



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

SHAYENNE EDUARDA RAMOS VANDERLEY

ESTUDO DA MODULAÇÃO IMUNOMETABÓLICA DA *Cannabis* MEDICINAL NA
OBESIDADE

João Pessoa
2025

SHAYENNE EDUARDA RAMOS VANDERLEY

ESTUDO DA MODULAÇÃO IMUNOMETABÓLICA DA *Cannabis* MEDICINAL NA OBESIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima.

Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves.

**João Pessoa
2025**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

V235e Vanderley, Shayenne Eduarda Ramos.

Estudo da modulação imunometabólica da Cannabis medicinal na obesidade / Shayenne Eduarda Ramos Vanderley. - João Pessoa, 2025.

133 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.

Coorientação: José Luiz de Brito Alves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Inflamação crônica. 2. Obesidade. 3. Fitocanabinoides. 4. Modulação imunológica. 5. Farmacologia. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Alves, José Luiz de Brito. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616-002.2(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



Ata da 523ª (quingentésima vigésima terceira) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Shayenne Eduarda Ramos Vanderley**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às oito horas e trinta minutos (08h30) do dia vinte e oito de agosto do ano de dois mil e vinte e cinco (28/08/2025), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/cky-mfcn-rpf>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Shayenne Eduarda Ramos Vanderley**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, Ph.D em Bioquímica e Imunologia, Márcia Regina Piuvezam, Ph.D em Microbiologia, José Luiz de Brito Alves, Ph.D em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, e Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, Ph.D em Bioquímica e Imunologia. Sendo a primeira, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Minas Gerais e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Shayenne Eduarda Ramos Vanderley**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**ESTUDO DA MODULAÇÃO IMUNOMETABÓLICA DA *Cannabis* MEDICINAL NA OBESIDADE**”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Shayenne Eduarda Ramos Vanderley** legalmente habilitado(a) a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE LUIZ DE BRITO ALVES
Data: 02/09/2025 13:14:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (Coorientador)

Prof.^a Dr.^a Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Examinadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br JULIANA DE ASSIS SILVA GOMES ESTANISLAU
Data: 01/09/2025 12:38:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Piuvezam (Examinadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIA REGINA PIUVEZAM
Data: 01/09/2025 13:56:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Shayenne Eduarda Ramos Vanderley (Discente)

Documento assinado digitalmente
gov.br SHAYENNE EDUARDA RAMOS VANDERLEY
Data: 02/09/2025 16:54:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br TATJANA KEESSEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE
Data: 02/09/2025 13:39:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço pelo dom da vida, por todas as graças imerecidas e pela força que me sustentou nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Klenio e Valdijane, sou imensamente grata por acreditarem em mim, por me apoiarem incondicionalmente e por dedicarem tudo o que estava ao alcance de vocês para que meus sonhos se tornassem realidade. À minha irmã, obrigada pelo incentivo constante e por sua presença que sempre aquece meu coração.

Ao amor da minha vida, João Paulo, que alegria foi te encontrar neste caminho! Quem diria que meu vizinho de laboratório se tornaria meu noivo e uma companhia tão essencial na minha trajetória? Obrigada por trazer serenidade nos momentos difíceis, por me incentivar sempre e por cuidar de mim em todos os sentidos da palavra cuidado. Obrigada por acreditar em mim quando minhas próprias forças vacilavam. Amo você!

Aos meus amigos, que fizeram e fazem parte da minha vida, meu sincero obrigada. São anos de companheirismo, risadas e memórias compartilhadas, seja em Pernambuco (melhor lugar do mundo), na Paraíba ou em qualquer outro lugar.

Quero dedicar um agradecimento especial a quatro amigos que foram luz neste período: Anny, minha parceira nas dificuldades acadêmicas, não sei o que seria de mim sem sua companhia. Nat, minha amiga, não há palavras suficientes para expressar a gratidão por tanta cumplicidade e partilha; já és parte da minha família, e sei que também faço parte da sua. Mateus e Anne, obrigada! Mesmo à distância, me mostraram que carinho e cuidado atravessam qualquer barreira - até a alfandegária (não é mesmo, Anne?).

À todos colegas que conheci durante o mestrado, meu muito obrigada! Não consigo citar todos vocês, mas saibam que todos foram essenciais durante este período.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tatjana Kessen, agradeço por todo apoio, orientação e confiança depositados em mim desde a graduação, e, principalmente, por acreditar que eu conseguiria conduzir o pequeno início desta nova linha de pesquisa no laboratório. Foi uma honra tê-la como orientadora!

No laboratório, Fernanda, obrigada por cada conversa, ensinamento e conselho científico que ajudaram na estruturação desse trabalho e que levarei comigo por onde for. Aos meus Rosa, Let, Leo, Delva (e a pequena Liz, que já nasceu sabendo pipetar!) e Fernando, meu profundo obrigada. Vocês estiveram presentes em cada etapa, ajudando com paciência, dedicação e bom humor, mesmo quando não era da linha de pesquisa de vocês, tornando o trabalho mais leve e repleto de momentos memoráveis. Me ajudaram a processar até nove amostras simultaneamente, abrir e rotular mais de 90 eppendorfs por experimento, me acompanhar enquanto preparava nove placas e permanecer até tarde nos dias de marcação, sempre com risadas, pequenos surtos e fofocas, regados a coffee break com bolo de chocolate, cacau e café, acompanhado de um espresso — mesmo reclamando que eu levava comida de propósito, estavam sempre à espera.

De todos vocês — não tenham ciúmes! — agradeço imensamente, por bilhões e trilhões de anos, à nossa querida Roses, Rosália ou “tia Rôô” para os íntimos. Amiga, sem você este trabalho não existiria; sua disposição em me ajudar nas coletas dos pacientes de interesse tornou tudo possível, e sua dedicação era tanta que permanecia até o final para aprender cada detalhe.

Todos vocês sempre terão um lugar especial no meu coração, e saibam que nossa relação, apesar do humor e das brincadeiras, é marcada por muito carinho e cumplicidade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves, agradeço pela generosidade, apoio e incentivo constantes. Agradeço também à Lud, que esteve presente nas medições e análises antropométricas e bioquímicas do estudo.

Agradeço a todos que compõem o Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC) e o Laboratório de Pesquisa Translacional em Nutrição e Doenças Cardiometabólicas (LANUCAM) pelo suporte técnico.

Meus agradecimentos se estendem aos laboratórios parceiros: Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA), Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA), Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular

(LBCM) e Laboratório de Imunofarmacologia e Imunobiotecnologia (Lymfa/Lib). Agradeço imensamente aos técnicos Teresa Cristina e Francisco Allysson, por me receberem diariamente com bom humor e sorriso no rosto, contribuindo de forma significativa para esta pesquisa.

À Apepi, minha gratidão por disponibilizar o produto vegetal primário deste estudo.

À Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) e a todos os professores, meu reconhecimento pela sólida formação técnico-científica que sustentou minha trajetória.

A Carol e Nilmar, agradeço pela dedicação incansável em me apoiar com os trâmites burocráticos ao longo destes dois anos.

Aos órgãos de fomento CAPES e Fapesq-PB, meu sincero agradecimento por possibilitarem a realização desta pesquisa.

À banca examinadora, Professoras Dra. Marcia Regina Piuvezam e Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, agradeço pelas valiosas contribuições e dedicação ao aprimoramento deste trabalho.

Aos pacientes voluntários e participantes do estudo, minha gratidão pelo empenho e colaboração.

Por fim, dedico este trabalho a mim mesma. Apenas aqueles próximos sabem o quanto foi desafiador manter a presença e dar o melhor de mim, conciliando pesquisa e questões de saúde ao longo desses dois anos. Hoje, sinto orgulho da trajetória que trilhei e da pessoa que me tornei, aprendendo a conviver com cada desafio e a celebrar cada conquista.

RESUMO

A obesidade é uma condição complexa, associada a inflamação crônica, alterações metabólicas e risco de complicações graves. Fármacos anti-obesidade enfrentam limitações, como efeitos colaterais e reganho de peso. Nesse contexto, a modulação da inflamação crônica surge como estratégia promissora, e fitocanabinoides da *Cannabis*, como THCv, CBD e CBG, mostram potencial para reduzir a inflamação por meio da interação com receptores canabinoides e outras vias. Nessa perspectiva, investigamos os efeitos de diferentes extratos ricos nesses fitocanabinoides sobre a inflamação crônica e as alterações metabólicas de células do sangue periférico em indivíduos com obesidade, oferecendo novas perspectivas terapêuticas adjuvantes ao tratamento da doença. No presente estudo, foram realizadas análises comparativas em monócitos e células T CD4⁺ totais provenientes de voluntários eutróficos e obesos. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) desses indivíduos foram coletadas e estimuladas com o extrato rico em fitocanabinoides que apresentou melhor desempenho. Para controle positivo nos experimentos de citometria de fluxo, utilizaram-se lipopolissacarídeo (LPS) para estímulo dos monócitos e anti-CD3/CD28 para ativação dos linfócitos T CD4⁺. Já no ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), a dexametasona foi empregada como controle anti-inflamatório, enquanto o Staphylococcal enterotoxin B (SEB) foi utilizado como controle positivo para indução inflamatória. Anteriormente a esta etapa, este estudo avaliou a citotoxicidade de extratos brutos ricos em fitocanabinoides de *Cannabis sativa* em macrófagos murinos RAW 264.7, hemácias humanas e PBMCs, com o objetivo de determinar concentrações seguras para análises imunológicas subsequentes. Foram realizados testes de viabilidade em macrófagos RAW 264.7 e PBMCs pelo método MTT, além da avaliação da taxa de hemólise em eritrócitos humanos. Após a triagem das concentrações citotóxicas médias (CC50) e das concentrações seguras para testes (CC20) dos diferentes extratos, utilizou-se citometria de fluxo para investigar os mecanismos de morte celular induzidos por esses extratos em PBMCs, por meio da marcação com Anexina V/iodeto de propídio (PI). Os resultados do teste MTT indicaram CC50 em células RAW 264.7 de 28,49 µg/mL para CBD, 47,56 µg/mL para CBG e 8,68 µg/mL para THCv. Não foi observada atividade hemolítica para nenhum dos extratos testados. Em PBMCs, as CC50 foram de 5,91 µg/mL para CBD, 15,77 µg/mL para CBG e 6,79 µg/mL para THCv. Quanto ao mecanismo de morte celular, os ensaios com Anexina V/PI mostraram que os extratos induzem predominantemente apoptose, com taxas de morte celular inferiores a 35% nas concentrações referentes à CC50. No que tange ao extrato bruto rico em THCv, selecionado para os testes imunológicos, os resultados demonstram que esse extrato modula seletivamente a resposta imune, com diferenças marcantes entre indivíduos eutróficos e obesos. O tratamento preservou a frequência de IL-10 e IL-4, e reduziu TNF-α em monócitos e linfócitos CD4⁺ de indivíduos obesos, indicando um perfil potencialmente anti-inflamatório quando comparados com os extratos ricos em CBG e CBD. Na dosagem de citocinas por ELISA foi observado que o THCv reduziu as citocinas IL-17 e IFN-γ em obesos, quando comparado com indivíduos eutróficos. Em monócitos, a maior frequência de CD220⁺ foi observada nos indivíduos obesos, enquanto p-RPS6K1 não apresentou distinção. Ambos os marcadores nesta célula, não diferiu a frequência nos tratamentos, concentrações e tempos avaliados. Ao analisar a mieloperoxidase (MPO), o THCv reduziu monócitos MPO⁺ em eutróficos, mas não em obesos. O tratamento diminuiu também a frequência de IL-17A em linfócitos CD4⁺ de indivíduos obesos, quando comparado com eutróficos. Em linfócitos CD4⁺, indivíduos obesos exibiram menor expressão de CD220 e redução de p-RPS6K1 após tratamento, quando comparados com eutróficos. Além disso, a menor frequência de linfócitos CD4⁺ CD39⁺CD73⁺ em obesos, não foi revertida pelo tratamento. Por fim, o extrato bruto rico em THCv modulou seletivamente a resposta imune, evidenciando que o perfil imunometabólico basal influencia a resposta a fitocanabinoides, integrando a regulação de vias inflamatórias, imunorregulatórias e de sinalização intracelular.

Palavras-chave: Obesidade. Fitocanabinoides. Inflamação crônica. Modulação imunológica.

ABSTRACT

Obesity is a multifaceted condition characterized by chronic inflammation, metabolic dysregulation, and an increased risk of severe complications. Current anti-obesity pharmacotherapies face significant challenges, including adverse side effects and high rates of weight regain after discontinuation. In this context, targeting chronic inflammation has emerged as a promising therapeutic strategy. Phytocannabinoids derived from *Cannabis sativa*, such as THCV, CBD, and CBG, have demonstrated potential in reducing inflammation through interactions with cannabinoid receptors and other signaling pathways. The immunomodulatory effects of various phytocannabinoid-rich extracts on chronic inflammation and metabolic alterations were evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from obese individuals, to identify novel adjuvant therapeutic strategies. Comparative analyses were conducted on monocytes and total CD4⁺ T cells isolated from both eutrophic and obese volunteers. PBMCs were stimulated *ex vivo* with the phytocannabinoid-rich extract that exhibited the most promising activity. Positive controls comprised lipopolysaccharide (LPS) for monocyte activation and anti-CD3/CD28 antibodies for CD4⁺ T cell stimulation in flow cytometry assays, while dexamethasone and Staphylococcal enterotoxin B (SEB) served as anti-inflammatory and pro-inflammatory controls, respectively, in ELISA assays. Before the immunological tests, cytotoxicity of crude *C. sativa* extracts was assessed in murine RAW 264.7 macrophages, human erythrocytes, and PBMCs to establish safe experimental concentrations. Viability assays (MTT) revealed CC50 values in RAW 264.7 cells of 28.49 µg/mL for CBD, 47.56 µg/mL for CBG, and 8.68 µg/mL for THCV, with no hemolytic activity detected in erythrocytes. PBMC CC50 values were 5.91 µg/mL (CBD), 15.77 µg/mL (CBG), and 6.79 µg/mL (THCV). Annexin V/propidium iodide staining indicated apoptosis as an action mechanism, with rates below 35% at CC50 concentrations. Focusing on the THCV-rich extract selected for immunological testing, results showed its selective immunomodulatory effect, with clear differences between eutrophic and obese subjects. Treatment maintained IL-10 and IL-4 levels while reducing TNF-α expression in monocytes and CD4⁺ T cells from obese individuals, indicating a strong anti-inflammatory profile compared to CBG- and CBD-rich extracts. ELISA analysis showed that THCV reduced IL-17 and IFN-γ secretion in obese subjects. Obese individuals also showed higher frequencies of CD220⁺ monocytes, with no significant changes in p-RPS6K1 expression. THCV reduced MPO⁺ monocytes in eutrophic but not obese subjects. Additionally, IL-17A⁺ CD4⁺ T cell frequencies decreased in obese subjects after treatment, along with lower CD220 expression and reduced p-RPS6K1 phosphorylation. The lower frequency of CD4⁺ CD39⁺CD73⁺ regulatory T cells in obese individuals was not reversed by the treatment. Overall, these findings highlight the crucial role of basal immunometabolic status in determining phytocannabinoid responses, suggesting that THCV can modulate inflammatory, regulatory, and intracellular signaling pathways involved in obesity-related immune dysfunction.

Keywords: Obesity. Phytocannabinoids. Chronic inflammation. Immune modulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Obesidade clínica e pré-clínica.....	23
Figura 2.	Hormônios que atuam como sinais que regulam a fome e o gasto energético	35
Figura 3.	Modelo de funcionamento do papel das alterações no tecido adiposo induzidas pela perda de peso no reganho ponderal.....	36
Figura 4.	Reações intracelulares que ocorrem quando agonistas interagem com receptores canabinoides CB1 e CB2 no SNC	39
Figura 5.	Efeito anti-inflamatório dos fitocannabinoides da C. sativa.....	40
Figura 6.	Via de sinalização da ligação canabinoide-receptor CB1.....	41
Figura 7.	Tabela contendo os metabólitos secundários de C. sativa.....	43
Figura 8.	Via biossintética dos cannabinoides primários.	44
Figura 9.	CBD: vias inflamatórias e apoptóticas.....	46
Figura 10.	Mecanismo dos efeitos anti-inflamatórios do CBG	47
Figura 11.	Estratégia de análise de mecanismo de morte celular.	65

Figura 12. Estratégia de análise para seleção de monócitos e linfócitos T CD4+.....	66
Figura 13. Estratégia de análise para seleção de linfócitos T CD4+ positivos para marcadores de interesse.....	67
Figura 14. Estratégia de análise para seleção de monócitos positivos para marcadores de interesse.....	67
Figura 15. Avaliação da Concentração Citotóxica Média (CC50) em linhagem de macrófagos murinos.....	73
Figura 16. Análise quantitativa da Concentração Hemolítica Média (HC50).	76
Figura 17. Determinação da Concentração Citotóxica Média (CC50) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	77
Figura 18. Avaliação da citotoxicidade frente a PBMCs por citometria de fluxo	78
Figura 19. Avaliação imunomoduladora preliminar dos diferentes extratos brutos de C. sativa ricos em fitocanabinoides frente a PBMCs de indivíduos obesos.	81
Figura 20. Dosagem de citocinas do extrato bruto de C. sativa rico em THCV frente a PBMCs de indivíduos eutróficos e obesos.....	84
Figura 21. Frequência de linfócitos TCD4+ e monócitos CD14+ frente a PBMCs de indivíduos eutróficos e obesos.....	86
Figura 22. Frequência de monócitos CD14+ expressando CD220 e positivos para p-RPS6K1, mieloperoxidase e TNF- α em indivíduos eutróficos e obesos.	87
Figura 23. Frequência de linfócitos T CD4+ expressando IFN- γ , IL-10 e IL-17A em indivíduos eutróficos e obesos.....	89

Figura 24. Frequência de linfócitos T CD4+ ativados (CD25+), expressando CD220 e positivos para p-RPS6K1 em indivíduos eutróficos e obesos.	90
Figura 25. Matriz de correlação entre os marcadores CD220 e p-RPS6K1 em linfócitos T CD4+ de indivíduos eutróficos e obesos.	92
Figura 26. Frequência de linfócitos T CD4+ ativados (CD25+) expressando IFN- γ , IL-10 e IL-17A em indivíduos eutróficos e obesos.	94
Figura 27. Frequência de linfócitos T CD4+ expressando CD39 e CD73 em indivíduos eutróficos e obesos.....	95
Figura 28. Frequência de linfócitos T CD4+ expressando para CD39 e CD73 em indivíduos eutróficos e obesos.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela	1.	Extratos	de	<i>Cannabis</i>	
<i>sativa</i>					51
Tabela 2.	Percentual de fitocanabinoides presentes nos diferentes quimiotipos de <i>Cannabis sativa</i>				53
Tabela 3.	Valores de referência dos marcadores bioquímicos.....				55
Tabela 4.	Aspectos demográficos e clínicos de voluntários inseridos no estudo				68
Tabela 5.	Dosagem bioquímica dos voluntários inseridos no estudo				70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG 2-Araquidonoilglicerol

AEA Anandamida

Akt Serina/Treonina Quinase (Protein Kinase B)

ALT/TGP Alanina Aminotransferase / Transaminase Glutâmico-Pirúvica

AML Leucemia Mieloide Aguda

ANOVA Análise de Variância

AnV Anexina V

AST/TGO Aspartato Aminotransferase / Transaminase Glutâmico-Oxalacética

Bad Antagonista da Morte Celular da família Bcl-2

C- Controle Negativo

C+ Controle Positivo

CB1/CB1R Receptor Canabinoide Tipo 1

CB2/CB2R Receptor Canabinoide Tipo 2

CBD Canabidiol

CBG Canabigerol

CC Circunferência da Cintura

CC20 Concentração Citotóxica 20%

CC50 Concentração Citotóxica Média (50%)

CD36 Cluster de Diferenciação 36

CD39 Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1

CD73 Ecto-5'-nucleotidase

CD4⁺ Linfócitos T auxiliares CD4 positivos

CTL- Controle Negativo

DEXA Dexametasona

TDM2 Diabetes Mellitus Tipo 2

DMSO Dimetilsulfóxido

ERK1/2 Quinases Reguladas por Sinal Extracelular ½

F Feminino

Gas / Gai / βγ Subunidades de proteínas G heterotriméricas envolvidas em sinalização intracelular

Gama-GT Gama Glutamil Transferase

GLUT1 Transportador de Glicose tipo 1

GM-CSF Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

HC50 Concentração Hemolítica Média (50%)

HSCs Células-Tronco Hematopoéticas

HDL Lipoproteína de Alta Densidade

HIF-1 α Fator induzível por hipóxia 1

IFN- γ Interferon gama

IL-10 Interleucina 10

IL-17 / IL-17A Interleucina 17 / Subtipo A da Interleucina 17

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

IMC Índice de Massa Corporal

iBALT Tecido Linfóide Associado ao Brônquio Induzível

IR (CD220) Receptor de Insulina (marcador CD220)

LPS Lipopolissacarídeo

LDL Lipoproteína de Baixa Densidade

MAPKs Quinases Ativadas por Mitógeno

M-CSF Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos

MPO Mieloperoxidase

mRNA RNA mensageiro

Mtor Alvo da Rapamicina em Mamíferos

Mtorc1 Complexo 1 do Alvo da Rapamicina em Mamíferos

M Masculino

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NF- κ B Fator Nuclear kappa B

n Frequência absoluta

p-RPS6K1 Ribosomal Protein S6 Kinase beta-1 fosforilada

PARP1 Poli(ADP-ribose) Polimerase 1

PBS Tampão Salino Fosfatado

PERK-ATF4-CHOP Eixo de sinalização celular envolvendo PERK, ATF4 e CHOP

PI Iodeto de Propídeo

PI3K/Akt Fosfatidilinositol 3-quinase / Protein Kinase B (via de sinalização)

PS Fosfatidilserina

RCQ Relação Cintura-Quadril

RCQ Relação Cintura/Quadril

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

SEM Erro Padrão da Média

SD Desvio Padrão

STATs Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição

Treg Células T reguladoras

Th17 Células T auxiliares tipo 17

TNF- α Fator de Necrose Tumoral alfa

TLR4 Receptor Toll-Like 4

THC Tetrahydrocannabinol

THCv Tetrahydrocannabivarina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1.	A Fisiopatologia da obesidade.....	21
2.2.	Aspectos fenotípicos das células do sistema imunológico na obesidade	24
2.3.	Medicamentos anti-obesidade e o fenômeno de reganho de peso.....	28
2.3.1	Fármacos para o tratamento da obesidade: prós e contras.....	28
2.3.2	Reganho de peso: “memória” da obesidade	33
2.4.	<i>Cannabis</i> medicinal: fitocanabinoides como potencial agente terapêutico na obesidade.....	37
3.	OBJETIVOS	48
3.1.	Objetivo geral	48
3.2.	Objetivos específicos.....	48
4.	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1.	Obtenção da <i>Cannabis</i> medicinal	50
4.2.	Delineamento do estudo.....	52
4.3.	Avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais	53
4.4.	Ensaio de citotoxicidade em linhagem celular de macrófago	55
4.5.	Ensaio de citotoxicidade em eritrócitos humanos	56
4.6.	Ensaio de citotoxicidade em PBMCs (Células mononucleares do sangue periférico)	57
4.7.	Avaliação de morte celular por citometria de fluxo em PBMCs marcadas com AnexinaV-PI	59
4.8.	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática para análise de citocinas produzidas..	60
4.9.	Extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e ensaio de citometria de fluxo	61
4.10.	Análise de dados por citometria de fluxo	62
4.11.	Análise estatística.....	66
5.	RESULTADOS	68
5.1.	Aspectos demográficos e clínicos de voluntários inseridos no estudo.....	68
5.2.	Perfil citotóxico e mecanismo de morte celular dos extratos brutos de <u>C. sativa</u> L. ricos em CBD, CBG e THCV	72
5.3.	Determinação do extrato bruto de <u>C. sativa</u> L. rico em fitocanabinoides com potencial imunomodulador frente a PBMCs de indivíduos com obesidade	78

5.4.	Avaliação da produção de citocinas do extrato bruto de <u>C. sativa</u> L. rico em tetrahydrocannabinol (THCv) frente a PBMCs de indivíduos eutróficos e obesos ...	81
5.5.	Atividade imunomoduladora do extrato bruto de C. sativa L. rico em tetrahydrocannabinol (THCv) frente a monócitos (CD14+) e linfócitos CD4+ de indivíduos eutróficos e com obesidade.....	84
6.	DISCUSSÃO	94
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS.....	109
	ANEXOS	120
	APÊNDICES	122

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial, comumente caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura visceral. Ela é definida quando um indivíduo possui um índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30, enquanto o sobrepeso é caracterizado por um IMC entre 25,0 e 29,9 (Rubino et al., 2025). Indivíduos com obesidade apresentam maior incidência de problemas de saúde relacionados ao excesso de peso, como diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose, condições frequentemente associadas a alterações na resposta inflamatória no tecido adiposo, que se estenderá por todo organismo (De Heredia; Gómez-Martínez; Marcos, 2012; Lin; Li, 2021; Misumi et al., 2019; Rubino et al., 2025).

O tecido adiposo, particularmente em sua fração vascular estromal, abriga células imunes com um perfil predominantemente Th2, que são essenciais para a manutenção da homeostase tecidual e da sensibilidade à insulina nos adipócitos. Neste ambiente, predominam macrófagos anti-inflamatórios (M2), células T reguladoras (Tregs), células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s), células T natural killer invariantes (iNKT), células natural killer (NK) e eosinófilos (Cinkajzlová; Mráz; Haluzík, 2017; Trim; Lynch, 2022). Contudo, à medida que ocorre a hiperplasia dos adipócitos, característica da obesidade, o ambiente tecidual sofre alterações, incluindo um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, em resposta à hipóxia local sinalizada pela produção de HIF-1 α pelos adipócitos. Este processo induz o recrutamento de macrófagos pró-inflamatórios (M1) para o tecido adiposo, levando à diminuição do caráter anti-inflamatório das células imunológicas residentes. A mudança no perfil celular e na produção de citocinas gera um desbalanço funcional no sistema imunológico, caracterizando a inflamação de baixo grau associada à obesidade (De Heredia; Gómez-Martínez; Marcos, 2012; Purdy; Shatzel, 2021).

Além de promoverem a inflamação, essas citocinas comprometem o armazenamento de triglicerídeos e aumentam a lipólise. Elas também interferem negativamente no processo de maturação dos adipócitos e na síntese adequada de triglicerídeos, o que, por sua vez, sustenta a ativação de vias pró-inflamatórias, como

NFkB e JNK. A via JNK, em particular, desempenha um papel central no desenvolvimento da resistência insulínica observada nesta população. Como resultado, ocorre um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, em especial TNF- α , que atuam regulando positivamente o mecanismo de manutenção da doença, perpetuando a inflamação crônica e contribuindo para o agravamento das comorbidades associadas à obesidade (De Heredia; Gómez-Martínez; Marcos, 2012; Makhijani et al., 2023; McLaughlin et al., 2017; Trim; Lynch, 2022; Yung; Giacca, 2020).

Os medicamentos anti-obesidade (AOMs) têm enfrentado desafios substanciais ao longo do tempo, devido a falhas anteriores como efeitos cardiovasculares adversos e risco de dependência. Drogas como sibutramina e rimonabant foram retiradas do mercado devido a efeitos indesejáveis. No entanto, com o avanço das terapias baseadas em agonistas do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1), como a semaglutida, aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2021, e a liraglutida, desde 2014, o cenário está mudando. Esses medicamentos têm demonstrado eficácia significativa na promoção da perda de peso, mas ainda apresentam efeitos colaterais, como náuseas e problemas gastrointestinais, além de riscos cardiovasculares raros (Müller et al., 2021; Perdomo et al., 2023; Sumithran; Finucane; Cohen, 2024). Além dos desafios associados aos AOMs, a taxa de reganho de peso após a interrupção do tratamento, seja farmacológico ou não farmacológico, continua a ser um obstáculo significativo. Esse reganho pode ser atribuído a fatores como adaptação do metabolismo, aumento do apetite e falta de adesão a tratamentos de longo prazo (Greenway, 2015). A inflamação crônica de baixo grau, um fator central na obesidade, pode também desempenhar um papel crucial no reganho de peso. Assim, estratégias para modular essa inflamação podem se mostrar benéficas como parte integral do tratamento da obesidade (Liu; Nikolajczyk, 2019; Van Baak; Mariman, 2023).

Neste contexto, a *Cannabis sativa* L. tem se destacado como uma fonte promissora para o tratamento de condições inflamatórias, devido à sua rica composição de fitocanabinoides. O Δ 9-tetraidrocanabinol (THC) é o principal composto psicoativo, enquanto o Δ 9-tetraidrocannabivarina (THCv), apesar de estruturalmente similar, não possui efeitos psicotrópicos. Outros canabinoides relevantes incluem o canabidiol (CBD),

o canabinol (CBN) e o canabigerol (CBG), cada um com propriedades terapêuticas distintas (Janecki et al., 2022; Jastrzab; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2022; Kogan et al., 2021). Estudos recentes demonstram que esses fitocanabinoides podem modular a inflamação crônica por interação direta com células do sistema imunológico, como agonistas de receptores canabinoides do tipo 2 (CBR2) ou através outras famílias de receptores metabotrópicos e ionotrópicos (Braile et al., 2021; Liu et al., 2022; Maayah et al., 2020; Péntzes et al., 2023). Atuando como agonistas ou antagonistas, esses compostos oferecem novas perspectivas como adjuvante na farmacoterapia da obesidade e de outras condições inflamatórias crônicas. Sendo assim, a hipótese desse trabalho é que a *Cannabis* medicinal pode restaurar a homeostase imunológica e melhorar a sinalização da insulina, contribuindo para o equilíbrio fisiológico e auxiliando no tratamento da obesidade. Desta forma, este estudo propõe investigar o potencial anti-inflamatório e imunometabólico de fitocanabinoides presentes em diferentes quimiotipos de *C. sativa* frente a inflamação crônica de baixo grau em pessoas com obesidade.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A Fisiopatologia da obesidade

Embora o IMC seja uma ferramenta amplamente utilizada para mensurar a obesidade, entende-se cada vez mais que essa condição é muito mais complexa. Atualmente, a obesidade é concebida como um estado “defendido” pelo organismo, caracterizado por uma resistência natural à perda de peso (Chandiwana et al., 2025). Esse entendimento ajuda a justificar o sucesso dos agonistas do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), que modulam o apetite e o metabolismo, desempenhando um papel comparável ao da insulina no tratamento do diabetes ou dos medicamentos anti-hipertensivos nas doenças cardíacas — tema que será abordado no subtópico 4 desta fundamentação teórica (Busetto et al., 2021).












Dessa forma, o novo conceito de obesidade (Figura 1) sugerido pela comissão formada pelos principais 56 pesquisadores mundiais da área (Rubino et al., 2025), define a obesidade como uma condição caracterizada pelo excesso de tecido adiposo no corpo, que pode ocorrer com ou sem alterações na distribuição e função desse tecido. Essa condição possui causas multifatoriais, ainda não totalmente compreendidas, e quando esse excesso de gordura começa a afetar a função dos órgãos e tecidos, ela pode ser classificada como obesidade clínica, uma doença crônica e sistêmica. Nessa fase, a obesidade pode causar danos significativos a órgãos vitais, levando a complicações graves como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência renal, que impactam severamente a qualidade e a expectativa de vida do indivíduo.

Antes do desenvolvimento dessas complicações, existe uma fase denominada obesidade pré-clínica, na qual o excesso de gordura está presente, mas os órgãos e tecidos ainda mantêm suas funções normais. Nesta fase, os indivíduos apresentam um risco aumentado de evoluir para a obesidade clínica, além de desenvolverem outras doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e transtornos mentais (Rubino et al., 2025).

Para avaliar o risco e confirmar a presença de excesso adiposo, o IMC pode ser usado como uma medida prática em nível populacional, mas não é suficiente para avaliar a saúde individual. Por isso, é recomendado o uso de medidas adicionais, como a circunferência da cintura ou a relação cintura-quadril, que ajudam a identificar a quantidade e distribuição da gordura corporal, levando em conta fatores como idade, gênero e etnia. Todavia, em pessoas com IMC muito elevado (acima de 40 kg/m²), o excesso de gordura pode ser assumido sem necessidade de confirmação adicional (Chandiwana et al., 2025; Rubino et al., 2025).

Além disso, de acordo com Rubino e colaboradores (2025), o diagnóstico formal de obesidade clínica deve considerar não apenas o excesso de gordura, mas também a presença de prejuízos na função de órgãos ou limitações significativas nas atividades diárias, especialmente aquelas que envolvem mobilidade e cuidados básicos. Além da avaliação clínica, exames laboratoriais básicos são recomendados para pacientes com excesso de gordura confirmado, incluindo hemograma completo, glicemia, perfil lipídico e testes de função renal e hepática, de forma a identificar precocemente possíveis alterações metabólicas e monitorar a saúde geral do indivíduo.

Figura 1. Obesidade clínica e pré-clínica

	Preclinical obesity	Clinical obesity
Excess adiposity	<div><div>✓  (BMI)</div><div>+</div><div><div>✓ </div><div>(Waist circumference, etc)</div></div></div>	<div><div>✓  (BMI)</div><div>+</div><div><div>✓ </div><div>(Waist circumference, etc)</div></div></div>
Mechanisms and pathophysiology	<div>Alterations of cells and tissue → Alterations of organ structure</div>	<div>Alterations of organ function → End-organ damage</div>
Clinical manifestations	Minor or absent (substantially preserved organ function)	<div>Signs and symptoms</div> <div>Limitations of daily activities</div> <div>Complications</div>
Detection and diagnosis	<div>Anthropometrics, medical history, review of organ systems, and further diagnostic assessment as needed</div> <div>  </div>	<div>   </div>

Fonte: Rubino e colaboradores (2025). Quadro comparativo entre obesidade pré-clínica e obesidade clínica. Ambas apresentam excesso de adiposidade, avaliado por IMC e medidas como circunferência da cintura. Na obesidade pré-clínica, há alterações iniciais em células e tecidos que evoluem para mudanças na estrutura dos órgãos, mas com função preservada, resultando em manifestações clínicas mínimas ou ausentes. Já na obesidade clínica, ocorrem alterações na função dos órgãos, levando a sinais e sintomas, limitações nas atividades diárias e, eventualmente, complicações graves com danos a órgãos. O diagnóstico em ambos os estágios envolve medidas antropométricas, histórico médico, revisão dos sistemas orgânicos e avaliações diagnósticas adicionais conforme necessário.

Além do diagnóstico e avaliação clínica da obesidade, é fundamental entender os fatores que levam ao seu desenvolvimento. Segundo Lingvay e colaboradores (2024), o acúmulo excessivo de gordura corporal que leva à obesidade resulta de um balanço energético positivo sustentado. No entanto, as causas desse desequilíbrio são complexas, envolvendo interações entre fatores biológicos, ambientais, comportamentais, socioculturais e econômicos. O ambiente obesogênico, caracterizado por fatores como maior disponibilidade e marketing de alimentos, tamanhos maiores de porções e aumento do sedentarismo, é um principal impulsionador do aumento da obesidade nas últimas décadas.

Além disso, a obesidade está associada a uma série de genes, cada um com efeito individual pequeno sobre o índice de massa corporal (IMC). Muitos desses genes são predominantemente expressos no sistema nervoso central. Genes específicos, como aqueles relacionados à via leptina-melanocortina, desempenham papéis cruciais na regulação da ingestão alimentar. Mutações no gene do receptor de melanocortina-4, responsáveis por obesidade monogênica, são comuns em casos de obesidade severa e exemplificam a complexidade da obesidade, que pode ser vista como um conjunto de subtipos ou diferentes condições que resultam em excesso de tecido adiposo e deterioração da saúde (Lin; Li, 2021; Lingvay et al., 2024).

Além das causas e mecanismos genéticos, é importante compreender as mudanças fisiológicas associadas ao acúmulo de tecido adiposo. O acúmulo de lipídios, predominantemente triglicerídeos, no tecido adiposo ocorre junto com aumentos volumétricos no músculo esquelético, fígado e outros órgãos (Greenway, 2015). Em indivíduos obesos com peso estável, observa-se uma maior massa gorda e magra, além de maior gasto energético em repouso, débito cardíaco, pressão arterial e massa de

células β pancreáticas, em comparação com indivíduos sem sobrepeso ou obesidade. Com o tempo, o excesso de lipídios se distribui em diversos compartimentos corporais, com o tecido adiposo subcutâneo armazenando a maior parte desses lipídios, enquanto adipócitos marrons e bege estão presentes em menores quantidades em adultos (Greenway, 2015; Heymsfield; Wadden, 2017; Lingvay et al., 2024).

A obesidade é acompanhada por uma inflamação sistêmica de baixo grau, onde há um aumento de macrófagos e outras células imunológicas no tecido adiposo, particularmente devido à remodelação tecidual em resposta à apoptose dos adipócitos. Essas células imunológicas secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1, IL-8 e TNF- α , contribuindo para a resistência à insulina frequentemente observada em pacientes obesos. O tecido adiposo visceral, em particular, embora menor que o subcutâneo, está fortemente associado a distúrbios metabólicos e consequências adversas da obesidade, incluindo hipertensão e diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) (Heymsfield; Wadden, 2017; Purdy; Shatzel, 2021; Van Baak; Mariman, 2023).

Essas alterações no tecido adiposo visceral acarretam efeitos sistêmicos que contribuem para diversas complicações clínicas. Por exemplo, o acúmulo de gordura ao redor dos rins pode elevar a pressão arterial, exacerbando a hipertensão, enquanto o aumento dos tecidos moles faríngeos pode obstruir as vias aéreas durante o sono, levando à apneia obstrutiva do sono. Adicionalmente, o excesso de adiposidade impõe uma carga mecânica nas articulações, tornando a obesidade um fator de risco significativo para o desenvolvimento de osteoartrite. O aumento da pressão intra-abdominal também pode estar relacionado ao maior risco de doença do refluxo gastroesofágico, esôfago de Barrett e adenocarcinoma esofágico em indivíduos obesos (De Heredia; Gómez-Martínez; Marcos, 2012; Heymsfield; Wadden, 2017).

