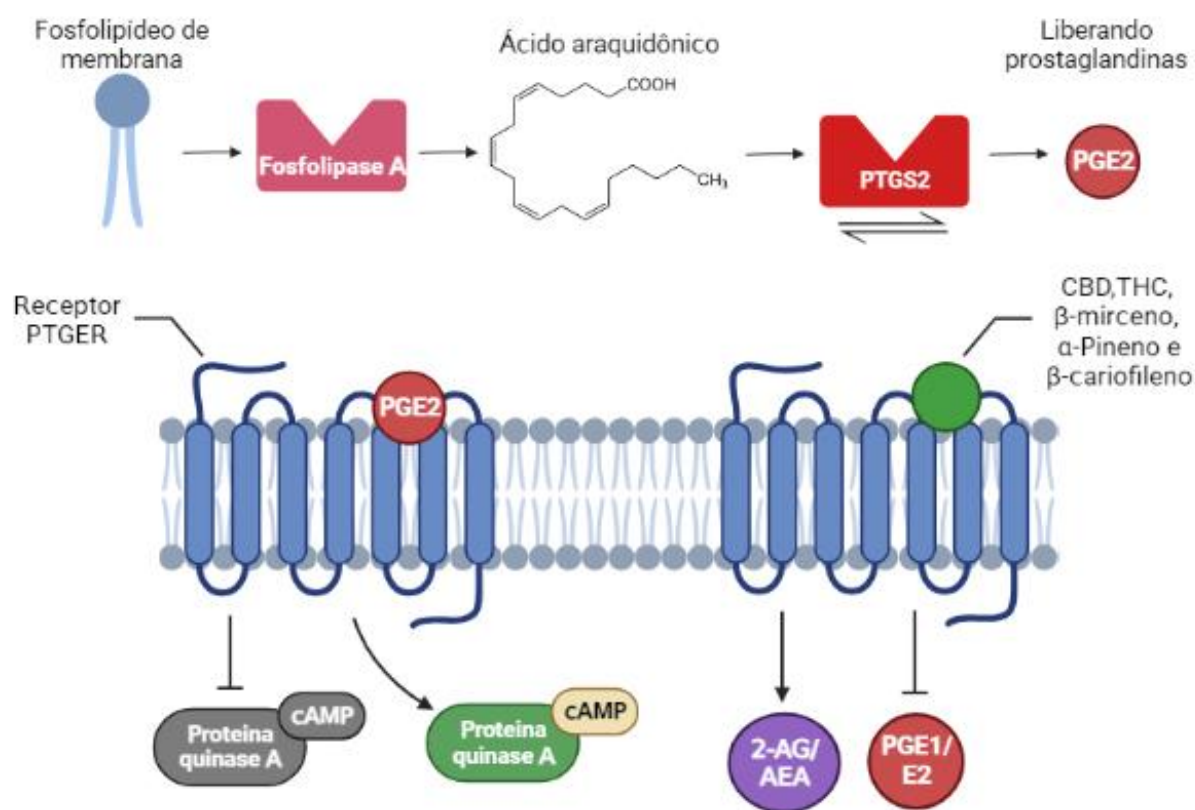
O potencial analgésico e anti-inflamatório da *Cannabis* é relatado, sendo essa a principal via de interesse deste trabalho. São descritos, na literatura, o papel da sinalização do receptor canabinoide como regulador da expressão gênica de células imunes (KLEIN *et al.*, 2003), e sua influência sobre adesão de leucócitos, ativação de mastócitos e no estresse oxidativo (ELIKKOTTIL, GUPTA, GUPTA, 2009; VINCENT *et al.*, 2016). E, apesar de necessária maior investigação, tem-se descoberto a relação entre ligantes do ECS com a via da ciclooxygenase-2 (*Prostaglandin-endoperoxide synthase*, PTGS2), sendo esta responsável por acionar uma cascata mediadora de processos inflamatórios (KOZAK *et al.*, 2002; FOWLER, 2007). As evidências da relação podem ser um dos pontos de partida para explorar a ação da *Cannabis* na inflamação.

1.4 PTGS2 e Sistema endocanabinoide

Como descrito anteriormente, os endocanabinoides atuam na regulação da resposta inflamatória. Sendo assim, este trabalho explorou sua relação com a via da PTGS2, anteriormente conhecida pela sigla COX-2. A PTGS2 é uma enzima oxidante da cascata do ácido araquidônico, sendo responsável por catalisar a produção de prostaglandinas (PG) culminando na liberação de citocinas (ZMIGRODZKA *et al.*, 2018; SCHAEUBLE *et al.*, 2019), sua ação ocorre pela interação de PG, principalmente prostaglandina E2 (PGE2), a

GPCRs específicos (*Prostaglandin E Receptor*, PTGER) (CALLAGHAN; HOUSTON, 2015). A PTGS2 reconhece endocanabinoides que contêm ácidos graxos poli-insaturados (LEUTI *et al.*, 2020). Em tratamentos com óleo de *Cannabis* do tipo *full spectrum* compostos como CBD, THC, e terpenos como β -mirceno, α -Pineno, β -cariofileno também atuam reduzindo PTGS2 (MAAYAH *et al.*, 2020). A interação entre PTGS2 e fitocanabinoides é demonstrada na Figura 3:

Figura 3- Fitocanabinoides e PTGS2.



Subtítulo: A via da PTGS2 faz parte da cascata do ácido araquidônico, onde fosfolípidios de membrana são clivados pela enzima Fosfolipase A, gerando ácido araquidônico que é posteriormente convertido pela enzima PTGS2 em prostaglandina H₂, essa pode formar diferentes isômeros, sendo PGE₂ a mais abundante. PGE₂ atua ligando-se a GPCRs específicos, e sua ação irá depender do receptor ao qual se ligou, podendo tanto diminuir como aumentar adenilato ciclase, bloqueando ou ativando PKA. Já os fitocanabinoides, interagem com seus GPCRs específicos, e afetam a PTGS2 pela inibição de PGE₁/E₂ e produção de endocanabinoides (AEA e 2-AG). Fonte: ELABORADA PELA AUTORA, 2023.

Na cascata iniciada pela PTGS2, entre os receptores específicos das prostaglandinas encontra-se PTGER₄ (NARUMIYA; FITZGERALD, 2001), regulador da expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs). As MMPs são uma família de enzimas, geralmente utilizadas como marcadores inflamatórios, em sua forma extracelular estão ligadas ao desencadeamento e regulação da inflamação ao ter ação proteolítica sobre citocinas e

quimiocinas inflamatórias (MANICONE; MCGUIRE, 2008). São reguladoras metabólicas e possuem capacidade de clivar lipoproteínas e receptores de lipoproteínas, as MMP-2 podem modular vias inflamatórias intracelulares e o metabolismo de lipídeos (FERNANDEZ-PATRON; KASSIRI; LEUNG, 2016). Enquanto as MMP-9 intracelulares podem atuar na imunidade inata e na inflamação mediada por receptor do tipo Toll 4 (ZHANG *et al.*, 2015b). Entre os exemplos de sua atuação, as MMP-2 e 9, demonstram potencial tanto em promover como reprimir a interleucina IL-1 β (ITO *et al.*, 1996); e MMP-9 processa o domínio N-terminal IL-8, produzindo uma molécula capaz de ser quimioatraente (STEEN *et al.*, 2000; STEEN *et al.*, 2003).

Além disso, MMP2 é descrita como moduladora de TNF- α . A TNF- α é uma citocina envolvida com ativação e expressão de MMPs, exercendo um papel de retroalimentação que mantém quadros inflamatórios (VU; WERB, 2000; MCQUIBBAN *et al.*, 2002). TNF- α foi utilizada em estudos *in vivo* como estímulo inflamatório em camundongos (HIDALGO *et al.*, 2009) e para análises da fisiopatologia da dor vaso-oclusiva decorrente do quadro inflamatório crônico da anemia falciforme (LI *et al.*, 2014).

Como exemplo do papel das citocinas no agravamento de doenças inflamatórias crônicas, o estudo de Domingos *et al.* (2020) demonstra os altos níveis de IL-6 e IL-8 em pacientes de anemia falciforme durante crise característica da doença; e a associação ao risco aumentado de desdobramentos como síndrome torácica aguda, osteonecrose e úlceras nas pernas; os autores argumentam sobre a semelhança com feridas crônicas causadas por diabetes e o papel das interleucinas, em que a resposta inflamatória persistente impede uma recuperação adequada. O trabalho de Sesti-Costa *et al.* (2021), encontrou níveis significativos das citocinas IL-6, IL-8 e MCP-1 em pacientes de anemia falciforme, e destaca que isso pode indicar a atuação dessas citocinas no recrutamento de monócitos e neutrófilos no processo inflamatório.

Portanto, é destacada a correlação entre os mediadores relacionados à cascata inflamatória e os mecanismos de atuação do ECS. Este trabalho se propõe a fazer essa análise verificando como o óleo da *Cannabis* atua sobre a expressão de genes e proteínas que fazem parte da cascata de inflamação, em linhagens celulares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes e proteínas relacionados a via inflamatória (PTGS2) mediante ação do óleo da *Cannabis in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

Verificar os seguintes aspectos nas linhagens celulares (HUVEC e K562) após o tratamento com o óleo de *Cannabis sativa*:

1. Morfologia celular;
2. Proliferação celular;
3. Viabilidade celular;
4. Apoptose;
5. Migração celular;
6. Análise de Interleucinas 1 beta (IL-1 β) e 8 (IL-8);
7. Expressão dos genes da via inflamatória (*PTGS2*, *MMP2* e *MMP9*) e receptores canabinoides (*CNR1* e *CNR2*);
8. Expressão das proteínas PTGS2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Linhagens celulares

A linhagem normal utilizada foi obtida da *American Tissue Cell Culture* (ATCC), sendo de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). Enquanto a linhagem leucêmica, células de leucemia mieloide crônica (K562), foram cedidas pela Prof^o Dr^a Nicola Conran da UNICAMP, com recomendação para utilização de outro meio de cultura que não o recomendado pela ATCC. As HUVEC são utilizadas como modelo em trabalhos sobre células endoteliais, de grande importância na biologia vascular, auxiliando na compreensão de interações moleculares e celulares (KOKURA, *et al.*, 1999; BURNS, DEPAOLA, 2015). Quanto a linhagem K562, foi obtida por meio de efusão pleural de uma paciente de 53 anos com Leucemia Mieloide Crônica (LMC) em 1975 (LOZZIO; LOZZIO, 1975), foram a primeira linhagem celular estabelecida de leucemia mieloide humana imortalizada (DREXLER, 2001).

3.1.2 Óleo de *Cannabis*

Foi utilizado o extrato de *Cannabis Sativa* L. *Full spectrum* (Grüne Labs), com concentração de 20mg/mL CBD para 10mg/mL de THC (2:1). O óleo *Full spectrum* contém todos os componentes da planta, sendo o CBD e THC em proporções conhecidas. A empresa Grüne Labs do Uruguai, cultiva e extrai óleo de *Cannabis* para fins medicinais, sendo estes produtos padronizados. O extrato é diluído em triglicerídeo de cadeia média (TCM), portanto, foi utilizado TCM nos ensaios como controle de veículo, aplicando nas amostras controle o mesmo volume que seria aplicado do óleo de *Cannabis*.

Nosso trabalho não utilizou métodos para diluição do óleo para aplicação nas células, apenas o aquecimento prévio junto ao meio de cultura, realizado em banho ultrassônico para diminuição das gotículas de óleo. QUSHAWY *et al.* (2022), aborda que a diminuição do tamanho das gotículas tem uma relação direta com a disponibilidade desses compostos em óleo. Estudos com ratos, cachorros e humanos demonstraram que formulações à base de óleo aumentam a biodisponibilidade na administração de CBD (POTSCHKA *et al.*, 2022). Além disso, TCM é conhecido como um lipídio de maior absorção, e tem sido testado e recomendado como veículo para medicamentos lipofílicos (RAMELLA *et al.*, 2020). Portanto, utilizamos essa estratégia para entender como a formulação com TCM atuaria.

