



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**ANÁLISES DE DNA EXTRACELULAR EM PACIENTES COM DOENÇA DE
ALZHEIMER E EFEITO DE FITOCANABINÓIDES NA MODULAÇÃO DE REDES
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS E NA INTEGRIDADE DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA**

BRUNO JAVIER ZEPEDA ROJAS

Foz do Iguaçu, Paraná
2026



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**ANÁLISES DE DNA EXTRACELULAR EM PACIENTES COM DOENÇA DE
ALZHEIMER E EFEITO DE FITOCANABINÓIDES NA MODULAÇÃO DE REDES
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS E NA INTEGRIDADE DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA**

BRUNO JAVIER ZEPEDA ROJAS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Francisney Pinto do Nascimento

Coorientador: Dr. Andrés Mojoli Le-Quesne

Foz do Iguaçu, Paraná
2026

BRUNO JAVIER ZEPEDA ROJAS

ANÁLISES DE DNA EXTRACELULAR EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER
E EFEITO DE FITOCANABINÓIDES NA MODULAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES
DE NEUTRÓFILOS E NA INTEGRIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Francisney Pinto do Nascimento
Orientador
UNILA

Dr. Andrés Mojoli Le-Quesne
Coorientador
UNILA

Dra. Elvira Saraiva
Examinador(a)
UFRJ

Dr. Elton Gomes da Silva
Examinador(a)
UNILA

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 25 de Fevereiro de 2026.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

R741a

Rojas, Bruno Javier Zepeda.

Análises de DNA extracelular em pacientes com doença de Alzheimer e efeito de fitocanabinóides na modulação de redes extracelulares de neutrófilos e na integridade de células endoteliais da barreira hematoencefálica / Bruno Javier Zepeda Rojas. - Foz do Iguaçu, 2026.

109 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS.

Orientador: Francisney Pinto do Nascimento.

Coorientador: Andrés Mojoli Le-Quesne.

1. Neutrófilos. 2. Canabinóides. 3. Maconha. 4. Alzheimer, Doença de. I. Nascimento, Francisney Pinto do. II. Le-Quesne, Andrés Mojoli. III. Título.

CDU 61

*Trabajo dedicado a todas las personas que
estuvieron apoyándome en estos dos años
de maestría. ¡Gracias a todos!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família por estar sempre comigo, seu apoio foi fundamental para completar este trabalho. A distância física tem se tornado normal para nós, porém não tem sido um impedimento para eles me mostrarem seu carinho e apoio o tempo inteiro. Eu nunca teria chegado a ser o pesquisador que sou hoje sem o apoio dos meus pais, Carlos e Karla. Muito do que consegui foi graças a vocês.

Um especial agradecimento ao Dr. Andrés Mojoli Le-Quesne, coorientador desta dissertação, por ser a principal pessoa a me guiar ao longo dos últimos dois anos. Obrigado por me mostrar, com muita paciência, como ser um cientista e pesquisador; neste tempo sob a sua mentoria aprendi muito sobre como pensar de forma crítica e, mais importante, calma.

Agradeço com igual importância ao meu orientador, o Prof. Dr. Francisney Nascimento, pela confiança e apoio nos anos que tenho trabalhado no seu laboratório. Obrigado por acreditar em mim e me ajudar a realizar meus objetivos. O Prof. Nascimento é uma pessoa de grande coração que, como bom cientista e chefe, ajuda seus alunos a crescer como pesquisadores e ensina que a ciência pode trazer uma infinidade de oportunidades para nós. Pode ter a certeza que sempre lembrarei disso e farei o mesmo no futuro.

Um ambiente de trabalho seguro e divertido é importante para poder realizar uma pesquisa; a ciência não avança se você está sozinho e as pessoas que estão ao nosso redor são muito importantes. Por isso, agradeço de coração a todos os membros do Laboratório de Cannabis e Psicodélicos da UNILA; meu crescimento como cientista e como pessoa não se deu somente na bancada realizando experimentos, também em cada conversa que tive e trabalhos que realizei com cada um de vocês.

Gostaria de agradecer enormemente aos técnicos dos laboratórios do prédio do Ginásio do Jardim Universitário da UNILA, Carla e Wagner, cuja ajuda foi fundamental na realização do meu trabalho. Similarmente, quero agradecer a todo o pessoal de limpeza, especialmente à dona Sueli, que sempre nos ajudou em tudo.

Agradeço à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo recebimento da bolsa com código de financiamento 001, bolsa DS (Demanda Social) ao longo dos dois anos de mestrado.

Muito importantes para mim, agradeço ao Mateo, Jonathan e à Grécia; embora todos seguimos caminhos diferentes e a distância nos separa, sempre serão a minha família de Foz.

Por último, com muito carinho e amor, quero agradecer à minha namorada Yoselin por ser a pessoa que tem ficado do meu lado sem importar nada, apoiando cada passo que dou e comemorando cada conquista comigo. Sem você, eu não seria o cientista, nem a pessoa que sou hoje.

ZEPEDA ROJAS, Bruno Javier. 2026. **Análises de DNA extracelular em pacientes com doença de Alzheimer e efeito de fitocanabinóides na modulação de redes extracelulares de neutrófilos e na integridade de células endoteliais da barreira hematoencefálica.** Orientadores: NASCIMENTO, Francisney Pinto do (orientador); LE-QUESNE, Andrés Mojoli (coorientador). 109 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

ANÁLISES DE DNA EXTRACELULAR EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER E EFEITO DE FITOCANABINÓIDES NA MODULAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS E NA INTEGRIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa caracterizada por um quadro de neuroinflamação crônica, no qual neutrófilos migram para o sistema nervoso central e liberam redes extracelulares de neutrófilos (NETs), contribuindo para danos ao endotélio cerebral e ao parênquima. Considerando o papel central das células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) e o potencial modulador dos fitocanabinóides sobre células imunes, este estudo avaliou os efeitos do canabidiol (CBD) e o tetrahydrocannabinol (THC) da *Cannabis sativa* em neutrófilos e em células endoteliais cerebrais humanas (HBMECs), assim como em biomarcadores de pacientes com DA. Inicialmente, foram determinadas concentrações seguras para experimentos *in vitro*, sendo observado que o THC aumentou a atividade mitocondrial das HBMECs no ensaio de MTT. Em neutrófilos, tanto o CBD quanto o THC mostraram-se seguros; o CBD inibiu a liberação de NETs em neutrófilos de indivíduos saudáveis, enquanto o THC exerceu o efeito oposto em neutrófilos de pacientes com DA, aumentando a formação de NETs. Adicionalmente, a quantificação de DNA extracelular (cfDNA) (molécula importante na estrutura das NETs) em amostras de líquido cefalorraquídeo (LCR) e plasma de pacientes com DA revelou níveis mais elevados no LCR em comparação ao plasma. Estas concentrações de cfDNA não se correlacionam com marcadores inflamatórios ou clássicos da DA. O cfDNA do LCR apresentou uma tendência de correlação negativa com o desempenho cognitivo, enquanto o cfDNA plasmático demonstrou uma relação inversa a esta. Em conjunto, os resultados destacam a complexidade dos efeitos dos fitocanabinóides sobre neutrófilos em diferentes contextos fisiopatológicos e reforçam a relevância das HBMECs, das NETs e do cfDNA como alvos e potenciais biomarcadores no estudo da DA.

Palavras-chave: Neutrófilos; Canabinóides; Maconha; Alzheimer, Doença de.

ZEPEDA ROJAS, Bruno Javier. 2026. **Análisis de ADN extracelular en pacientes con enfermedad de Alzheimer y efecto de fitocannabinoides en la modulación de las redes extracelulares de neutrófilos y la integridad de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.** Orientadores: NASCIMENTO, Francisney Pinto do (orientador); LE-QUESNE, Andrés Mojoli (coorientador). 109 p.. *Disertación (Maestría)* - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguacu.

ANÁLISIS DE ADN EXTRACELULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EFECTO DE FITOCANNABINOIDES EN LA MODULACIÓN DE LAS REDES EXTRACELULARES DE NEURÓFILOS Y LA INTEGRIDAD DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa caracterizada por neuroinflamación crónica, en la que los neutrófilos migran al sistema nervioso central y liberan redes extracelulares de neutrófilos (NETs), lo que contribuye al daño del endotelio y parénquima cerebral. Considerando el papel central de las células endoteliales en la barrera hematoencefálica (BHE) y el potencial modulador de los fitocannabinoides en las células inmunes, este estudio evaluó los efectos del cannabidiol (CBD) y el tetrahidrocannabinol (THC) de la Cannabis sativa en neutrófilos y células endoteliales del cerebro humano (HBMECs), así como en biomarcadores de pacientes con EA. Inicialmente, se determinaron concentraciones seguras para experimentos in vitro, y se observó que el THC aumentó la actividad mitocondrial de las HBMEC en el ensayo de MTT. En los neutrófilos, tanto el CBD como el THC demostraron ser seguros; El CBD inhibió la liberación de NETs en neutrófilos de individuos sanos, mientras que el THC ejerció el efecto opuesto en neutrófilos de pacientes con EA, aumentando la formación de NETs. Además, la cuantificación de ADN extracelular (cfDNA) (una molécula importante en la estructura de los NETs) en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma de pacientes con EA reveló niveles más altos en el LCR en comparación con el plasma. Estas concentraciones de cfDNA no se correlacionan con marcadores inflamatorios o clásicos de la EA. El cfDNA en el LCR mostró una tendencia de correlación negativa con el desempeño cognitivo, mientras que el cfDNA plasmático demostró una relación inversa. En conjunto, los resultados resaltan la complejidad de los efectos de los fitocannabinoides sobre los neutrófilos en diferentes contextos fisiopatológicos y refuerzan la relevancia de las HBMECs, las NETs y el cfDNA como objetivos y biomarcadores potenciales en el estudio de la EA.

Palabras clave: *Neutrófilos; Cannabinoides; Cannabis; Alzheimer, Enfermedad de.*

ZEPEDA ROJAS, Bruno Javier. 2026. **Cell-free DNA analyses in patients with Alzheimer's disease and the effect of phytocannabinoids on the modulation of neutrophil extracellular traps and the integrity of endothelial cells of the blood-brain barrier.** Advisors: NASCIMENTO, Francisney Pinto do (advisor); MOJOLI, Andrés (co-advisor). 109 p.. *Dissertation (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.*

CELL-FREE DNA ANALYSES IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE AND THE EFFECT OF PHYTOCANNABINOIDS ON THE MODULATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS AND THE INTEGRITY OF ENDOTHELIAL CELLS OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology characterized by chronic neuroinflammation, in which neutrophils migrate to the central nervous system and release neutrophil extracellular networks (NETs), damaging the cerebral endothelium and parenchyma. Considering the central role of endothelial cells in the blood-brain barrier (BBB) and the modulating potential of phytocannabinoids on immune cells, this study evaluated the effects of cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (THC) from Cannabis sativa on neutrophils and human brain endothelial cells (HBMECs), as well as on biomarkers of AD patients. Initially, safe concentrations were determined for in vitro experiments, and it was observed that THC increased mitochondrial activity of HBMECs in the MTT assay. In neutrophils, both CBD and THC proved to be safe; CBD inhibited the release of NETs in neutrophils from healthy individuals, while THC exerted the opposite effect in neutrophils from AD patients, increasing NET formation. Additionally, quantification of cell-free DNA (cfDNA) (an important molecule in the structure of NETs) in cerebrospinal fluid (CSF) and plasma samples from AD patients revealed higher levels in CSF compared to plasma. These cfDNA concentrations do not correlate with inflammatory or classical AD markers. CSF cfDNA showed a negative correlation trend with cognitive performance, while plasma cfDNA demonstrated an inverse relationship. Taken together, these results highlight the complexity of the effects of phytocannabinoids on neutrophils in different pathophysiological contexts and reinforce the relevance of HBMECs, NETs, and cfDNA as targets and potential biomarkers in the study of AD.

Keywords: Neutrophils; Cannabinoids; Cannabis; Alzheimer's Disease.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Processo de extravasamento dos neutrófilos através do endotélio.....	20
Figura 2. Esquema de NETs.....	21
Figura 3. NETs liberadas por neutrófilos.....	21
Figura 4. Barreira hematoencefálica e células associadas.....	23
Figura 5. Junções aderentes e de oclusão nas HBMECs.....	25
Figura 6. Esquema da estrutura química geral dos fitocanabinóides.....	30
Figura 7. Estrutura molecular do THC.....	31
Figura 8. Estrutura molecular do CBD.....	32
Figura 9. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD isolado.....	47
Figura 10. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD broad spectrum.....	48
Figura 11. Viabilidade celular de HBMECs expostas a THC isolado.....	49
Figura 12. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD isolado e THC isolado, analisado pelo ensaio de LDH.....	50
Figura 13. Viabilidade celular de HBMECs expostas a THC isolado e inibidores, analisado pelo ensaio de LDH.....	51
Figura 14. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD isolado e inibidores, analisado pelo ensaio de LDH.....	51
Figura 15. Viabilidade celular de HBMECs incubadas com meio sem SFB.....	52
Figura 16. Efeito do THC isolado sob a capacidade de wound healing das HBMECs.....	53
Figura 17. Produção de NETs por neutrófilos.....	54
Figura 18. CBD e THC não afetam a viabilidade dos neutrófilos.....	55
Figura 19. CBD inibe a liberação de NETs.....	55
Figura 20. THC induz a liberação de NETs em neutrófilos de pacientes com DA.....	58
Figura 21. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação à idade.....	59
Figura 22. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação ao sexo.....	59
Figura 23. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação à severidade da doença.....	60
Figura 24. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação à velocidade de progressão da doença.....	60
Figura 25. cfDNA está mais elevado no LCR do que no plasma na DA.....	61
Figura 26. Concentrações de cfDNA nas amostras de LCR e plasma dos pacientes com DA não estão correlacionadas.....	61
Figura 27. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com o número de neutrófilos no sangue de pacientes com DA.....	62
Figura 28. Concentrações de cfDNA no plasma não se correlacionam com o número de neutrófilos no sangue de pacientes com DA.....	63
Figura 29. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com IL-6 plasmático em pacientes com DA.....	64
Figura 30. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com TNF- α plasmático em pacientes com DA.....	64
Figura 31. Concentrações de cfDNA no plasma não se correlacionam com IL-6	

plasmático em pacientes com DA.....	65
Figura 32. Concentrações de cfDNA no plasma não se correlacionam com TNF- α plasmático em pacientes com DA.....	65
Figura 33. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com A β 42 em pacientes com DA.....	66
Figura 34. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com a razão A β 42/40 em pacientes com DA.....	67
Figura 35. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com tau fosforilada 181 (pTAU 181) em pacientes com DA.....	67
Figura 36. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com tau total em pacientes com DA.....	68
Figura 37. Desempenho cognitivo está negativamente correlacionado com a idade em pacientes com DA.....	69
Figura 38. Desempenho cognitivo está negativamente correlacionado com as concentrações de tau fosforilada 181 (pTAU 181) em pacientes com DA.....	69
Figura 39. Desempenho cognitivo não se correlaciona com concentrações de A β 42 em pacientes com DA.....	70
Figura 40. Desempenho cognitivo apresenta uma tendência a se correlacionar negativamente com o cfDNA do LCR.....	71
Figura 41. Desempenho cognitivo apresenta uma tendência a se correlacionar positivamente com o cfDNA do plasma.....	71
Figura 42. Pacientes que receberam placebo e extrato de cannabis durante 6 meses apresentaram uma redução no cfDNA no LCR.....	72
Figura 43. Concentração de IL-8 em amostras de LCR em pacientes com DA.....	73
Figura 44. Concentração de IL-33 em amostras de LCR em pacientes com DA.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Características demográficas e de biomarcadores dos pacientes do DAZACANN.....	56
Tabela 2 Características demográficas dos pacientes do MICA-AD.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-Araquidonoilglicerol
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HT1A	Receptor de 5-hidroxitriptamina 1A
AEA	Anandamida
β A	Beta amilóide
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CBD	Canabidiol
CBDV	Canabidivarina
CBG	Canabigerol
CBN	Canabinol
CBR	Receptor canabinóide
cfDNA	<i>Cell-free DNA</i> (DNA extracelular)
CXCL1	<i>Chemokine C-X-C motif ligand 1</i>
CXCL2	<i>Chemokine C-X-C motif ligand 2</i>
DA	Doença de Alzheimer
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EM	Esclerose Múltipla
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
HBMEC	<i>Human brain microvascular endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-33	Interleucina 33
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>

LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDH	Lactato desidrogenase
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCT	<i>Medium-chain triglyceride</i>
MEEM	Mini-exame do estado mental
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
OMS	Organização mundial da saúde
PAD4	<i>Peptidyl arginine deiminase 4</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SNC	Sistema nervoso central
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VE-PTP	<i>Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase</i>
ZO	<i>Zona occludens</i>

SUMÁRIO

RESUMO	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Referencial Teórico	17
1.1.1 <i>Inflamação e a Barreira Hematoencefálica</i>	17
1.1.2 <i>Neutrófilos</i>	18
1.1.3 <i>NETs (Neutrophil Extracellular Traps)</i>	21
1.1.4 <i>A Barreira Hematoencefálica (BHE)</i>	22
1.1.5 <i>Células do Endotélio Cerebral (HBMECs)</i>	24
1.1.6 <i>Sistema Endocanabinóide (SEC)</i>	27
1.1.7 <i>Fitocanabinóides</i>	29
1.1.8 <i>Doença de Alzheimer</i>	32
1.2 Justificativa	37
1.3 Pergunta Norteadora	37
1.4 Hipótese	38
2 OBJETIVOS	39
2.1 Geral	39
2.2 Específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Extratos de fitocanabinóides	40
3.2 Amostras de plasma e LCR de pacientes com DA	40
3.3 Cultivos celulares	41
3.3.1 <i>HBMECs</i>	41
3.3.2 <i>Neutrófilos</i>	41
3.4 Estimulação de neutrófilos para produção de NETs	41
3.5 Microscopia de fluorescência	42
3.6 Ensaios de viabilidade celular	42
3.6.1 <i>Ensaio do MTT</i>	42
3.6.2 <i>Ensaio de LDH</i>	43
3.7 Wound healing assay	43
3.8 Quantificação de citocinas em amostras de LCR e plasma	44
3.9 Quantificação de cfDNA em amostras de LCR e plasma	44
3.10 Análise estatística	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Viabilidade HBMECs incubadas com fitocanabinóides	46
4.2 Papel dos receptores CB1 e CB2 no efeito citotóxico dos fitocanabinóides	

nas HBMECs.....	50
4.3 O THC não modula a migração das HBMECs.....	52
4.4 Indução de NETs.....	53
4.5 CBD isolado e THC isolado não afetam a viabilidade de neutrófilos.....	54
4.6 CBD isolado inibe a liberação de NETs.....	55
4.7 Dados demográficos dos pacientes com DA.....	56
4.8 THC induz a liberação de NETs na DA.....	57
4.9 Quantificação de cfDNA em amostras de LCR e plasma de pacientes com DA.	58
4.9.1 <i>cfDNA no LCR de pacientes com DA não varia em relação à idade, sexo ou</i>	
<i>severidade da doença.....</i>	<i>58</i>
4.9.2 <i>cfDNA está mais elevado no LCR do que no plasma em pacientes com DA.....</i>	<i>60</i>
4.9.3 <i>O número de neutrófilos não se correlaciona com os níveis de cfDNA.....</i>	<i>62</i>
4.9.4 <i>cfDNA e marcadores inflamatórios na DA.....</i>	<i>63</i>
4.9.5 <i>cfDNA e marcadores clássicos da DA.....</i>	<i>66</i>
4.9.6 <i>cfDNA e o desempenho cognitivo.....</i>	<i>68</i>
4.10 Efeitos do extrato de cannabis nas concentrações de cfDNA em amostras	
de LCR de pacientes com DA.....	72
4.11 Quantificação de IL-8 e IL-33 em amostras de LCR de pacientes com DA....	72
5 DISCUSSÃO.....	75
6 CONCLUSÕES.....	87
7 PERSPECTIVAS.....	88
8 FINANCIAMENTO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Inflamação e a Barreira Hematoencefálica

As células do sistema imune e a barreira hematoencefálica (BHE) interagem de uma forma muito complexa e importante. Como é indicado pelo nome, a BHE é uma interface celular semipermeável e altamente seletiva que regula o movimento de substâncias entre a circulação sanguínea e o cérebro, sendo uma estrutura essencial para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (ABBOTT *et al.*, 2012). Sem a BHE, o SNC está em risco de ser invadido por toxinas, patógenos e células imunitárias, ou pode acontecer uma desregulação iônica; tudo isto podendo levar a uma disfunção neuronal e à degeneração do tecido (DANEMAN *et al.*, 2015).

As células do sistema imune estão constantemente circulando no sistema vascular e, em casos de uma resposta inflamatória, elas utilizam este meio para se locomover rapidamente até o sítio requerido. Dependendo da situação, células como monócitos e neutrófilos podem migrar até o sítio da inflamação em questão de minutos (LUU *et al.*, 1999).

O encéfalo é um dos órgãos mais importantes do organismo e o SNC é um dos locais mais regulados e protegidos; a existência da BHE é uma evidência do quão extremamente seletiva pode ser a “entrada” e “saída” deste ambiente. Apesar dos múltiplos mecanismos de proteção, o SNC não é alheio a patologias que podem danificá-lo consideravelmente. Por isso, o SNC possui células conhecidas como microglias, que, entre outras funções, são o principal mecanismo de defesa imune deste sistema (FILIANO *et al.*, 2015). Porém, os leucócitos mais comuns que encontram-se na corrente sanguínea também conseguem acessar ao SNC em processos inflamatórios, por exemplo; e é através da BHE que estas células conseguem migrar do vaso sanguíneo para o parênquima cerebral. Casos onde há uma ativação da microglia e uma migração exacerbada de leucócitos no SNC são conhecidos como quadros de neuroinflamação (DISABATO *et al.*, 2016).

Na presença de um agente patogênico externo, a resposta neuroinflamatória tem o objetivo inicial de proteger o SNC; porém esta pode se tornar deletéria e iniciar um recrutamento exacerbado de leucócitos no sistema. A neuroinflamação aguda começa em resposta a patógenos como bactérias, vírus e outros agentes infecciosos. As células da microglia podem liberar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que vão recrutar

leucócitos para o SNC (RAMESH *et al.*, 2013). Alguns destes agentes externos podem desencadear uma resposta imune descontrolada, levando a um comprometimento da BHE devido aos próprios efeitos dos leucócitos que estão deslocando-se através dela. Uma BHE que tem a sua integridade comprometida não pode executar suas funções de regulação habituais, o que pode permitir uma passagem ainda mais elevada de leucócitos e a um possível quadro de neurodegeneração (TOHIDPOUR *et al.*, 2017).

O comprometimento da BHE devido à presença elevada de leucócitos pode ser observado em diversas patologias, desencadeando quadros de inflamação estéril. O traumatismo craniano e o acidente vascular cerebral (AVC) são exemplos de casos onde acontece esta disrupção da BHE (LO *et al.*, 2003; MAYER *et al.*, 2013). Os casos de neuroinflamação crônica são geralmente associados a doenças neurodegenerativas, onde a inflamação e o comprometimento da integridade da BHE são componentes essenciais destas patologias. A doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e a esclerose múltipla (EM) são algumas das patologias neurodegenerativas mais comuns onde esta características pode ser observada (ZENARO *et al.* 2017; BARNUM *et al.*, 2012; BJELOBABA *et al.*, 2017).

1.1.2 Neutrófilos

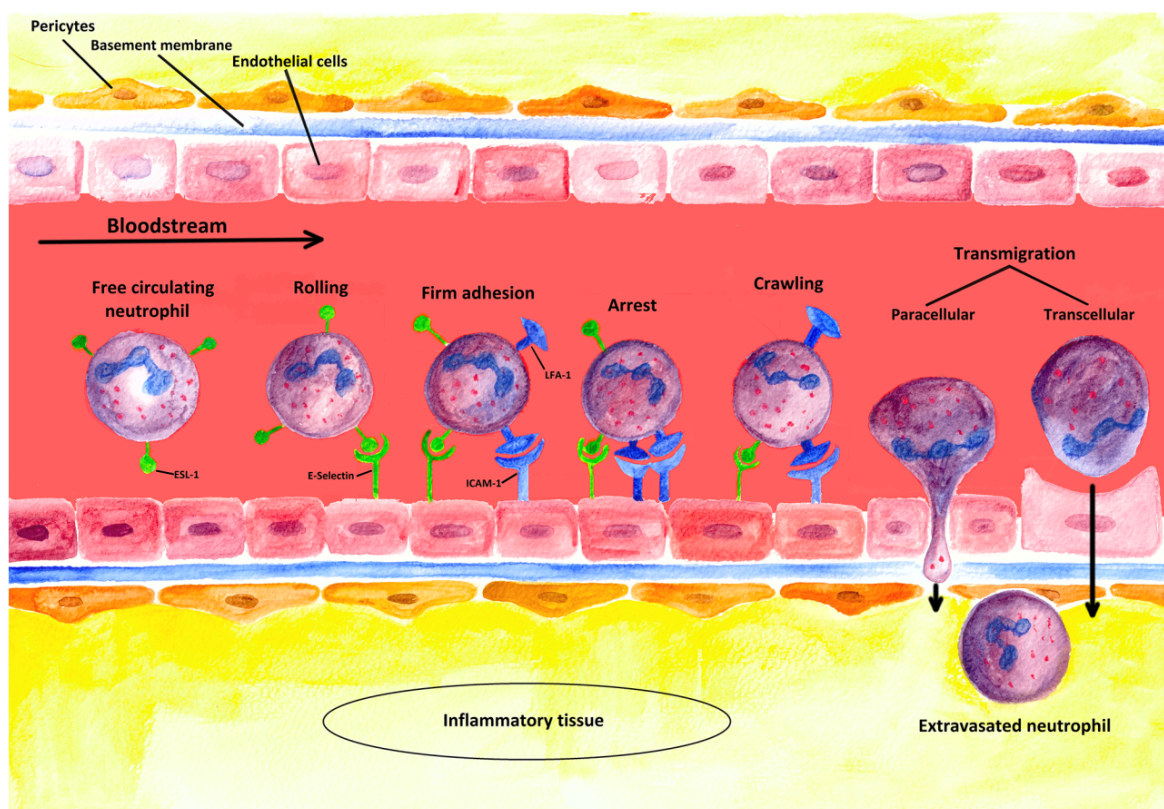
Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do organismo humano, representando aproximadamente 70% das células imunitárias encontradas no corpo. Até hoje, é aceito que os neutrófilos são os protagonistas principais da resposta imune em quadros de inflamação aguda, pois eles são os primeiros a ser recrutados para o sítio de inflamação nestes casos. Além disso, o papel destas células na inflamação crônica tem ganhado mais interesse nos últimos anos (SOEHNLEIN *et al.*, 2017).

Na sua ação normal como célula imunitária, os neutrófilos possuem três mecanismos de ação principais para realizar a sua função microbicida: a fagocitose, a degranulação e a liberação de “armadilhas” extracelulares (NETs; *neutrophil extracellular traps*) (PAPAYANNOPOULOS, 2018). Estas últimas, são estruturas formadas por cromatina extracelular associada a proteases com a função de capturar e degradar micróbios patogênicos (BRINKMANN *et al.*, 2004); porém com alto potencial de ocasionar danos nos tecidos do próprio organismo quando liberadas em excesso (CORTJENS *et al.*, 2017).

Quando a sua presença é necessária em casos de infecções por microrganismos ou inflamação estéril, os neutrófilos são recrutados por meio de diversas citocinas e quimiocinas. As principais quimiocinas envolvidas no recrutamento dos neutrófilos são a CXCL1 e CXCL2, além da TNF- α e a IL-8 (TSIOUMPEKOU *et al.*, 2023; VIEIRA *et al.*, 2009). Uma vez ativados por estas moléculas, os neutrófilos migram até o sítio da inflamação.

Para chegar ao sítio de ação, os neutrófilos são transportados no sistema vascular e, uma vez no tecido alvo, acontece o extravasamento deles através do endotélio vascular; ação que é melhor conhecida como diapedese (**Figura 1**). Inicialmente, o neutrófilo encontra-se livre no sangue e este se ligará fracamente às selectinas expressas na membrana das células endoteliais. Por esta ligação ser fraca, ela não consegue parar completamente o fluxo do neutrófilo causado pela força da corrente sanguínea, pelo que o neutrófilo começa a rolar na parede do vaso conforme estas ligações vão se quebrando e se formando sucessivamente. Quando ativadas por quimiocinas, integrinas como a LFA-1 (expressas na membrana do neutrófilo) conseguem se ligar a moléculas de adesão encontradas, por sua vez, na membrana das células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). A ligação entre estas duas proteínas permite uma adesão forte que consegue parar o movimento do neutrófilo ao longo da superfície do endotélio. Esta adesão firme faz com que o neutrófilo consiga migrar no espaço entre as células endoteliais para chegar, finalmente, no sítio da inflamação (KRAUS *et al.*, 2021).

Figura 1. Processo de extravasamento dos neutrófilos através do endotélio.



