



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

HELOÍSA AIOLFI PADILHA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO DE *Cannabis sativa* E
CANABIDIOL ISOLADO EM *Caenorhabditis elegans***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA/RS

2024

HELOÍSA AIOLFI PADILHA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO DE *Cannabis sativa* E
CANABIDIOL ISOLADO EM *Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientador(a): Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila

URUGUAIANA/RS

2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

P123a Padilha, Heloísa Aiolfi
Avaliação da segurança do extrato de Cannabis sativa e
canabidiol isolado em Caenorhabditis elegans / Heloísa Aiolfi
Padilha.
58 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2024.
"Orientação: Daiana Silva de Ávila".

1. Canabinoides. 2. Desenvolvimento. 3. C. elegans. 4.
Toxicidade. I. Título.

Heloísa Aiolfi Padilha

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO DE *Cannabis sativa* E CANABIDIOL ISOLADO EM *Caenorhabditis elegans*

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em: 20 de fevereiro de 2024.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila
Orientadora
UNIPAMPA

Profa. Dra. Patricia Reckziegel
USP

Profa. Dra. Francielli Weber Santos Cibirin
UNIPAMPA

02/04/2024, 19:45

SEI/MUNIPAMPA - 1376752 - SISBI/Folha de Aprovação



Assinado eletronicamente por **DAIANA SILVA DE AVILA, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 23/02/2024, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **FRÂNCIELLI WEBER SANTOS CIBIN, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 23/02/2024, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Patricia Reckziegel, Usuário Externo**, em 26/02/2024, às 13:53, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1376752** e o código CRC **6DED3DB5**.

DEDICO ESSE TRABALHO AOS MEUS FILHOS FELINOS, CAETANO E CATARINA, E ÀQUELES QUE ESTIVERAM AO MEU LADO DURANTE TODO ESSE PROCESSO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por sempre ter indicado o melhor caminho a ser seguido.

A minha mãe, por permitir que eu vivencie todas essas experiências da melhor forma possível. Com teu apoio eu pude seguir meu sonho, estudando

longe de casa e com todo o conforto de um lar. Você é meu exemplo de mulher guerreira e minha inspiração como professora exemplar. Espero seguir te dando muito orgulho e conseguir atingir 1% da professora dedicada e cuidadosa que você foi. Te amo, mãe!

A meu pai e minha irmã, obrigada por acreditarem em mim e confiarem no meu potencial. O apoio de vocês me dá forças para seguir essa jornada.

Aos meus gatos, Caetano e Catarina, por permanecerem ao meu lado durante todo esse processo. A vida é uma jornada individual, mas os animais são aqueles que sentem e compartilham todos os seus sentimentos, sejam de alegria ou de angústias, doando um amor incondicional. Muito obrigada, meus filhotinhos!

Ao João Vitor Meneghetti, por embarcar comigo nessa jornada e enfrentar um processo longo e desconhecido mesmo à 370km de distância. Obrigada por todas as nossas conversas sobre o futuro no âmbito pessoal e principalmente profissional. Isso me dá forças para seguir!

Aprendi que a vida não pode ser vivida sem bons amigos. Aos meus amigos de São Lourenço do Oeste, agradeço pelas conversas diárias, ligações por vídeo e tantos momentos de risadas genuínas. Com vocês consigo libertar a criança que vive em mim. Amo muito vocês! As minhas amigas de Uruguaiana, obrigada por termos criado essa amizade tão linda que permanecerá para sempre.

Aos meus colegas do GBToxCe, obrigada por tornarem meus dias mais leves e por aguentarem todos os meus momentos de surto com muito cuidado e compreensão. É prazeroso compartilhar meu dia-a-dia com um grupo tão querido! E obrigada aos meus ICs, Julia e Jean, por todo apoio nesse trabalho.

A professora Daiana, muito obrigada por todo acolhimento! Obrigada por cumprir o papel de orientadora da melhor forma, não medindo esforços para o nosso sucesso! Ao longo desse tempo minha admiração por você só cresceu e seguirei me inspirando nos seus passos para ser uma boa profissional.

“Nunca deixe o medo de errar impedir que você jogue”

Albert Einstein

RESUMO

A *Cannabis sativa* possui mais de 400 compostos bioativos, incluindo flavonoides, terpenos, ácidos graxos e fitocanabinoides, sendo utilizada há milhares de anos para fins medicinais e também como droga recreativa. Dentre os principais fitocanabinoides presentes nesta planta estão tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD). O THC é o ativo responsável pelos efeitos de euforia e alteração na percepção sensorial, atribuindo o perfil farmacológico da planta principalmente ao CBD. A utilização de CBD para fins terapêuticos abrange um amplo leque de doenças e distúrbios e após a descoberta do sistema endocanabinoide em humanos, despertou-se o interesse de investigar as atividades farmacológicas da *Cannabis spp.* e seu possível mecanismo de ação. Porém, estudos indicam efeitos adversos no uso de canabinoides, destacando a necessidade de ensaios clínicos e avaliações de riscos antes da recomendação generalizada do CBD para diferentes faixas etárias. Nós utilizamos o *Caenorhabditis elegans*, para a realização das análises toxicológicas do extrato de *Cannabis sativa* 5% CBD (EXT) e do CBD isolado (CBD). Após exposição crônica (48h) de animais no primeiro estágio larval, identificamos que as maiores concentrações testadas de EXT e CBD apresentaram toxicidade na sobrevivência, capacidade de locomoção e desenvolvimento dos vermes. Entretanto, a menor concentração não apresentou evidências de toxicidade. Por fim, observamos que o sistema reprodutor dos vermes não foi alterado pelo tratamento e uma investigação mais específica indicou que os canabinoides não causaram danos nos neurônios colinérgicos e no sistema dopaminérgico. A nossa investigação demonstrou a influência dos canabinoides no desenvolvimento do *C. elegans*. Além disso, sugerimos que na concentração de 10 μ M, CBD e EXT não foram tóxicos para o verme, tornando-se um potencial farmacológico promissor para posterior exploração do isolado.

Palavras-chave: Canabinoides, desenvolvimento, toxicidade, *C. elegans*

ABSTRACT

Cannabis sativa has more than 400 bioactive compounds, including flavonoids, terpenes, fatty acids and phytocannabinoids, and has been used for thousands of years for medicinal purposes and also as a recreational drug. Among the main phytocannabinoids present in this plant are tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). THC is the active ingredient responsible for the effects of euphoria and changes in sensory perception, attributing the pharmacological profile of the plant mainly to CBD. The use of CBD for therapeutic purposes covers a wide range of diseases and disorders and after the discovery of the endocannabinoid system (eCBS) in humans, interest was awakened in investigating the pharmacological activities of *Cannabis spp.* and its possible mechanism of action. However, studies indicate adverse effects from the use of cannabinoids, highlighting the need for clinical trials and risk assessments before the widespread recommendation of CBD for different age groups. We used *Caenorhabditis elegans* to carry out toxicological analyzes of *Cannabis sativa* extract 5% CBD (EXT) and isolated CBD (CBD). After chronic exposure (48h) of animals in the first larval stage, we identified that the highest tested concentrations of EXT and CBD presented toxicity on the survival, locomotion capacity and development of the worms. However, the lowest concentration showed no evidence of toxicity. Finally, we observed that the reproductive system of worms was not altered by the treatment and a more specific investigation indicated that cannabinoids did not cause damage to cholinergic neurons and the dopaminergic system. Our research has demonstrated the influence of cannabinoids on *C. elegans* development. Furthermore, we suggest that at 10 μ M, CDB and EXT were not toxic to the worm, making it a promising pharmacological potential for further exploration of the isolate.