O trabalho de Pagano *et al.* (2020), traz uma revisão sistemática de estudos em linhagens celulares tratadas com CBD em uma faixa de atuação entre 1-50 μM ; enquanto outros trabalhos utilizam essa concentração entre 10-100 μM para o THC (POWLES *et al.*, 2005; MILIAM *et al.*, 2020). Nosso trabalho utilizou como parâmetro para o cálculo das concentrações os dados do THC, verificando a ação do óleo entre 1-100 μM de THC por 4, 24, 48 e 72 horas nos testes iniciais e, posteriormente, escolheu-se o tempo de atuação e concentração estatisticamente significativa para os ensaios moleculares.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo e análise da morfologia celular

A linhagens celulares HUVEC e K562 foram semeadas, respectivamente, em meio MEM- *Minimum Essential Medium - Earle* (Cultilab) e DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium - High Glucose* (Nova Biotecnologia), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 1% antibiótico/antimicótico (Invitrogen), 1% L-glutamina (200 μM) (Sigma Aldrich) e 1% de aminoácidos não essenciais 10mM (Sigma Aldrich). As células foram cultivadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . Diariamente foi avaliada a morfologia e crescimento celular, em microscópio de contraste de fase *Olympus CKX41* (Olympus, JP). O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias, ou até atingir 80% de confluência. Quando alcançada alta densidade celular, as células aderentes eram submetidas à tripsinização e as sobrenadantes repicadas, para posterior subdivisão. Todos os ensaios foram realizados em três réplicas e em três eventos independentes.

3.2.2 Ensaio de proliferação

A partir da proliferação celular foi estimada a curva de crescimento. Para isso, as células foram cultivadas em placas de cultura de seis poços a uma densidade de 5×10^4 em 2 mL de meio completo por 24 horas. Após esse período, as células aderentes tiveram o meio substituído por outro sem SFB, para sincronização celular, fazendo com que todas as células estejam na mesma fase do ciclo celular. Após mais 24 horas, este meio foi substituído novamente por meio completo, com a adição do óleo de *Cannabis* nas concentrações 1, 10, 40 e 100 μM de THC. Enquanto nos ensaios com as células sobrenadantes eram submetidas a tratamento com óleo de *Cannabis* sem passar pela etapa de sincronização.

As linhagens foram analisadas e contadas em 4, 24, 48, 72 horas com auxílio do contador de células *Countess Automated Cell Counter II* (Life Technologies). Os dados obtidos foram

submetidos ao teste de análise de variância a dois critérios (ANOVA) e o teste de Dunnet's no *software* GraphPad Prism 8.0.1., com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.2.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi mensurada utilizando o reagente MTS – CellTiter 96 *Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (PROMEGA, USA), seguindo as normas do fabricante. As células foram tratadas com o óleo de *Cannabis* nas concentrações 1, 5, 10, 20, 40 e 100 μM de THC, por 4, 24, 48 e 72 horas, e então foram realizadas leituras após incubação de 3 horas com o MTS em estufa umidificada sob 37°C e CO₂ a 5%. As leituras foram realizadas em leitor de placas no comprimento de onda de 492 nm (*Thermo Plate, Tp-Reader Basic*).

Após a obtenção dos dados foi realizado o teste estatístico para a análise da viabilidade celular versus concentração. Os valores foram normalizados dividindo a absorbância obtida das células tratadas com o óleo de *Cannabis* (A) pelo valor das células tratadas com TCM (B), obtendo-se a porcentagem da viabilidade celular (C), sendo a equação final $C = A/B \times 100$.

Esse ensaio permitiu escolher o tempo (24 horas) e concentração de tratamento (10 μM) para os próximos ensaios. A significância estatística foi verificada pelo teste ANOVA e de Dunnet's, realizados no *software* GraphPad Prism 8.0.1., com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.2.4 Análise de Apoptose

Após serem tratadas por 24 horas a 10 μM de óleo de *Cannabis* as duas linhagens foram analisadas por citometria de fluxo (Guava *Easycyte*, MILLIPORE) para verificação da apoptose, sempre mantendo um controle TCM nos ensaios. As suspensões de células (1×10^6) foram tratadas com PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™, San Diego, USA), por 30 minutos, de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados os *softwares* Guava soft 3.3 e GraphPad Prism 8.0.1. para análise dos dados.

3.2.5 Ensaio de migração

O ensaio de migração foi realizado em placas de 24 poços com células cultivadas em uma concentração de 5×10^4 sobre câmaras bipartites *Transwell* (poros de 8 μm de diâmetro BD - Biosciences San Jose, CA, USA) com 200 μL de meio sem soro na parte superior junto às células e 500 μL de meio completo (10% SFB) na parte inferior.

Após 24 horas de tratamento a 10 μM de óleo de *Cannabis* as células foram fixadas com 500 μL de metanol por 10 minutos, coradas com 300 μL de Cristal Violeta por 30 minutos, e

então submetidas a três lavagens com 500 µL de PBS 1X por 20 minutos para retirada do cristal violeta excedente. Por fim, as células foram fotografadas com auxílio do microscópio de contraste de fase *Olympus CKX41* (Olympus, JP), para contagem das células no *software* Image J. Os *softwares* Image J e GraphPad Prism 8.0.1. foram utilizados para análise dos dados, sendo utilizado o teste t para análise estatística.

3.2.6 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O sobrenadante das células dos diferentes grupos experimentais foi recolhido ao longo dos outros ensaios realizados. Foi utilizado o conjunto de reagentes da BD OptEIA (Nº de cat. 550534), e seguido o protocolo do fabricante para citocinas IL-8 e IL-1 β . Foi realizada a preparação da placa de 96 poços, preparação dos padrões, e posterior aplicação de tampão de revestimento. Após, a análise foi realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os dados foram analisados pelo teste t no *software* GraphPad Prism 8.0.1.

3.2.7 Análise da expressão gênica

3.2.7.1 Extração de RNAs

Após o cultivo das células no tempo e concentração determinados, foi extraído o RNA total utilizando *TRIZol RNA Isolation Reagents* (ThermoFisher), seguindo instruções do fabricante. A quantificação do material foi realizada por espectrofotômetro no equipamento NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), além da avaliação da integridade pelas bandas ribossomais (18s e 28s) em gel de agarose 1%. Para síntese do cDNA utilizou-se *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com protocolo de acordo com o fabricante.

3.2.7.2 Genes escolhidos

A sequência dos genes estudados está descrita na Tabela 1. Sendo escolhidos genes atuantes da cascata inflamatória e genes dos receptores canabinoides.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na qPCR.

Genes	Sequência
<i>PTGS2</i> anti-sense	5'-AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG-3'
<i>PTGS2</i> sense	5'-ATTCCCTTCCTTCGAAATGC-3'
<i>MMP9</i> anti-sense	5'-ATTTGACTCTCCACGCATC-3'
<i>MMP9</i> sense	5'-TTGTGCTCTCCCTGGAGAC-3'
<i>CNR1</i> anti-sense	5'-AACCACGAGCAAAGGAGAGA-3'
<i>CNR1</i> sense	5'-CACCCAGCTCTGTCTTGGTA-3'
<i>CNR2</i> anti-sense	5'-CTGCATGCAAAGACCACACT-3'
<i>CNR2</i> sense	5'-ACCTGTTTCATTGGCAGCTTG-3'
<i>GAPDH</i> anti-sense	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
<i>GAPDH</i> sense	5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'

3.2.7.3 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

As reações para os genes da cascata inflamatória (*PTGS2*, *MMP9*) e receptores canabinoides (*CNR1* E *CNR2*) foram realizadas no termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações ocorreram em triplicatas, inclusive para o controle endógeno Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). As amostras foram processadas após a confecção do cDNA para que um volume final de reação de 20uL contivesse 20 ng; nessa reação adicionou-se SYBR® *Green PCR Master Mix* e 100 nM de cada *primer*, segundo protocolo da empresa fabricante. Os valores obtidos foram normalizados com base na quantificação da amostra controle (gene endógeno) pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, para os cálculos de análise comparativa (Pfaffl, 2001).

3.2.8 Análise da expressão proteica

3.2.8.1 Extração e quantificação de proteínas

As células foram cultivadas em placas de seis poços em uma densidade de 5×10^5 em 1 mL de meio com 10% de SFB; após 24 horas o meio foi substituído por meio sem SFB. No dia seguinte foi colocado o meio completo com tratamento e aguardou-se 24 horas para prosseguir com a extração.

Após o tempo de tratamento as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (*Phosphate buffer saline*, PBS) gelado e posteriormente aplicado o reagente radioimunoprecipitação (RIPA) pH 7.4 (Sigma cod R0278), 1,5 µl de inibidor de protease (Sigma cod P8340), e 1 µl de inibidor de fosfatase (Sigma cod 450243). Posteriormente, as células foram ressuspensas utilizando-se agulha de 0,45µm x 13 mm com seringa de 5 mL; o experimento é realizado mantendo as células em gelo. Após ressuspensas, as células foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 8000 força centrífuga relativa (*Relative centrifugal force*, RCF). O sobrenadante foi então transferido para novos microtubos de 1,5 mL e mantidos no freezer -80°C. A quantificação dessas amostras foi realizada com *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), e seguidas as instruções conforme o fabricante.

3.2.8.2 Western Blotting

Seguindo os valores das quantificações, as amostras lisadas foram diluídas em água ultrapura para que se obtivesse uma concentração final de 30µg de proteínas por amostra. Adicionou-se 4 µl de β-mercapto (Sigma cod M6250) e 2 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% a cada amostra diluída, e todas foram submetidas à fervura no banho a seco a 100°C por cinco minutos. Essas proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, seguindo protocolo *Mini PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad, Hercules, USA), e logo após transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, USA). Essas membranas passaram por uma etapa de bloqueio com 5% de leite em pó diluído em Solução Salina Tamponada com Tris com TWEEN 20 (*Tris-Buffered Saline with Tween 20*, TBS-T) (Bio-Rad Reagent, Hercules, USA), e permaneceram por 12 horas em temperatura ambiente sob agitação.

Posteriormente, as membranas foram submetidas a uma nova etapa de bloqueio com o anticorpo anti-PTGS2 primário (1:500 µl Abcam, Cambridge, UK), e ficaram incubadas *overnight*. No dia seguinte, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG conjugado com peroxidase *horseradish* (HRP) (1:1000 µl Abcam, Cambridge, UK). Concomitantemente foi detectada a β-actina como controle de reação, com anticorpo monoclonal anti-IgG (1:200 Abcam, Cambridge, MA, USA). A visualização da reação foi feita em filme fotográfico *Hyperfilm* (Amersham, Little Chalfont, UK) por meio da aplicação do kit quimioluminescente ECL (*enhanced chemiluminescence*) (Bio Rad, Hercules, USA). A densitometria quantitativa dos níveis das proteínas foi realizada por meio do *software ImageJ*. O nível da expressão das proteínas obtido foi analisado no *software* GraphPad Prism 8.0.1., realizando Teste T para análise de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Sobre os modelos escolhidos para esse trabalho, foi observado em células HUVEC uma interação com células do sistema imune, no qual foi verificado que fatores de transcrição regulam a expressão de células de adesão e que essas expressam receptores CB2 (Bevilacqua *et al.*, 2015). Além disso, a superexpressão de CB2 em HUVEC, após tratadas com N-Oleoylethanolamide (OEA), foi relacionada ao efeito anti-inflamatório desse composto, suprimindo as citocinas IL-6, IL-8 (Xu *et al.*, 2016).

Quanto à K562, é uma linhagem que apresenta plasticidade, sendo possível a diferenciação com a utilização de agentes químicos, diferenciando-se em células eritroides, capazes de produzir hemoglobina fetal (HbF), e comportamento semelhante ao de células talassêmicas (TSIFTSOGLU; PAPPAS; VIZIRIANAKIS, 2003), sendo um modelo ideal em estudos de linhagens eritroides *in vitro* (KAWASAKI *et al.*, 1996); foi verificado modulação CB1 e CB2 pela ação de moléculas agonistas e antagonistas desses receptores, com diminuição da proliferação celular, redução da invasividade, e diminuição da expressão de MMP-2 e MMP-9 (GHOLIZADEH *et al.*, 2019), marcadores importantes do processo inflamatório.