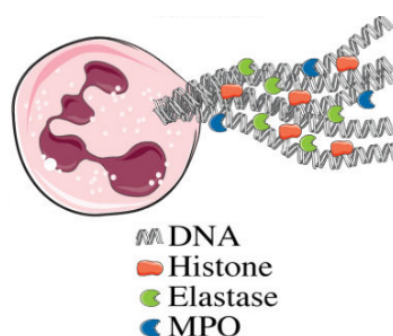
Fonte: Kraus *et al.*, 2021

O papel dos neutrófilos nas doenças neurodegenerativas tem chamado mais a atenção dos pesquisadores nos últimos anos, especialmente pelo fato deles terem um papel fundamental em neuropatologias que exibem quadro de neuroinflamação (SANTOS-LIMA *et al.*, 2022). Em patologias como a DA, existem registros que mostram como os neutrófilos tendem a acumular-se não só no parênquima cerebral mas também na vasculatura do cérebro; em outras palavras, antes deles atravessarem do vaso sanguíneo para o parênquima (ZENARO *et al.*, 2015). Além disso, já foi observado que neutrófilos fazem a liberação de NETs tanto no endotélio da vasculatura cerebral quanto no parênquima cerebral, o que está relacionado à neurodegeneração observada na doença (PIETRONIGRO *et al.*, 2017). Quando liberadas no endotélio cerebral, as NETs contribuem com a degeneração da BHE. Em 2013, Erickson e Banks descreveram como a disfunção da BHE é tanto uma causa quanto uma consequência da DA; ponto essencial para o desenvolvimento da patologia (ERICKSON *et al.*, 2013).

1.1.3 NETs (Neutrophil Extracellular Traps)

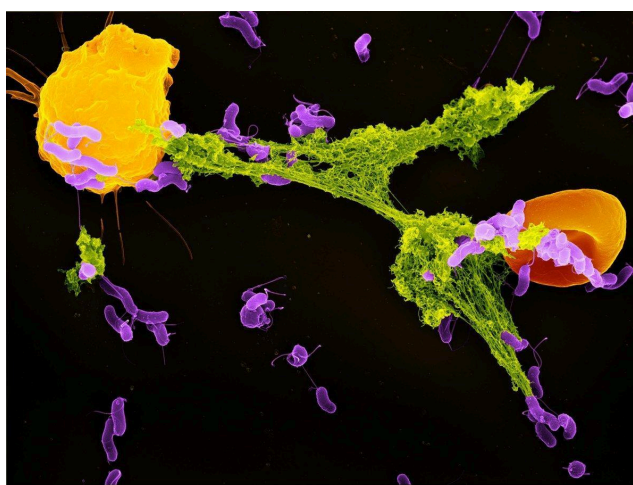
Descritas pela primeira vez em 2004, as NETs são, como mencionado anteriormente, redes de cromatina liberadas em conjunto com histonas, proteases (elastase, proteinase 3, catepsina G) e mieloperoxidase (MPO) (**Figura 2**). A liberação destas redes é induzida por diversos estímulos, como bactérias, protozoários, fungos, vírus e fatores endógenos (BRINKMANN *et al.*, 2004) (**Figura 3**). Além disso, já foi observado que certas citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na indução da liberação das NETs, como TNF- α , IL-1 β e IL-8 (KESHARI *et al.*, 2012) e, similarmente, espécies reativas de oxigênio aparentam ter um papel importante no processo de liberação de NETs (STOIBER *et al.*, 2015).

Figura 2. Esquema de NETs.



Fonte: Adaptado de Meegan *et al.*, 2017

Figura 3. NETs liberadas por neutrófilos.



Nota: Neutrófilo (amarelo) libera NETs (verde) para capturar bactérias (roxo). Eritrócito visível na imagem (vermelho).

Fonte: Brinkmann, 2021.

O processo de liberação das NETs é um tipo de morte celular programada que é acionada e mediada por várias cascatas de sinalização. Como explicado por Meegan et al., o processo é caracterizado pela descondensação da cromatina, mediado pela citrulinização das histonas pela enzima PAD4. A elastase e a MPO, que são liberadas posteriormente na NET, abandonam os grânulos e migram para o núcleo, auxiliando na clivagem das histonas e na descondensação da cromatina (MEEGAN *et al.*, 2017).

Como descrito acima, um dos componentes principais das NETs é o DNA de dupla fita; essa cromatina desenrolada é a que dá às NETs sua estrutura característica em forma de rede. Pelo fato do DNA ocupar uma grande área da estrutura das NETs, pesquisas têm começado a considerar o DNA extracelular (cfDNA) como um indicador da presença das NETs, especialmente em amostras de biofluidos (DE MIRANDA *et al.*, 2021).

As NETs são uma ferramenta de defesa de grande utilidade, já que, como seu nome o implica, atuam como uma armadilha que captura patógenos na rede de cromatina para controlar a sua disseminação (muito útil em casos de patógenos que são muito grandes para serem fagocitados, por exemplo), assim como para inativar e eliminar os mesmos, por meio da alta concentração de proteases e histonas contidas na rede (BRINKMANN *et al.*, 2004). Porém, a liberação descontrolada de NETs pode danificar tecidos do próprio organismo e promover uma resposta inflamatória mais exacerbada, contribuindo na patologia de diversas doenças (THIAM *et al.*, 2020).

Como mencionado previamente, a liberação elevada de NETs que acontece na BHE e no parênquima cerebral na DA é um grande contribuinte à subsequente neurodegeneração e progressão da doença. Recentemente, pesquisadores têm dado mais importância à disfunção da BHE como ponto chave da DA e vários têm apontado a ação citotóxica das NETs nas células endoteliais da barreira como um dos maiores responsáveis desta degeneração (MEEGAN *et al.*, 2017; PIETRONIGRO *et al.*, 2017; SAFFARZADEH *et al.*, 2012; SANTOS-LIMA *et al.*, 2022).

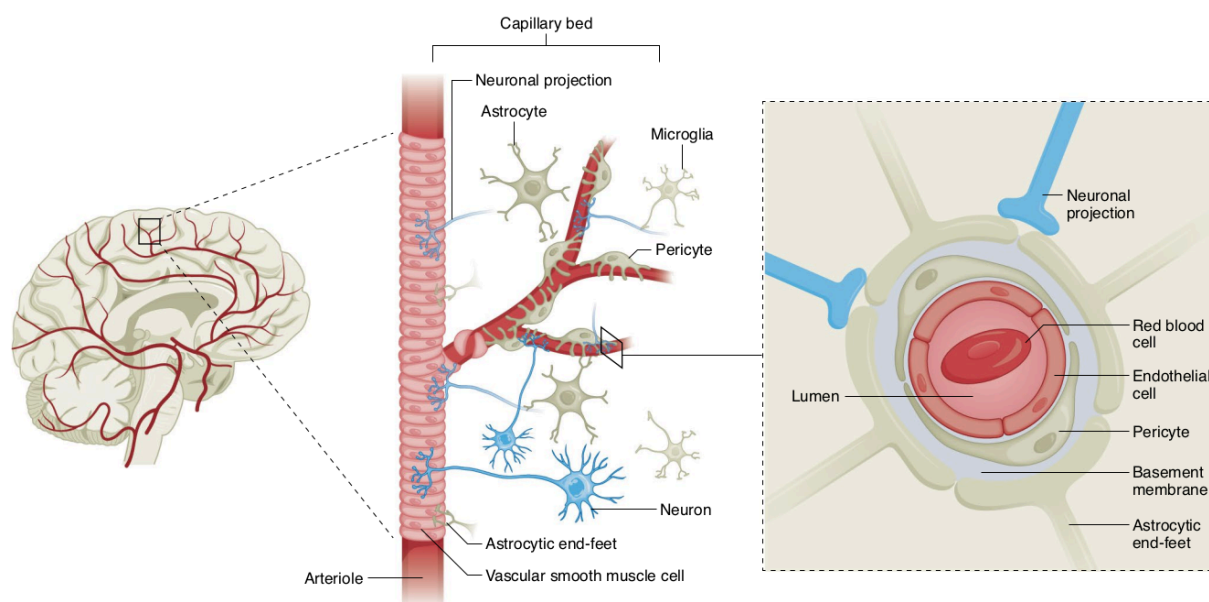
1.1.4 A Barreira Hematoencefálica (BHE)

As primeiras evidências da existência da BHE datam do início do século XX, quando o ganhador do prêmio Nobel, Paul Ehrlich, injetou diversos corantes na corrente sanguínea e observou como todos eles extravasaram na maioria dos tecidos do corpo,

mas o cérebro e a medula espinhal permaneceram limpos, sem nenhuma coloração. O termo “barreira hematoencefálica” foi utilizado pela primeira vez pela neurofisiologista Lina Stern em 1921, abrindo o caminho à compreensão da importância desta barreira (GUPTA *et al.*, 2015).

A BHE é formada por quatro elementos: i) uma monocamada de células endoteliais, o principal componente da barreira; ii) uma membrana basal, consistindo de fibras de colágeno de tipo IV, fibronectina e laminina; iii) pericitos integrados nesta membrana basal; e iv) astrócitos que envolvem a membrana basal (**Figura 4**) (HAWKINS *et al.*, 2006). Em condições fisiológicas normais, a BHE atua como uma interface seletiva que regula a troca de nutrientes, desperdícios e células imunitárias entre o sangue e o tecido nervoso do SNC, tornando a BHE o componente mais importante na preservação da homeostasia do SNC e da função neuronal (ABBOTT *et al.*, 2012). Além disso, a estabilidade iônica e o ambiente neuroquímico do encéfalo são altamente dependentes da integridade dos componentes da BHE. Na ausência desta estabilidade, as complexas funções realizadas pelo cérebro seriam impossíveis (SAUNDERS *et al.*, 2008).

Figura 4. Barreira hematoencefálica e células associadas.



Fonte: Barisano *et al.*, 2022

A permeabilidade seletiva da BHE é mantida por meio de várias junções intercelulares na monocamada de células endoteliais, tais como as junções de oclusão, junções aderentes e junções comunicantes (GUPTA *et al.*, 2015). Estes complexos proteicos serão discutidos com mais detalhes posteriormente.

Quando alguma substância tóxica compromete a integridade da BHE (estrutura, função ou permeabilidade), esta torna-se incapaz de controlar corretamente o fluxo de moléculas e células para dentro e fora do SNC. Uma das principais formas em que pode ocorrer o comprometimento da BHE é através da quebra das junções intercelulares do endotélio que mantém uma forte impermeabilidade ou pela morte destas células. É exatamente isto o que ocorre nas patologias nas quais a integridade da BHE é afetada, como no AVC, na DP, na DA, etc. No caso da DA, as NETs liberadas pelos neutrófilos no vaso sanguíneo cerebral têm a capacidade de afetar consideravelmente a integridade da BHE por meio da quebra das junções celulares: algumas das proteases que fazem parte da NET (especialmente a elastase, a proteinase 3 e a catepsina G) causam uma reação de clivagem de proteínas essenciais para a estrutura das junções celulares; por exemplo as caderinas, indispensáveis na estrutura das junções aderentes (MEEGAN *et al.*, 2017). Devido a isto, se dá um grande incremento da permeabilidade da BHE, permitindo a passagem de mais leucócitos para o parênquima cerebral, contribuindo com o quadro de neuroinflamação crônica observado na DA (PIETRONIGRO *et al.*, 2017).

A presença do cfDNA no sangue, independente se for oriundo das NETs ou não, já foi associada a uma BHE comprometida. Embora não existam estudos relatando se o próprio cfDNA tem algum efeito negativo que afete a estrutura e funcionalidade da BHE, estudos relacionados a diferentes tipos de tumores cerebrais já observaram que, quando a BHE está danificada, os níveis de cfDNA tumoral começa a aumentar no sangue; tornando o cfDNA um biomarcador interessante para monitoramento e detecção de patologias do SNC quando 1) a BHE está danificada de alguma forma e 2) existe a possibilidade de determinar o tipo e a origem do cfDNA (WADDEN *et al.*, 2022; MATHIOS *et al.*, 2025).

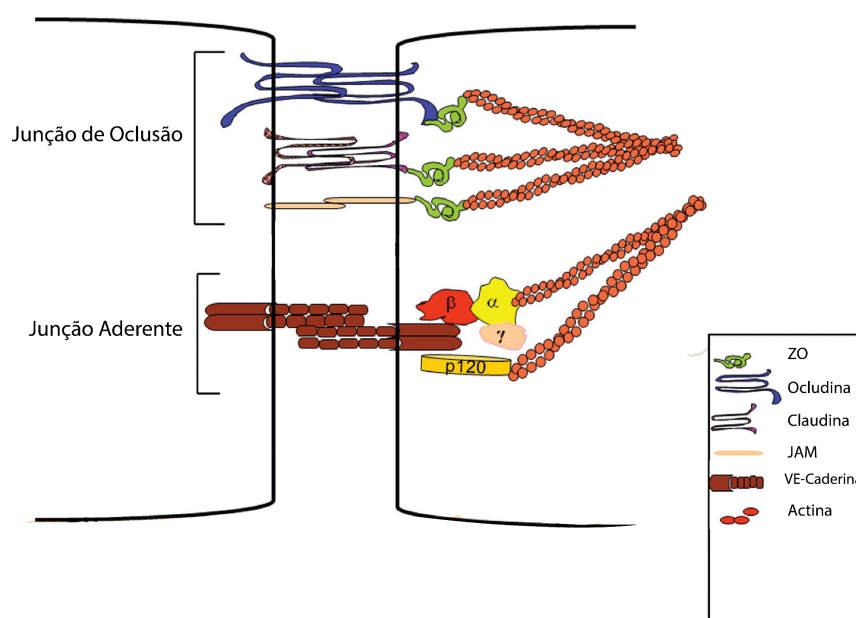
1.1.5 Células do Endotélio Cerebral (HBMECs)

O principal componente da BHE são as células endoteliais, também conhecidas como BMECs ou HBMECs. Como com outras células endoteliais do organismo, as estruturas conhecidas como junções celulares são muito importantes para a sua função. As junções aderentes e as de oclusão são as principais responsáveis pela manutenção da união intercelular das HBMECs (VANDERBROUCKE *et al.*, 2008).

No caso das junções aderentes, a união entre duas HBMECs se dá por meio de uma proteína específica de células endoteliais conhecida como caderina-vascular

endotelial (VE-caderina), que encontra-se no espaço intercelular. A VE-caderina liga-se a outras proteínas chamadas α - e β -cateninas, presentes no espaço intracelular que, por sua vez, facilitam a ligação com o esqueleto de actina encontrado dentro das células. Uma outra molécula, a proteína vascular endotelial tirosina fosfatase (VE-PTP), está encarregada de manter a VE-caderina desfosforilada, o que aumenta a força adesiva da união. Já as junções de oclusão encontradas nas HBMECs são compostas pelas proteínas transmembrana ocludinas, claudinas e moléculas de adesão juncional (JAMs); a ligação intracelular destas estruturas com o esqueleto de actina se dá por meio da proteína zona occludens (ZO) (DISTASI *et al.*, 2009) (**Figura 5**) (SUKRITI *et al.*, 2014).

Figura 5. Junções aderentes e de oclusão nas HBMECs.



Fonte: Adaptado de Sukriti *et al.*, 2014

Sendo o componente mais importante da BHE (ALAHMARI, 2021), as HBMECs são as responsáveis pela “abertura” e “fechamento” da barreira. Como previamente discutido, é por meio deste leve incremento na permeabilidade da monocamada que moléculas e células conseguem atravessar a BHE e chegar no parênquima cerebral. Em condições normais, a regulação da permeabilidade endotelial acontece através do arredondamento das células. As HBMECs se contraem devido à formação de fibras de estresse de actina e pela desestabilização dos microtúbulos; quando esta contração é o suficientemente forte, a célula atinge o formato arredondado. Ao passar do seu formato achatado normal para um arredondado, as junções intercelulares das HBMECs perdem a

sua adesividade e isto leva ao incremento na permeabilidade. Quando a HBMEC precisa voltar ao seu estado achatado, há um reforço nas junções célula-matriz extracelular (MEC) chamadas adesões focais (MEHTA *et al.*, 2006). Este reforço, junto à restauração das junções intercelulares e do citoesqueleto, permite que a célula volte a seu formato normal e a impermeabilidade da BHE é restaurada.

Durante a neuroinflamação, o processo se desenvolve de uma maneira diferente. Discutido no subtópico *1.1.2 Neutrófilos*, para que estes leucócitos consigam atravessar uma monocamada endotelial é preciso que as células do endotélio expressem proteínas de adesão como a ICAM-1 e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1). Desta forma, integrinas na membrana do neutrófilo (como a LFA-1) ligam-se à ICAM-1 e à VCAM-1, promovendo a adesão do leucócito ao endotélio; o que leva, por sua vez, ao posterior extravasamento do neutrófilo para o parênquima cerebral. Tem sido observado que, durante processos inflamatórios, existe uma superexpressão de ICAM-1 e VCAM-1 na membrana das HBMECs, o que facilita a adesão em massa de neutrófilos (VENDEL *et al.*, 2014).

Uma vez que o neutrófilo encontra-se aderido ao endotélio, este libera quimiocinas e citocinas com o propósito de recrutar mais neutrófilos para o sítio, o que, em casos de migração massiva, incrementa o risco de dano da BHE. Este elevado potencial para danos na integridade da BHE é atribuído a diversos fatores; por exemplo, as quimiocinas e citocinas liberadas pelo neutrófilo (como TNF- α , CXCL1, CXCL2, CCL3, CCL4 e IL-8) podem induzir diretamente uma contração na HBMEC, o que leva a um incremento na permeabilidade do endotélio (DISTASI *et al.*, 2009). Por outro lado, como mencionado nos subtópicos anteriores, a liberação de NETs no endotélio cerebral tem sido confirmada em diversos quadros de neuroinflamação crônica, como na DA, e é conhecido que alguns dos seus componentes têm a capacidade de digerir moléculas essenciais da estrutura de junções intercelulares, o que também leva a um incremento significativo da permeabilidade da barreira (PIETRONIGRO *et al.*, 2017).

As funções das células do endotélio cerebral, assim como as das células imunitárias, podem ser moduladas por moléculas endógenas e exógenas. Como será discutido no subtópico a continuação, compostos relacionados ao sistema endocanabinoide são capazes desta modulação, induzindo diversos tipos de efeitos nestas células.

1.1.6 Sistema Endocanabinóide (SEC)

O sistema endocanabinóide (SEC) é um complexo sistema de sinalização composto pelos seguintes elementos: dois receptores acoplados à proteína G (GPCRs), conhecidos como os receptores endocanabinóides 1 e 2 (CBR1 e CBR2); endocanabinóides que atuam como agonistas nestes receptores; assim como as enzimas envolvidas nos processos de biossíntese e degradação dos endocanabinóides (KAUR *et al.*, 2016). De maneira geral, a ativação dos CBRs nas células leva à inibição da adenilato ciclase, uma enzima chave na regulação de diversas respostas celulares. Ao mesmo tempo, a ativação destes receptores incrementa a atividade de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (DI MARZO *et al.*, 2004). Os CBRs estão presentes em praticamente todos os tecidos do organismo humano. O CBR1 é o GPCR mais abundante do SNC dos mamíferos e, embora em menores quantidades, ele tem sido identificado em células de outros tecidos como o sistema reprodutivo, o trato gastrointestinal, o coração, os pulmões e a bexiga (MACKEY, 2005). Por outro lado, o CBR2 é muito mais abundante em tecidos periféricos, especialmente em células do sistema imune. Porém, deve-se enfatizar que, assim como o CBR1, o CBR2 não é exclusivo dos tecidos nos quais ele é mais abundante; sendo que este receptor já tem sido identificado na microglia e em neurônios, por exemplo (SVÍZENSKÁ *et al.*, 2008).

Como mencionado no parágrafo anterior, outro componente essencial do SEC são as moléculas lipídicas que atuam como agonistas nos CBRs: os endocanabinóides. Os dois endocanabinóides mais estudados são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). As duas moléculas foram identificadas no começo da década dos anos 1990, pouco tempo depois dos CBRs serem clonados pela primeira vez (DEVANE *et al.*, 1992; MECHOULAM *et al.*, 1995). Estas moléculas são sintetizadas sob demanda (somente quando são requeridos) através da hidrólise enzimática de precursores derivados das bicamadas lipídicas das células em resposta à diversos estímulos, como incrementos nos níveis de cálcio intracelular (DI MARZO *et al.*, 2005).

O consenso científico é que o SEC tem um papel crucial na regulação de distintos processos fisiológicos no organismo inteiro, sendo não exclusivo ao SNC. Por exemplo, a evidência aponta a uma importância operacional nos sistemas endócrino, nervoso autônomo, imune, reprodutivo e gastrointestinal e na microcirculação (BEHL *et al.*, 2022).

As células do sistema imune expressam tanto CBR1 quanto CBR2, porém a expressão do CBR2 chega a ser em torno de 10-100 vezes maior, evidenciando a

importância deste receptor na regulação imunológica (RAHAMAN *et al.*, 2021). Os neutrófilos apresentam ambos receptores na sua membrana e diversos estudos mostram como a sua atividade pode ser modificada através do SEC. Por exemplo, quando encontrados em deficiência do CBR2, foi incrementada a resposta inflamatória dos neutrófilos assim como a sua migração para o sítio da inflamação (KAPELLOS *et al.*, 2019). Por outro lado, já foi observado que a AEA é capaz de reduzir a migração dos neutrófilos através de um receptor distinto do CBR1 e do CBR2 (MCHUGH *et al.*, 2008). Um tempo depois, foi identificado que este receptor é o GPR55, um receptor densamente expresso nos neutrófilos e que tem-se começado a enxergar como o “terceiro” receptor endocanabinóide. Além da redução da migração, a AEA reduziu a degranulação e a produção de espécies reativas de oxigênio por parte dos neutrófilos (BALENGA *et al.*, 2011). No caso do 2-AG, tem-se mostrado que é também capaz de reduzir a migração destas células (induzida por fMLP, um peptídeo utilizado como fator quimiotático de leucócitos polimorfonucleares), mas nesta ocasião por meio do CBR2 (KURIHARA *et al.*, 2006).

Como foi previamente mencionado, os receptores canabinóides estão muito presentes nos diversos tecidos do SNC, especialmente o CBR1, e as células do endotélio cerebral não são exceção. As HBMECs expressam o CBR1, confirmado em diversos estudos por ensaios como o Western Blot e RT-PCR (LU *et al.*, 2008; HELMS *et al.*, 2016). O caso do CBR2 é um pouco mais complexo. Inicialmente acreditava-se que o CBR2 estava ausente no SNC, limitando-se aos tecidos periféricos. Porém, diferentes anticorpos para CBR2 foram utilizados em análises histológicas de tecido neurológico e tecido de cérebro inflamado, onde os vasos sanguíneos apresentaram coloração positiva para este receptor. Estudos posteriores mostraram a presença do CBR2 especificamente nas HBMECs, porém em quantidades consideravelmente menores em comparação ao CBR1. Nos casos em que as HBMECs apresentaram uma expressão mais elevada de CBR2 era em amostras de pacientes com EM, especialmente nas regiões de ampla infiltração imune e inflamação no cérebro (KHO *et al.*, 2017).

Embora mais estudos sejam necessários para entender a relação do SEC com as HBMECs, a evidência atual indica que, através da modulação de CBRs, é possível regular a permeabilidade das HBMECs. Por exemplo, em um modelo de lesão causada por reperfusão pós-AVC, foi observado que ao utilizar agonistas seletivos do CBR2 é evitada a quebra das proteínas das junções intercelulares nas HBMECs, prevenindo o incremento na permeabilidade que pode levar ao dano neuronal neste tipo de lesões (YANG *et al.*,

2016). Em outros estudos, a ativação do CBR2 levou a uma atenuação na expressão de ICAM-1 por parte das HBMECs. Como mencionado anteriormente, a ICAM-1 promove a adesão de células imunes no endotélio e a sua posterior transmigração (o que pode ser observado na neuroinflamação), pelo que uma diminuição na sua expressão é significativa na prevenção de danos causados pelo extravasamento de células imunitárias no SNC (HAGAN *et al.*, 2022).

1.1.7 Fitocanabinóides

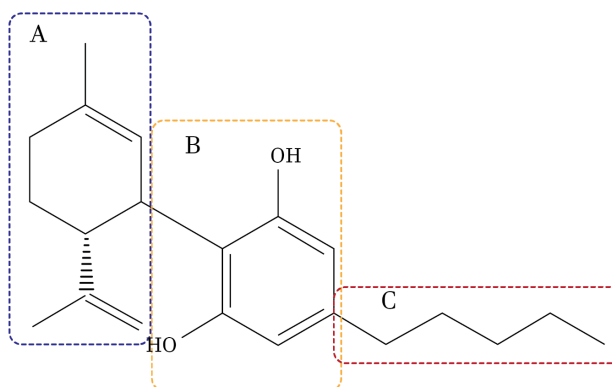
O SEC e seus componentes vêm sendo explorados desde o século passado e, apesar das dificuldades, têm se descoberto a sua grande importância nos processos fisiológicos do organismo. Porém, antes do descobrimento do SEC, o termo “canabinóide” era somente utilizado em um contexto diferente. As primeiras moléculas denominadas “canabinóides” foram isoladas da planta de *Cannabis sativa*, conhecida popularmente como “maconha” no Brasil e “marihuana/marijuana” em outros países.

A planta de *cannabis* tem caminhado junto ao ser humano desde tempos imemoriais. Estima-se que a planta foi um dos primeiros vegetais a ser domesticados, existindo registros genéticos e arqueológicos indicando que a *cannabis* foi domesticada 12.000 anos atrás no Leste Asiático (REN *et al.*, 2021). Tanto na antiguidade quanto na era moderna, a *cannabis* tem sido muito utilizada de maneira medicinal pela sua eficácia em tratar a dor, a ansiedade, as náuseas, doenças infecciosas, a anorexia, transtornos epilépticos, etc. (RUSSO, 2007). No século XX, pesquisas levaram à identificação das principais moléculas com atividade farmacológica presentes na planta: o CBD e o THC, identificados em 1963 e 1964, respectivamente (MECHOULAM & GALVANI, 1963; GAONI & MECHOULAM, 1964). Foi aqui que estas moléculas foram denominadas “canabinóides”, em homenagem à planta produtora destas substâncias.

Depois da identificação dos endocanabinóides e da criação de canabinóides sintéticos, aqueles primeiros canabinóides descritos originalmente na planta de *cannabis* passaram a ser conhecidos como fitocanabinóides. De maneira geral, estas moléculas lipofílicas podem ser definidas quimicamente como monoterpenos contendo um núcleo resorcinol, comumente acompanhado de um grupo isoprenil e uma cadeia lateral contendo um grupo alquila (**Figura 6**) (HANUS *et al.*, 2016). Até hoje foram isolados pelo menos 113 fitocanabinóides diferentes da planta de *cannabis*, classificados dependendo da sua rota de biossíntese (AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). Os fitocanabinóides mais

abundantes na planta, e os mais estudados pelas suas propriedades farmacológicas, são o delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) e o canabidiol (CBD); mas também existem outros com atividade farmacológica de interesse, tais como o canabigerol (CBG), a canabidivarina (CBDV), o canabinol (CBN), etc. (GULCK *et al.*, 2020).

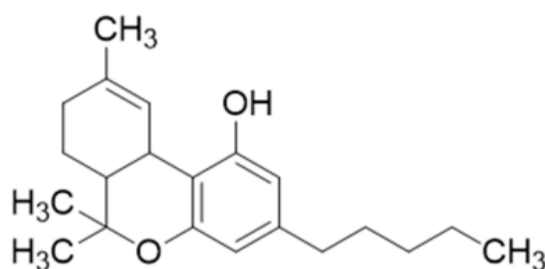
Figura 6. Esquema da estrutura química geral dos fitocanabinóides.



Nota: (A) Grupo isoprenil, (B) núcleo resorcinol, (C) cadeia lateral com grupo alquila.

Fonte: Do autor.

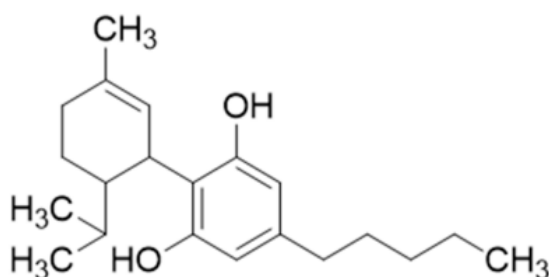
O THC (**Figura 7**) é o principal responsável pelo efeito psicoativo da planta de *cannabis*, atuando, principalmente, como agonista parcial no CBR1. Além disso, a molécula consegue modular o CBR2 e outros receptores, como alguns canais de potencial transitório (TRPs) e receptores de serotonina (5-HT) (MECHOULAM, 2014; MULLER *et al.*, 2019). Os efeitos do THC em neutrófilos são muito similares aos encontrados quando os CBRs das células são estimulados por endocanabinóides. Estudos observaram a capacidade do THC de reduzir a migração de neutrófilos *in vivo*, tanto através de CBRs quanto através da estimulação de receptores diferentes destes (MAKWANA *et al.*, 2015; THAPA *et al.*, 2018). No caso das HBMECs, os efeitos do THC descritos na literatura são, novamente, muito similares aos reportados quando estas células são estimuladas por endocanabinóides: Lu e colaboradores observaram, em um ensaio *in vitro*, que o Δ 9-THC preveniu a diminuição na quantidade de ZO-1, claudina-5 e da JAM-1. Todas estas são proteínas essenciais na estrutura das junções celulares, pelo que o THC foi eficaz em prevenir o incremento da permeabilidade da BHE (LU *et al.*, 2008).

Figura 7. Estrutura molecular do THC.

Fonte: Govindarajan et al, 2023.