Keywords: Cannabinoids, development, toxicity, *C. elegans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição Geográfica da <i>Cannabis sativa</i> L. (Fonte: Hourfane et al., 2023)	
.....	18
Figura 2 - Estrutura molecular dos fitocanabinoides	18
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Caenorhabditis elegans</i> a 22°C. (Fonte: WormAtlas).....	25
Figura 4 - Semelhança na síntese e degradação dos endocanabinoides em humanos e em <i>C. elegans</i> . (Fonte: Estrada-Valencia et al., 2021)	26

LISTA DE ABREVIATURAS

CBD - canabidiol

THC - tetrahydrocannabinol

AEA - anandamida

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

NAPE-PLD - N-acilfosfatidiletanolamina D

DAGL- α/β - Diacilglicerol lipase α/β

FAAH - amida hidrolases de ácidos graxos

MAGL - monoacilglicerol lipase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 <i>CANNABIS SATIVA</i>	17
3.2 PRINCIPAIS EFEITOS ATRIBUÍDOS AO CANABIDIOL.....	19
3.2.1 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	19
3.2.2 TOXICIDADE	21
3.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE	22
3.4 SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	24
5. MATERIAIS, METODOS E RESULTADOS.....	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, é originária da Ásia e tem uma distribuição global devido à sua adaptação a diversos climas (Hourfane et al., 2023). Contendo mais de 400 compostos bioativos, incluindo polifenóis, flavonoides, terpenos e fitocanabinoides como o canabidiol (CBD) e o tetrahydrocannabinol (THC), a planta é associada a efeitos terapêuticos e recreativos (Pattnaik et al., 2022). O CBD destaca-se por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras, enquanto o THC é responsável, principalmente, pelos efeitos psicoativos, levando ao consumo recreativo (Brighenti et al., 2021).

O uso terapêutico da *Cannabis sativa* já ocorre há milhares de anos, mas o interesse da ciência em avaliar a sua eficácia é recente. A dosagem recomendada para aplicações medicinais varia conforme características individuais e a patologia em questão, porém é interessante avaliar a eficácia de doses mais baixas, visando diminuir qualquer efeito adverso desconhecido (Arnold et al., 2023). Embora em alguns países o uso medicinal da *Cannabis sativa* seja legalizado, e tenha havido um aumento notável na prescrição e estudo clínicos de medicamentos a base de canabinoides, é necessário aprofundar os estudos relacionado a toxicidade relacionadas a esse uso, bem como ao uso do extrato de *Cannabis sativa* e o CBD isolado. Estudos indicam efeitos adversos no desenvolvimento, sistema reprodutivo, problemas no desenvolvimento cerebral e hepatotoxicidade em modelos animais, destacando a necessidade de ensaios clínicos e avaliações de riscos antes da recomendação generalizada do CBD para diferentes faixas etárias (Gingrich et al., 2023; Li et al., 2023).

Desde a descoberta do sistema endocanabinoide em 1990, as pesquisas sobre o uso de canabinoides para diversas doenças têm aumentado. O eCBS influencia a rede neuromoduladora, operando por meio de endocanabinoides como a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), enzimas metabólicas e receptores canabinoides CB1 e CB2. Os receptores CB1 são predominantemente encontrados no sistema nervoso, enquanto os receptores CB2 estão associados a células do sistema imunológico (Lu & Mackie, 2021). Além disso, os canabinoides exógenos, CBD e THC, também desempenham um

papel significativo na ativação desses receptores (Lu & Mackie, 2021). Assim, despertando um crescente interesse entre pesquisadores para melhor compreender os mecanismos subjacentes e explorar aplicações terapêuticas potenciais.

O *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um modelo interessante para a pesquisa toxicológica de canabinoides, proporcionando uma alternativa aos estudos em mamíferos e alinhando-se com os princípios dos 3R's, (do inglês *refine, replace, reduce*). Este nematoide de vida livre, descoberto por Sydney Brenner em 1960, oferece facilidade de manuseio, manutenção e rápida reprodução (Hunt, 2017). O *C. elegans* possui um ciclo de vida curto (aproximadamente 23 dias), bem como tem o corpo transparente; característica que permite realizar análises *in vivo* marcadas com proteína verde fluorescente (Corsi et al., 2015). Além disso, a existência do sistema endocanabinoide em *C. elegans*, a capacidade de sintetizar endocanabinoides e a crescente utilização do modelo em estudos com CBD indicam seu potencial em contribuir para a compreensão dos efeitos terapêuticos e toxicológicos dos canabinoides (Estrada-Valencia et al., 2021).

Considerando a necessidade de aprofundar os estudos sobre o impacto do CBD, o presente estudo foi delineado com o intuito de avaliar os efeitos do extrato de *Cannabis sativa* 5% CBD bem como do CBD isolado. Assim, foram analisadas as ações desses canabinoides na sobrevivência, desenvolvimento e sistema reprodutivo após uma exposição crônica, utilizando o modelo *in vivo* de *C. elegans*. Ademais, foi observado o envolvimento dos sistemas de neurotransmissores colinérgicos e dopaminérgicos.

2. JUSTIFICATIVA

A *Cannabis sativa* tem sido empregada pela sociedade há muitos anos devido ao seu potencial terapêutico proporcionado pelo CBD, bem como ao seu uso recreativo associado ao THC. Extratos de *Cannabis sativa* e produtos de CBD isolado já vem sendo prescritos para o tratamento e atenuação de muitas patologias, principalmente relacionadas com distúrbios neuronais. A autorização de medicamentos à base de extratos de *Cannabis sativa* e CBD foi realizada

pelos órgãos reguladores a partir da apresentação de estudos que indicaram a eficácia destes produtos.

Entretanto, o uso de *Cannabis sativa* pode levar a efeitos adversos que permanecem desconhecidos, principalmente no que diz respeito ao seu uso a longo prazo. Esta incerteza causa particular preocupação no contexto da prescrição de medicamentos à base de canabinoides, especialmente para bebês e crianças na primeira infância, fases cruciais para o desenvolvimento do cérebro e do corpo.

Sendo assim, ainda há controvérsia em relação a eficácia e segurança na prescrição de produtos à base de canabinoides, principalmente devido a escassez de informações sobre seus efeitos toxicológicos a longo prazo. Nesse sentido, a condução de uma avaliação toxicológica em um modelo experimental alternativo, como o *C. elegans*, não apenas pode enriquecer as pesquisas, mas também proporcionar insights adicionais sobre a toxicidade e os possíveis mecanismos envolvidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição crônica ao extrato de *Cannabis sativa* e do canabidiol isolado no modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de sobrevivência do *C. elegans* após a exposição com o extrato e o canabidiol isolado.;
- Analisar a interferência do extrato e do canabidiol isolado no desenvolvimento do *C. elegans*;
- Verificar se a exposição ao extrato e ao canabidiol isolado alteram a reprodução do *C. elegans*;
- Investigar se a exposição ao extrato e ao canabidiol isolado alteram o sistema locomotor do *C. elegans*.
- Pesquisar o envolvimento dos sistemas dopaminérgico e colinérgico no possível efeito toxicológico do extrato e do canabidiol isolado em *C. elegans*.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Cannabis sativa*

A *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como marijuana ou maconha, é uma planta pertencente ao gênero *Cannabis* e à família Cannabaceae. Apesar da sua origem asiática, a *Cannabis spp.* possui uma ampla distribuição geográfica, uma vez que consegue se adaptar a diversos ambientes climáticos (Figura 1). Além disso, a espécie *Cannabis sativa* apresenta uma diversidade de fenótipos que contribuem para a identificação de sub espécies, sendo classificadas atualmente em *Cannabis sativa ssp. sativa*, *Cannabis sativa ssp. indica*, *Cannabis ssp. ruderalis* e *Cannabis sativa spp afghanica* (Hourfane et al., 2023).