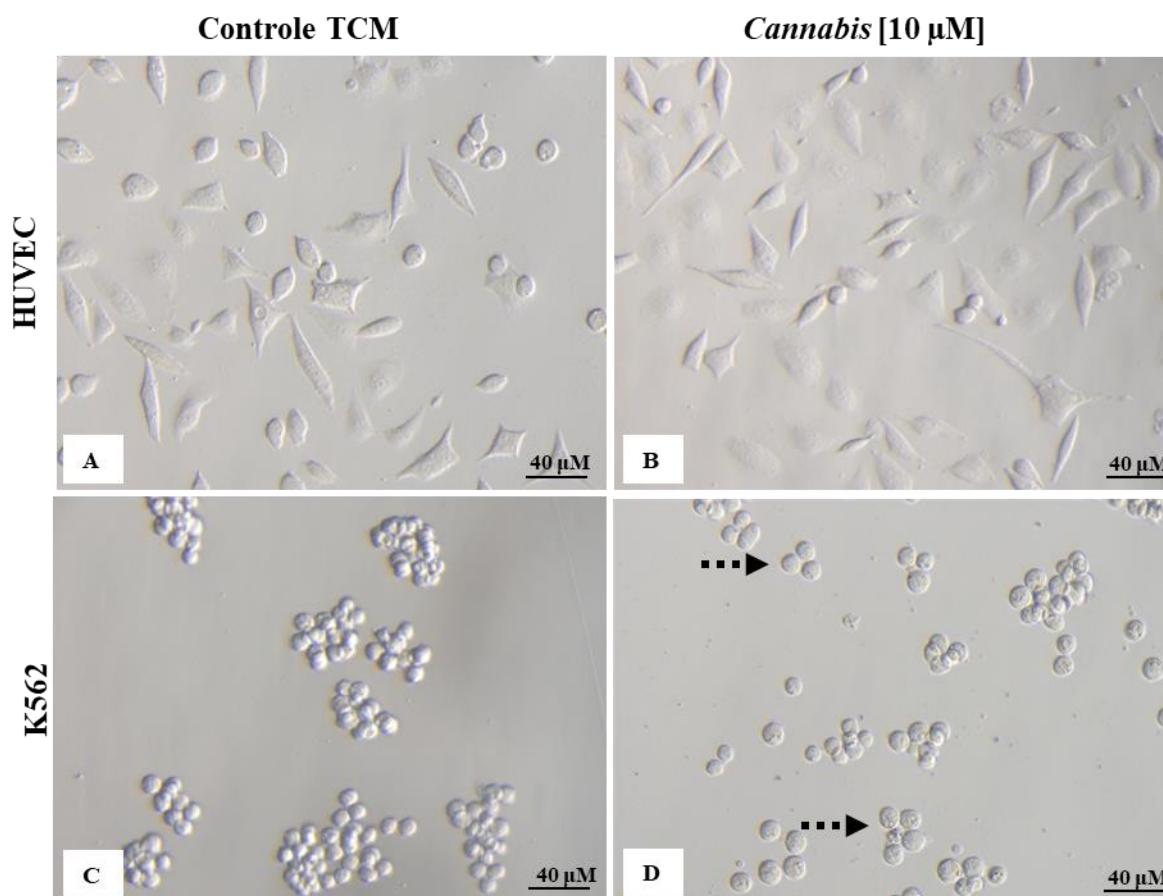
Nos próximos tópicos discutiremos como essas linhagens responderam frente ao tratamento com óleo *full spectrum* de *Cannabis sativa* e quais foram os resultados celulares, além das análises moleculares para os marcadores inflamatórios e receptores canabinoides.

4.1 Morfologia, proliferação, e viabilidade celular

Na análise morfológica de HUVEC, não houve alteração nos tempos de 4 e 24 horas de tratamento. As células mantiveram-se fusiformes, irregulares, com prolongamentos citoplasmáticos característicos e núcleo arredondado central (JAFFE, 1973; MEDINA-LEYTE *et al.*, 2020). Entretanto, nos tempos de 48 e 72 horas, não foi estabelecida a monocamada de células poligonais como esperado para este tempo de cultivo, provavelmente, em decorrência da diminuição do número de células, alterando o ritmo de crescimento (JAFFE, 1973; MEDINA-LEYTE *et al.*, 2020).

Para a linhagem K562, foi observado que a partir de 24 horas de tratamento as células encontravam-se agregadas em menor proporção do que o grupo controle. Essas células apresentam-se arredondadas e lisas, podendo conter microvilosidades semelhantes a células leucêmicas indiferenciadas, a conexão entre as células faz parte de sua morfologia, sendo a separação das células circundantes uma alteração morfológica (GUO *et al.*, 2022). Conforme ilustra a Figura 4:

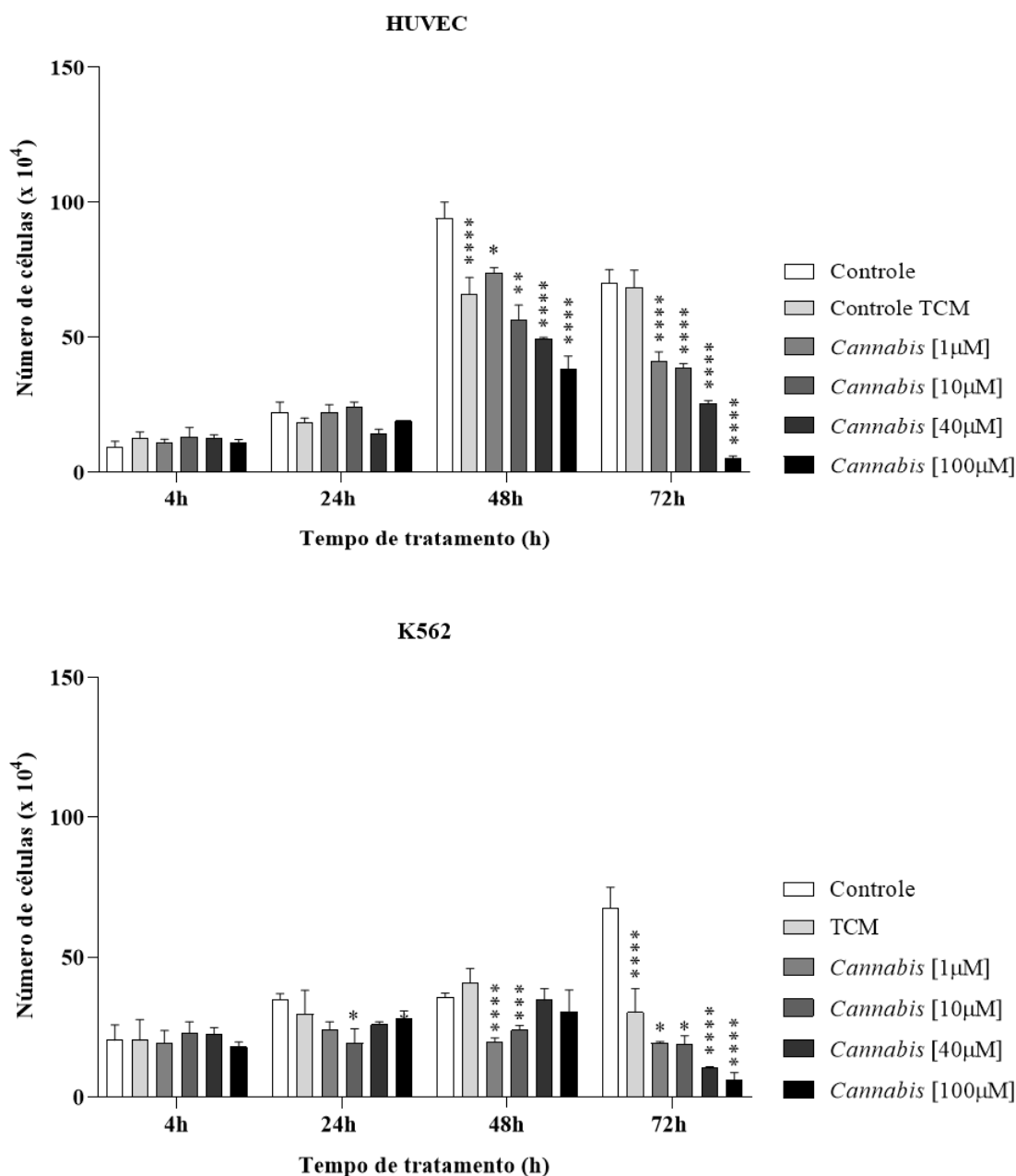
Figura 4- Fotomicrografia de morfologia celular de HUVEC e K562.



Subtítulo: Fotomicrografia da morfologia das linhagens celulares HUVEC e K562 após 24h de tratamento com controle (TCM) e *Cannabis*[10μM]. O tratamento não altera a morfologia de HUVEC, mas induz a desagregação em maior proporção nas células K562 tratadas do que nas células controle. Ponta da seta: células K562 desagregadas. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2023.

Quanto à proliferação, não houve mudança significativa em quatro horas de tratamento, porém, nos tempos de 48 e 72 horas houve redução do crescimento celular dependente da concentração, principalmente na HUVEC. Enquanto para os tratamentos no tempo de 24 horas, não houve diminuição da proliferação da HUVEC, mas foi verificada a diminuição significativa a 10 μM de THC, para K562. A Figura 5 ilustra os resultados observados:

Figura 5- Gráfico de proliferação celular das linhagens HUVEC e K562.



Subtítulo: Gráfico representativo da proliferação celular após tratamento com óleo de *Cannabis* nas concentrações de 1, 10, 40 e 100 μM por 4, 24, 48 e 72 horas de tratamento. *vs controle, $p < 0,05$, **vs controle, $p < 0,01$, ***vs controle, $p < 0,001$, ****vs controle, $p < 0,00017$. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2023.

Na literatura têm sido relatadas alterações morfológicas após tratamento com agonista e agonista inverso, porém em outras linhagens, como por exemplo em células de glioblastoma (LN229 e U-138) que foi verificada essa alteração via CB1 e CB2 (HOHMANN *et al.*, 2019). Mas nossos resultados de proliferação celular corroboram com a hipótese levantada em outros trabalhos sobre a diminuição desse crescimento celular por ação de compostos da *Cannabis*.

No estudo de García-Morales *et al.* (2020), verificou-se mudanças morfológicas pós tratamento com CBD nas células 6D (linhagem de câncer de mama MCF-7, com indução de fenótipo maligno), foi demonstrado a reversão da transição epitelial-mesenquimal, levando a reprogramação das células 6D, os autores discutem o caráter seletivo dessa ação e a redução de características de malignidade após o tratamento; além disso, nos resultados de proliferação foi encontrado que, 10 μ M CBD reduziu a proliferação das células 6D, mas não reduziu significativamente de MCF-7, enquanto a 20 μ M ambas sofreram redução. No trabalho de Shrivastava *et al.* (2011), após o tratamento com CBD houve uma ação seletiva em células agressivas de câncer de mama (MDA-MB-231), sem exercer efeitos sobre a linhagem de células normais (MCF-10A).