2.2. Aspectos fenotípicos das células do sistema imunológico na obesidade

A obesidade é caracterizada por uma ativação crônica de baixo grau do sistema imune, impulsionada por um microambiente inflamatório no qual citocinas pró-

inflamatórias, como IFN- γ (perfil Th1 em linfócitos) e TNF- α (perfil M1 em macrófagos), desempenham um papel central. A sinalização dessas moléculas estimula a secreção de quimiocinas, como CCL5 e MCP-1, promovendo o recrutamento de monócitos e linfócitos para o tecido adiposo – um fenômeno observado tanto em modelos animais quanto em humanos. Esse influxo celular resulta no aumento da infiltração de macrófagos, que, ao interagirem com adipócitos e pré-adipócitos, amplificam a resposta inflamatória e contribuem para a disfunção endotelial e metabólica (Cinkajzlová; Mráz; Haluzík, 2017; Engin, 2017; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Durante a obesidade, a ativação do eixo MCP-1/CCR2 facilita a migração de monócitos para o subendotélio vascular, onde interagem com lipoproteínas oxidadas (ox-LDL), originando células espumosas, um estágio inicial da formação de placas ateroscleróticas. Além disso, macrófagos ativados na obesidade sintetizam grandes quantidades de IL-12, IL-23 e Inos, promovendo um perfil inflamatório sustentado por meio da ativação dos receptores do tipo Toll (TLR)(Chávez-Galán et al., 2015; Kapellos et al., 2019; Kwaifa et al., 2020). Evidências mostram que o número de macrófagos no tecido adiposo aumenta proporcionalmente ao grau de obesidade, com uma transição do fenótipo anti-inflamatório (M2) para o pró-inflamatório (M1). Essa mudança, impulsionada por dietas hiperlipídicas, reforça a hipótese de que a obesidade induz um microambiente inflamatório persistente, elevando os níveis sistêmicos de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-12 (Chávez-Galán et al., 2015; Kapellos et al., 2019).

Nesse cenário, a mieloperoxidase (MPO), uma enzima abundante em neutrófilos e monócitos, emerge como um elo potencial entre a inflamação da obesidade e o aumento do risco cardiovascular. Ao gerar espécies reativas de oxigênio, a MPO contribui para o estresse oxidativo e a inflamação, promovendo a oxidação da LDL e favorecendo a progressão da aterosclerose. Estudos epidemiológicos e experimentais indicam que monócitos com alta expressão de MPO estão associados a um maior risco de doenças cardiovasculares, sugerindo um papel ativo dessa enzima na fisiopatologia inflamatória e metabólica da obesidade (Aratani, 2018; Catellier et al., 2008; Khine et al., 2017; Matijevic et al., 2011; Ndrepepa, 2019; Oyenuga et al., 2018; Wildgruber et al., 2016).

Os linfócitos representam a primeira linha de resposta imune ao estresse metabólico induzido pela obesidade no tecido adiposo, reagindo precocemente aos produtos de adipócitos hipertróficos e contribuindo para o subsequente recrutamento de monócitos, sua ativação e diferenciação em macrófagos. No microambiente adiposo, essas células linfoides incluem células natural killer (NK) e células natural killer T (NKT), além de células da imunidade adaptativa, como linfócitos T auxiliares (Th), linfócitos T citotóxicos (Tc) e células B. Em humanos, os linfócitos CD4⁺ constituem a principal população linfocitária no tecido adiposo, desempenhando papéis distintos de acordo com o reconhecimento de citocinas presentes no microambiente (Cinkajzlová; Mráz; Haluzík, 2017; Shirakawa; Sano, 2023).

Os linfócitos CD4⁺ podem se diferenciar em subtipos funcionais específicos, cada um associado a perfis inflamatórios distintos. As células Th1 e Th17, impulsionadas por IFN- γ e IL-6/TGF- β , respectivamente, favorecem respostas pró-inflamatórias, incluindo a indução da polarização de macrófagos para o fenótipo M1. Em contraste, as células Th2 e regulatórias (Tregs), moduladas por IL-4 e TGF- β , exercem um papel anti-inflamatório, promovendo a diferenciação de macrófagos M2 e a manutenção da homeostase tecidual. Estudos recentes destacam o papel crítico das células CD4⁺ no equilíbrio imunológico do tecido adiposo durante a progressão da obesidade e suas complicações metabólicas, sendo sua frequência positivamente correlacionada com o índice de massa corporal (IMC) em humanos (Valentine; Nikolajczyk, 2024; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018).

Com a progressão da obesidade, há uma expansão das populações de linfócitos Th1 no tecido adiposo, superando a influência das células Th2, que são essenciais para a homeostase do tecido adiposo em indivíduos eutróficos. Tanto células Th1 quanto Th2 demonstram aumento da produção de citocinas associadas à inflamação crônica de baixo grau, mesmo em indivíduos obesos não diabéticos, marcando um perfil inflamatório alterado em comparação com indivíduos eutróficos. Esse aumento das citocinas Th1 e Th2 está diretamente relacionado ao desenvolvimento de estados pré-diabéticos. Por outro lado, em camundongos, as células Th2 ao secretarem citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, demonstraram reverter o ganho de peso corporal e melhorias significativas na tolerância à glicose, aumento da sensibilidade à insulina e

redução do ganho de peso (Cinkajzlová; Mráz; Haluzík, 2017; McLaughlin et al., 2017; Shirakawa; Sano, 2023; Valentine; Nikolajczyk, 2024).

Em pacientes com diabetes tipo 2, a população de células Th1 no tecido adiposo está aumentada e correlaciona-se com a resistência à insulina. Relatos indicam que indivíduos obesos resistentes à insulina apresentam níveis elevados de células Th17 no tecido adiposo subcutâneo abdominal em comparação com aqueles obesos, porém sensíveis à insulina. Além disso, níveis elevados de IL-17 foram detectados tanto em indivíduos obesos quanto em pacientes com diabetes tipo 2. Em modelos murinos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, as populações esplênicas de células Th17 e os níveis circulantes de IL-17 aumentaram de maneira dependente de IL-6, contribuindo para a inibição da sinalização da insulina nos hepatócitos e para a redução da captação de glicose pelo músculo esquelético. A via AKT-Mtor-quinase beta-1 da proteína ribossomal S6 (rpS6K1), conhecida por regular o metabolismo celular e a resposta inflamatória, parece ter um papel crítico na diferenciação de células Th17. A inibição dessa via em animais normopeso afetou a expressão de Gfi1, um regulador negativo da diferenciação de Th17 (Kurebayashi et al., 2012; Shirakawa; Sano, 2023; Wang et al., 2018).

A ecto-nucleotidase CD73 também é importante neste balanço supressivo. Sua função é converter AMP em adenosina que é uma molécula crucial na função supressora das linfócitos T CD4⁺ de perfil regulador (Tregs), ademais, juntamente com outra ecto-nucleotidase que hidrolisa ATP em ADP e AMP: a CD39, elas desempenham um papel essencial na modulação da resposta inflamatória pela redução dos níveis de AMP cíclico nos linfócitos. É observado que no contexto obesogênico, há uma redução na expressão de CD73 de Tregs no tecido adiposo visceral (VAT) que é diretamente proporcional ao aumento da expressão do receptor ST2 (eixo ST2/IL33, importante na obesidade). Para a homeostase destas células no microambiente, Tregs CD73^{high} ST2^{low} e CD73^{low} ST2^{high} são encontradas na mesma proporção (Li et al., 2021; Torres et al., 2023).

Em indivíduos eutróficos, uma proporção significativa de Tregs no VAT expressa o receptor de insulina (CD220) que responde adequadamente à insulina para regular a inflamação sem comprometer a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 (Han et al., 2014). De maneira ainda não elucidada molecularmente, esta

subpopulação de Treg é sensível a insulina mesmo em ambiente hiperinsulinêmico associado à obesidade (Li et al., 2021).

Em indivíduos obesos, a frequência de células T CD4+ de perfil regulador no VAT diminui, enquanto há um aumento na prevalência de células T de caráter pro-inflamatórias, como Th1 e Th17. Esta mudança no perfil celular reflete uma transição de um ambiente anti-inflamatório para um ambiente pró-inflamatório (Liu; Nikolajczyk, 2019). A mudança na proporção de macrófagos M1 para M2 e a função reduzida das Tregs exacerbam a inflamação no tecido adiposo e a resistência à insulina (Guo, 2014; Han et al., 2014; Li et al., 2021; Liu; Nikolajczyk, 2019). As Tregs residentes no VAT de indivíduos eutróficos produzem IL-10, que exerce um efeito inibitório sobre a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 e restaura a função do GLUT4 em adipócitos (Li et al., 2021; Trim; Lynch, 2022). No entanto, na obesidade, a produção de IL-10 por Tregs é reduzida devido à ativação permanente da via de sinalização AKT-mTOR-proteína ribossomal S6 (rpS6K1), comprometendo sua capacidade de suprimir a inflamação induzida por TNF- α (Han et al., 2014; Laplante; Sabatini, 2012; Li et al., 2021). Esses subconjuntos de células T residentes no tecido adiposo têm a capacidade de circular no sangue periférico (Burton et al., 2024), o que pode levar a alterações sistêmicas.

2.3. **Medicamentos anti-obesidade e o fenômeno de reganho de peso**

2.3.1 **Fármacos para o tratamento da obesidade: prós e contras**

O tratamento da obesidade é multiesferas e, além de mudanças no estilo de vida, a terapia medicamentosa desempenha um papel importante no manejo do peso corporal (Sumithran; Finucane; Cohen, 2024; Yárnoz-Esquiros et al., 2022). Os medicamentos antiobesidade (AOMs) são desenvolvidos para ajudar na redução de peso, muitas vezes atuando através da supressão do apetite, aumento da saciedade ou diminuição da absorção de nutrientes (Müller et al., 2021; Perdomo et al., 2023; Schmitz; Aronne, 2023; Sumithran; Finucane; Cohen, 2024).

A fentermina é uma amina simpaticomimética conhecida por suprimir o apetite, reduzindo, assim, a ingestão alimentar. Aprovada em 1959 para o tratamento de curto

prazo da obesidade (menos de 3 meses), a fentermina é atualmente o medicamento antiobesidade (AOM) mais prescrito nos Estados Unidos. Sua aprovação para uso de curto prazo se deve ao fato de que os dados de segurança disponíveis na época eram baseados em estudos de curta duração, e a compreensão da obesidade como uma condição crônica ainda era limitada (Perdomo et al., 2023). Além disso, a fentermina é aprovada para uso em adolescentes de 16 a 18 anos. Entre os efeitos colaterais mais comuns estão elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, ansiedade, insônia, boca seca, constipação, irritabilidade e palpitações. A fentermina é classificada como uma substância controlada de classe IV, e deve-se evitar sua administração à noite para prevenir a insônia (Schmitz; Aronne, 2023). Embora originalmente aprovada para uso de curto prazo, muitos médicos prescrevem fentermina *off-label* para uso prolongado, visando a manutenção do peso a longo prazo. Outras aminas simpaticomiméticas, como fendimetrazina e dietilpropiona, também são aprovadas para o tratamento de curto prazo da obesidade, mas são menos utilizadas que a fentermina. Estas substâncias são classificadas como controladas nas classes IV e III, respectivamente (Perdomo et al., 2023; Schmitz; Aronne, 2023).

A combinação de fentermina e topiramato de liberação prolongada é um medicamento de dose fixa aprovado em 2012 para o tratamento de longo prazo da obesidade. A fentermina atua como uma amina simpaticomimética, enquanto o topiramato, aprovado pela FDA para o tratamento de epilepsia e profilaxia de enxaqueca, mostrou reduzir o peso corporal ao diminuir a ingestão calórica e promover aversão ao sabor (Müller et al., 2021; Schmitz; Aronne, 2023). O topiramato é teratogênico, portanto, mulheres em idade fértil devem realizar teste de gravidez antes de iniciar o medicamento e utilizar contracepção eficaz durante o tratamento. Efeitos colaterais incluem elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, boca seca, constipação, parestesias, náuseas, vômitos, insônia, tontura, ansiedade, irritabilidade, comprometimento cognitivo e distúrbios de atenção (Schmitz; Aronne, 2023).

A bupropiona, um inibidor da recaptação de norepinefrina e dopamina, e a naltrexona, um antagonista dos receptores opioides, são aprovadas pela FDA como uma combinação em pílula de dose fixa para o manejo de peso a longo prazo. A bupropiona

estimula os neurônios proopiomelanocortina (POMC) no hipotálamo, resultando em redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético. A naltrexona bloqueia a autoinibição do POMC, potencializando os efeitos da bupropiona. A combinação bupropiona/naltrexona produz maior perda de peso (9,3% com tratamento versus 5,2% com placebo). Efeitos colaterais incluem náuseas, vômitos, constipação, diarreia, elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, insônia, boca seca e elevação de enzimas hepáticas, com relatos de hepatotoxicidade em pacientes utilizando naltrexona (Perdomo et al., 2023; Schmitz; Aronne, 2023).

A liraglutida é um agonista do receptor de peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) aprovado pela FDA para o tratamento da obesidade em adultos e crianças a partir de 12 anos com obesidade e peso corporal acima de 60 kg. O GLP-1 é um hormônio incretínico que atua no trato gastrointestinal para reduzir o esvaziamento gástrico, aumentando assim a saciedade. O receptor de GLP-1 também está presente no cérebro, onde participa da regulação do apetite. Pacientes tratados com liraglutida perderam em média 6,2% de peso adicional em comparação a 0,2% no grupo placebo (Müller et al., 2021; Schmitz; Aronne, 2023).

A semaglutida é um agonista do receptor GLP-1 de longa duração, aprovado pela FDA para o manejo crônico do peso em adultos e pacientes pediátricos a partir de 12 anos com IMC igual ou superior ao percentil 95, padronizado por idade e sexo. A semaglutida retarda o esvaziamento gástrico, reduzindo a ingestão de energia, além de atuar diretamente no cérebro para reduzir a recompensa e os desejos alimentares. É considerado o AOM mais eficaz disponível, pois produziu a maior redução percentual no peso corporal em ensaios clínicos, com perda de peso de 15,8% no grupo tratado com semaglutida em comparação a 6,4% no grupo tratado com liraglutida. A redução média de peso foi de 14,9% no grupo tratado com 2,4 mg de semaglutida versus 2,4% no grupo placebo. Efeitos colaterais da liraglutida e da semaglutida incluem náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, constipação, dispepsia, fadiga, pancreatite aguda, colecistite aguda, lesão renal aguda secundária à desidratação, hipoglicemia (especialmente em pacientes com diabetes tipo 2 em uso concomitante de insulina ou secretagogos de insulina) e

elevação da frequência cardíaca (Müller et al., 2021; Perdomo et al., 2023; Schmitz; Aronne, 2023).

Por um tempo, este fármaco foi considerado o melhor AOM disponível no mercado, porém foi observado que a farmacoterapia com semaglutida ainda está sujeita ao reganho de peso, um fenômeno observado em todos os tratamentos farmacológicos e não farmacológicos (terapias endoscópicas, hidrogeis orais, gastroplastia endoscópica, balão intragástrico e cirurgia bariátrica), contra a obesidade. Em um estudo, a perda de peso média foi de 10,6% entre os 803 pacientes que completaram o período inicial do estudo. Aqueles que continuaram com a semaglutida perderam mais 7,9% do peso corporal, enquanto os que mudaram para o placebo recuperaram 6,8% do peso corporal (Müller et al., 2021; Perdomo et al., 2023; Schmitz; Aronne, 2023; Sumithran; Finucane; Cohen, 2024).

Um novo medicamento denominado Tirzepatida (TZP) foi desenvolvido, consistindo em um co-agonista de GLP-1e do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) (Fareed et al., 2025). Tal fármaco demonstrou elevada eficácia em termos de perda de peso, alcançando aproximadamente 25% de redução do peso corporal ao longo de um período de 1,5 anos. Ademais, verificou-se que a TZP apresenta efeitos benéficos nas comorbidades associadas à obesidade além da perda de peso, tais como melhorias no diabetes tipo 2 (T2DM), nas doenças cardiovasculares (CVDs), na doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e na síndrome da apneia obstrutiva do sono (OSAS) (Cai et al., 2024; Melson et al., 2025; Rochira et al., 2024; Willard et al., 2020).

Observou-se por Rochira e colaboradores (2024) que o impacto da TZP na diminuição da massa gorda total parece superar o efeito de outros fármacos antiobesidade e do placebo (modificação do estilo de vida), porém tal efeito ocorre aparentemente em doses elevadas de TZP (10 e 15 mg). Além disso, a TZP, em qualquer dose, aparenta determinar um decréscimo significativo na gordura visceral pelo mesmo período.

Por outro lado, conforme constatado por Mishra et al., (2023), a TZP apresenta alguns efeitos adversos, majoritariamente de natureza gastrointestinal, sendo náusea e

diarreia os eventos mais frequentemente relatados. Ademais, no que concerne às interações medicamentosas, ao iniciar o tratamento com TZP, deve-se considerar cuidadosamente a redução da dose de insulina ou secretagogos de insulina (por exemplo, sulfonilureias) administrados concomitantemente, a fim de evitar episódios de hipoglicemia. Outrossim, considerando-se que a tirzepatida (TZP) retarda o esvaziamento gástrico, tal efeito pode comprometer a absorção de medicamentos orais administrados concomitantemente — por exemplo, pacientes em uso de contraceptivos orais devem ser orientados a migrar para métodos contraceptivos não orais. Dessa forma, torna-se imprescindível cautela quanto ao uso de fármacos cuja eficácia dependa de concentrações limiares, especialmente aqueles com estreito índice terapêutico, como a varfarina.

Estudo realizado por Aronne et al., (2023), avaliou o impacto da continuidade versus interrupção do tratamento com TZP em indivíduos com obesidade ou sobrepeso. Inicialmente, 783 participantes receberam semanalmente a dose subcutânea máxima tolerada (10 ou 15 mg) por 36 semanas, sendo então randomizados (1:1) para manter a TZP ou trocar para placebo por mais 52 semanas. Ao final do acompanhamento, 89,5% dos participantes que continuaram o uso mantiveram pelo menos 80% da perda de peso obtida no período inicial, contra apenas 16,6% no grupo placebo. Entre as semanas 36 e 88, a variação percentual média do peso foi de -5,5% no grupo TZP versus +14,0% no placebo (diferença: -19,4%), com redução total média de 25,3% e 9,9%, respectivamente, desde o início do estudo. Os achados evidenciam que a suspensão do fármaco levou a um reganho substancial do peso perdido — fenômeno comum a todos os AOMs — enquanto a manutenção do tratamento preservou e potencializou a redução ponderal inicial.

Ao comparar-se com a semaglutida, foi observado por Rodriguez et al., (2024), em uma população clínica de adultos com sobrepeso ou obesidade, que os pacientes tratados com tirzepatida apresentaram maior probabilidade de alcançar perda de peso significativa. As alterações ponderais durante o tratamento foram mais expressivas nos pacientes que receberam TZP aos 3 meses (diferença de -2,4%), 6 meses (diferença de

–4,3%) e 12 meses (diferença de –6,9%) de tratamento. As taxas de eventos adversos gastrointestinais foram similares entre os grupos.

Tal eficácia pode estar relacionada com achados recentes, nos quais Wang et al., (2025) observaram, em camundongos C57BL/6J com seis semanas de idade, que a TZP atenuou a disbiose induzida por dieta rica em gorduras, alterando a composição e diversidade da microbiota intestinal. A microbiota intestinal tem sido implicada como um fator crucial na obesidade relacionada à dieta (Zhang et al., 2015). Após a exposição à dieta rica em gorduras, a abundância de certos gêneros bacterianos, incluindo *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Mucispirillum*, *Enterococcus* e *Alistipes*, declinou significativamente, enquanto *Faecalibaculum*, *Allobaculum* e *Ileibacterium* apresentaram aumento notável. A intervenção com TZP facilitou a restauração da homeostase da microbiota intestinal após a exposição à dieta rica em gorduras (Wang et al., 2025).

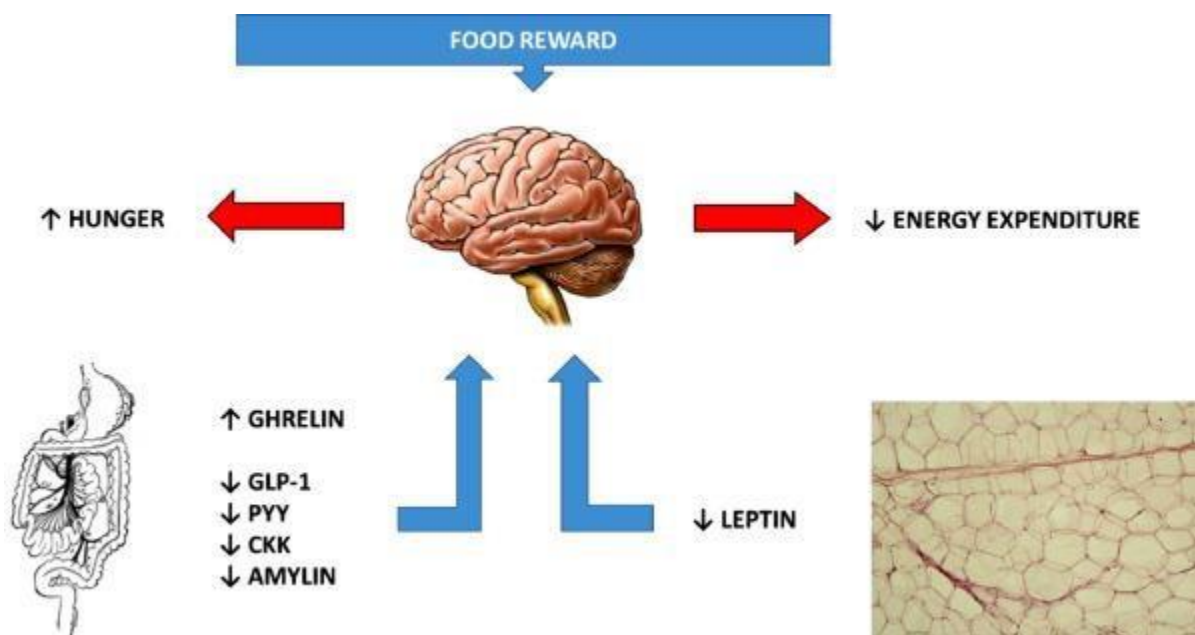
2.3.2 Reganho de peso: “memória” da obesidade

Garantir uma ingestão energética adequada às necessidades do organismo é essencial para a sobrevivência, graças a isso, O reganho de peso é frequente após qualquer tentativa de perda ponderal voluntária (Leibel; Rosenbaum; Hirsch, 1995). Como descrevem Busetto e colaboradores (2021), os hormônios intestinais foram identificados como reguladores-chave da homeostase energética, atuando em circuitos cerebrais homeostáticos e hedônicos para modular o comportamento alimentar. Esses mecanismos fisiológicos evoluíram em contextos nos quais a disponibilidade de energia era limitada. Assim, a restrição calórica aciona potentes respostas compensatórias, destinadas a resistir à perda de peso e defender um peso corporal mais elevado (como esquematizado na figura 2). Perfis alterados de secreção hormonal intestinal são parte fundamental dessa resposta, contribuindo para o reganho de peso após perda induzida por dieta.

Um estudo de Sumithran et al., (2011) trouxe evidências relevantes sobre o papel dos hormônios intestinais no reganho de peso. Cinquenta participantes com obesidade grave foram acompanhados por 52 semanas após uma dieta muito baixa em calorias

(VLED) de 10 semanas. A perda de peso média foi de $13,5 \pm 0,5$ kg ao final da intervenção e $7,9 \pm 1,1$ kg após um ano. Relatos de aumento da fome, desejo e urgência em comer foram frequentes. Ao final da VLED, observou-se redução significativa nos hormônios anorexígenos Peptídeo YY3–36 (PYY), colecistocinina (CCK) e amilina, bem como nos níveis de insulina e leptina. Em contrapartida, houve aumento nos níveis do hormônio orexigênico grelina, além de elevação do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e do polipeptídeo pancreático (PP). Após 52 semanas, o peso corporal retornou aos valores pré-intervenção, e as alterações desfavoráveis nos hormônios intestinais, assim como a fome aumentada, persistiram.

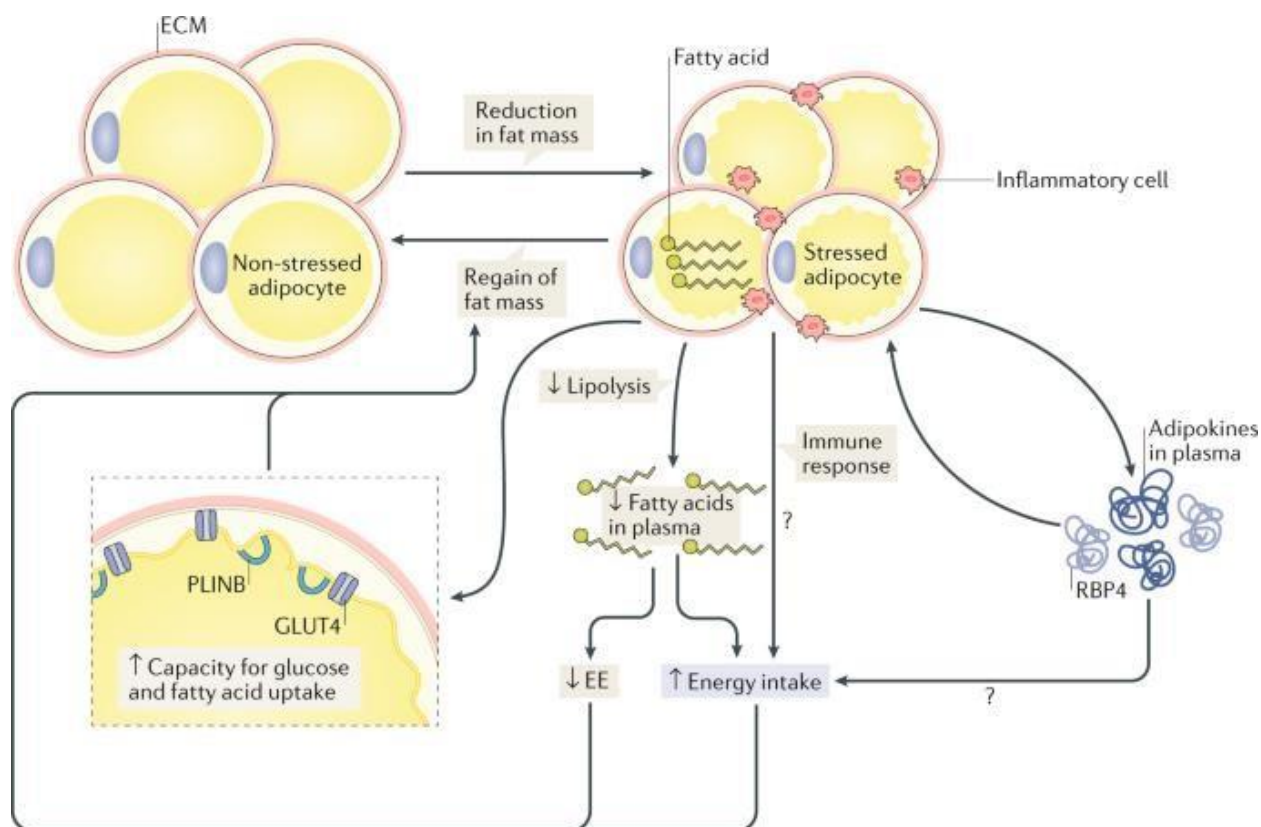
Figura 2. Hormônios que atuam como sinais que regulam a fome e o gasto energético



Fonte: Busetto e colaboradores (2021). Esquema ilustrando os sinais periféricos que atuam no cérebro para regular a fome e o gasto energético em resposta à perda de peso. O aumento do hormônio orexigênico grelina e a redução dos hormônios anorexígenos GLP-1, PYY, CCK e amilina, junto com a queda dos níveis de leptina provenientes do tecido adiposo, ativam neurônios hipotalâmicos que elevam a sensação de fome e diminuem o gasto energético. Esses processos favorecem a ativação dos mecanismos centrais relacionados ao prazer e à recompensa alimentar.

A perda de peso por restrição dietética também afeta outros componentes desse sistema complexo, incluindo a secreção de ácidos biliares, o tecido adiposo e o microbioma intestinal (Greenway, 2015). A redução ponderal leva à diminuição do tamanho dos adipócitos, com aumento relativo da matriz extracelular (ECM) (Van Baak; Mariman, 2019). Essa alteração mecânica induz estresse celular, inflamação e estresse oxidativo, acompanhados por secreção alterada de adipocinas (como a proteína ligadora de retinol 4 – RBP4) e redução da lipólise. Tais mudanças podem reduzir o gasto energético (EE) e aumentar a ingestão alimentar, favorecendo o reganho de massa gorda e peso corporal, aliviando o estresse celular. Além disso, as células passam a expressar maior capacidade de captação de glicose (via GLUT4) e de ácidos graxos (via perilipina 1 isoforma B – PLINB), facilitando o novo acúmulo de gordura (Figura 3).

Figura 3. Modelo de funcionamento do papel das alterações no tecido adiposo induzidas pela perda de peso no reganho ponderal



Fonte: van Baak e Mariman (2019). Esquema ilustrando as alterações no tecido adiposo durante a perda e o reganho de peso. A redução da massa de gordura leva à diminuição de adipócitos estressados, com menor inflamação e melhor captação de glicose e ácidos graxos. Contudo, respostas metabólicas e imunes — incluindo menor gasto energético, maior ingestão alimentar e liberação de adipocinas — podem favorecer o reganho de gordura, restabelecendo o ciclo inflamatório.

Em condições de restrição energética contínua, pode não ocorrer remodelamento da ECM, limitando reduções adicionais no tamanho dos adipócitos e levando-os a retornar ao tamanho original, contribuindo para o reganho ponderal. Ácidos biliares e microbioma intestinal, também respondem a mudanças dietéticas como as promovidas por VLEDs; contudo, o impacto de longo prazo dessas alterações na manutenção ou no reganho de peso ainda não está claramente estabelecido (Alemán et al., 2018; Van Nierop et al., 2017).

Há evidências de que uma memória de obesidade impressa em células imunes durante os períodos de obesidade e perda de peso contribui para um risco aumentado de reganho de peso (Greenway, 2015; van Baak; Mariman, 2023). Essa memória está associada às células T CD4+, que desempenham um papel crucial no aumento do peso após a perda (Van Baak; Mariman, 2023; Zou et al., 2018). Estudos em camundongos mostraram que a depleção sistêmica dessas células T CD4+ leva à eliminação da memória de obesidade (Zou et al., 2018).

Em humanos, uma conexão semelhante foi sugerida pelo estudo YoYo, que investigou o impacto de diferentes dietas na perda e manutenção de peso. Nesse estudo de Vink et al., (2016), indivíduos com sobrepeso ou obesidade perderam 8% do peso corporal em dietas de baixa caloria (1.250 kcal/dia) ou muito baixa caloria (500 kcal/dia) durante a fase de perda de peso. Após 4 semanas em uma dieta equilibrada para manutenção do peso, foram acompanhados por 9 meses, durante os quais o reganho de peso foi registrado. A análise da expressão de 277 genes da ECM no tecido adiposo subcutâneo revelou que mudanças na expressão de genes de integrina estavam correlacionadas com o percentual de reganho de peso, especialmente em indivíduos que seguiram uma VLED. As pessoas com menor redução na expressão desses genes

específicos de leucócitos nas semanas após a perda de peso foram mais propensas ao reganho de peso. Esses resultados corroboram a ideia de uma memória de obesidade composta por células mieloides persistentes em humanos, embora haja variação individual em relação a esse fenômeno.

Desta forma, van Baak e Mariman (2023), hipotetizam que essa memória inflamatória da obesidade, baseada em células imunes, pode desempenhar um papel significativo no risco de reganho de peso em humanos. Isso porque, segundo os autores, as enzimas modificadoras da ECM secretadas por macrófagos não só podem influenciar a infiltração de células imunes, mas também contribuir para a memória de obesidade. Com a expansão dos adipócitos, a ECM pode perder sua dinâmica, uma vez que a hipóxia compromete o funcionamento de enzimas modificadoras do colágeno, como a lisil-oxidase e a prolil-4-hidroxilase (Mariman; Wang, 2010).

Essa perda de dinamismo pode limitar o crescimento adicional e ajustar o sinal dos adipócitos para reduzir a ingestão e armazenamento de energia. Durante o desenvolvimento da obesidade, as enzimas modificadoras da ECM secretadas por macrófagos podem enfraquecer a ECM, reduzindo a resistência ao crescimento e à ingestão de energia. Após a perda de peso, algumas células imunes permanecem no tecido adiposo e, diante de um novo desafio por balanço energético positivo (como o retorno ao padrão alimentar anterior), essas enzimas estão prontamente disponíveis para remodelar a ECM. Isso facilita o crescimento dos adipócitos e o reganho de peso. A participação de células imunes também sugere que citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias podem influenciar o risco de reganho de peso (Ambeba et al., 2013; Sougiannis et al., 2020).

2.4. ***Cannabis* medicinal: fitocanabinoides como potencial agente terapêutico na obesidade**

A *Cannabis sativa* L. é amplamente utilizada para fins medicinais devido à sua rica

composição de compostos farmacologicamente ativos, conhecidos como fitocanabinoides. Esses compostos têm mostrado grande potencial no tratamento de diversas condições, como dor crônica, inflamação, esclerose múltipla, epilepsia e distúrbios metabólicos. A ação medicinal da *C. sativa* está fortemente associada à sua capacidade de interagir com o sistema endocanabinoide (ECS), que regula processos fisiológicos essenciais (Braile *et al.*, 2021; Maayah *et al.*, 2020).

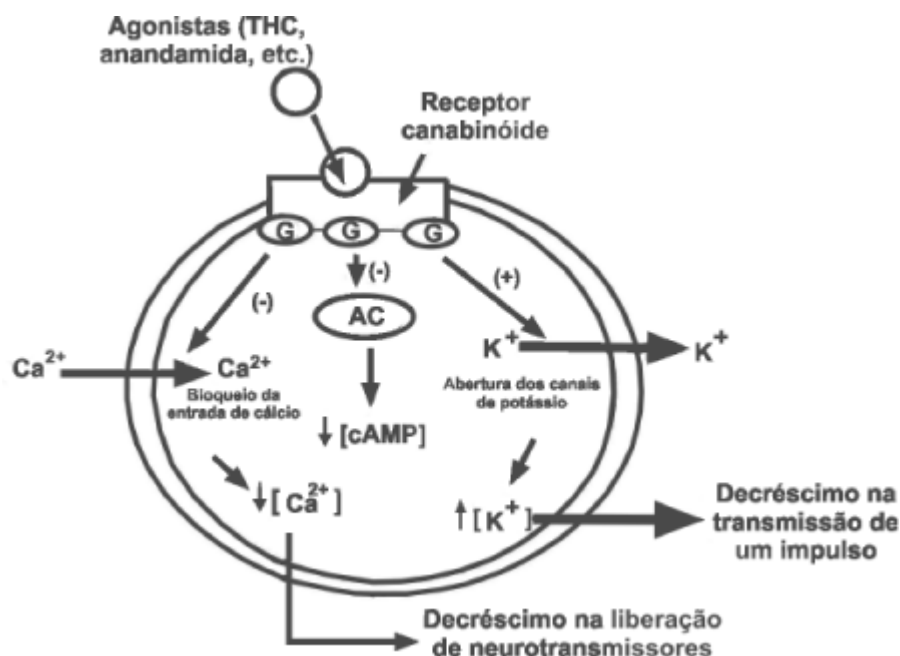
O ECS é composto por receptores canabinoides tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2), endocanabinoides como anandamida (AEA) e 2-aracdonilglicerol (2-AG), e enzimas que sintetizam e degradam esses compostos, como a FAAH para a AEA e MAGL para o 2-AG (Fig. 4). O receptor CB1 está amplamente presente no sistema nervoso central (SNC) e em órgãos periféricos como fígado, músculos e tecido adiposo, regulando a ingestão de alimentos, gasto energético e respostas relacionadas à recompensa. Já o receptor CB2 é altamente expresso em células imunológicas, como linfócitos e neutrófilos, desempenhando um papel anti-inflamatório (Figura 5) ao reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e regular a ativação dos linfócitos T. A proporção de distribuição nesta células, é com uma distribuição maior em células B, seguido por granulócitos, células dendríticas, macrófagos, células T CD8+, células T natural killer (NKT), células T CD4+ e, por último, em células natural killer. Especificamente em linfócitos T, a expressão do CB2R é preferencialmente induzida em células T reguladoras (Treg) FOXP3+ CD4+ (Liu *et al.*, 2022; Lowin *et al.*, 2022; Maayah *et al.*, 2020; Péntzes *et al.*, 2023).

Os canabinoides de forma geral, exercem efeitos anti-inflamatórios complexos por meio da interação com os receptores CB1 e CB2, que são ambos receptores acoplados à proteína Gi/o, com sete domínios transmembranares. Estes receptores reduzem os níveis de AMP cíclico ao inibirem a adenilato ciclase (via que em células mononucleares está responsável pela regulação positiva de processos inflamatórios), conforme figura 6.

A expressão do CB2R é altamente induzível durante processos inflamatórios, sugerindo um papel importante na regulação da resposta imune. A ativação deste receptor resulta em uma diminuição da expressão de moléculas MHC-II na superfície celular e na redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-12p40, além de também

polarizar macrófagos de um estado pró-inflamatório clássico (M1) para um estado anti-inflamatório alternativo (M2) (Liu *et al.*, 2022; Maayah *et al.*, 2020; Pénczes *et al.*, 2023).

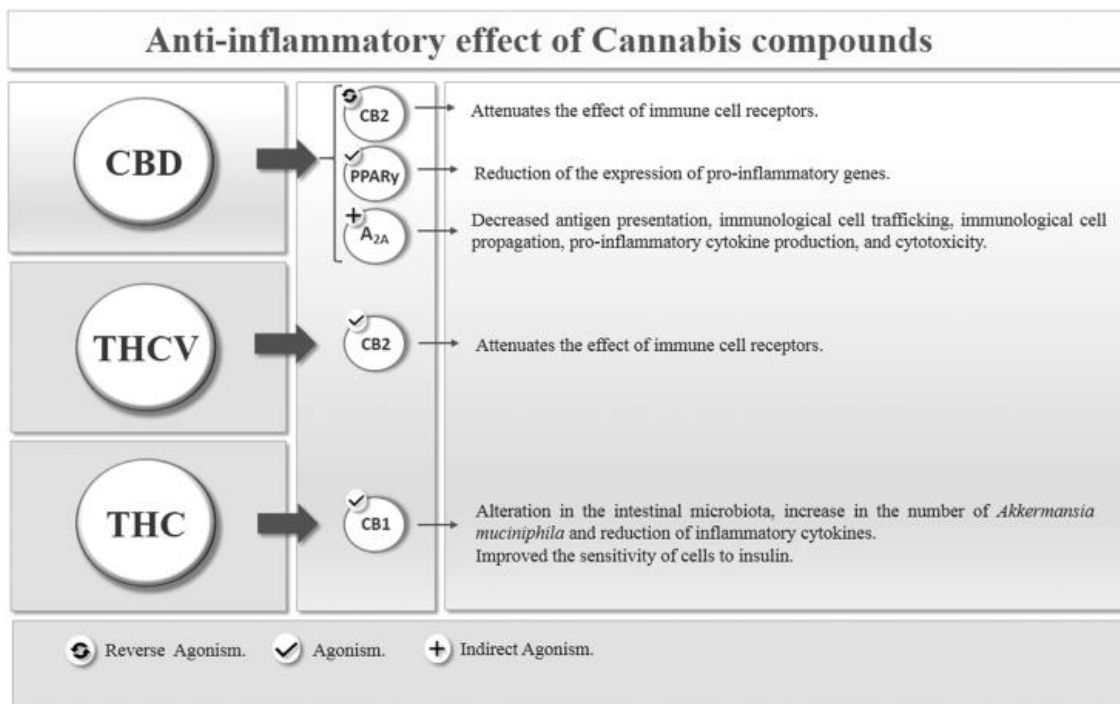
Figura 4. Reações intracelulares que ocorrem quando agonistas interagem com receptores canabinoides CB1 e CB2 no SNC



Fonte: Honório, Arroio e Silva (2006)

Os receptores CB1 e CB2 desempenham papéis distintos na regulação do metabolismo e na obesidade. O CB1, quando ativado em estados obesogênicos, contribui para o aumento da ingestão alimentar e do acúmulo de gordura, enquanto o CB2, cuja expressão é induzida em processos inflamatórios, promove a polarização de macrófagos para um estado anti-inflamatório e pode reduzir a gordura corporal ao estimular a β -oxidação. A ativação do CB2 tem sido associada a efeitos protetores contra a resistência à insulina induzida pela obesidade, sugerindo seu potencial como alvo terapêutico em distúrbios metabólicos (Braile *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022; Maayah *et al.*, 2020; Pénczes *et al.*, 2023).