O outro fitocanabinóide encontrado em maiores concentrações na planta de *cannabis*, o CBD (**Figura 8**), tem efeitos biológicos tão variados que os cientistas têm se maravilhado com esta molécula desde que começou a ser estudada com maior profundidade. Este interesse surgiu, em parte, pelos variados efeitos farmacológicos observados que vão desde diminuição da ansiedade, das náuseas e da dor, até potentes efeitos antiinflamatórios (MECHOULAM, 2014). Assim como o THC, o CBD também consegue modificar a ação dos neutrófilos. Pesquisas com modelos *in vitro* e *in vivo* reportaram a atenuação da resposta inflamatória dos neutrófilos após serem tratados com CBD (MCHUGH *et al.*, 2008; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2017). De maneira similar, foi observada a diminuição na migração de neutrófilos *in vivo* quando camundongos receberam tratamento com CBD em modelos de lesão pulmonar aguda e hiperalgesia da córnea (RIBEIRO *et al.*, 2012; THAPA *et al.*, 2018). A quantidade de estudos feitos com CBD e seus efeitos nas HBMECs é mais limitada. Hind e colaboradores reportaram que, *in vitro*, o CBD tem a capacidade de prevenir o incremento da permeabilidade das HBMECs em um estado de privação de oxigênio e glicose, que foi usado como modelo de AVC isquêmico. De forma destacada, foi observado que o efeito protetor da BHE do CBD não era por meio de CBRs e sim através dos receptores PPAR γ e 5-HT $1A$, pois o efeito protetor do CBD foi inibido por meio do uso de antagonistas destes receptores. No mesmo estudo, foi observado que o CBD reduz a queda na viabilidade celular das HBMECs causada pela privação de oxigênio e glicose (HIND *et al.*, 2016).

Figura 8. Estrutura molecular do CBD.



Fonte: Govindarajan et al, 2023.

1.1.8 Doença de Alzheimer

Como já foi discutido, os neutrófilos e as HBMECs têm uma interação de grande importância em casos de neuroinflamação; interação que se torna mais prevalente nas doenças neurodegenerativas.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma destas patologias neurodegenerativas e ela é o tipo de demência mais comum em nível mundial. A OMS estima que, atualmente, existem ao redor de 55 milhões de pessoas padecendo de demência mundialmente e a DA é a causa de 70% desses casos (OMS, 2023). A previsão é de que a doença se torne ainda mais prevalente no mundo, pois a estimativa é de que o número de pessoas padecendo da DA seja de mais de 100 milhões no ano de 2050 (BROOKMEYER, 2007). A expectativa de vida das pessoas com DA é reduzida. Após o diagnóstico, a expectativa de vida média das pessoas é de 5,8 anos (LIANG *et al.*, 2021). Pessoas entre 60 e 70 anos têm, em média, uma expectativa de 7 a 10 anos mais de vida; isto se reduz a somente três anos quando se trata de pessoas com mais de 90 anos (ZANETTI *et al.*, 2009).

Clinicamente, a DA é caracterizada pela perda de memória progressiva, o declínio cognitivo e comprometimento na expressão da fala e no processamento visuoespacial. Esta doença é um processo progressivo, irreversível e, até hoje, não há tratamentos que curem a doença e poucos têm sido efetivos para desacelerar a progressão dela (o donanemab e lecanemab) (KNOPMAN *et al.*, 2021; SEEGERT, 2025). A severidade da deficiência cognitiva na DA varia dependendo do estágio da doença. Considera-se que a pessoa com DA chegou no estágio de demência quando o declínio cognitivo é de suficiente magnitude para prejudicar a independência e comprometer a vida diária do paciente. A demência de progressão gradual e o avanço de sintomas amnésicos compõem o quadro clínico prototípico da DA (MCKHANN *et al.*, 2011).

Atualmente não existe cura para a DA; os tratamentos disponíveis são somente de caráter paliativo e oferecem um pequeno alívio dos sintomas. O tratamento da DA é categorizado em farmacológico, psicossocial e de cuidados paliativos (BREIJYEH *et al.*, 2020). Entre os fármacos comumente utilizados encontram-se os inibidores de colinesterase (rivastigmina, donepezil, galantamina) para pacientes em qualquer estágio da doença e a memantina, um antagonista do receptor NMDA, para casos de demência moderada a avançada. Porém, essas drogas melhoram a qualidade de vida dos pacientes quando prescritas no momento adequado (BOTCHWAY *et al.*, 2018). Em 2021 a FDA aprovou o aducanumab, o primeiro anticorpo monoclonal anti- β A, e em anos posteriores foram aprovados mais dois tratamentos similares, o donanemab e lecanemab. Como muitos anticorpos monoclonais, estes tratamentos têm um custo elevado e existem questionamentos no meio científico sobre o custo benefício entre eficácia e segurança dos mesmos (CONTI FILHO *et al.*, 2023).

Entre as principais características neuropatológicas da DA podem ser destacadas a formação de placas compostas por depósitos da proteína β -amilóide (β A), o acúmulo anormal da proteína tau hiperfosforilada no soma neuronal e um quadro de neuroinflamação crônica; tudo isto contribuindo na disfunção sináptica e na perda neuronal (QUERFURTH *et al.*, 2010).

Estudos têm analisado o papel da neuroinflamação crônica na patologia da DA e como esse quadro é essencial no desenvolvimento da doença (HENEKA *et al.*, 2015). A ativação da microglia antecede a perda neuronal na DA e se dá, especialmente, na presença das placas de β A e das fibras de proteína tau hiperfosforilada. Nesta resposta, a microglia libera diversas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que recrutam leucócitos até o cérebro, o que, como mencionado anteriormente, acaba potencializando o quadro neuroinflamatório já estabelecido (HEPPNER *et al.*, 2015).

A migração de leucócitos no contexto da DA não tem sido investigada em detalhe, porém estudos confirmaram a presença de células do sistema imune inato e adaptativo no cérebro de pessoas sofrendo da doença (ZENARO *et al.*, 2017; PIETRONIGRO *et al.*, 2016). O que não fica claro é se a chegada de leucócitos no cérebro tem uma ação positiva ou negativa em modelos de DA; é possível que a resposta se encontra no tipo de célula e no estágio da doença em que elas migram para o parênquima cerebral (ZENARO *et al.*, 2017; PIETRONIGRO *et al.*, 2016).

Neutrófilos são uma das células imunitárias que foram encontradas em grandes quantidades no cérebro de pacientes com DA e, surpreendentemente, as concentrações

de neutrófilos no sistema vascular do cérebro são similarmente elevadas (BAIK *et al.*, 2014; ZENARO *et al.*, 2015). Neste contexto, tem sido descrito que existe uma hiperativação destas células em pacientes com DA (DONG *et al.*, 2018), e tem sido observado que os neutrófilos são particularmente atraídos pelas regiões do cérebro com maiores concentrações de β A (BAIK *et al.*, 2014). Em outro estudo, foi observado que os neutrófilos liberam NETs na presença das placas de β A e que, por meio das proteínas liberadas na NET, são capazes de clivar estes acúmulos de β A. O que pode parecer um ótimo mecanismo de “limpeza” destes acúmulos, acaba tendo o efeito contrário, pois induzem a fragmentação da β A na sua forma fibrilar, o que leva à liberação da forma oligomérica da proteína, que é altamente tóxica e contribui com um agravamento do quadro neurodegenerativo (AZEVEDO *et al.*, 2012).

Em um estudo com modelo animal da DA, foi observado que o extravasamento dos neutrófilos para o parênquima cerebral era mediado pela integrina LFA-1. Ao utilizar camundongos deficientes da integrina LFA-1, foi observada uma redução dos sintomas de neuropatologia e foi observada uma melhora nas funções de memória dos camundongos, o que sugere que os neutrófilos desempenham um papel fundamental na patogênese da DA (ZENARO *et al.*, 2015). Como discutido anteriormente, a BHE é uma das estruturas que se vê danificada na DA e grande parte dessa deterioração é devido à ação inflamatória dos neutrófilos, tanto pela liberação de citocinas e quimiocinas que promovem o quadro inflamatório, quanto pela ação das NETs liberadas na BHE.

Já em pacientes humanos, existe um único relato de caso onde um paciente com DA em estágios avançados foi tratado com a enzima desoxirribonuclease I (DNase I); esta enzima tem a capacidade de clivar DNA, tanto humano quanto microbiano, assim como DNA extracelular. O paciente teve uma melhora rápida e significativa dos sintomas presentes nestes estágios da doença; este se encontrava em um estado terminal e, durante o tratamento, apresentou melhoras na função cognitiva e comportamental, incluindo a capacidade de caminhar e realizar tarefas diárias com independência quase absoluta (TETZ *et al.*, 2016). Estes resultados se mostram interessantes ao considerar a presença das NETs e o papel que desempenham na DA, pois um elemento essencial na estrutura destes complexos é o DNA extracelular que contém as proteases e demais componentes das NETs.

Em relação ao cfDNA na DA, diversas pesquisas têm explorado seu potencial como biomarcador para diagnóstico e monitoramento da doença. Em um estudo de 2023, os autores analisaram os níveis sanguíneos de cfDNA em pessoas com DA e

encontraram que os pacientes apresentaram maiores quantidades de cfDNA quando comparado com controles (POLLARD *et al.*, 2023). Em outro estudo, foi relatado que pessoas idosas com concentrações elevadas de cfDNA genômico no sangue possuíam um maior risco de desenvolver demência (NIDADAVOLU *et al.*, 2022), sugerindo que o cfDNA pode estar associado a parâmetros relevantes da DA. Porém, baseado na literatura disponível, não existem relatos de associações diretas entre o cfDNA (no sangue ou no LCR) e biomarcadores clássicos da DA, como a β A42 e a proteína tau hiperfosforilada.

Considerando a importância que a BHE tem na patologia da doença, ela não tem sido muito explorada como alvo farmacológico no tratamento da DA. Estudos feitos com o resveratrol reportaram que foi capaz de proteger a integridade da BHE através da ativação da SIRT-1 (proteína capaz de inibir o declínio cognitivo associado à idade em modelos animais) e da redução do estresse oxidativo (LIN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2016). Porém, em ensaios clínicos de fase 2 em pacientes com DA, foi observada uma redução no volume cerebral, pelo que os autores sugeriram uma falta de benefícios (TURNER *et al.*, 2015).

A *cannabis* e seus componentes têm sido estudados pelo potencial terapêutico para tratar a DA. Devido à sua atividade neuroprotetora, anti-inflamatória e antioxidante *in vitro*, o CBD tem sido pesquisado como uma opção multifuncional para o tratamento da DA (WATT *et al.*, 2017; MELLO-HORTEGA *et al.*, 2025; WU *et al.*, 2025). Em estudos com modelos animais da DA, o CBD foi capaz de atenuar a neuroinflamação induzida pela proteína β A ao reduzir a expressão de genes e mediadores pró-inflamatórios (ESPOSITO *et al.*, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2011). De maneira interessante, em estudos onde o tratamento foi feito com CBD em conjunto ao THC, foram observados melhores resultados que quando se utiliza qualquer fitocanabinóide isoladamente (WATT *et al.*, 2017).

A capacidade da *cannabis* e/ou canabinóides para tratar a DA em ensaios clínicos não tem sido muito registrada, porém, existem estudos com resultados promissores. Em um relato de caso, nosso grupo tratou um paciente de DA em estágios leves com um extrato de *cannabis* contendo THC:CBD na proporção 8:1 durante 22 meses. O paciente teve uma melhora significativa nos sintomas relacionados à DA, mostrando como a terapia com canabinóides têm potencial no tratamento da DA (RIVER-MARTINS *et al.*, 2022). Além disso, em um ensaio clínico randomizado com grupo placebo, confirmamos

que a *cannabis*, em baixas doses, é efetiva para prevenir o avanço do declínio cognitivo verificado pelo mini-exame do estado mental (MEEM) (CURY *et al.*, 2025).

1.2 Justificativa

A BHE é uma estrutura essencial para a regulação do SNC, e sua degradação ocorre em diversas patologias neurodegenerativas, como a DA. Evidências indicam que a DA está associada à disfunção vascular (BARISANO et al., 2022) e que os neutrófilos podem danificar as células endoteliais da BHE por meio de seus mecanismos de ação, incluindo a liberação de NETs. Diante do possível envolvimento das NETs na DA, torna-se relevante investigar seus componentes como potenciais biomarcadores da doença, tanto para diagnóstico quanto para monitoramento. Nesse contexto, o cfDNA surge como um marcador de fácil quantificação por biópsias líquidas, podendo indicar a presença de NETs em fluidos biológicos.

Devido à sua natureza progressiva e irreversível, indivíduos com DA vivem, em média, até seis anos após o diagnóstico, tornando-se progressivamente dependentes de cuidadores em razão do declínio cognitivo acelerado (LIANG et al., 2021). Além disso, estima-se que, até 2050, mais de 100 milhões de pessoas viverão com a doença, mais do que o dobro do número atual.

Os fitocanabinóides são moléculas farmacologicamente ativas derivadas da *cannabis*, com ampla gama de propriedades terapêuticas, incluindo potente ação anti-inflamatória. Estudos demonstram que esses compostos podem modular a atividade dos neutrófilos, reduzindo sua migração e resposta inflamatória, bem como reforçar a integridade da BHE. Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliem simultaneamente seus efeitos sobre neutrófilos e células endoteliais cerebrais.

Assim, compreender o efeito dos fitocanabinóides nos neutrófilos e nas células do endotélio cerebral, assim como nas concentrações de cfDNA em pacientes com a doença, pode ampliar o entendimento dos mecanismos envolvidos e contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para neuropatologias marcadas pela neuroinflamação, como a DA.

1.3 Pergunta Norteadora

Os fitocanabinóides são capazes de modular a liberação de NETs e a viabilidade de HBMECs *in vitro* e, paralelamente, os níveis basais de cfDNA no LCR e plasma de pacientes com DA correlacionam-se com parâmetros clínico-biológicos da doença?

1.4 Hipótese

Os fitocanabinóides são capazes de modular a liberação de NETs por neutrófilos, apresentar segurança em estudos com células endoteliais cerebrais humanas (HBMECs) e reduzir a concentração de marcadores associados às NETs, como o cfDNA, em pacientes com DA.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o efeito de fitocanabinóides nas funções de HBMECs, na liberação de NETs por parte dos neutrófilos e nas concentrações de cfDNA em amostras de pacientes com DA.

2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos dos fitocanabinóides na viabilidade celular de neutrófilos e HBMECs;
- Estudar a capacidade dos fitocanabinóides para estimular a migração das HBMECs;
- Avaliar o efeito modulador de fitocanabinóides sobre a liberação de NETs;
- Verificar a presença de citocinas e cfDNA em amostras de plasma e LCR de pacientes com DA;
- Analisar a relação dos marcadores de cfDNA achados em amostras de LCR e plasma de pacientes com DA com marcadores clássicos e inflamatórios da doença, assim como com aspectos clínicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extratos de fitocanabinóides

Os fármacos utilizados no projeto incluem CBD isolado (FarmaUSA, 200 mg/ml), CBD *broad spectrum* (EVONA, 200 mg/ml) e Δ 9-THC isolado (Laboratório Reaja). Na terminologia de extratos da planta de *cannabis*, aqueles chamados de *broad spectrum* são aqueles extratos que contém um fitocanabinóide principal, em maiores concentrações, outros fitocanabinóides em quantidades mínimas e, finalmente, outros compostos não-cannabinóides que estão também presentes na planta, como por exemplo flavonóides e terpenos. É importante detalhar que estes extratos não contém THC.

Devido à natureza lipofílica dos fitocanabinóides, quando é realizada a extração dos mesmos da planta de *cannabis*, geralmente é utilizada uma solução gordurosa para conseguir extrair os compostos e criar uma solução corretamente diluída. No caso do extrato de CBD isolado, o veículo de diluição em que o composto vinha era óleo de milho e no caso do CBD *broad spectrum* o veículo era o MCT. O THC isolado foi obtido em forma cristalizada, pelo que ele não tinha um veículo e foi reconstituído utilizando DMSO e meio de cultivo diretamente. Os extratos de CBD também foram diluídos em DMSO até atingir as concentrações a serem utilizadas nos cultivos celulares.

Brevemente, para a diluição dos tratamentos foram colocados 10 μ l de extrato (CBD isolado, CBD *broad spectrum* e THC isolado) em 90 μ l de DMSO. Foram feitas diluições subsequentes até atingir as concentrações desejadas de cannabinóides e uma porcentagem de DMSO adequada.

3.2 Amostras de plasma e LCR de pacientes com DA

As amostras de plasma e de LCR utilizadas neste projeto foram obtidas de pacientes com DA que participaram nos estudos clínicos já finalizados MICA-AD (CAAE 09713219.9.0000.0107) e no DAZACANN (CAAE: 60167722.6.0000.0107), onde estas coletas faziam parte das análises de cada estudo. As amostras de plasma e LCR foram coletadas e armazenadas a -80°C no início do estudo e 6 e 12 meses posteriores ao início do tratamento no caso do MICA-AD, e no início e após 6 meses no caso do DAZACANN.

3.3 Cultivos celulares

3.3.1 HBMECs

As células HBMECs foram gentilmente doadas pela Professora Luciana Barros de Arruda do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina e mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.3.2 Neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos de doadores saudáveis a partir de centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque. Seguido da centrifugação, as células foram aspiradas da monocamada que encontra-se associada a eritrócitos. Em seguida, os eritrócitos residuais associados aos neutrófilos foram lisados utilizando solução de lise hipotônica (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA) durante 5 minutos a 25°C.

3.4 Estimulação de neutrófilos para produção de NETs

Após a obtenção dos neutrófilos de indivíduos saudáveis, as células foram distribuídas em placas de 48 poços (2 x 10⁶ células por poço), e incubadas em RPMI 1640 sem soro e com lisado de promastigotas de *Leishmania amazonensis* (150 µg/mL de proteína, quantificado com Nanodrop. O lisado foi obtido a partir de ciclos de congelamento e descongelamento do parasita) durante três horas (37°C, 5% CO₂). Em seguida, os sobrenadantes ricos em NETs foram colhidos e centrifugados a 400xg durante 10 minutos, para eliminar células e debris, e estas amostras foram mantidas a -80°C até o momento do uso.

Para avaliar os efeitos dos canabinóides sobre a produção de NETs, os neutrófilos de pessoas saudáveis foram pré-incubados durante 30 minutos com CBD (0,1; 1 e 10 µg/ml). Logo após, as células foram tratadas com PMA (100 nM) durante três horas. A liberação de NETs foi quantificada nos sobrenadantes com PicoGreen conforme as instruções do fabricante.

Neutrófilos foram isolados de amostras de sangue de pacientes com DA, como descrito no ponto 3.3.2. Uma vez isolados, os neutrófilos foram pré-tratados com THC isolado (10 µg/ml) durante 30 minutos e em seguida estimulados com 100 nM de PMA

durante três horas, para induzir a liberação de NETs. A liberação de NETs foi quantificada nos sobrenadantes com PicoGreen conforme as instruções do fabricante.

3.5 Microscopia de fluorescência

Uma vez isolados, os neutrófilos (2×10^5 células por poço) foram aderidos em lamínulas de vidro revestidas com 0,01% de poli-L-lisina distribuídos em placas de 48 poços e incubados com meio RPMI 1640, sem soro e com o lisado de *Leishmania amazonensis* (150 µg/mL de proteína quantificados com Nanodrop) durante três horas a 37°C e 5% CO₂. As amostras foram então fixadas com paraformaldeído (4%) durante 30 minutos e lavadas com PBS 1X. As amostras foram montadas com *Prolong antifade* contendo DAPI (*Life Technologies*) e analisadas em microscópio de fluorescência.

3.6 Ensaios de viabilidade celular

3.6.1 Ensaio do MTT

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o ensaio do MTT, que determina a atividade metabólica das células por meio da atividade de enzimas mitocondriais oxidoredutases dependentes de NADPH. As células HBMECs foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 1×10^4 células por poço. Após 24 horas, as células foram tratadas por mais 24 horas com os fitocanabinóides nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 µg/ml (aproximadamente 3, 32, 95 e 159 µM, respectivamente). Para o THC isolado, foi avaliada também a concentração adicional de 100 µg/mL (aproximadamente 318 µM). Passado o tempo de tratamento com os extratos, foram colocados 0,5 mg de MTT em cada poço e as placas foram incubadas por três horas. Após esse tempo, o MTT foi removido e foram colocados 100 µl de DMSO em cada poço. Imediatamente, a placa foi analisada em uma leitora de microplacas com a detecção de absorbância em 570 nm. Adicionalmente, foram utilizados DMSO e os veículos encontrados nos extratos (MCT e óleo de milho) como controles.

Os neutrófilos foram semeados em placas de 96 poços em uma concentração de 1×10^5 células por poço. Após 30 minutos, as células foram tratadas com 1 e 10 µg/ml de CBD e 10 µg/ml de THC, por mais 30 minutos. Passado o tempo de tratamento, foram colocados 0,5 mg de MTT em cada poço e as placas foram incubadas por três horas. Após esse tempo, o MTT foi removido e foram colocados 100 µl de DMSO em cada poço.

Imediatamente, a placa foi analisada em uma leitora de microplacas com a detecção de absorvância em 570 nm.

3.6.2 Ensaio de LDH

As células HBMECs foram semeadas e tratadas nas mesmas condições do ensaio de MTT, com a adição da concentração de 100 µg/ml de CBD isolado e THC isolado. Passado o tempo de tratamento com os extratos, foram retirados 50 µl do sobrenadante de cada poço e colocados em uma nova placa onde, posteriormente, foram adicionados 50 µl do reagente Cytotox 96 Reagent™ (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega). Após 30 minutos, foram adicionados 50 µl da stop solution e a placa foi analisada com absorvância de 492 nm na leitora de placas. Para o controle positivo, foi adicionada a solução de lise inclusa no kit para ocasionar morte celular; a leitura de absorvância desses poços foi determinada como correspondente ao 100% de liberação de LDH.

Para os ensaios de viabilidade celular utilizando inibidores dos receptores canabinoides, as células foram preparadas como descrito no parágrafo anterior. Antes do tratamento com fitocannabinóides, as células foram incubadas com 5 µM de AM281 (inibidor do receptor CB1, Sigma-Aldrich A0980) e 5 µM de AM630 (inibidor do receptor CB2, Sigma-Aldrich SML0327), ou com 5 µM de cada um, durante 30 minutos. Posteriormente, as células foram tratadas com 80 µg/ml de THC ou CBD durante oito horas. Passado o tempo de tratamento com os extratos, a viabilidade dos cultivos foi avaliada por LDH como descrito anteriormente.

3.7 Wound healing assay

As HBMECs foram semeadas em placas de 24 poços, em concentrações de $2,5 \times 10^5$ células por poço. Uma vez que o cultivo atingiu 90-95% de confluência, foi feita uma cicatriz na monocamada de células utilizando uma ponteira plástica estéril de 10 µl. Seguidamente, cada poço foi tratado com THC na concentração de 10 µg/ml e imediatamente fotografado usando microscópio invertido. Os poços tratados foram fotografados novamente após 15 horas de tratamento para registrar o efeito do THC nas HBMECs quando existe uma lesão na monocamada celular. Posteriormente, as imagens foram analisadas usando o *software Fiji ImageJ*©.

3.8 Quantificação de citocinas em amostras de LCR e plasma

Para analisar o efeito que o tratamento com extrato de *cannabis* teve nos pacientes com DA, foram utilizadas amostras de LCR do início do estudo e após seis meses de tratamento. Foram quantificadas as citocinas IL-8, IL-33 e a proteína BDNF utilizando kits comerciais de ELISA (*ELK Biotechnology*), seguindo as instruções do fabricante. Foram colocados 100 µl de LCR por poço e incubados por 80 minutos a 37°C. Passado o tempo, o líquido foi removido e cada poço foi lavado três vezes com 200 µl do Wash Buffer incluso no kit; seguidamente foram adicionados 100 µl do antígeno biotilado e a placa foi incubada por mais 50 minutos a 37°C. Novamente, a placa foi lavada cinco vezes com o Wash Buffer e foram adicionados 90 µl da solução TMB. A placa foi incubada por 20 minutos a 37°C sob proteção da luz e, em seguida, adicionaram-se 50 µl da solução Stop em cada poço e a placa foi agitada durante um minuto. Finalmente, a placa foi analisada em uma leitora de microplacas com a absorbância em 450 nm.

3.9 Quantificação de cfDNA em amostras de LCR e plasma

Para quantificar DNA extracelular nas amostras de biofluidos dos pacientes com DA, as amostras foram analisadas utilizando o kit Quant-iT™ *PicoGreen*® *dsDNA Assay* (*Invitrogen*), conforme as orientações do fabricante. Brevemente, foram utilizados 100 µl de cada amostra, tanto de plasma quanto de LCR; este volume foi colocado em uma placa negra de 96 poços com fundo transparente (*Greiner Bio-One*) e lhe foram adicionados 100 µl do *PicoGreen*®. Seguindo as instruções do fabricante para o ensaio, foi preparada uma curva de referência com DNA nas concentrações de 1000, 500, 100, 25, 10, 5 e 1 ng/ml. Após 5 minutos de incubação a 25°C, a placa foi analisada em fluorímetro com comprimento de onda de excitação de 480 nm e 520 nm de emissão.

Para uso nas análises relacionadas à cognição, foi utilizada a pontuação dos pacientes no questionário MEEM. Baseado nestas pontuações, foram realizadas diferentes estratificações dos pacientes com DA. A severidade do comprometimento cognitivo foi determinada da seguinte forma: pontuação <10 foi considerada como indicativo de comprometimento severo, pontuações 10-20 foram consideradas como comprometimento moderado e, finalmente, pacientes com pontuação >20 foram considerados como tendo comprometimento leve. No caso das análises relacionadas à

velocidade da progressão da doença, consideramos pacientes com progressão rápida aqueles que tiveram uma piora de no mínimo quatro pontos no MEEM em seis meses (SOTO *et al.*, 2008). Pacientes que tiveram uma redução na pontuação do MEEM de ≤ 3 em seis meses, foram considerados como sendo de progressão lenta.

3.10 Análise estatística

Todo dado obtido foi avaliado com testes de normalidade. Posteriormente, foram realizados testes estatísticos como descritos nas legendas de cada figura de resultado. Para realizar as análises e gerar os gráficos, foram utilizados os *softwares Prism 8* (GraphPad Software, USA) e *R* versão 4.5.1. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

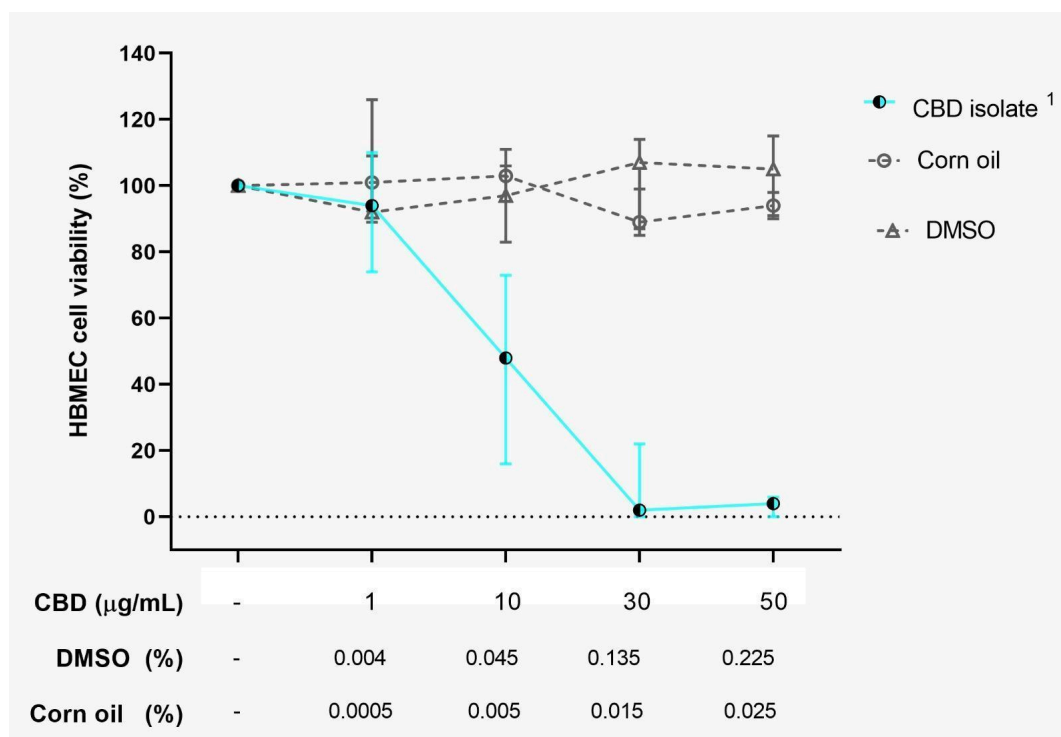
4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade HBMECs incubadas com fitocanabinóides

Para avaliar o efeito dos fitocanabinóides na viabilidade das HBMECs, as células foram incubadas com diferentes concentrações de CBD (isolado e *broad spectrum*) e THC isolado 24h e posteriormente incubadas com MTT durante três horas. No caso do extrato de CBD isolado ($IC_{50} = 9 \mu\text{g/ml}$), a menor concentração, de $1 \mu\text{g/ml}$, não afetou a viabilidade das células, enquanto a concentração de $10 \mu\text{g/ml}$ reduziu a viabilidade em quase 50%. Já as concentrações de 30 e $50 \mu\text{g/ml}$ levaram a uma queda significativa da viabilidade das HBMECs, com uma redução de quase 100% (**Figura 9**).