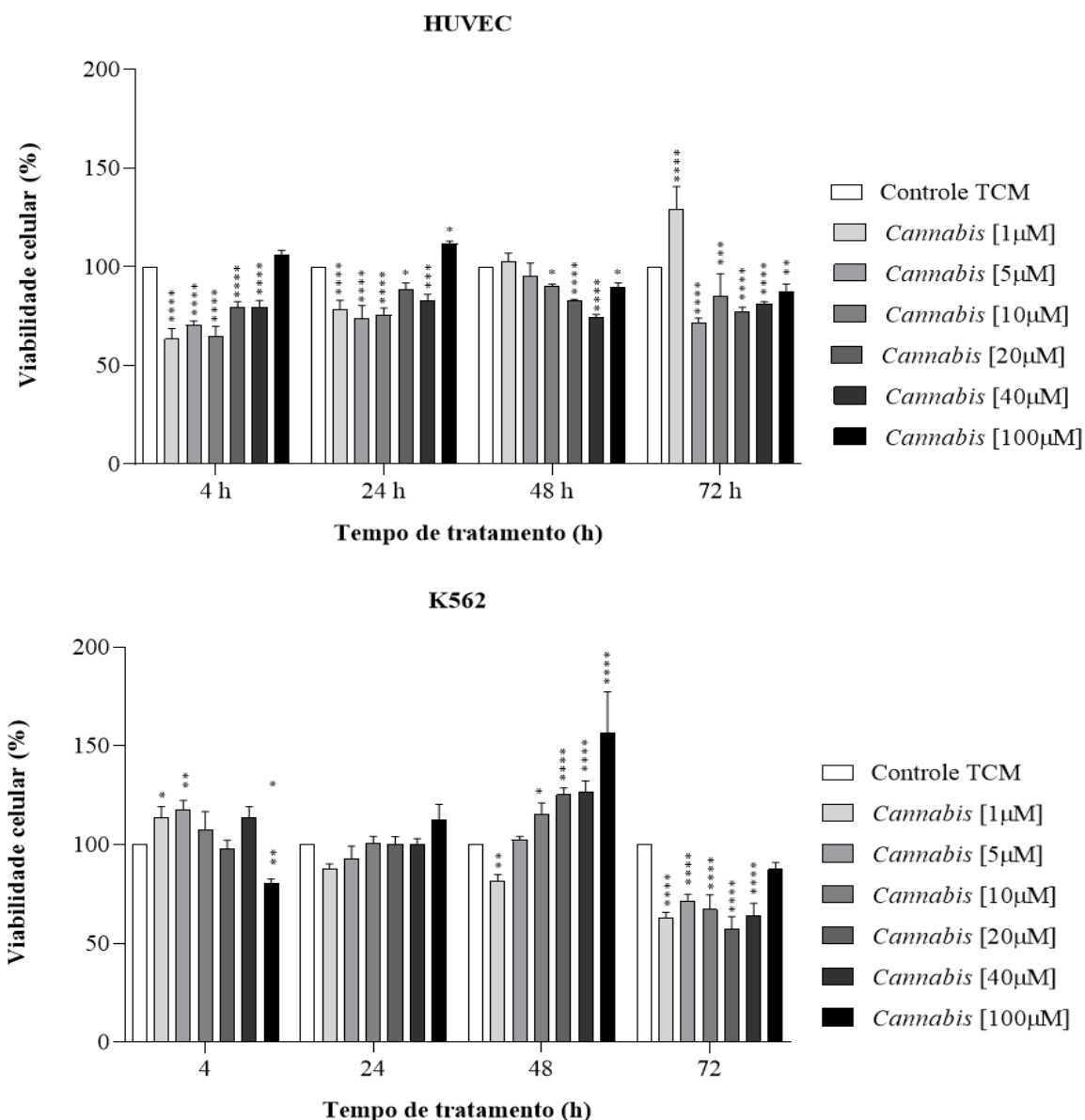
Outros resultados semelhantes de proliferação celulares foram estudos desenvolvidos em linhagens de câncer de pulmão (A549, H460 e H1792), nas quais foi encontrado ação antiproliferativa numa relação dose-dependente de CBD e THC, tanto isolados como em combinação, numa proporção de 1:1 (MILIAN *et al.*, 2020).

Entretanto, Sainz-Cort, Müller-Sánchez & Espel (2020), abordam que baixas concentrações de CBD ($> 4 \mu$ M) são capazes de induzir a proliferação, mas tratamentos de 10 μ M de CBD em células de câncer de cólon humano (HT-29) reduzem a proliferação celular, para células tratadas com baixa concentração de SFB (0,5%). Em células Jurkat (Leucemia de células T) e MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) concentrações maiores do que 2,5 μ M de CBD em 24 horas de tratamento reduziram o número de células (MCKALLIP *et al.*, 2006).

Portanto, o ensaio de proliferação por curva de crescimento foi utilizado para decidir qual a concentração e tempo de tratamento seriam os ideais para os ensaios posteriores, foi demonstrado que para HUVEC o óleo não reduz a proliferação em uma concentração de 10 μ M de THC por 24 horas, mas reduziu a proliferação em K562 na mesma concentração. Sendo este o parâmetro utilizado por não afetar a linhagem normal mas exercer ação sobre a K562. Além disso, o trabalho de revisão de Pagano *et al.* (2020) evidencia que a maior parte dos estudos *in vitro* têm obtido resultados avaliando o tratamento no tempo de 24 horas.

Para a análise da viabilidade pelo ensaio de MTS, observou-se que o tratamento reduziu a viabilidade celular, mas não atingiu 50%. Para a célula HUVEC houve uma redução de viabilidade após 4 horas de tratamento, mas para a célula K652 apenas após 72 horas de exposição ao óleo é que foi observada uma diminuição significativa. Os resultados da viabilidade com MTS estão destacados na Figura 6:

Figura 6- Gráfico do ensaio de viabilidade celular das linhagens HUVEC e K562.



Subtítulo: As células foram tratadas com 1, 5, 10, 20, 40 e 100 µM de óleo de *Cannabis* em 4, 24, 48 e 72 horas de tratamento. *vs controle, $p < 0,05$, **vs controle, $p < 0,01$, ***vs controle, $p < 0,001$, ****vs controle, $p < 0,00017$.
 Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2023.

Os gráficos demonstram que, após 48 horas de tratamento foi observado um aumento significativo na viabilidade celular na linhagem K562, esse comportamento não condiz com a observação visual dos poços no momento do experimento, em que houve uma diminuição no número de células dependente da concentração. Há relatos na literatura quanto à interação entre o MTS e o tratamento aplicado nas células. É provável que para um composto oleoso esse método colorimétrico de análise do metabolismo celular não seja o ideal. Wang, Henning & Heber (2010), encontraram que para avaliação *in vitro* de polifenóis do chá verde o ensaio trouxe valores subestimados de viabilidade e apontam como avaliações de viabilidade e proliferação celular devem levar em consideração a natureza química do composto estudado.

Ghasemi et al (2021), realizaram ensaios com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide), em que foi visto o aumento da densidade óptica no leitor que não refletia o número de células do plaqueamento, e concluem que a concentração do MTT, tempo de incubação, meio de cultura e número de células são variáveis que podem alterar a leitura dos valores.

Em ensaios de citotoxicidade na linhagem K562, utilizando WIN 55212-2 (agonista de CB1/CB2) e AM251 (antagonista de CB1), evidenciou-se que WIN 55212-2 reduziu a viabilidade celular, enquanto AM251 foi menos efetivo (GHOLIZADEH *et al.*, 2019). Na linhagem BeWo (coriocarcinoma), todos os canabinoides sintéticos (JWH-018, JWH-122, UR-144) diminuíram a viabilidade celular, entretanto, para o THC isso foi observado apenas nas maiores concentrações (15µM) (ALMADA *et al.*, 2020). Em linhagens de melanoma (SK-MEL 28, A375, FM55P e FM55M2), CBD reduziu a viabilidade em concentrações entre 3-10µM, inclusive na linhagem HaCat, linhagem não tumorigênica (MARZEDA *et al.*, 2022).

Esses resultados demonstram a variação ampla de redução de proliferação e viabilidade a depender do tipo de célula, principalmente relacionado ao nível de malignidade dessa célula; além disso, outro ponto crucial, é trazer evidências para a lacuna existente quanto ao entendimento de como os compostos da *Cannabis* atuam em conjunto, sendo maior parte dos dados disponíveis com ensaios realizados com os compostos isolados ou sintéticos.

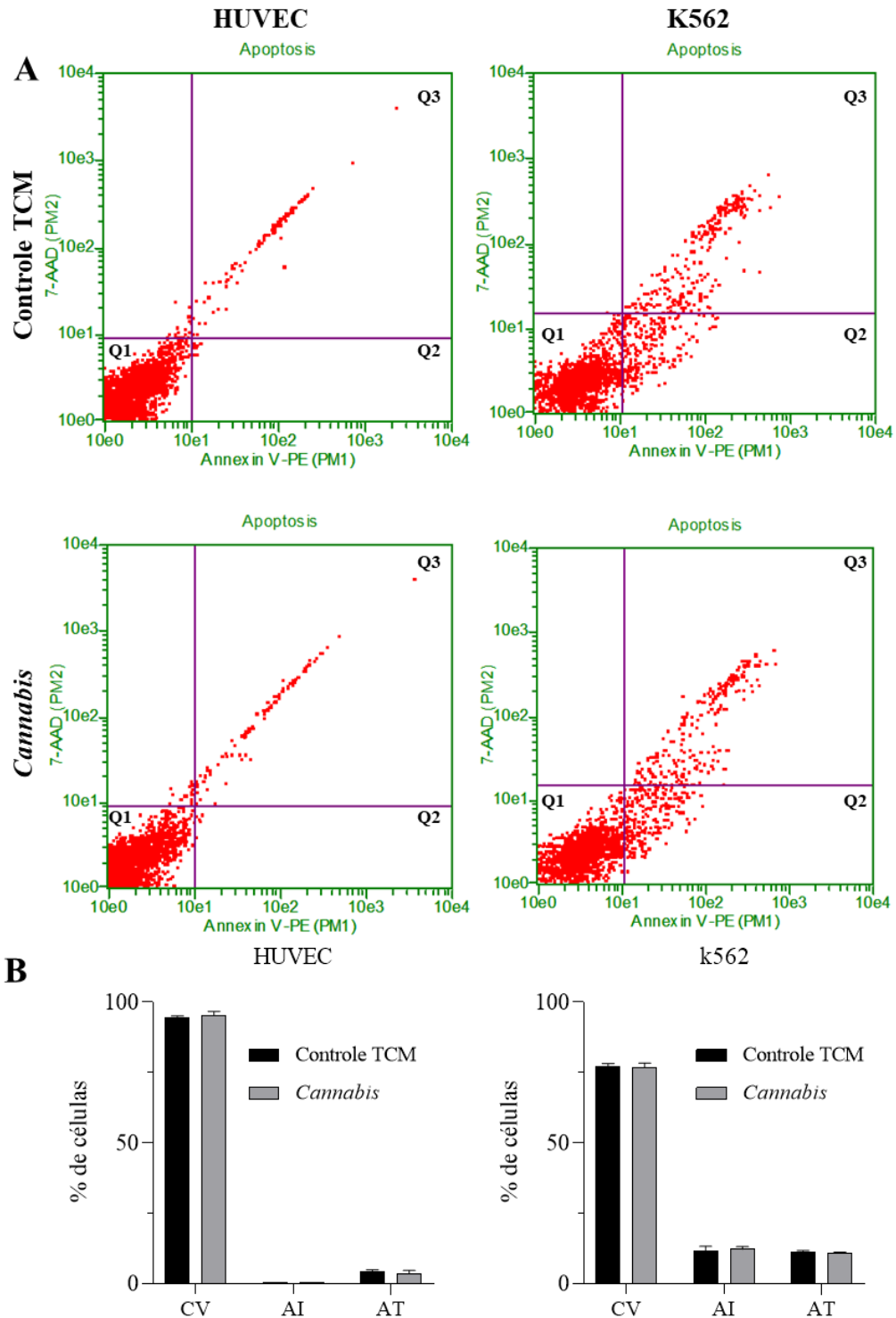
Maayah *et al.* (2020), citam que em razão do possível efeito sinérgico proporcionado por óleos do tipo *full-spectrum*, são necessários estudos que avaliem esse potencial biológico. Poucos trabalhos abordam os efeitos do óleo *full spectrum* por se tratar de uma preparação relativamente recente, mas são trazidas cada vez mais evidências dos benefícios dos compostos quando utilizados em uma formulação que traga esses componentes como um todo ao invés daquelas em que há somente parte deles (VANDOLAH *et al.*, 2019).

Outro fator é a variação da resposta em razão da proporção em que esses componentes se encontram, estudos apontam que variedades de *Cannabis* com baixo teor de THC e alto teor de CBD apresentam redução de efeitos adversos quando comparadas aquelas em que há altas concentrações de THC (DI FORTI *et al.*, VOLKOW *et al.*; 2016)

4.2 Ensaio de Apoptose

As células foram incubadas com Anexina V-PE e 7-AAD, e então realizada a leitura da fluorescência em citometria de fluxo. Não foi encontrada diferença significativa entre células controle e tratadas para ambas as linhagens, representado nos *dot plots* e gráficos da Figura 7:

Figura 7- Gráficos da análise de morte celular apoptótica.