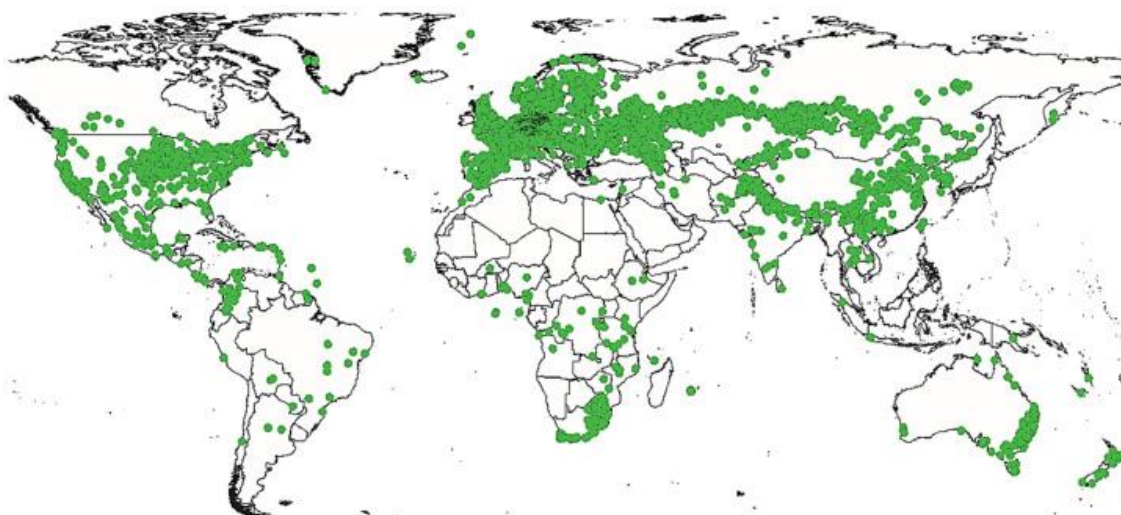


Figura 1 - Distribuição Geográfica da *Cannabis sativa* L. (Fonte: Hourfane et al., 2023)

Esta planta possui mais de 400 compostos bioativos identificados nas suas flores, raízes, folhas e pelos glandulares secretores, sendo eles polifenóis, flavonoides, terpenos, terpenoides, ácidos graxos, óleos, ceras e, principalmente, os fitocanabinoides. Entre os fitocanabinoides mais estudados para a avaliação de atividades terapêuticas estão o canabidiol, canabigerol, canabinol e o tetrahidrocanabinol (Figura 2) (Pattnaik et al., 2022).

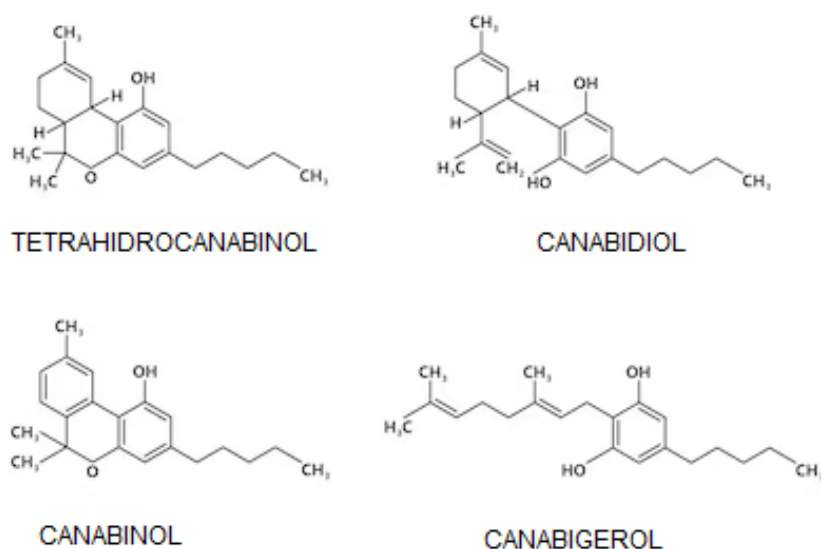


Figura 2 - Estrutura molecular dos fitocanabinoides

Os extratos da *Cannabis sativa* já vêm sendo utilizado há milhares de anos para fins terapêuticos e como droga recreativa. As respectivas atividades são atribuídas aos dois compostos majoritários da planta, CBD e THC (Brighenti et al., 2021; Pattnaik et al., 2022). As plantas têm sido empregadas há bastante

tempo como fonte primária no tratamento de saúde, muitas vezes devido à facilidade de acesso e custo reduzido. O CBD é o bioativo responsável pelo uso da *Cannabis sativa* e está associado a atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, neuroprotetora e anticonvulsivante, contribuindo para a ascensão das pesquisas desse canabinoide em diferentes alvos terapêuticos (Brighenti et al., 2021).

Entretanto, o THC é o ativo que induz euforia e alterações na percepção sensorial, resultando em um consumo recreativo da planta de mais de 4% da população mundial com idade entre 15 e 64 anos (Pattnaik et al., 2022). Apesar do consumo da planta já ocorrer há milhares de anos, a sua prática recreativa é considerada ilegal em diversos países, justamente pelos efeitos psicoativos induzidos pelo THC.

Nos últimos anos, diversos debates têm surgido tanto no âmbito governamental quanto entre a população acerca da descriminalização da *Cannabis sativa*. Países como Holanda, Canadá, alguns estados dos EUA, Uruguai, Jamaica e Austrália já legalizaram o seu uso (SILVA, 2022). As evidências que destacam a eficácia terapêutica da planta para diversas aplicações, atribuídas principalmente ao CBD, bem como os impactos do uso abusivo de THC, são os principais argumentos utilizados nesse diálogo (Pattnaik et al., 2022).

3.2 Principais efeitos atribuídos ao Canabidiol

3.2.1 Atividade farmacológica

A utilização dos canabinoides para fins medicinais abrange uma variedade de alvos terapêuticos. Dentre os diversos focos estão, principalmente, a eficácia do extrato de *Cannabis sativa* e do CBD nos transtornos do neurodesenvolvimento e distúrbios cerebrais. A posologia de canabidiol indicada varia de acordo com as características e gravidade da patologia, idade, peso corporal e uso concomitante de outros medicamentos, porém, considera-se adequada uma administração entre 2,5 e 25 mg/kg/dia dosagem (Prati-donaduzzi, 2020). Devido à escassez no conhecimento dos efeitos a longo prazo da utilização dos canabinóides, o seu uso deve ser monitorado para aumento ou diminuição da dosagem (Prati-donaduzzi, 2020).

Nos últimos anos houve um aumento no interesse científico pela

comprovação da eficácia do extrato para fins terapêuticos, com foco principal em altas doses de CBD. Entretanto, há uma curiosidade na investigação da eficácia de baixas doses de CBD, visando diminuir os possíveis efeitos adversos. De acordo com uma revisão realizada por Arnold et al., 2023, estudos em humanos adultos demonstraram uma eficácia em doses de 300-400 mg por dia em aspectos como redução da ansiedade, distúrbios neurológicos e dores crônicas.

Conforme comentado anteriormente, alguns países têm legalizado o uso da *Cannabis spp* ou o extrato de *Cannabis sativa*, principalmente para fins medicinais. A forma de administração é variada, contemplando a inalação, via oral (comprimido, óleos, pastilhas), vaporização, sublingual, retal, transcutânea e intravenosa (Huestis, 2007). Porém, devido à alta capacidade de metabolização de primeira passagem dos endocanabinoides no fígado, a melhor forma de administração ainda está sendo avaliada (Pamplona et al., 2018). Algumas alternativas são a utilização de formulações de extrato de canabinoides ou do próprio canabinoide isolado, facilitando o controle da dose administrada (Legare et al., 2022).

Atualmente, apesar da legalização da *Cannabis sativa* para uso medicinal em alguns países, poucos medicamentos possuem comprovação de segurança e eficácia e estão aprovados para uso nas listas de agências regulatórias como FDA – Federal Drug Administration e EMA – European Medicines Agency. Dentre eles estão o Dronabinol (Marinol®), Nabilone (Cesamet™), Nabiximols (Sativex®), Cannabidiol (Epidiolex®) (Legare et al., 2022). No Brasil, existem 23 fármacos aprovados pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo 9 à base de extratos de *Cannabis sativa* e 14 de CBD (dados atualizados em março de 2024).

As pesquisas com maiores níveis de evidências para o uso de *Cannabis sativa* aponta eficácia dos canabinoides na redução dos sintomas e melhora no quadro de saúde em condições de dor crônica, epilepsia refratária, espasticidade, náusea, vômitos e perda do apetite ligados a quimioterapia, transtornos neuropsiquiátricos. Além disso, os novos estudos em diferentes organismos estão investigando a papel dos canabinoides em transtornos do neurodesenvolvimento, atividade anticancerígena, artrite, artrose, doenças cardiovasculares, dentre outras (Saúde & Fiocruz, 2023). Porém, apesar das evidências na eficácia terapêutica, ainda são necessários mais estudos em

relação ao possível mecanismo de ação e também da segurança a longo prazo destes canabinoides.