O CBD isolado utilizado nos ensaios trata-se de uma solução oleosa contendo óleo de milho como o veículo. Para verificar o possível efeito deste veículo na viabilidade celular, as HBMECs foram incubadas com óleo de milho nas concentrações equivalentes a aquelas presentes no tratamento com CBD. Como pode ser observado, nenhuma das concentrações do veículo afetaram a viabilidade celular. De forma adicional, como indicado nos métodos, os extratos de fitocanabinóides foram diluídos em DMSO. Por isso, também foi avaliado o efeito desta substância na viabilidade celular das HBMECs. Como mostrado na figura 9, o DMSO não alterou a viabilidade das células nas condições experimentais, indicando que as mudanças na viabilidade das HBMECs é devido ao CBD contido no extrato.

Figura 9. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD isolado.



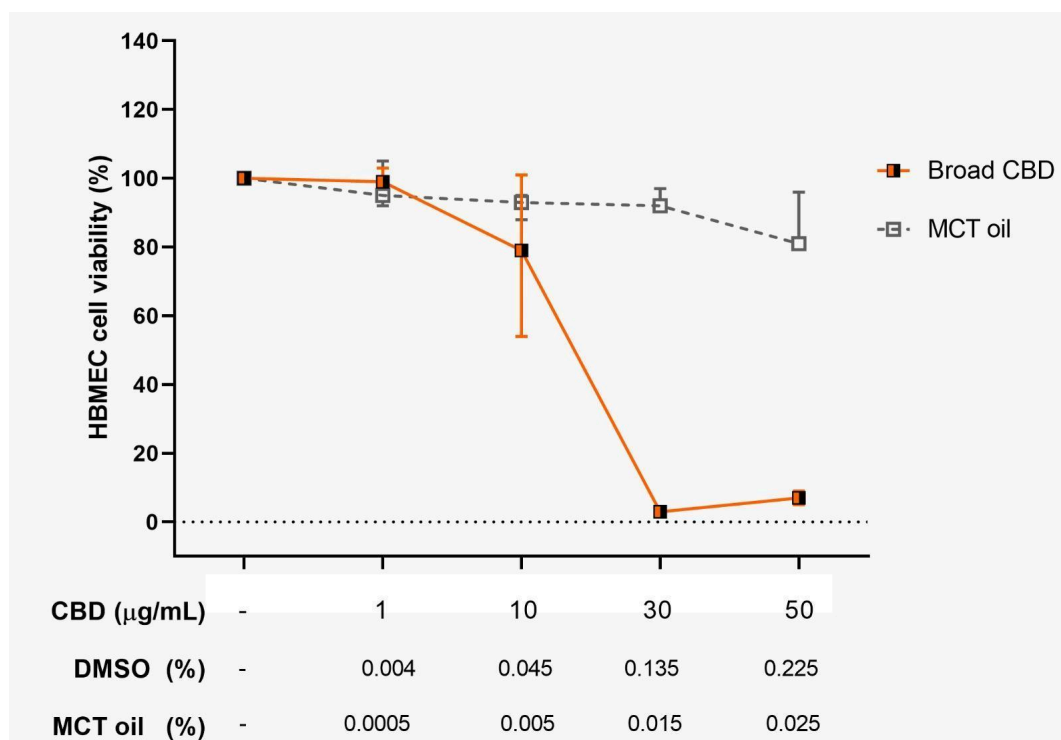
Nota: As células foram incubadas com diferentes concentrações de CBD durante 24h e a viabilidade foi verificada pelo ensaio de MTT, como descrito nos métodos. Porcentagem do veículo e de DMSO para cada concentração presente na figura. Foi utilizado um ANOVA de efeitos mistos. n=5.

Fonte: Do autor.

Foi testado um extrato de CBD *broad spectrum*, para avaliar se a presença de outros componentes não-cannabinóides presentes na planta poderiam modular o resultado obtido com o extrato do CBD isolado. Foi observado que, nas duas menores concentrações, a viabilidade das HBMECs não foi modificada significativamente. Similar ao resultado com o CBD isolado, as duas maiores concentrações reduziram a viabilidade em quase 100% (**Figura 10**) ($IC_{50} = 13,7 \mu\text{g/ml}$). As concentrações de DMSO são iguais às da **Figura 9** e, de maneira similar, não tiveram um efeito significativo na viabilidade das HBMECs quando tratadas com o CBD *broad spectrum*.

Similar ao realizado com o extrato de CBD isolado, foi avaliado o efeito do veículo (MCT) presente no extrato de CBD *broad spectrum*. Como pode ser apreciado na figura 10, o MCT não alterou a viabilidade das células nas condições experimentais, indicando assim que as mudanças observadas na viabilidade das HBMECs nestes experimentos foram devido ao fitocanabinóide.

Figura 10. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD *broad spectrum*.

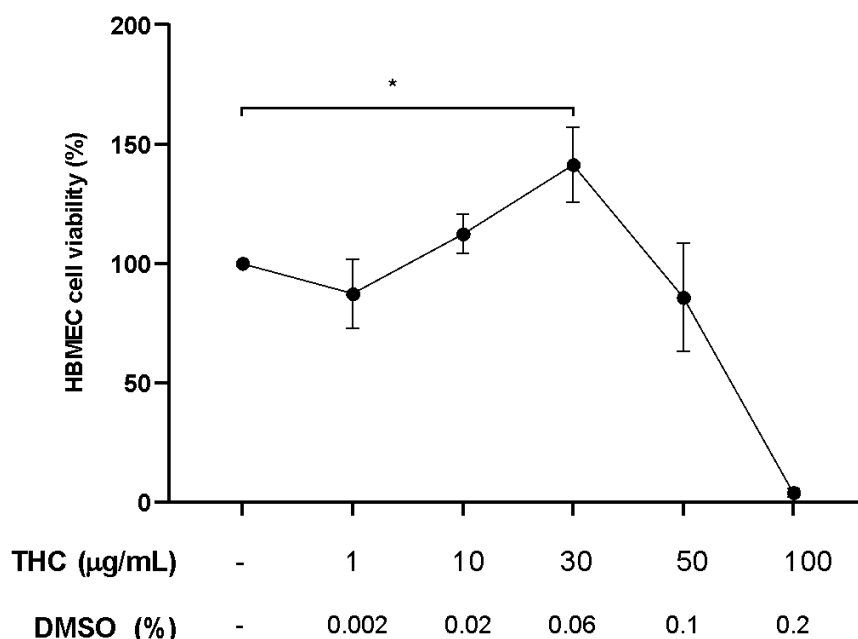


Nota: As células foram incubadas com diferentes concentrações de CBD *broad spectrum* durante 24h e a viabilidade foi verificada pelo ensaio de MTT, como descrito nos métodos. Porcentagem do veículo e de DMSO para cada concentração presente na figura. Foi utilizado um ANOVA de efeitos mistos. n=3.

Fonte: Do autor.

Ao avaliar o efeito do THC isolado nas HBMECs ($IC_{50} = 55 \mu\text{g/ml}$), o ensaio mostrou que, na menor concentração, a viabilidade não foi significativamente afetada. Interessantemente, na concentração de $30 \mu\text{g/ml}$ foi observado um incremento da atividade da enzima mitocondrial oxiredutase dependente de NADPH, sugerindo um possível aumento na proliferação destas células quando incubadas nestas condições experimentais. Na concentração de $50 \mu\text{g/ml}$ a viabilidade não foi afetada e, em uma concentração adicional de $100 \mu\text{g/ml}$, foi observada uma redução completa da viabilidade (**Figura 11**).

Figura 11. Viabilidade celular de HBMECs expostas a THC isolado.

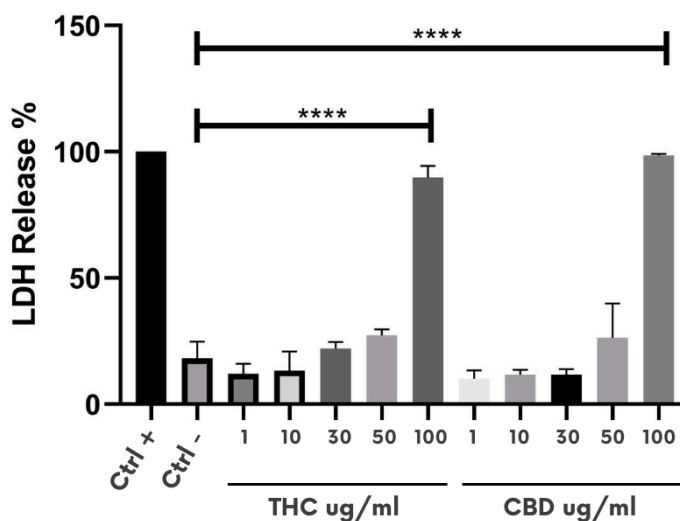


Nota: As células foram incubadas com diferentes concentrações de THC isolado durante 24h e a viabilidade foi verificada pelo ensaio de MTT, como descrito nos métodos. Porcentagem de DMSO para cada concentração presente na figura. Foi utilizado um ANOVA de efeitos mistos. (* = $p < 0,05$). $n=5$.

Fonte: Do autor.

O ensaio do MTT é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular, porém, a nível molecular, o que este ensaio realmente está analisando é a atividade das enzimas desidrogenases, geralmente mais abundantes nas mitocôndrias e que pode refletir a viabilidade das células (para a maioria das células isto é relacionado à viabilidade delas) (VAN MEERLOO, 2011). Com o objetivo de compreender melhor o efeito dos fitocanabinóides na viabilidade das HBMECs, foi realizado o ensaio de quantificação de LDH quando estas células são expostas a CBD e THC. Como pode ser observado na **Figura 12**, o efeito do THC isolado e do CBD isolado foi similar ao obtido nos ensaios do MTT. Na maior concentração (100 µg/ml) a liberação de LDH ao meio extracelular foi muito mais elevada, indicando uma maior taxa de morte celular.

Figura 12. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD isolado e THC isolado, analisado pelo ensaio de LDH.



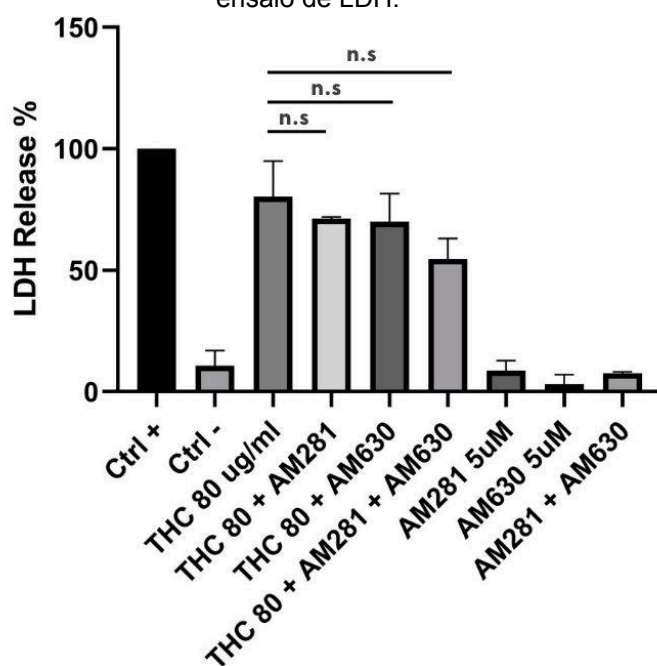
Nota: As células foram incubadas com diferentes concentrações de CBD (FarmaUSA) ou THC isolados durante 8h e a viabilidade foi verificada pelo ensaio de LDH, como descrito nos métodos. Foi utilizado um ANOVA de duas vias com teste post hoc de Tukey. (**** = $p < 0,0001$). $n=3$.

Fonte: Do autor.

4.2 Papel dos receptores CB1 e CB2 no efeito citotóxico dos fitocannabinóides nas HBMECs

Considerando os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, prosseguiu-se a avaliar se os receptores CB1 e CB2 estão envolvidos no efeito citotóxico dos fitocannabinóides utilizados. Na concentração de 80 µg/ml, o THC isolado levou a uma elevada taxa de morte celular, comparável com o controle positivo. A presença dos antagonistas não levou a uma mudança significativa na morte celular das HBMECs (**Figura 13**). Quando as HBMECs foram tratadas com CBD na concentração de 80 µg/ml, a presença dos antagonistas também não preservou a viabilidade celular em presença deste fitocannabinóide (**Figura 14**). De maneira importante, também observamos que os antagonistas, nas concentrações de 5 µM, não tiveram um efeito citotóxico significativo nas células, tanto individualmente quanto em combinação.

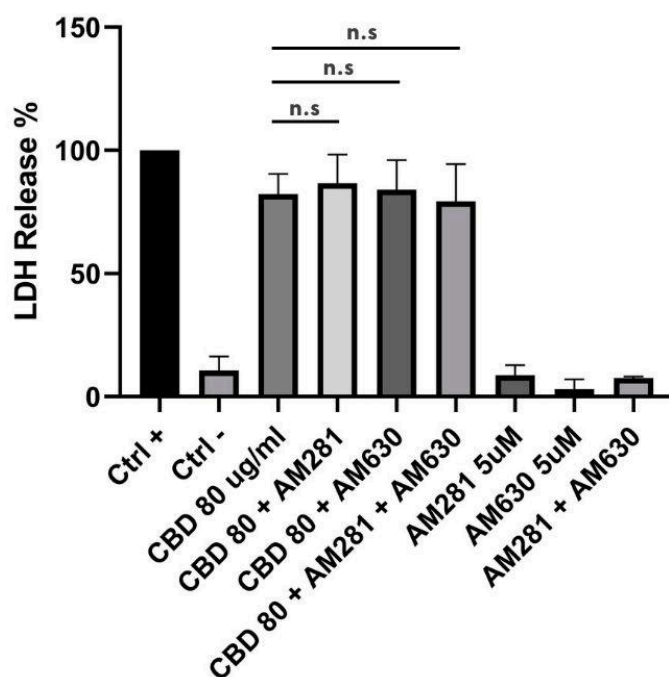
Figura 13. Viabilidade celular de HBMECs expostas a THC isolado e inibidores, analisado pelo ensaio de LDH.



Nota: As células foram pré-incubadas durante 30 minutos com os inibidores AM281 e AM630. Logo, foram tratadas com THC isolado durante 8h e a viabilidade foi verificada pelo ensaio de LDH, como descrito nos métodos. Foi realizado um teste ANOVA de efeitos mistos. (n.s = não significativo). n=3.

Fonte: Do autor.

Figura 14. Viabilidade celular de HBMECs expostas a CBD isolado e inibidores, analisado pelo ensaio de LDH.



Nota: As células foram pré-incubadas durante 30 minutos com os inibidores AM281 e AM630. Logo, foram tratadas com CBD isolado (FarmaUSA) durante 8h e a viabilidade foi verificada pelo ensaio de LDH, como descrito nos métodos. (n.s = não significativo). n=3.

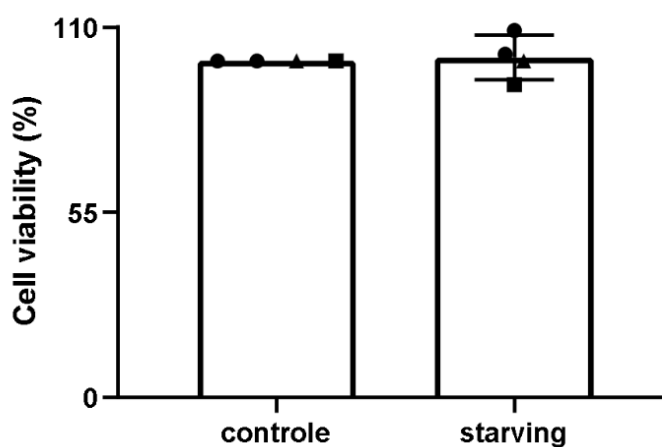
Fonte: Do autor.

4.3 O THC não modula a migração das HBMECs

No *healing assay*, é possível avaliar a capacidade de uma monocamada celular de fechar uma ferida feita artificialmente no cultivo. Para verificar se o preenchimento da área lesionada ocorre predominantemente por causa da migração celular, a estratégia padrão é a de incubar as células com meio de cultivo sem SFB, já que sem os nutrientes encontrados no soro as células não são capazes de entrar em divisão celular (JONKMAN *et al.*, 2014). Assim, sem possibilidade de proliferar, as células conseguiriam fechar a ferida apenas por meio da migração celular.

Para analisar o efeito do meio sem SFB nas HBMECs, foi feito um teste de viabilidade celular. Na **Figura 15** é mostrado que, após 24 horas, o meio sem SFB (*starving*) não causa mudanças na viabilidade das HBMECs, indicando que é possível realizar o *healing assay* com o meio sem SFB e obter um resultado que poderia ser indicativo de migração celular.

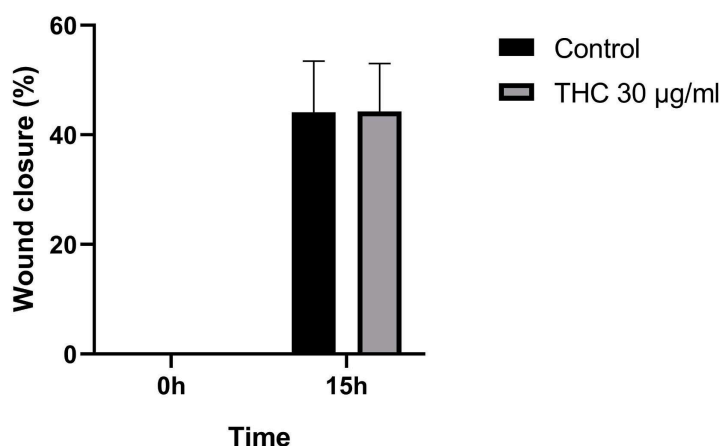
Figura 15. Viabilidade celular de HBMECs incubadas com meio sem SFB.



Fonte: Do autor.

Uma vez testada a capacidade das HBMECs de crescer sob a ausência das quantidades normais de SFB, prosseguiu-se a testar os efeitos do THC isolado na capacidade migratória das células. Como pode ser observado na **Figura 16**, após 15 horas de tratamento, o THC na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$ não foi capaz de induzir uma diferença na capacidade de cicatrização de feridas das HBMECs quando comparado com células sem tratamento.

Figura 16. Efeito do THC isolado sob a capacidade de wound healing das HBMECs.



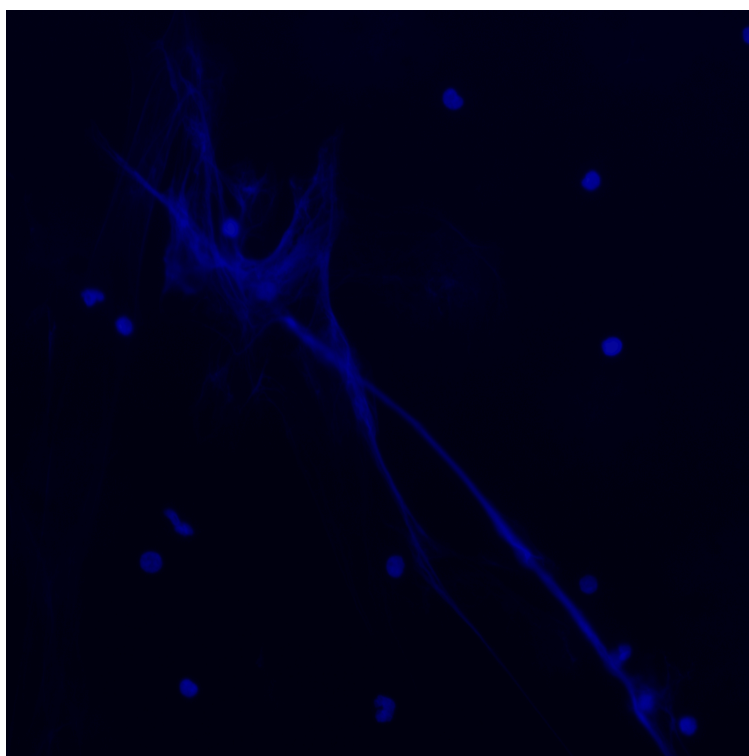
Nota: Dados expressos como porcentagem da área da ferida fechada pelas células; por isso, no tempo 0h a porcentagem é 0. n=3.

Fonte: Do autor.

4.4 Indução de NETs

Com o objetivo de padronizar o protocolo de obtenção de NETs, neutrófilos foram estimulados com um lisado de *Leishmania amazonensis*, como descrito nos Materiais e Métodos, e as amostras foram fixadas, marcadas com DAPI e visualizadas por meio de microscopia de fluorescência. Na **Figura 17**, podem ser observados neutrófilos e a presença de estruturas reticulares no espaço extracelular positivas para a marcação com DAPI, mostrando a liberação de NETs em nossas condições experimentais.

Figura 17. Produção de NETs por neutrófilos.



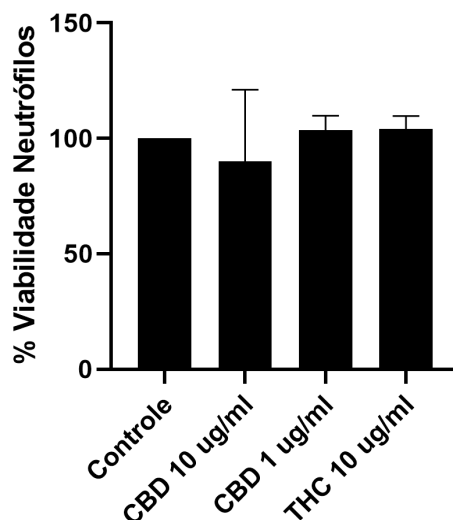
Nota: Neutrófilos foram incubados com lisado de *L. amazonensis* durante 3h a 37 °C e as NETs foram marcadas com DAPI. Aumento 40X. (n=2).

Fonte: Do autor.

4.5 CBD isolado e THC isolado não afetam a viabilidade de neutrófilos

Baseado nas concentrações de CBD utilizadas no ensaio de inibição de NETs, foram feitos ensaios para avaliar os efeitos do CBD e do THC na viabilidade dos neutrófilos. Os resultados dos ensaios do MTT realizados indicam que tanto o CBD quanto o THC não afetam a viabilidade destas células em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 18**).

Figura 18. CBD e THC não afetam a viabilidade dos neutrófilos.



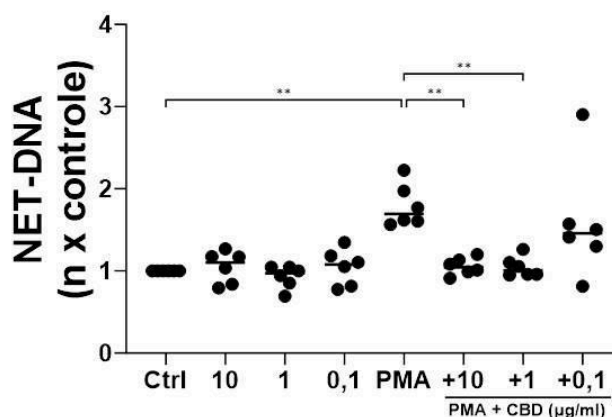
Nota: Teste ANOVA de uma via. n=2.

Fonte: Do autor.

4.6 CBD isolado inibe a liberação de NETs

A avaliação dos efeitos do CBD na liberação de NETs foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Elvira Saraiva da UFRJ. Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram incubados com CBD nas concentrações de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos e posteriormente estimulados com PMA (100 nM). Na **Figura 19** pode ser observado que o tratamento prévio dos neutrófilos com CBD conseguiu inibir a liberação de NETs por parte de neutrófilos estimulados com PMA.

Figura 19. CBD inibe a liberação de NETs.



Nota: O CBD, nas concentrações de 10 e 1 $\mu\text{g/ml}$, conseguiu inibir a liberação de NETs em neutrófilos estimulados com 100 nM de PMA. (** = $p < 0,01$).

Fonte: Do autor.

4.7 Dados demográficos dos pacientes com DA

As amostras utilizadas para as análises descritas nas seguintes seções, foram obtidas de pacientes com DA participantes de dois estudos randomizados, duplo cego e controlados por placebo, avaliando o efeito do tratamento com extrato de *cannabis* em pacientes com esta patologia. Na Tabela 1, são descritos os dados demográficos dos pacientes que participaram do estudo DAZACANN e na Tabela 2 estão descritos os dados dos pacientes participantes do estudo MICA-AD (adaptado de CURY *et al.*, 2025). É importante ressaltar que, com exceção da **Figura 42**, todas as análises feitas com amostras de LCR e plasma de pacientes do estudo DAZACANN correspondem ao tempo inicial da pesquisa, onde nenhum paciente tinha recebido o tratamento com extrato de *cannabis* ainda.

Tabela 1 Características demográficas e de biomarcadores dos pacientes do DAZACANN.

Característica	Valor
N	73
Idade, média em anos (95% IC)	76.97 (75.31 – 78.63)
Sexo, n (%)	
Mulher	45 (61.64)
Homem	28 (38.36)
Pontuação MEEM, média (95% IC)	15 (13.60 – 16.92)
Raça, n (%)	
Branco	59 (80.8)
Pardo	12 (16.4)
Preto	2 (2.8)
Nível de escolaridade, n = 60* (%)	
Ensino médio incompleto	42 (70)
Ensino médio completo	14 (23.3)
Graduação ou pós-graduação completa	4 (6.7)
Ingresso mensal, n = 60** (%)	
Até 1 salário mínimo	37 (61.7)
1-2 salários mínimos	11 (18.3)
2-7 salários mínimos	10 (16.7)
>7 salários mínimos	2 (3.3)
β amiloide 42 pg/mL, média (95% IC)	714.09 (596.12 – 832.06)
β amiloide 40 pg/mL, média (95% IC)	9270.73 (8021.27 – 10520.18)
Tau total pg/mL, média (95% IC)	896.97 (802.97 – 990.98)

Tau fosforilada 181 pg/mL, média (95% IC)	108.11 (93.69 – 122.53)
TNF- α pg/mL, média (95% IC)	7.49 (7.00 – 7.98)
IL-6 pg/mL, média (95% IC)	5.01 (4.22 – 5.79)

Nota: As porcentagens foram calculadas com base nos dados disponíveis. *Os dados sobre nível de escolaridade estavam ausentes para 13 participantes. **Os dados sobre renda estavam ausentes para 13 participantes.

Fonte: Do autor.

Tabela 2 Características demográficas dos pacientes do MICA-AD.

Característica	Valor
N	28
Idade, média em anos	76.35
Sexo, n (%)	
Mulher	16 (57.14)
Homem	12 (42.86)
Pontuação MEEM, média	14
Raça, n (%)	
Branco	25 (89.3)
Indígena	1 (3.57)
Preto	2 (7.14)
Nível de escolaridade	
Ensino médio incompleto	19 (67.86)
Ensino médio completo	4 (14.29)
Graduação ou pós-graduação completa	5 (17.86)
Ingresso mensal	
Até 1 salário mínimo	1 (3.57)
1-2 salários mínimos	6 (21.43)
2-7 salários mínimos	18 (64.29)
>7 salários mínimos	3 (10.71)

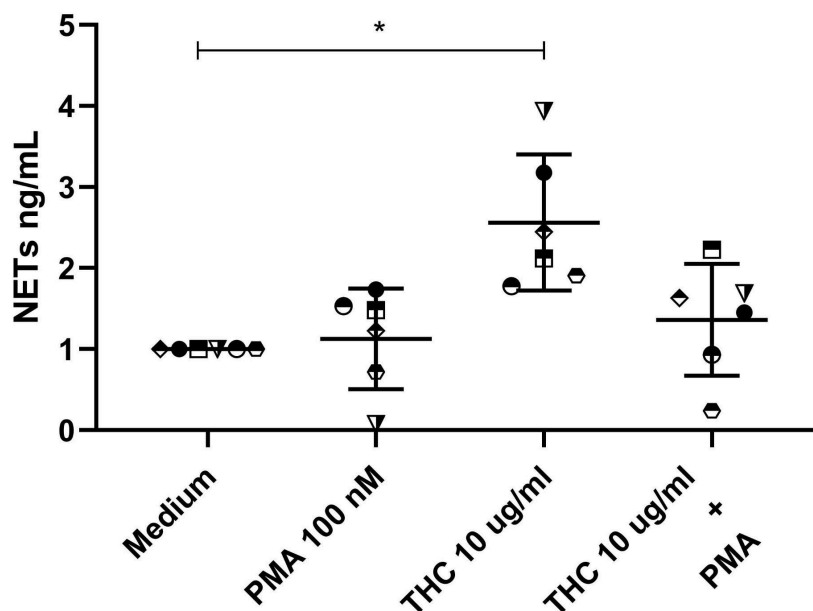
Fonte: Do autor.

4.8 THC induz a liberação de NETs na DA

Considerando o resultado obtido com os neutrófilos de pessoas jovens e saudáveis, nos perguntamos se o efeito do THC seria similar no caso de neutrófilos obtidos de pacientes idosos com DA. Como descrito nos métodos, foram isolados neutrófilos de pacientes com DA do projeto DAZACANN e foi avaliado o efeito do THC isolado na liberação de NETs. Neutrófilos foram incubados com THC na concentração de 10 μ g/ml durante 30 minutos e posteriormente estimulados com PMA (100 nM). Na **Figura**

20 pode ser observado que o tratamento prévio dos neutrófilos com THC estimulou significativamente a liberação de NETs.

Figura 20. THC induz a liberação de NETs em neutrófilos de pacientes com DA.



Nota: Os dados foram normalizados. Neutrófilos isolados de 6 pacientes do estudo DAZACANN. Teste de Friedman. (* = $p < 0,05$).

Fonte: Do autor.