Figura 5. Efeito anti-inflamatório dos fitocanabinoides da *C. sativa*



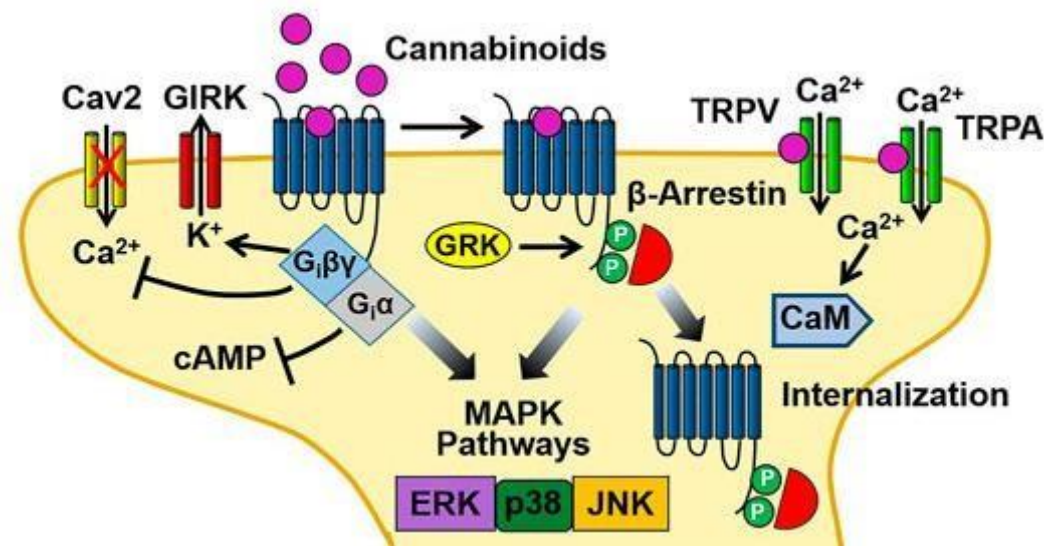
Fonte: Cavalheiro e colaboradores (2022). O canabidiol (CBD) atua sobre CB2 (agonismo reverso), atenuando o efeito dos receptores das células imunológicas; sobre PPAR γ (agonismo), reduzindo a expressão de genes pró-inflamatórios; e sobre A $_2$ A (agonismo indireto), diminuindo a apresentação de antígenos, o tráfego e a propagação de células imunológicas, além da produção de citocinas pró-inflamatórias e da citotoxicidade. O tetraidrocanabivarina (THCV) age em CB2 (agonismo reverso), atenuando o efeito dos receptores das células imunológicas. O Δ 9-tetraidrocanabinol (THC) atua em CB1 (agonismo), alterando a microbiota intestinal, aumentando o número de *Akkermansia muciniphila*, reduzindo citocinas inflamatórias e melhorando a sensibilidade das células à insulina. Símbolos: ☯ agonismo reverso; ✓ agonismo; + agonismo indireto.

Os fitocanabinoides são substâncias exógenas derivadas da *Cannabis sativa* que ativam os receptores endocanabinoides. A planta contém aproximadamente 400 substâncias químicas, das quais cerca mais de 100 são fitocanabinoides (Figura 7), sendo os mais conhecidos o Δ 9-tetraidrocanabinol (THC) e o canabidiol (CBD) (Maayah et al., 2020; Tassi Borille et al., 2017).

O THC é responsável pelos efeitos psicoativos, devido à sua alta afinidade pelos receptores CB1, predominantemente localizados no sistema nervoso central (Borille, 2016). A ativação desses receptores promove, entre outros efeitos, o aumento do apetite.

Enquanto o CBD é considerado não psicoativo e apresenta propriedades terapêuticas diversas. Além dos fitocanabinoides, a *Cannabis sativa* contém terpenos, como o β -cariofileno, que também interagem com o ECS e contribuem para o chamado "efeito *entourage*", onde a combinação de canabinoides e terpenos potencializa os efeitos terapêuticos da planta (Braile *et al.*, 2021; Maayah *et al.*, 2020).

Figura 6. Via de sinalização da ligação canabinoide-receptor CB1



Fonte: Wash, McKinney e Holmes (2021). A ligação dos canabinoides ao receptor neuronal CB1 estimula tanto as vias de sinalização neuronal Gi/Go quanto β -arrestina, levando à inibição da adenilato ciclase, ativação dos canais de potássio retificadores de entrada regulados por proteína G (GIRK) e à internalização do receptor. Além disso, a ativação dos canais *transient receptor potential vanilloid* (TRPV) e *ankyrin* (TRPA) pelos canabinoides provoca influxo de Ca^{2+} que ativa enzimas sensíveis ao Ca^{2+} , como a proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaM).

Na *Cannabis sativa* L., a biossíntese dos canabinoides (Figura 8) ocorre nos tricomas glandulares das flores femininas a partir de dois precursores principais: o ácido olivetólico (via poliquetídeo — polyketide pathway) e o geranil difosfato (via plastidial MEP — 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato) (Walsh; McKinney; Holmes, 2021). Esses compostos são condensados pela enzima olivetolato geraniltransferase (GOT), formando o ácido canabigerólico (CBGA), precursor dos principais canabinoides ácidos: ácido tetrahydrocannabinólico (THCA), via THCA-sintase; ácido canabidiólico (CBDA), via

CBDA-sintase; e ácido canabicromênico (CBCA), via CBCA-sintase. Sob ação de calor ou luz, esses ácidos passam por descarboxilação não enzimática, gerando as formas neutras e farmacologicamente ativas, como Δ^9 -THC (a partir do THCA) e canabidiol (CBD, a partir do CBDA) (Tahir et al., 2021; Walsh; McKinney; Holmes, 2021).

O THC é o principal componente da *C. sativa*, com efeitos que incluem analgesia, relaxamento muscular, aumento do apetite e propriedades antieméticas e neuroprotetoras. Esses efeitos são mediados principalmente pela ativação dos receptores CB1, que estão presentes em grande número no SNC. Contudo, o uso de THC pode levar a efeitos colaterais como disfunção cognitiva e perda de memória a curto prazo (Bátkai et al., 2007; Gojani et al., 2023; Maayah et al., 2020; Pénczes et al., 2023). Evidências sugerem que o Δ^9 -THC é o principal responsável pela dependência e pela indução de sintomas psicóticos em indivíduos vulneráveis, possivelmente devido ao aumento do fluxo pré-sináptico de dopamina no córtex pré-frontal medial (Matos Gonçalves; Schlichting, 2014).

Figura 7. Tabela contendo os metabólitos secundários de *C. sativa*

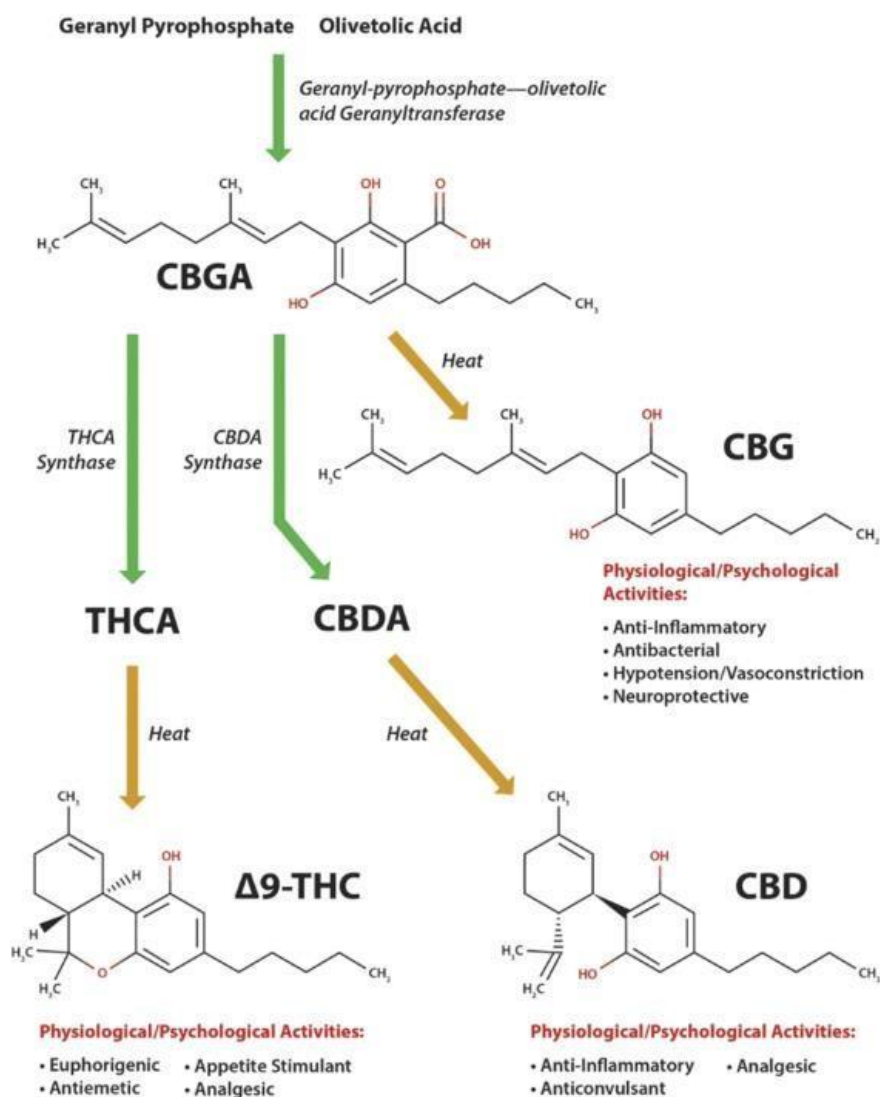
Tabela 1. Classes de compostos encontrados na planta *Cannabis sativa*

Classe	Número de compostos encontrados na planta	Classe	Número de compostos encontrados na planta
<i>Canabinóides</i>	61	<i>Cetonas simples</i>	13
Canabigerol (CBG)	6	<i>Ácidos simples</i>	20
Canabicromeno (CBC)	4	<i>Ácidos graxos</i>	12
Canabidiol (CBD)	7	<i>Ésteres e lactonas simples</i>	13
$\Delta^{1(9)}$ -THC	9	<i>Esteróides</i>	11
$\Delta^{2(8)}$ -THC	2	<i>Açúcares e análogos</i>	34
Canabiciolol (CBL)	3	Monossacarídeos	13
Canabielsoin (CBE)	3	Dissacarídeos	2
Canabinol (CBN)	6	Polissacarídeos	5
Canabinodiol (CBND)	2	Ciclitóis	12
Canabitriol (CBT)	6	Amino-açúcares	2
Outros canabinóides	13	<i>Terpenos</i>	103
<i>Compostos Nitrogenados</i>	20	Monoterpenos	58
Bases quartenárias	5	Sesquiterpenos	38
Amidas	1	Diterpenos	1
Aminas	12	Triterpenos	2
Alcalóides espermidinas	2	Mistura de terpenóide	4
<i>Aminoácidos</i>	18	<i>Fenóis não-canabinóides</i>	16
<i>Proteínas, glicoproteínas e enzimas</i>	9	<i>Glicosídeos Flavonóide</i>	19
<i>Hidrocarbonetos</i>	50	<i>Vitaminas</i>	1
<i>Álcoois simples</i>	7	<i>Pigmentos</i>	2
<i>Aldeídos simples</i>	12	Total	421

Fonte: Honório, Arroio e Silva (2006)

Por outro lado, a THCV (tetrahydrocanabivarina, homólogo não-psicoativo do THC), tem mostrado efeitos anti-inflamatórios significativos, incluindo a inibição da produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias em macrófagos ativados. Além disso, a THCV pode regular a expressão de receptores CB1 e tem sido investigado por seus efeitos na modulação do metabolismo lipídico e na proteção contra danos hepáticos induzidos por dietas ricas em gordura (Batkái *et al.*, 2011; Gojani *et al.*, 2023.; Maayah *et al.*, 2020; Péntzes *et al.*, 2023).

Figura 8. Via biossintética dos canabinoides primários



Fonte: Nachnani, Raup-Konsavage, Vrana (2021). A biossíntese dos canabinoides começa com

a combinação do geranil pirofosfato e do ácido olivético para formar o ácido canabigerólico (CBGA). O CBGA atua como substrato para a síntese do ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico (Δ^9 -THCA) e do ácido canabidiólico (CBDA). A descarboxilação do CBGA, Δ^9 -THCA e CBDA pelo calor resulta, respectivamente, em canabigerol (CBG), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol (CBD). Como o CBGA serve de substrato para a síntese dos principais canabinoides, ele é normalmente encontrado em quantidades muito pequenas no material proveniente de plantas do gênero *Cannabis*.

A THCv difere estruturalmente do THC por possuir uma cadeia propila (três carbonos) em vez da pentila. Sua biossíntese inicia-se com a condensação de geranil pirofosfato com ácido divarinólico, formando o ácido canabigerovarínico (CBGVA), que, pela ação da THCv-sintase, origina o ácido tetrahydrocannabinavarínico (THCVA). A descarboxilação induzida por calor ou radiação UV converte o THCVA em THCv (Abioye et al., 2020; Cavalheiro et al., 2022; Riedel et al., 2009; Wargent et al., 2013).

Enquanto o THC estimula o apetite por sua ação agonista no CB1, a THCv atua como antagonista ou agonista neutro nesse receptor (Riedel et al., 2009), reduzindo a ingestão alimentar em modelos murinos (Abioye et al., 2020; Cavalheiro et al., 2022; Mendoza, 2025).

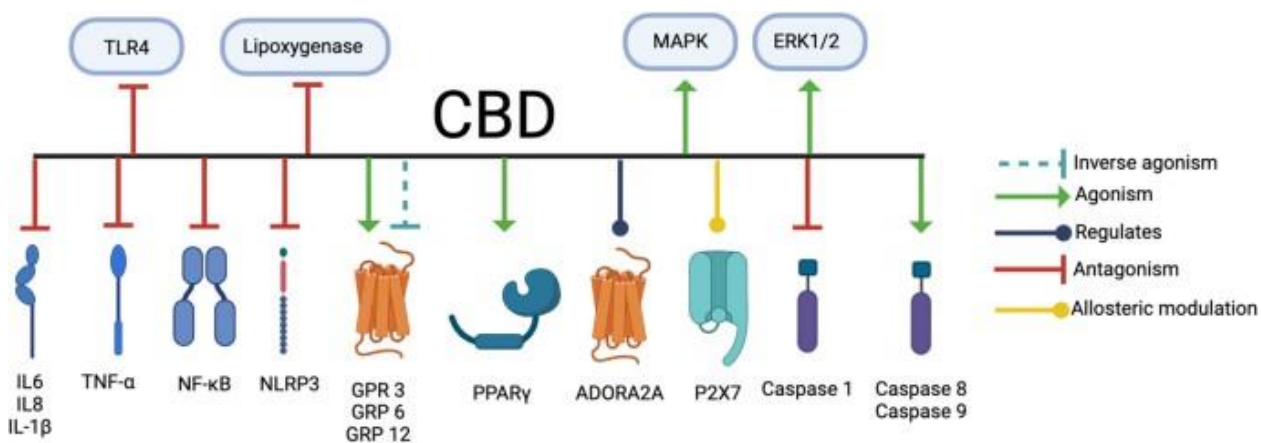
Em camundongos obesos (DIO ou ob/ob), a THCv melhorou a tolerância à glicose, aumentou a sensibilidade à insulina, reduziu triglicerídeos hepáticos e elevou o gasto energético (Riedel et al., 2009). Em ensaio clínico duplo-cego com pacientes com diabetes tipo 2, a administração de THCv (5 mg duas vezes ao dia) reduziu a glicemia de jejum, melhorou a função das células β -pancreáticas e aumentou os níveis de apolipoproteína A e adiponectina (Cavalheiro et al., 2022; Wargent et al., 2013).

O CBD é um canabinoide com diversas propriedades terapêuticas, incluindo efeitos sedativos, anticonvulsivantes, anti-inflamatórios e antipsicóticos. Diferente do THC, o CBD não atua predominantemente nos receptores CB1 e CB2, mas sim em outros sistemas, como os receptores de serotonina (5-HT1A) e canais TRPV, contribuindo para seus efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios (Lowin et al., 2022; Jastrzab; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2022).

Revisões recentes demonstram que o CBD está envolvido em diversos processos fisiológicos, incluindo regulação do equilíbrio energético, via sistemas de sinalização

complexos como canais iônicos, enzimas do citocromo P450, e vias inflamatórias e apoptóticas (Swenson, 2025), conforme ilustrado na figura 9.

Figura 9. CBD: vias inflamatórias e apoptóticas



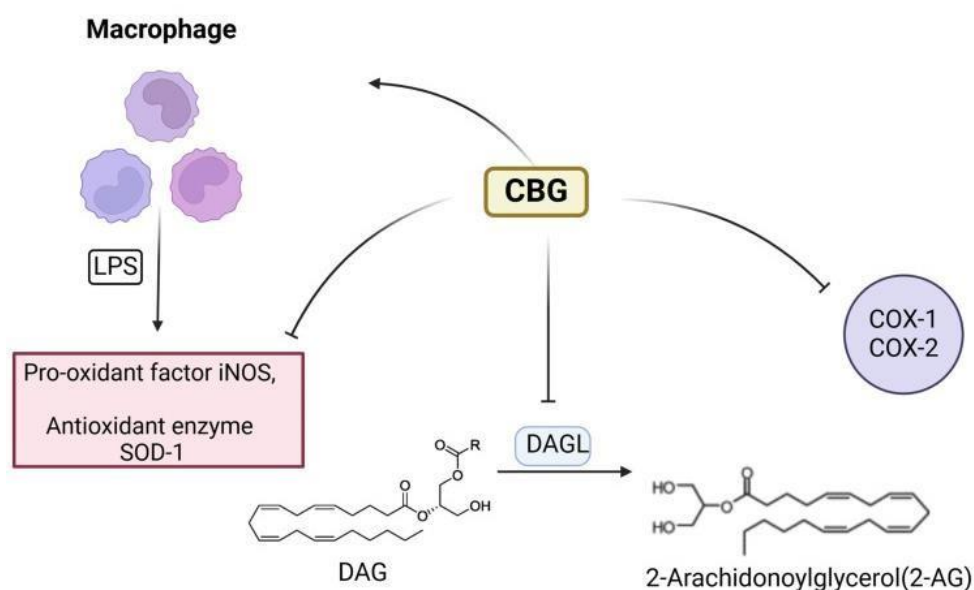
Fonte: Swenson (2025). O CBD impacta vias inflamatórias e apoptóticas, interagindo com múltiplos componentes desses processos. O CBD antagoniza TLR4, lipoxigenase, interleucinas 1α, 1β, 6 e 18, TNFα, NFκB, NLRP3 e caspase 1. Ele ativa as caspases 8 e 9, os receptores acoplados à proteína G GPR3, GPR6 e GPR12, o receptor PPARγ, o receptor de adenosina A₂A, bem como as proteínas ERK1/2 e MAPK. Além disso, o CBD ativa inversamente os receptores GPR3, GPR6 e GPR12, e modula alostericamente o receptor P2X7.

De forma similar, o CBG que é o precursor dos principais canabinoides, possui uma afinidade moderada pelos receptores CB1 e CB2. No entanto, ele se destaca por sua capacidade de inibir enzimas como a lipoxigenase e de ativar o receptor adrenérgico α₂, o que lhe confere efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antidepressivos. Além disso, o CBG também tem potencial para atuar na modulação do sistema endocanabinoide em condições de inflamação e obesidade (Janecki et al., 2022; Jastrzab; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2022; Kogan et al., 2021; Lowin et al., 2023).

O canabigerol (CBG) é um canabinoide não psicotrópico, presente em menores concentrações na planta. Trata-se da forma descarboxilada do CBGA, precursor de diversos canabinoides, incluindo THC e CBD (Kohara et al., 2025; Nachnani; Raup-Konsavage; Vrana, 2021). Sua biossíntese envolve a formação de ácido olivetólico a partir de hexanoyl-CoA e malonyl-CoA, seguida pela prenilação mediada por uma preniltransferase (geranyl-pyrophosphate-olivetolate geranyltransferase) para originar o CBGA, que, por descarboxilação, dá origem ao CBG. Durante o desenvolvimento da

planta, a maior parte do CBG é convertida em THC ou CBD, restando apenas cerca de 1% no material vegetal maduro (Kearsey et al., 2023). O CBG atua como agonista fraco nos receptores CB1 e CB2, agonista potente do receptor α_2 -adrenérgico, antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} e inibidor dos canais TRPM8. Também inibe enzimas como FAAH (fatty acid amide hydrolase), COX-1 e COX-2, e interfere na recaptação e no metabolismo da anandamida (Kohara et al., 2025; Nachnani; Raup-Konsavage; Vrana, 2021), conforme ilustrado na figura 10.

Figura 10. Mecanismo dos efeitos anti-inflamatórios do CBG



Fonte: Li e colaboradores (2024). O mecanismo dos efeitos anti-inflamatórios do canabigerol (CBG) envolve a redução da atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a modulação da expressão da superóxido dismutase-1 (SOD-1). Além disso, o CBG inibe a diacylglicerol lipase (DAGL) e diminui a atividade das enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2).

Evidências indicam que o CBG pode reduzir ansiedade, melhorar memória e exercer efeitos neuroprotetores, embora sejam necessários mais estudos clínicos para confirmar sua eficácia e segurança (Kohara et al., 2025; Li et al., 2024; Navarro et al., 2018). Estudos pré-clínicos sugerem ainda que o CBG pode estimular o apetite: em roedores saciados, observou-se redução do tempo para início da alimentação e aumento da frequência das refeições, sem comprometimento neuromotor. Esses resultados

apontam para um potencial terapêutico na perda de apetite associada à quimioterapia, com baixo risco de indução de euforia (Brierley et al., 2016; Nachnani; Raup-Konsavage; Vrana, 2021).

De forma geral, estes fitocanabinoides modulam tanto a atividade quanto a migração de várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, células dendríticas, células NK, fibroblastos e células endoteliais. Além de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α , MCP-1/CCL5 e GM-CSF, os fitocanabinoides também aumentam a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-11 e TGF- β (Maayah *et al.*, 2020; Pénczes *et al.*, 2023).

Os fitocanabinoides demonstram potencial promissor na modulação da inflamação crônica de baixo grau, como a observada na obesidade. A hipótese deste estudo é que esses compostos podem restaurar a homeostase imunológica e otimizar a sinalização da insulina, contribuindo para a melhora do equilíbrio fisiológico e da função corporal em indivíduos obesos. Assim, atuariam como adjuvantes eficazes no tratamento da obesidade, promovendo a melhoria do quadro inflamatório e funcional, além de auxiliar na prevenção do reganho de peso após intervenções convencionais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial modulador de extratos brutos de diferentes quimiotipos de *Cannabis sativa* L., frente ao perfil inflamatório, supressor e metabólico de células mononucleares do sangue periférico de pessoas com obesidade.

3.2. Objetivos específicos

1) Avaliar os parâmetros laboratoriais e antropométricos a fim de classificar clinicamente os grupos estudados;

2) Observar o efeito citotóxico de extratos brutos dos quimiotipos: CBG, CBD, THC, THCV de *C. sativa* L. sobre linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7, eritrócitos e as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos eutróficos;

3) Analisar o mecanismo de morte celular provocado pelas concentrações determinadas dos extratos brutos dos quimiotipos: CBG, CBD, THC, THCV de *C. sativa* L. sobre as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos humanos eutróficos;

4) Realizar triagem dos extratos brutos de *C. sativa*, a fim de observar qual apresenta atividade anti-inflamatória mais pronunciada frente as PBMCs de indivíduos com obesidade;

A partir do extrato bruto de *C. sativa* L. de melhor resultado:

5) Avaliar a atividade imunomoduladora do extrato bruto de *C. sativa* L. na produção de IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 e IFN- γ em PBMC de indivíduos com obesidade em relação à indivíduos eutróficos;

7) Observar atividade anti-inflamatória em marcadores imunológicos prognósticos na subpopulação de monócitos CD14+ totais quanto à produção de citocinas (TNF- α) e mecanismo de modulação inflamatório (MPO) de indivíduos com obesidade em relação à indivíduos eutróficos;

8) Analisar atividade anti-inflamatória em marcadores imunológicos prognósticos na subpopulação de linfócitos T CD4+ quanto à produção de citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-17-A), receptores de ativação (CD25) e modulação purinérgica (CD39, CD73) de indivíduos com obesidade em relação à indivíduos eutróficos;

9) Investigar o papel modulador do extrato bruto de *C. sativa* L. de melhor resultado, na frequência de receptor de insulina (CD220) e via de sinalização mTOR-RPS6K1, nas células do sistema imune avaliadas acima;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção da *Cannabis* medicinal

Os extratos brutos de *Cannabis sativa* ricos em diferentes fitocanabinoides foram adquiridos da APEPI (Apoio à Pesquisa e Pacientes de Cannabis Medicinal - Rio de Janeiro, RJ), uma empresa licenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a distribuição de Cannabis medicinal para fins de pesquisa, documentação vide em ANEXO A.

Todos os extratos seguiram metodologia padronizada de preparo, do cultivo à elaboração do produto. Os quimiotipos utilizados no estudo: CBD, CBG, THCV e THC (Tabela 1) foram cultivados na sede campestre da APEPI, localizada em Paty de Alferes, Rio de Janeiro - Brasil. Espécimes férteis foram coletados no Rio de Janeiro, RJ - Brasil. Neste estudo, o extrato bruto de *C. sativa* rico em THC somente será usado como controle positivo do seu homólogo (THCV), visto que apresenta características como dependência e processos alucinógenos, que não são ideais para um candidato à medicamento.

Tabela 1. Extratos de *Cannabis sativa*

Quimiotipo/Código	Fitocanabinoide majoritário
EBDRS86	CBD
EBCBG28	CBG
EBPWK10	THC
EBTHCV01	THCv

Dados fornecidos pela APEPI.

O processo de extração foi realizado pelo laboratório responsável da APEPI, onde as flores de *Cannabis sativa* cultivadas foram secas em um armário com circulação de ar controlada, mantendo-se a umidade e a temperatura sob parâmetros específicos.

Após esse processo, foram trituradas por um moinho de facas e posteriormente acondicionadas em embalagens hermeticamente fechadas para serem utilizadas na etapa de extração e obtenção do extrato vegetal. As flores de *Cannabis* trituradas foram colocadas em contato com álcool de cereais (92,8°) em proporção de substrato para solvente de 1:10 (*m/v*).

O protocolo de extração seguiu o método padronizado do laboratório da APEPI, que consiste em maceração dinâmica da solução, seguida da filtração da biomassa e evaporação do solvente para obtenção do extrato. Após a evaporação do solvente, os extratos foram submetidos à etapa de descarboxilação em câmara de secagem/aquecimento com circulação forçada de ar em frasco âmbar vedado a 115°C por 150 minutos. Após a descarboxilação, os extratos estavam prontos para utilização nos estudos.

Os extratos foram analisados para obtenção do percentual (% *m/m*) do perfil de fitocanabinoides por meio de metodologia validada no Centro de Informação e Assistência Toxicológica da Universidade Estadual de Campinas (Ciatox – UNICAMP), por meio de Cromatografia Gasosa (Tabela 2).

A caracterização para confirmação dos dados fornecidos pela APEPI sobre os extratos foi realizada em parceria com o Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba. Para tanto, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (Modelo GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu), equipado com coluna capilar RTX-5MS (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de fase estacionária.

A análise e comparação com a biblioteca interna do equipamento permitiram confirmar os picos majoritários correspondentes ao CBD e THC nos extratos contendo esses fitocanabinoides majoritários. Para os extratos contendo CBG e THCV, foram observados picos únicos não identificados na biblioteca interna, os quais foram posteriormente confirmados mediante consulta à biblioteca online GIST. Os cromatogramas encontram-se no Apêndice A.

Tabela 2. Percentual de fitocanabinoides presentes nos diferentes quimiotipos de *Cannabis sativa*

Fitocanabinoides	EBPWK10	EBCBG28	EBDRS86	EBTHCV01
CBDV	< 0,2	< 0,2	<0,2	< 0,2
CBD	< 0,2	1,4	67,7	< 0,2
CBD-A	< 0,2	< 0,2	<0,2	< 0,2
CBG	2,1	63,7	1,6	6,9
CBN	< 0,2	< 0,2	<0,2	< 0,2
CBG-A	< 0,2	< 0,2	<0,2	< 0,2
Δ 9-THC	62,1	0,9	2,5	33,1
Δ 8-THC	< 0,2	< 0,2	<0,2	< 0,2
CBC	0,8	4	2	< 0,2
THC-A	< 0,2	< 0,2	<0,2	< 0,2
THCV	-	-	-	23,5
THCV-A	-	-	-	0,2

Dados fornecidos pela APEPI.

4.2. Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo com 24 voluntários distribuídos em diferentes grupos: indivíduos eutróficos (n = 12) e indivíduos obesos grau 2 (n = 12). Os pacientes estavam negativos para COVID-19 no momento da coleta. Os critérios de exclusão para todos os grupos incluíram a seleção de indivíduos com idade superior a 18 anos, não gestantes e que não apresentavam problemas neurológicos, como síndrome de Guillain-Barré, Alzheimer, Parkinson, Esclerose Múltipla e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

O protocolo do estudo “ANÁLISE DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS PROGNÓSTICOS E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE FITOCANABINOIDES EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do

Centro de Ciências da Saúde da UFPB (CAAE: 77985223.3.0000.5188, ANEXO B), e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido por escrito de todos os participantes (APÊNDICE B). Ademais, os voluntários preencheram um questionário clínico-epidemiológico contendo dados gerais, além de informações acerca de sua saúde, aspectos clínicos e laboratoriais relacionados à doença e às comorbidades associadas.

4.3. Avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais

Com o intuito de validar clinicamente a eutrofia e a obesidade, os indivíduos foram avaliados antropometricamente por meio de balança de bioimpedância de corpo inteiro OMRON HBF-51 e estadiômetro portátil. Essa etapa foi realizada em parceria com o Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (DN/CCS), que atuou como coorientador neste estudo. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado a partir da relação peso (kg) / altura² (m) e classificado conforme o proposto. Os pacientes foram selecionados segundo os critérios de inclusão: IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m² para indivíduos não obesos e entre 30 e 39,9 kg/m² para indivíduos com obesidade (grau 1 e 2).

Foi avaliada a relação cintura/quadril (RCQ) para predizer o risco de problemas cardiovasculares. O método consistiu na aferição da linha natural da cintura (parte mais estreita entre o tórax e o quadril) e da circunferência do quadril (maior circunferência da região glútea), sendo as medidas obtidas em centímetros (cm) por fita inelástica. Os valores de referência para circunferência da cintura foram: abaixo de 80 cm (normal), entre 80 e 84 cm (médio risco), entre 85 e 88 cm (risco elevado) e acima de 88 cm (risco muito elevado). O resultado da RCQ foi classificado como favorável quando menor ou igual a 0,75 e desfavorável quando superior a 0,75.

Após jejum de 12 horas, sem exercício físico extenuante 24 horas antes e sem ingestão de bebida alcoólica 72 horas prévias à coleta. Foram coletados 4 mL de sangue em tubo com anticoagulante e gel separador. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante (soro) transferido para microtubos, que foram armazenados a -20 °C até as análises.

Para a realização dos ensaios laboratoriais, foram analisados os seguintes

marcadores: ureia (liquiform), albumina, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (liquiform), colesterol total (liquiform), transaminase oxalacética (TGO/AST; liquiform), creatinina K, transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ALT; liquiform), Gama Glutamil Transferase (gama-GT; liquiform) e glicemia em jejum. Todos os ensaios foram realizados utilizando kits comerciais da marca Labtest, seguindo as recomendações do fabricante, em analisador automático Labmax 240 Premium, com calibração realizada previamente de acordo com os valores de referência (Tab. 3).

Tabela 3. Valores de referência dos marcadores bioquímicos

Valores de referência (Kit Labtest)	
Glicose em jejum	65 - 99 mg/dL
Triglicerídeos	< 150mg/dL (esperado)
	150 - 199 mg/dL (limítrofe para alto)
	200 - 499 mg/dL (aumentado)
	> 500 mg/dL (muito aumentado)
Colesterol total	< 200 mg/dL (desejável)
	200 - 239 mg/dL (limítrofe para alto)
	≥ 240 mg/dL (alto)
HDL	< 40 mg/dL (baixo)
	≥ 60 mg/dL (alto)
LDL	< 100 mg/dL (ótimo)
	100 - 129 mg/dL (acima do ideal)
	130 - 159 mg/dL (limítrofe para alto)
	160 - 189 mg/dL (alto)
	≥ 190 mg/dL (muito alto)
Albumina	3,5 - 5,5 g/dL
ALT/TGP	11 - 45 U/L (homem)
	10 - 37 U/L (mulher)
AST/TGO	11 - 39 U/L (homem)
	10 - 37 U/L (mulher)
Gama-GT	7 - 58 U/L (homem)
	5 - 39 U/L (mulher)
Creatinina K	0,70 - 1,20 mg/dL (homem)
	0,53 - 1,00 mg/dL (mulher)
Ureia	15 - 45 mg/dL

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

4.4. Ensaio de citotoxicidade em linhagem celular de macrófago

Para a avaliação da atividade citotóxica na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7, foi utilizado o teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazólio). O ensaio foi realizado em três experimentos independentes, em triplicata, totalizando 9 replicatas por estudo de material vegetal e concentração. As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 5% de SBF, 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL).

As células da linhagem RAW 264.7 foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Valnes Rodrigues Junior (DCF/UFPB). As células foram cultivadas na concentração de 5×10^4 células/mL em frascos de cultivo. A manipulação celular ocorreu em ambiente de fluxo laminar para evitar contaminações, e as culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas e, ao atingirem aproximadamente 80% de confluência (geralmente após 48 horas de cultivo), foi realizada a passagem das células. Inicialmente, o meio consumido foi removido e substituído por meio fresco. Em seguida, para facilitar o desprendimento das células, a placa foi cuidadosamente posicionada sobre uma superfície com gelo protegida, e, com auxílio de um raspador de células, as células aderidas foram delicadamente desprendidas, evitando danos.

As células foram então centrifugadas a 500 × g por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante azul de tripan. Para manutenção do estoque celular, parte das culturas foi submetida à criopreservação. Células com viabilidade igual ou superior a 90%, preferencialmente até a quinta passagem, foram preparadas para congelamento. Para isso, 950 µL da suspensão celular em meio contendo 10% de SBF foram transferidos para tubos criogênicos, aos quais foram adicionados 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%, utilizado como criopreservante, por gotejamento. As amostras foram homogeneizadas, mantidas inicialmente a -20 °C por 20 a 30 minutos, e posteriormente transferidas para armazenamento em freezer a -80 °C.

Para o plaqueamento, a concentração celular foi ajustada para $1,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços de fundo chato, 24 horas antes do tratamento, para que as células se fixassem e houvesse uma proliferação estimada matematicamente de $1,5 \times 10^5$ células/poço.

Após 24 horas, os extratos foram adicionados aos seus respectivos poços nas concentrações de 400 a 3,12 µg/mL, com o objetivo de obter a curva citotóxica e determinar a Concentração Citotóxica Média (CC50) dos diferentes extratos brutos de *Cannabis sativa* (CBD, CBG, THCV) em PBMCs. O controle negativo consistiu em células cultivadas apenas com meio DMEM, enquanto o controle positivo foi realizado com células tratadas com 0,1% de Triton X-100 em meio DMEM. O extrato bruto de *Cannabis sativa* rico em THC foi utilizado como controle positivo para seu homólogo (THCV). Também foi avaliado o potencial citotóxico da dexametasona – o controle anti-inflamatório - nas concentrações de 200 a 1,56 µM.

Após a adição dos compostos, foi adicionado meio para um volume final de 200 µL por poço. As placas foram incubadas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de tratamento, o meio foi substituído e foram adicionados 100 µL de meio DMEM contendo 10% de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, 5 mg/mL]. Em seguida, as placas foram incubadas por 4 horas na estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse tempo, o meio foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de DMSO puro (99,9%) para dissolução dos cristais de formazan. Posteriormente, a leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas (Biotek modelo ELx800) a 540 nm.

4.5. Ensaio de citotoxicidade em eritrócitos humanos

Na avaliação da atividade hemolítica, foram utilizados eritrócitos humanos provenientes de indivíduos eutróficos, coletados com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (n = 3). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em PBS 1×, pH 7, para um volume de 80 µL de PBS + sangue por poço, ajustando-se a concentração das hemácias para 5%, considerando as diferenças do hematócrito entre

homens (40–50% \cong 45%) e mulheres (35–45% \cong 40%). Em seguida, foram adicionados às placas os diferentes extratos brutos de *C. sativa* (CBD, CBG, THCV) em concentrações seriadas de 400 a 3,12 $\mu\text{g/mL}$, nos respectivos poços contendo sangue + PBS, para um volume final de 100 μL por poço (sangue + PBS + substâncias). Também foi avaliado o potencial hemolítico da dexametasona – controle anti-inflamatório – nas concentrações de 1000 a 7,81 μM .

O controle positivo do ensaio consistiu na utilização de água Milli-Q (Direct-Q UV®, Guyancourt, França), que promoveu a lise das hemácias por choque osmótico, sendo considerada hemólise de 100%. O controle negativo consistiu no plaqueamento do sangue apenas com PBS, que não possui ação de lise sobre os eritrócitos. O extrato bruto de *C. sativa* rico em THC foi utilizado como controle positivo para seu homólogo (THCV).