Subtítulo: **(A)** Gráfico representativo de morte celular apoptótica comparando controle TCM e *Cannabis* [10 μ M]. Os quadrantes em que há marcação V-PE (-) e 7-AAD (-) representam as células viáveis (Q1), V-PE (+) e 7-AAD (-) apoptose inicial (Q2), enquanto V-PE (+) e 7-AAD (+) demonstram apoptose tardia/necrose (Q3). **(B)** Gráfico com a % de células nas fases viável, apoptose inicial ou tardia, nos grupos controle e tratados. Células viáveis (CV), Apoptose inicial (AI), Apoptose tardia (AT). Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2023.

É relatado na literatura componentes da *Cannabis* levando células a apoptose. Por meio do método TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), foi

demonstrado que células Jurkat e MOLT-4 tratadas com 2,5 uM de CBD entraram em apoptose, acionando a via das caspases (MCKALLIP *et al.*, 2006; SALEEMI, 2022). Canabinoides podem ativar mecanismos de morte programada e bloqueio do crescimento celular, modulando autofagia e angiogênese. Trabalhos com fármacos derivados de CBD como PM-49 e HU-331 acionaram vias de morte celular, com PM-49 tendo efeitos pró-apoptóticos interagindo com receptor CB1, gerando estresse oxidativo (KOGAN *et al.*, 2006; KOGAN *et al.* 2007; MORALES *et al.*, 2013; BADOLATO *et al.*, 2019; IRRERA *et al.*, 2021).

Entretanto, a indução a apoptose apresenta um comportamento que pode estar intimamente relacionado a qual dos receptores o tratamento é direcionado. Os efeitos do estímulo ao receptor CB1 são diferentes de quando o estímulo é direcionado ao receptor CB2 e, trabalhos demonstram que houve a diminuição de macrófagos acumulados em lesões e redução de apoptose quando estimulado via CB2 (RAJESH, et al 2007; RAJESH, et al 2008; PACHER; STEFFENS, 2009).

Nossos resultados não apresentaram indução a apoptose em nenhuma das linhagens, mesmo este sendo um mecanismo amplamente descrito para alguns compostos da *Cannabis*, sintéticos ou isolados, a discussão da nossa hipótese acerca desses resultados é melhor elaborada junto aos dados de expressão gênica.

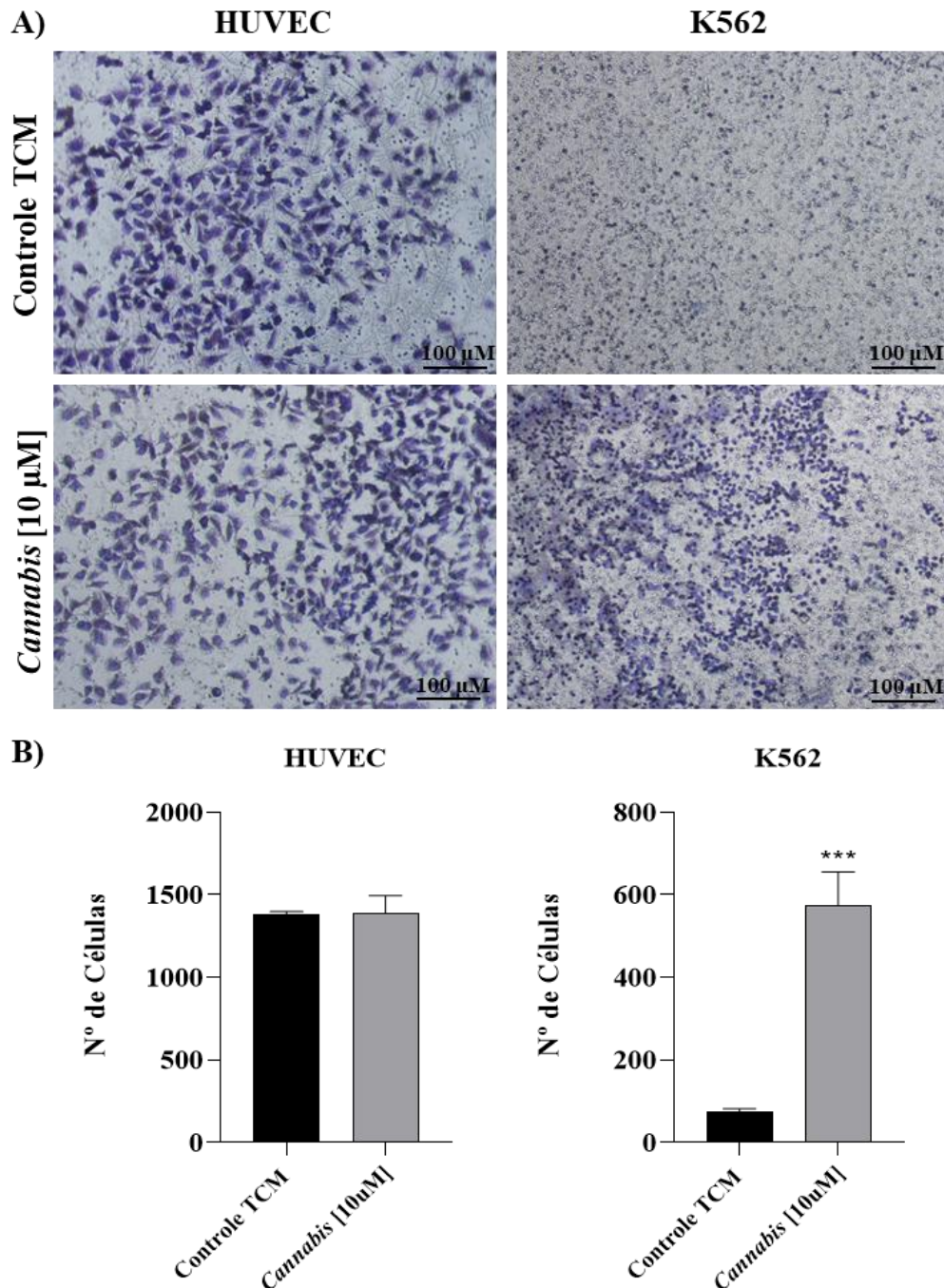
4.3 Ensaio de migração

Nos tecidos periféricos do sistema imune o ECS está envolvido na regulação da migração celular (IBSEN; CONNOR; GLASS, 2017). Foi demonstrado *in vitro* que AEA inibe a migração induzida pela quimocina fator 1 derivado de células estromais (*Stromal cell-derived factor*, SDF-1) de células T CD8⁺ (JOSEPH *et al.*, 2004); contudo, 2-AG induz a migração dependente de CB2 na linhagem KHYG-1 (células *natural killer*) (KISHIMOTO, 2005). Em conjunto 2-AG e AEA suprimem a migração de neutrófilos (RAHAMAN; GANGULY, 2021).

No desenvolvimento do câncer a invasão de diferentes tecidos é um dos processos envolvidos no crescimento tumoral e metástase. Nesse sentido, trabalhos demonstram a diminuição da migração em células de carcinoma escamoso de cabeça escamoso HPV⁺ com receptores canabinoides inibidos ou *knockdown* (GALVE-ROPERH *et al.*, 2002), enquanto na mesma linhagem a ativação de CB1 e CB2 aumenta a migração celular por ativação da via MAPK-p38 (LIU *et al.*, 2020).

No ensaio de migração celular não houve diferença significativa entre as células tratadas e controle para a linhagem celular HUVEC, enquanto para as células K562 houve aumento da migração celular nos tratamentos com óleo de *Cannabis* a 10 μ M, apresentados na Figura 8:

Figura 8- Ensaio de Migração celular *Transwell* HUVEC e K562.



Subtítulo: Fotomicrografias e gráficos de migração celular de HUVEC e K562. **A)** Fotomicrografias de migração das células HUVEC e K562 na câmara inferior do *transwell*, após 24 de tratamento comparando controle TCM e *Cannabis* [10 μ M]. **B)** Gráfico representativo do número de células que sofreram migração celular comparando controle TCM e *Cannabis* [10 μ M]. ***vs controle, p<0,001. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2023.

Os receptores CB1 e CB2 tem demonstrado correlação direta no aumento ou redução da invasividade em diferentes tipos de câncer (ENDSLEY et al, 2007; FREIMUTH, RAMER, HINZ, 2010; XIAN et al, 2010). Em estudo com agonista de CB1/CB2 (WIN 55212-2) foi relatada a diminuição da invasividade das células K562, porém, ao serem tratadas com antagonista seletivo de CB1 (AM251) houve aumento da invasividade; essas células foram analisadas quanto a expressão proteica de MMP2 e MMP9, para os tratamentos com WIN 55212-2 foi observado a redução das MMPs, enquanto para as células que receberam AM251 houve aumento de MMP2 e MMP9 (GHOLIZADEH *et al.*, 2019). O aumento da invasividade após tratamento com AM251 também foi relatado em células de câncer de mama (MDA-MB-231), acompanhada da expressão elevada de PTGS2 (FARSANDAJ; GHAHREMANI; OSTAD, 2012).

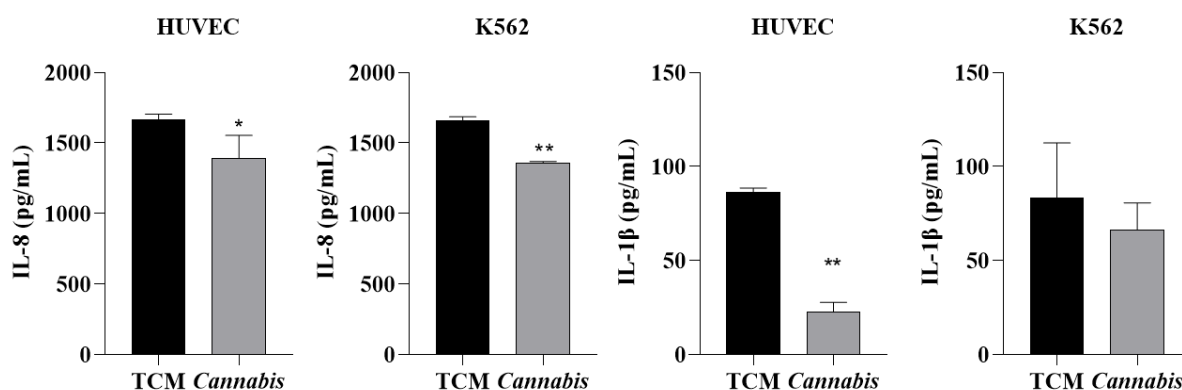
Sendo assim, além do papel de regulação da migração de células do sistema imune exercido pelo ECS, existe sua atuação na migração e invasão de células de câncer, sendo um mecanismo diretamente envolvido e regulado pelos receptores canabinoides e com papel de modificação dos níveis de marcadores inflamatórios como MMPs e PTGS2. Nosso resultado demonstrou o aumento da migração da linhagem cancerosa tratada com o óleo de *Cannabis*.

4.4 Ensaio colorimétrico ELISA

As interleucinas compreendem uma família de proteínas expressas e secretadas por diferentes tipos celulares. A IL-8 atua via GPCR's, podendo ativar MAPK e promover além de sobrevivência e proliferação, o processo inflamatório. O acionamento dessa via tem como consequência a expressão de moléculas de adesão, entre elas a integrina Mac-1 (TAKAMI; TERRY; PETRUZZELLI, 2002; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). A família IL-1 possui papel fundamental na regulação da inflamação, sendo a IL-1 β uma das mais importantes, atuando como sinalizador pró-inflamatório, diretamente envolvido no aumento da expressão gênica e secreção de PTGS2. Além disso, seu aumento induz a expressão de moléculas de adesão e maior recrutamento de células inflamatórias (DINARELLO, 2009; TURNER *et al*, 2014).