4.9 Quantificação de cfDNA em amostras de LCR e plasma de pacientes com DA

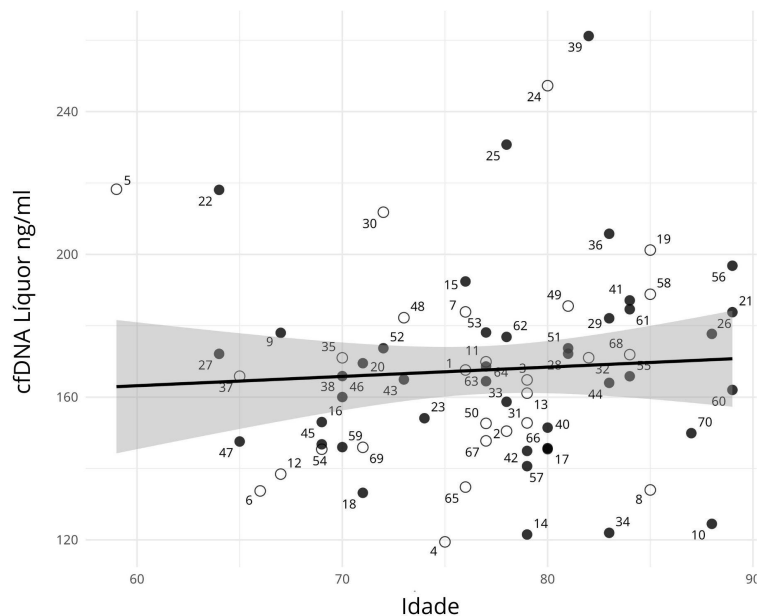
Devido à importância do DNA na estrutura das NETs, cfDNA tem sido explorado nos últimos anos como um marcador da presença de NETs, com resultados promissores (SAHIN *et al.*, 2025). Por isso, decidiu-se avaliar a presença de cfDNA em amostras de plasma e LCR de pacientes com DA e assim tentar encontrar alguma relação entre ele e diversos fatores relevantes da DA.

4.9.1 cfDNA no LCR de pacientes com DA não varia em relação à idade, sexo ou severidade da doença.

Ao quantificar os níveis de cfDNA no LCR dos pacientes com DA do estudo DAZACANN, foi observado que a idade não se correlacionou de maneira significativa com as concentrações de cfDNA (Rho de spearman = 0.15; $p = 0,22$) (Figura 21) e o sexo dos pacientes também não apresentou uma relação significativa com os níveis desta molécula (Figura 22). Utilizando as pontuações dos pacientes no MEEM como referência, foram estratificadas as concentrações de cfDNA no LCR e, similar ao descrito anteriormente,

não houve variações nos níveis desta molécula ao considerar a severidade da doença (**Figura 23**) e a velocidade da progressão da mesma (**Figura 24**).

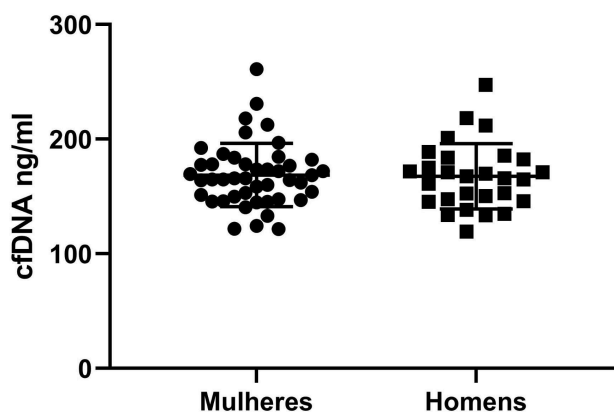
Figura 21. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação à idade.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

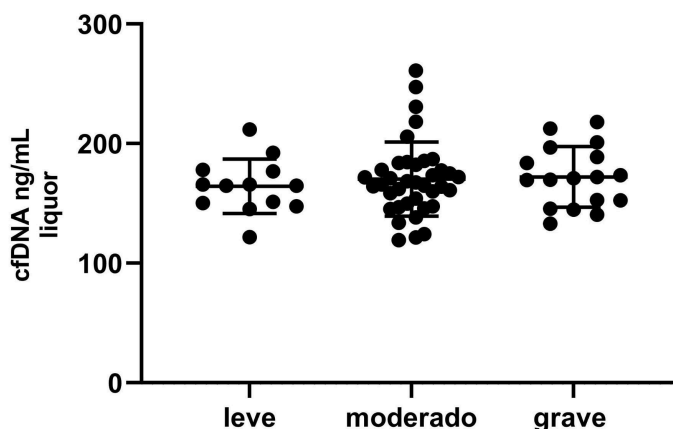
Figura 22. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação ao sexo.



Nota: Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

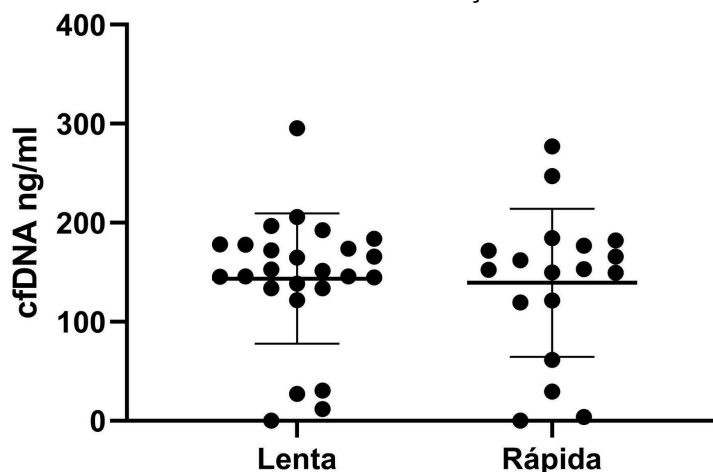
Fonte: Do autor.

Figura 23. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação à severidade da doença.



Nota: Amostras de pacientes do estudo DAZACANN. Foi realizado um teste ANOVA de uma via.
Fonte: Do autor.

Figura 24. Níveis de cfDNA no LCR não variam em relação à velocidade de progressão da doença.

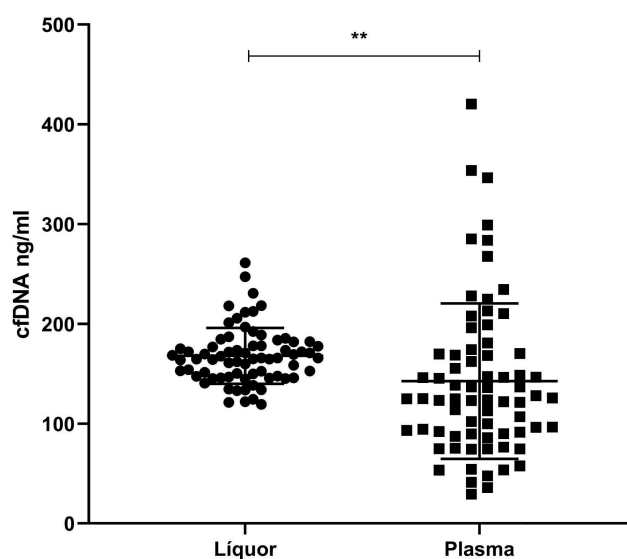


Nota: Amostras de pacientes do estudo DAZACANN. Foi realizado um teste t de Student's.
Fonte: Do autor.

4.9.2 cfDNA está mais elevado no LCR do que no plasma em pacientes com DA

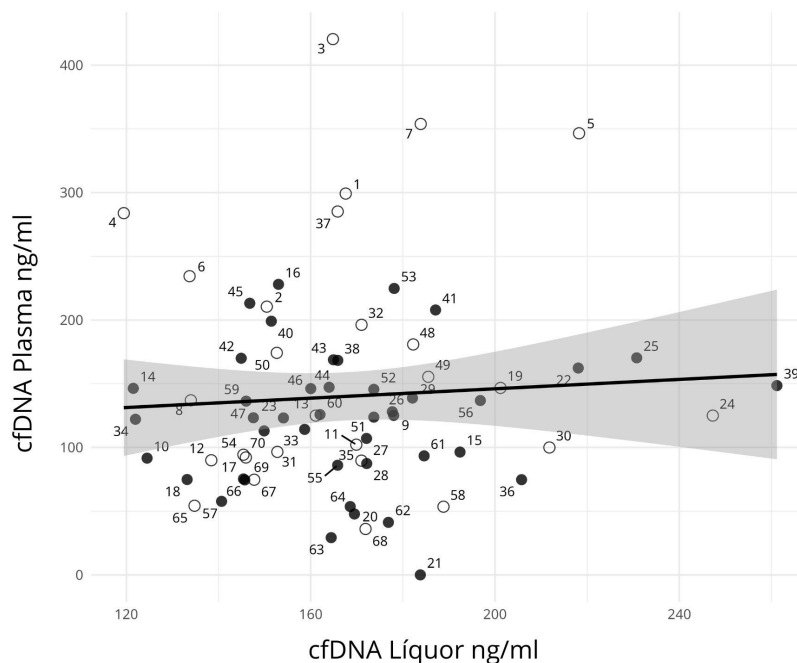
Ao comparar as concentrações de cfDNA nos dois tipos de amostras obtidas, foi observado que os níveis de cfDNA estavam significativamente mais elevados no LCR do que no plasma dos pacientes com DA (**Figura 25**). Utilizando análises de correlação determinou-se, porém, que as concentrações de cfDNA entre estes dois fluidos não estão correlacionadas significativamente (Rho de spearman = 0.13; p = 0,31) (**Figura 26**).

Figura 25. cfDNA está mais elevado no LCR do que no plasma na DA.



Nota: Teste t de Student's. (** = $p < 0,01$). Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.
Fonte: Do autor.

Figura 26. Concentrações de cfDNA nas amostras de LCR e plasma dos pacientes com DA não estão correlacionadas.



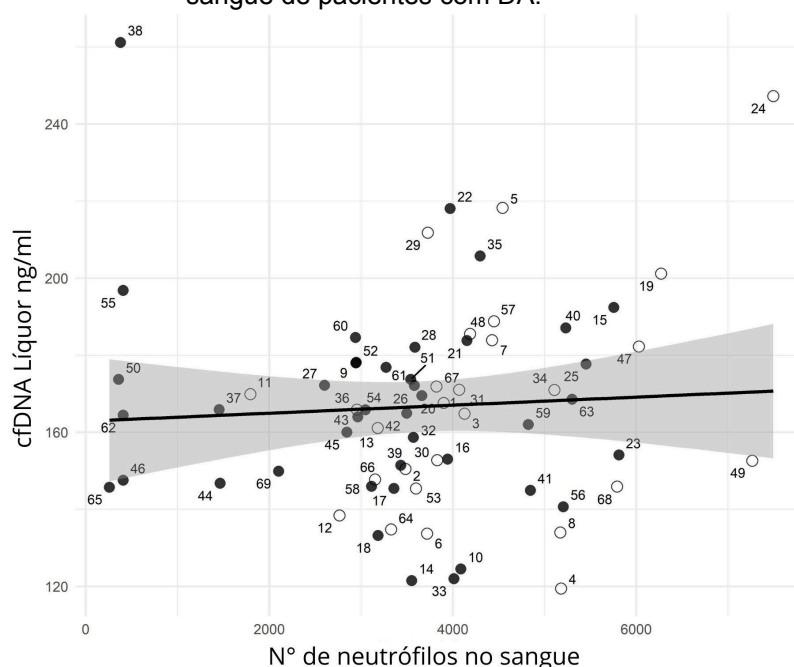
Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

4.9.3 O número de neutrófilos não se correlaciona com os níveis de cfDNA

Para avaliar a possibilidade das concentrações observadas de cfDNA serem oriundas de NETs nas amostras de LCR e plasma, foram realizadas análises de correlação onde não foi observada uma significância entre o número de neutrófilos presentes no sangue dos pacientes e os níveis de cfDNA no LCR (Rho de spearman = 0.11; $p = 0,39$) (**Figura 27**) e no plasma (Rho de spearman = 0.09; $p = 0,46$) (**Figura 28**).

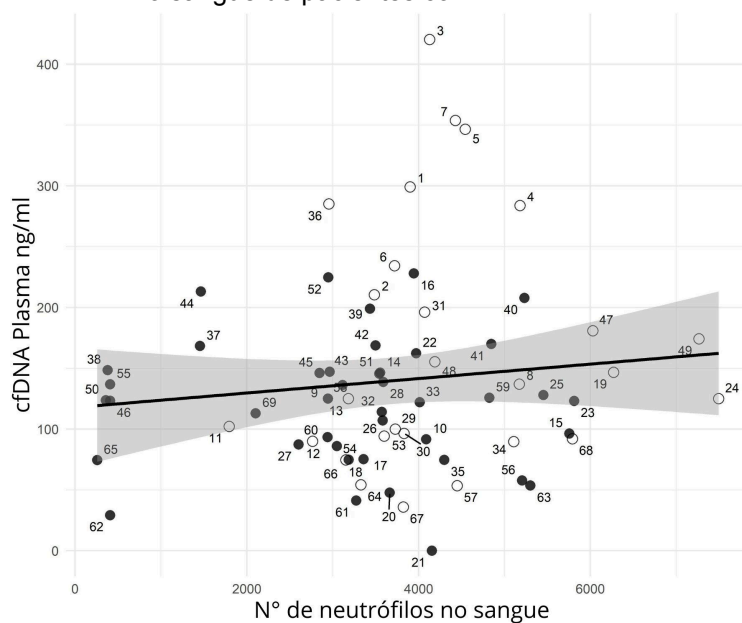
Figura 27. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com o número de neutrófilos no sangue de pacientes com DA.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

Figura 28. Concentrações de cfDNA no plasma não se correlacionam com o número de neutrófilos no sangue de pacientes com DA.



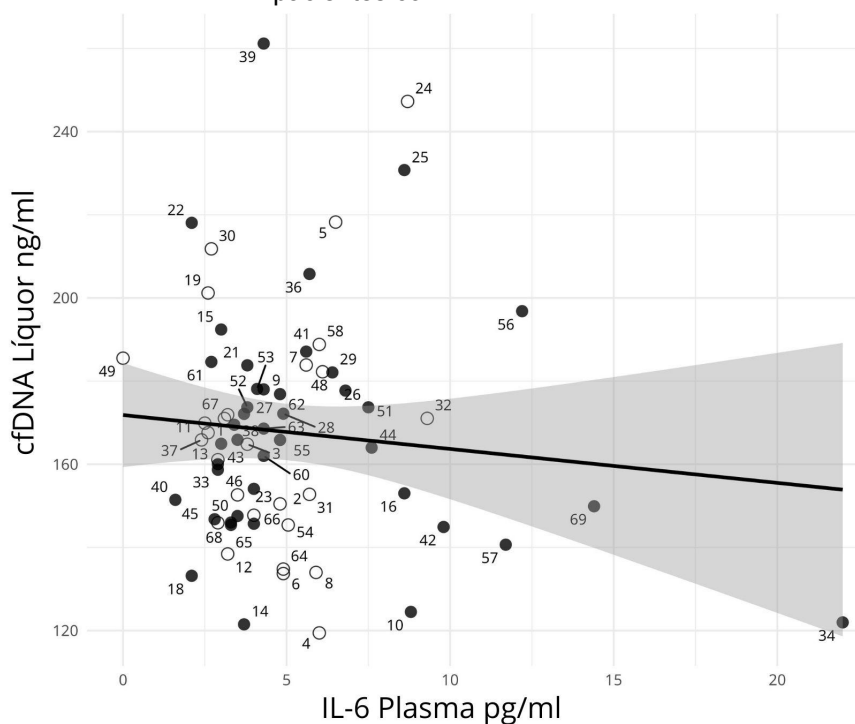
Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

4.9.4 cfDNA e marcadores inflamatórios na DA

Embora não foi observada uma relação direta entre a quantidade de neutrófilos e os níveis de cfDNA; optou-se por explorar a relação entre o cfDNA e citocinas inflamatórias no sangue; considerando a relação direta das citocinas pró-inflamatórias na liberação de NETs. Por isso, foram feitas análises de correlação entre o cfDNA e as citocinas IL-6 e TNF- α . No caso do cfDNA encontrado no LCR, não houve correlações significativas com IL-6 (Rho de spearman = -0.09, $p = 0,49$) (**Figura 29**) nem com TNF- α (Rho de spearman = 0.08, $p = 0,5$) (**Figura 30**). De maneira similar, o cfDNA no plasma não se correlacionou significativamente com IL-6 (Rho de spearman = 0.14, $p = 0,26$) (**Figura 31**) nem TNF- α (Rho de spearman = -0.04, $p = 0,74$) (**Figura 32**).

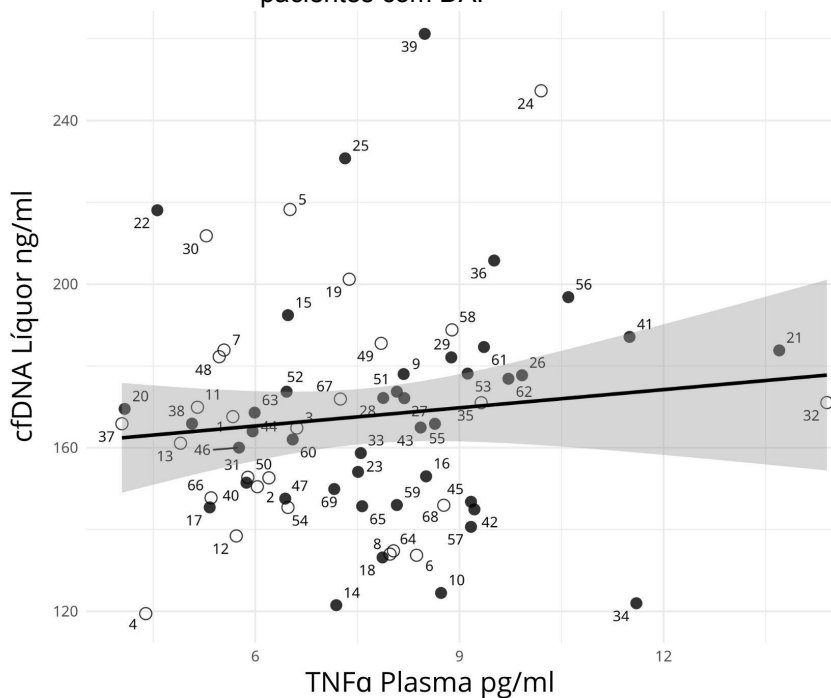
Figura 29. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com IL-6 plasmático em pacientes com DA.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

Figura 30. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com TNF- α plasmático em pacientes com DA.

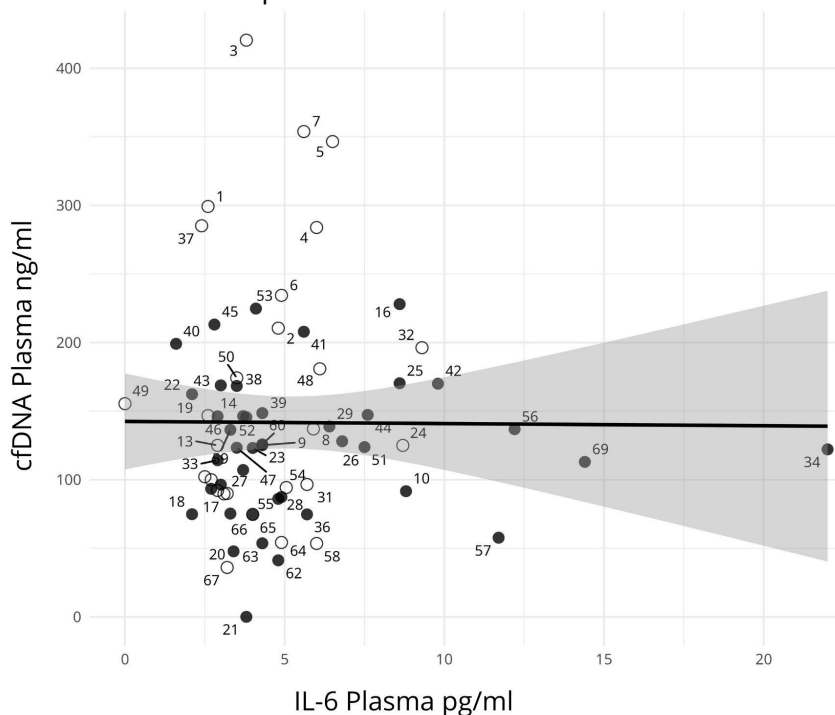


Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação

apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

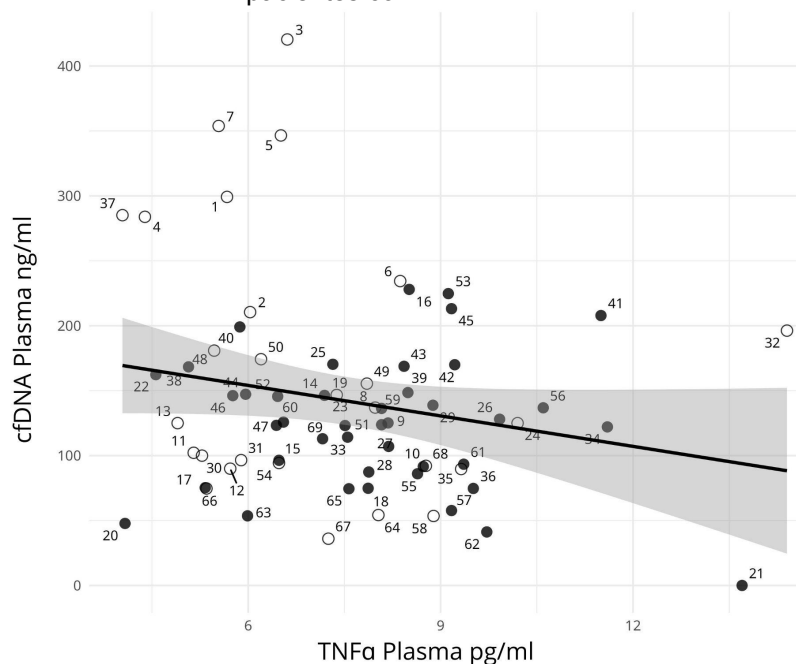
Figura 31. Concentrações de cfDNA no plasma não se correlacionam com IL-6 plasmático em pacientes com DA.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

Figura 32. Concentrações de cfDNA no plasma não se correlacionam com TNF- α plasmático em pacientes com DA.



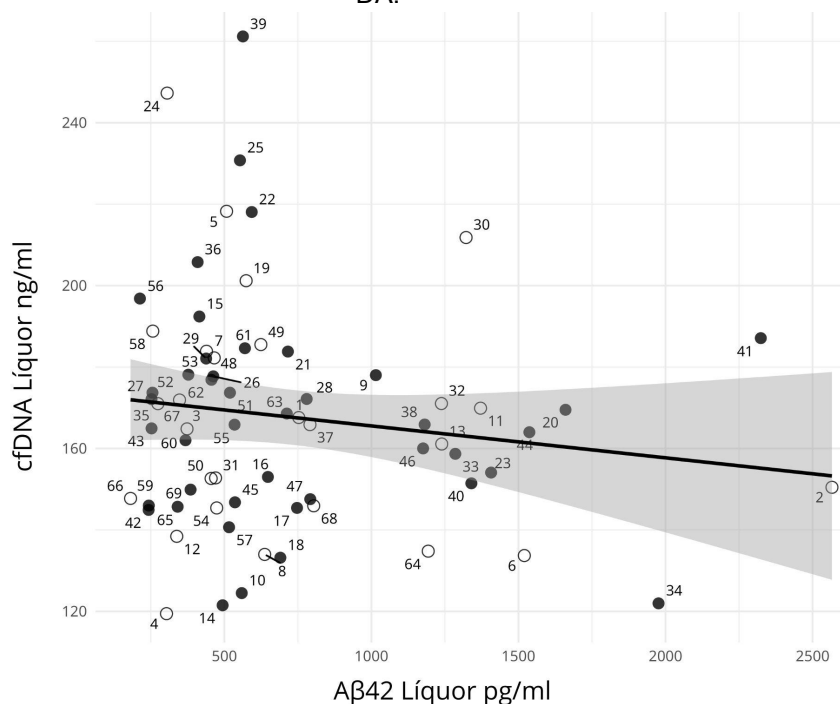
Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

4.9.5 cfDNA e marcadores clássicos da DA

Com o intuito de explorar o possível papel das NETs achadas no LCR de pacientes com DA, foram analisadas as relações entre o cfDNA encontrado no LCR com marcadores canônicos da doença, especificamente tipos das proteínas beta amiloide e tau, também quantificados no LCR. As concentrações de A β 42 (Rho de spearman = -0.10, $p = 0,44$) (**Figura 33**) e da razão A β 42/40 (Rho de spearman = -0.04, $p = 0,78$) (**Figura 34**) não se correlacionam com os níveis de cfDNA no LCR e, similarmente, as proteínas tau fosforilada 181 (Rho de spearman = 0.07, $p = 0,60$) (**Figura 35**) e tau total (Rho de spearman = 0.21, $p = 0,09$) (**Figura 36**) não tiveram correlações significativas com o cfDNA. Considerando que os pacientes dos quais foram obtidas as amostras encontravam-se em estados da DA com manifestações clínicas claras, decidiu-se avaliar se o cfDNA apresentava alguma relação com o desempenho cognitivo.

Figura 33. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com A β 42 em pacientes com DA.

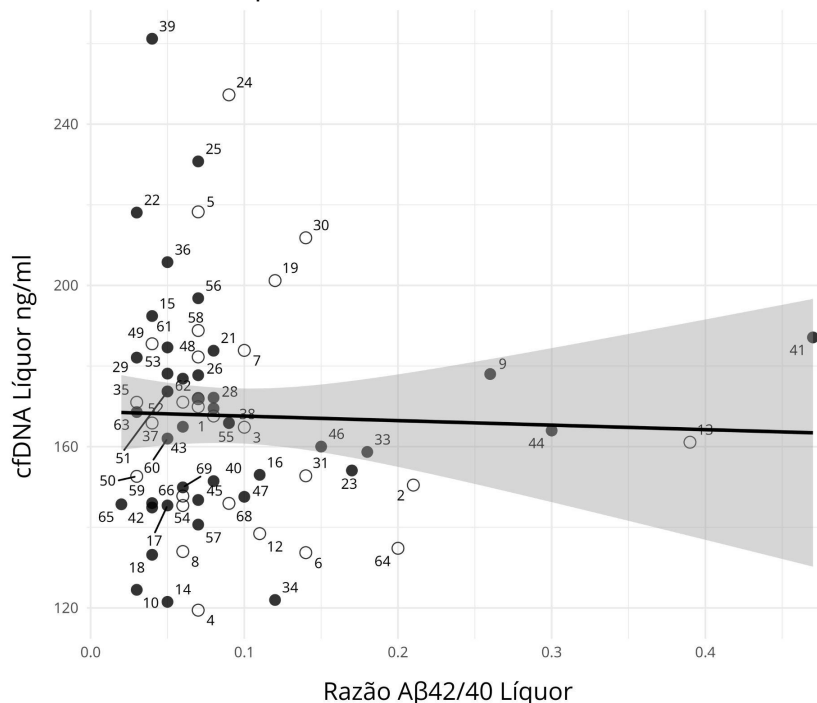


Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação

apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

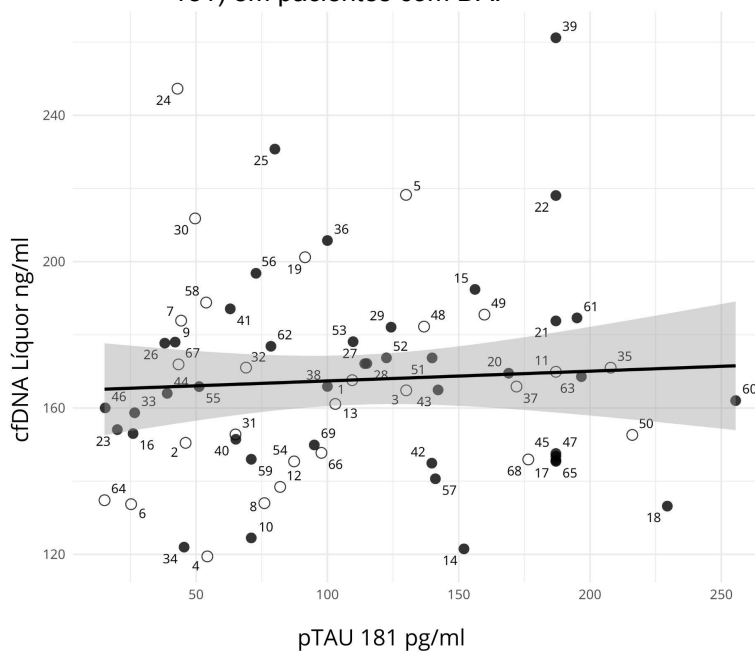
Figura 34. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com a razão A β 42/40 em pacientes com DA.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

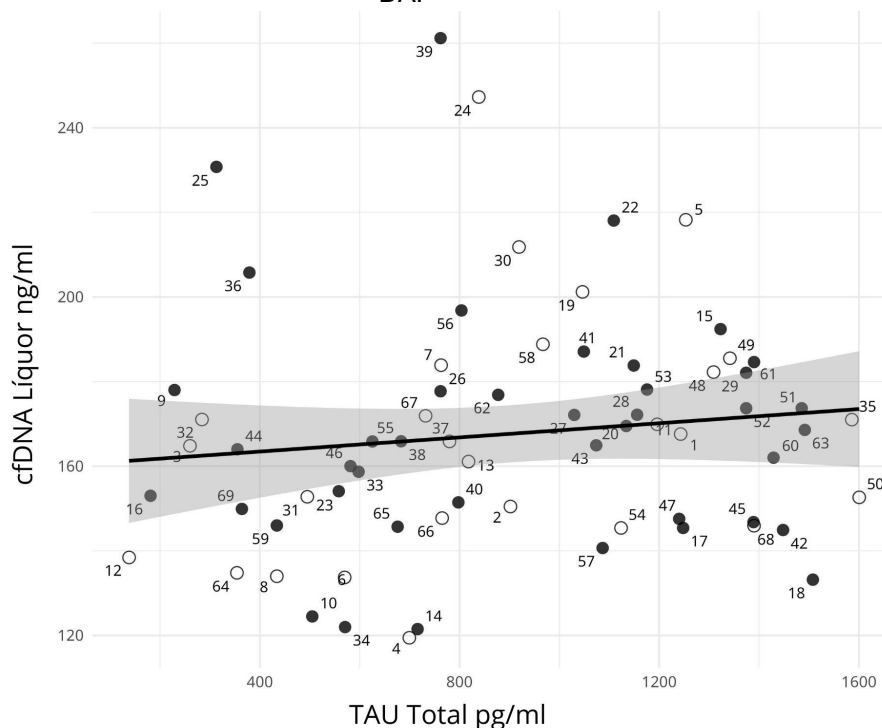
Figura 35. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com tau fosforilada 181 (pTAU 181) em pacientes com DA.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

Figura 36. Concentrações de cfDNA no LCR não se correlacionam com tau total em pacientes com DA.