Após a etapa de plaqueamento, as amostras foram incubadas durante 1 hora a 37 °C em estufa com demanda biológica de CO₂ a 5%, e a reação foi interrompida pela adição de 100 μL /poço de PBS. Após o tempo de exposição, as suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 25 °C, e cada sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços. A hemoglobina liberada, correspondente à porcentagem de lise de eritrócitos, foi monitorada por meio da medição da absorbância a 540 nm, para quantificar a atividade hemolítica dos compostos.

O experimento foi realizado em duplicata para cada amostra de sangue periférico, em três experimentos independentes, totalizando $n = 6$ replicatas para cada condição. Os resultados foram expressos em Concentração Hemolítica Média (HC50) (ALMEIDA et al., 2023).

4.6. Ensaio de citotoxicidade em PBMCs (Células mononucleares do sangue periférico)

Para a avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), linfócitos e monócitos, foi utilizado o teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Para o ensaio, foram coletados 20 mL de sangue periférico de voluntários eutróficos ($n = 3$) em tubos VACUTAINERS contendo

heparina e as células foram separadas por gradiente de Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare, EUA). As plaquetas foram removidas dos PBMCs por meio de lavagens e centrifugações subsequentes. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF, 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL). A partir da suspensão celular, foram retirados 10 µL para diluição em 90 µL de azul de Tripán (proporção 1:10) e realizada a contagem celular em hemocítômetro. Neste método, as células vivas com membrana celular intacta excluíram o corante, apresentando leve coloração azulada ao redor da membrana e aparência cintilante, enquanto as células mortas apresentaram coloração azul intensa devido ao dano na membrana celular.

Ao final dessa etapa, a concentração celular foi ajustada com meio RPMI para 1×10^7 células/mL, e 25 µL dessa suspensão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo em U, totalizando aproximadamente 250.000 células por poço. Simultaneamente, os compostos previamente diluídos em tubos Eppendorf foram adicionados aos respectivos poços nas concentrações de 400 a 3,12 µg/mL, para obtenção da curva citotóxica e determinação da Concentração Citotóxica Média (CC50) dos diferentes extratos brutos de *C. sativa* (CBD, CBG, THCV) em PBMCs. O controle negativo foi realizado apenas com células e meio RPMI, enquanto o extrato bruto de *C. sativa* rico em THC foi utilizado como controle positivo do seu homólogo (THCV). Também foi avaliado o potencial citotóxico da dexametasona – controle anti-inflamatório – nas concentrações de 1000 a 7,81 µM.

Após a adição dos compostos, foi adicionado meio para um volume final de 200 µL por poço. As placas foram incubadas em estufa com demanda biológica de CO₂ (5%) por 24 horas. Após o período de tratamento, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C, e 100 µL do sobrenadante foram descartados. Em seguida, foram adicionados 10 µL de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio] diluído em PBS a uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e, após esse tempo, foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado, com o pellet ressuspendido em 100 µL de DMSO puro (99,9%) para dissolução dos cristais de formazan. Por fim, a leitura das placas foi realizada em leitor de placas (Biotek modelo ELx800) a 540 nm.

4.7. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo em PBMCs marcadas com AnexinaV-PI

Como adicional às avaliações do efeito biológico dos extratos de *C. sativa* L., e considerando os resultados da CC50 observados frente às PBMCs, foi escolhida a concentração correspondente à CC20 dos extratos, baseada em um efeito citotóxico médio de aproximadamente 20%, a fim de observar o provável efeito imunomodulador em 80% das células viáveis. Para visualizar o mecanismo e a frequência com que tais compostos induziam a morte celular, foi realizada esta metodologia. Para a obtenção das PBMCs, foram coletados 10 mL de sangue periférico de voluntários eutróficos ($n = 3$) em tubos VACUTAINERS contendo heparina e as células foram separadas por gradiente de Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare, EUA), conforme procedimento citado anteriormente.

As células tiveram sua concentração ajustada para $2,5 \times 10^5$ células por poço e foram plaqueadas conforme descrito anteriormente. Os extratos foram testados nas concentrações correspondentes à CC50 e CC20 obtidas nos ensaios prévios de MTT. Além disso, para este experimento, foram utilizadas as seguintes condições: poços contendo os extratos nas duas concentrações descritas, DMSO (0,5%) como controle veículo, dexametasona na concentração descrita na literatura capaz de induzir atividade anti-inflamatória *ex vivo* em PBMCs, e ausência de qualquer substância como controle negativo.

Após a adição dos compostos, foi adicionado meio para um volume final de 200 μ L por poço. As placas foram então incubadas em estufa com demanda biológica de CO₂ (5%) por 24 horas. Após o período de tratamento, as placas foram retiradas da estufa e centrifugadas a 2000 rpm por 8 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular em cada poço foi ressuspensionado em uma solução-mix contendo anticorpos e Binding Buffer (BB) 1x (10 μ M HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4). A solução-mix foi preparada considerando o número total de poços multiplicado por 1 μ L de Anexina-V por poço, 3 μ L de iodeto de propídio (PI) por poço e 96 μ L de BB 1x por poço. Assim, 100 μ L do mix foi adicionado em cada poço para marcação com os dois anticorpos. Essa etapa permite avaliar a exposição de

fosfatidilserina (PS) na face externa da membrana plasmática (um evento-chave no início da apoptose) por meio do ensaio de Anexina-V/PI. Enquanto células viáveis não são marcadas, células em apoptose inicial ligam Anexina-V, e células em apoptose tardia ou necrose tornam-se duplamente positivas devido à permeabilidade ao PI que atua como intercalante de DNA (Audo et al., 2017; Kari et al., 2022; Span et al., 2002).

Contudo, algumas condições exigiram o preparo separado das soluções, tais como: células marcadas apenas com Anexina-V, células marcadas apenas com PI, e células não marcadas, que foram ressuspensas somente com 100 µL de BB 1x, sem anticorpos. Após as ressuspensões, as placas foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente (25 °C), protegidas com papel alumínio devido à fotossensibilidade dos anticorpos. Por fim, o conteúdo de todos os poços foi transferido para tubos de citometria de fluxo de 5 mL e diluído com 300 µL de BB 1x.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Accuri C6 dentro de 1 hora após a marcação, sendo adquiridos 30.000 eventos por amostra. Como o experimento envolveu a participação de três indivíduos, cada condição foi testada em triplicata, uma vez para cada amostra de sangue.

4.8. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática para análise de citocinas produzidas

Para quantificação das citocinas IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 e IFN-γ foi utilizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Neste experimento, após o tratamento de PBMCs (n=12 por grupo) com o extrato bruto de *C. sativa* mais promissor, os sobrenadantes foram coletados. A dexametasona foi utilizada com controle anti-inflamatório na concentração de 1 µM (Anil et al., 2021; Tejwani et al., 2021). enterotoxina B de *Staphylococcus sp.* foi utilizada como controle positivo na concentração de 1µg/mL (S4881). As citocinas presentes nesses sobrenadantes foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA). A leitura será realizada em leitor de microplaca no comprimento de onda de 450 nm.

4.9. Extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e ensaio de citometria de fluxo

As amostras foram processadas para obtenção de leucócitos totais (Buffy Coat) ou PBMCs, separados por gradiente de Ficoll. As PBMCs e/ou leucócitos obtidos foram plaqueados em placa estéril de 96 poços e incubados em quatro condições: 1) células não tratadas (meio); 2) tratadas com extrato de *C. sativa* mais promissor, em concentração previamente estudada capaz de modular resposta anti-inflamatória; 3) tratadas com anti-CD3 (2 ug/mL) e anti-CD28 (4 ug/mL) para estímulo policlonal de células T (Müller et al., 1999; CD3: clone HIT3a, isotipo Mouse BALB/c IgG2a, κ , cat. 550367, espécie Mouse; CD28: clone CD28.2, isotipo Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 556620, espécie Mouse), 4) tratadas com LPS de *E. coli* O111:B4 (cat. #12190105) para estímulo de monócitos, por 16 horas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C.

Logo após, as células foram incubadas por 4 horas com brefeldina A (1 mg/mL), impedindo a exportação de proteínas para o meio extracelular. Após este período, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas por agitação. Em seguida, adicionaram-se os anticorpos para estruturas de superfície, previamente diluídos conforme a titulação estabelecida na fase de padronização dos reagentes, em um volume final de 40 μ L: anti-CD14-PE-Cy5 (clone M ϕ P9, isotipo Mouse BALB/c IgG2b, κ , cat. 340585, espécie Mouse), anti-CD4-FITC (clone SK3, isotipo Mouse IgG1, κ , cat. 566911, espécie Mouse), anti-CD4-APC (clone RPA-T4, isotipo Mouse IgG1, κ , cat. 555349, espécie Mouse), anti-CD4-APC-Cy7 (clone RPA-T4, isotipo Mouse IgG1, κ , cat. 557871, espécie Mouse), anti-CD25-PE-Cy7 (clone M-A251, isotipo Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 557741, espécie Mouse), anti-CD39-PE (clone TU66, isotipo Mouse IgG2b, κ , cat. 555464, espécie Mouse), anti-CD73-APC (clone AD2, isotipo Mouse IgG1, κ , cat. 561254, espécie Mouse) e anti-CD220-PE (clone B6.220, isotipo Mouse IgG2b, κ , cat. 352604, espécie Mouse).

Após a adição dos anticorpos, as placas foram incubadas a 4 °C por 30 minutos, ao abrigo da luz. Decorrido o período de incubação, realizou-se a lavagem das células com 150 μ L de PBS por poço, seguida de centrifugação (8 min, 1300 rpm, 4 °C). O

sobrenadante foi removido e as células ressuspensas por agitação. Posteriormente, adicionaram-se 100 μ L de PBS e 100 μ L de solução de formaldeído a 4% em cada poço para fixação da marcação extracelular (20 min, temperatura ambiente, ao abrigo da luz).

Após nova centrifugação (8 min, 1300 rpm, 4 °C) e remoção da solução fixadora, as células foram lavadas com 150 μ L de PBS. A permeabilização foi então realizada incubando-se as células por 10 minutos em Permeabilization Buffer (0,5% BSA, w/v, e 0,5% saponina, w/v, em PBS) à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se nova centrifugação (8 min, 1300 rpm, 4 °C), o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas.

Para marcação intracelular, foram adicionados 40 μ L da solução de anticorpos, devidamente diluídos em Permeabilization Buffer: anti-MPO-FITC (clone MPO455-8E6, isotipo Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 11-1299-42, espécie Mouse), anti-TNF α -PE (clone MAb11, isotipo Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 559321, espécie Mouse), anti-IL-10-PE (clone JES3-19F1, isotipo Mouse BALB/c IgG2a, κ , cat. 554707, espécie Mouse), anti-IL-17A-PE (clone N49-653, isotipo Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 560486, espécie Mouse), anti-IFN- γ -PE-Cy7 (clone B27, isotipo Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 557643, espécie Mouse) e anti-RPS6Phospho(Ser235/Ser236)-PE (clone A17020B, isotipo Mouse IgG1, κ , cat. 608604, espécie Mouse).

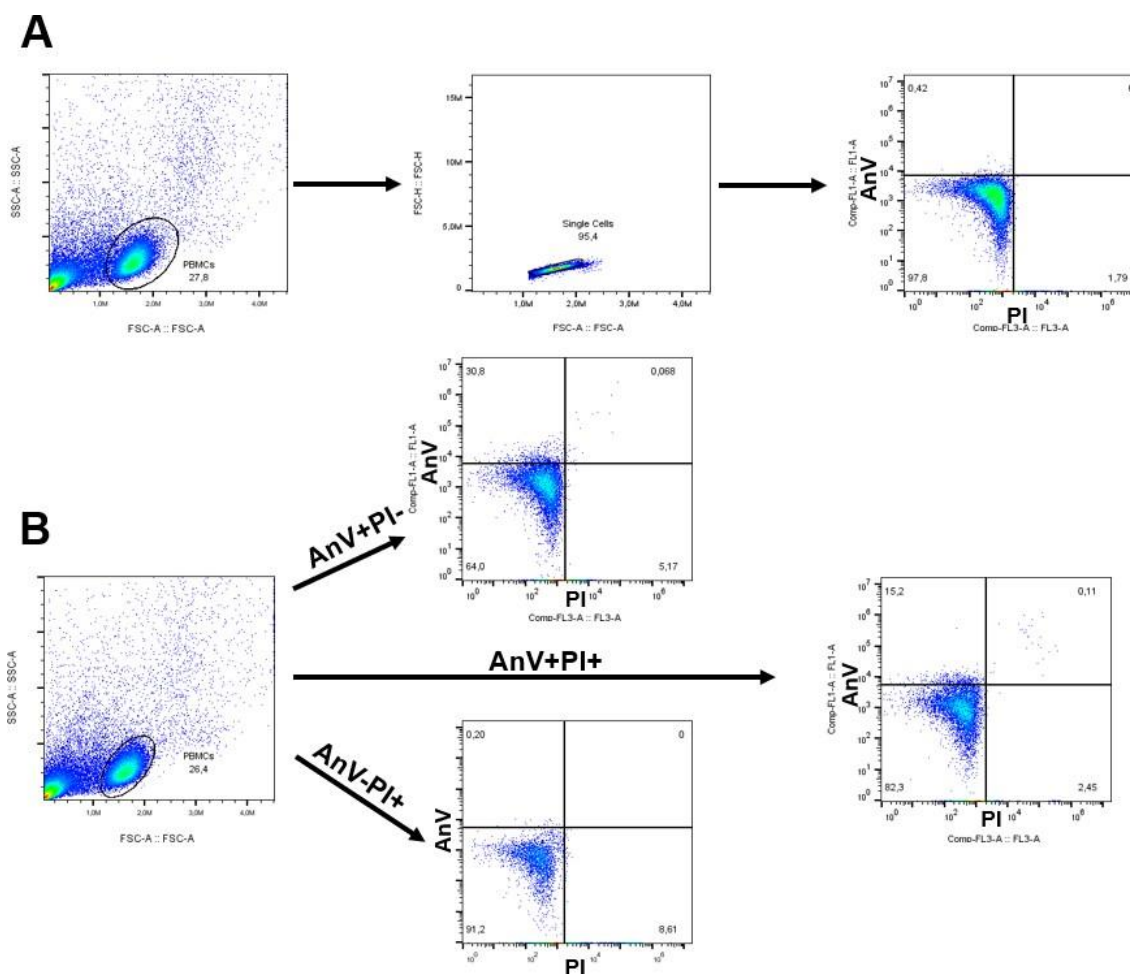
As amostras foram incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, adicionaram-se 150 μ L/poço de Permeabilization Buffer, procedendo-se nova centrifugação (8 min, 1300 rpm, 4 °C) e remoção do sobrenadante. Posteriormente, adicionaram-se 200 μ L/poço de solução Wash B (PBS/BSA). Por fim, o volume final de 200 μ L/poço contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo. As amostras foram mantidas a 4 °C, ao abrigo da luz, até o momento da aquisição dos dados. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), adquirindo-se 50.000 eventos por amostra. As análises subsequentes foram conduzidas no software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

4.10. **Análise de dados por citometria de fluxo**

Para a análise dos dados de citometria, os dados contendo 50.000 eventos foram

inicialmente exportados para o programa FlowJo 10.8.1. O limite para a posição dos quadrantes foi estabelecido com base na utilização de controles negativos (células) e controles *Fluorescence Minus One* (FMO), quando apropriado. Para a caracterização de morte celular por anexina/PI, foi realizado o posicionamento dos quadrantes a partir da seleção inicial da região correspondente às PBMCs, mediante os parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguida pela identificação das single cells (FSC-A x FSC-H). Dentro dessa população, foram observadas as marcações isoladas de anexina (FITC) e de PI (PE-Cy5) em tubos contendo uma única marcação, a fim de definir os limites dos quadrantes. Em seguida, procedeu-se à análise da dupla marcação (Fig. 11).

Figura 11. Estratégia de análise de mecanismo de morte celular

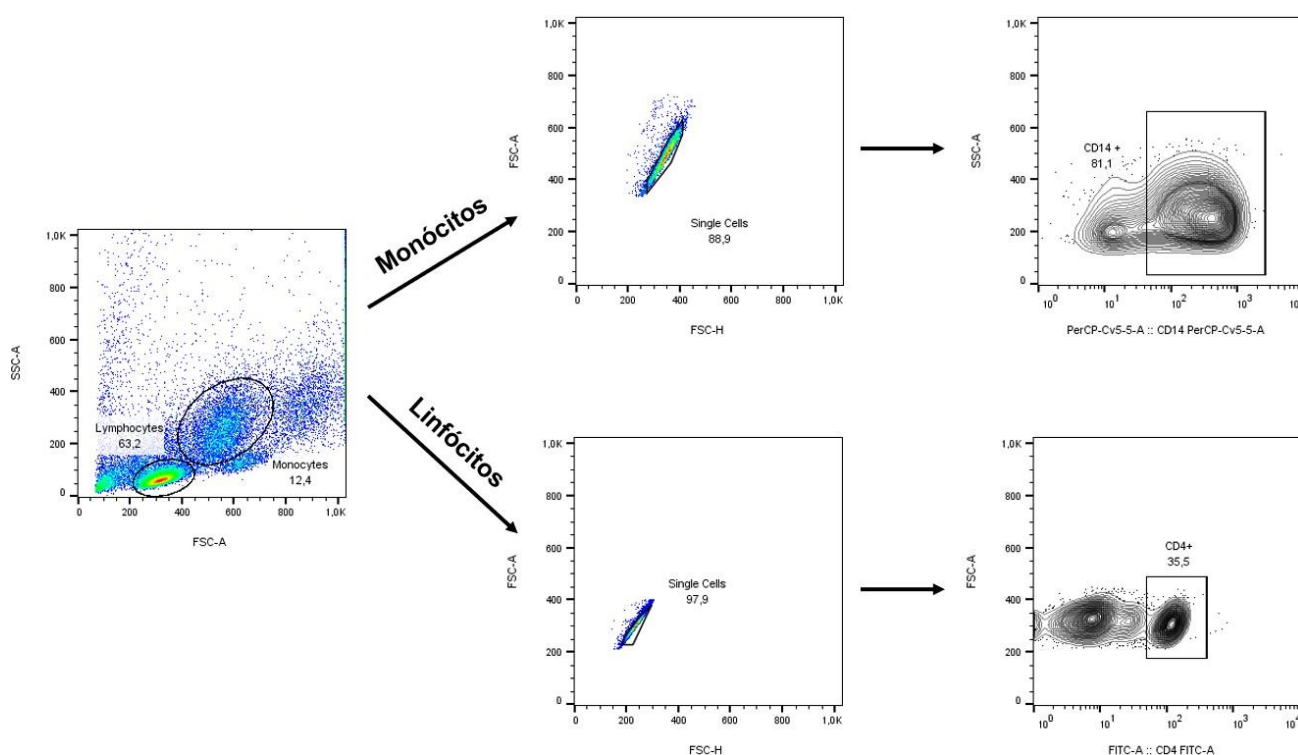


Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Gráficos representativos: AnV = Anexina V; PI = Iodeto

de propídeo. Figura A = Controle sem marcação; Figura B = Controle com as diferentes marcações (só Anv, só PI, Anv-PI).

Para a caracterização dos marcadores imunológicos nas células em estudo (CD4+, CD14+), foram associados de dois a cinco fluorocromos conjugados a anticorpos específicos para os parâmetros de interesse. A Figura 12 apresenta a estratégia de análise utilizada para a caracterização dos marcadores imunológicos em monócitos e linfócitos T CD4+ totais.

Figura 12. Estratégia de análise para seleção de monócitos e linfócitos T CD4+

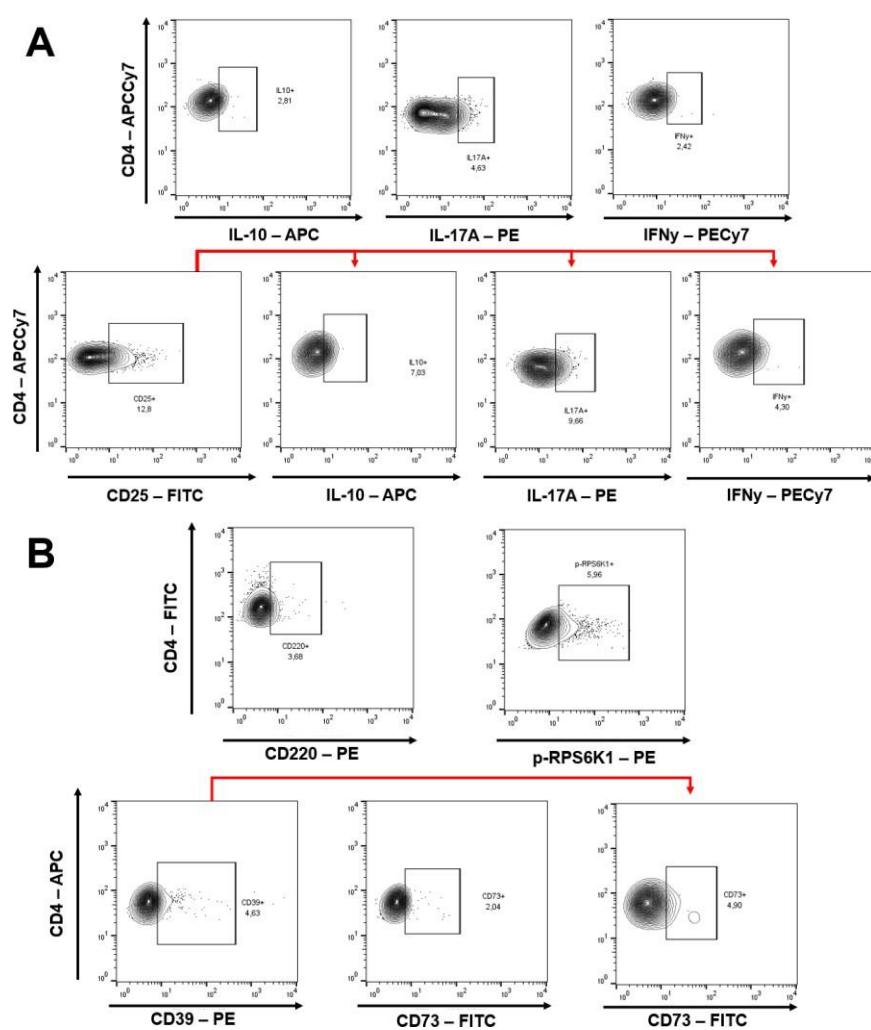


Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Gráficos representativos. Inicialmente, foi selecionada a região correspondente aos monócitos e linfócitos totais pelos parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguida pela identificação das *single cells* (FSC-A x FSC-H). Em seguida, linfócitos T CD4+ (FSC-A x CD4-A — APC-Cy7, APC ou FITC) ou monócitos (SSC-A x CD14-A — PE-Cy5) foram identificados e, dentro dessas populações, foram selecionados os marcadores de interesse.

Os outros fluorocromos (PE, PE-Cy7, FITC/Alexa 488 e APC/Alexa Fluor 647) foram utilizados para a análise da expressão de TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-17A, p-RPS6K1, CD39

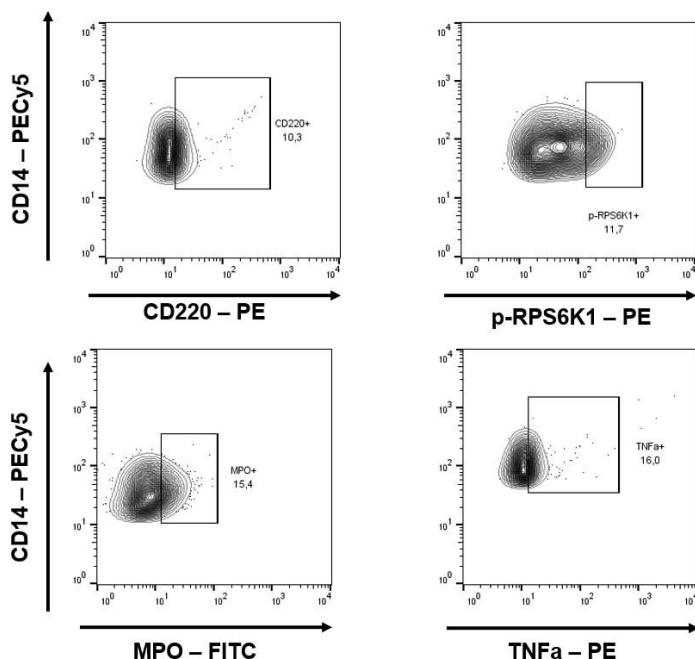
e CD73 nas células estudadas. Assim, após a identificação dos monócitos e linfócitos T CD4+, a frequência dessas células expressando os marcadores supracitados foi determinada (Figuras 13 A-B e 14).

Figura 13. Estratégia de análise para seleção de linfócitos T CD4+ positivos para marcadores de interesse



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Gráficos representativos.

Figura 14. Estratégia de análise para seleção de monócitos positivos para marcadores de interesse



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Gráficos representativos.

4.11. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism (San Diego, EUA), considerando-se diferenças estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (W). Para comparações entre múltiplos grupos, foram aplicados o teste ANOVA one-way (F), seguido do pós-teste de Tukey, quando os dados apresentaram distribuição normal, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido do pós-teste de Dunn, para dados não paramétricos. Comparações entre dois grupos foram realizadas por meio dos testes t pareado ou não pareado (t) para dados paramétricos, ou dos testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U) para dados não paramétricos. Para identificação e exclusão de outliers, foi utilizado o teste de Grubbs. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as condições dentro de cada grupo foram indicadas por letras minúsculas ou símbolos (*, #). *Heat maps* das frequências obtidas nos tratamentos de indivíduos eutróficos e obesos, com base nas análises por citometria de fluxo, também foram utilizados.

Para os estudos de correlação, a escolha do teste foi feita mediante inspeção visual do scatter plot, considerando distribuição, linearidade e presença de outliers. O teste de Pearson (r) foi aplicado para dados normalmente distribuídos com relação linear; caso contrário, utilizou-se Spearman (ρ) para dados não paramétricos com relação monotônica; e Kendall (τ) para amostras pequenas ou com muitos empates. A significância estatística dos coeficientes de correlação foi considerada quando $p < 0,05$.

Para a análise da atividade dos compostos em eritrócitos humanos, foram plotadas as absorbâncias obtidas em espectrofotômetro referentes aos três experimentos independentes. Esses dados foram expressos em HC50, onde a porcentagem de hemólise foi determinada pela fórmula $(\text{AbsA} - \text{AbsCN})/(\text{AbsCP} - \text{AbsCN}) \times 100$, sendo AbsA a absorbância da amostra, AbsCN a absorbância do controle negativo e AbsCP a absorbância da hemólise total ou controle positivo (ALMEIDA et al., 2023). As absorbâncias foram normalizadas para porcentagem, considerando 100% de lise celular para o controle positivo e 0% para o controle negativo.

A análise para inferir o valor de CC50 da atividade biológica dos compostos testados frente à linhagem RAW 264.7 e PBMCs utilizou os dados de absorbância dos três experimentos independentes, que foram transformados em log pela equação $X = \text{Log}(x)$, normalizados e utilizados para obtenção da curva logarítmica do CC50.

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos demográficos e clínicos de voluntários inseridos no estudo

Para o presente estudo, um total de 24 voluntários foi recrutado, distribuído em dois grupos. O grupo de indivíduos eutróficos foi composto por 12 participantes, sendo 7 homens e 5 mulheres, com média de idade de 24,08 anos ($\pm 3,09$). O grupo de indivíduos obesos também contou com 12 participantes, sendo 7 homens e 5 mulheres, com média de idade de 27,50 anos ($\pm 5,82$) (Tabela 4). Entre os participantes eutróficos, 58,33% se autodeclararam brancos, 41,67% pardos e nenhum participante se identificou como preto. Por outro lado, no grupo de indivíduos com obesidade, 41,67% se autodeclararam pretos, 33,33% brancos e 25% pardos.

Tabela 4. Aspectos demográficos e clínicos de voluntários inseridos no estudo

Parâmetro	Indivíduos eutróficos (n=12)	Indivíduos obesos (n=12)
Idade (anos) \pm SD	24,08 \pm 3,09	27,5 \pm 5,82
IMC (kg/m ²) \pm SD	20,82 \pm 2,04	35,02 \pm 2,51
RCQ \pm SD	0,75 \pm 0,04	0,91 \pm 0,09
CC \pm SD	71,98 \pm 5,45	105,75 \pm 7,03
Sexo (F/M)	41,67% / 58,33%	41,67% / 58,33%
Raça/Cor (%)	58,33% brancos, 41,67% pardos, 0% preto	33,33% brancos, 25% pardos, 41,67% pretos
Comorbidades		
Diabetes mellitus II (n, %)	0 (0%)	2 (16,67%)
Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (n, %)	0 (0%)	3 (25%)

Hipertensão arterial (n, %)	0 (0%)	2 (16,67%)
Doença do Refluxo Gastroesofágico (n, %)	0 (0%)	3 (25%)
Asma (n, %)	0 (0%)	1 (8,33%)
Apneia obstrutiva do sono (n, %)	0 (0%)	0 (0%)
Artropatias (n, %)	0 (0%)	0 (0%)
Eventos tromboembólicos (n, %)	0 (0%)	1 (8,33%)
Insuficiência renal crônica (n, %)	0 (0%)	0 (0%)
Insuficiência hepática crônica (n, %)	0 (0%)	0 (0%)
Insuficiência cardíaca (n, %)	0 (0%)	0 (0%)
Hipotireoidismo	0 (0%)	1 (8,33%)

Fonte: Elaborada pelo autor (2025). F = Feminino, M = Masculino; SD = Desvio Padrão; n = frequência absoluta; % = frequência relativa; RCQ = relação cintura/quadril; CC = circunferência da cintura. O indivíduo obeso que relata ter apresentado eventos tromboembólicos arteriais, incluindo infarto agudo do miocárdio, ambos ocorridos após a doença COVID-19. Os dois indivíduos obesos com hipertensão arterial e os dois com diabetes mellitus afirmam que desenvolveram essas condições também após a COVID-19. Quanto à doença hepática não alcoólica, um dos indivíduos apresenta a forma grau I, com diagnóstico desde os 8 anos de idade, enquanto o outro apresenta a mesma condição em grau II. Dois dos 12 indivíduos do grupo obeso encontram-se em uso de polimedicação.

A Tabela 4 apresenta a média do IMC dos dois grupos. O grupo eutrófico apresentou média de 20,82 kg/m² ($\pm 2,04$), enquanto o grupo de indivíduos obesos apresentou média de 35,02 kg/m² ($\pm 2,51$). A Tabela 3 também apresenta a média da razão cintura/quadril (RCQ) dos dois grupos. O grupo de indivíduos eutróficos apresentou

média de 0,75 ($\pm 0,04$), enquanto o grupo de indivíduos obesos apresentou média de 0,91 ($\pm 0,09$).

Não foram observadas comorbidades no grupo eutrófico. No entanto, entre os indivíduos obesos, foi identificado um perfil clínico heterogêneo, sendo a doença do refluxo gastroesofágico e a doença hepática gordurosa não alcoólica as comorbidades mais prevalentes (25%), seguida por diabetes mellitus tipo II e hipertensão arterial, ambas com prevalência de 16,67%. Os dados demonstram diferenças nos indicadores antropométricos entre os grupos, refletindo o estado clínico-nutricional dos indivíduos. Além disso, a presença de múltiplas comorbidades no grupo obeso reforça a associação entre obesidade e risco aumentado para doenças metabólicas e gastrointestinais.

Conforme apresentado na Tabela 5, os indivíduos eutróficos apresentaram níveis desejáveis para todos os marcadores bioquímicos avaliados. Em contraste, os indivíduos obesos mostraram alterações relevantes.

Tabela 5. Dosagem bioquímica dos voluntários inseridos no estudo

Marcadores bioquímicos	Qualitrol 1H	Eutróficos (\pm SD)	Obesos (\pm SD)
Glicose em jejum	95	73,38 \pm 6,39	83,25 \pm 14,30
Triglicerídeos	112	57,30 \pm 15,78	153 \pm 134,70
Colesterol total	94	162,29 \pm 29,31	194,91 \pm 53,51
HDL	47	55,38 \pm 18,63	45 \pm 10,01
LDL	31	80,92 \pm 32,92	107,91 \pm 43,80
Albumina	2,34	4,79 \pm 0,22	4,54 \pm 0,19
ALT/TGP	35	12 \pm 11,97	22,25 \pm 32,25
AST/TGO	45	16 \pm 9,84	18,25 \pm 8,10
Gama-GT	11	17,61 \pm 11,88	94,91 \pm 118,57
Creatinina K	1,03	0,62 \pm 0,10	0,84 \pm 0,17
Ureia	28	21,84 \pm 8,99	24,33 \pm 4,74

Fonte: Elaborada pelo autor (2025). SD = Desvio Padrão; Qualitrol 1H = controle da dosagem bioquímica no Labmax240 premium.

O colesterol total apresentou média de 194,91 \pm 53,51 mg/dL, situando-se entre os valores desejáveis e o limite para classificação como limítrofe. O LDL apresentou média de 107,91 \pm 43,80 mg/dL, com valores variando de ótimos a limítrofes para altos, considerando a dispersão amostral. Além disso, observou-se elevação nos níveis de ALT

($22,25 \pm 32,25$ U/L) e de Gama-GT ($94,91 \pm 118,57$ U/L), sugerindo alterações hepáticas potencialmente associadas ao estado metabólico dos indivíduos obesos.

5.2. Perfil citotóxico e mecanismo de morte celular dos extratos brutos de *C. sativa* L. ricos em CBD, CBG e THCV

O valor de CC50 de CBD frente aos macrófagos murinos foi de 28,49 ug/mL (Fig. 15A). A análise estatística indicou que o controle diferiu significativamente ($F = 612,5$; $p < 0,0001$) das concentrações 25 a 400 ug/mL, com $p < 0,0001$ para todas as comparações. Por sua vez, CBG apresentou CC50 de 47,56 ug/mL (Fig. 15B), com o controle diferindo significativamente das concentrações de 3,125 ug/mL ($p = 0,0053$), 6,25 ug/mL ($p = 0,0046$) e 50 a 400 ug/mL ($p < 0,0001$ em todas as comparações). Ademais, THCV apresentou CC50 de 8,68 ug/mL (Fig. 15C), onde o controle diferiu das concentrações 6,25 ug/mL ($p = 0,0002$) e 25 a 400 ug/mL ($p < 0,0001$).

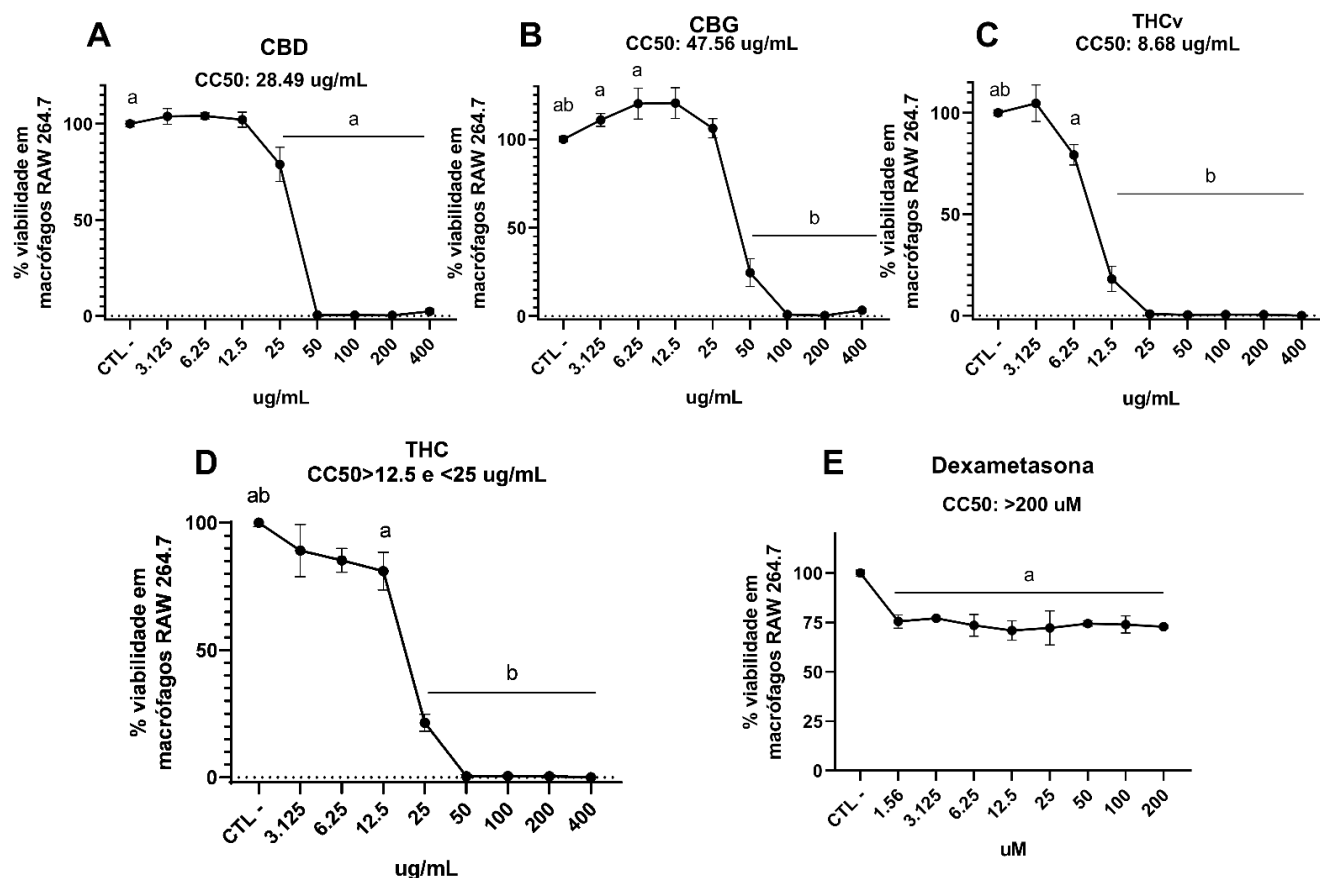
Por conseguinte, não foi possível estimar com certeza o CC50 do THC frente a linhagem celular devido à alta variabilidade dos dados, indicando que é necessário um maior número de amostras para obter uma regressão linear precisa. Contudo, observou-se redução significativa na viabilidade celular a partir da concentração de 12,5 µg/mL (Fig. 15D), que diferiu do controle ($p = 0,0078$). Além disso, a concentração de 25 µg/mL já resultou em viabilidade inferior a 50% (média de 21,47%), com todas as concentrações de 25 a 400 µg/mL apresentando diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,0001$).