Para análise de citocinas foram avaliados os níveis de secreção de IL-8 e IL-1 β . Quanto à IL-8, houve redução significativa para ambas as linhagens, com maior destaque na K562. Para secreção de IL-1 β houve redução apenas para HUVEC. Demonstrado na Figura 9:

Figura 9- Gráficos do ensaio colorimétrico ELISA das células HUVEC e K562.



Subtítulo: Gráfico representativo do ensaio colorimétrico ELISA para análise das citocinas IL-8 e IL-1β secretada por HUVEC e K562, após 24 horas de tratamento comparando controle TCM e Cannabis [10μM]. *vs controle, $p < 0,05$, **vs controle, $p < 0,01$. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2023.

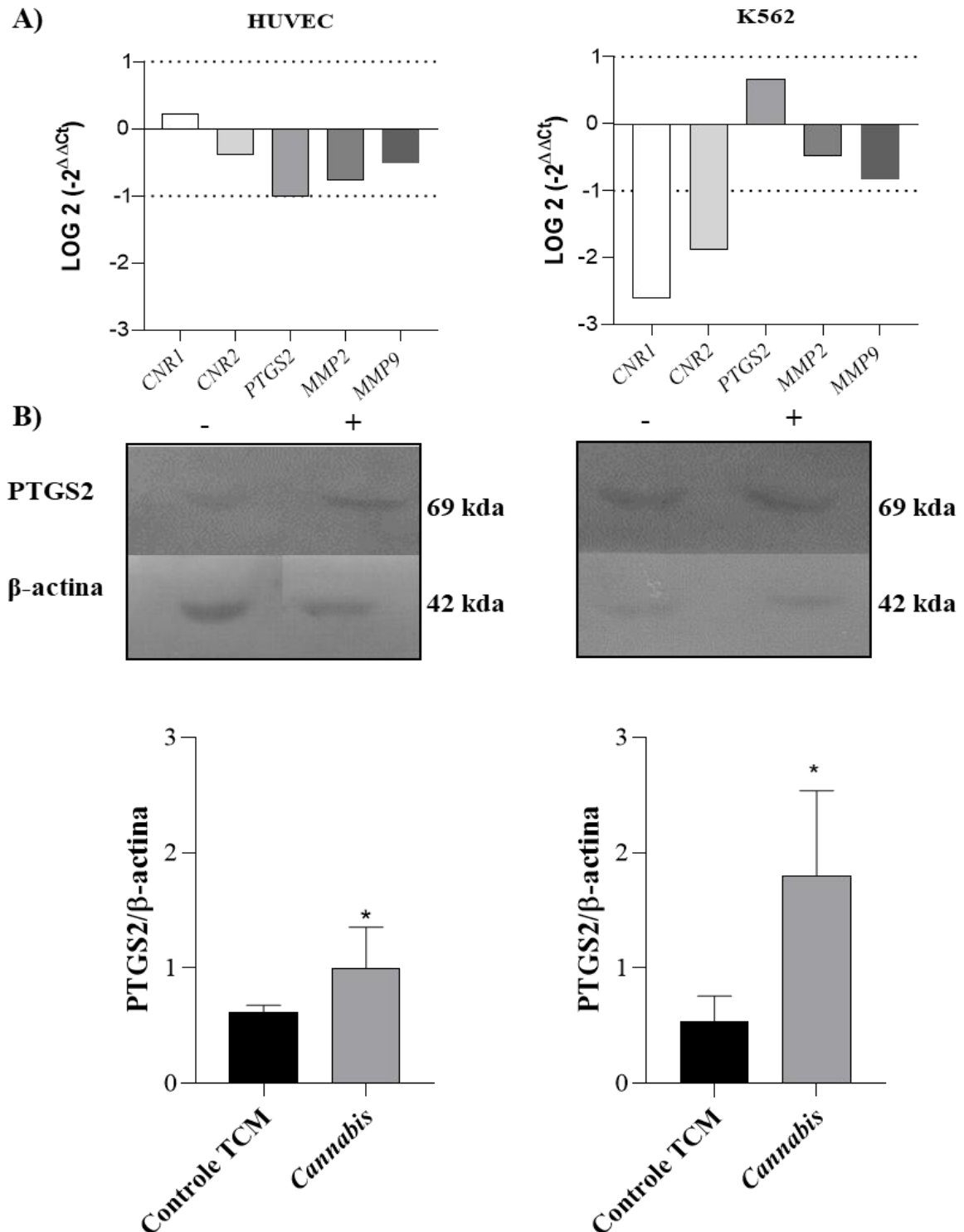
Em fibroblastos sinoviais de artrite reumatóide o CBD reduziu os níveis de IL-6 e IL-8 (LOWIN *et al*, 2020). Em trabalho com fibroblastos primários de gengiva estimulados com IL-1β, o tratamento com os fitocanabinoides como Canabidivarina (CBVN) e Canabigerol (CBG) diminuiu os níveis de PGE2, enquanto o uso isolado com CBD e CBG aumentou a produção de PGE2. Além disso, ao serem mensurados os níveis de citocinas foi encontrado que, os tratamentos com CBD, CBVN e CBG diminuíram INF-γ, TNF-α e IL-2, enquanto aumentaram os níveis de IL-6, IL-10 e IL-12. E, nenhum dos tratamentos foi significativo para IL-8 (ABIDI *et al*, 2022).

Portanto, assim como nos trabalhos citados, nossos resultados demonstraram a redução das interleucinas nas células tratadas com o óleo, o que indica a atuação dos fitocanabinoides na modulação dessas proteínas.

4.5 Expressão de genes e proteínas

Nas análises de expressão de genes não houve alteração da expressão de *PTGS2*, *MMP2* e *MMP9* nas duas linhagens celulares, mas foi encontrada uma redução significativa para os receptores CB1 e CB2 (respectivamente *CNR1* e *CNR2*) na linhagem K562. Enquanto para expressão proteica as duas linhagens apresentaram aumento significativo de PTGS2 (Figura 10).

Figura 10- Gráficos de expressão gênica e proteica em HUVEC e K562.



Subtítulo: **A)** Expressão do mRNA de *CNR1*, *CNR2*, *PTGS2*, *MMP2* e *MMP9*, analisadas após tratamento com *Cannabis* [10μM] em relação ao controle TCM, apresentando redução significativa da expressão de *CNR1* e *CNR2* em K562. A diferença de expressão significativa é dada pelos valores $\geq 1,0$ ou $\leq -1,0$, delimitados pela linha pontilhada. **B)** Expressão proteica de *PTGS2* comparando controle TCM e *Cannabis* [10μM] por *Western blotting*, normalizados pela expressão de β-actina. *vs controle, $p < 0,05$. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2023.

Quanto ao aumento da expressão proteica, hipotetizamos a ocorrência de um mecanismo, bem documentado em certas espécies, mas pouco trabalhado em seres humanos, denominado de preparação para o estresse oxidativo (*Preparation for Oxidative Stress*, POS), em que ocorre acionamento de vias e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*, ROS) como uma proteção e preparação celular para estados hipermetabólicos, neste são desencadeados fatores epigenéticos diante do estresse ambiental, alteração de fatores de transcrição, controle de microRNA e mRNA, além de modificações pós-traducionais (GIRAUD-BILLOUD et al., 2019). Acreditamos que possa ter ocorrido o acúmulo de PTGS2 como uma resposta que ainda estava em andamento. Para compreender melhor esse resultado seria interessante a análise dos receptores de PTGS2 ao nível gênico (*PTGER2*, *PTGER3* e *PTGER4*).

Para o resultado da diminuição da expressão de CB1 e CB2, sabe-se que, o CBD e o THC possuem mecanismos diferentes de ativação; sendo CBD capaz de inibir a captação da AEA, ativar os receptores TRPV1, GPR55, e 5-HT1A; enquanto o THC liga-se a CB1; no entanto, quando se trata de um óleo com diversos componentes outros canabinoides podem se ligar ao receptor CB2, o qual tem os mecanismos menos conhecidos (MARZO, BIFULCO, PETROCELLIS, 2004; PERTWEE, 2008; GERTSCH et al., 2008; CAMPOS et al., 2012; VANDOLAH et al., 2019). Ademais, a redução dos receptores canabinoides na linhagem K562 indica a necessidade de verificar quais foram as consequências dessa modulação, principalmente em razão da ação anti-inflamatória que CB1 e CB2 podem exercer ao inibir a produção de PGE2, uma das principais prostaglandinas na cascata da PTGS2.

Pesquisadores da área obtiveram que o estímulo ao receptor CB1 levou a ativação de MAPK, ERK1/2, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e P38 (DEMUTH; MOLLEMAN, 2006; HOWLETT, A.; BLUME; DALTON, 2010; TURU; HUNYADY, 2010), vias relacionadas a proliferação, controle do ciclo e morte celular. Sabe-se que 2-AG é um agonista específico de CB1, e pesquisas encontraram que o tratamento com 2-AG promoveu disfunção endotelial e recrutamento de leucócitos (JEHLE et al, 2020), além de resultados com aumento da migração de macrófagos e ativação do inflamassoma NLRP3 (*NOD-like receptor pyrin containing 3*) (MILLER; STELLA, 2008). Avraamidou e colaboradores (2023), encontraram que em monócitos tratados com 2-AG houve aumento da produção de ROS e IL-1 β , promovendo sinalização pró-inflamatória.

A expressão de CB1 no fígado, por exemplo, é relatada como aumentada em certas condições de doença, promovendo fibrose, resistência à insulina e lipogênese; o mesmo comportamento é encontrado também no sistema vascular, em que o aumento de CB1 contribui

para progressão de doenças e disfunção cardíaca (MILLER; DEVI, 2011; MONTECUCCO; DI MARZO, 2012; MACCARRONE *et al.*, 2015; SIERRA; LUQUIN; NAVARRO-OTANO, 2017). Estresse oxidativo, inflamação e fibrose foram observadas após ativação de CB1 em cardiomiócitos, em células do endotélio vascular e células musculares lisas (RAJESH *et al.*, 2010; BOOZ, 2011).

Em contra ponto, o estímulo seletivo com JWH-133, agonista dos receptores CB2, na linhagem SUP-B15 (leucemia linfoblástica aguda) diminui a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer, não só confirmando a expressão desse receptor em células imunes periféricas como também a importância do seu papel e estudo em diversas vias (PUNZO *et al.*, 2022). Em contraposição a esse achado, Greco *et al* (2020), analisaram monocitos circulantes CD16+ de pacientes com derrame cerebral isquêmico, e encontraram uma correlação entre gravidade e expressão de CB2, e atribuem esse resultado a uma resposta compensatória para limitar os danos; mas, a conclusão que obtêm sobre a expressão desse receptor é que, seu papel em células imunes é dependente do estado de ativação dessa célula e da natureza pela qual ele sofreu o estímulo.

Para doença articular inflamatória, por exemplo, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias e mediadores como a PTGS2 e as MMPs atuam na produção e liberação de endocanabinoides, com trabalhos indicando eficácia na ação anti-inflamatória de agonistas endocanabinoides com alvo nos receptores CB2 (MARZO, BIFULCO, PETROCELLIS, 2004; BRUNI *et al.*, 2018).

Considerando que, os efeitos são diferentes a depender de qual e como esse receptor é acionado, nossos resultados demonstram um efeito da ação conjunta dos compostos uma vez que ambos os receptores tiveram sua expressão diminuída na linhagem cancerígena. E, apesar de serem necessárias análises complementares, é provável que o tratamento nas linhagens HUVEC e K562 não tenha levado a apoptose devido a diminuição na expressão dos receptores canabinoides, inibindo as cascatas relacionadas à morte celular programada, em razão da apoptose ser esperada após tratamentos com compostos isolados ou sintéticos, assim como a super expressão de CB1 e CB2. Portanto, mostramos um comportamento diferente do que é encontrado quando há estímulo exclusivo e direcionado ao receptor CB1.