3.2.2 Toxicidade

Apesar das evidências científicas do potencial terapêutico dos extratos de *Cannabis sativa* e do CBD isolado, muitos estudos também indicam seus efeitos toxicológicos, como por exemplo problemas de desenvolvimento, alteração no sistema reprodutivo e hepatotoxicidade em modelos animais (Gingrich et al., 2023). Porém, tanto o mecanismo de ação quanto o toxicológico do CBD ainda não estão bem elucidados.

Um dos prováveis efeitos do CBD no organismo é a interferência do canabinoide na sinalização fisiológica dos endocanabinoides. A AEA e 2-AG fazem parte do sistema endocanabinoide que está envolvido em diversas funções neuronais. De acordo com alguns estudos, o CBD pode interferir na síntese e degradação destas moléculas através da inibição de proteínas que participam desses processos como a proteína de ligação a ácidos graxos, amida hidrolases de ácidos graxos, além da atividade da monoacilglicerol lipase (Aran & Cayam-Rand, 2020; Gingrich et al., 2023)

Em humanos, o CBD é metabolizado no intestino e no fígado através de metabolismo de fase I pela ação das enzimas do citocromo P450 (CYP), principalmente em suas isoformas CYP3A4 e CYP2C19, e fase II por glicuronidação sendo o 7-COOH-CBD seu principal metabólito (Beers et al., 2021; Jiang et al., 2011). A hepatotoxicidade pela administração oral, bem como um aumento no peso corporal e elevação nas enzimas ALT e AST do fígado foram demonstradas em estudos com animais e humanos, tornando o CBD um contribuinte na classificação de lesão hepática induzida por drogas (L. A. Lo et al., 2023).

Além disso, estudos em animais demonstraram toxicidade no sistema reprodutor causada pelos canabinoides. Em peixe-zebra (*Danio rerio*), o CBD demonstrou causar malformação da prole, redução no número de ovos gerados e na diminuição da taxa de sobrevivência, além da interferência nos hormônios reprodutores, no desenvolvimento das gônadas e a indução de apoptose, levando à inibição da capacidade reprodutiva do peixe-zebra (Li et al., 2023). Em roedores, a exposição crônica ao CBD (15-30 mg/kg/dia) durante 34 dias

resultou na toxicidade reprodutiva de camundongos machos. Ainda, foi observado uma diminuição nos níveis de testosterona, interferência na frequência dos estágios da espermatogênese, redução e anomalias nos espermatozoides (Carvalho et al., 2018; Gingrich et al., 2023).

No entanto, os estudos toxicológicos do medicamento à base de CBD Epidiolex® apresentados ao FDA não demonstraram toxicidade reprodutiva (U.S. Food and Drug Administration, 2018). Embora, a exposição de ratas grávidas ao medicamento indicou alterações no desenvolvimento da progênie, afetando o crescimento, a maturação sexual e a atividade neurocomportamental (Gingrich et al., 2023).

Investigações realizadas em células indicaram que o CBD apresenta efeitos nocivos em um modelo *in vitro* de toxicidade no desenvolvimento neuronal. Além de não oferecer neuroproteção, o estudo apontou, pela primeira vez, que a exposição ao CBD durante a diferenciação neuronal pode sensibilizar células imaturas, resultando em efeitos adversos que se manifestarão ao longo do tempo (Schönhofen et al., 2015). Logo, os dados do estudo reforçam a necessidade de mais ensaios clínicos e critérios de avaliação de riscos cuidadosos antes que o CBD possa ser recomendado a crianças e adultos

Ainda, estudos em roedores na fase da adolescência demonstraram que a exposição a canabinoides causa prejuízo a longo prazo na aprendizagem e memória (Rubino & Parolaro, 2016). Os estudos demonstram que as alterações no sistema endocanabinoide ocasionadas pelo uso de CBD pode desregular a atividade de neurotransmissores responsáveis por processos de desenvolvimento (Rubino & Parolaro, 2016).

3.3 Sistema endocanabinoide

Após a descoberta do sistema endocanabinoide em 1990, as pesquisas sobre a utilização de canabinoides para diferentes doenças estão em ascensão. O eCBS possui variadas funções no sistema nervoso central e periférico, atuando na rede neuromoduladora tanto no desenvolvimento do sistema nervoso quanto na modulação de processos cognitivos e fisiológicos (Lu & Mackie, 2021). O sistema é composto pelos endocanabinoide AEA e 2-AG, enzimas metabólicas e receptores canabinoides acoplados à proteína G, dos tipos CB1 e CB2, produzidos nas células pós-sinápticas (Poleg et al., 2019). Uma ilustração

simplificada do funcionamento do sistema pode ser visualizada na figura 3.

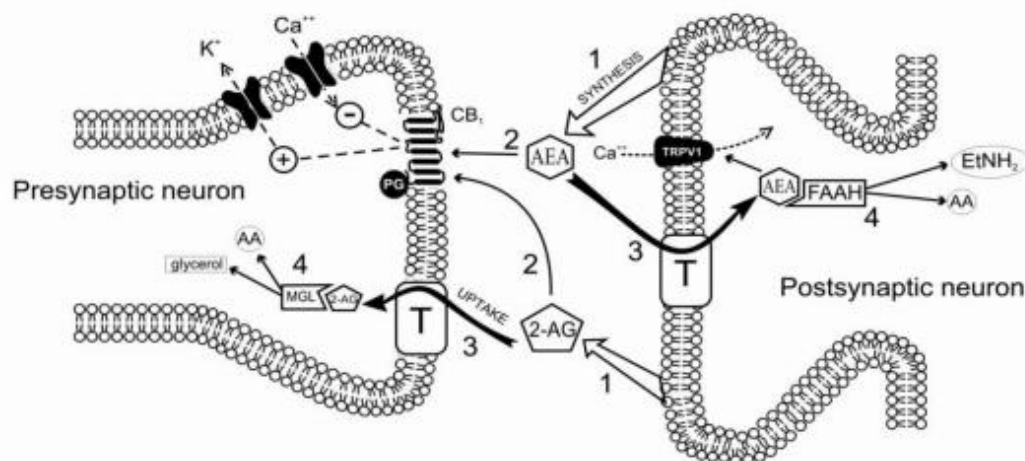


Figura 3 - Representação esquemática da sinapse endocanabinoide. Anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) são sintetizados em neurônios pós sinápticos, após influxo de cálcio (1). AEA e 2-AG se ligam a receptores CB1 em neurônios pré-sinápticos (2), exercendo suas ações. O término da ação destes endocanabinoides se dá por recaptação por transportadores (3) e metabolização pela Hidrolase Amida de ácidos graxos (FAAH) e Monoacil Monoacilglicerol Lipase (MAGL), que metabolizam AEA e 2-AG respectivamente (4). (Fonte: Viana, 2016)

Os endocanabinoides são lipídeos sinalizadores que ativam os receptores canabinoides. A AEA e o 2-AG são os endocanabinoides mais relatados do sistema, sintetizados a partir do ácido araquidônico (Lu & Mackie, 2021). A síntese de AEA e 2-AG em mamíferos são catalisadas por hidrólise tipo fosfolipase D específica de N-acilfosfatidiletanolamina D (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipase α / β (DAGL α / β), respectivamente. Sua hidrólise é mediada por amida hidrolases de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), respectivamente (Estrada-Valencia et al., 2021).

Os receptores canabinoides CB1 e CB2 são receptores acoplados a proteína G inibitória, atuando através da inibição da adenilil ciclase e certos canais de cálcio sensíveis à voltagem e estimulando proteínas quinases e canais de potássio. Os receptores CB1 são localizados principalmente no sistema nervoso, em uma ampla gama de neurônios (dopaminérgico, colinérgico, gabaérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, entre outros), mas também estão presentes em locais como fígado e tecido adiposo. Já os receptores CB2 estão mais relacionados com as células que possuem caráter imunológico, como por exemplo a microglia (Lu & Mackie, 2021).

Além dos endocanabinoides, os receptores endocanabinoides também são ativados por moléculas como os canabinóides exógenos (CBD e THC). De acordo com a literatura, os canabinóides utilizam um sítio alostérico dos

receptores para realizar a sua ação no organismo. Ainda há pouco conhecimento sobre a interação alostérica com o receptor CB2, porém, estudos estão se aprofundando em relação à sinalização através de receptores CB1, principalmente no seu foco farmacológico ou como agente contribuinte para alguns transtornos como esquizofrenia (Lu & Mackie, 2021).