Por fim, para a dexametasona, também não foi possível estimar a CC50, mas por um motivo distinto, já que mesmo na maior concentração testada (200 µM), a viabilidade celular permaneceu acima de 50% (Fig. 15E). Apesar disso, observou-se diferença estatística entre o grupo controle e todas as concentrações avaliadas: 200 µM ($p = 0,0005$), 100 µM ($p = 0,0007$), 50 µM ($p = 0,0009$), 25 µM ($p = 0,0004$), 12,5 µM ($p = 0,0003$), 6,25 µM ($p = 0,0006$), 3,125 µM ($p = 0,0021$) e 1,56 µM ($p = 0,0012$). As concentrações testadas mantiveram uma média de viabilidade de aproximadamente 75% das células.

Os extratos de *Cannabis sativa* ricos em fitocanabinoides foram avaliados quanto à citotoxicidade frente a eritrócitos humanos (Figura 16). Os resultados (Figuras 16A-D) demonstraram que os extratos não apresentaram atividade hemolítica significativa (CBD:

F = 95,45; CBG: F = 169,9; THCV: F = 487,1; THC: F = 83,58; em todos os casos, $p < 0,0001$) nas concentrações testadas, quando comparados ao controle negativo (solução salina). Foi observada diferença estatística ($p < 0,0001$) entre todos os extratos e o controle positivo, indicando baixa hemólise induzida pelos extratos, em concordância com os achados anteriores.

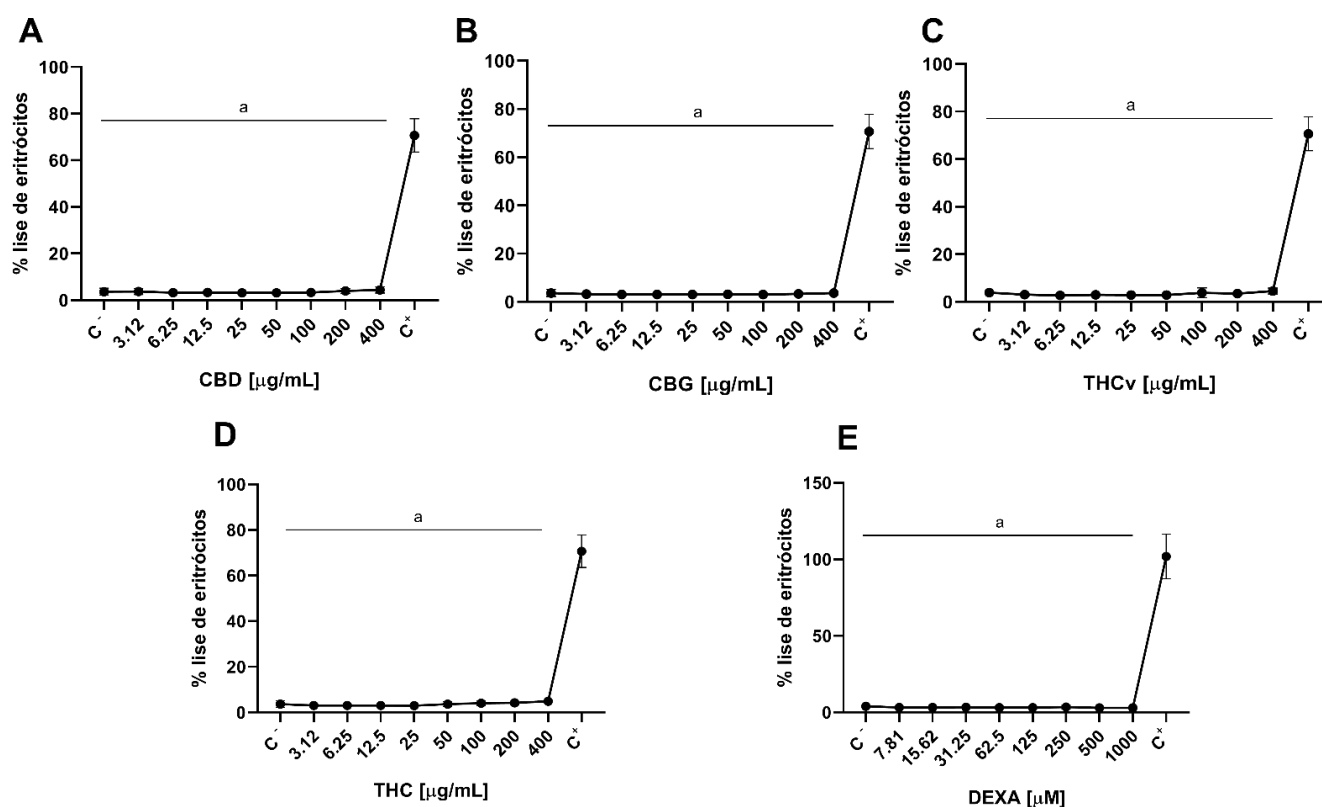
Figura 15. Avaliação da Concentração Citotóxica Média (CC50) em linhagem de macrófagos murinos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). CTL- = controle negativo, sem tratamento. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **Figura A** = a (grupo controle x concentrações de 25 a 400 ug/mL); **Figura B** = a (grupo controle x concentrações de 3,125 e 6,25 ug/mL), b (grupo controle x concentrações de 50 a 400 ug/mL); **Figura C** = a (grupo controle x concentração de 6,25 ug/mL), b (grupo controle x concentrações de 12,5 a 400 ug/mL); **Figura D** = a (grupo controle x concentração de 12,5 ug/mL), b (grupo controle x concentrações de 25 a 400 ug/mL); **Figura E** = a (grupo controle x todas as concentrações testadas, com o mesmo p-valor). As barras de erro nas Figuras A a E representam o desvio padrão (SD) de cada grupo. Os grupos e concentrações foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn.

De modo semelhante, a dexametasona, utilizada como controle no ensaio de dosagem de citocinas, também não apresentou atividade hemolítica significativa nas concentrações testadas (Figura 16E), quando comparada ao controle negativo. No entanto, diferenças significativas ($F = 270,1$; $p < 0,0001$) foram observadas em relação ao controle positivo. Assim, não foi possível determinar os valores de HC50 (concentração que causa 50% de hemólise) para os compostos testados, uma vez que não se atingiu o limiar necessário para esse cálculo.

Figura 16. Análise quantitativa da Concentração Hemolítica Média (HC50)

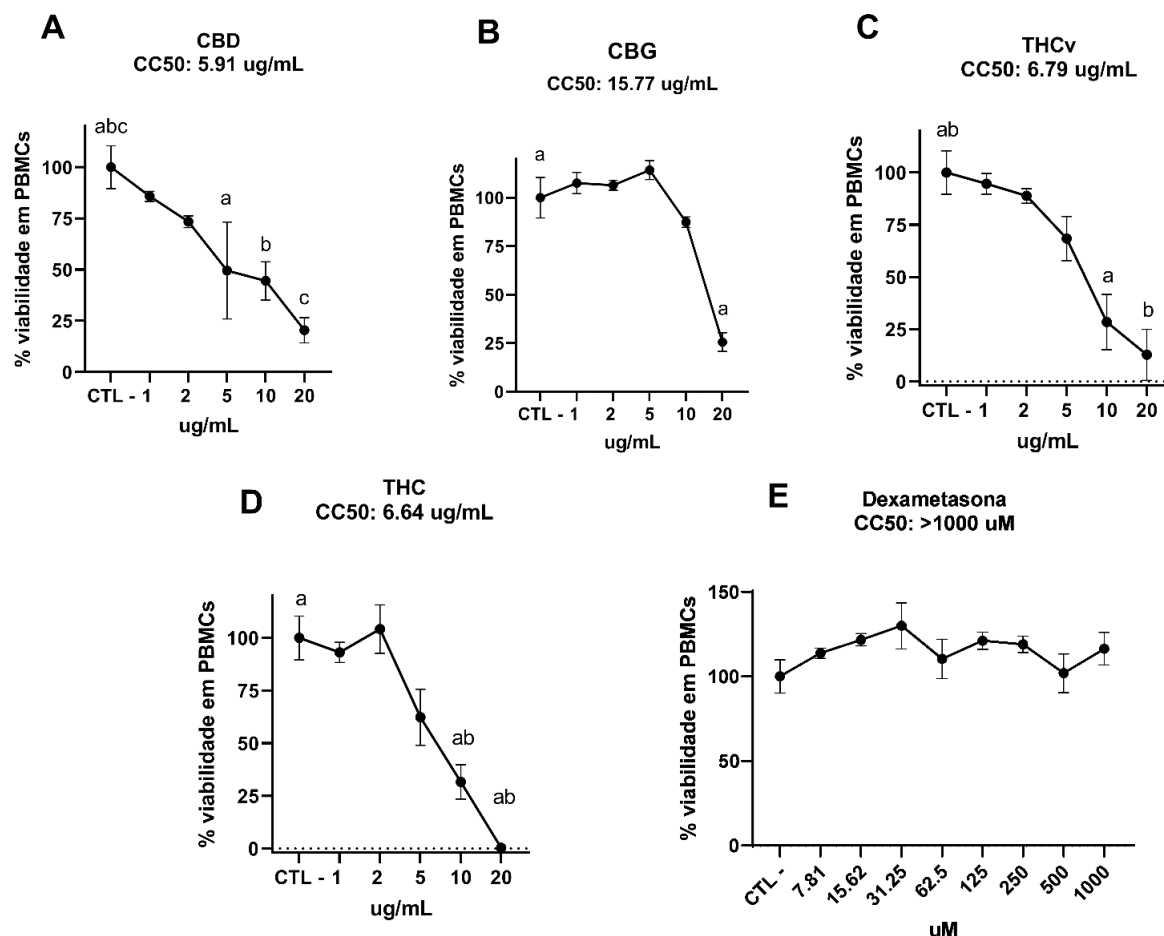


Fonte: Elaborada pelo autor (2025). C- = controle negativo, PBS; C+ = controle positivo, água deionizada; DEXA = dexametasona. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **a** (grupo controle, todas as concentrações testadas x controle positivo). As barras de erro nas Figuras A a E representam o desvio padrão (SD) de cada grupo. Os grupos e concentrações foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn.

Da mesma forma, foi realizada a avaliação da CC50 dos tratamentos frente às PBMCs (Figura 17), também por meio do método colorimétrico de MTT. O valor de CC50

de CBD frente aos linfócitos e monócitos do sangue periférico (PBMCs) foi de 5,91 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 17A). Com base nesse resultado, os experimentos imunológicos subsequentes utilizaram uma concentração que mantivesse aproximadamente 80% da viabilidade celular, correspondente à CC20, estimada em 2 $\mu\text{g/mL}$ para este extrato. Optou-se pelo uso de concentrações inteiras na condução dos ensaios.

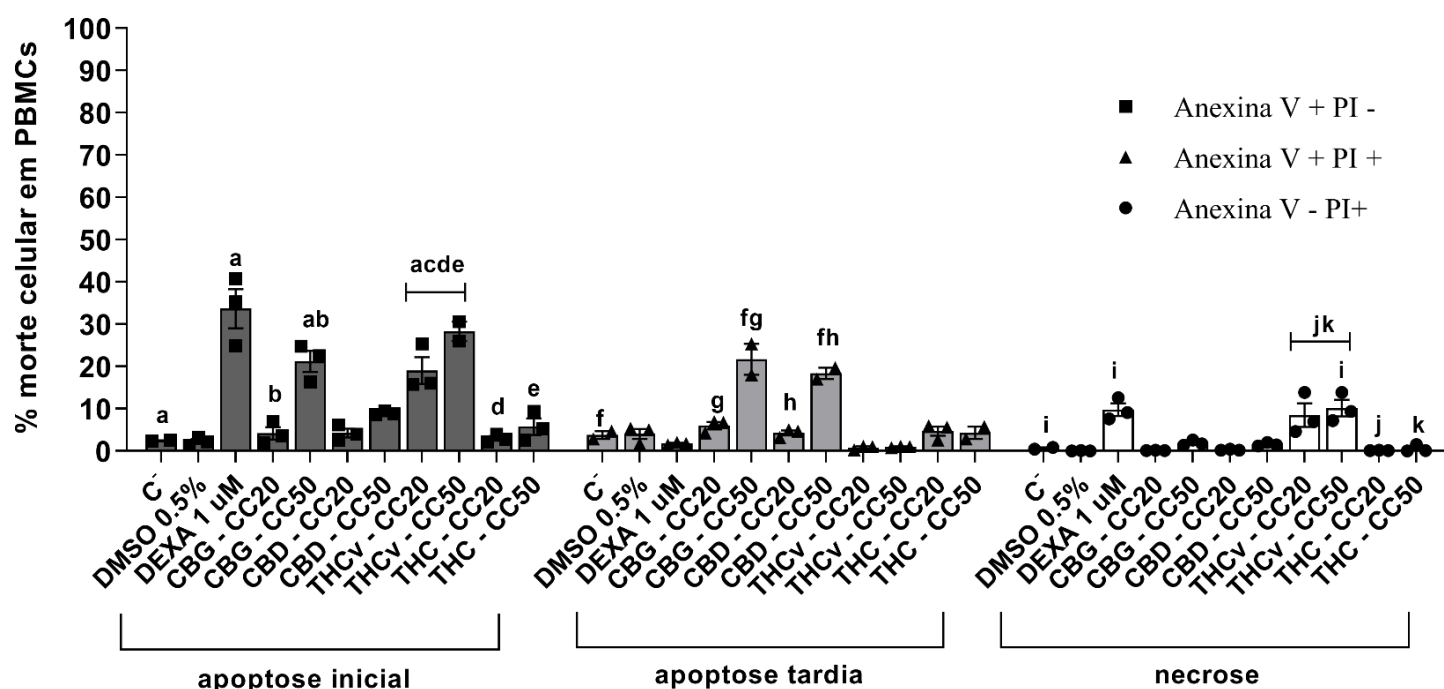
Figura 17. Determinação da Concentração Citotóxica Média (CC50) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs: células mononucleares do sangue periférico; CTL- = controle negativo, sem tratamento. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **Figura A** = a (grupo controle x concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$); **Figura B** = a (grupo controle x concentrações de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$); **Figura C** = a (grupo controle x concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$), b (grupo controle x concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$); **Figura D** = a (grupo controle x concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$), b (concentração de 10 x 20 $\mu\text{g/mL}$). As barras de erro nas Figuras A a E representam o desvio padrão (SD) de cada grupo. Os grupos e concentrações foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn.

A análise estatística revelou que o controle diferiu significativamente ($F = 9,41$; $p < 0,0001$) das concentrações de 5 ug/mL ($p = 0,0298$), 10 ug/mL ($p = 0,0041$) e 20 ug/mL ($p < 0,0001$). Por sua vez, para o CBG a CC50 foi de 15,77 ug/mL (CC20: 5 ug/mL), com o controle diferindo significativamente ($F = 33,66$; $p < 0,0001$) apenas da concentração de 20 ug/mL ($p = 0,0001$) (Fig. 17B). O THCV apresentou CC50 de 6,79 (CC20: 2ug/mL), sendo observada diferença estatística ($F = 13,67$; $p < 0,0001$) entre o controle e as concentrações de 10 ug/mL ($p = 0,0003$) e 20 ($p < 0,0001$) (Fig. 17C).

Figura 18. Avaliação da citotoxicidade frente a PBMCs por citometria de fluxo



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). C- = controle negativo, sem tratamento; DMSO 0,5%: dimetilsulfóxido a 0,5%, veículo; DEXA: dexametasona; PI: iodeto de propídeo. Os símbolos ■, ▲ e ●, representam, respectivamente, marcação positiva para anexina V (apoptose inicial), anexina v em associação com iodeto de propídeo (apoptose tardia) e iodeto de propídeo isolado (necrose). Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **a** (grupo controle x dexametasona, CBG CC50, THCV CC20 e CC50); **b** (CBG CC20 x CBG CC50); **c** (THCV CC20 x THCV CC50); **d** (THC CC20 x THCV CC20 e CC50); **e** (THC CC50 x THCV CC20 e CC50); **f** (grupo controle x CBG CC50 e CBD CC50); **g** (CBG CC20 x CBG CC50); **h** (CBD CC20 x CBD CC50); **i** (grupo controle x dexametasona e THCV CC50); **j** (THC CC20 x THCV CC20 e CC50); **k** (THC CC50 x THCV CC20 e CC50). As barras de erro na Figura representam o erro padrão da média (SEM) de cada grupo. Os grupos e concentrações foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*two-way ANOVA*, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn.

Por conseguinte, THC apresentou CC50 de 6,66 (CC20: 2 ug/mL) com o grupo controle diferindo significativamente ($F = 32,09$; $p < 0,0001$) das concentrações 10 e 20 ug/mL ($p < 0,0001$), bem como entre estas duas concentrações ($p = 0,0293$) (Fig. 17D). Por último, a dexametasona mesmo na maior concentração testada (1000 μ M), manteve a viabilidade celular permaneceu em 100% (Fig. 17E), sem diferença estatística ($F = 1,08$; $p = 0,3815$) em relação ao controle.

Ademais, investigou-se o mecanismo de morte celular induzido pelos tratamentos (($F = 140,36$; $p < 0,0001$; Figura 18). Em relação à apoptose inicial (Fig. 18), observou-se que o controle negativo diferiu significativamente dos grupos tratados com dexametasona, CBG na CC50, bem como THCv nas CC20 e CC50 ($p < 0,0001$).

Além disso, CBG CC50 diferiu significativamente de CBG CC20 ($p < 0,0001$), assim como os tratamentos com THCv CC20 e CC50 entre si ($p = 0,0167$). De maneira semelhante, THC na CC20 apresentou diferença estatística em relação a THCv CC20 e THCv CC50 ($p < 0,0001$), o que também foi observado para THC CC50 em comparação aos mesmos grupos ($p < 0,0001$).

No que tange à apoptose tardia (Fig. 18), o controle negativo diferiu significativamente dos grupos tratados com CBG na CC50 e CBD na CC50 ($p < 0,0001$). Ademais, CBG CC50 diferiu significativamente de CBG CC20 ($p < 0,0001$), assim como os tratamentos com CBD CC20 e CC50 entre si ($p < 0,0001$). Sobre a presença de necrose nos grupos avaliados (Fig. 17), o controle negativo diferiu significativamente dos grupos tratados com dexametasona ($p = 0,0181$) e THCv na CC50 ($p = 0,0117$). Além disso, THC na CC20 apresentou diferença estatística em relação a THCv CC20 ($p = 0,0150$) e THCv CC50 ($p = 0,0013$), o que também foi observado para THC CC50 em comparação aos mesmos grupos ($p = 0,0267$; $p = 0,0026$, respectivamente).

5.3. Determinação do extrato bruto de C. sativa L. rico em fitocanabinoides com potencial imunomodulador frente a PBMCs de indivíduos com obesidade

Para a triagem inicial com o objetivo de selecionar o extrato que seguiria para os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e de modulação por citometria de fluxo, foi conduzido um experimento preliminar com um número reduzido de indivíduos obesos (N=3). Nessa etapa, buscou-se avaliar o perfil imunomodulador dos quatro extratos ricos em fitocanabinoides por meio da análise da frequência de citocinas em 100.000 eventos, via citometria de fluxo.

Na Figura 19A, são apresentados os resultados da frequência de TNF- α em monócitos CD14+. Foi observada a redução de TNF- α nos grupos (H = 18,25; p = 0,0056) tratados com dexametasona (p = 0,0436) e com THCV na CC20 (t = 14,24; p < 0,0001), ambos em comparação ao grupo controle. O tratamento com THCV apresentou efeito semelhante ao da dexametasona, sugerindo ação anti-inflamatória.

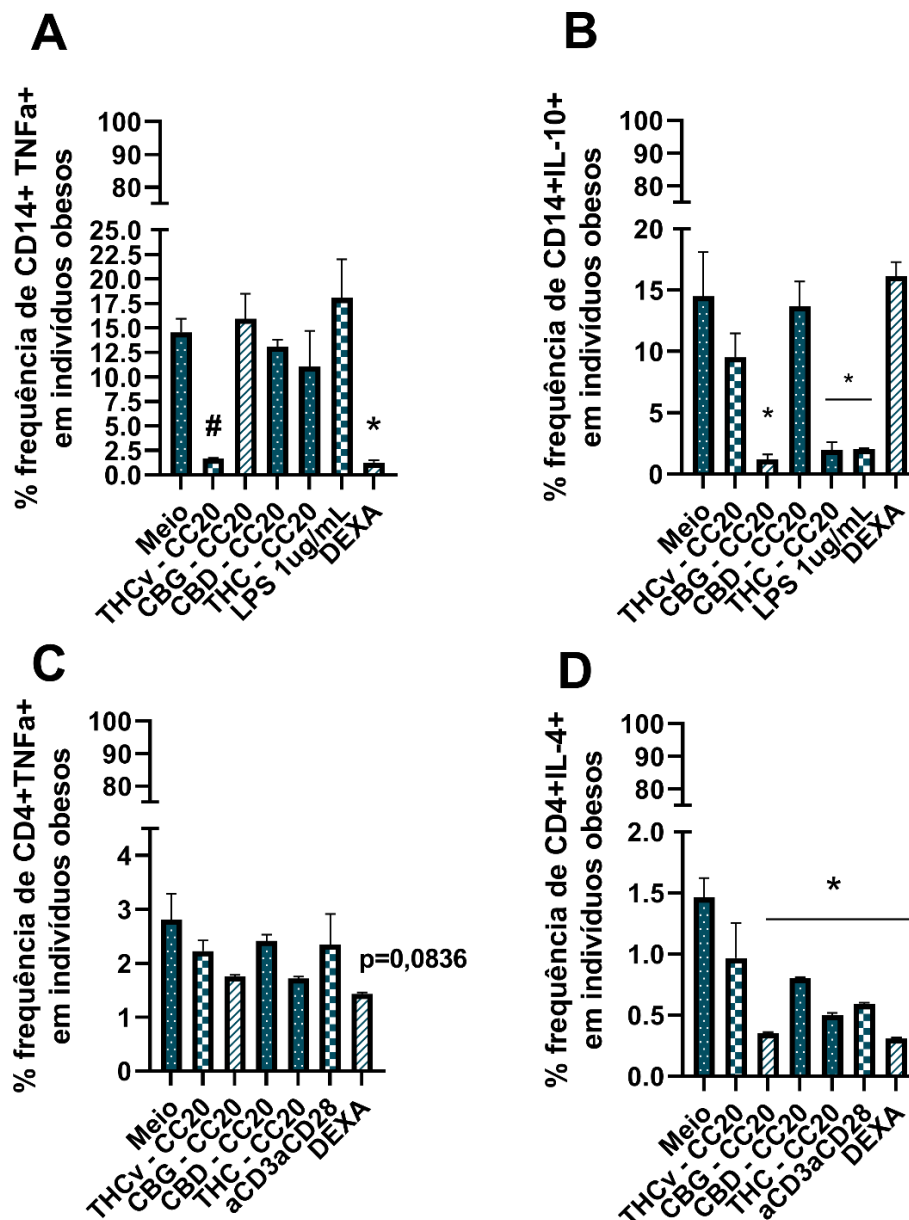
Na Figura 19B, é apresentada a frequência de IL-10 em monócitos CD14+. Os grupos CBG CC20 (p = 0,0301), THC CC20 (p < 0,0001) e LPS (p = 0,0013) apresentaram redução (H = 18,52; p = 0,0051) na frequência de IL-10 em comparação ao controle, indicando um possível perfil regulador negativo.

Já na Figura 19C, avaliou-se a frequência de TNF- α em linfócitos CD4+. Não observada diferenças estatísticas entre os grupos (F = 2,02; p = 0,1752), apenas uma tendência de diminuição da frequência de TNF- α no grupo tratado com dexametasona (p = 0,0836), em relação ao controle.

Por fim, a Figura 19D mostra a frequência de IL-4 em linfócitos CD4+. Observou-se redução da IL-4 nos grupos tratados com CBG (p = 0,0001), CBD (p = 0,0100), THC (p = 0,0004), estímulo policlonal com α CD3-CD28 (p = 0,0010) e dexametasona (p < 0,0001), quando comparados ao grupo controle (F = 10,72; p = 0,0001). Esses achados sugerem que tais extratos ricos em fitocanabinoides exercem um efeito modulador negativo sobre o eixo Th2.

Figura 19. Avaliação imunomoduladora preliminar dos diferentes extratos brutos de

C. sativa ricos em fitocanabinoides frente a PBMCs de indivíduos obesos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários com obesidade ($n = 3$), a fim de realizar a triagem do estudo. Meio = sem tratamento; LPS = lipopolissacarídeo de *E. coli*; α CD3- α CD28 = estímulo policlinal de célula T α CD3-CD28; DEXA = dexametasona. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelo símbolo (*). O símbolo (#) representa diferenças significativas identificadas por testes estatísticos distintos dos convencionais aplicados entre grupos. As barras de erro nas Figuras A a D representam o erro padrão da média (SEM) de cada grupo. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados.

Diante desses resultados, o extrato de THCv foi selecionado para as próximas etapas da pesquisa, por demonstrar tendência inicial a um perfil imunomodulador

favorável a inflamação crônica de baixo grau, caracterizado pela redução de TNF- α em monócitos e pela manutenção de níveis semelhantes ao controle para IL-10 em monócitos CD14+ e IL-4 em linfócitos CD4+.

5.4. Avaliação da produção de citocinas do extrato bruto de C. sativa L. rico em tetrahidrocanabiverina (THCv) frente a PBMCs de indivíduos eutróficos e obesos

Com relação aos resultados de ELISA para citocinas (Figura 20), observou-se diferença significativa ($H = 30,71$; $p < 0,0001$) entre os grupos tratados com THCv e dexametasona em indivíduos obesos (Fig. 20A; $p = 0,0001$) na dosagem de IL-6. A dosagem de IL-12, por sua vez, não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados (Fig. 19B; $H = 12,82$; $p = 0,0767$).

Na dosagem de IL-17 (Fig.20C), os grupos analisados demonstraram diferenças estatísticas significativas entre si ($F = 18,40$; $p < 0,0001$). No grupo de indivíduos eutróficos, observou-se tendência à diferença entre o grupo controle (meio) e o grupo tratado com enterotoxina B de *Staphylococcus sp.* (SEB), com $p = 0,0635$.

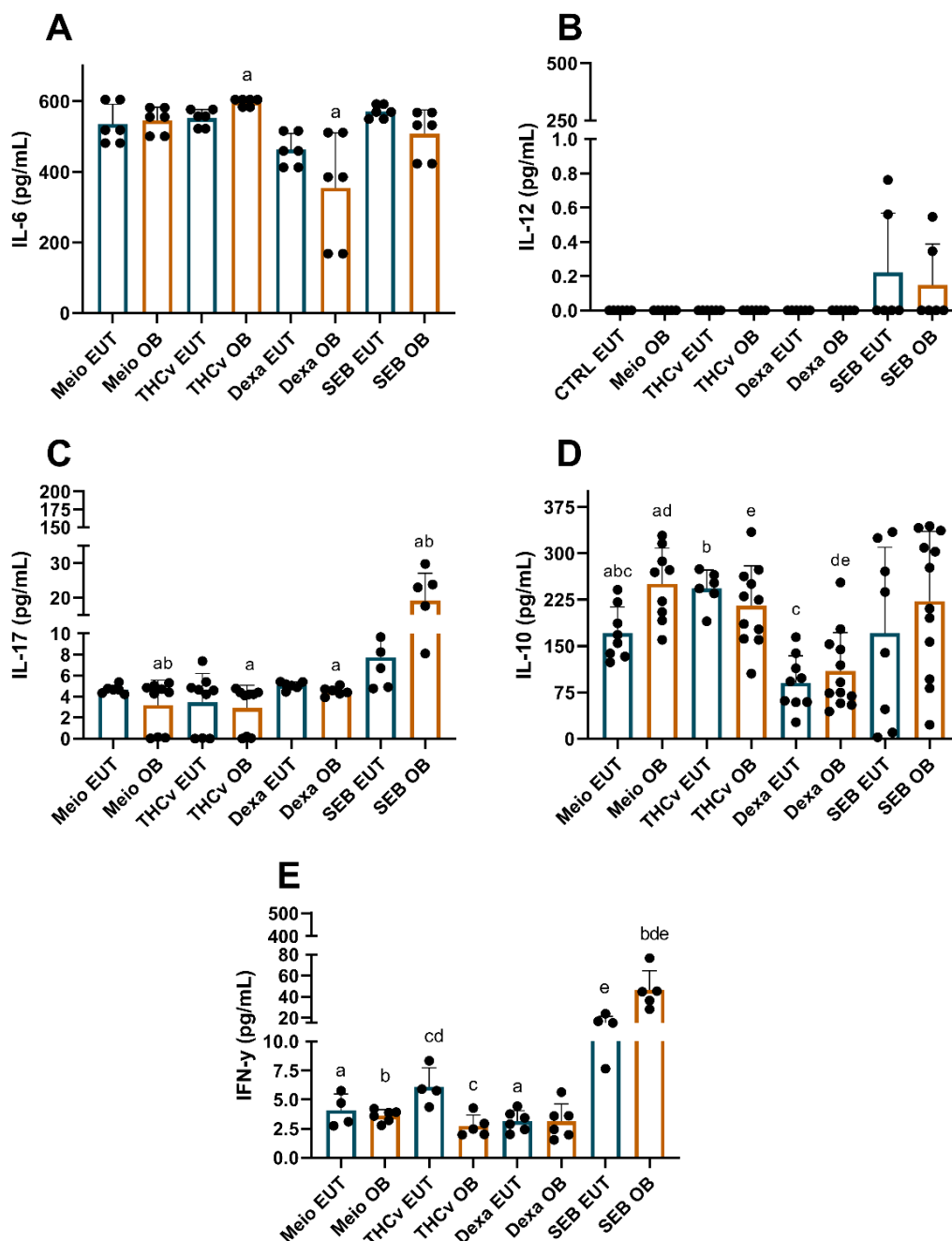
Por outro lado, entre os indivíduos obesos, o grupo controle apresentou diferença estatística em relação aos grupos tratados com THCv ($t = 02,61$; $p = 0,0311$), que exibiu discreta redução na produção da citocina; com dexametasona ($t = 02,57$; $p = 0,0499$), que demonstrou aumento na produção de IL-17; e com SEB ($t = 03,22$; $p = 0,0486$), que apresentou elevação acentuada na produção da citocina. Ainda nesse grupo, observou-se diferença significativa entre os tratamentos com THCv e SEB ($t = 03,34$; $p = 0,0443$), apresentando perfil de produção de IL-17 semelhante ao observado na comparação entre os grupos controle e SEB.

Com relação a dosagem de IL-10, no grupo de indivíduos eutróficos (Figura 20D), o grupo sem tratamento diferiu significativamente ($F = 5,42$; $p < 0,0001$) dos grupos tratados com: THCv, que apresentou aumento na produção de IL-10 ($t = 03,32$; $p = 0,0209$), e com dexametasona, que demonstrou redução ($t = 04,66$; $p = 0,0023$). Além disso, o grupo tratado com THCv também diferiu do grupo tratado com dexametasona ($t = 06,45$; $p = 0,0013$).

Observou-se ainda que, entre os grupos sem tratamento, os indivíduos obesos apresentaram níveis mais elevados de IL-10 em comparação aos eutróficos ($t = 03,20$; $p = 0,0062$). No grupo dos indivíduos obesos, o meio diferiu significativamente da

dexametasona ($t = 09,16$; $p < 0,0001$), assim como o grupo tratado com THCV também diferiu da dexametasona ($t = 06,36$; $p < 0,0001$).

Figura 20. Dosagem de citocinas do extrato bruto de *C. sativa* rico em THCV frente a PBMCs de indivíduos eutróficos e obesos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 12$) e indivíduos obesos ($n = 12$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio

= sem tratamento; Dexa = dexametasona; SEB = enterotoxina B de *Staphylococcus sp.* Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **Figura A** = a (grupo THCV OB x Dexa OB); **Figura C** = a (grupo meio OB x THCV OB, Dexa OB e SEB OB); b (grupo THCV OB x SEB OB); **Figura D** = a (grupo meio EUT x meio OB); b (grupo meio EUT x THCV EUT); c (grupo meio EUT x Dexa EUT); d (grupo meio OB x Dexa OB); e (grupo THCV OB x Dexa OB); **Figura E** = a (grupo meio EUT x Dexa EUT); b (grupo meio OB x SEB OB); c (grupo THCV EUT x THCV OB); d (grupo THCV OB x SEB OB); e (grupo SEB EUT x SEB OB). As barras de erro nas Figuras A a E representam o desvio padrão (SD) de cada grupo. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados.

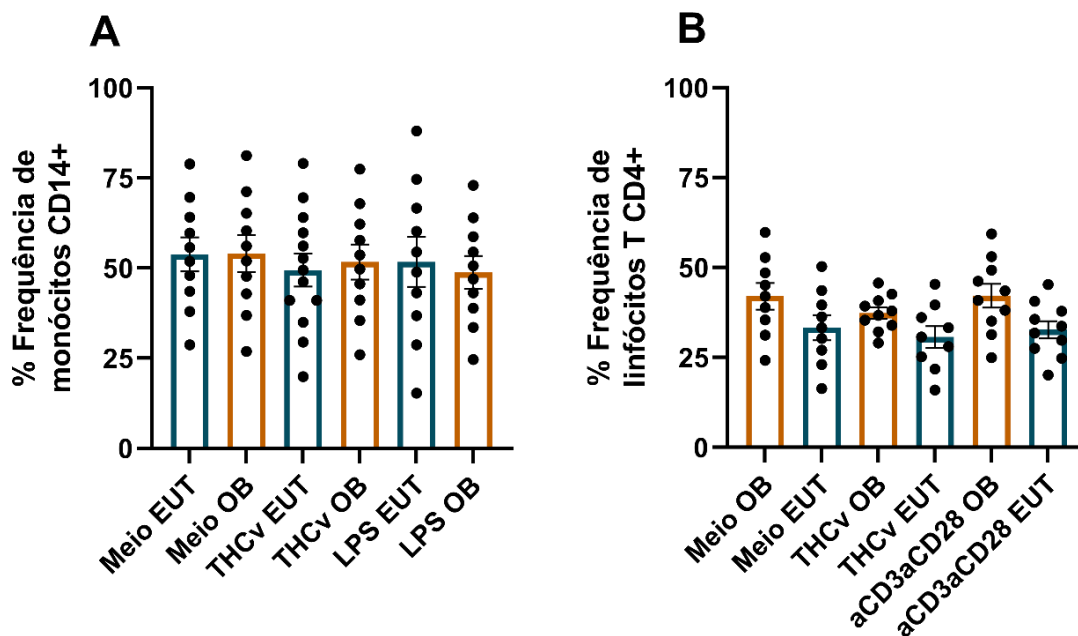
Por fim, na dosagem de IFN- γ (Figura 20E), houve uma redução na produção de IFN- γ no grupo sem tratamento de indivíduos eutróficos em comparação com o grupo tratado ($F = 24,56$; $p < 0,0001$) com dexametasona ($t = 3,43$; $p = 0,0415$). Considerando os diferentes tratamentos entre os indivíduos obesos, o grupo tratado com SEB diferiu significativamente tanto do grupo com meio ($t = 5,20$; $p = 0,0066$) quanto do grupo tratado com THCV ($t = 4,20$; $p = 0,0247$).

No mais, observou-se diferença estatística entre os grupos tratados com THCV entre indivíduos eutróficos e obesos ($t = 3,86$; $p = 0,0062$), sendo que os indivíduos obesos apresentaram menor produção da citocina. Por outro lado, em resposta ao tratamento com SEB, os indivíduos obesos apresentaram maior produção de IFN- γ em comparação com os eutróficos ($t = 3,57$; $p = 0,0073$).

5.5. Atividade imunomoduladora do extrato bruto de *C. sativa* L. rico em tetrahydrocannabiniverina (THCv) frente a monócitos (CD14+) e linfócitos CD4+ de indivíduos eutróficos e com obesidade

No que tange à frequência de células CD14+ (Fig. 21A), não foi observada diferença significativa entre os grupos ($F = 0,14$; $p = 0,9726$). De forma similar, em relação à frequência de linfócitos T CD4+ (Fig. 21B), não foi detectada diferença estatística na comparação par a par entre os grupos.

Figura 21. Frequência de monócitos CD14+ e linfócitos T CD4+ frente a PBMCs de indivíduos eutróficos e obesos

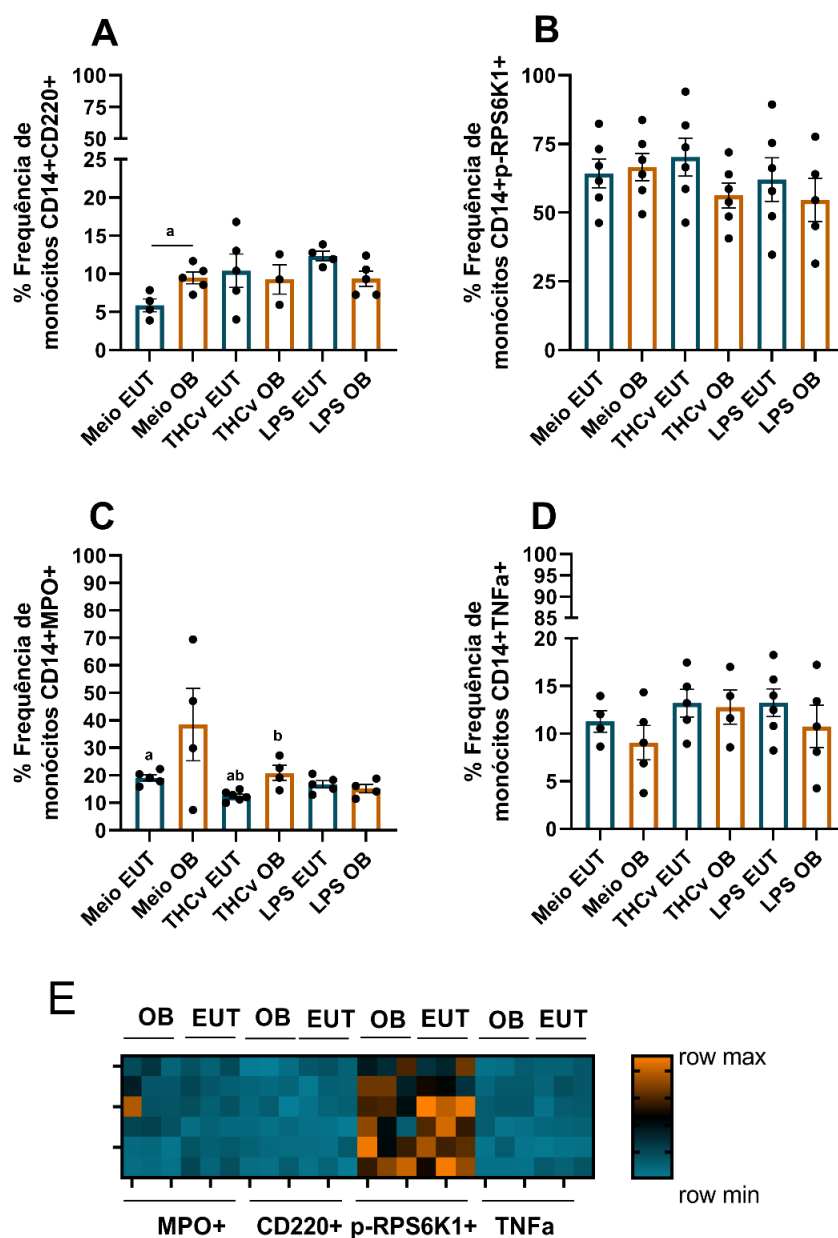


Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 9$) e indivíduos obesos ($n = 9$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio = sem tratamento; LPS = lipopolissacarídeo de *E. coli*; αCD3-αCD28 = estímulo policlonal de célula T αCD3-CD28. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo. As barras de erro nas Figuras A e B representam o erro padrão da média padrão (SEM) de cada grupo. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de **Kruskal**-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados.