Os canabinoides endógenos são produzidos por demanda a partir das mudanças causadas pelo acúmulo de Ca⁺(KATONA; FREUND, 2008; KANO *et al.*, 2009; CASTILLO *et al.*, 2012) mas os fitocanabinoides alteram essa relação. O CBD interage como um modulador alostérico negativo de CB1, ou seja, diminui a afinidade dos agonistas endógenos desse receptor; enquanto seu efeito em CB2 é de agonista inverso, o qual induz uma resposta diferente de seu ligante endógeno (SANTOS; HALLAK; CRIPPA, 2020). Outro fitocanabinoide

conhecido é o Canabicromeno (CBC), o qual é agonista de receptores TRPA1 e seus efeitos inibem a recaptação de AEA e MAGL; além disso, seu potencial anti-inflamatório, analgésico e anticâncer é bem conhecido (IZZIO et al., 2009; RANIERI et al., 2016). Sendo assim, a diminuição da expressão dos receptores CB1/CB2 está relacionada a como ocorreu a dinâmica entre os ligantes exógenos e endógenos.

Portanto, os nossos dados refletem a variação de resposta tanto relacionada a composição do medicamento, quanto às características do modelo em que foi aplicado, e a possível plasticidade na resposta de diferentes genes.

Nosso trabalho permitiu a visualização de uma perspectiva futura para aplicação do óleo de *Cannabis sativa full spectrum* em doenças inflamatórias, dada sua alteração na expressão gênica na linhagem K562, porém, com efeitos sutis nas células normais.

Existem poucos dados clínicos sobre a farmacocinética e farmacodinâmica desses compostos no organismo humano, mas as pesquisas *in vitro* fornecem um conjunto de evidências para conseguirmos fazer a proposição desse tipo de tratamento e extrapolação para o uso clínico. Contudo, mais estudos são necessários para entender o efeito cumulativo, o tempo de exposição e possíveis efeitos residuais no organismo humano.

5 CONCLUSÕES

Os resultados de morfologia, proliferação e viabilidade celular evidenciaram que, o óleo em baixas concentrações e no tempo de 24 horas não surtiu efeitos sobre a linhagem normal, mas alterou morfologia e proliferação celular de K562.

Não houve redução significativa da proliferação celular a 10 μ M por 24 horas em ambas as linhagens. A linhagem K562 teve a migração celular aumentada nas células tratadas a 10 μ M por 24 horas.

Para a secreção de citocinas, foi encontrada a diminuição de IL-8 para K562 e HUVEC, redução de IL-1 β para a linhagem HUVEC.

A expressão gênica de *PTGS2*, *MMP2* e *MMP9* não foi significativa nas células HUVEC e K562, enquanto para os receptores canabinoides (*CNR1* e *CNR2*) houve diminuição da expressão nas células K562 tratadas com o óleo.

A expressão proteica de PTGS2 foi aumentada significativamente nas células K562 tratadas com óleo de *Cannabis*.

Sendo assim, foi possível evidenciar a correlação entre a via PTGS2 e o tratamento com óleo de *Cannabis* nos modelos utilizados pela alteração nas citocinas moduladoras da via PTGS2. Contudo, há a necessidade de análises complementares para entender quais vias bioquímicas podem ter sido alteradas pela redução da expressão de CB1 e CB2.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular**. Grupo GEN, 2019. 9788595150355.
- ABIDI, A. H. *et al.* Phytocannabinoids regulate inflammation in IL -1 β -stimulated human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v. 57, n. 6, p. 1127–1138, 2022.
- AGGARWAL S; *et al.* Medicinal use of *Cannabis* in the United States: historical perspectives, current trends, and future directions. **Journal of Opioid Management**, v. 5, n. 3, p. 153-168, 2009.
- ALMADA, M. *et al.* Synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-122, UR-144 and the phytocannabinoid THC activate apoptosis in placental cells. **Toxicology Letters**, v. 319, p. 129–137, 2020.
- ANDERSON, L. C.; NILSSON, K.; GAHMBERG, C. G. K562 - A human erythroleukemic cell line. **International Journal of Cancer**, v. 23, p. 143-147, 1979.
- ARULSELVAN, P.; *et al.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2016, p. 1-15, 2016.
- AVRAAMIDOU, E. *et al.* Myeloid but Not Endothelial Expression of the CB2 Receptor Promotes Atherogenesis in the Context of Elevated Levels of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 16, n. 2, p. 491–501, 2023.
- BADOLATO, M.; *et al.* Discovery of 1,4-Naphthoquinones as a New Class of Antiproliferative Agents Targeting GPR55. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, 402-406, 2019.
- BALLESTER, P.; MURIEL, J.; PEIRÓ, A. M. CYP2D6 phenotypes and opioid metabolism: the path to personalized analgesia. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 261-275, 2022.
- BALLAS, S. K. Pathophysiology and principles of management of the many faces of the acute vaso-occlusive crisis in patients with sickle cell disease. **European Journal of Haematology**, v. 95, n. 2, p. 113-123, 2015.
- BALLAS, S. K. How I treat acute and persistent sickle cell pain. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, 2020.
- BENDADIS, S. R.; *et al.* Medical marijuana in neurology. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 14, n. 12, p. 1453–1465, 2014.
- BEVILACQUA, M. P.; *et al.* Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**, v. 243, n. 4895, p.1160–1165, 1989.

BOOZ, G. W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1054–1061, 2011.

BROUSSEAU, D. C.; *et al.* The number of people with sickle-cell disease in the United States: national and state estimates. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 77-78, 2010.

BRUNI, N.; *et al.* Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment. **Molecules**, n. 23, v. 2478, 2018.

BRUSTON, J. J.; WOODHAMS, S. G. Endocannabinoid system and pain: an introduction. **Proceedings of the Nutrition Society**, n. 73, p. 106-117, 2014.

BUNN H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 762–69, 1997.

BURNS M. P., DEPAOLA N. Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, p. H194 –H204, 2005.

CAMPOS, A. C.; *et al.* Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, n. 367, n. 1607, p. 3364-3378, 2012.

CASTILLO, P. E. *et al.* Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 70–81, 2012.

CHIURCHIÙ, V.; BATTISTINI, L.; MACCARRONE, M. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 352–364, 2015.

CHIURCHIÙ, V., LEUTI, A., MACCARRONE, M. Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy research**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, 2021.

CRISTINO, L.; BECKER, T.; MARZO, V. Endocannabinoids and energy homeostasis: an update. **Biofactors**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 389-397, 2014.

CROWLEY-MATOKA, M. How to parse the protective, the punitive and the prejudicial in chronic opioid therapy? **Pain**, v. 154, n.1, p. 5-6, 2013.

DEMUTH, D. G.; MOLLEMAN, A. Cannabinoid signalling. **Life Sciences**, v. 78, n. 6, p. 549–563, 2006.

DENNIS, E., NORRIS, P. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 511–523, 2015.

DESTA, Z.; *et al.* PharmVar GeneFocus: CYP2B6. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 110, n. 1, p. 82-97, 2021.

DI FORTI, M. *et al.* Proportion of patients in south London with first-episode psychosis attributable to use of high potency cannabis: a case-control study. **The Lancet Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. 233–238, 2015.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 519–550, abr. 2009.

DOMINGOS, I. F.; *et al.* High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. **Annals of Hematology**, v. 99, n.5, p.947-953, 2020.

DREXLER, H. G. The Leukaemia–Lymphoma Cell Line Factsbook. **British Journal of Haematology**, v.117, p. 1000–1001, 2002.

ELIKKOTTIL J.; GUPTA P.; GUPTA K. The analgesic potential of cannabinoids. **Journal of Opioid Management**, v. 5, n. 3, p. 341-357, 2009.

ENDSLEY, M. P. *et al.* Diverse roles of 2-arachidonoylglycerol in invasion of prostate carcinoma cells: Location, hydrolysis and 12-lipoxygenase metabolism. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 5, p. 984–991, 1 set. 2007.

FARSANDAJ, N.; GHAHREMANI, M. H.; OSTAD, S. N. Role of cannabinoid and vanilloid receptors in invasion of human breast carcinoma cells. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 31, n. 4, p. 377–387, 2012.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317–1327, 2003.

FERNANDEZ-PATRON, C.; KASSIRI, Z.; LEUNG, D. Modulation of Systemic Metabolism by MMP-2: From MMP-2 Deficiency in Mice to MMP-2 Deficiency in Patients. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 4, p. 1935–1949, 2016.

FOWLER, C. J. The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. **British Journal of Pharmacology**, n. 152, p. 594-601, 2007.

FREIMUTH, N.; RAMER, R.; HINZ, B. Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 336–344, 2010.

GALVE-ROPERH, I. *et al.* Mechanism of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by the CB1 Cannabinoid Receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 1385–1392, 2002.

GARCÍA-MORALES, L. *et al.* CBD Reverts the Mesenchymal Invasive Phenotype of Breast Cancer Cells Induced by the Inflammatory Cytokine IL-1 β . **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2429, 2020.

GÉRARD, C.; *et al.* Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. **Nucleic Acids Research**, n. 18, v. 7142, 1990.

GÉRARD, C. M.; *et al.* Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. **Biochemical Journal**, n. 279, p. 129-134, 1991.

GERTSCH, M. J.; *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 105, v. 26, p. 9099-9104, 2008.

GIRAUD-BILLOUD, M.; *et al.* Twenty years of the “Preparation for Oxidative Stress” (POS) theory: Ecophysiological advantages and molecular strategies. **Comparative Biochemistry and Physiology A-molecular & Integrative Physiology**, v. 234, p. 36–49, 2019.

GHASEMI, M.; *et al.* The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 22, v. 12827, 2021.

GHOLIZADEH, F.; *et al.* Assessment of Cannabinoids Agonist and Antagonist in Invasion Potential of K562 Cancer Cells. **Iranian Biomedical Journal**, v. 23, n. 2, p. 153-158, 2019.

GRECO, R. *et al.* Characterization of CB2 Receptor Expression in Peripheral Blood Monocytes of Acute Ischemic Stroke Patients. **Translational Stroke Research**, 2020.

GUO, W.; *et al.* The Effect of Polyhydroxy Fullerene Derivative on Human Myeloid Leukemia K562 Cells. **Materials**, v. 15, n. 1349, 2022.

HADLAND, S. E.; KNIGHT, J. R.; HARRIS, S. K. Medical marijuana: review of the science and implications for developmental-behavioral pediatric practice. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, v. 36, n. 2, p. 115–123, 2015.

HERKENHAM, M.; *et al.* Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. **Brain Research**, n. 552, p. 301–310, 1991.

HIDALGO, A.; *et al.* Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 384-391, 2009.

HOHMANN, T. *et al.* On the influence of cannabinoids on cell morphology and motility of glioblastoma cells. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0212037–e0212037, 2019.

HOWLETT, A.; BLUME, L.; DALTON, G. CB1 Cannabinoid Receptors and their Associated Proteins. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1382–1393, 2010.

HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E. CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology. **Cannabinoid Pharmacology**, [S.L.], p. 169-206, 2017.

IRRERA, N.; *et al.* Pros and Cons of the Cannabinoid System in Cancer: Focus on Hematological Malignancies. **Molecules**, n. 26, ed. 3866, 2021.

IBSEN, M. S.; CONNOR, M.; GLASS, M. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Signaling and Bias. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 2, n. 1, p. 48–60, 2017.

ITO, A. *et al.* Degradation of Interleukin 1 β by Matrix Metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25, p. 14657–14660, 1996.

IZZO, A. A. *et al.* Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 10, p. 515–27, 2009.

JAFFE, E. A. *et al.* Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification By Morphologic and Immunologic Criteria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 11, p. 2745–2756, 1973.

JARVIS, S.; RASSMUSSEN, S.; WINTERS, B. Role of the Endocannabinoid System and Medical *Cannabis*. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 13, n. 8, p. 525-531, 2017.

JOSEPH, J. *et al.* Anandamide is an endogenous inhibitor for the migration of tumor cells and T lymphocytes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 8, 2004.

KANO, M. *et al.* Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 309-380, 2009.

KATO, G. J. Sickle cell disease. **Nature Reviews**, v. 4, n. 18010, 2018.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. **Nature Medicine**, v. 14, n. 9, p. 923–930, 2008.

KAWASAKI, N; *et al.* Control of Hemoglobin Synthesis in Erythroid Differentiating K562 Cells. **Archives Of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 2, p. 289-294, 1996.