3.4 Sistema endocanabinoide em *Caenorhabditis elegans*

Considerando a política dos 3R's (do inglês refine, replace, reduce) na pesquisa *in vivo*, uma alternativa é a utilização do *C. elegans*, um modelo adequado para os estudos toxicológicos. Após a caracterização do modelo pelo biólogo Sydney Brenner em 1960, esse nematoide não parasita vem sendo amplamente estudado (Hunt, 2017).

O *C. elegans* é um nematoide de vida livre pertencente a família Rhabditidae, que possui um tamanho pequeno de aproximadamente 1 milímetro de comprimento quando adulto e pode ser encontrado em matéria orgânica em decomposição. O modelo vem sendo muito utilizado pelos pesquisadores devido as suas diversas vantagens na pesquisa e dentre elas estão o seu fácil manuseio e manutenção. No ambiente laboratorial o verme é mantido em placas de petri com meio de crescimento para nematoides (NGM – nematode growth medium) e bactéria *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento, incubados a uma temperatura e umidade controlados (Hunt, 2017).

Adicionalmente, o seu ciclo de vida curto contribui para a realização de diversas análises, como por exemplo na avaliação toxicológica através da sobrevivência e longevidade dos vermes. Após a eclosão dos ovos, o verme possui quatro estágios larvais até atingir o primeiro dia de adulto (Figura 2), sendo necessário aproximadamente 4 dias para esse desenvolvimento. Além disso, o nematóide possui uma longevidade de 23 dias, dependendo das condições laboratoriais. A população do *C. elegans* é dividida em hermafroditas (99,9%) e machos. O verme hermafrodita consegue fazer a postura de 300 a 400 ovos a cada ciclo de vida, tendo início no período reprodutivo no primeiro dia de adulto com duração de 3 dias (Corsi et al., 2015). Essa rápida e fácil reprodução é considerada uma das grandes vantagens do modelo pois possibilita visualizar os efeitos de algumas exposições diretamente no sistema reprodutor.

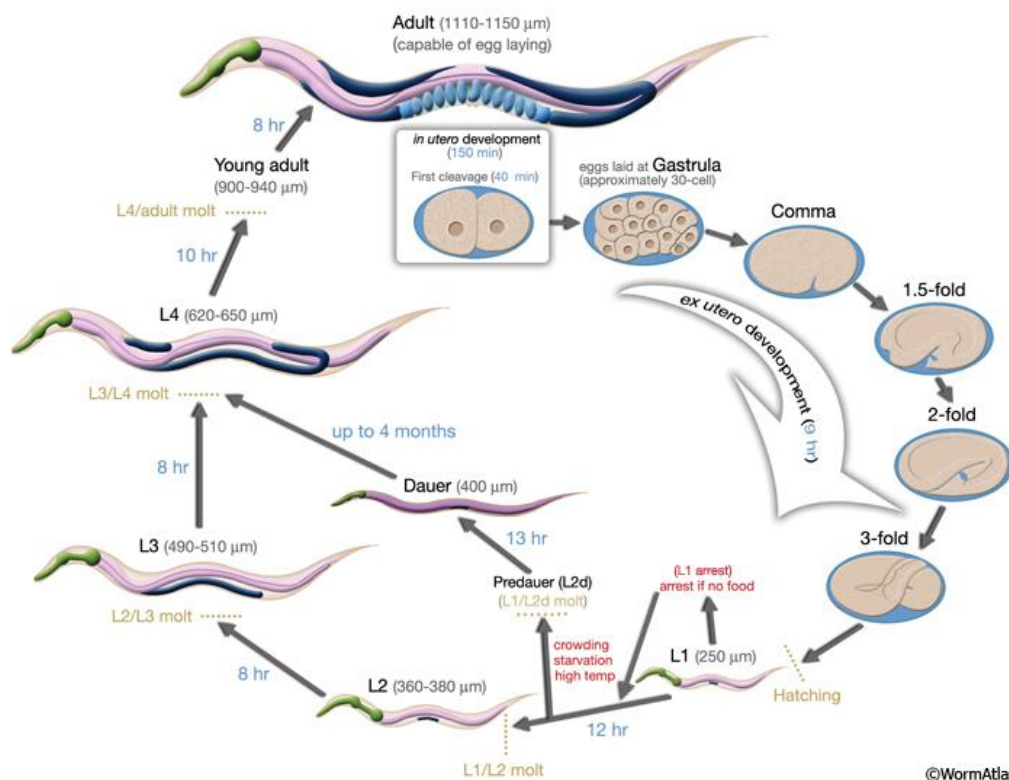


Figura 4 - Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* a 22°C. (Fonte: WormAtlas)

A grande similaridade do sequenciamento genético, no qual 60-80% dos genes são homólogos aos humanos, torna o *C. elegans* um modelo vantajoso para pesquisas sobre genética, desenvolvimento e toxicologia. Devido a isso, tornou-se possível a obtenção de animais nocaute e transgênicos através de manipulações genéticas. Ainda, a transparência do verme e a marcação com a proteína verde fluorescente (GFP – green fluorescence protein) contribuem para a visualização e análise *in vivo* de diversos aspectos, como por exemplo dos neurônios dopaminérgicos e colinérgicos (Corsi et al., 2015).

Além disso, outra vantagem importante é a capacidade de *C. elegans* de sintetizar endocanabinoides, demonstrada pela primeira vez em 2008 (Lehtonen et al., 2008). Conforme comentado anteriormente, a síntese de AEA e 2-AG em mamíferos são catalisadas por hidrólise tipo fosfolipase D específica de NAPE-PLD) e DAGL α / β , respectivamente. Sua hidrólise é mediada por FAAH e MAGL, respectivamente. Em comparação, no *C. elegans* os ortólogos NAPE-1 e NAPE-2 sintetizam AEA e a FAAH-1 o cataboliza. Para 2-AG, o ortólogo DAGL-2 pode ser responsável para sua síntese, e o não homólogo FAAH-4 é responsável por sua degradação (Estrada-Valencia et al., 2021).

A sinapse endocanabinoide em *C. elegans* ocorre através da ativação de

diferentes receptores. Conforme Oakes et al., 2017 demonstrou através de experimentos com nocaute no gene *npr-19*, que o receptor NPR-19 do verme é ortólogo ao receptor CB1 dos mamíferos. Em níveis mais elevados, os canabinoides podem ativar outros receptores não canabinoides como por exemplo do tipo 2A-adrenérgico (OCTR-1), receptores vanilóides (TRPV1) e semelhantes ao serotoninérgico 5-HT1A (SER-4) (M. Oakes et al., 2019; M. D. Oakes et al., 2017; van Es-Remers et al., 2022)