Sobre a frequência de monócitos CD14+ expressando CD220 (Fig. 22A), verificou-se que o grupo de indivíduos obesos apresentou aumento significativo da frequência de monócitos CD220+ em relação ao grupo eutrófico ($t = 3,09$; $p = 0,0179$), sem tratamento.

Por outro lado, na análise da frequência de monócitos CD14+ com ativação da quinase beta-1 da proteína ribossomal S6 (p-RPS6K1; Fig. 22B), proteína ativada pela via mTOR, não foi observada diferença estatística ($F = 0,85$; $p = 0,5266$) entre os grupos.

Figura 22. Frequência de monócitos CD14+ expressando CD220 e positivos para p-RPS6K1, mieloperoxidase e TNF- α em indivíduos eutróficos e obesos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 9$) e indivíduos obesos ($n = 9$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio = sem tratamento; LPS = lipopolissacarídeo de *E. coli*; CD220 = receptor de insulina; p-RPS6K1 = Quinase

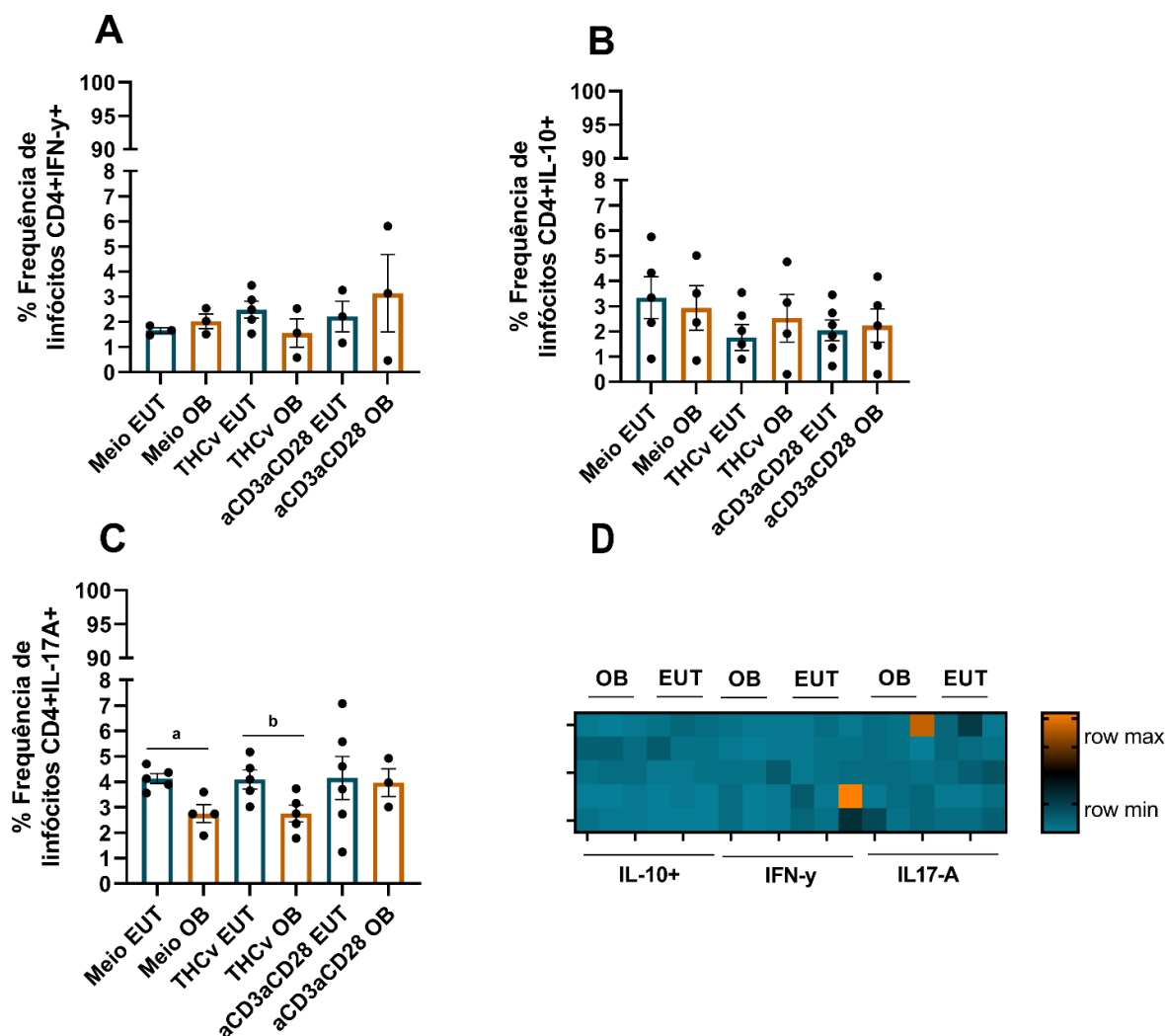
beta-1 da proteína ribossomal S6 (alvo a jusante da via mTOR para síntese proteica); MPO = mieloperoxidase. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **Figura A** = a (grupo meio EUT x meio OB); **Figura C** = a (grupo meio EUT x THCV EUT), b (THCV EUT x THCV OB). As barras de erro nas Figuras A a D representam o erro padrão da média padrão (SEM) de cada grupo. **Fig. E** = *Heat Map* da frequência de monócitos CD14+ positivos para CD220, p-RPS6K1, mieloperoxidase e TNF- α nos tratamentos de indivíduos eutróficos e obesos com base nas análises de citometria de fluxo apresentando no eixo X, para cada grupo, cada indivíduo, e no eixo Y, os tratamentos “meio, THCV e estímulo” nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente, por grupo com obesidade e com eutrofia. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados.

Paralelamente, avaliou-se a frequência de monócitos CD14+ positivos para MPO (Fig. 22C). Foi observada redução significativa da frequência de monócitos MPO⁺ em indivíduos eutróficos tratados com THCV em relação aos eutróficos sem tratamento ($t = 5,12$; $p = 0,0069$) e aumento significativo da frequência de monócitos MPO⁺ no grupo de indivíduos com obesidade tratados com THCV em comparação aos eutróficos tratados ($t = 3,56$; $p = 0,0073$).

Em contrapartida, na modulação de TNF- α (Fig. 22D), não foram observadas diferenças estatísticas ($F = 5,59$; $p = 0,3477$) entre os grupos na comparação geral. Em relação a modulação de citocinas produzidas por linfócitos CD4⁺ tratados, não houve diferença estatística entre os grupos referentes à IL-10 (Fig. 23A; $H = 4,05$; $p = 0,5422$).

Em relação ao IFN- γ (Fig. 23B), também não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos ($F = 0,65$; $p = 0,6659$). A análise da modulação de IL-17A em linfócitos CD4⁺ totais (Fig. 23C), evidenciou redução significativa da frequência de IL-17A em indivíduos obesos quando comparados aos eutróficos ($U=0$; $p = 0,0159$), bem como em indivíduos obesos tratados com THCV em relação aos eutróficos ($U=2$; $p = 0,0317$).

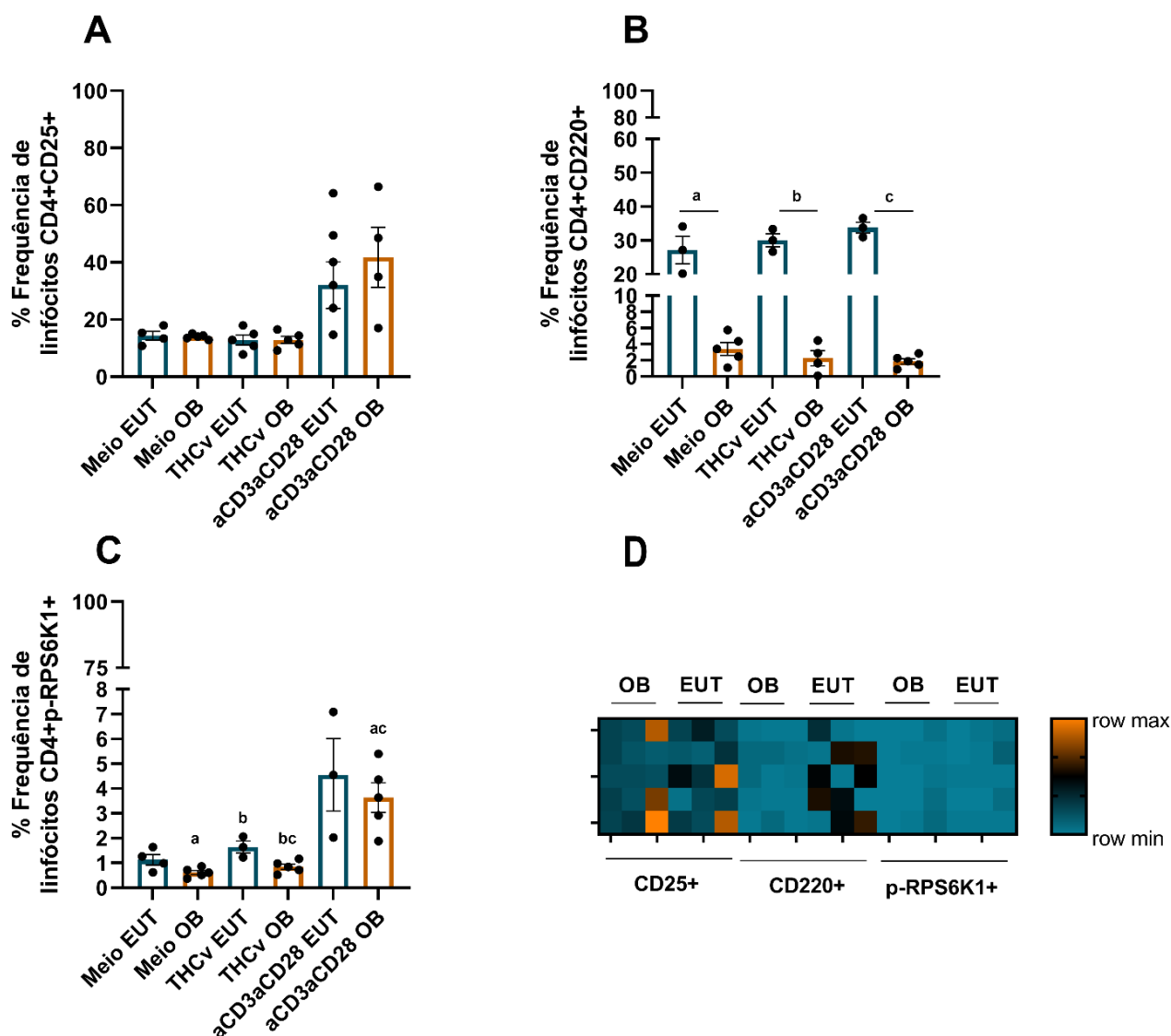
Figura 23. Frequência de linfócitos T CD4+ positivos para IFN- γ , IL-10 e IL-17A em indivíduos eutróficos e obesos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 9$) e indivíduos obesos ($n = 9$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio = sem tratamento; α CD3- α CD28 = estímulo policlonal de célula T α CD3-CD28. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **Figura C** = a (grupo meio EUT x meio OB), b (THCV EUT x THCV OB). As barras de erro nas Figuras A a C representam o erro padrão da média padrão (SEM) de cada grupo. **Fig. D** = *Heat Map* da frequência de linfócitos T CD4+ positivos para IFN- γ , IL-10 e IL-17-A nos tratamentos de indivíduos eutróficos e obesos com base nas análises de citometria de fluxo apresentando no eixo X, para cada grupo, cada indivíduo, e no eixo Y, os tratamentos “meio, THCV e estímulo” nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente, por grupo com obesidade e com eutrofia. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way ANOVA*, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados.

A frequência de CD25 (Fig. 24A), marcador de ativação de linfócitos CD4+, não apresentou diferença significativa entre os grupos ($H = 7,49$; $p = 0,1866$). Já a modulação do receptor de insulina CD220 (Fig. 24B) nessas mesmas células revelou diferença significativa entre os grupos ($H = 17,77$; $p = 0,0032$). O grupo eutrófico apresentou maior frequência desse receptor em comparação aos indivíduos obesos nas três condições: sem tratamento ($U = 0$; $p = 0,0357$), tratados com THCv ($U = 0$; $p = 0,0003$) e com α CD3- α CD28 ($U = 0$; $p = 0,0067$).

Figura 24. Frequência de linfócitos T CD4+ ativados (CD25+), expressando CD220 e positivos p-RPS6K1 em indivíduos eutróficos e obesos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 9$) e indivíduos obesos ($n = 9$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio

= sem tratamento; α CD3- α CD28 = estímulo policlonal de célula T α CD3-CD28; CD220 = receptor de insulina; p-RPS6K1 = Quinase beta-1 da proteína ribossomal S6 (alvo a jusante da via mTOR para síntese proteica). Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **Figura A** = a (grupo THCV EUT x α CD3- α CD28 EUT); **Figura B** = a (grupo meio EUT x meio OB), b (THCV EUT x THCV OB), c (α CD3- α CD28 EUT x α CD3- α CD28 OB); **Figura C** = a (grupo meio OB x α CD3- α CD28 OB), b (THCV EUT x THCV OB), c (THCV OB x α CD3- α CD28 OB). As barras de erro nas Figuras A a C representam o erro padrão da média padrão (SEM) de cada grupo. **Fig. D**= *Heat Map* da frequência de linfócitos T CD4+ ativados (CD25+) e positivos para CD220 e p-RPS6K1 nos tratamentos de indivíduos eutróficos e obesos com base nas análises de citometria de fluxo apresentando no eixo X, para cada grupo, cada indivíduo, e no eixo Y, os tratamentos “meio, THCV e estímulo” nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente, por grupo com obesidade e com eutrofia. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way* ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados.

De forma similar, a análise da frequência de linfócitos T CD4+ com ativação da quinase beta-1 da proteína ribossomal S6 (p-RPS6K1; Fig. 24C), ativada pela via mTOR, mostrou diferença estatística entre os grupos ($F = 8,85$, $p = 0,0002$). Foi evidenciado o aumento da frequência em indivíduos obesos sem tratamento comparados aos tratados com α CD3- α CD28 ($t = 5,16$; $p = 0,0067$), redução da frequência da proteína quinase no grupo tratado com THCV em relação aos eutróficos ($t = 3,36$; $p = 0,0151$), e aumento do marcador frente ao estímulo policlonal em comparação ao grupo tratado com THCV nos indivíduos obesos.

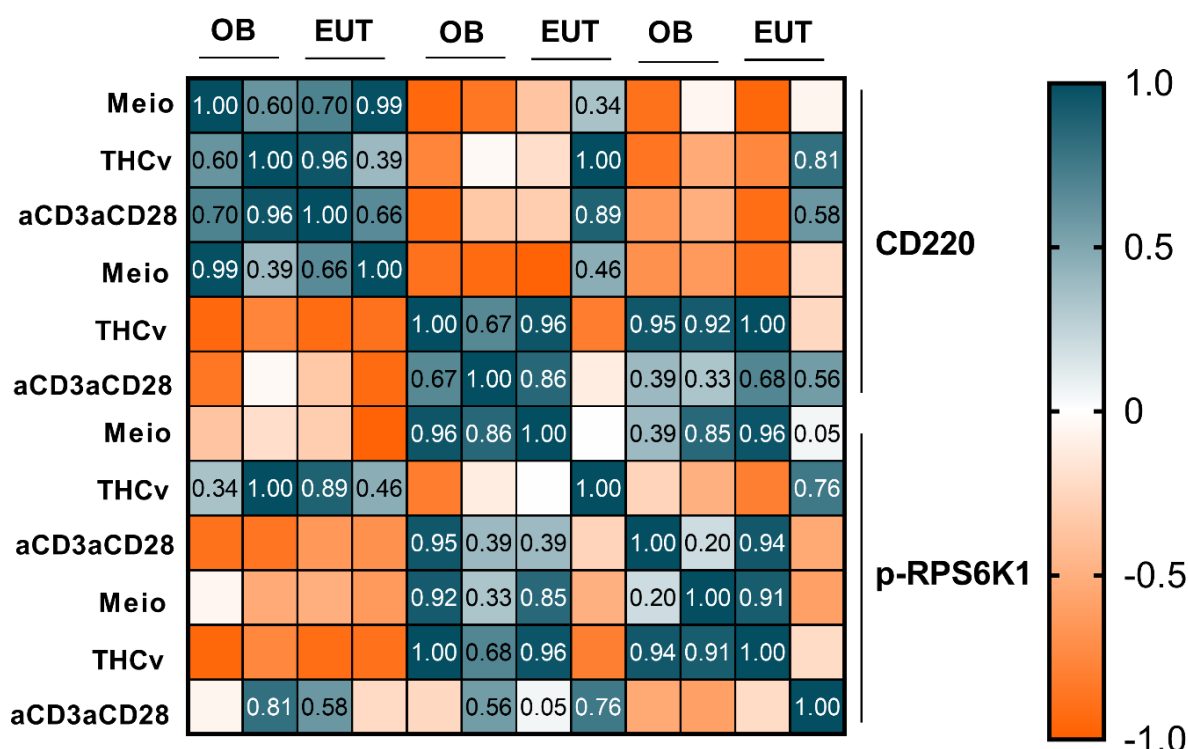
Foi observada redução nos marcadores CD220 e p-RPS6K1 em linfócitos T CD4 totais de indivíduos obesos, os quais estão biologicamente relacionados, já que o receptor de insulina ativa a via PI3K-Akt-mTOR, que culmina na ativação da quinase beta-1 da proteína ribossomal S6, fundamental para o metabolismo celular. Por isso, investigamos se essas reduções estavam correlacionadas.

Conforme a matriz de correlação de Pearson (Figura 25), foi observada correlação positiva significativa entre a redução dos marcadores CD220 e p-RPS6K1 em indivíduos obesos tratados com THCV ($r = 0,995$; $p = 0,005$). Em indivíduos eutróficos, também foi observada correlação positiva significativa entre a frequência aumentada de CD220 e p-RPS6K1 no tratamento com THCV ($r = 1,000$; $p = 0,013$).

Por outro lado, na condição sem tratamento dos indivíduos com obesidade, foi observada correlação negativa entre esses marcadores, embora não estatisticamente

significativa ($r = -0,371$; $p = 0,538$). Além disso, verificou-se correlação positiva ($r = 0,887$; $p = 0,045$) entre a redução de p-RPS6K1 no tratamento com THCV em obesos e o aumento de CD220 na mesma população após estímulo policlonal (anti-CD3/CD28); contudo, essa associação deve ser interpretada com cautela, pois envolve fenômenos biologicamente distintos.

Figura 25. Matriz de correlação entre os marcadores CD220 e p-RPS6K1 em linfócitos T CD4⁺ de indivíduos eutróficos e obesos

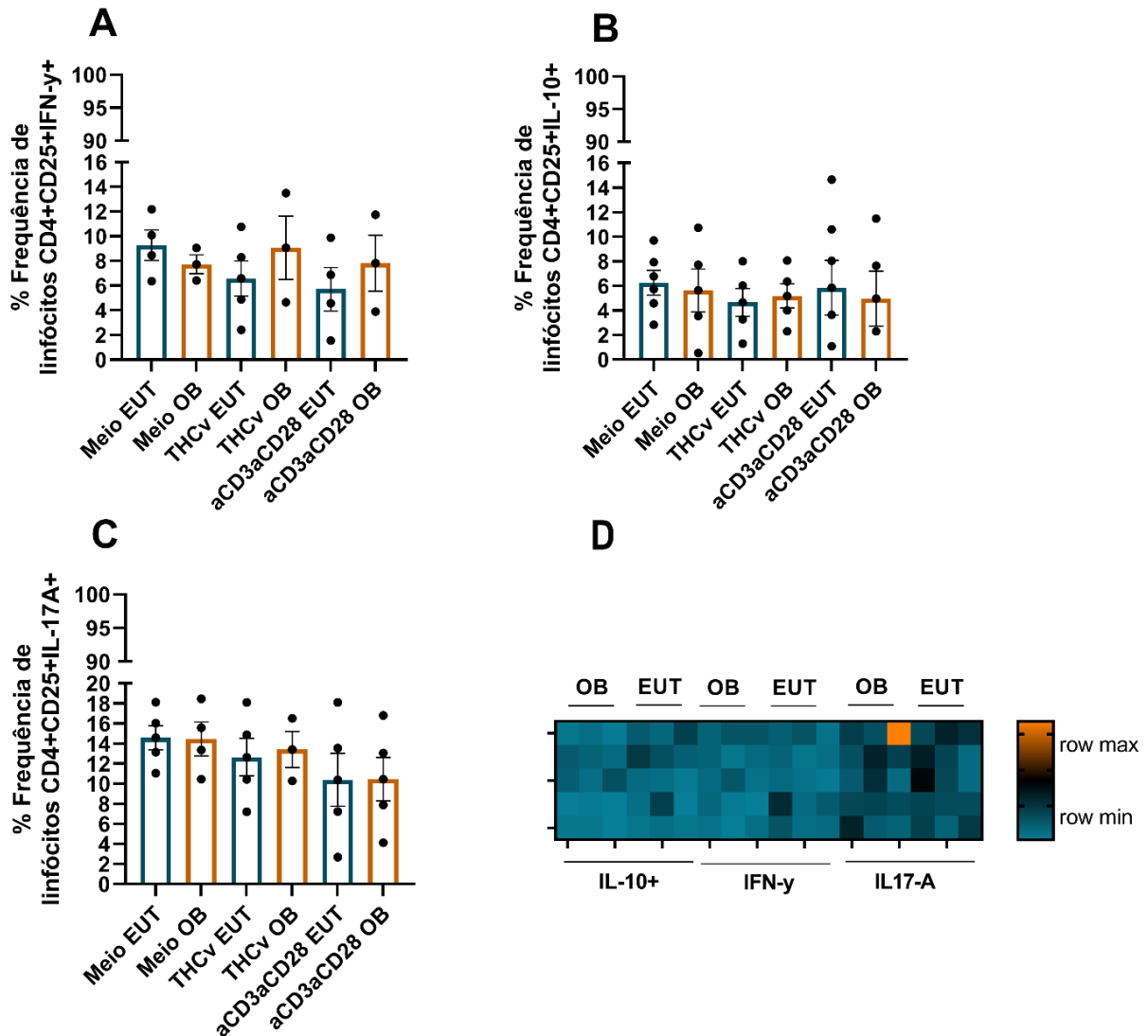


Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 9$) e indivíduos obesos ($n = 9$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio = sem tratamento; α CD3- α CD28 = estímulo policlonal de célula T α CD3/ α CD28; CD220 = receptor de insulina; p-RPS6K1 = Quinase beta-1 da proteína ribossomal S6 (alvo a jusante da via mTOR para síntese proteica). A escolha do teste de correlação foi baseada na inspeção visual do scatter plot, avaliando distribuição, linearidade e presença de outliers. O teste de Pearson (r) é aplicado para dados normalmente distribuídos com relação linear; caso contrário, utiliza-se Spearman (ρ) para dados não paramétricos com relação monotônica; e Kendall (τ) para amostras pequenas ou com muitos empates. Também foi avaliado a significância estatística do valor do coeficiente de correlação, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

Com relação à modulação da frequência de citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺ ativados (CD25⁺), foi observado que, das citocinas avaliadas (Fig.26A-C): IFN- γ (

$F = 0,66$, $p = 0,6567$), IL-10 ($H = 1,91$, $p = 0,8060$) e IL-17A ($F = 0,86$, $p = 0,5215$), nenhuma apresentou diferença significativa entre os grupos.

Figura 26. Frequência de linfócitos T CD4+ ativados (CD25+) positivos para IFN- γ , IL-10 e IL-17A em indivíduos eutróficos e obesos

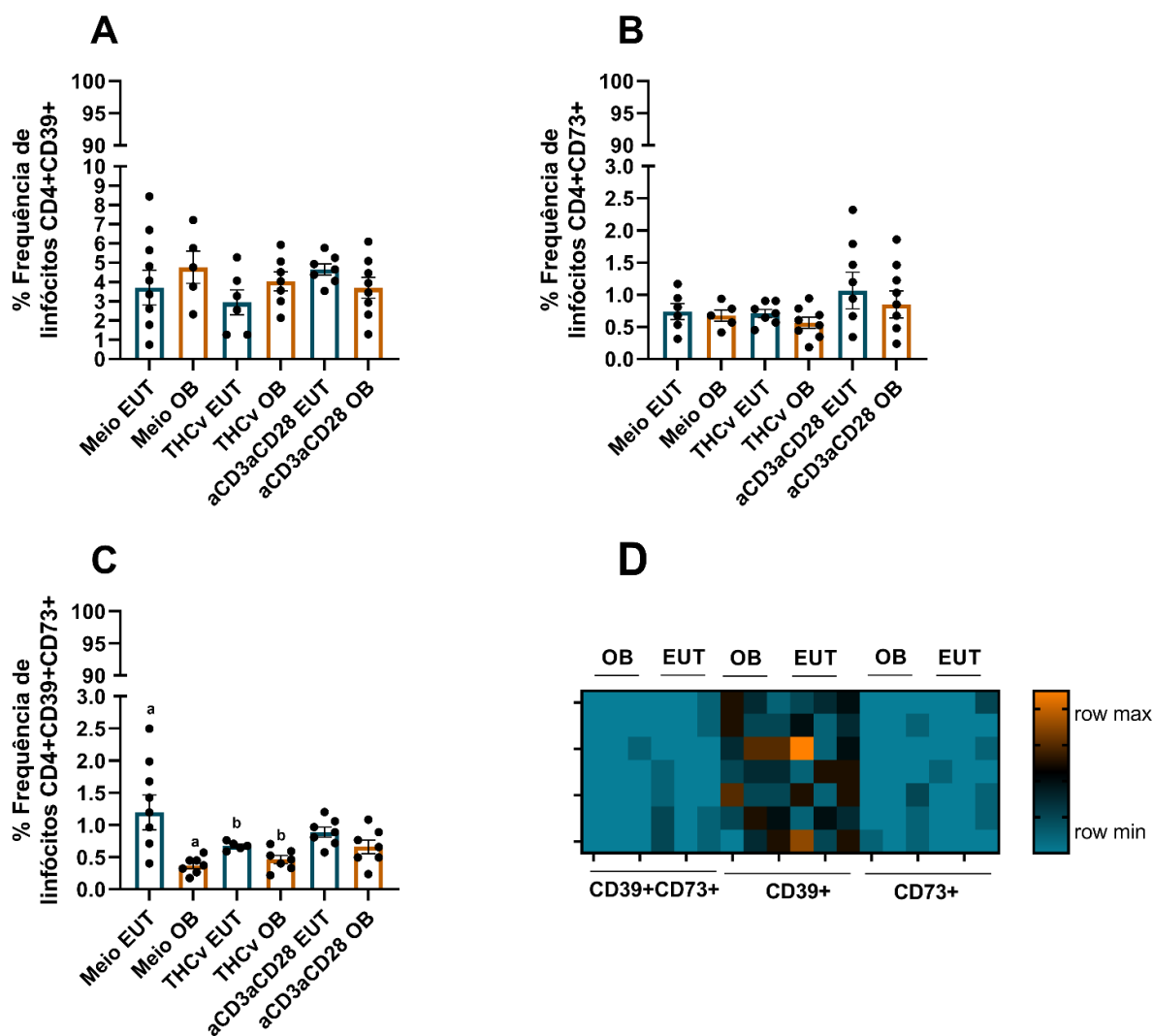


Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 9$) e indivíduos obesos ($n = 9$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio = sem tratamento; α CD3- α CD28 = estímulo policlonal de célula T α CD3/ α CD28. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo. As barras de erro nas Figuras A a C representam o erro padrão da média padrão (SEM) de cada grupo. **Fig. D** = Heat Map da frequência de linfócitos T CD4+ ativados (CD25+) positivos para IFN- γ , IL-10 e IL-17-A nos tratamentos de indivíduos eutróficos e obesos com base nas análises de citometria de fluxo apresentando no eixo X, para cada grupo, cada indivíduo, e no eixo Y, os tratamentos "meio, THCv e estímulo" nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente, por grupo com obesidade e com eutrofia. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (one-

way ANOVA, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados.

Por fim, foi avaliada a modulação da frequência das ectonucleotidases CD39 e CD73 em linfócitos CD4⁺ (Fig. 27A-C). Individualmente, CD39 (marcador pró-inflamatório) não apresentou diferença significativa entre os grupos ($F = 0,79$, $p = 0,5636$). De forma semelhante, CD73 (marcador supressor) isoladamente também não mostrou diferença estatisticamente significativa ($F = 0,79$, $p = 0,5636$).

Figura 27. Frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando para CD39 e CD73 em indivíduos eutróficos e obesos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). PBMCs foram coletadas de voluntários eutróficos ($n = 9$) e indivíduos obesos ($n = 9$), formando os grupos do estudo. OB = indivíduos obesos; EUT = indivíduos eutróficos; Meio = sem tratamento; α CD3- α CD28 = estímulo policlonal de célula T α CD3-CD28. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **Figura C** = a (grupo meio EUT x meio OB), b (meio EUT x THCV EUT), c (THCV EUT x THCV OB). As barras de erro nas Figuras A a C representam o erro padrão da média padrão (SEM) de cada grupo. **Fig. D= Heat Map** da frequência de linfócitos T CD4+ expressando para CD39 e CD73 nos tratamentos de indivíduos eutróficos e obesos com base nas análises de citometria de fluxo apresentando no eixo X, para cada grupo, cada indivíduo, e no eixo Y, os tratamentos. Os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas, iniciando-se com o teste de Shapiro-Wilk (W) para a verificação da normalidade dos dados; quando apropriado, foi aplicado o teste ANOVA (*one-way ANOVA*, F), seguido pelo pós-teste de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo pós-teste de Dunn. Análises comparativas entre dois grupos foram conduzidas utilizando-se o teste t pareado ou não pareado, ou ainda os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney (U), conforme a adequação à distribuição dos dados. “meio, THCV e estímulo” nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente, por grupo com obesidade e com eutrofia.

Todavia, ao avaliar a subpopulação duplo positiva para CD39⁺CD73⁺ (Fig. 27C), foi observada redução da frequência dessa população supressora em indivíduos obesos quando comparados aos eutróficos ($H = 21,67$, $p = 0,0006$), tanto sem tratamento ($U = 3$; $p = 0,0011$) quanto após tratamento com THCV ($U = 3,50$; $p = 0,0202$).

6. DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura visceral e associada a inflamação crônica e diversas comorbidades, como diabetes e doenças cardiovasculares (De Heredia; Gómez-Martínez; Marcos, 2012; Lin; Li, 2021; Rubino et al., 2025). Essa inflamação envolve aumento de citocinas pró-inflamatórias e resistência insulínica, agravando o quadro clínico (Melson et al., 2025; Trim; Lynch, 2022). Medicamentos anti-obesidade enfrentam limitações, como efeitos colaterais e alta taxa de reganho de peso após a interrupção (Greenway, 2015; Müller et al., 2021).

Por isso, a modulação da inflamação crônica é uma estratégia promissora (Liu; Nikolajczyk, 2019). Fitocanabinoides da *Cannabis sativa*, como THCV, CBD e CBG, têm mostrado potencial para reduzir a inflamação por meio da interação com receptores canabinoides e outras vias (Braile et al., 2021; Jastrzab; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2022). Baseado nisso, nosso estudo investiga os efeitos desses fitocanabinoides na inflamação crônica e nas alterações metabólicas de células do sangue periférico em indivíduos com obesidade, abrindo novas perspectivas terapêuticas.

Observou-se que a obesidade esteve associada ao aumento da RCQ, indicando maior acúmulo de gordura abdominal e risco cardiometabólico (Szczerbowska-Boruchowska et al., 2023). Alterações no perfil lipídico e nas enzimas hepáticas sugerem comprometimento metabólico que pode evoluir para outras complicações (Szczerbowska-Boruchowska et al., 2023), como doença cardiovascular, TD2M, NAFLD, insuficiência renal e acidente vascular cerebral.

Em relação aos dados de citotoxicidade obtidos em macrófagos RAW 264.7, esse teste inicial teve como objetivo preliminar avaliar a atividade dos extratos antes das análises em PBMCs. Os resultados indicam que os extratos ricos em fitocanabinoides apresentam um potencial citotóxico variável contra esses macrófagos, enquanto a dexametasona demonstrou menor toxicidade nas condições avaliadas.

Entretanto, os efeitos dos glicocorticoides sobre células do sistema imune inato de modelos murinos são complexos e dependem de respostas transcricionais específicas para a indução da morte celular (Ehrchen; Roth; Barczyk-Kahlert, 2019). No contexto da cannabis medicinal, essa citotoxicidade pode ser atribuída à ativação do receptor canabinoide tipo 1 (CB1R), conforme evidenciado pela indução de apoptose, dependente do tempo e da concentração, pelo endocanabinoide anandamida (AEA) em células deciduais de ratos (Fonseca; Correia-da-Silva; Teixeira, 2009). Por fim, a alta variabilidade observada nos dados relativos ao THC indica a necessidade de um maior número de replicações para uma definição mais precisa de seu CC50.

A ausência de toxicidade em hemácias observada nos extratos brutos de *C. sativa* representa um indicativo promissor para a continuidade dos estudos, pois demonstra que tais extratos não promovem lise ou dano à membrana dessas células, preservando sua integridade e evitando potenciais efeitos adversos hematológicos.

Por outro lado, a ausência de toxicidade observada para a dexametasona, empregada como controle, corrobora seu perfil conhecido de segurança hematológica em doses terapêuticas. Tal resultado foi igualmente constatado no ensaio realizado com PBMCs, onde não houve evidência de citotoxicidade nas concentrações testadas, conforme avaliação pelo método colorimétrico de MTT.

Os resultados da avaliação da CC50 dos extratos de Cannabis sativa em PBMCs indicam que os fitocanabinoides apresentam diferentes níveis de citotoxicidade. A escolha das concentrações para os experimentos subsequentes foi baseada na CC20, garantindo viabilidade celular próxima a 80%, preservando a funcionalidade das células para as análises imunológicas. A partir do cálculo das concentrações, seguiu-se para a avaliação do mecanismo molecular de morte celular induzidos por estes materiais vegetais.

A análise do mecanismo de morte celular induzido pelos tratamentos avaliados indicou que a via predominante foi a apoptose, especialmente em sua fase inicial, conforme evidenciado pela marcação positiva para AnV e pelas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o controle negativo. Em menor

proporção, observou-se apoptose tardia, e, de forma pontual, necrose, sugerindo que estes mecanismos também podem contribuir para a citotoxicidade observada, embora em intensidade inferior. Assim, os resultados apontam que os materiais vegetais testados, particularmente CBG (CC50), THCV (CC20 e CC50), CBD (CC50) e a dexametasona, promovem morte celular programada como mecanismo principal, com participação secundária de necrose em condições específicas. Esse perfil pode indicar uma potencial vantagem terapêutica, associada a um melhor perfil de segurança.

Tal fenômeno pode ser explicado pelo fato de que o receptor canabinoide tipo 1 (CB1R) ativa vias intracelulares MAPKs que modulam proteínas como p53, c-Jun e membros da família Bcl-2, promovendo a cascata apoptótica mitocondrial (Bockmann et al., 2022). Os endocanabinoides AEA, 2-AG, bem como o THC e canabinoides sintéticos, induzem apoptose em diferentes modelos celulares via CB1, de forma dependente de dose e tempo (Fonseca; Correia-da-Silva; Teixeira, 2009), com aumento da atividade das caspases 2 e 7 (Costa et al., 2021). Por outro lado, a ativação do receptor CB2 está associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), à indução do eixo PERK–ATF4–CHOP (Almada et al., 2020), b) e ao estresse do retículo endoplasmático (Lojpur et al., 2019; Maia et al., 2020).

Contrastando com esse perfil, estudos recentes de Medrano et al., (2024) indicam que, ao serem tratadas com canabinoides sintéticos, as células hematopoéticas não leucêmicas apresentam maior resistência à morte celular, provavelmente devido à baixa expressão do receptor CB2, quando comparadas às células de leucemia mieloide aguda (AML). Isso ocorre porque a ativação do CB2 por canabinoides sintéticos em células AML promove um aumento exacerbado de ROS, dano mitocondrial e hiperativação da poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1), culminando em morte celular via Parthanatos, um processo independente de caspases. Por sua vez, a baixa expressão de CB2 nas células-tronco hematopoéticas (HSCs) contribui para a preservação da sua viabilidade.

Os resultados referentes à dexametasona indicam que seus efeitos pró-apoptóticos variam conforme as condições particulares do cultivo celular e, principalmente, o nível de ativação das células estudadas. Por exemplo, em monócitos humanos pró-inflamatórios

induzidos por GM-CSF, mas não em células tratadas com M-CSF, o tratamento com glicocorticoides promoveu apoptose por meio da inibição da atividade de ERK1/2. A regulação negativa da atividade de ERK1/2 foi associada à redução da atividade da quinase ribossomal p90 S6 (p90RSK), diminuição da fosforilação da proteína Bcl-2 Antagonista da Morte Celular (Bad) e aumento da atividade da caspase-3, culminando na indução do processo apoptótico (Achuthan et al., 2018; Ehrchen; Roth; Barczyk-Kahlert, 2019). No entanto, são necessários estudos adicionais para compreender o mecanismo que leva a indução morte celular por esses materiais vegetais. Esses resultados sugerem a necessidade de pesquisas mais aprofundadas para entender a atividade destes extratos de *C. sativa* frente a células humanas *ex vivo*.

Os resultados da triagem preliminar indicam que extratos ricos em fitocanabinoides exercem efeitos imunomoduladores distintos sobre PBMCs de indivíduos obesos. Entre eles, o extrato rico em THCV destacou-se por reduzir significativamente a produção de TNF- α em monócitos, efeito comparável ao da dexametasona, sugerindo um potencial anti-inflamatório. Esse achado vai de encontro com Furgieue et al., (2023), onde foi observado que o CBD antagonizou a expressão de mRNA de TNF- α induzida por estímulo em PBMCs cultivadas; entretanto, tal efeito não se traduziu em redução da proteína.