KENNY, M. W.; GEORGE, A. J.; STUART J. Platelet hyperactivity in sickle-cell disease: a consequence of hyposplenism. **Journal of Clinical Pathology**, n. 33, p. 622-625, 1980.

KHANOLKAR, A. D.; PALMER, S. L.; MAKRIYANNIS, A. Molecular probes for the cannabinoid Receptors. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 108, n. 1-2, p. 37-52, 2000.

KISHIMOTO, S. Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand Induces the Migration of Human Natural Killer Cells. **Journal of Biochemistry**, v. 137, n. 2, p. 217–223, 2005.

KLEIN, T.W., *et al.* The cannabinoid system and immune modulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p.486-496, 2003.

KOGAN, N. M.; *et al.* A cannabinoid quinone inhibits angiogenesis by targeting vascular endothelial cells. **Molecular Pharmacology**, n. 70, p. 51-59, 2006.

KOGAN, N. M.; *et al.* HU-331, a novel cannabinoid-based anticancer topoisomerase II inhibitor. **Molecular Cancer Therapeutics**, n. 6, 173-183, 2007.

KOKURA S., *et al.* Molecular Mechanisms of Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion Induced by Redox Imbalance. **Circulation Research**, v. 84, n. 5, p. 516–524, 1999.

KOZAK, K. R.; *et al.* Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. **Journal of Biological Chemistry**, n. 277, p. 44877-44885, 2002.

LEUTI, A. *et al.* Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 159, p. 133-169, 2020.

LEVY, B., *et al.* Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nature Immunology**, v. 2, p. 612-619, 2001.

LI, J., *et al.* Neutrophil AKT2 regulates heterotypic cell-cell interactions during vascular inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 4, p. 1483-1496, 2014.

LI, X.; *et al.* Structural and Functional Insights into Cannabinoid Receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, n. 41, p. 665-677, 2020.

LIU, C. *et al.* Cannabinoids Promote Progression of HPV-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma via p38 MAPK Activation. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 11, p. 2693–2703, 2020.

LOWIN, T. *et al.* Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 8, 2020.

LOZZIO, C. B. LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v. 45, n. 3, 1975.

MAAYAH, Z. H.; *et al.* The molecular mechanisms that underpin the biological benefits of full-spectrum cannabis extract in the treatment of neuropathic pain and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 7, 2020.

MACCARRONE, M. *et al.* Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p. 277–296, 2015.

MANICONE, A.; MCGUIRE, J. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n. 1, p. 34–41, 2008.

MARZĘDA, P. *et al.* Cannabidiol Interacts Antagonistically with Cisplatin and Additively with Mitoxantrone in Various Melanoma Cell Lines—An Isobolographic Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6752, 2022.

MARZO, V.; BIFULCO, M.; PETROCELLIS L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771-784, 2004.

MATSUDA, L. A.; *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561-564, 1990.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**, v. 33, n. 1, p. 131-139, 2019.

MCCARBERG, B. H.; BARKIN, R. L. The future of cannabinoids as analgesic agents: a pharmacologic, pharmacokinetic, and pharmacodynamic overview. **American Journal of Therapeutics**, v. 14, n. 5, p. 475–483, 2007.

MCKALLIP, R. J.; *et al.* Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. **Molecular Pharmacology**, v. 70, p. 897-908, 2006.

MCQUIBBAN G. A.; *et al.* Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1160-1167, 2002.

MECHOULAM, R. The Pharmacohistory of *Cannabis Sativa*. In: MECHOULAM, R. *et al.* **Cannabinoids as Therapeutic Agents**. 1. Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 1-20, 1986.

MEDINA-LEYTE, D. J. *et al.* Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. **Applied Sciences**, v. 10, n. 3, p. 938, 2020.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MILIAM, L., *et al.* Cannabinoid receptor expression in non-small cell lung cancer: Effectiveness of tetrahydrocannabinol and cannabidiol inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in vitro. **PLoS One**, v. 15, n. 2, 2020.

MILLER, L. K.; DEVI, L. A. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 3, p. 461–470, 2011.

MONTECUCCO, F.; DI MARZO, V. At the heart of the matter: the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 6, p. 331–340, 2012.

MORALES, P.; *et al.* Synthetic cannabinoid quinones: Preparation, in vitro antiproliferative effects and in vivo prostate antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 70, p. 111-119, 2013.

MILLER, A. M.; STELLA, N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. 2, p. 299–308, jan. 2008.

MULLER, C.; MORALES, P.; REGGIO, P. H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP channels. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 2019.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, n. 365, p. 61-65, 1993.

NARUMIYA, S.; FITZGERALD, G.A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 1, p. 25-30, 2001.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). **PubChem Compound Summary for CID 644019, Cannabidiol**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cannabidiol>>. Acesso em: Maio, 2023a.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). **PubChem Compound Summary for CID 16078, Dronabinol**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dronabinol>>. Acesso em: Maio, 2023b.

NOVELLI E. M., GLADWIN M. T. Crises in sickle cell disease. **Chest**, v. 149, p. 1082-1093, 2016.

O'CALLAGHAN, G.; HOUSTON, A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets? **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 22, p. 5239–5250, 2015.

PACHER, P.; STEFFENS, S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 1, p. 63-77, 2009.

PAGANO, *et al.* Biological effects of Cannabidiol on normal human healthy cell populations: Systematic review of the literature. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, 2020.

PARVEZ, M. K.; *et al.* Oncoglabrinol C, a new flavan from *Oncocalyx glabratus* protects endothelial cells against oxidative stress and apoptosis, and modulates hepatic CYP3A4 activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 6, p. 648-656, 2020.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, n. 2, p. 129-180, 1997.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

PERTWEE, R. G. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 4, p. 588–631, 2010.

PETROCELLIS, L.; *et al.* Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 163, n. 7, p. 1479-1494, 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e45, 2001.

POTSCHKA, H. *et al.* Cannabidiol in canine epilepsy. *The Veterinary Journal*, p. 105913, 2022.

POWLES, T. Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 1214-1221, 2005.

PUNZO, F.; *et al.* Effect of CB2 Stimulation on Gene Expression in Pediatric B-Acute Lymphoblastic Leukemia: New Possible Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 23, v. 15, 2022.

QUSHAWY, M. *et al.* Formulation and Characterization of O/W Nanoemulsions of Hemp Seed Oil for Protection from Steatohepatitis: Analysis of Hepatic Free Fatty Acids and Oxidation Markers. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 7, p. 864, 2022.

RAHAMAN, O.; GANGULY, D. Endocannabinoids in immune regulation and immunopathologies. **Immunology**, 2021.

RAMELLA, A. *et al.* Impact of Lipid Sources on Quality Traits of Medical Cannabis-Based Oil Preparations. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 2986, 2020.

RANIERI, R. *et al.* Phytocannabinoids and Cannabimimetic Drugs: Recent Patents in Central Nervous System Disorders. **Recent patents on CNS drug discovery**, v. 10, n. 2, p. 157–177, 2016.

RAJESH, M. *et al.* CB2-receptor stimulation attenuates TNF- α -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 4, p. H2210–H2218, 2007.

RAJESH, M. *et al.* CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF- α -induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 347–357, 2008.

RAJESH, M. *et al.* Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 25, p. 2115–2125, 2010.

RESS, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADIN, M. T. Sick cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.

REZENDE, B. *et al.* Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 148, 2023.

RUSSO E., *et al.* Phytochemical and genetic analyses of ancient *Cannabis* from central Asia. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 15, p. 4171–4182, 2008.

RUSSO, E. B. Taming THC: potential *cannabis* synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344–1364, 2011.

SAINZ-CORT, A.; MÜLLER-SÁNCHEZ, C.; ESPEL, E. Anti-proliferative and cytotoxic effect of cannabidiol on human cancer cell lines in presence of serum. **BMC Research Notes**, n.13, v. 389, 2020.

SALEEMI, M. A.; *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Cannabinoids: An Updated Review with Future Perspectives and Current Challenges. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 10, 2022.

SANTOS, R. G.; HALLAK, J. E. C.; CRIPPA, J. A. S. Neuropharmacological Effects of the Main Phytocannabinoids: A Narrative Review. **Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders**, p. 29–45, 2020.

SESTI-COSTA, R.; *et al.* Inflammatory Dendritic Cells Contribute to Regulate the Immune Response in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 11, 2021.

SCHAEUBLE K, *et al.* Attenuation of chronic antiviral T-cell responses through constitutive COX2-dependent prostanoid synthesis by lymph node fibroblasts. **PLoS Biology**, v. 17, n. 7, p. e3000072, 2019.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 7, p. 1161–72, 2011.

SIERRA, S.; LUQUIN, N.; NAVARRO-OTANO, J. The endocannabinoid system in cardiovascular function: novel insights and clinical implications. **Clinical Autonomic Research**, v. 28, n. 1, p. 35–52, 2017.

SINHA, C. B.; *et al.* Management of Chronic Pain in Adults Living With Sickle Cell Disease in the Era of the Opioid Epidemic. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 5, 2019.

STEEN, P. E. V. D. *et al.* Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2673–2681, 2000.

STEEN, P. E. V. D. *et al.* Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. **European journal of biochemistry**, v. 270, n. 18, p. 3739–3749, 2003.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. K.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 263–292, 2019.

TAKAMI, M.; TERRY, V.; PETRUZZELLI, L. Signaling Pathways Involved in IL-8-Dependent Activation of Adhesion Through Mac-1. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4559–4566, 2002.

TAO, R.; *et al.* Cannabinoid receptor *CNR1* expression and DNA methylation in human prefrontal cortex, hippocampus and caudate in brain development and schizophrenia. **Translational Psychiatry**, n. 10, v. 158, 2020.

TSIFTSOGLU, A. S.; PAPPAS, I. S.; VIZIRIANAKIS, I. S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, p. 257–290, 2003.

TURNER, M. D. *et al.* Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

TURU, G.; HUNYADY, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 75–85, 2009.

VANDOLAH, H. J.; *et al.* Clinicians' Guide to Cannabidiol and Hemp Oils. **Mayo Clinic Proceedings**, [S.L.], v. 94, n. 9, p. 1840-1851, 2019.

VINCENT L., *et al.* Cannabinoid receptor-specific mechanisms to alleviate pain in sickle cell anemia via inhibition of mast cell activation and neurogenic inflammation. **Haematologica**, v. 101, n. 5, p. 566-577, 2016.

VOLKOW, N. D. *et al.* Effects of Cannabis Use on Human Behavior, Including Cognition, Motivation, and Psychosis: A Review. **JAMA Psychiatry**, v. 73, n. 3, p. 292, 2016.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & Development**, v. 14, n. 17, p. 2123-2133, 2000.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PLoS One**, n. 16, v. 5, 2010.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 454, n.7203, p. 427, 2008.

XIAN, X.-S. *et al.* Effect of a synthetic cannabinoid agonist on the proliferation and invasion of gastric cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. 110, v. 2, p. 321-332, 2010.

XU, X.; *et al.* N-Oleoyl ethanolamine Reduces Inflammatory Cytokines and Adhesion Molecules in TNF- α -induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Activating CB2 and PPAR- α . **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 280-291, 2016.

YE, L.; *et al.* New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. **Current Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 239-248, 2019.

ZHANG, H. Y.; *et al.* Species Differences in Cannabinoid Receptor 2 and Receptor Responses to Cocaine Self-Administration in Mice and Rats. **Neuropsychopharmacology**, n. 40, p. 1037-1051, 2015a.

ZHANG, M. W.; HO, R. C. M. The *Cannabis* Dilemma: A Review of Its Associated Risks and Clinical Efficacy. **Journal of Addiction**, v. 2015, 2015.

ZHANG, Z. *et al.* Proteolytic Cleavage of AMPK α and Intracellular MMP9 Expression Are Both Required for TLR4-Mediated mTORC1 Activation and HIF-1 α Expression in Leukocytes. **Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 2452–2460, 2015b.

ZHANG, J.; *et al.* Traditional herbal medicine and nanomedicine: converging disciplines to improve therapeutic efficacy and human health. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 178, p. 113964, 2021.

ZMIGRODZKA M, *et al.* The cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway and its role in the pathogenesis of human and dog hematological malignancies. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n. 5, 2018.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 19, v. 833, 2018.