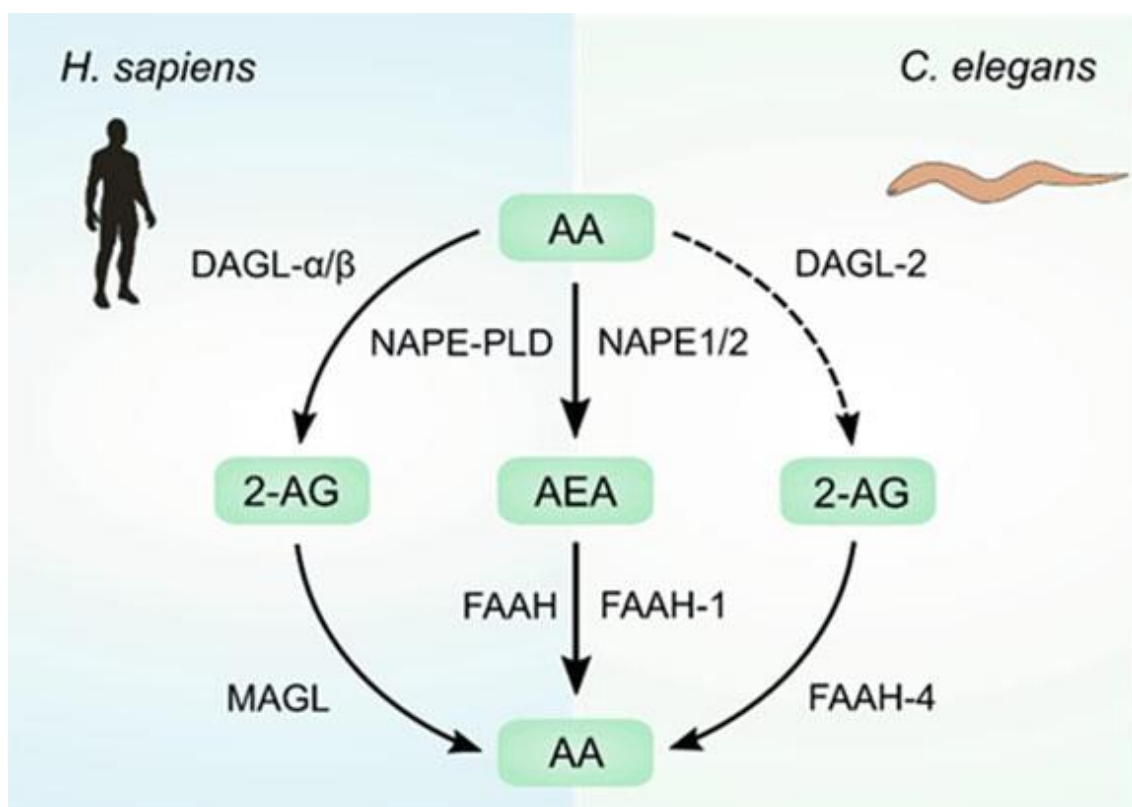


Figura 5 - Semelhança na síntese e degradação dos endocanabinoides em humanos e em *C. elegans*. (Fonte: Estrada-Valencia et al., 2021)

Os estudos com CBD em *C. elegans* iniciaram em 2020 pela investigação do envolvimento do receptor de dopamina nas ações de fitocanabinoides (Shrader et al., 2020). Porém, até o momento ainda existem poucos estudos avaliando o CBD neste modelo, totalizando doze trabalhos. Land et al., (2020) realizou o primeiro estudo toxicológico do CBD em *C. elegans* através de uma exposição crônica, porém não determinou uma concentração letal de 50% da população. Após, van Es-Remers (2022) e Wang (2022) observaram alterações toxicológicas no desenvolvimento e na saúde neuronal do verme, expostos em diferentes estágios larvais.

Os estudos farmacológicos do CBD em *C. elegans* vem aumentando principalmente em relação a doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer. As investigações demonstraram que o canabinoide consegue aliviar a progressão induzida por beta-amiloide na doença de Alzheimer (Zhang et al., 2022) e reduzir o acúmulo de alfa-sinucleína na doença de Parkinson (Muhammad et al., 2022). Além disso, foi possível identificar diferentes mecanismos de ação do CBD nesses efeitos farmacológicos, principalmente o seu envolvimento na modulação do sistema dopaminérgico do *C. elegans* (Frandsen & Narayanasamy, 2022; Guedes et al., 2023; Vanin et al., 2022; F. Wang et al., 2023; Z. Wang et al., 2021). Apesar desses estudos, ainda há uma escassez de informações sobre os efeitos farmacológicos e toxicológicos do uso dos canabinoides. Neste sentido, é necessária a realização de estudos para avaliar a segurança da utilização e investigar uma dosagem adequada destes canabinóides.

5. MATERIAIS, METODOS E RESULTADOS

A metodologia, resultados e discussão desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito científico.

Manuscrito científico**Effect of early-life chronic exposure to *Cannabis sativa* extract and isolated cannabidiol in the *Caenorhabditis elegans* development**

Heloísa Aiolfi Padilha^a, Jean Freitas Reginatto^a, Júlia Dorneles Saleh^a, Natália Silva Jardim^a, Alline Campos^b, Daiana Silva Ávila^{a*}

^aGraduate Program in Biochemistry, Laboratory of Biochemistry and Toxicology in *Caenorhabditis elegans*, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Zip code 97500-970, Brazil.

^b Pharmacology Laboratory of (Neuro) Plasticity, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto -USP, Ribeirão Preto, SP, Zip code 14049-900, Brazil.

*Corresponding author:

Daiana Silva Ávila

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

BR 472 – Km 592 – Postal Code 118

Zip code 97500-970 Uruguaiana /RS

Email: daianaavila@unipampa.edu.br

List of abbreviations

CBD - cannabidiol

THC - tetrahydrocannabinol

AEA - anandamide

2-AG – 2-arachidonoylglycerol

NAPE-PLD - N-acylphosphatidylethanolamine D

DAGL- α/β - Diacylglycerol lipase α/β

FAAH - fatty acid amide hydrolases

MAGL - monoacylglycerol lipase

Abstract

Cannabis sativa has more than 400 bioactive compounds, including flavonoids, terpenes, fatty acids and phytocannabinoids, and has been used for thousands of years for medicinal purposes and as a recreational drug. Among the main phytocannabinoids present in this plant are tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). THC is the active ingredient responsible for the effects of euphoria and changes in sensory perception, a pharmacological profile that has been attributed to CBD. The use of CBD for therapeutic purposes covers a wide range of diseases and disorders and after the discovery of the endocannabinoid system (eCBS) in humans, interest was awakened in investigating the pharmacological activities of *Cannabis* spp. and its possible mechanism of action. However, studies indicate adverse effects from the use of cannabinoids, highlighting the need for clinical trials and risk assessments before the widespread recommendation of CBD for different age groups. We used *Caenorhabditis elegans* to carry out toxicological analyzes of *Cannabis sativa* extract 5% CBD (EXT) and isolated CBD (CBD). After chronic exposure (48h) of the animals from the first larval stage, we identified that the highest tested concentrations of EXT and CBD presented toxicity by reducing worms survival, impairing locomotion capacity and delaying their development. However, the lowest concentration showed no evidences of toxicity. Finally, we observed that the reproductive system of the worms was not altered by the treatments and a more specific investigation indicated that cannabinoids did not cause damage to cholinergic neurons and to the dopaminergic system. Our research has demonstrated the influence of cannabinoids on *C. elegans* development. Furthermore, we suggest that 10 μ M was not toxic to the worm, making it a promising pharmacological potential for further exploration of the isolate.

Keywords: Cannabinoids, development, toxicity, *C. elegans*.

1. Introduction

Cannabis sativa, popularly known as marijuana, originates from Asia and has a global distribution due to its adaptation to various climates (Hourfane et al., 2023). Containing more than 400 bioactive compounds, including polyphenols, flavonoids, terpenes and phytocannabinoids like cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (THC), the plant is associated with both therapeutic and recreational effects (Pattnaik et al., 2022). CBD notable for its antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties, while THC is mainly responsible for psychoactive effects, leading to recreational consumption (Brighenti et al., 2021).

The therapeutic use of *Cannabis sativa* has a history spanning thousands of years, but scientific interest in evaluating its effectiveness is recent. The recommended dosage for medicinal applications varies depending on individual characteristics and the specific pathology, yet exploring the efficacy of lower doses is important to mitigate potential unknown adverse effects (Arnold et al., 2023). Although some countries have legalized the medicinal use of *Cannabis*, and there is a growing prevalence of prescriptions and clinical studies on cannabinoid-based medicines, it is necessary to investigate toxicity issues associated related to this use, including *Cannabis sativa* extract and isolated CBD. Studies indicate adverse effects on development, reproductive system, and hepatotoxicity in animal models, highlighting the need for clinical trials and risk assessments before widespread recommendation of CBD for different age groups (Gingrich et al., 2023; Li et al., 2023).

Since the discovery of the endocannabinoid system (eCBS) in 1990, research on the use of cannabinoids for various diseases has increased. eCBS influences the neuromodulatory network, operating through endocannabinoids like anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), metabolic enzymes, and CB1 and CB2 cannabinoid receptors. CB1 receptors are predominantly found in the nervous system, while CB2 receptors are associated with immune system cells. In addition to endocannabinoids, exogenous cannabinoids such as CBD and THC also activate these receptors. Consequently, there is a growing interest among researchers to better understand their interactions and pharmacological effects (Lu & Mackie, 2021)

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) is an interesting model for toxicological research, offering an alternative to mammalian studies and aligning with the principles of the 3R's (refine, replace, reduce). Discovered by Sydney Brenner in 1960, this free-living nematode, provides simplicity in handling, maintenance, and rapid reproduction (Hunt,

2017). With a short lifespan of approximately 23 days, *C. elegans* is transparent, allowing for *in vivo* analysis labeled with green fluorescent protein (Corsi et al., 2015). Moreover, its capacity to synthesize endocannabinoids and the increasing utilization of the model in studies involving CBD indicate its potential contribution to the understanding the therapeutic and toxicological effects of cannabinoids (Estrada-Valencia et al., 2021).