Em contraste, dados de Fitzpatrick et al., (2022) mostram que THC e CBD, isolados ou combinados em proporção equimolar (10 μ M:10 μ M), exacerbam a produção de TNF- α induzida por TLR4 em PBMCs de indivíduos saudáveis e pessoas com esclerose múltipla (MS), sem comprometer a viabilidade celular. Embora haja relatos de efeitos anti-inflamatórios de canabinoides sobre TLR4 — como a supressão da sinalização inflamatória por THCV em macrófagos (Romano et al., 2016) — os achados de Fitzpatrick sugerem que, em PBMCs humanas, o aumento de TNF- α pode estar relacionado à ativação das vias NF- κ B e MAPKs, previamente descrita para THC e agonistas seletivos de CB1/CB2.

No presente estudo, o THCV preservou os níveis de IL-10 em monócitos e de IL-4 em linfócitos CD4⁺, sugerindo um perfil imunomodulador que mantém citocinas

regulatórias essenciais para o controle da inflamação. Resultado semelhante foi descrito por Saroz et al., (2019) com um canabinoide sintético seletivo para CB2, que não alterou IL-4, mas induziu IL-10 em PBMCs de indivíduos saudáveis onde 85% da resposta foi mediada por G α s e pela subunidade $\beta\gamma$ (levando a fosforilação das proteínas ERK1/2 e Akt), enquanto cerca de 15% foram atribuídas a G α i (levando a ativação da proteína p38).

. Em contrapartida, CBG e THC reduziram a frequência de IL-4 em linfócitos CD4⁺ e IL-10 em monócitos, indicando modulação imunológica distinta daquela observada com THCV. Com relação à IL-10, Correa et al., (2005) observaram que a ativação de CB2 por canabinoide sintético aumentou sua produção em macrófagos ativados por LPS/IFN- γ . Em sentido oposto, Sacerdote et al., (2005) relataram que o CBD reduziu a produção de IL-10 em macrófagos peritoneais. Essas discrepâncias podem refletir diferenças na farmacodinâmica dos agonistas de CB1R e CB2R entre espécies, na natureza do estímulo e nas condições de cultura celular (Jean-Gilles et al., 2015). Quanto à IL-4, (Furgiuele et al., 2023) reportaram que o CBD diminuiu a frequência de células CD4⁺ produtoras dessa citocina, bem como seus níveis de mRNA, em PBMCs de indivíduos saudáveis.

Com base nesse conjunto de resultados, o extrato rico em THCV foi selecionado para as etapas subsequentes do estudo por apresentar um balanço promissor entre modulação da resposta inflamatória e preservação da homeostase imunológica. Contudo, é importante considerar que citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, podem desempenhar papéis duais em contextos metabólicos. Foi identificado em indivíduos obesos, correlação positiva da IL-10 com parâmetros adipométricos e, juntamente com TNF- α , esta citocina mostrou-se aumentada em relação a controles não obesos (Schmidt et al., 2015). De forma semelhante, Surendar et al. (2011), relataram que, em indivíduos com síndrome metabólica (MetS), há aumento concomitante de citocinas pró-inflamatórias (M1/Th1) e anti-inflamatórias (M2/Th2), incluindo IL-4, indicando um estado de ativação mista com respostas inflamatórias e regulatórias ocorrendo simultaneamente.

Foi observado na dosagem de citocinas que o extrato bruto de *Cannabis sativa* rico

em THCV apresentou um perfil modulador seletivo sobre a produção de citocinas em PBMCs humanas, com diferenças marcantes entre indivíduos eutróficos e obesos. Para IL-6, observou-se diferença significativa apenas entre os grupos tratados com THCV e dexametasona no grupo obeso, porém sem distinção estatística entre o tratamento com o fitocanabinoide e o grupo controle. Esse resultado sugere que a concentração utilizada do extrato não foi suficiente para modular a produção dessa citocina, a qual desempenha papel central na manutenção do estado de inflamação crônica de baixo grau característico da obesidade (Schmidt et al., 2015; Surendar et al., 2011; Valentine; Nikolajczyk, 2024).

A modulação mais evidente foi observada para a IL-17, na qual o THCV promoveu uma discreta redução da produção dessa citocina no grupo obeso. Esse resultado sugere um potencial efeito anti-inflamatório do THCV direcionado às vias associadas à resposta Th17, cuja relevância na obesidade e resistência à insulina já é amplamente reconhecida (Kurebayashi et al., 2012; Shirakawa; Sano, 2023; Wang et al., 2018).

Outro ponto importante foi o comportamento da IL-10. Nos indivíduos eutróficos, o THCV aumentou significativamente a produção dessa citocina anti-inflamatória, efeito contrário ao observado com a dexametasona, condizente com relatos de ativação de respostas regulatórias por agonistas seletivos do receptor CB2 (Saroj et al., 2019). Já no grupo obeso, mesmo sem tratamento, os níveis basais de IL-10 foram mais elevados em comparação aos eutróficos — reforçando o papel dual das citocinas na obesidade. Além disso, o THCV manteve níveis superiores frente à dexametasona, indicando um possível estímulo ou preservação das respostas regulatórias nesse contexto.

Quanto ao IFN- γ , o THCV reduziu sua produção nos obesos em comparação aos eutróficos, sugerindo um efeito modulador no grupo em estudo. No entanto, a ausência de diferença estatística entre o tratamento com THCV e o grupo controle indica que a concentração utilizada (CC20 de 2 μ g/mL) pode ter sido insuficiente para uma modulação significativa da produção dessa citocina.

A frequência de monócitos e linfócitos CD4⁺ nas PBMCs se manteve relativamente estável entre os grupos eutróficos e obesos, assim como após o tratamento com THCV.

Esse resultado é esperado no grupo obeso, uma vez que, em contextos de inflamação crônica de baixo grau, o que se observa é principalmente uma modulação funcional das células, e não necessariamente uma alteração significativa na frequência das populações celulares (De Heredia; Gómez-Martínez; Marcos, 2012; Purdy; Shatzel, 2021).

Entretanto, em relação aos monócitos do grupo eutrófico, nosso achado contrasta com dados da literatura, como os de Utomo et al., (2017), que demonstraram que o tratamento *ex vivo* com THC reduz a expressão de receptores de superfície, incluindo CD14, em monócitos isolados de PBMCs de indivíduos saudáveis. Essa discrepância pode ser atribuída a diferenças metodológicas, bem como ao estado fisiológico distinto dos indivíduos estudados (obesos *versus* eutróficos).

Em monócitos, os dados revelam achados pontuais que sugerem alterações específicas associadas tanto aos grupos quanto ao tratamento com THCV. A frequência aumentada de monócitos CD220⁺ em indivíduos obesos, quando comparados aos eutróficos, pode refletir uma modulação diferenciada de vias de sinalização celular nesses indivíduos. O estudo de Lago et al., (2021) reforça essa interpretação ao demonstrar que células imunes circulantes podem carregar a marca de alterações metabólicas na forma de expressão anormal de proteínas de superfície, incluindo reguladores centrais do metabolismo, como GLUT1, IR (CD220) e CD36. No referido trabalho, observou-se aumento da expressão de IR e CD36, concomitante à redução de isoformas de GLUT em subpopulações de PBMCs na esquizofrenia — padrão que espelha as alterações detectadas em tecidos metabolicamente relevantes, como o adiposo e o muscular, no contexto da síndrome metabólica (Boucher; Kleinridders; Ronald Kahn, 2014; Guo, 2014).

Nesse cenário, a maior frequência de monócitos CD220⁺ no grupo obeso poderia indicar uma população celular mais apta a interagir com vias metabólicas e inflamatórias, perpetuando o estado inflamatório característico desse fenótipo. Esse mecanismo é plausível, uma vez que na resistência insulínica há uma atenuação da sinalização via PI3K/Akt e um desvio para a ativação da via MAPK (Guo, 2014). O fato de esse aumento

ocorrer independentemente do tratamento com THCv sugere que tal característica esteja fortemente ligada ao perfil metabólico intrínseco do grupo obeso, apresentando baixa responsividade ao tempo de tratamento com a *Cannabis* medicinal.

Por outro lado, a análise da ativação da p-RPS6K1 (via mTOR) não revelou diferenças significativas entre os grupos estudados. Essa ausência de modulação sugere que, nas concentrações e no tempo de exposição utilizados, o THCv não interfere de forma relevante na ativação dessa via em monócitos. Essa observação contrasta com dados encontrados em estudos pré-clínicos, como o de Crewe et al., (2019), que mostraram em tecido adiposo de camundongos obesos induzidos por dieta rica em gordura a condição na qual a atividade do mTORC1 está tipicamente aumentada desembocando a manutenção da supressão dos genes lipogênicos SREBP1 e ChREBP. Todavia, embora relevantes, os achados em modelos murinos nem sempre se traduzem diretamente para humanos, reforçando a necessidade de estudos clínicos adicionais.

A via mTOR–S6, especialmente via mTORC1, é reconhecida por seu papel crucial no metabolismo e na função das células imunes inatas. Em contextos inflamatórios, sua ativação promove o aumento da tradução proteica, a proliferação celular e uma mudança para o metabolismo glicolítico, fatores que sustentam respostas pró-inflamatórias. No entanto, há evidências de que essa mesma sinalização mTOR–S6 também atua como um mecanismo regulatório importante, funcionando como um freio para conter a inflamação excessiva. Esse efeito ocorre por meio da regulação negativa dos fatores de transcrição NF- κ B e STATs, além da indução de perfis celulares anti-inflamatórios, como macrófagos M2 e células Th2, que contribuem para a resolução da inflamação (Laplane; Sabatini, 2012; Ma; Blenis, 2009).

Complementando essa visão, Utomo et al. (2017) observaram que o THC reduz a fosforilação de RPS6K1 em monócitos isolados de PBMCs de pacientes com dor abdominal crônica decorrente de pancreatite ou dor pós-cirúrgica. Essa diminuição da p-RPS6K1 sugere que o THC pode modular a via mTOR–S6, limitando o metabolismo anabólico associado à inflamação crônica e promovendo um estado imunorregulatório. Assim, embora nosso estudo não tenha observado modulação significativa da via mTOR–S6 pelo THCv nas condições testadas, os dados da literatura indicam que a

interferência nessa via pode depender da dose, do tempo de exposição e do contexto fisiopatológico.

Já em relação à MPO, um padrão distinto entre eutróficos e obesos: redução significativa da frequência de monócitos MPO⁺ nos eutróficos tratados com THCv, mas aumento no grupo obeso tratado em relação aos eutróficos tratados. É importante ressaltar que, no grupo de indivíduos obesos, não foi observada diferença significativa em relação à condição sem tratamento, o que impede inferir que o tratamento com THCv tenha promovido um aumento relativo na frequência de monócitos MPO⁺. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos obesos e eutróficos, o que contrasta com a literatura que aponta aumento desse marcador em indivíduos obesos (Monserrat-Mesquida et al., 2021). Essa divergência pode ser atribuída ao tamanho limitado da amostra, já que, visualmente, o gráfico sugere uma tendência que não foi confirmada estatisticamente. Nos eutróficos, a redução da MPO sugere um efeito anti-inflamatório potencial do THCv, visto que a mieloperoxidase é uma enzima pró-oxidante liberada por células do sistema imune inato, contribuindo para o estresse oxidativo e dano tecidual (Kargapolova et al., 2021).

Quanto à modulação de TNF- α , diferentemente do observado na etapa de triagem, não foram detectadas diferenças estatísticas. Esse resultado indica que o aumento do número amostral pode ter normalizado as variações individuais observadas inicialmente, evidenciando que, nas concentrações utilizadas, o THCv não exerceu efeito modulador consistente sobre a produção dessa citocina.

Outro achado do estudo foi de que a frequência de linfócitos CD4⁺ produtores de IL-17A é significativamente menor em indivíduos obesos em relação aos eutróficos, inclusive após tratamento com THCv. Esse resultado é consistente com os dados obtidos por ELISA, reforçando a possibilidade de um efeito anti-inflamatório do THCv direcionado às vias Th17. Embora não tenha apresentado efeito estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, o THCv pode contribuir para a redução da IL-17A em indivíduos obesos, o que pode ter implicações relevantes na regulação da resposta inflamatória associada à obesidade.

Entretanto, essa observação parece contradizer dados da literatura. SantaCruz-Calvo et al., (2021) relataram que, tanto em humanos quanto em modelos murinos, a obesidade e/ou o T2DM estão associados ao aumento da frequência de células Th17. Em humanos, uma maior proporção de células Th17 em relação às células Treg no fígado e na circulação diferencia pacientes com esteatose hepática simples daqueles com esteatohepatite, duas comorbidades comuns à obesidade e T2DM. Além disso, a supressão de células Th17 intra-hepáticas em camundongos obesos com esteatohepatite resultou na reversão da resistência insulínica e da inflamação lobular. De maneira consistente, indivíduos com resistência insulínica apresentam maior quantidade de células Th17 no tecido adiposo do que aqueles insulinosensíveis.

Considerando que nosso estudo analisou células circulantes, enquanto SantaCruz-Calvo et al. avaliaram o tecido hepático, as diferenças observadas podem refletir a migração de células Th17 para outros sítios metabólicos. A realização de análises diretamente em tecido seria fundamental para confirmar essa hipótese.

Por fim, estudos como o de Furgiuele et al. (2023) mostram que o CBD reduz significativamente a proporção de células CD4⁺ duplo-positivas para IFN- γ e IL-17A, além de antagonizar a expressão de mRNA para IFN- γ e IL-17 em PBMCs estimuladas, embora esse efeito não tenha sido refletido na produção proteica, o que sugere complexidade na regulação pós-transcricional dessa citocina.

A ausência de diferença significativa na produção de IFN- γ especificamente por linfócitos CD4⁺ pode ser explicada pelo fato de que, no ensaio de ELISA, a análise reflete a produção total de citocinas por um pool de células mononucleares, que inclui não apenas os linfócitos CD4⁺, mas também outras populações celulares produtoras de IFN- γ , como linfócitos CD8⁺ e células NK (Huot et al., 2023; Shimoyama et al., 2021). Dessa forma, a contribuição combinada dessas diversas células pode mascarar variações específicas observadas apenas em subpopulações isoladas, como os linfócitos CD4⁺, o que justifica as diferenças nos achados entre as metodologias.

Os resultados do estudo indicam que a frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados (CD25⁺) não apresentou diferenças significativas entre indivíduos eutróficos e obesos,

sugerindo que nem os grupos nem o tratamento com THCV impactaram a ativação geral desses linfócitos no sangue periférico. Embora (Travers et al., 2024) relatem que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ residentes no tecido adiposo apresentam níveis maiores de ativação com o aumento da adiposidade — medidos pela expressão de CD25 e CD69. Nossos dados sugerem que essa ativação pode não ser refletida em células no sangue periférico. Essa distinção pode também explicar a ausência de diferenças na produção intracelular de citocinas em linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ em nosso estudo.

Em relação ao receptor de insulina (CD220), observamos uma frequência maior desse marcador em linfócitos CD4⁺ de indivíduos eutróficos em comparação aos obesos, independentemente do tratamento. A redução de CD220 nos obesos pode refletir um comprometimento da sinalização insulínica nesses linfócitos, potencialmente afetando seu metabolismo e função.

Estudos prévios, como o de Travers et al. (2024), observaram aumento da frequência de CD220 em linfócitos T CD4⁺ ativados (CD5⁺) no sangue periférico de homens obesos submetidos à restrição calórica, sugerindo que a expressão desse receptor pode ser modulada pelo estado metabólico. Essa baixa frequência de CD220 em linfócitos durante a obesidade clínica pode estar relacionada à resistência insulínica, que tende a promover a internalização e dessensibilização dos receptores de insulina (Ma et al., 2024), como demonstrado em modelos animais, por exemplo, em camundongos Cav-1 nulos submetidos a dieta rica em gordura (Cohen et al., 2003).

Complementarmente, observou-se que a frequência de linfócitos CD4⁺ positivos para p-RPS6K1 foi reduzida em indivíduos obesos após o tratamento com THCV, quando comparados aos eutróficos. Esse achado sugere uma possível modulação da via mTOR pela *Cannabis* medicinal. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nas condições sem tratamento e com THCV, indicando que o efeito do fitocanabinoide tem potencial para ser desencadeado nas células imunes neste modelo de doença, mas que a concentração utilizada e o tempo de exposição não foram suficientes para que diferenças pudessem ser observadas dentro dos grupos eutróficos e obesos individualmente após o tratamento. Isso porque estudos já demonstram que,

em condições inflamatórias agudas, a fosforilação da RPS6K1 é reduzida pelo THC em células T, considerando que essa sinalização possui caráter pró-inflamatório. Todavia, também foi observado que a sinalização mTOR-S6 pode aumentar após exposição prolongada ao THC, ou seja, que a inibição repetida a curto prazo dessa via resulta em uma regulação compensatória positiva (Utomo et al., 2017).

A diminuição fisiológica da atividade de RPS6K1 nessas células em indivíduos obesos pode ser explicada pelo papel fundamental dessa quinase na produção proteica via mTORC1. Além da produção proteica, o retículo endoplasmático (RE) regula diversos processos celulares por meio da via de sinalização UPR (*unfolded protein response*, ou resposta a proteínas desnaturadas), incluindo o metabolismo de nutrientes, a proliferação e morte celular, a inflamação e a transdução do sinal da insulina (Pagliassotti et al., 2016).

Durante a obesidade, a função normal do RE é significativamente prejudicada, diminuindo a produção de proteínas, gerando grande pressão sobre a UPR. Essa resposta ao estresse do retículo endoplasmático (ERS) ocorre devido ao acúmulo de proteínas mal dobradas, o que desencadeia estresse celular (Ma et al., 2024). Além disso, o ERS pode causar produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e disfunção do metabolismo energético, levando a estresse oxidativo e inflamação (Mullins et al., 2020).

A UPR é ativada principalmente para restaurar a homeostase proteica e é uma das características da inflamação crônica no tecido adiposo de indivíduos obesos. O ERS desempenha papel fundamental na modificação, dobramento e transporte de proteínas, além de controlar a atividade e expressão de enzimas-chave envolvidas na biossíntese de fosfolípidios (Sha et al., 2009), o que regula a formação e diferenciação de adipócitos (Zheng; Zhang; Zhang, 2010).

Além disso, a correlação positiva significativa entre as frequências de CD220 e p-RPS6K1 em ambos os grupos, especialmente sob tratamento com THCV, reforça a relação funcional entre a sinalização do receptor de insulina e a ativação da via mTOR em linfócitos T CD4⁺.

CD39 (Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1) é uma ectonucleotidase que cliva ATP extracelular para formar AMP, que pode ser convertido em adenosina pela CD73 (Ecto-5'-nucleotidase). Como o ATP extracelular exerce múltiplos efeitos pró-inflamatórios, sua remoção pode gerar um efeito anti-inflamatório geral (Cortez-Espinosa et al., 2015). No nosso estudo, não houve diferença significativa na expressão isolada de CD39 e CD73 em linfócitos CD4⁺. Contudo, a subpopulação duplo positiva para CD39⁺CD73⁺ apresentou redução significativa em indivíduos obesos em relação aos eutróficos, tanto sem tratamento quanto após o uso de THCv. Além disso, o tratamento com THCv não reverteu essa redução, sugerindo que, na concentração e tempo avaliados, o extrato pode não modular a expressão dessas ectonucleotidasas.

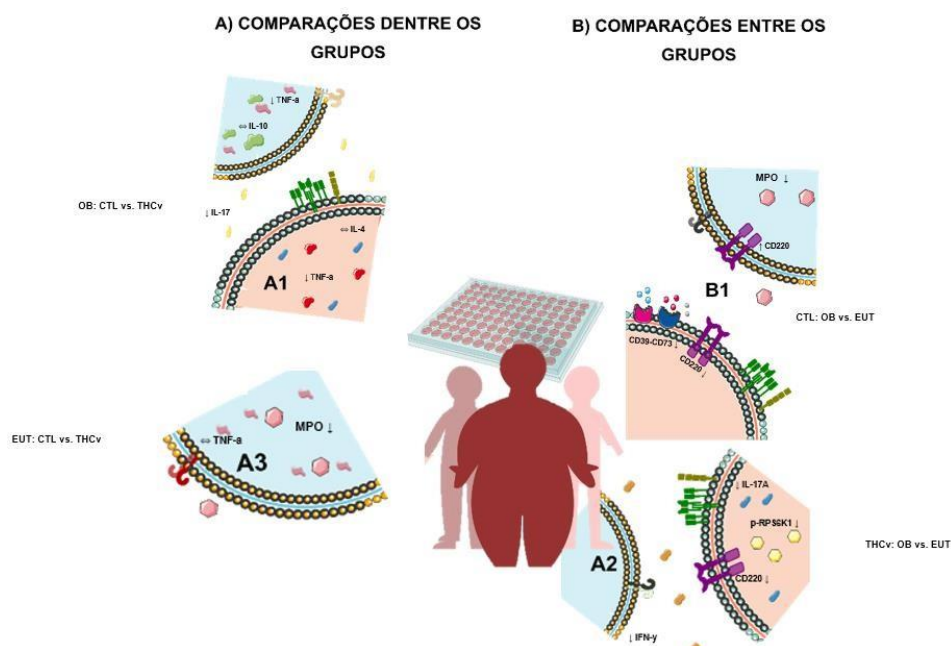
Esses linfócitos duplo positivos provavelmente correspondem às células Tregs já que estudos indicam que Tregs que expressam CD39 são menos abundantes em pacientes com obesidade, TD2M e diabetes tipo 1 (Reichert et al., 2021; SantaCruz-Calvo et al., 2021). Além disso, a obesidade tem sido associada a uma redução na expressão de CD73 (Li et al., 2021; Torres et al., 2024). Embora nosso estudo não tenha detectado diminuição isolada de CD39 ou CD73, essa ausência pode ser atribuída ao tamanho limitado da amostra.

Portanto, os resultados indicam um possível comprometimento da função imune reguladora mediada por essas ectonucleotidasas na obesidade, o que pode contribuir para a inflamação crônica característica dessa condição.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, conclui-se que, no que tange ao extrato bruto rico em THCV, selecionado para os testes imunológicos, os resultados demonstram que esse fitocanabinoide modula seletivamente a resposta imune, com diferenças marcantes entre indivíduos eutróficos e obesos. Conforme evidenciado na figura 28, O tratamento preservou ou aumentou citocinas regulatórias, como IL-10 e IL-4, e reduziu citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-17 e IFN- γ , indicando um perfil potencialmente anti-inflamatório.

Figura 28. Frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando para CD39 e CD73 em indivíduos eutróficos e obesos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025). Lado A= comparações entre os tratamentos dentro do grupo com eutrofia e com obesidade. Lado B= comparações entre os grupos com eutrofia e obesidade com relação ao tratamento empregado. Seta dupla: manutenção; seta para baixo: regulação negativa; seta para cima: regulação positiva. Célula azul: monócito; Célula em vermelho: linfócito.

Em monócitos, a maior frequência de CD220⁺ no grupo obeso foi compatível com alterações metabólicas associadas à resistência insulínica, enquanto p-RPS6K1 não foi afetado nas concentrações e tempos avaliados. Em linfócitos CD4⁺, obesos exibiram menor expressão de CD220 e redução de p-RPS6K1 após tratamento, sugerindo

influência sobre a sinalização insulínica e o metabolismo celular. A análise da MPO revelou efeito dependente do grupo: o THCV reduziu monócitos MPO⁺ em eutróficos, mas não em obesos.

Além disso, a menor frequência de linfócitos CD4⁺ CD39⁺CD73⁺ em obesos, não revertida pelo tratamento, indica um comprometimento persistente da função imunorregulatória. Esses dados evidenciam que o perfil imunometabólico basal condiciona a resposta a fitocanabinoides, modulando de forma integrada vias inflamatórias, regulatórias e de sinalização intracelular.

REFERÊNCIAS

ABIOYE, Amos *et al.* Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin (THCV): a commentary on potential therapeutic benefit for the management of obesity and diabetes. *Journal of Cannabis Research*, v. 2, n. 1, p. 6, 31 jan. 2020.

ACHUTHAN, Adrian *et al.* Glucocorticoids promote apoptosis of proinflammatory monocytes by inhibiting ERK activity article. *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 3, 1 mar. 2018.

ALEMÁN, José O. *et al.* Fecal microbiota and bile acid interactions with systemic and adipose tissue metabolism in diet-induced weight loss of obese postmenopausal women. *Journal of Translational Medicine*, v. 16, n. 1, 3 set. 2018.

ALMADA, Marta *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, 1 fev. 2020.

AMBEBA, Erica J. *et al.* Longitudinal effects of weight loss and regain on cytokine concentration of obese adults. *Metabolism*, v. 62, n. 9, p. 1218–1222, 1 set. 2013.

ANIL, Seegehalli M. *et al.* Cannabis compounds exhibit anti-inflammatory activity in vitro in COVID-19-related inflammation in lung epithelial cells and pro-inflammatory activity in macrophages. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2021.

ARATANI, Yasuaki. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 640, p. 47–52, 15 fev. 2018.

ARONNE, Louis J. *et al.* Continued Treatment With Tirzepatide for Maintenance of Weight Reduction in Adults With Obesity: The SURMOUNT-4 Randomized Clinical Trial. *JAMA*, v. 331, n. 1, p. 38, 2 jan. 2023.

AUDO, Rachel *et al.* Phosphatidylserine Outer Layer Translocation Is Implicated in IL-10 Secretion by Human Regulatory B Cells. *PLOS ONE*, v. 12, n. 1, p. e0169755, 1 jan. 2017.

BÁTKAI, Sándor *et al.* Endocannabinoids acting at CB1 receptors mediate the cardiac contractile dysfunction in vivo in cirrhotic rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 293, n. 3, p. 1689–1695, set. 2007.

BOCKMANN, Eduardo Cosendey *et al.* The Role of Cannabinoids in CNS Development:

Focus on Proliferation and Cell Death. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2022 43:4, v. 43, n. 4, p. 1469–1485, 4 ago. 2022.

BOUCHER, Jérémie; KLEINRIDDERS, André; RONALD KAHN, C. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. 1, p. a009191, 1 jan. 2014.

BRAILE, Mariantonia *et al.* The Interplay between the Immune and the Endocannabinoid Systems in Cancer. *Cells*, v. 10, n. 6, p. 1282, 1 jun. 2021.

BRIERLEY, Daniel I. *et al.* Cannabigerol is a novel, well-tolerated appetite stimulant in pre-satiated rats. *Psychopharmacology*, v. 233, n. 19–20, p. 3603–3613, 1 out. 2016.

BURTON, Oliver T. *et al.* The tissue-resident regulatory T cell pool is shaped by transient multi-tissue migration and a conserved residency program. *Immunity*, v. 57, n. 7, p. 1586–1602.e10, 9 jul. 2024.

BUSETTO, Luca *et al.* Mechanisms of weight regain. *European Journal of Internal Medicine*, v. 93, p. 3–7, 1 nov. 2021.

CAI, Wenting *et al.* Tirzepatide as a novel effective and safe strategy for treating obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Public Health*, v. 12, p. 1277113, 31 jan. 2024.

CATELLIER, Diane J. *et al.* Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Flow Cytometry Study of Monocyte and Platelet Markers: Intraindividual Variability and Reliability. *Clinical chemistry*, v. 54, n. 8, p. 1363, 1 ago. 2008.

CAVALHEIRO, Eulla Keimili Fernandes Ferreira *et al.* Cannabis sativa as a Treatment for Obesity: From Anti-Inflammatory Indirect Support to a Promising Metabolic Re-Establishment Target. *Cannabis and Cannabinoid Research*, v. 7, n. 2, p. 135, 1 abr. 2022.

CHANDIWANA, Nomathemba *et al.* Obesity is a disease: global health policy must catch up. *The Lancet Global Health*, v. 0, n. 0, ago. 2025.

CHÁVEZ-GALÁN, Leslie *et al.* Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. MAY, p. 135584, 26 maio 2015.

CINKAJZLOVÁ, Anna; MRÁZ, Miloš; HALUZÍK, Martin. Lymphocytes and macrophages in adipose tissue in obesity: markers or makers of subclinical inflammation? *Protoplasma* 2017 254:3, v. 254, n. 3, p. 1219–1232, 1 fev. 2017.

COHEN, Alex W. *et al.* Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 285, n. 1 54-1, p. 222–235, 1 jul. 2003.

CORREA, Fernando *et al.* Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *British Journal of Pharmacology*, v. 145, n. 4, p. 441–448, 1 jun. 2005.

CORTEZ-ESPINOSA, Nancy *et al.* CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. *Human Immunology*, v. 76, n. 9, p. 622–630, 1 set. 2015.

COSTA, L. *et al.* The major endocannabinoid anandamide (AEA) induces apoptosis of human granulosa cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 171, 1 ago. 2021.

CREWE, Clair *et al.* SREBP-regulated adipocyte lipogenesis is dependent on substrate availability and redox modulation of mTORC1. *JCI Insight*, v. 4, n. 15, p. e129397, 8 ago. 2019.

DE HEREDIA, Fátima Pérez; GÓMEZ-MARTÍNEZ, Sonia; MARCOS, Ascensión. Obesity, inflammation and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 71, n. 2, p. 332–338, 2012.

EHRCHEN, Jan M.; ROTH, Johannes; BARCZYK-KAHLERT, Katarzyna. More than suppression: Glucocorticoid action on monocytes and macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. AUG, p. 474955, 27 ago. 2019.

ENGİN, Ayse Basak. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 960, p. 327–343, 2017.

FAREED, Areeba *et al.* Charting New Territories in Obesity Management- Traditional Techniques to Tirzepatide. *Endocrine Practice*, v. 31, n. 1, p. 102–113, 1 jan. 2025.

FITZPATRICK, John Mark *et al.* Botanically-Derived Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol, and Their 1:1 Combination, Modulate Toll-like Receptor 3 and 4 Signalling in Immune Cells from People with Multiple Sclerosis. *Molecules*, v. 27, n. 6, p. 1763, 1 mar. 2022.

FONSECA, B. M.; CORREIA-DA-SILVA, G.; TEIXEIRA, N. A. Anandamide-Induced Cell Death: Dual Effects in Primary Rat Decidual Cell Cultures. *Placenta*, v. 30, n. 8, p. 686–692, 1 ago. 2009.

FURGIUELE, Alessia *et al.* Effect of Cannabidiol on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and CD4+ T Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 19, p. 14880, 1 out. 2023.

GOJANI, Esmaeel Ghasemi *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Minor Cannabinoids CBC, THCV, and CBN in Human Macrophages. *Molecules*, v. 28, n. 18, p. 6487, 1 set. 2023.

GREENWAY, F. L. Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. *International Journal of Obesity*, v. 39, n. 8, p. 1188–1196, 6 ago. 2015.

GUO, Shaodong. Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *The Journal of endocrinology*, v. 220, n. 2, p. T1, fev. 2014.

HAN, Jonathan M. *et al.* Insulin Inhibits IL-10–Mediated Regulatory T Cell Function: Implications for Obesity. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 2, p. 623–629, 15 jan. 2014.

HEYMSFIELD, Steven B.; WADDEN, Thomas A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 3, p. 254–266, 19 jan. 2017.

HUANGFU, Longjie *et al.* The IL-17 family in diseases: from bench to bedside. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 1–22, 1 dez. 2023.

HUOT, Nicolas *et al.* SARS-CoV-2 viral persistence in lung alveolar macrophages is controlled by IFN- γ and NK cells. *Nature Immunology*, v. 24, n. 12, p. 2068–2079, 1 dez. 2023.

JANECKI, Marcin *et al.* Anti-Inflammatory and Antiviral Effects of Cannabinoids in Inhibiting and Preventing SARS-CoV-2 Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 8, 1 abr. 2022.

JASTRZĄB, Anna; JAROCKA-KARPOWICZ, Iwona; SKRZYDLEWSKA, Elżbieta. The Origin and Biomedical Relevance of Cannabigerol. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 14, 1 jul. 2022.

JEAN-GILLES, L. *et al.* Effects of pro-inflammatory cytokines on cannabinoid CB1 and CB2 receptors in immune cells. *Acta Physiologica*, v. 214, n. 1, p. 63–74, 1 maio 2015.

KAPELLOS, Theodore S. *et al.* Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. AUG, p. 482347, 30 ago. 2019.

KARGAPOLOVA, Yulia *et al.* The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 562, v. 10, n. 4, p. 562, 5 abr. 2021.

KARI, Sana *et al.* Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis* 2022 27:7, v. 27, n. 7, p. 482–508, 17 jun. 2022.

KEARSEY, Lewis J. *et al.* Biosynthesis of cannabigerol and cannabigerolic acid: the gateways to further cannabinoid production. *Synthetic Biology*, v. 8, n. 1, p. ysad010,

2023.

KHINE, Htet W. *et al.* Association of the serum myeloperoxidase/high-density lipoprotein particle ratio and incident cardiovascular events in a multi-ethnic population: Observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis*, v. 263, p. 156–162, 1 ago. 2017.

KOGAN, Natalya M. *et al.* Novel cbg derivatives can reduce inflammation, pain and obesity. *Molecules*, v. 26, n. 18, 1 set. 2021.

KOHARA, Nathalia Akemi Neves *et al.* Cannabigerol Attenuates Memory Impairments, Neurodegeneration, and Neuroinflammation Caused by Transient Global Cerebral Ischemia in Mice. *Society preprints*, 27 mar. 2025.

KUREBAYASHI, Yutaka *et al.* PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation by Regulating Gfi1 Expression and Nuclear Translocation of ROR γ . *Cell Reports*, v. 1, n. 4, p. 360–373, 19 mar. 2012.

KWAIFA, Ibrahim Kalle *et al.* Endothelial Dysfunction in Obesity-Induced Inflammation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 291, v. 10, n. 2, p. 291, 13 fev. 2020.

LAGO, Santiago G. *et al.* Exploring cellular markers of metabolic syndrome in peripheral blood mononuclear cells across the neuropsychiatric spectrum. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 91, p. 673–682, 1 jan. 2021.

LAPLANTE, Mathieu; SABATINI, David M. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, v. 149, n. 2, p. 274–293, 13 abr. 2012.

LEIBEL, Rudolph L.; ROSENBAUM, Michael; HIRSCH, Jules. Changes in Energy Expenditure Resulting from Altered Body Weight. *New England Journal of Medicine*, v. 332, n. 10, p. 621–628, 9 mar. 1995.

LI, Shijia *et al.* Cannabigerol (CBG): A Comprehensive Review of Its Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 29, n. 22, p. 5471–5471, 20 nov. 2024.

LI, Yangyang *et al.* Insulin signaling establishes a developmental trajectory of adipose regulatory T cells. *Nature Immunology*, v. 22, n. 9, p. 1175–1185, 1 set. 2021.

LIN, Xihua; LI, Hong. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, 6 set. 2021.

LINGVAY, Ildiko *et al.* Obesity in adults. *The Lancet*, v. 404, n. 10456, p. 972–987, 7 set. 2024.

LIU, Qing Rong *et al.* Anti-Inflammatory and Pro-Autophagy Effects of the Cannabinoid

Receptor CB2R: Possibility of Modulation in Type 1 Diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 809965, 18 jan. 2022.

LIU, Rui; NIKOLAJCZYK, Barbara S. Tissue immune cells fuel obesity-associated inflammation in adipose tissue and beyond. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JULY, p. 469118, 17 jul. 2019.

LOJPUR, Tina *et al.* Δ 9-Tetrahydrocannabinol leads to endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human BeWo trophoblasts. *Reproductive Toxicology*, v. 87, p. 21–31, 1 ago. 2019.

LOWIN, Torsten *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Cannabigerol in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures Are Partly Mediated by TRPA1. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 1, 1 jan. 2023.

MA, Kaile *et al.* Endoplasmic reticulum stress: bridging inflammation and obesity-associated adipose tissue. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1381227, 4 abr. 2024.

MA, Xiaojun Max; BLENIS, John. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 10, n. 5, p. 307–318, 2 maio 2009.

MAAYAH, Zaid 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 (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 7, p. 165771, 1 jul. 2020.

MAIA, J. *et al.* The fundamental role of the endocannabinoid system in endometrium and placenta: Implications in pathophysiological aspects of uterine and pregnancy disorders. *Human Reproduction Update*, v. 26, n. 4, p. 586–602, 18 jun. 2020.

MAKHJANI, Priya *et al.* Regulation of the immune system by the insulin receptor in health and disease. *Frontiers in endocrinology*, v. 14, 2023.

MARIMAN, E. C. M.; WANG, Ping. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, v. 67, n. 8, p. 1277, abr. 2010.

MATIJEVIC, Nena *et al.* The ARIC Carotid MRI Study of Blood Cellular Markers: An Inverse Association of Monocyte Myeloperoxidase Content With Peripheral Arterial Disease. <http://dx.doi.org/10.1177/0003319710385336>, v. 62, n. 3, p. 237–244, 14 mar. 2011.

MATOS GONÇALVES, Gabriel Augusto;; SCHLICHTING, Carmen Lúcia Ruiz. EFEITOS BENÉFICOS E MALÉFICOS DA Cannabis sativa L. *UNINGÁ Review*, v. 20, n. 1, p. 92, 2014.

MCLAUGHLIN, Tracey *et al.* Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 1, p. 5, 3 jan. 2017.

MEDRANO, M. *et al.* Cannabinoids induce cell death in leukaemic cells through Parthanatos and PARP-related metabolic disruptions. *British Journal of Cancer*, v. 130, n. 9, p. 1529–1541, 18 maio 2024.

MELSON, Eka *et al.* What is the pipeline for future medications for obesity?: Clinical Research. *International Journal of Obesity*, v. 49, n. 3, p. 433–451, 1 mar. 2025.

MENDOZA, Scott. The role of tetrahydrocannabivarin (THCV) in metabolic disorders: A promising cannabinoid for diabetes and weight management. *AIMS Neuroscience*, v. 12, n. 1, p. 32, 2025.

MISHRA, Rahul *et al.* Adverse Events Related to Tirzepatide. *Journal of the Endocrine Society*, v. 7, n. 4, 9 fev. 2023.

MISUMI, Ichiro *et al.* Obesity Expands a Distinct Population of T Cells in Adipose Tissue and Increases Vulnerability to Infection. *Cell Reports*, v. 27, n. 2, p. 514- 524.e5, 9 abr. 2019.

MONSERRAT-MESQUIDA, Margalida *et al.* Peripheral Blood Mononuclear Cells Oxidative Stress and Plasma Inflammatory Biomarkers in Adults with Normal Weight, Overweight and Obesity. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 813, v. 10, n. 5, p. 813, 20 maio 2021.

MÜLLER, Timo D. *et al.* Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 21:3, v. 21, n. 3, p. 201–223, 23 nov. 2021.

MÜLLER, Y. *et al.* Induction of abortive and productive proliferation in resting human T lymphocytes via CD3 and CD28. *Immunology*, v. 97, n. 2, p. 280–286, 1 jun. 1999.

MULLINS, Caitlyn A. *et al.* Neural Underpinnings of Obesity: The Role of Oxidative Stress and Inflammation in the Brain. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 1018, v. 9, n. 10, p. 1018, 20 out. 2020.