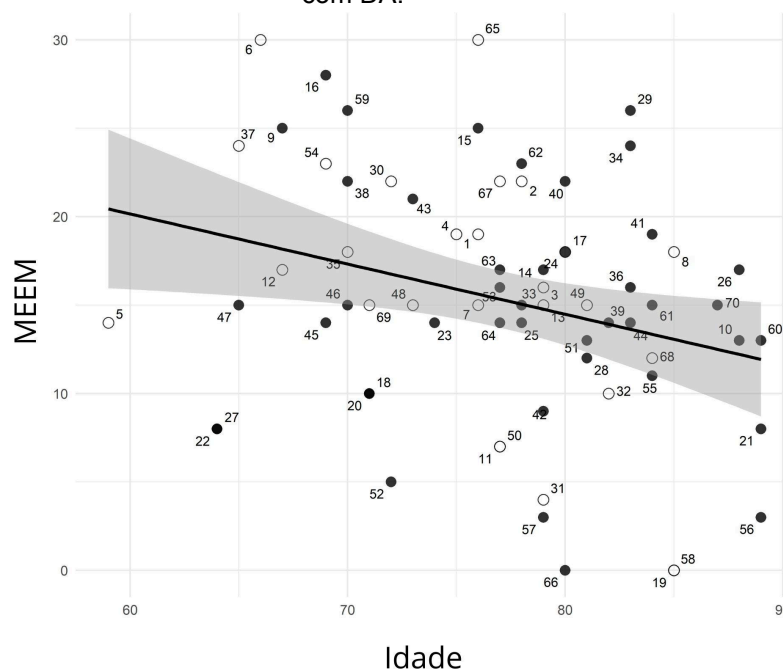
Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

4.9.6 cfDNA e o desempenho cognitivo

Como mencionado anteriormente, foi utilizada a pontuação dos pacientes no MEEM como indicador do seu desempenho cognitivo. De maneira esperada, o desempenho cognitivo dos pacientes com DA apresentou uma correlação significativa negativa com a idade (Rho de spearman = -0.28, $p = 0,02$) (**Figura 37**). Ao avaliar a relação do MEEM com biomarcadores da DA, houve uma correlação negativa significativa com a pTAU 181 (Rho de spearman = -0.36, $p = 0,003$) (**Figura 38**), mas com a A β 42 não foi observada nenhuma significância estatística na análise de correlação (Rho de spearman = 0.15, $p = 0,21$) (**Figura 39**).

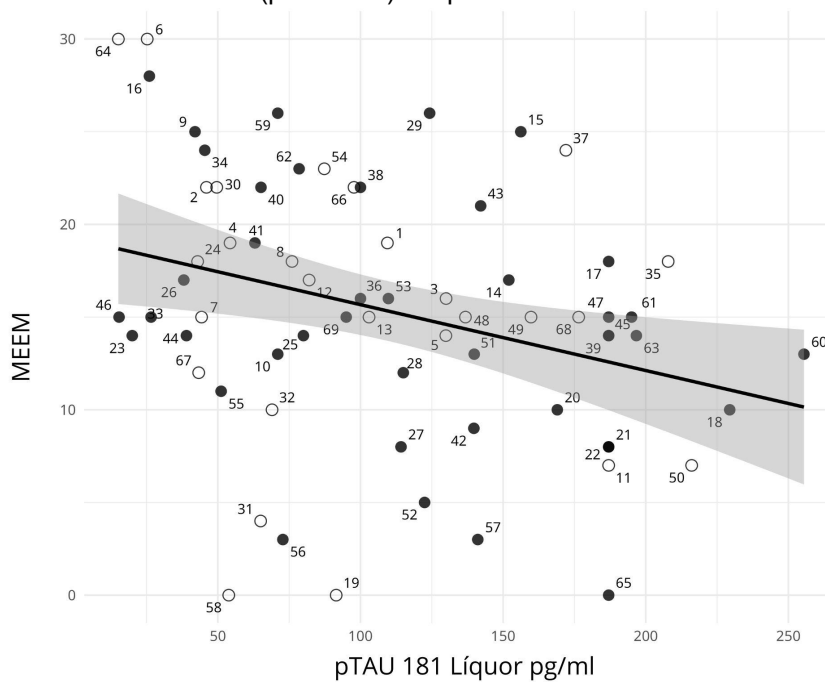
Figura 37. Desempenho cognitivo está negativamente correlacionado com a idade em pacientes com DA.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

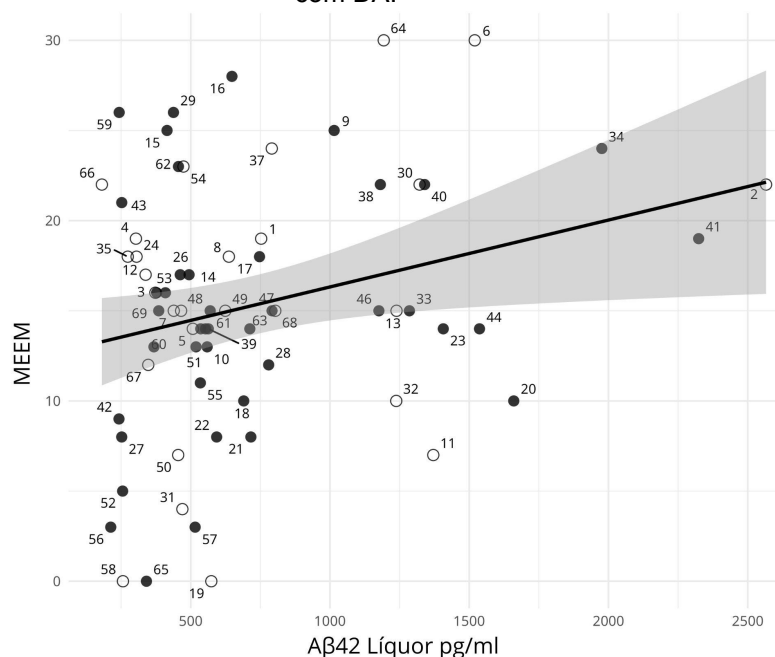
Figura 38. Desempenho cognitivo está negativamente correlacionado com as concentrações de tau fosforilada 181 (pTAU 181) em pacientes com DA.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

Figura 39. Desempenho cognitivo não se correlaciona com concentrações de A β 42 em pacientes com DA.

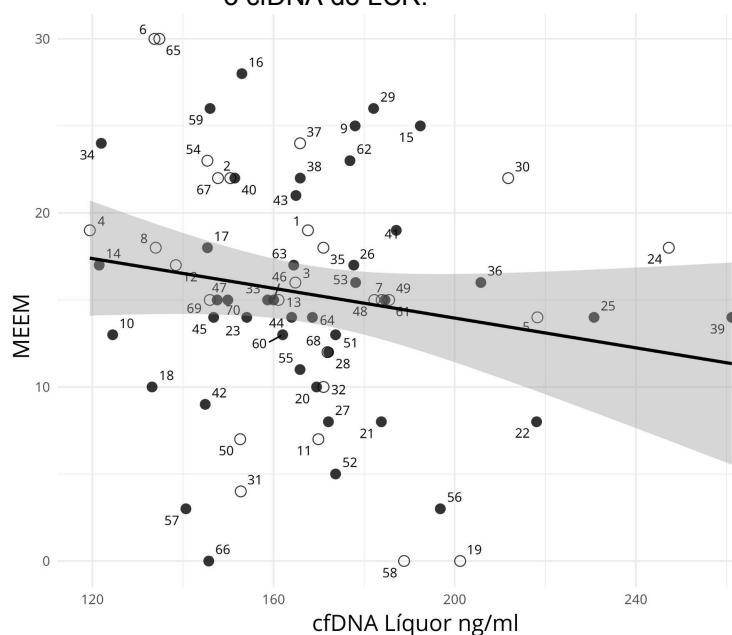


Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

Considerando que as pontuações do MEEM comportaram-se de maneira esperada nas suas associações com variáveis relevantes da DA, prosseguiu-se a estudar as suas correlações com o cfDNA. O cfDNA encontrado no LCR teve uma tendência a se correlacionar negativamente com o desempenho cognitivo (Rho de spearman = -0.14, $p = 0,25$) (**Figura 40**); por outro lado, o cfDNA no plasma tendeu a uma correlação positiva com a pontuação do MEEM (Rho de spearman = 0.15, $p = 0,23$) (**Figura 41**).

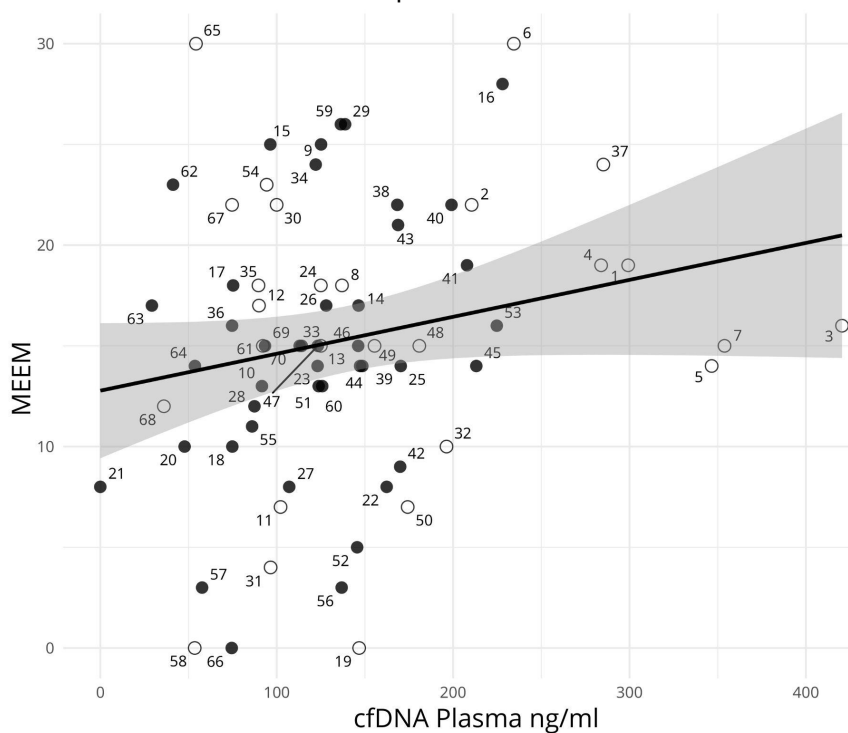
Figura 40. Desempenho cognitivo apresenta uma tendência a se correlacionar negativamente com o cfDNA do LCR.



Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

Figura 41. Desempenho cognitivo apresenta uma tendência a se correlacionar positivamente com o cfDNA do plasma.



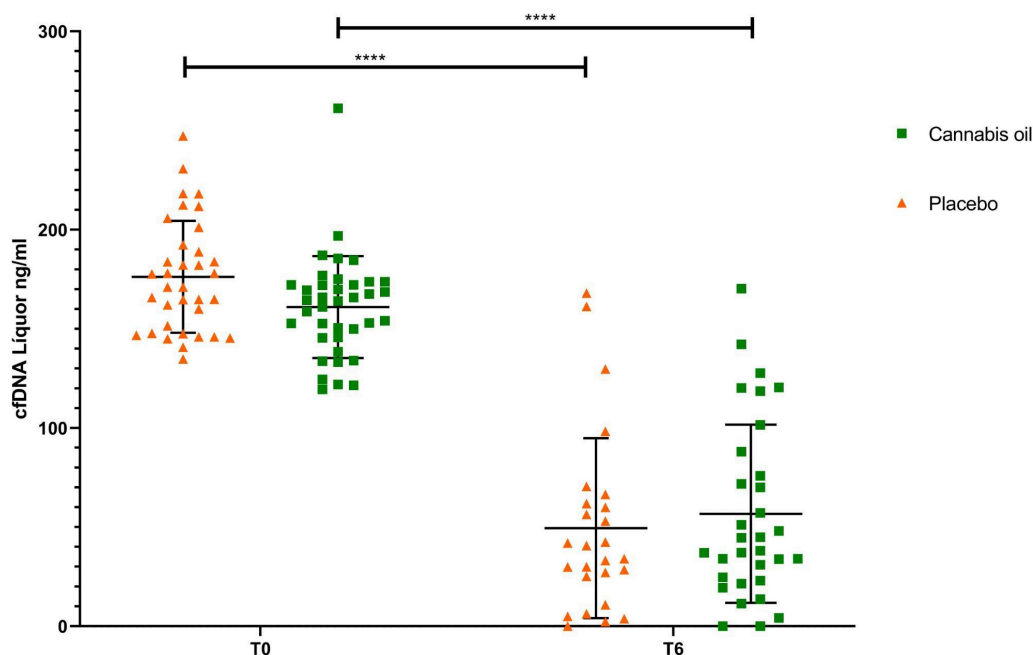
Nota: Os pontos pretos correspondem a pacientes do sexo feminino e os pontos brancos a pacientes masculinos. Cada número corresponde ao mesmo paciente em todos os gráficos de correlação apresentados neste trabalho. Correlação parcial de Spearman, ajustado para idade e sexo. A área sombreada representa o intervalo de confiança. Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

4.10 Efeitos do extrato de *cannabis* nas concentrações de cfDNA em amostras de LCR de pacientes com DA

Como parte do estudo DAZACANN, pacientes com DA receberam extrato de *cannabis* ou placebo (MCT) durante seis meses. Foram utilizadas as amostras de LCR destes pacientes para analisar as possíveis mudanças nas concentrações de cfDNA antes e após seis meses de uso do extrato de *cannabis*. Tanto no grupo placebo quanto no grupo que recebeu o tratamento, os níveis de cfDNA diminuíram significativamente (**Figura 42**).

Figura 42. Pacientes que receberam placebo e extrato de *cannabis* durante 6 meses apresentaram uma redução no cfDNA no LCR.



Nota: Foi utilizado um teste ANOVA de efeitos mistos. (**** = $p < 0,0001$). Amostras de pacientes do estudo DAZACANN.

Fonte: Do autor.

4.11 Quantificação de IL-8 e IL-33 em amostras de LCR de pacientes com DA

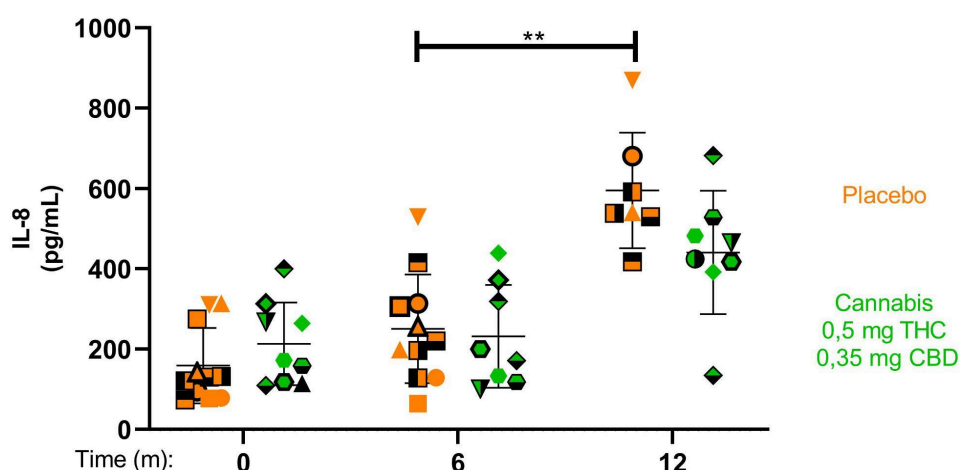
Citocinas pró-inflamatórias são capazes de induzir a liberação de NETs. Para avaliar os efeitos de extratos de *cannabis* neste contexto, decidimos avaliar a presença de possíveis indutores de NETs em amostras de LCR de pacientes com DA na forma das citocinas IL-8 e IL-33; isto foi realizado por meio de ensaios de ELISA. Para isso, foram

obtidas amostras de pacientes participantes de um estudo duplo cego controlado por placebo, onde os pacientes tomaram extrato de *cannabis* durante seis meses.

Foram testadas amostras que foram coletadas antes do início do tratamento e seis meses depois do início do mesmo. No caso da IL-8, a maioria dos pacientes do grupo placebo apresentou um incremento na quantidade de IL-8 depois dos seis meses. Já o grupo que recebeu extrato de *cannabis* teve uma resposta mais segmentada, com alguns pacientes apresentando uma queda na presença de IL-8 e outros apresentando um incremento. Aos 12 meses de tratamento, os níveis de IL-8 no LCR dos pacientes aumentou em ambos grupos quando comparado com as concentrações aos seis meses de tratamento, porém somente o aumento do grupo placebo foi estatisticamente significativo. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos de análise (**Figura 43**).

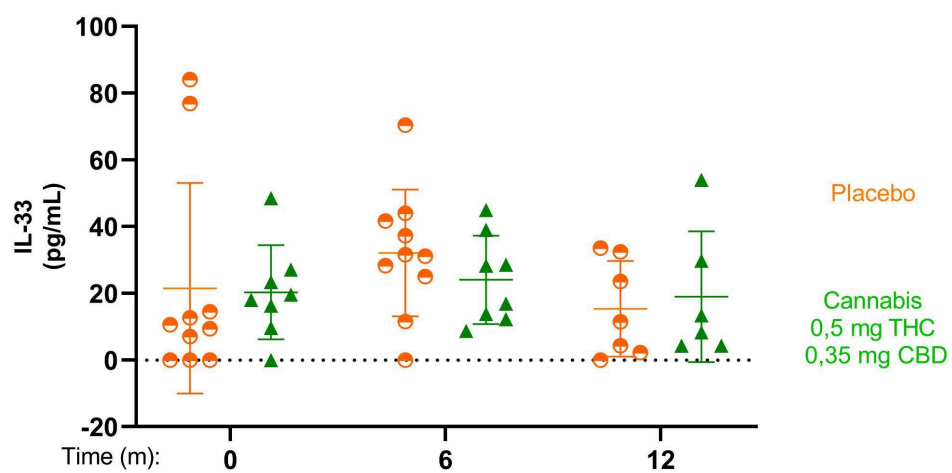
Em relação à IL-33, tanto os pacientes do grupo placebo quanto aqueles do grupo que recebeu o tratamento com *cannabis* apresentaram resultados segmentados; após seis meses de tratamento, em ambos grupos foram observados indivíduos com um incremento nas concentrações de IL-33 assim como outros que tiveram uma diminuição na quantidade desta citocina. Já nas concentrações aos 12 meses de tratamento, também não houve um aumento significativo de IL-33 para nenhum dos grupos. Similar ao caso da IL-8, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo *cannabis* e placebo em nenhum dos tempos de análise (**Figura 44**).

Figura 43. Concentração de IL-8 em amostras de LCR em pacientes com DA.



Nota: Foi utilizado um ANOVA de efeitos mistos com teste post hoc de Tukey. (** = $p < 0,005$). Amostras de pacientes do estudo MICA-AD.

Fonte: Do autor.

Figura 44. Concentração de IL-33 em amostras de LCR em pacientes com DA.

Nota: Foi utilizado um ANOVA de efeitos mistos com teste post hoc de Tukey. Amostras de pacientes do estudo MICA-AD.

Fonte: Do autor.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudamos os efeitos de extratos de diferentes fitocanabinóides na viabilidade de HBMECs *in vitro*, considerando que estas células encontram-se comprometidas na DA devido à neuroinflamação crônica que é característica desta patologia. Determinamos as concentrações de fitocanabinóides que levam às HBMECs a morte celular e que os efeitos destes compostos na viabilidade das células é independente dos principais receptores canabinóides, o CB1 e CB2. Considerando a interação que existe entre células do sistema imune e HBMECs em diversas doenças neurodegenerativas, como a DA, também avaliamos os efeitos dos fitocanabinóides na viabilidade de neutrófilos, onde encontramos as concentrações que não levam a morte celular e que coincidem com aquelas concentrações que também não comprometem a viabilidade das HBMECs.

Considerando as evidências do papel das NETs na DA e no comprometimento da BHE (ZENARO *et al.*, 2015; ZENARO *et al.*, 2017; PIETRONIGRO *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2018; BAIK *et al.*, 2014; AZEVEDO *et al.*, 2012), analisamos a capacidade dos fitocanabinóides, especificamente o CBD e o THC, de inibir a liberação de NETs em neutrófilos de pessoas sem DA e de idosos com a doença; nestes ensaios descobrimos que o CBD é capaz de inibir a liberação das NETs em voluntários saudáveis nas concentrações de 1 e 10 µg/ml e que o THC, interessantemente, promove a liberação das NETs em pacientes com DA quando utilizado na concentração 10 µg/ml.

Fazendo uso de amostras de LCR e plasma de pacientes com DA, fizemos a quantificação de cfDNA diretamente nestes fluídos, utilizando o cfDNA como indicador da possível presença de NETs. Observamos que nestas amostras, as concentrações de cfDNA foram significativamente maior no LCR do que no plasma e que, ao fazer análises de correlação com marcadores clássicos da DA, não houve correlações estatisticamente significativas entre os níveis de cfDNA com marcadores como a β A42, β A40, tau fosforilada 181 ou tau total. Por outro lado, observamos que o cfDNA no LCR dos pacientes com DA tendeu a se correlacionar negativamente com o desempenho cognitivo dos pacientes, enquanto o cfDNA do plasma tendeu a uma correlação oposta; embora não significativas, estas relações são interessantes e trazem novas perguntas sobre o papel do cfDNA e, em consequência, das NETs, na DA e outras doenças neurodegenerativas. Finalmente, ao avaliar os efeitos que o tratamento com extrato de *cannabis* durante seis meses teve nas concentrações de cfDNA no LCR dos pacientes,

observamos que tanto aqueles que receberam tratamento com *cannabis* quanto os que receberam placebo, apresentaram uma redução nos níveis de cfDNA.

Em 2015, Zenaro e colaboradores demonstraram pela primeira vez que neutrófilos atravessam a BHE em grandes quantidades em pacientes com DA e que, uma vez no parênquima cerebral, eles acumulam-se e liberam NETs. Estas NETs são liberadas tanto dentro do vaso sanguíneo quanto no tecido cerebral. De maneira interessante, eles também observaram que ao fazer a depleção dos neutrófilos em modelos animais da DA, houve uma redução da neuropatologia relacionada à doença e os camundongos que já apresentavam declínio cognitivo apresentaram melhoras na memória. Além disso, o estudo revelou que depletar os neutrófilos nos estágios iniciais da doença também contribuiu com melhoras na memória (ZENARO *et al.*, 2015). Este estudo pioneiro colocou os neutrófilos como mais um possível alvo terapêutico na DA, considerando o aparente envolvimento que eles têm no estabelecimento da doença e as melhorias que foram observadas ao alvejar estas células. Alguns anos depois, tomando como ponto de referência o que foi relatado no estudo da Zenaro, Dong e colaboradores decidiram estudar o comportamento dos neutrófilos em uma amostra de 42 pacientes com DA (16 com declínio cognitivo leve e 26 com demência). No estudo, foi demonstrado que os neutrófilos de todos os pacientes com demência encontravam-se em estados de “hiper-ativação”, adotando fenótipos associados a um estado de predisposição pró-inflamatória, evidenciado, principalmente, por uma produção de espécies reativas de oxigênio mais elevada. Curiosamente, os autores também descrevem uma quantidade elevada de NETs intravasculares, corroborando os resultados do estudo da Zenaro e sugerindo ainda mais a importância que estas estruturas têm na DA (DONG *et al.*, 2018).

Desde então, os neutrófilos e outras células do sistema imune periférico têm sido amplamente consideradas como tendo um papel muito importante na inflamação crônica que pode ser observada na DA e novas terapias que têm como alvo estas células têm sido exploradas (ZHANG *et al.*, 2024). No presente trabalho, avaliamos extratos de diversos fitocannabinóides *in vitro* em neutrófilos isolados do sangue periférico de pessoas saudáveis e de pacientes idosos com DA em estágios avançados. De maneira importante, determinamos as concentrações de CBD e THC que não matam estas células e, no caso do CBD, também a concentração que inibe a liberação de NETs (10 µg/ml). Existe somente um único estudo relatando a capacidade do CBD de inibir a liberação de NETs, onde neutrófilos isolados de pacientes psoriáticos não liberaram NETs ao serem tratados com LPS (outro indutor da liberação de NETs) e CBD na concentração de 10 µg/ml; os

autores teorizam que isto pode estar acontecendo por meio da ação antioxidante do CBD, sendo que a presença de espécies reativas de oxigênio é um estimulante da produção de NETs (WÓJCIK *et al.*, 2020). Por outro lado, ao testar a concentração de 10 µg/ml de THC em neutrófilos de pacientes com DA, observamos, inesperadamente, que o THC levou a uma maior liberação de NETs. De maneira geral, a ciência tem demonstrado que os compostos da planta de *cannabis* possuem propriedades anti-inflamatórias, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ANIL *et al.*, 2022); é por isso que estudos específicos avaliando os efeitos de fitocanabinóides em neutrófilos têm mostrado que a ativação dos receptores CB1 e CB2, por meio de agonistas sintéticos ou fitocanabinóides, leva a uma atenuação de vários mecanismos inflamatórios destas células, principalmente a redução da migração celular tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BERDYSHEV *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2017; THAPA *et al.*, 2018).

Nosso resultado traz uma nova perspectiva sobre os possíveis usos terapêuticos da *cannabis*, pois sugere que é importante considerar o estado fisiológico do paciente em questão já que isso pode modular o resultado de um tratamento com fitocanabinóides. A idade é um fator que afeta diversas questões do funcionamento do organismo, entre elas os mecanismos de ação dos neutrófilos. Em um estudo de 2014, Hazeldine e colaboradores mostraram que neutrófilos de pessoas idosas têm as vias de liberação de NETs prejudicadas; mostrando que já existe evidência de diferenças na formação de NETs entre pessoas jovens e idosas (HAZELDINE *et al.*, 2014). Por outro lado, quando inserimos o fator da presença da DA, as observações na literatura são diferentes. Nosso resultado alinha-se com o relatado no estudo do Dong e colaboradores (DONG *et al.*, 2018); os neutrófilos dos nossos pacientes possivelmente encontravam-se no estado “hiperativado” que é descrito neste estudo, sugerindo que estas células tinham uma predisposição a respostas inflamatórias exacerbadas. Isto poderia explicar a nossa observação: embora fitocanabinóides tenham efeitos anti-inflamatórios na maioria dos casos, em neutrófilos de pacientes idosos com DA estes compostos podem ter um efeito contrário, considerando o estado de hiperativação em que estas células encontram-se. É importante lembrar que o SEC está começando a ser compreendido com mais detalhe e ainda não são muito bem conhecidos os efeitos que um estado patológico tão variado como o da DA possa ter neste sistema. Uma revisão sistemática de 22 estudos que analisaram as mudanças do SEC na DA relatou que estas pesquisas apresentavam inconsistências na metodologia e tamanhos amostrais relativamente pequenos, pelo que

não era possível descrever corretamente se há alterações claras no SEC em pacientes com DA (BERRY *et al.*, 2020).

Como qualquer outro composto, fitocanabinóides são capazes de ter efeitos citotóxicos em diversos tipos celulares, dependendo das concentrações. Dependendo do contexto, isto pode ser benéfico, como é no caso de células tumorais. No caso do CBD, um estudo de 2008 detalhou os efeitos citotóxicos que este composto, a partir da concentração de 20 μM (aproximadamente 7 $\mu\text{g/ml}$), teve sob seis tipos de linhagens cancerígenas *in vitro* ativando vias apoptóticas envolvendo as caspases-3, -8 e -9 (CHOIPARK *et al.*, 2008). No nosso estudo, avaliamos os efeitos de vários extratos de fitocanabinóides na viabilidade das HBMECs, com o objetivo de determinar as concentrações seguras para experimentos em modelos celulares. Quando avaliamos a viabilidade celular por meio do ensaio do MTT, observamos que os extratos de CBD isolado e CBD *broad spectrum* tiveram resultados similares, onde a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ a viabilidade começou a estar comprometida. Em um estudo, Hind e colaboradores utilizaram a concentração de 10 μM (aproximadamente 3,15 $\mu\text{g/ml}$) de CBD e observaram que esta foi capaz de proteger um modelo da BHE (composto por uma co-cultura de HBMECs e astrócitos) dos efeitos tóxicos da privação de glicose e oxigênio (HIND *et al.*, 2016). Podemos inferir que concentrações menores a 10 $\mu\text{g/ml}$ de CBD são seguras para uso em ensaios *in vitro* com HBMECs, sendo que até esta concentração não existe uma taxa de morte celular elevada e o fitocanabinóide aparenta ter efeitos benéficos nas células. Em um contexto de estresse celular, como a privação de glicose e oxigênio, já foi observado que o CBDV, composto homólogo do CBD, foi capaz de reduzir a expressão da proteína MCP-1 nas HBMECs *in vitro*, mostrando que estes canabinóides podem gerar efeitos anti-inflamatórios e protetores nestas células da BHE (STONE *et al.*, 2021).