Considering the imperative to delve further into the examination of CBD's impact on organisms, this study was specifically crafted to assess the effects of both *Cannabis sativa* extract and isolated CBD. Consequently, we investigated the actions of these cannabinoids on survival, development, and the reproductive system through a chronic exposure paradigm, employing the *in vivo* model of *C. elegans*. Furthermore, we observed the potential involvement of cholinergic and dopaminergic neurotransmitter systems in these processes

2. Material and methods

2.1 Chemicals

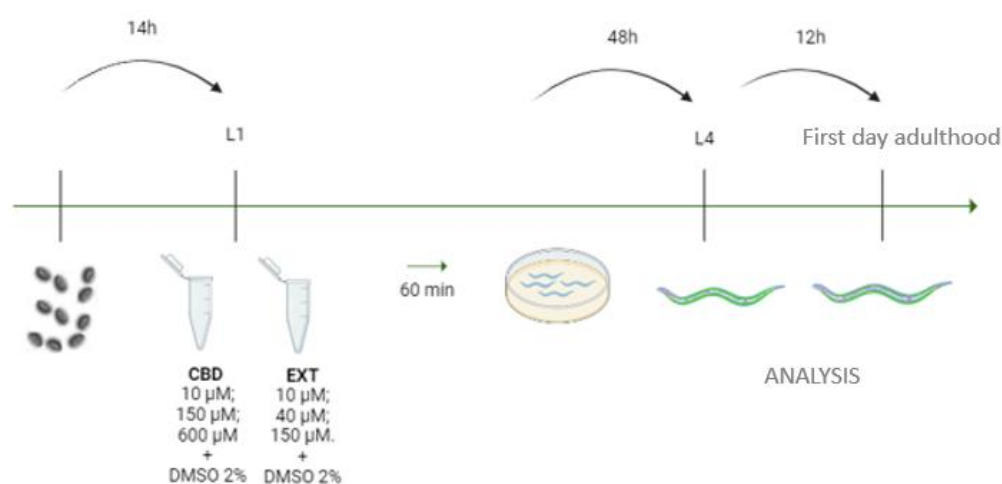
Isolated cannabidiol (kindly supplied by Dra. Alline Campos, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, Brazil) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The *Cannabis sativa* extract used was EPIFRACATAN 5% produced by Medicplast, Uruguay. This extract presents 5% CBD and less than 0.1% of THC diluted in medium chain triglycerides oil. Levamisole and dopamine were obtained from Sigma/Merck. All other reagents were of analytical grade and were obtained from local suppliers.

2.2 *C. elegans* strains and maintenance

C. elegans were cultivated in Petri dishes containing nematode growth medium (NGM), fed with *Escherichia coli* OP50 and incubated in a controlled temperature of 20°C (Panasonic Healthcare company of North America, MIR-254-PA) to appropriated development of animals. The strains used were N2 (wild type), BY200 vtIs1 [*dat-1p::GFP*; *rol-6(su1006)*], BZ555 egIs1 [*dat-1p::GFP*] and LX929 vsIs48 [*unc-17::GFP*]. The BY200 was donated by Dr. Michael Aschner (Director, Einstein Center of Toxicology) and all the other strains were obtained from *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, Minnesota, USA). Worms were synchronized to obtain all of them at the same larval stage. The population was exposed to a lysis solution (NaOH 1M, NaClO 1%, and distilled H₂O) to break the cuticle of pregnant hermaphrodites and to release the eggs.

2.3 Exposure protocol

For the treatment, 1500 worms at the L1 stage were subjected to chronic exposure divided into a control group, treatment with isolated cannabidiol (CBD) and treatment with *Cannabis sativa* extract 5% CBD (EXT). The concentrations used were obtained from a concentration curve (Figure 1S) and DMSO was used as a diluent vehicle. The worms were treated with 2% of DMSO in a control group, 10, 150 and 600 μ M of CBD, 10, 40 and 150 μ M of EXT, in M9 buffer (0.02 M KH_2PO_4 , 0.04 M Na_2HPO_4 and 0.085 M NaCl) (Land et al., 2020). We did not test equal concentrations of CBD and EXT due to the limited concentration of CBD in the EXT formulation (5%). After 1h of homogenization, the worms were placed on NGM plates seeded with *E. coli* OP50 for additional 48h or 72h depending on the analysis to be performed.



2.4 Survival rate

The survival rate was performed as a parameter to verify the safety of CBD or EXT *in vivo* chronic exposure. A total of 1500 wild type worms at the L1 stage were treated for 48h and the population of live animals was estimated by counting an area delimited by quadrants, using a stereomicroscope (Leica S8 Apo Stereomicroscope, SP, Brazil). Six independent experiments were conducted in duplicate, and the results were showed as the raw number of surviving worms.

2.5 Body length and area assay

The size of the worms was evaluated after 48 hours of treatments with 1,500 wild type worms at the L1 larval stage. The animals in Petri dishes were collected with M9 buffer and transferred to microtubes, washed three times with M9 buffer to remove

bacteria. The worms were pipetted onto glass slides containing levamisole (1 mM) and covered with coverslips to obtain images using a Nikon Eclipse 50i microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The body length and body area of ten animals at each concentration were measured using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) for Windows. Six independent experiments were carried out and the results were shown in millimeters.

2.6 Reproduction assays

The egg production capacity of N2 worms was evaluated 72h after treatment with CBD or EXT (first adult day), in six individual experiments. Five worms of each concentration were transferred to a glass slide with 5µL of a bleach solution (NaOH 1M, NaClO 1%, and distilled H₂O) to break the cuticle of pregnant hermaphrodites and to release the eggs. The number of eggs produced by worms was counted using a stereomicroscope (Leica S8 Apo Stereomicroscope, SP, Brazil) and compared with the control group.

The brood size assay was performed in triplicate after 48 hours of exposure of 1,500 wild type worms to CBD or EXT. One hermaphrodite worm of each concentration was transferred to the center of a NGM plate containing 10 µL of *E. coli* OP50. The worm was transferred to a new plate every day throughout its reproductive period (3 days). Progeny were counted using a stereomicroscope (Leica S8 Apo Stereomicroscope, SP, Brazil). Six independent experiments were carried out and the result was shown by the number of brood size over 4 days.

2.7 Swimming assay

The swimming assay was used as one of the parameters to assess the cholinergic system. In three independent experiments, 1500 wild-type worms at the L1 larval stage were exposed to CBD or EXT. After 48h of treatment, the animals at the L4 larval stage were collected with M9 buffer and transferred to microtubes, washed three times with M9 buffer to remove bacteria. Then, 10 worms at each concentration were pipetted into a becker containing 2 mL of M9 buffer and habituated to the new environment for 1 minute. The swimming movements were recorded for 1 minute in a stereomicroscope (Leica S8 Apo Stereomicroscope, SP, Brazil) and the videos were analyzed using Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) software for Windows with Worm Tracker plugin. The parameters analyzed were velocity (mm/s) and distance (nm) traveled in comparison to the control group.

2.8 Assessment of the dopaminergic system

The swimming induced-paralysis was used to evaluate the dopaminergic system of wild type worms exposed to CBD or EXT. The assay consists of counting the latency time required for the worms to paralyze after acute exposure to an excess of dopamine 50mM. After 48h of treatment, five worms at each concentration were transferred to a 12-well plate with PBS buffer (Na_2HPO_4 , KCl, KH_2PO_4 , NaCl and distilled H_2O) and exposed to dopamine (50mM). Eight independent experiments were carried out and the result was showed by the seconds required for paralysis compared to the control group.