NACHNANI, Rahul; RAUP-KONSAVAGE, Wesley M.; VRANA, Kent E. The pharmacological case for cannabigerol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 376, n. 2, p. 204–212, 1 fev. 2021.

NAVARRO, Gemma *et al.* Cannabigerol action at cannabinoid CB1 and CB2 receptors and at CB1-CB2 heteroreceptor complexes. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, n. JUN, p. 366412, 21 jun. 2018.

NDREPEPA, Gjini. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*, v. 493, p. 36–51, 1 jun. 2019.

- OYENUGA, Abayomi O. *et al.* Association of monocyte myeloperoxidase with incident cardiovascular disease: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *PLOS ONE*, v. 13, n. 10, p. e0205310, 1 out. 2018.
- PAGLIASSOTTI, Michael J. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: An expanded view. *Metabolism*, v. 65, n. 9, p. 1238–1246, 1 set. 2016.
- PÉNZES, Zsófia *et al.* The dual role of cannabidiol on monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1240800, 22 ago. 2023.
- PERDOMO, Carolina M. *et al.* Contemporary medical, device, and surgical therapies for obesity in adults. *The Lancet*, v. 401, n. 10382, p. 1116–1130, 1 abr. 2023.
- PURDY, Johanna C.; SHATZEL, Joseph J. The hematologic consequences of obesity. *European Journal of Haematology*, v. 106, n. 3, p. 306–319, 1 mar. 2021.
- REICHERT, Karine Paula *et al.* Diabetes and hypertension: Pivotal involvement of purinergic signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 137, p. 111273, 1 maio 2021.
- ROCHIRA, Vincenzo *et al.* The Effect of Tirzepatide on Body Composition in People with Overweight and Obesity: A Systematic Review of Randomized, Controlled Studies. *Diseases* 2024, Vol. 12, Page 204, v. 12, n. 9, p. 204, 5 set. 2024.
- RODRIGUEZ, Patricia J. *et al.* Semaglutide vs Tirzepatide for Weight Loss in Adults With Overweight or Obesity. *JAMA Internal Medicine*, v. 184, n. 9, p. 1056–1064, 1 set. 2024.
- RUBINO, Francesco *et al.* Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, v. 13, n. 3, p. 221–262, 1 mar. 2025.
- SACERDOTE, P. *et al.* The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, v. 159, n. 1–2, p. 97–105, 1 fev. 2005.
- SANTACRUZ-CALVO, Sara *et al.* Adaptive immune cells shape obesity-associated type 2 diabetes mellitus and less prominent comorbidities. *Nature Reviews Endocrinology* 2021 18:1, v. 18, n. 1, p. 23–42, 26 out. 2021.
- SAROZ, Yurii *et al.* Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Signals via G-alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary Leukocytes. *ACS Pharmacology and Translational Science*, v. 2, n. 6, p. 414–428, 13 dez. 2019.
- SCHMIDT, Frank M. *et al.* Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLOS ONE*, v. 10, n. 3, p. e0121971, 17 mar. 2015.

SCHMITZ, Sarah H.; ARONNE, Louis J. The Effective Use of Anti-obesity Medications. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 52, n. 4, p. 661–680, 1 dez. 2023.

SHA, Haibo *et al.* The IRE1 α -XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response Is Required for Adipogenesis. *Cell Metabolism*, v. 9, n. 6, p. 556–564, 14 maio 2009.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 1 set. 2018.

SHIMOYAMA, Shin *et al.* Ursodeoxycholic acid impairs liver-infiltrating T-cell chemotaxis through IFN- γ and CX3CL1 production in primary biliary cholangitis. *European Journal of Immunology*, v. 51, n. 6, p. 1519–1530, 1 jun. 2021.

SHIRAKAWA, Kohsuke; SANO, Motoaki. Drastic transformation of visceral adipose tissue and peripheral CD4 T cells in obesity. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 1044737, 4 jan. 2023.

SOUGIANNIS, Alexander T. *et al.* Impact of weight loss and partial weight regain on immune cell and inflammatory markers in adipose tissue in male mice. *Journal of Applied Physiology*, v. 129, n. 4, p. 909, 1 out. 2020.

SPAN, L. F. R. *et al.* The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry*, v. 47, n. 1, p. 24–31, 1 jan. 2002.

SUMITHRAN, Priya *et al.* Long-Term Persistence of Hormonal Adaptations to Weight Loss. *New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 17, p. 1597–1604, 27 out. 2011.

SUMITHRAN, Priya; FINUCANE, Francis M.; COHEN, Ricardo V. Obesity drug shortages are symptomatic of wider malaise. *The Lancet*, v. 403, n. 10437, p. 1613–1615, 27 abr. 2024.

SURENDAR, Jayagopi *et al.* Increased levels of both Th1 and Th2 cytokines in subjects with metabolic syndrome (CURES-103). *Diabetes Technology and Therapeutics*, v. 13, n. 4, p. 477–482, 1 abr. 2011.

SWENSON, Karli. Beyond the hype: a comprehensive exploration of CBD's biological impacts and mechanisms of action. *Journal of Cannabis Research* 2025 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–25, 11 maio 2025.

SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, Magdalena *et al.* Combined spectroscopic, biochemical and chemometric approach toward finding of biochemical markers of obesity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1867, n. 2, p. 130279, 1 fev. 2023.

TAHIR, M. Nazir *et al.* The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of Cannabis Research*, v. 3, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2021.

TASSI BORILLE, Bruna *et al.* CANNABIS SATIVA: A SYSTEMATIC REVIEW OF PLANT ANALYSIS. *Drug Analytical Research*, v. 1, n. 1, p. 1–23, 28 ago. 2017.

TEJWANI, Vickram *et al.* Dexamethasone-Induced FKBP51 Expression in CD4+ T-Lymphocytes Is Uniquely Associated With Worse Asthma Control in Obese Children With Asthma. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 744782, 15 out. 2021.

TORRES, Sabrina *et al.* Propriedades terapêuticas dos compostos fitoquímicos da espécie *Cannabis sativa* L.: Uma revisão de literatura. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, v. 12, n. 2, p. 19–28, 29 dez. 2023.

TRAVERS, Rebecca L. *et al.* Calorie restriction-induced leptin reduction and T-lymphocyte activation in blood and adipose tissue in men with overweight and obesity. *International Journal of Obesity* 2024 48:7, v. 48, n. 7, p. 993–1002, 27 mar. 2024.

TRIM, W. V.; LYNCH, L. Immune and non-immune functions of adipose tissue leukocytes. *Nature Reviews Immunology*, v. 22, n. 6, p. 371–386, 1 jun. 2022.

UTOMO, Wesley K. *et al.* Modulation of human peripheral blood mononuclear cell signaling by medicinal cannabinoids. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, p. 232402, 24 jan. 2017.

VALENTINE, Yolander; NIKOLAJCZYK, Barbara S. T cells in obesity-associated inflammation: The devil is in the details. *Immunological Reviews*, v. 324, n. 1, p. 25–41, 1 jul. 2024.

VAN BAAK, Marleen A.; MARIMAN, Edwin C. M. Mechanisms of weight regain after weight loss — the role of adipose tissue. *Nature Reviews Endocrinology* 2018 15:5, v. 15, n. 5, p. 274–287, 17 jan. 2019.

VAN BAAK, Marleen A.; MARIMAN, Edwin C. M. Obesity-induced and weight-loss-induced physiological factors affecting weight regain. *Nature Reviews Endocrinology* 2023 19:11, v. 19, n. 11, p. 655–670, 11 set. 2023.

VAN NIEROP, F. Samuel *et al.* Effects of acute dietary weight loss on postprandial plasma bile acid responses in obese insulin resistant subjects. *Clinical Nutrition*, v. 36, n. 6, p. 1615–1620, 1 dez. 2017.

VINK, Roel G. *et al.* The effect of rate of weight loss on long-term weight regain in adults with overweight and obesity. *Obesity*, v. 24, n. 2, p. 321–327, 1 fev. 2016.

WALSH, Kenneth B.; MCKINNEY, Amanda E.; HOLMES, Andrea E. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 777804, 29 nov. 2021.

WANG, Mei *et al.* Th17 and Treg lymphocytes in obesity and Type 2 diabetic patients. *Clinical Immunology*, v. 197, p. 77–85, 1 dez. 2018.

WANG, Ruonan *et al.* The role of gut microbiota in Tirzepatide-mediated alleviation of high-fat diet-induced obesity. *European Journal of Pharmacology*, v. 1002, p. 177827, 5 set. 2025.

WARGENT, E. T. *et al.* The cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity. *Nutrition & Diabetes* 2013 3:5, v. 3, n. 5, p. e68–e68, 27 maio 2013.

WILDGRUBER, Moritz *et al.* The “Intermediate” CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Scientific Reports* 2016 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–8, 19 dez. 2016.

WILLARD, Francis S. *et al.* Tirzepatide is an imbalanced and biased dual GIP and GLP-1 receptor agonist. *JCI Insight*, v. 5, n. 17, p. e140532, 3 set. 2020.

YÁRNOZ-ESQUIROZ, Patricia *et al.* ‘Obesities’: Position statement on a complex disease entity with multifaceted drivers. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 52, n. 7, p. e13811, 1 jul. 2022.

YUNG, Justin Hou Ming; GIACCA, Adria. Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. *Cells*, v. 9, n. 3, 13 mar. 2020.

ZHANG, Chenhong *et al.* Dietary Modulation of Gut Microbiota Contributes to Alleviation of Both Genetic and Simple Obesity in Children. *EBioMedicine*, v. 2, n. 8, p. 968–984, 1 ago. 2015.

ZHAO, Yueshui *et al.* CD4⁺ T cells in obesity and obesity-associated diseases. *Cellular Immunology*, v. 332, p. 1–6, 1 out. 2018.

ZHENG, Ze; ZHANG, Chunbin; ZHANG, Kezhong. Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World Journal of Hepatology*, v. 2, n. 6, p. 203, 2010.

ZOU, Jianghuan *et al.* CD4⁺ T cells memorize obesity and promote weight regain. *Cellular and Molecular Immunology*, v. 15, n. 6, p. 630–639, 1 jun. 2018.

ANEXOS

ANEXO A – DOCUMENTAÇÃO RELACIONADA A ASSOCIAÇÃO DE APOIO À PESQUISA E PACIENTES DE Cannabis MEDICINAL



Acordo De Cooperação Para Pesquisa, Desenvolvimento E Inovação entre Organização da Sociedade Civil e Administração Pública

Em acordo com a Lei 13.019/2014 que foi publicada em 31 de julho de 2014 e entrou em vigor em 23 de janeiro deste ano que se aplica a União, o Distrito Federal e os estados e trata das relações de parceria entre a administração pública e as OSCs este instrumento visa promover a cooperação técnico científica, de um lado o **LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**, com sede na Rua Recanto da Milona, Via Ipê Amarelo, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba - Campus I, João Pessoa, PB, CEP 58051-900, inscrita no CNPJ de Autarquia Federal da Universidade sob o nº 24.098.477/0001-10 e neste ato representada por sua Coordenadora, doravante denominada **TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE**, e, de outro lado, a **ASSOCIAÇÃO DE APOIO À PESQUISA E PACIENTES DE CANNABIS MEDICINAL**, organização não governamental e sem fins lucrativos inscrita no CNPJ sob nº 24.436.817/0001-75, com sede na Rua do Ouvidor, nº63, Centro, Rio de Janeiro, RJ, neste ato representada por seu diretor geral, **MARCOS LINS LANGENBACH**, doravante denominada **APEPI**.

CLÁUSULA PRIMEIRA - OBJETO

1.1. O objeto do presente Convênio é a execução do projeto de pesquisa aplicada intitulado **"Avaliação de biomarcadores prognósticos na subpopulação de linfócitos T regulatórios, bem como do potencial anti-inflamatório de fitocanabinoides em pessoas com obesidade e comorbidades associadas decorrentes da COVID-19"**.

1.2. Integram o presente Convênio os documentos abaixo discriminados, cujos termos



Declaração de Recebimento de Amostrar

Eu, Fernanda Silva Almeida Queiroz, representante do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas no Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), confirmo a recepção das amostras de códigos: EBDRS86 (3,3g); EBCBG28 (3,3g); EBTHCV01 (3,8g) e EBPWK10 (3,6g) à base de Cannabis sativa, originárias da Fazenda APEPI. Estas foram entregues no dia 11 de fevereiro de 2024 e estão em total conformidade com as expectativas estabelecidas.

Expressamos o compromisso de utilizar as amostras exclusivamente para propósitos de análise, pesquisa ou avaliação, em estrita observância ao Acordo de Cooperação Técnica firmado entre as Instituições envolvidas. Comprometemo-nos, ademais, a manter a confidencialidade das informações associadas às amostras e a conduzir a análise dos dados de maneira ética e responsável.

Esta declaração visa oficializar o recebimento das amostras mencionadas, solidificando, assim, a transparência e responsabilidade nas relações comerciais e científicas estabelecidas entre as partes.

Local: João Pessoa - PB

Data: 15 de fevereiro de 2024

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES HUMANOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS PROGNÓSTICOS E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE FITOCANABINOÍDES EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 77985223.3.0000.5188

Instituição Proponente: Centro de Biotecnologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.723.650

Apresentação do Projeto:

O projeto trata de Avaliar biomarcadores prognósticos na sub população de linfócitos T regulatórios, monócitos e células natural killers T invariáveis, bem como do potencial anti-inflamatório de fitocanabinoides em pessoas com obesidade e comorbidades associadas

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Gerar conhecimento sobre as conexões entre obesidade e comorbidades associadas e seus aspectos imunológicos. Para tal, serão avaliados os mecanismos celulares e moleculares de subtipos de linfócitos T, células natural killers T invariáveis e monócitos característicos da obesidade, correlacionando com achados clínicos e laboratoriais. Além disso, serão investigados os potenciais mecanismos desencadeados nestas células frente ao tratamento com Cannabis sativa.

Objetivo Secundário:

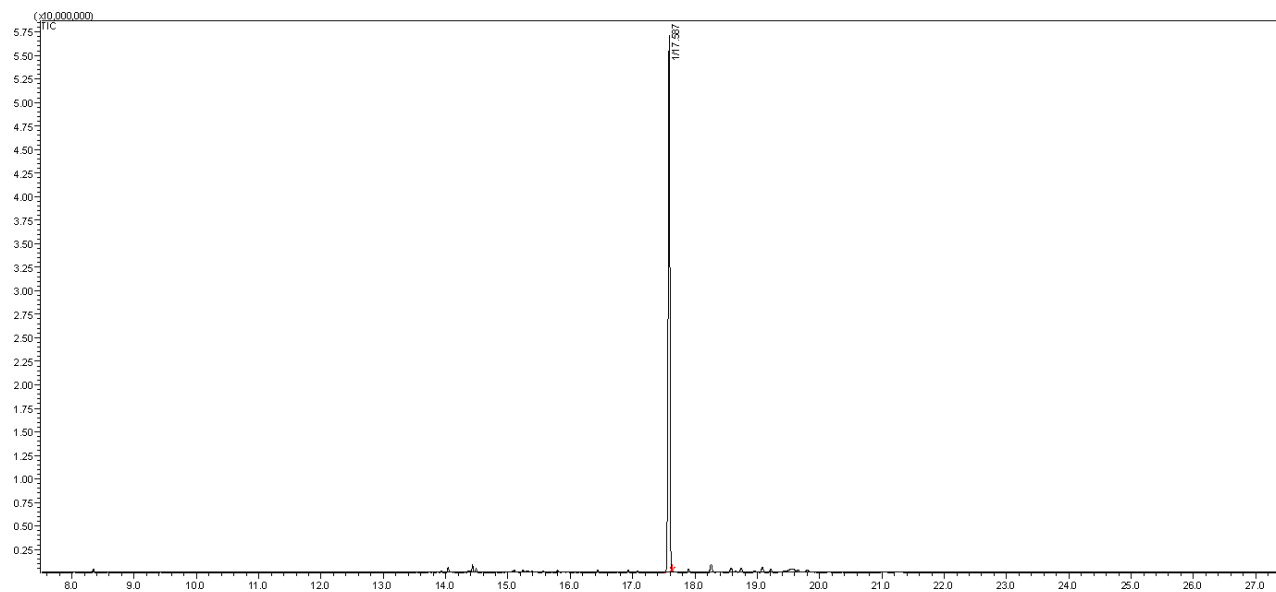
1) Avaliar os parâmetros laboratoriais dos grupos estudados: hemograma, ferritina, velocidade de sedimentação de hemácias (VHS), proteína C reativa (PCR), ácido úrico, creatinina, insulina, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL).

Endereço: Campus I / Prédio do CCS UFPB - 1º Andar
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

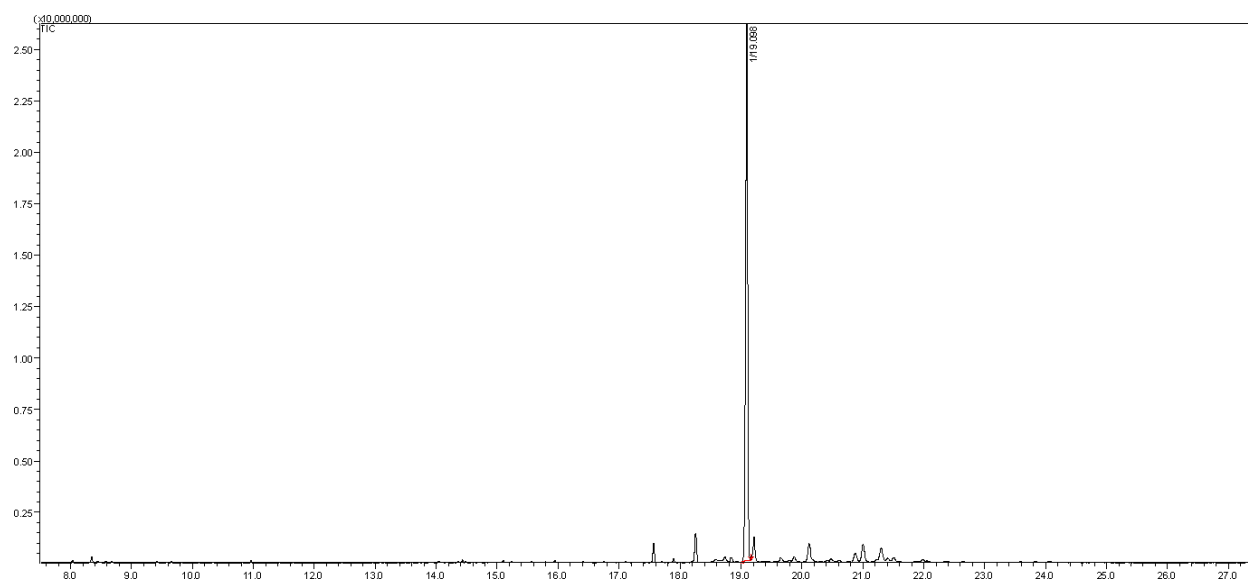
APÊNDICES

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS (CG-MS) DOS EXTRATOS BRUTOS UTILIZADOS NO ESTUDO

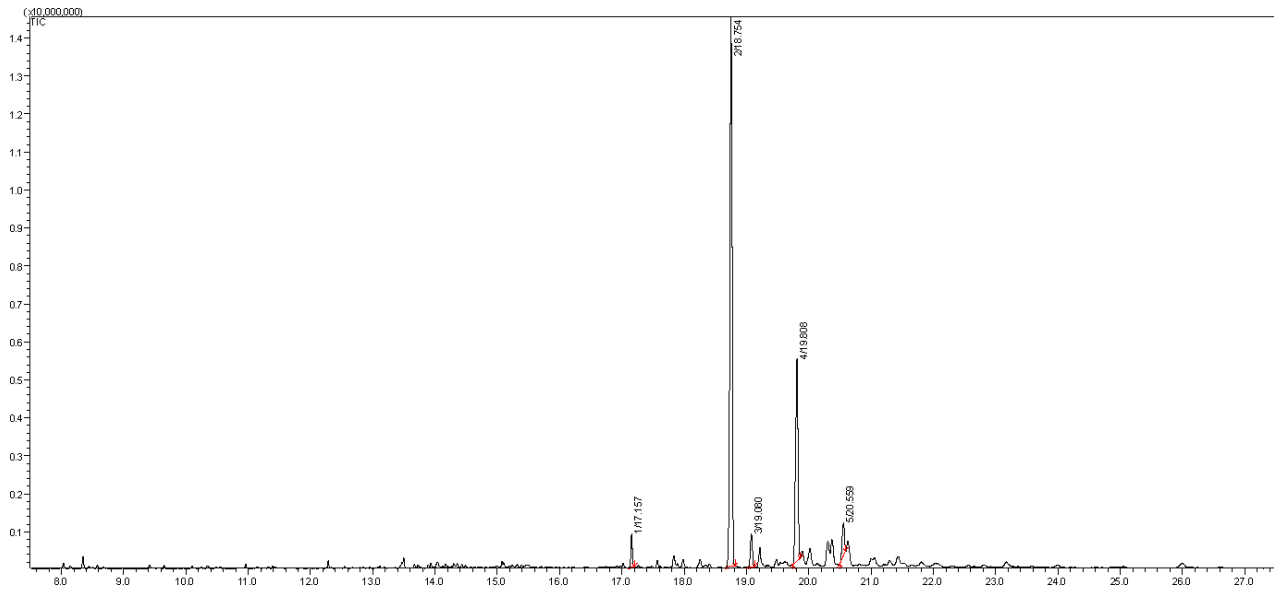
EB_CBD



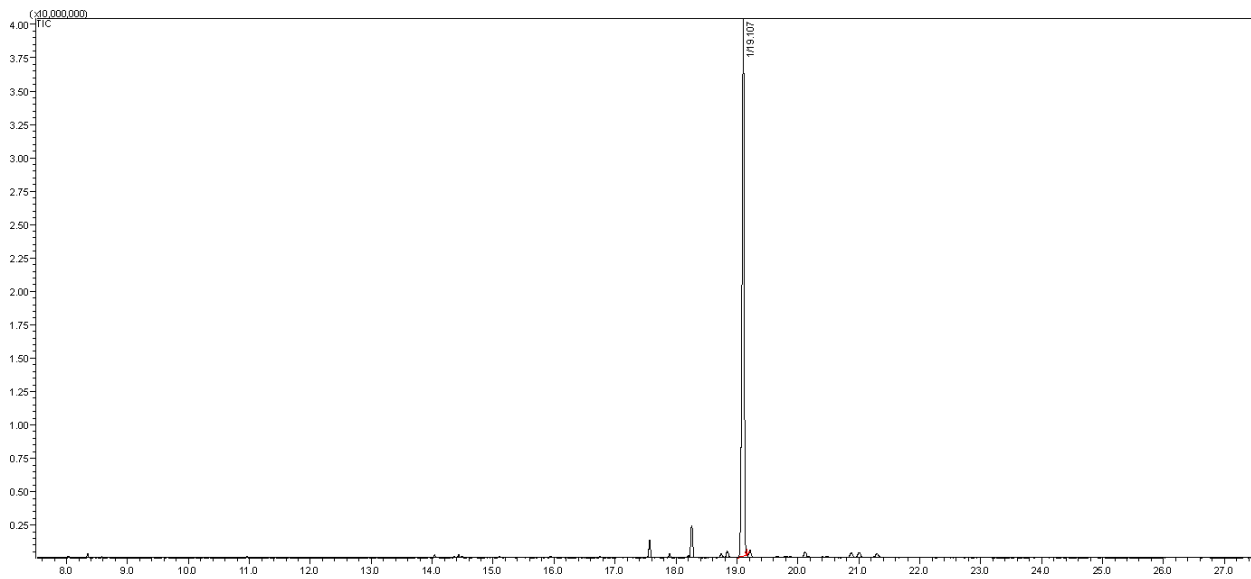
EB_CBG



EB_THC



EB_THCv



APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: ANÁLISE DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS PROGNÓSTICOS E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE FITOCANABINOIDES EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE

PESQUISADORA: Tatjana Keesen De Souza Lima

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre o impacto da obesidade na função de células de defesa do corpo. Durante a obesidade, o corpo pode estar mais inflamado e estressado, o que altera a resposta imune. Isso acontece porque pessoas com excesso de peso, muitas vezes, têm outros problemas de saúde relacionados à obesidade, como doenças do coração, problemas nos pulmões e diabetes. Nosso objetivo com essa pesquisa é avaliar a ideia de que a obesidade e problemas de saúde relacionados, especialmente após a COVID-19, podem alterar as defesas naturais do corpo. Acreditamos que o uso de tratamento com *Cannabis sativa* pode influenciar a resposta dessas células, potencialmente reduzindo a inflamação. Para isto, vamos realizar um estudo do seu sistema de defesa (imunológico), no qual serão analisadas as células que são capazes de defender o organismo contra o coronavírus (SARS-Cov-2). Iremos observar um grupo determinado de células que regulam o sistema de defesa humano e observar se há mudanças em suas funções de acordo com peso corporal e possíveis doenças associadas, além de entender compostos derivados da planta *C. sativa* podem modular a resposta imune. Caso aceite participar do estudo você deverá permitir a realização da coleta do seu sangue. Além disto, você deverá autorizar a realizar medições antropométricas, por bioimpedância e aferição da pressão arterial, para que possamos coletar dados que confirmem e possam ser correlacionados com os dados obtidos posteriormente. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la.

Vamos a seguir, explicar a você para que utilizaremos o material coletado e os riscos e desconforto que poderão existir.

APÊNDICE D – ARTIGOS RELACIONADOS COM TEMA DA DISSERTAÇÃO

- Publicados

International Immunopharmacology 147 (2025) 113992



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



Leptin, NK cells, and the weight of immunity: Insights into obesity

Arthur Gomes de Andrade^a, Shayenne Eduarda Ramos Vanderley^a, Lorrane de Farias Marques^a,
Fernanda Silva Almeida^a, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva^b, Tatjana Souza Lima Keesen^{a,*}

^a Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^b Medical Sciences and Nursing Complex, Federal University of Alagoas, Arapiraca 57309-005, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hormones

Immunoendocrine

Metabolism

Innate immunity

ABSTRACT

Obesity is a chronic inflammatory disease that affects more than 1 billion people worldwide and is associated with various metabolic and physiological dysfunctions, directly impacting the dynamics of the immune response, partly due to elevated leptin levels. Leptin is an important peptide hormone that regulates neuroendocrine function and energy homeostasis, with its blood levels reflecting energy reserves, fat mass, or energy deprivation. This hormone also plays a fundamental role in regulating immune function, including the activity of NK cells, which are essential components in antiviral and antitumor activity. In obese individuals, leptin resistance is commonly established, however, NK cells and other immune components remain responsive to this hormone. So far, leptin has demonstrated paradoxical activities of these cells, often associated with a dysfunctional profile when associated with obesity. The excessive fat is usually related to metabolic remodeling in NK cells, resulting in compromised antitumor responses due to reduced cytotoxic capacity and decreased expression of cytokines important for these defense mechanisms, such as IFN- γ . Therefore, this review approaches a better understanding of the immunoendocrine interactions between leptin and NK cells in the context of obesity.

- Submetidos

Clinical Immunology

Reshaping the microbiota and gut-immune axis: Cannabinoids as promising therapeutic agents in low-grade inflammation

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Review Article
Keywords:	endocannabinoids; phytocannabinoids; immunomodulation
Corresponding Author:	Tatjana Keesen Universidade Federal da Paraiba BRAZIL
First Author:	Shayenne Eduarda Ramos Vanderley
Order of Authors:	Shayenne Eduarda Ramos Vanderley
	Fernanda Silva Almeida
	Fernando César Comberlang
	Rosália Santos Ferreira
	Hugo Juvino Isidro Anacleto
	Tatjana Keesen
Abstract:	<p>Advances in research indicate that sustained low-grade inflammation, driven by complex disturbances in redox signaling and metabolic remodeling, constitutes a central pathological mechanism underlying a wide range of chronic diseases. Considering this, the endocannabinoid system (ECS) has emerged as a key integrator of immune and metabolic signals, modulating cytokine production, redox enzyme activity, and T cell fate through CB1/CB2 and non-canonical receptors. The ECS orchestrates epithelial integrity and mucosal immune responses by sensing dietary lipids and microbiota-derived metabolites. Its crosstalk with tryptophan metabolism and the kynurenine pathway further links nutrient availability to immune regulation. Together, these pathways could converge to position cannabinoids, such as CBD and</p>



ACS Applied Bio Materials <onbehalf@manuscriptce... ter., 24 de jun., 01:16



para fhxj, mayara-thays1, lfas, allessya.formiga, anaflaviauchoauf, annyleticiamarinho, lucas.medeiros2, p ▼



Traduza para o português



To improve and transform your experience of publishing with ACS journals, we are currently developing the ACS Publishing Center. As a result, you may experience interactions and communications from different systems for some elements of the process during this transition. We aim to continue providing you with the best service and appreciate your patience as we work through these changes.

24-Jun-2025

Journal: ACS Applied Bio Materials

Manuscript ID: mt-2025-01183c

Title: "Chitosan-functionalized polymeric nanoparticles enhance antipromastigote activity of Cannabidiol-Rich *Cannabis sativa* Extract Against *Leishmania infantum*"

Author(s): Alcantara da Costa, Mayara Thays ; Alves da Silva, Luis Felliipe; Dantas Formiga, Allessya Lara ; Uchôa, Ana; Marinho Ramos Cardoso, Anny Leticia; Carvalho, Lucas; Oliveira de Souza, Pedro Henricke; da Silva Pereira, Paulo Sergio; Alves, Álisson; Cavalcanti, Iago; Monteiro Fernandes, Ana Leticia; Comberlang Queiroz Davis dos Santos, Fernando Cezar; Ramos Vanderley, Shayenne Eduarda; Fonseca Lamec, Delva Thyares; da Silva Almeida, Fernanda; Keesen de Souza Lima Clemente, Tatjana; Barbosa-Filho, José; Silva, Marcelo; Soares, Karla; Xavier-Junior, Francisco

Manuscript Status: Associate Editor Assigned

APÊNDICE E – ARTIGOS NÃO RELACIONADOS COM TEMA DA DISSERTAÇÃO

- Publicados

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Organic Chemistry, XXXX, XX, 1-11

1

RESEARCH ARTICLE

Novel 2-Acetanilide 2-Arylquinoline-4-carboxylates as Antileishmanial Agents: From Prediction to *In Vitro* Activity/Toxicity

Daniel P. Costa¹, Abraão P. Sousa¹, Leonardo L. Cardoso², Shayenne E.R. Vanderley², Fernanda S. Almeida², Tatjana S.L. Keesen², Thiago A.M. Brito³, Marcelo S. Silva³, Petrônio F. Athayde-Filho^{1,*} and Gabriela F. Fiss^{1,*}

¹Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS), Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ²Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC), Department of Biology Cellular and Molecular, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, and ³Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA), Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Abstract: Alarming data on the neglected tropical disease leishmaniasis, especially for global visceral cases, have motivated the development of novel drugs to overcome the emergence of resistance. In this context, quinoline derivatives, especially quinoline-4-carboxylic acids, have shown promising antileishmanial activity. More recently, acetanilide linked quinoline derivatives revealed selective antileishmanial activity. Now, we are motivated to investigate the influence of the substituent group on antileishmanial and toxicity properties of sixteen 2-acetanilide 2-arylquinoline-4-carboxylates. To this end, the precursors, 2-arylquinoline-4-carboxylic acids, prepared from isatin through the Pfitzinger reaction, and 2-chloroacetanilides were used in an alkylation reaction to obtain the final products (**5e-t**) in yields of 40-88%. Next, 2-acetanilide 2-arylquinoline-4-carboxylates (**5e-t**) had their *in silico/vitro* activity evaluated against *Leishmania infantum* promastigotes. From the MolPredictX program, all compounds were predicted to be active, and only four halogenated compounds (**5k**, **5n**, **5o**, **5r**) were active by *in vitro* assays, with the best result for the compound **5n** (R/R' = Br/Cl), IC₅₀ = 17.08 ± 1.09 µM. From the pkCSM program, these compounds were predicted as non-mutagenic, hepatotoxic, and highly cytotoxic on Flathead Minnows. On the other hand, compounds showed moderate ecotoxicity on *Artemia salina*, with IC₅₀ = 256-297 µg.mL⁻¹. Finally, in contrast of Amphotericin B which caused relevant erythrocyte lysis starting from 50 µM, none of the compounds showed hemolytic activity. Furthermore, compounds were more selective against *L. infantum* promastigotes than against human erythrocytes, with a selectivity index (IC₅₀/IC₅₀) > 15.63, which demonstrates a promising therapeutic window for 2-acetanilide 2-arylquinoline-4-carboxylates.

ARTICLE HISTORY

Received: December 31, 2024
Revised: April 05, 2025
Accepted: April 23, 2025

DOI:
[10.1074011852728371714250529123641](https://doi.org/10.1074011852728371714250529123641)

Keywords: *Artemia salina*, bioinformatics, hemolysis, isatin, *Leishmania infantum*, pfitzinger reaction.



In vitro and *in silico* evaluation of the anti-leishmania activity of synthetic chalcones

Fernando Ferreira Leite^a, Luis Cezar Rodrigues^b, Bruno Hanrry Melo de Oliveira^a, Gabrielly Diniz Duarte^b, Maria Denise Leite Ferreira^a, Natália Ferreira de Sousa^a, Shayenne Eduarda Ramos Vanderley^{a,c}, Leonardo Lima Cardoso^{a,c}, Tatjana Souza Lima Keesen^{a,c}, Rodrigo Santos Aquino de Araújo^{a,d}, Luciana Scotti^a, Marcus Tullius Scotti^a and Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior^{a,d}

^aPostgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^bPostgraduate Program in Development and Innovation of Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^cLaboratory of Infectious Disease Immunology of the Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil; ^dSynthesis and Drug Delivery Laboratory, Department of Biological Sciences, State University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of neglected, vector-borne infectious diseases that affect millions of people around the world. The medications available for its treatment, especially in cases of visceral leishmaniasis, are old, outdated and have serious side effects. In this work, 10 chalcones were synthesised and evaluated *in vitro* against promastigotes and axenic amastigotes of

ARTICLE HISTORY

Received 24 February 2024
Accepted 2 September 2024

KEYWORDS

Chalcones;



Review

Mycobacterium tuberculosis in a Trap: The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Tuberculosis

Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva , Fernanda Silva Almeida, Arthur Gomes de Andrade ,
Fernando César Comberlang, Leonardo Lima Cardoso , Shayenne Eduarda Ramos Vanderley
and Tatjana S. L. Keesen *

Immunology of Infectious Diseases Laboratory, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; luiz0710@gmail.com (L.H.A.C.-S.); fernandaalmeida.ufpb@gmail.com (F.S.A.); arthurg.hit@gmail.com (A.G.d.A.); fcezar14@gmail.com (F.C.C.); leonardo15lima16@gmail.com (L.L.C.); shayenne.erv@gmail.com (S.E.R.V.)

* Correspondence: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br; Tel.: +55-83-32167371

Abstract: *Mycobacterium tuberculosis* complex causes tuberculosis (TB), a disease that causes pulmonary inflammation but can also affect other tissues. Despite macrophages having a defined role in TB immunopathogenesis, other innate immune cells, such as neutrophils, are involved in this process. These cells have high phagocytic ability and a microbial-killing machine comprised of enzymes, antimicrobial peptides, and reactive oxygen species. In the last two decades, a new neutrophil immune response, the neutrophil extracellular traps (NETs), has been intensely researched. NETs comprise DNA associated with histones, enzymes, and antimicrobial peptides. These structures are related to antimicrobial immune response and some immuno-pathogenesis mechanisms. This mini review highlights the role of NETs in tuberculosis and how they can be helpful as a diagnostic tool and/or therapeutic target.

Keywords: NETs; innate immunity; mycobacteria



- Submetidos



Bioorganic & Medicinal Chemistry <em@editorialmanager.com>

para mim ▾

seg., 4 de ago., 11:26 (há 6 dias)



This is an automated message.

Journal: Bioorganic & Medicinal Chemistry

Title: Novel chalcone derivatives as anti-Leishmania infantum agents with potential synergistic activity

Corresponding Author: professor Tatjana Keesen



Co-Authors: Ana Letícia M. Fernandes; Abraão P. Sousa; Delva Thyares F. Lamec; Leonardo Lima Cardoso; Rosália S. Ferreira; Shayenne Eduarda R. Vanderley; Petronio Filgueiras Athayde-Filho; Gabriela F. Fiss

Manuscript Number: **BMCHEM-D-25-01456**

Dear Shayenne Eduarda R. Vanderley,

The corresponding author professor Tatjana Keesen has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Bioorganic & Medicinal Chemistry.

Submission Title: Novel chalcone derivatives as anti-Leishmania infantum agents with potential synergistic activity

Please verify your contribution to Quercetin enhances Amphotericin B activity and regulates ROS and cytokine production in human monocytes infected by *Leishmania infantum*  

Externa Caixa de entrada x



Cytokine <em@editorialmanager.com>
para mim ▾

qua., 23 de jul., 12:14 ★ ↶ ⋮

This is an automated message.

Journal: Cytokine

Title: Quercetin enhances Amphotericin B activity and regulates ROS and cytokine production in human monocytes infected by *Leishmania infantum*

Corresponding Author: Professor Tatjana Keesen

Co-Authors: Leonardo Lima Cardoso, M.D.; Delva Fonseca Lamec Thyares, M.D.; Ana Leticia Monteiro Fernandes; Rosália Santos Ferreira; Shayenne Eduarda Ramos Vanderley; Fernando César Comberlang; Fernanda Silva Almeida, Ph.D.

Manuscript Number:

Dear Shayenne Eduarda Ramos Vanderley,

The corresponding author Professor Tatjana Keesen has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Cytokine.

Submission Title: Quercetin enhances Amphotericin B activity and regulates ROS and cytokine production in human monocytes infected by *Leishmania infantum*



Acta Tropica <em@editorialmanager.com>
para mim ▾

qua., 16 de jul., 16:06 ★ ↶ ⋮

This is an automated message.

Journal: Acta Tropica

Title: Thiosemicarbazone Derivatives Exhibit Potential Leishmanicidal Effects on *L. infantum*

Corresponding Author: professor Tatjana Keesen Souza Lima

Co-Authors: Delva Thyares Fonseca Lamec; Ana Leticia Monteiro Fernandes; Leonardo Lima Cardoso; Fernanda Silva Almeida; Rosália Santos Ferreira; Shayenne Eduarda Ramos Vanderley; Rephany Fonseca Peixoto; Ian P. G. Amaral; Aleff Cruz Castro; Claudio Gabriel Lima-Junior

Manuscript Number: ACTROP-D-25-01154

Dear Shayenne Eduarda Ramos Vanderley,

The corresponding author professor Tatjana Keesen Souza Lima has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Acta Tropica.

Submission Title: Thiosemicarbazone Derivatives Exhibit Potential Leishmanicidal Effects on *L. infantum*