Como mencionado na seção 3.6.3 dos Materiais e Métodos, o ensaio do MTT, embora amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular, este teste o que realmente quantifica a nível molecular é a capacidade das mitocôndrias de metabolizar o composto ativo do ensaio. Quando avaliamos os efeitos do THC isolado nas HBMECs por meio do ensaio do MTT, obtivemos o curioso resultado de que, na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$, houve um incremento significativo da “viabilidade celular”. Porém, sendo cautelosos ao analisar este resultado, decidimos interpretá-lo como um incremento na atividade mitocondrial. Isto ainda resulta ser contrário ao que alguns estudos têm relatado em relação aos efeitos do THC nas mitocôndrias. Um estudo realizado a inícios do século XXI

relatou que o THC leva a disfunções nas mitocôndrias de diversas células, afetando a sua produção de ATP, por exemplo (SARAFIAN *et al.*, 2003). Em outros dois estudos mais recentes, o THC afetou negativamente as funções mitocondriais em neurônios hipocâmpais (tanto maduros quanto imaturos) de camundongos e em uma linhagem celular de trofoblastos; porém em nenhum destes estudos foi relatada morte celular após tratamento com THC (MAZZANTINI *et al.*, 2025; WALKER *et al.*, 2021). Baseado na literatura disponível, não encontramos estudos avaliando os efeitos do THC nas mitocôndrias de HBMECs, pelo que não foi possível realizar uma comparação direta que fosse mais precisa. Como com muitas pesquisas relacionadas ao SEC e fitocanabinóides, é recomendado realizar mais estudos para conseguir compreender com maior detalhe os mecanismos de ação que estes compostos têm ao nível mitocondrial, pois é importante lembrar que o SEC possui múltiplos sítios de ação e regulação, tornando possível uma grande quantidade de efeitos mediados por outras vias independentes aos receptores clássicos CB1 e CB2 (MALHEIRO *et al.*, 2023).

Ao avaliar os efeitos dos fitocanabinóides na viabilidade celular por meio do ensaio do LDH, obtivemos resultados similares aos do MTT em relação às concentrações que levaram à morte celular. É importante ressaltar que os resultados obtidos nos ensaios de LDH variaram um pouco quando comparados ao que observamos nos experimentos com MTT. Por exemplo, no MTT a concentração de 10 µg/ml de CBD isolado levou a uma redução de 50% na viabilidade, enquanto no ensaio do LDH a viabilidade se manteve praticamente inalterada. As concentrações de 30 e 50 µg/ml reduziram a viabilidade das células quase completamente no ensaio do MTT, diferente do resultado obtido no caso do LDH onde estas concentrações não chegaram a afetar a viabilidade de maneira significativa. Devemos considerar alguns fatores ao interpretar estes resultados. Primeiramente, o tempo de incubação com os fitocanabinóides foi diferente em cada ensaio, de 24 horas no caso do MTT e de oito horas para o ensaio do LDH. Isto devido a que o kit utilizado para o ensaio do LDH indica que o tempo de meia vida desta enzima é de aproximadamente nove horas uma vez liberado no meio extracelular, pelo que optamos por um tempo de incubação de oito horas para prevenir perdas na quantificação. Por este motivo, no caso do ensaio de LDH é possível que este tempo de exposição ao tratamento não fosse o suficiente para levar à morte celular observada no MTT. Por outro lado, devemos considerar o mencionado no parágrafo anterior: o ensaio do MTT traz resultados refletindo atividade mitocondrial, pelo que também deve ser levado em

consideração que as reduções na “viabilidade celular” observadas no ensaio do MTT podem ser realmente disfunções nas funções das mitocôndrias das células.

Nos ensaios realizados com o objetivo de avaliar o papel dos receptores CB1 e CB2 nesta morte celular, observamos que, no caso do CBD isolado, o efeito citotóxico da concentração de 80 µg/ml é independente de qualquer um destes receptores canabinóides. Ao testar 80 µg/ml de THC isolado, também não houveram mudanças significativas na taxa de morte celular das células; porém, considerando o desvio padrão observado no gráfico, especificamente no uso dos dois antagonistas em combinação, este resultado poderia chegar a ser significativo estatisticamente aumentando o número de ensaios. Ao final, é importante considerar que estes efeitos citotóxicos podem estar sendo mediados por outras vias, já que fitocanabinóides são capazes de interagir com vários outros elementos do SEC, assim como o receptor GPR55, alguns da família dos TRPV e receptores intracelulares como o PPAR γ (QUEIROZ *et al.*, 2025), e em pesquisas futuras devem ser utilizados outros inibidores para obter um melhor panorama dos mecanismos e vias de sinalização envolvidas nos efeitos citotóxicos dos fitocanabinóides nas HBMECs. Pesquisas pré-clínicas têm observado que, pelo menos o CBD, consegue matar células tumorais ativando majoritariamente mecanismos de apoptose (por meio de receptores TRPV); e, em menor medida, mecanismos de autofagia e necrose (MELO *et al.*, 2025).

O ensaio de *wound healing* realizado neste estudo é amplamente utilizado na pesquisa pré-clínica para avaliar a migração ou a proliferação celular, indicado pela capacidade das células de fechar uma ferida artificial na placa de cultivo. Considerando a literatura atual, não existem relatos dos efeitos de fitocanabinóides em ensaios de cicatrização de feridas com HBMECs, pelo que não foi possível realizar uma comparação direta dos resultados. No nosso estudo, baseado no interessante efeito que o THC na concentração de 30 µg/ml teve nas HBMECs, decidimos testar o fitocanabinóide nesta mesma concentração no ensaio do wound healing. Após vários ensaios de padronização de tempo, determinamos avaliar o efeito do composto depois de 15 horas de incubação e observamos que o THC isolado não teve nenhum efeito significativo na capacidade de wound healing das HBMECs. No caso de feridas na pele em um contexto de cicatrização normal, estudos têm demonstrado que canabinóides possuem, de fato, propriedades cicatrizantes e capazes de auxiliar no processo de fechamento de feridas (PARIKH *et al.*, 2024). Em ensaios de migração e de wound healing realizados com fibroblastos primários, o THC e o CBD isolado foram capazes de incrementar a migração celular e a proliferação

destas células, mostrando que estes compostos são capazes de induzir este tipo de comportamento em células importantes no processo de cicatrização (MILLER *et al.*, 2021). As células endoteliais, como as HBMECs, também são essenciais no processo de cicatrização, pois a angiogênese depende bastante deste tipo celular e as etapas da cicatrização ocorrem de maneira eficiente com uma boa quantidade de novos vasos sanguíneos sendo formados no local. Neste contexto, os efeitos da ativação do SEC também têm sido avaliados em células endoteliais, porém fitocannabinóides aparentam inibir a capacidade angiogênica deste tipo de células. Em um estudo de 2014, Ramer e colaboradores observaram que, ao tratar células endoteliais da veia umbilical (HUVECs) com meio condicionado de células A549 tratadas com THC isolado, as células endoteliais apresentaram menor migração celular e formação de tubos, fatores essenciais da angiogênese (RAMER *et al.*, 2014). Estes efeitos foram mediados por receptores CB1, CB2 e TRPV1 e, curiosamente, esta ativação do SEC das células levou a uma ativação do inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz 1 (TIMP-1) por meio do ICAM-1, molécula que, como discutido anteriormente, é essencial na migração de neutrófilos pela BHE na DA. É importante considerar que se fitocannabinóides têm a capacidade de inibir a capacidade de células endoteliais de migrar e/ou proliferar por meio da ativação da ICAM-1, uma molécula cuja expressão elevada nas HBMECs já é considerada prejudicial no contexto da DA, então é necessário realizar mais estudos onde sejam avaliados com maior profundidade os efeitos dos canabinóides neste tipo de células, pois o seu efeito pode ser contrário ao desejado.

Como mencionado anteriormente, um dos componentes principais das NETs é o DNA de dupla fita e é por isso que a presença do cfDNA em diversos fluídos e tecidos pode ser um indicador da presença de NETs (DE MIRANDA *et al.*, 2021). No presente estudo, tivemos a grande oportunidade de ter acesso a amostras de biofluidos de pacientes com DA, especificamente de LCR e plasma. Nos anos recentes, as biópsias líquidas têm ganhado destaque em análises clínicas e em pesquisas pelo seu grande potencial para realizar avaliações de diagnóstico e monitoramento de diferentes doenças, entre elas a DA, de uma forma muito menos invasiva e mais acessível do que biópsias teciduais regulares (POLLARD *et al.*, 2024). Em anos recentes, o cfDNA têm sido explorado como um possível biomarcador na DA que permita diagnosticar e monitorar a doença; com alguns estudos mostrando a sua relação com fatores relevantes da patologia, como o estágio da doença e mudanças genéticas (POLLARD *et al.*, 2023; MACÍAS *et al.*, 2023). Como será discutido nos próximos parágrafos, as concentrações de

cfDNA no organismo têm que ser interpretadas de maneira cautelosa, pois estes níveis podem indicar diversas questões dependendo do local onde o cfDNA foi quantificado, da concentração e do tipo de cfDNA; sendo que esta molécula pode ser proveniente de diversas fontes (NETs, morte celular, DNA mitocondrial, etc.) (AYDIN *et al.*, 2025; DE MIRANDA *et al.*, 2021).

Nas nossas avaliações, observamos que o cfDNA encontrado no LCR não apresentou mudanças com relação à idade e gênero dos pacientes, severidade da doença ou velocidade da mesma. Este resultado difere do observado em estudos realizados previamente. No caso do gênero, em um único estudo focado em analisar níveis de cfDNA no sangue de pacientes com malignidades hematológicas, os autores relatam que homens apresentaram maiores níveis de cfDNA no sangue em relação a mulheres; porém estas diferenças foram independentes da idade. Os pacientes do estudo tinham, em média, ao redor de 60 anos; porém não é possível afirmar que as amostras de sangue eram de pacientes idosos, igual às amostras de plasma e LCR do nosso estudo, pois o desvio padrão da idade era bastante elevado, com alguns pacientes tendo cerca de 20 anos (GNECCO *et al.*, 2025). Outro estudo mais focado na relação entre a idade e a presença de cfDNA no sangue apontam que, de fato, pessoas idosas apresentam maiores concentrações de cfDNA no sangue, assim como padrões de metilação diferenciados, quando comparado com voluntários jovens (LI *et al.*, 2024); porém não há dados mostrando se estas mudanças acontecem também no LCR. Por outro lado, estudos têm relatado que pessoas idosas saudáveis apresentaram uma correlação positiva entre cfDNA do sangue e a idade (JYLHÄVÄ *et al.*, 2011; JYLHÄVÄ *et al.*, 2013) e, em outro estudo, pessoas idosas que fizeram exercício físico e tiveram suplementação nutricional apresentaram reduções nos níveis de cfDNA no sangue (TOSEVSKA *et al.*, 2016), sugerindo mais uma vez que as concentrações de cfDNA em biofluidos podem representar processos diferentes no organismo, o que se alinha com a nossa observação de que o cfDNA no LCR se mantém constante na faixa etária dos nossos pacientes com DA.

Mostramos de maneira sem precedentes, que o cfDNA está mais elevado no LCR do que no plasma em pacientes com DA. Não existem muitos estudos que analisem a presença de cfDNA desta maneira e, entre aqueles disponíveis, nossos resultados contrastam com o que foi observado por Bratseth e colaboradores. Nesse estudo, os pesquisadores analisaram a presença de cfDNA em amostras de soro e LCR de pessoas idosas que sofreram uma fratura no quadril, que ficaram acamadas por muito tempo e

eventualmente desenvolveram delírio neste período. Diferente do que foi observado no nosso trabalho, Bratseth e a sua equipe observaram que os pacientes com delírio apresentaram uma maior concentração de cfDNA no soro do que no LCR, independente da presença de demência (BRATSETH *et al.*, 2024). Essa discrepância pode refletir diferenças nos mecanismos da doença: enquanto o delírio e a inflamação aguda envolvem principalmente a ativação imunológica sistêmica, a DA é caracterizada por neurodegeneração progressiva e um quadro inflamatório mais crônico.

Como mencionado anteriormente, a inflamação é um fator relevante na DA, considerando a importância que ela tem frente à progressão das mudanças neuropatológicas observadas na doença (KINNEY *et al.*, 2018). Por isso, também avaliamos as relações entre marcadores inflamatórios e as concentrações de cfDNA dos nossos pacientes com DA. Observamos que, em relação às citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α quantificadas no plasma, não houve correlações significativas com os níveis de cfDNA encontrados tanto no plasma quanto no LCR. Embora na nossa amostra de pacientes não achamos uma relação clara entre estes fatores, existem relatos da relação do cfDNA com marcadores inflamatórios em outras doenças neurodegenerativas. Por exemplo, um estudo observou que pacientes com DP de início precoce associada a mutações patológicas apresentaram níveis elevados tanto de IL-6 quanto de cfDNA mitocondrial no soro, mostrando a possível relação entre o cfDNA e o ambiente inflamatório exacerbado observado em diversas neuropatologias (BORSCHE *et al.*, 2020).

A presença e acúmulo anormal das proteínas β A42 e tau hiperfosforilada são fatores característicos da DA e estas moléculas são atualmente utilizadas como biomarcadores clássicos da patologia (QUERFURTH *et al.*, 2010). Nas análises realizadas no presente trabalho, não observamos correlações significativas entre as concentrações das proteínas β A42, β A40, tau total ou tau hiperfosforilada 181 com os níveis de cfDNA no plasma ou no LCR. Embora estas correlações nulas possam refletir em parte o tamanho limitado da amostra e o desenho transversal da análise (que já são limitações por si só), elas também podem indicar dissociações mecânicas entre a liberação de cfDNA e outras vias moleculares relacionadas à patologia clássica da DA. Mais uma vez, é importante considerar que a presença de cfDNA, proveniente de NETs ou de outras fontes, pode ser um indicador de diversos estados e estágios de uma patologia dependendo do compartimento onde ele foi quantificado e da origem deste cfDNA.

O declínio cognitivo é uma das características principais de doenças neurodegenerativas que podem levar à demência (GADHAVE *et al.*, 2024). No nosso estudo, os níveis de cfDNA no LCR apresentaram uma tendência não significativa a se correlacionar negativamente com as pontuações do MEEM, sugerindo uma associação entre as concentrações de cfDNA do LCR e o declínio cognitivo na DA. Esta observação está em consonância com estudos anteriores que relataram concentrações elevadas de cfDNA no plasma de pacientes com DA quando comparado com controles (POLLARD *et al.*, 2023). Além disso, níveis mais altos de cfDNA genômico no sangue foram associados a um risco aumentado de demência em idosos (NIDADAVOLU *et al.*, 2022). No entanto, ao contrário do cfDNA do LCR, o cfDNA plasmático em nosso estudo teve uma tendência a se correlacionar positivamente com as pontuações do MEEM. Nosso resultado sugere ainda que os níveis de cfDNA variam dependendo do fluido e compartimento específicos em que é encontrado, possivelmente refletindo que o cfDNA no LCR está mais intimamente associado ao comprometimento cognitivo em pacientes com DA.

O quadro de neuroinflamação crônica presente na DA é um dos principais aspectos que contribuem com o progresso da doença, sendo que nas últimas décadas múltiplos estudos têm mostrado a importância da inflamação na DA, mediada tanto pelo sistema imune periférico quanto por células residentes do SNC (TUPPO & ARIAS, 2005; ZHANG *et al.*, 2024). Os componentes da planta da *cannabis*, como comprovado por diversas pesquisas, possuem potentes propriedades anti-inflamatórias (ANIL *et al.*, 2022); por isso, neste trabalho decidimos explorar os efeitos que o consumo de extratos da *cannabis* tiveram na presença das citocinas IL-8 e IL-33 no LCR de pacientes com DA que tomaram este extrato ao longo de 12 meses. Incrementos na IL-8 no organismo têm sido relacionados à progressão da DA (RIGHI *et al.*, 2025) e, por outro lado, estudos sugerem que disfunções na IL-33 podem estar relacionadas a piora na DA, especialmente no aspecto cognitivo (LIANG *et al.*, 2020). Um estudo encontrou que a IL-33 possui a capacidade de reverter mecanismos patológicos em modelos animais da DA, porém o papel desta citocina na doença ainda deve ser investigado (FU *et al.*, 2016). Nosso resultado mostrou que o consumo de extrato de *cannabis* não evitou o aumento dos níveis de IL-8 no LCR, porém o aumento observado no grupo placebo foi significativo estatisticamente, enquanto o aumento observado no grupo que recebeu *cannabis* não foi, o que pode sugerir que a *cannabis* conseguiu prevenir, até certo ponto, o incremento desta citocina no LCR dos pacientes com DA. Em estudos *in vitro*, extratos de *cannabis* mostraram capacidade de reduzir a produção de IL-8 em macrófagos estimulados com

LPS (ZAIACHUK *et al.*, 2023). Já em estudos clínicos ou *in vivo*, não há relatos publicados que mostrem que extratos de *cannabis* ou fitocannabinóides isolados diminuem as concentrações de IL-8, especialmente no SNC. De maneira interessante, no caso da IL-33, existe um estudo mostrando que, em modelos animais da DA, tratamento com CBD foi capaz de melhorar a função cognitiva dos camundongos por meio do incremento de IL-33 no cérebro (KHODADADI *et al.*, 2021). Nas nossas análises, os níveis de IL-33 não mudaram de maneira significativa ao longo do tempo em nenhum dos grupos e também não houve diferenças entre os grupos, pelo que não podemos afirmar que a *cannabis* consegue modular as concentrações da IL-33 em pacientes com DA. De maneira geral, embora tratamentos com *cannabis* sejam capazes de reduzir a ação inflamatória em diversas patologias, mais estudos são necessários para determinar a sua efetividade na inflamação observada na DA e através de quais mecanismos isto acontece.

No caso do efeito do extrato de *cannabis* nas quantidades de cfDNA no LCR dos pacientes com DA, nossas observações mostraram que houve uma redução nestas concentrações, porém foi tanto no grupo placebo quanto aquele que recebeu *cannabis*, e assim não podemos afirmar que este extrato teve algum efeito direto na redução dos níveis de cfDNA após seis meses de tratamento. Não existem muitos estudos relacionados ao efeito da *cannabis* na produção e/ou presença de cfDNA em biofluidos. Um estudo de 2025 relatou que componentes da *cannabis*, especialmente o THC, após uma administração aguda e por meio da via inalatória, podem levar a uma redução nos níveis sanguíneos de cfDNA mitocondrial em pessoas com idade entre 19 e 25 anos. De maneira interessante, os autores observaram que, entre os indivíduos do estudo, estas reduções nas concentrações de cfDNA mitocondrial somente estavam presentes em pessoas que não costumavam consumir *cannabis* de maneira muito frequente, sugerindo que uma tolerância aos efeitos do THC e seus metabólitos pode estar associada ao conteúdo de cfDNA mitocondrial no sangue (POWLOWSKI *et al.*, 2025). Como discutido anteriormente, o cfDNA possui um amplo potencial como biomarcador em várias patologias, porém a especificidade do que a presença desta molécula pode indicar torna-se maior quando são realizadas análises para determinar o tipo de cfDNA que está presente, assim como a sua origem (liberado em quais células, a partir de quais mecanismos, por exemplo).

Diversas limitações devem ser consideradas no presente estudo. Primeiramente, é importante considerar que resultados de ensaios *in vitro* são essenciais no entendimento de mecanismos de ação, além de proporcionar informação sobre os possíveis efeitos que

um tratamento pode ter em pacientes. Porém, é comum que os efeitos observados em experimentos *in vitro* não sejam equivalentes quando testados em modelos animais e/ou em humanos. Por isso, os resultados de ensaios com células do nosso trabalho devem ser interpretados com a devida cautela e mais estudos são necessários, tanto ao nível não-clínico quanto clínico, para compreender com maior profundidade os efeitos dos fitocannabinóides nas células endoteliais da BHE e dos neutrófilos. Similarmente, no caso das concentrações de cfDNA nas amostras dos pacientes com DA, pesquisas posteriores onde seja possível analisar a origem e tipo deste cfDNA trarão novas percepções sobre o papel desta molécula na DA. Dificuldades que afetam a progressão eficiente do trabalho ocorreram ao longo desta pesquisa; perto do final do primeiro ano de mestrado aconteceu uma contaminação com micoplasma nas células HBMECs que, embora resolvido corretamente posteriormente, atrasou os experimentos com as células durante três meses. De forma similar, a falta de acesso ao laboratório de cultivo que ocorreu no segundo ano da pesquisa durante quase seis meses teve um impacto significativo na obtenção de resultados. Finalmente, a demora na aquisição de produtos e reagentes necessários para a pesquisa criou dificuldades no avanço efetivo dos experimentos.

De maneira geral, no presente trabalho observamos que, *in vitro*, fitocannabinóides são capazes de inibir a liberação de NETs em neutrófilos de pessoas saudáveis e, ao mesmo tempo, induzir a liberação de NETs em neutrófilos de pacientes com DA, ressaltando a importância de realizar mais estudos com o objetivo de determinar o verdadeiro efeito dos fitocannabinóides sob este mecanismo. Similarmente, observamos que o CBD e o THC têm propriedades citotóxicas nas células endoteliais da BHE a partir de certas concentrações, pelo que recomenda-se utilizar doses menores a 10 µg/ml destes compostos em futuros ensaios. Além disso, também determinamos que um tratamento de seis meses com extrato de *cannabis* não teve nenhum efeito nas concentrações de cfDNA no LCR de pacientes com DA. Os níveis do cfDNA do LCR e do plasma tiveram correlações muito variadas com diversos parâmetros relevantes da DA, mostrando que esta molécula possui um grande potencial como biomarcador na DA. Porém, torna-se essencial realizar mais estudos onde seja possível determinar com maior certeza a origem e natureza do cfDNA e se, por exemplo, está relacionado às NETs e outros marcadores moleculares que estão ganhando relevância na pesquisa da DA.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que o CBD e o THC exercem efeitos citotóxicos dose-dependentes em HBMECs, além de modularem de forma distinta a liberação de NETs conforme o estado patológico e a idade, enquanto o THC não altera a migração celular. Adicionalmente, o cfDNA mostrou-se diferencialmente distribuído entre LCR e plasma e associado de maneira distinta a parâmetros clínicos da DA; estas conclusões são fundamentadas nos resultados resumidos abaixo:

- CBD e THC possuem atividade citotóxica nas HBMECs de maneira dose dependente, e os efeitos aparentam estar mediados pelo receptor CB1, no caso do THC, e por nenhum dos receptores CB1 ou CB2, no caso do CBD.
- O THC não afeta a migração celular das HBMECs.
- O CBD inibe a liberação de NETs, induzido por PMA, em neutrófilos de pessoas saudáveis e o THC induz a liberação das NETs em neutrófilos de pacientes idosos com DA, sugerindo diferenças na ação de fitocannabinóides dependendo do estado patológico e a idade das pessoas.
- As concentrações de cfDNA no LCR são mais elevadas do que no plasma em pacientes com DA.
- O cfDNA no LCR apresentou uma tendência a uma correlação negativa com o desempenho cognitivo, sugerindo uma possível relação entre esta molécula e o declínio cognitivo na DA. De maneira interessante, o cfDNA do plasma apresentou uma relação oposta a esta.
- De maneira geral, os níveis de cfDNA, tanto no LCR quanto no plasma, apresentaram relações diferentes com diversos parâmetros da DA, e é importante determinar com maior exatidão o tipo de cfDNA que está sendo quantificado e a origem do mesmo, para poder analisar com maior certeza seu potencial como biomarcador.

7 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, além das limitações e dificuldades encontradas ao longo do mesmo, se dará continuação ao estudo através das seguintes abordagens:

- Padronizar os procedimentos de produção de NETs e quantificação das mesmas.
- Será testado o efeito do THC na liberação de NETs em neutrófilos de indivíduos saudáveis e o do CBD em neutrófilos de pacientes com DA. Neste último ensaio, será incluído um grupo controle de idade similar.
- Com alíquotas contendo concentrações conhecidas de NETs, será estudado o efeito direto das NETs na viabilidade das HBMECs. Posteriormente, poderá ser estudado se os mesmos tratamentos com fitocanabinóides usados neste estudo são capazes de inibir o efeito deletério das NETs nas HBMECs.
- Serão testados mais inibidores nas HBMECs (GPR55 e PPAR γ , por exemplo) para aprofundar mais o conhecimento sobre as vias de sinalização envolvidas no efeito dos fitocanabinóides nas células.
- Similarmente serão utilizados inibidores dos receptores CB1, CB2, GPR55 e PPAR γ nos neutrófilos para analisar se os efeitos que os fitocanabinóides tiveram na liberação de NETs continuam após o bloqueio desses receptores.
- Para confirmar a presença de NETs nas amostras de biofluidos dos pacientes com DA, será padronizado um ELISA que seja específico para DNA de dupla fita e proteases das NETs (MPO, elastase, etc.).
- Para avaliar se a presença de DNAses poderia estar relacionada com as concentrações detectadas nas amostras dos pacientes, será quantificada a concentração desta enzima nas amostras de LCR e plasma dos pacientes com DA.

8 FINANCIAMENTO

O presente trabalho conta com o apoio da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, bolsa DS (Demanda Social), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do NAPI Cannabis - Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. J.; FRIEDMAN, A. 2012. Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. **Epilepsia**, v. 53, n. 6, p. 1-6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03696.x>>. Acesso em: 15 abr. 2025.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; SOYDANER, U.; ÖZTÜRK, E. et al. 2016. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 2, p. 324-331. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>>. Acesso em: 20 maio 2025.

ALAHMARI, A. 2021. Blood-brain barrier overview: structural and functional correlation. **Neural Plasticity**, v. 2021, n. 1, p. 6564585. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2021/6564585>>. Acesso em: 10 jun. 2024.

ANIL, S. M.; PEERI, H.; KOLTAI, H. 2022. Medical cannabis activity against inflammation: active compounds and modes of action. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 908198. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908198>>. Acesso em: 03 jul. 2025.

AYDIN, Ş.; ÖZDEMİR, S.; ADIGÜZEL, A. 2025. The potential of cfDNA as biomarker: opportunities and challenges for neurodegenerative diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 75, n. 1, p. 34. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12031-025-02317-8>>. Acesso em: 12 ago. 2025.

AZEVEDO, E. P.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; TOREZANI, G. S. et al. 2012. Amyloid fibrils trigger the release of neutrophil extracellular traps (NETs), causing fibril fragmentation by NET-associated elastase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 44, p. 37206-37218. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369942>>. Acesso em: 18 set. 2024.

BAIK, S. H.; CHA, M. Y.; HYUN, Y. M. et al. 2014. Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 6, p. 1286-1292. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.003>>. Acesso em: 02 out. 2025.

BALENGA, N. A.; AFLAKI, E.; KARGL, J. et al. 2011. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. **Cell Research**, v. 21, n. 10, p. 1452-1469. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/cr.2011.60>>. Acesso em: 27 nov. 2024.

BARISANO, G.; MONTAGNE, A.; KISLER, K. et al. 2022. Blood-brain barrier links to human cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Nature Cardiovascular Research**, v. 1, n. 2, p. 108-115. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s44161-021-00014-4>>. Acesso em: 05 dez. 2025.

BARNUM, C. J.; TANSEY, M. G. 2012. Neuroinflammation and non-motor symptoms: the dark passenger of Parkinson's disease? **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 12, n. 4, p. 350-358. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11910-012-0283-6>>. Acesso em: 14 fev. 2026.

BEHL, T.; MAKKAR, R.; SEHGAL, A. et al. 2022. Exploration of multiverse activities of endocannabinoids in biological systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5734. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms23105734>>. Acesso em: 22 abr. 2025.

BERDYSHEV, E.; BOICHOT, E.; CORBEL, M. et al. 1998. Effects of cannabinoid receptor ligands on LPS-induced pulmonary inflammation in mice. **Life Sciences**, v. 63, n. 8, p. PL125-PL129. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00324-5](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00324-5)>. Acesso em: 09 maio 2024.

BERRY, A. J.; ZUBKO, O.; REEVES, S. J.; HOWARD, R. J. 2020. Endocannabinoid system alterations in Alzheimer's disease: a systematic review of human studies. **Brain Research**, v. 1749, n. 1, p. 147135. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147135>>. Acesso em: 11 jun. 2025.

BJELOBABA, I.; SAVIC, D.; LAVRNJA, I. 2017. Multiple sclerosis and neuroinflammation: the overview of current and prospective therapies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 5, p. 693-730. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1381612822666161214153108>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

BORSCHÉ, M.; KÖNIG, I. R.; DELCAMBRE, S. et al. 2020. Mitochondrial damage-associated inflammation highlights biomarkers in PRKN/PINK1 parkinsonism.

Brain, v. 143, n. 10, p. 3041-3051. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/brain/awaa246>>. Acesso em: 18 nov. 2025.

BOTCHWAY, B. O. A.; MOORE, M. K.; AKINLEYE, F. O.; IYER, I. C.; FANG, M. 2018. Nutrition: review on the possible treatment for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 61, n. 3, p. 867-883. Disponível em: <<https://doi.org/10.3233/JAD-170874>>. Acesso em: 07 set. 2024.

BRATSETH, V.; WATNE, L. O.; NEERLAND, B. E. et al. 2024. Increased cell-free DNA in CSF and serum of hip fracture patients with delirium. **Brain Communications**, v. 7, n. 1, p. fcae452. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/braincomms/fcae452>>. Acesso em: 19 out. 2025.

BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. 2020. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5789. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25245789>>. Acesso em: 04 jun. 2024.

BRINKMANN, V. 2021. Neutrophil releasing NETs. Disponível em: <<https://www.mpiib-berlin.mpg.de/2065118/neutrophil-extracellular-traps-aktivieren-das-immunsystem>> Acesso em: 20 Fev 2026.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C. et al. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1092385>>. Acesso em: 13 maio. 2024.

BROOKMEYER, R.; JOHNSON, E.; ZIEGLER-GRAHAM, K.; ARRIGHI, H. M. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, n. 3, p. 186-191. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.04.381>>. Acesso em: 08 fev. 2024.

CHOIPARK, W.; BAEK, S. H.; CHU, J. P.; KANG, M.; MI, Y. 2008. Cannabidiol induces cytotoxicity and cell death via apoptotic pathway in cancer cell lines. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 16, n. 1, p. 87-94. Disponível em: <<https://scispace.com/pdf/cannabidiol-induces-cytotoxicity-and-cell-death-via-rpr2sgtn46.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2025.

CONTI FILHO, C. E.; LOSS, L. B.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. 2023. Advances in Alzheimer's disease's pharmacological treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, n. 1, p. 1101452. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1101452>>. Acesso em: 28 maio 2025.

CORTJENS, B.; VAN WOENSEL, J. B.; BEM, R. A. 2017. Neutrophil extracellular traps in respiratory disease: guided anti-microbial traps or toxic webs? **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 21, n. 1, p. 54-61. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prrv.2016.03.007>>. Acesso em: 09 jun. 2024.

CURY, R. M.; DA SILVA, T.; CEZAR-DOS-SANTOS, F. et al. 2025. A randomized clinical trial of low-dose cannabis extract in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 108, n. 4, p. 1602-1613. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/13872877251389608>>. Acesso em: 14 jul. 2025.

DANEMAN, R.; PRAT, A. 2015. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a020412. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>>. Acesso em: 03 ago. 2024.

DE MIRANDA, F. S.; BARAUNA, V. G.; DOS SANTOS, L. et al. 2021. Properties and application of cell-free DNA as a clinical biomarker. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9110. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22179110>>. Acesso em: 22 set. 2025.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A. et al. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1470919>>. Acesso em: 11 out. 2024.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771-784. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrd1495>>. Acesso em: 30 nov. 2025.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L.; BISOGNO, T. 2005. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, n. 1, p. 147-185. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_5>. Acesso em: 06 dez. 2024.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. 2016. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 2, p. 136-153. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jnc.13607>>. Acesso em: 12 fev. 2026.

DISTASI, M. R.; LEY, K. 2009. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 11, p. 547-556. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.012>>. Acesso em: 18 abr. 2024.

DONG, Y.; LAGARDE, J.; XICOTA, L. et al. 2018. Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression. **Annals of Neurology**, v. 83, n. 2, p. 387-405. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ana.25159>>. Acesso em: 27 maio 2024.

ERICKSON, M. A.; BANKS, W. A. 2013. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 10, p. 1500-1513. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.135>>. Acesso em: 09 jun. 2024.

ESPOSITO, G.; SCUDERI, C.; SAVANI, C. et al. 2007. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 8, p. 1272-1279. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707337>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ESPOSITO, G.; SCUDERI, C.; VALENZA, M. et al. 2011. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28668. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028668>>. Acesso em: 30 ago. 2025.

FILIANO, A. J.; GADANI, S. P.; KIPNIS, J. 2015. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. **Brain Research**, v. 1617, n. 1, p. 18-27. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.07.050>>. Acesso em: 12 set. 2024.

FU, A. K.; HUNG, K. W.; YUEN, M. Y. et al. 2016. IL-33 ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 19, p. E2705-E2713. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1604032113>>. Acesso em: 05 out. 2025.

GADHAVE, D. G.; SUGANDHI, V. V.; JHA, S. K. et al. 2024. Neurodegenerative disorders: mechanisms of degeneration and therapeutic approaches with their clinical relevance. **Ageing Research Reviews**, v. 99, n. 1, p. 102357. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102357>>. Acesso em: 17 nov. 2024.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. 1964. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 1, p. 1646-1647. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja01062a046>>. Acesso em: 22 dez. 2025.

GARDINASSI, L. G.; DESOUZA-VIEIRA, T. S.; DA SILVA, N. O. et al. 2017. Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 285. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2222-5>>. Acesso em: 10 fev. 2026.

GNECCO, G.; DAVINI, A.; VALERIANO, A. et al. 2025. Sex-related differences in cell-free DNA and neutrophil extracellular traps in patients with hematologic malignancies. **Immunologic Research**, v. 73, n. 1, p. 124. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12026-025-09677-8>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

GOVINDARAJAN, R. K.; MISHRA, A. K.; CHO, K. H. et al. 2023. Biosynthesis of Phytocannabinoids and Structural Insights: A Review. **Metabolites**, v. 13, n. 3, p. 442. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/metabo13030442>>. Acesso em: 09 mar. 2026.

GÜLCK, T.; MØLLER, B. L. 2020. Phytocannabinoids: origins and biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 10, p. 985-1004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>>. Acesso em: 28 maio 2024.

GUPTA, R. C.; PITT, J.; ZAJA-MILATOVIC, S. 2015. Blood–brain barrier damage and dysfunction by chemical toxicity. **Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents**, v. 49, n. 2, p. 725-739. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00049-X>>. Acesso em: 07 jun. 2024.

HAGAN, K.; VARELAS, P.; ZHENG, H. 2022. Endocannabinoid system of the blood-brain barrier: current understandings and therapeutic potentials. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 7, n. 5, p. 561-568. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/can.2021.0101>>. Acesso em: 19 jul. 2024.

HANUŠ, L. O.; MEYER, S. M.; MUÑOZ, E. et al. 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 12, p. 1357-1392. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c6np00074f>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

HAWKINS, R. A.; O'KANE, R. L.; SIMPSON, I. A.; VIÑA, J. R. 2006. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 218S-26S. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/136.1.218S>>. Acesso em: 11 set. 2024.

HELMS, H. C.; ABBOTT, N. J.; BUREK, M. et al. 2016. In vitro models of the blood-brain barrier: an overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 36, n. 5, p. 862-890. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>>. Acesso em: 22 out. 2025.

HENEKA, M. T.; CARSON, M. J.; EL KHOURY, J. et al. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)>. Acesso em: 03 abr. 2024.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358-372. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrn3880>>. Acesso em: 14 maio. 2024.

HIND, W. H.; ENGLAND, T. J.; O'SULLIVAN, S. E. 2016. Cannabidiol protects an in vitro model of the blood-brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR γ and 5-HT $1A$ receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 5, p. 815-825. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/bph.13368>>. Acesso em: 08 abr. 2024.

JONKMAN, J. E.; CATHCART, J. A.; XU, F. et al. 2014. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 5, p. 440-451. Disponível em: <<https://doi.org/10.4161/cam.36224>>. Acesso em: 02 maio 2024.

JYLHÄVÄ, J.; KOTIPELTO, T.; RAITALA, A. et al. 2011. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 1-2, p. 20-26. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.11.001>>. Acesso em: 14 nov. 2025.

JYLHÄVÄ, J.; NEVALAINEN, T.; MARTTILA, S. et al. 2013. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. **Aging Cell**, v. 12, n. 3, p. 388-397. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/acer.12058>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

KAPELLOS, T. S.; TAYLOR, L.; FEUERBORN, A. et al. 2019. Cannabinoid receptor 2 deficiency exacerbates inflammation and neutrophil recruitment. **FASEB Journal**, v. 33, n. 5, p. 6154-6167. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.201802524R>>. Acesso em: 11 ago. 2025.

KAUR, R.; AMBWANI, S. R.; SINGH, S. 2016. Endocannabinoid system: a multi-facet therapeutic target. **Current Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 110-117. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1574884711666160418105339>>. Acesso em: 03 jun. 2024.

KESHARI, R. S.; JYOTI, A.; DUBEY, M. et al. 2012. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e48111. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048111>>. Acesso em: 17 out. 2024.

KHO, D. T.; GLASS, M.; GRAHAM, E. S. 2017. Is the cannabinoid CB2 receptor a major regulator of the neuroinflammatory axis of the neurovascular unit in humans? **Advances in Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 367-396. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.009>>. Acesso em: 26 nov. 2024.

KHODADADI, H.; SALLES, É. L.; JARRAHI, A. et al. 2021. Cannabidiol ameliorates cognitive function via regulation of IL-33 and TREM2 upregulation in a murine model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 80, n. 3, p. 973-977. Disponível em: <<https://doi.org/10.3233/JAD-210026>>. Acesso em: 09 dez. 2025.

KINNEY, J. W.; BEMILLER, S. M.; MURTISHAW, A. S. et al. 2018. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 4, n. 1, p. 575-590. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>>. Acesso em: 15 fev. 2025.

KNOPMAN, D. S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R. C. et al. 2021. Alzheimer disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 33. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>>. Acesso em: 18 abr. 2024.

KRAUS, R. F.; GRUBER, M. A. 2021. Neutrophils: from bone marrow to first-line defense of the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 767175. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.767175>>. Acesso em: 04 maio 2024.

KURIHARA, R.; TOHYAMA, Y.; MATSUSAKA, S. et al. 2006. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12908-12918. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M510871200>>. Acesso em: 12 jun. 2025.

LI, S. J.; GAO, X.; WANG, Z. H. et al. 2024. Cell-free DNA methylation patterns in aging and their association with inflamm-aging. **Epigenomics**, v. 16, n. 10, p. 715-731. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17501911.2024.2340958>>. Acesso em: 27 nov. 2025.

LIANG, C. S.; SU, K. P.; TSAI, C. L. et al. 2020. The role of interleukin-33 in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 86. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13195-020-00652-z>>. Acesso em: 09 jan. 2026.

LIN, Y. L.; CHANG, H. C.; CHEN, T. L. et al. 2010. Resveratrol protects against oxidized LDL-induced breakage of the blood-brain barrier by lessening disruption of tight junctions and apoptotic insults to mouse cerebrovascular endothelial cells. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2187-2192. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/jn.110.123505>>. Acesso em: 22 jun. 2024.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 399-415. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrn1106>>. Acesso em: 30 maio 2024.

LU, T. S.; AVRAHAM, H. K.; SENG, S. et al. 2008. Cannabinoids inhibit HIV-1 Gp120-mediated insults in brain microvascular endothelial cells. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6406-6416. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6406>>. Acesso em: 14 jun. 2024.

LUU, N. T.; RAINGER, G. E.; NASH, G. B. 1999. Kinetics of the different steps during neutrophil migration through cultured endothelial monolayers treated with tumour necrosis

factor-alpha. **Journal of Vascular Research**, v. 36, n. 6, p. 477-485. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000025690>>. Acesso em: 03 jun. 2024.

MACÍAS, M.; ACHA, B.; CORROZA, J. et al. 2023. Liquid biopsy in Alzheimer's disease patients reveals epigenetic changes in the PRLHR gene. **Cells**, v. 12, n. 23, p. 2679. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells12232679>>. Acesso em: 16 nov. 2025.

MACKIE, K. 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, n. 1, p. 299-325. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_10>. Acesso em: 11 abr. 2024.

MALHEIRO, R. F.; CARMO, H.; CARVALHO, F. et al. 2023. Cannabinoid-mediated targeting of mitochondria on the modulation of mitochondrial function and dynamics. **Pharmacological Research**, v. 187, n. 1, p. 106603. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106603>>. Acesso em: 22 jan. 2026.

MAKWANA, R.; VENKATASAMY, R.; SPINA, D. et al. 2015. The effect of phytocannabinoids on airway hyper-responsiveness, airway inflammation, and cough. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 353, n. 1, p. 169-180. Disponível em: <<https://doi.org/10.1124/jpet.114.221283>>. Acesso em: 19 jun. 2025.

MATHIOS, D.; NIKNAFS, N.; ANNAPRAGADA, A. V. et al. 2025. Detection of brain cancer using genome-wide cell-free DNA fragmentomes. **Cancer Discovery**, v. 15, n. 8, p. 1593-1608. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-25-0074>>. Acesso em: 07 dez. 2025.

MAYER, C. L.; HUBER, B. R.; PESKIND, E. 2013. Traumatic brain injury, neuroinflammation, and post-traumatic headaches. **Headache**, v. 53, n. 9, p. 1523-1530. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/head.12173>>. Acesso em: 25 jun. 2024.

MAZZANTINI, C.; CURTI, L.; LANA, D. et al. 2025. Prolonged incubation with Δ^9 -tetrahydrocannabinol but not with cannabidiol induces synaptic alterations and mitochondrial impairment in immature and mature rat organotypic hippocampal slices. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 183, n. 1, p. 117797. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117797>>. Acesso em: 21 jan. 2026.

MCHUGH, D.; TANNER, C.; MECHOULAM, R. et al. 2008. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 441-450. Disponível em: <<https://doi.org/10.1124/mol.107.041863>>. Acesso em: 28 jun. 2024.

MCKHANN, G. M.; KNOPMAN, D. S.; CHERTKOW, H. et al. 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 3, p. 263-269. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>>. Acesso em: 09 maio 2024.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. 1963. Hashish. I. The structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073-2078. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85022-x](https://doi.org/10.1016/0040-4020(63)85022-x)>. Acesso em: 17 jul. 2024.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L. et al. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83-90. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d)>. Acesso em: 06 abr. 2024.

MECHOULAM, R. 2014. Looking ahead after 50 years of cannabis research. **Cannabinoids**, v. 1, n. 1, p. 6-8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781118451281.ch1>>. Acesso em: 15 abr. 2024.

MEEGAN, J. E.; YANG, X.; COLEMAN, D. C. et al. 2017. Neutrophil-mediated vascular barrier injury: role of neutrophil extracellular traps. **Microcirculation**, v. 24, n. 3, p. e12352. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/micc.12352>>. Acesso em: 22 maio 2024.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 1, p. 279-367. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2005>>. Acesso em: 03 jun. 2024.

MELLO-HORTEGA, J. V.; DE OLIVEIRA, C. S.; DE ARAUJO, V. S. et al. 2025. Cannabidiol and Alzheimer disease: a comprehensive review and in silico insights into molecular interactions. **European Journal of Neuroscience**, v. 62, n. 4, p. e70229. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ejn.70229>>. Acesso em: 18 jan. 2026.

MELO, E. S. A.; ASEVEDO, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. 2025. Mechanisms of cell death induced by cannabidiol against tumor cells: a review of preclinical studies. **Plants**, v. 14, n. 4, p. 585. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants14040585>>. Acesso em: 11 fev. 2026.

MICHAILIDOU, D.; KULEY, R.; WANG, T. et al. 2023. Neutrophil extracellular trap formation in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated and large-vessel vasculitis. **Clinical Immunology**, v. 249, n. 1, p. 109274. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clim.2023.109274>>. Acesso em: 07 set. 2024.

MILLER, H.; DE LEO, N.; BADACH, J. et al. 2021. Role of marijuana components on the regenerative ability of stem cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 39, n. 3, p. 432-441. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cbf.3609>>. Acesso em: 14 out. 2024.

MUKHOPADHYAY, P.; RAJESH, M.; HORVÁTH, B. et al. 2011. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 10, p. 1368-1381. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.021>>. Acesso em: 05 jun. 2024.

MULLER, C.; MORALES, P.; REGGIO, P. H. 2019. Cannabinoid ligands targeting TRP channels. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 487. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>>. Acesso em: 27 abr. 2024.

NIDADAVOLU, L. S.; FEGER, D.; WU, Y. et al. 2022. Circulating cell-free genomic DNA is associated with an increased risk of dementia and with change in cognitive and physical function. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 89, n. 4, p. 1233-1240. Disponível em: <<https://doi.org/10.3233/JAD-220301>>. Acesso em: 12 nov. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2023. Dementia. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 03 jun. 2024.

PAPAYANNOPOULOS, V. 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134-147. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>>. Acesso em: 19 jul. 2025.

PARIKH, A. C.; JEFFERY, C. S.; SANDHU, Z. et al. 2024. The effect of cannabinoids on wound healing: a review. **Health Science Reports**, v. 7, n. 2, p. e1908. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/hsr2.1908>>. Acesso em: 27 ago. 2024.

PERTWEE, R. G. 2008. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199-215. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>>. Acesso em: 08 jun. 2025.

PIETRONIGRO, E. C.; DELLA BIANCA, V.; ZENARO, E. et al. 2017. NETosis in Alzheimer's disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1, p. 211. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00211>>. Acesso em: 14 abr. 2024.

PIETRONIGRO, E.; ZENARO, E.; CONSTANTIN, G. 2016. Imaging of leukocyte trafficking in Alzheimer's disease. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 1, p. 33. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00033>>. Acesso em: 21 abr. 2024.

POLLARD, C.; ASTON, K.; EMERY, B. R. et al. 2023. Detection of neuron-derived cfDNA in blood plasma: a new diagnostic approach for neurodegenerative conditions. **Frontiers in Neurology**, v. 14, n. 1, p. 1272960. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1272960>>. Acesso em: 02 dez. 2025.

POLLARD, C. A.; SAITO, E. R.; BURNS, J. M. et al. 2024. Considering biomarkers of neurodegeneration in Alzheimer's disease: the potential of circulating cell-free DNA in precision neurology. **Journal of Personalized Medicine**, v. 14, n. 11, p. 1104. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jpm14111104>>. Acesso em: 02 dez. 2025.

POWLOWSKI, P.; MATHESON, J.; LE FOLL, B. et al. 2025. Acute cannabis administration transiently reduces mitochondrial DNA in young adults: findings from a secondary analysis of a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 10, n. 2, p. e314-e322. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/can.2023.0282>>. Acesso em: 11 fev. 2026.

QUEIROZ, C. M.; DE OLIVEIRA KOREN, L.; DA SILVA, C. R. P. et al. 2025. Chemical diversity, receptor binding affinity, and pharmacology of phytocannabinoids: insights into

neuronal mechanisms. **Progress in Brain Research**, v. 296, n. 1, p. 1-28. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2025.07.006>>. Acesso em: 15 jan. 2026.

QUERFURTH, H.; LAFERLA, F. 2010. Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329-344. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>>. Acesso em: 22 maio 2024.

RADA, B. 2019. Neutrophil extracellular traps. **Methods in Molecular Biology**, v. 1982, n. 1, p. 517-528. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_31>. Acesso em: 03 jul. 2024.

RAHAMAN, O.; GANGULY, D. 2021. Endocannabinoids in immune regulation and immunopathologies. **Immunology**, v. 164, n. 2, p. 242-252. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/imm.13378>>. Acesso em: 18 ago. 2024.

RAMER, R.; FISCHER, S.; HAUSTEIN, M. et al. 2014. Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 91, n. 2, p. 202-216. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.06.017>>. Acesso em: 09 jan. 2026.

RAMESH, G.; MACLEAN, A. G.; PHILIPP, M. T. 2013. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, n. 1, p. 480739. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/480739>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

REN, G.; ZHANG, X.; LI, Y. et al. 2021. Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of Cannabis sativa. **Science Advances**, v. 7, n. 29, p. eabg2286. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/sciadv.abg2286>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L. et al. 2012. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, n. 1-3, p. 78-85. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.043>>. Acesso em: 05 maio 2024.

RIGHI, D.; MANCO, C.; PARDINI, M. et al. 2025. Investigating interleukin-8 in Alzheimer's disease: a comprehensive review. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 103, n. 1, p. 38-55. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/13872877241298973>>. Acesso em: 14 jan. 2026.

ROBAINA CABRERA, C. L.; KEIR-RUDMAN, S.; HORNIMAN, N. et al. 2021. The anti-inflammatory effects of cannabidiol and cannabigerol alone, and in combination. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 1, p. 102047. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2021.102047>>. Acesso em: 02 jun. 2024.

RUSSO, Ethan B. 2007. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1614-1648. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>>. Acesso em: 12 maio 2024.

RUVER-MARTINS, A. C.; BICCA, M. A.; DE ARAUJO, F. S.; et al. 2022. Cannabinoid extract in microdoses ameliorates mnemonic and nonmnemonic Alzheimer's disease symptoms: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 16, n. 1, p. 277-277. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13256-022-03457-w>>. Acesso em: 05 jul. 2024.

SAFFARZADEH, M.; JUENEMANN, C.; QUEISSER, M. A.; et al. 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32366-e32366. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SAHIN, F.; BREINBAUER, R.; LINNEMANN, C.; et al. 2025. Quantification of circulating cell-free DNA as a NETosis marker in trauma patients with type 2 diabetes mellitus. **Methods and Protocols**, v. 8, n. 2, p. 42-42. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/mps8020042>>. Acesso em: 14 jan. 2026.

SANTOS-LIMA, B.; PIETRONIGRO, E. C.; TERRABUIO, E.; et al. 2022. The role of neutrophils in the dysfunction of central nervous system barriers. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, p. 965169-965169. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.965169>>. Acesso em: 02 jun. 2024.

SARAFIAN, T. A.; KOUYOUMJIAN, S.; KHOSHAGHIDEH, F.; et al. 2003. Delta 9-tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetics. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, n. 2, p.

L298-L306. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajplung.00157.2002>>. Acesso em: 19 jan. 2026.

SAUNDERS, N. R.; EK, C. J.; HABGOOD, M. D.; et al. 2008. Barriers in the brain: a renaissance? **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 6, p. 279-286. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.03.003>>. Acesso em: 11 jun. 2024.

SEEGERT, L. 2025. Controversial new Alzheimer's drugs offer hope—but at a high cost. **Nature**, v. 645, n. 8081, p. S10-S12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/d41586-025-02927-7>>. Acesso em: 07 jun. 2024.

SOEHNLEIN, O.; STEFFENS, S.; HIDALGO, A.; et al. 2017. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 248-261. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>>. Acesso em: 23 maio 2024.

SOTO, M. E.; ANDRIEU, S.; CANTET, C.; et al. 2008. Predictive value of rapid decline in mini mental state examination in clinical practice for prognosis in Alzheimer's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 26, n. 2, p. 109-116. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000144073>>. Acesso em: 30 nov. 2024.

STOIBER, W.; OBERMAYER, A.; STEINBACHER, P.; et al. 2015. The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 702-723. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biom5020702>>. Acesso em: 18 jan. 2026.

STONE, N. 2021. **Phytocannabinoids, neuroprotection and the blood-brain barrier**. Orientadores: O'SULLIVAN, S (orientador), ENGLAND, T (coorientador). 127 f. Tese (Doutorado) - SMPP (*School of Medicine PhD Program*), UN (*University of Nottingham*), Nottingham, Reino Unido. Disponível em: <<https://eprints.nottingham.ac.uk/id/eprint/65309>>. Acesso em: 24 jun. 2024.

STONE, N. L.; ENGLAND, T. J.; O'SULLIVAN, S. E. 2021. Protective effects of cannabidiol and cannabigerol on cells of the blood-brain barrier under ischemic conditions. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 6, n. 4, p. 315-326. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/can.2020.0159>>. Acesso em: 03 out. 2025.

SUKRITI, S.; TAUSEEF, M.; YAZBECK, P.; et al. 2014. Mechanisms regulating endothelial permeability. **Pulmonary Circulation**, v. 4, n. 4, p. 535-551. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/677356>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

SVÍZENSKÁ, I.; DUBOVÝ, P.; SULCOVÁ, A. 2008. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures – a short review. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 501-511. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.05.010>>. Acesso em: 22 jun. 2024.

TETZ, V.; TETZ, G. 2016. Effect of deoxyribonuclease I treatment for dementia in end-stage Alzheimer's disease: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 10, n. 1, p. 131-131. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13256-016-0931-6>>. Acesso em: 14 jul. 2024.

THAPA, D.; CAIRNS, E. A.; SZCZESNIAK, A. M.; et al. 2018. The cannabinoids Δ 8THC, CBD, and HU-308 act via distinct receptors to reduce corneal pain and inflammation. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, n. 1, p. 11-20. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/can.2017.0041>>. Acesso em: 27 jun. 2025.

THIAM, H. R.; WONG, S. L.; WAGNER, D. D.; et al. 2020. Cellular mechanisms of NETosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 36, p. 191-218. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>>. Acesso em: 01 set. 2025.

TOHIDPOUR, A.; MORGUN, A. V.; BOITSOVA, E. B.; et al. 2017. Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 276-276. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00276>>. Acesso em: 16 abr. 2024.

TOSEVSKA, A.; FRANZKE, B.; HOFMANN, M.; et al. 2016. Circulating cell-free DNA, telomere length and bilirubin in the Vienna Active Ageing Study: exploratory analysis of a randomized, controlled trial. **Scientific Reports**, v. 6, n. __, p. 38084-38084. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep38084>>. Acesso em: 25 nov. 2025.

TSIOUMPEKOU, M.; KRIJGSMAN, D.; LEUSEN, J. H. W.; et al. 2023. The role of cytokines in neutrophil development, tissue homing, function and plasticity in health and

disease. **Cells**, v. 12, n. 15, p. 1981-1981. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells12151981>>. Acesso em: 11 jun. 2024.

TUPPO, E. E.; ARIAS, H. R. 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 2, p. 289-305. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.07.009>>. Acesso em: 02 jun. 2024.

TURNER, R. S.; THOMAS, R. G.; CRAFT, S.; et al. 2015. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 85, n. 16, p. 1383-1391. Disponível em: <<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002035>>. Acesso em: 19 set. 2025.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237-245. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20>. Acesso em: 27 nov. 2025.

VANDENBROUCKE, E.; MEHTA, D.; MINSHALL, R.; et al. 2008. Regulation of endothelial junctional permeability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1123, p. 134-145. Disponível em: <<https://doi.org/10.1196/annals.1420.016>>. Acesso em: 08 maio 2024.

VENDEL, E.; DE LANGE, E. C. 2014. Functions of the CB1 and CB2 receptors in neuroprotection at the level of the blood-brain barrier. **Neuromolecular Medicine**, v. 16, n. 3, p. 620-642. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12017-014-8314-x>>. Acesso em: 13 maio 2025.

VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; GRESPAN, R.; et al. 2009. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 779-789. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00367.x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WADDEN, J.; RAVI, K.; JOHN, V.; et al. 2022. Cell-free tumor DNA (cf-tDNA) liquid biopsy: current methods and use in brain tumor immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 882452-882452. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.882452>>. Acesso em: 05 fev. 2026.

WALKER, O. S.; GURM, H.; SHARMA, R.; et al. 2021. Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits invasion of HTR8/SVneo human extravillous trophoblast cells and negatively impacts mitochondrial function. **Scientific Reports**, v. 11, p. 4029-4029. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83563-9>>. Acesso em: 30 nov. 2025.

WANG, D.; LI, S. P.; FU, J. S.; et al. 2016. Resveratrol defends blood-brain barrier integrity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. **Journal of Neurophysiology**, v. 116, n. 5, p. 2173-2179. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/jn.00510.2016>>. Acesso em: 12 jun. 2024.

WANG, Y.; MUKHOPADHYAY, P.; CAO, Z.; et al. 2017. Cannabidiol attenuates alcohol-induced liver steatosis, metabolic dysregulation, inflammation and neutrophil-mediated injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12064-12064. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10924-8>>. Acesso em: 11 fev. 2025.

WATT, G.; KARL, T. 2017. In vivo evidence for therapeutic properties of cannabidiol (CBD) for Alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 20-20. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00020>>. Acesso em: 11 fev. 2026.

WÓJCIK, P.; GARLEY, M.; WROŃSKI, A.; et al. 2020. Cannabidiol modifies the formation of NETs in neutrophils of psoriatic patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6795-6795. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms21186795>>. Acesso em: 11 jun. 2024.

WU, S.; RAJIAH, T.; ALI, A. B. 2025. Therapeutic potential for cannabidiol on Alzheimer's disease-related neuroinflammation: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 24, p. 11963-11963. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms262411963>>. Acesso em: 11 fev. 2026.

YANG, M. C.; ZHANG, H. Z.; WANG, Z.; et al. 2016. The molecular mechanism and effect of cannabinoid-2 receptor agonist on the blood-spinal cord barrier permeability induced by ischemia-reperfusion injury. **Brain Research**, v. 1636, p. 81-92. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.047>>. Acesso em: 11 jun. 2025.

ZAIACHUK, M.; SURYAVANSHI, S. V.; PRYIMAK, N.; et al. 2023. The anti-inflammatory effects of *Cannabis sativa* extracts on LPS-induced cytokines release in human

macrophages. **Molecules**, v. 28, n. 13, p. 4991-4991. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules28134991>>. Acesso em: 11 jun. 2024.

ZENARO, E.; PIETRONIGRO, E.; DELLA BIANCA, V.; et al. 2015. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 880-886. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nm.3913>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

ZENARO, E.; PIACENTINO, G.; CONSTANTIN, G. 2017. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 107, p. 41-56. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07>>. Acesso em: 21 abr. 2024.

ZHANG, Q.; YANG, G.; LUO, Y.; et al. 2024. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: insights from peripheral immune cells. **Immunity & Ageing**, v. 21, n. 1, p. 38-38. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12979-024-00445-0>>. Acesso em: 17 maio 2024.