The BZ555 and BY200 strains were used to evaluate the integrity of dopaminergic neurons present in the head of the worms. 1500 worms in the L1 larval stage were submitted to a chronic exposure of CBD and EXT, in six individual experiments. After 48h, the animals were collected with M9 buffer and transferred to microtubes, washed three times with M9 buffer to remove bacteria. The worms were pipetted onto glass slides containing levamisole (1 mM) and covered with coverslips to obtain images using the FLoid™ Cell Imaging Station fluorescent microscope (Thermo Fisher Scientific, Catalog number: 4471136, USA). Images of five worms at each concentration per independent assay were obtained and the area fluorescence intensity (AUF) of the dopaminergic neurons were measured using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) for Windows.

2.9 Assessment of the cholinergic system

The egg laying capacity of N2 worms was evaluated 72h after treatment with CBD or EXT (first adult day), in five individual experiments. The assay consists of comparing the group transferred to a plate with only *E. coli* OP50 and the group transferred to a plate containing a cholinergic agonist that stimulates oviposition. For this, two worms of each concentration were transferred to the center of a plate with 10μL of *E. coli* OP50 or 10uL of Levamisole (500mM). 1h after the transfer, the eggs released by the worms were counted under a stereomicroscope (Leica S8 Apo Stereomicroscope, SP, Brazil) and analyzed comparing the pos-exposure and groups.

The LX929 strain was used to evaluate the integrity of cholinergic neurons. 1500 worms at the L1 larval stage were treated with CBD or EXT, in six individual experiments. After 48h, the animals were collected with M9 buffer and transferred to microtubes, washed three times with M9 buffer to remove bacteria. The worms were pipetted onto glass slides containing levamisole (1 mM) and covered with coverslips to

obtain images using the FLoid™ Cell Imaging Station fluorescent microscope (Thermo Fisher Scientific, Catalog number: 4471136, USA). Images of five worms at each concentration per independent assay were obtained and the area fluorescence intensity (AUF) of the cholinergic neurons were measured using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) for Windows.

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), with $p < 0.05$ considered statistically significant. The normality of data distribution was confirmed by the Shapiro-Wilk test (all $ps > 0.05$). Statistical significance for survival, length and body area, brood size, egg production, swimming induced-paralysis and fluorescence of cholinergic and dopaminergic neurons were analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. The egg laying was analyzed by Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. To analyze the swimming velocity and distance traveled by the worms were used a nonparametric test Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism Version 8.0.1 (244) software.

3. Results

3.1 CBD and EXT exposures did not alter the survival rate at low concentrations

The results illustrated in Figure 1 demonstrate both CBD and EXT did not cause reduction in the survival rate of the worms at the low concentrations tested. Chronic exposure to 10 and 150 μM of isolated CBD (Figure 1A) in worms showed no significant difference compared to the respective control group. However, the highest concentration tested caused a significant decrease in the number of live worms, indicating that 600 μM of isolated CBD may be toxic to the nematode. Furthermore, all EXT concentrations tested (Figure 1B) showed no significant difference in the survival rate of worms after 48h of treatment in comparison to the respective control group. We did not test 600 μM

for EXT due to the limited concentration of CBD in the formulation (5%). [The value referring to the 50% concentration \(LC50\) of the worms was not found.](#)

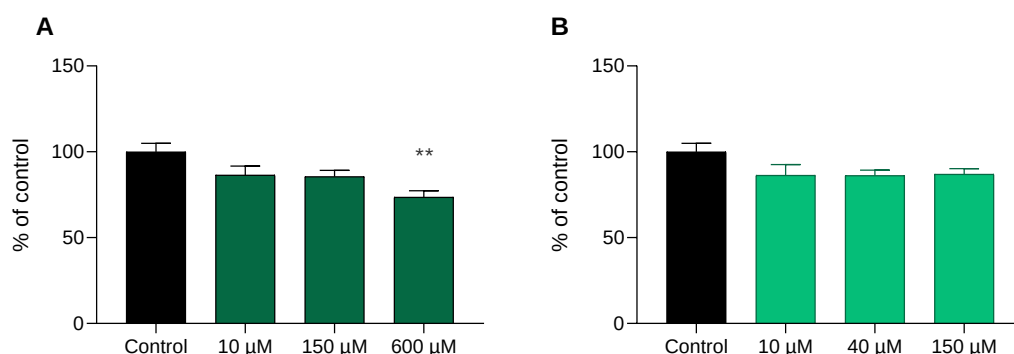


Figure 1 – Effect of CBD and EXT exposures on the survival rate. Survival rate of worms (A) 10, 150 and 600 µM of CBD and (B) 10, 40 and 150 µM of EXT (n=6) after 48 h of exposure (L4 stage) are depicted. Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The results were analyzed by One-way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparisons test. (**) Indicates a statistically significant difference compared to the control group with $**p < 0,01$.

3.2 Effect of CBD and EXT exposure on the length and body area of worms

The one-way ANOVA analysis revealed a significant difference in the length and body area of the worms treated with CBD or EXT at the highest concentration when compared to the respective control. Exposure to 150 and 600 µM of isolated CBD demonstrated a decrease in body length and body area when compared to the control group (Figure 2A). However, these parameters were not affected by the lower concentration tested (10 µM). Body length and body area of worms exposed to 150 µM of EXT were also decreased in comparison to the control group (Figure 2B), in contrast to 10 and 40 µM, which demonstrated a potential safety concern regarding worm development.

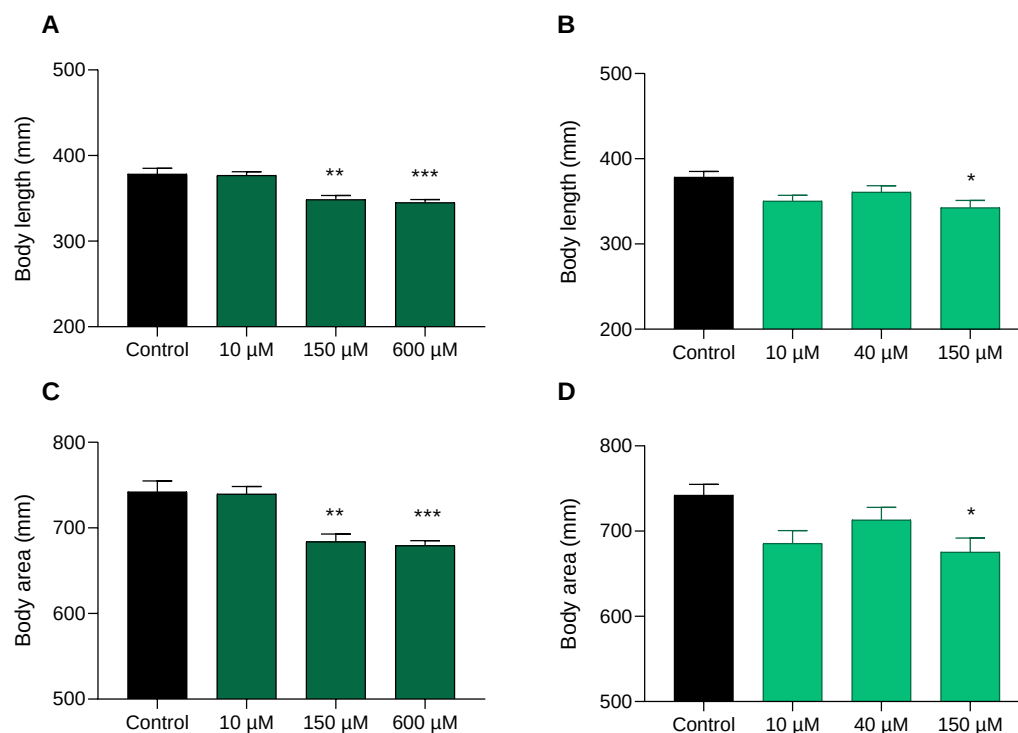


Figure 2 - Effect of CBD and EXT exposure on worms' development. Body length of L4 worms exposed in L1 for 48h different concentrations of (A) CBD and (B) EXT (n=6). Body area of worms L4 exposed in L1 for 48h to DMSO 2% (control group) and to different concentrations of (C) CBD and (D) EXT (n=6). Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The results were analyzed by One-way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparisons test. (*) Indicates a statistically significant difference compared to the control group with * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

3.3 Exposure to CBD or EXT did not alter the reproduction of the worms

The effect of CBD and EXT treatment in the worm's reproduction was observed by the egg production capacity and their brood size during all the reproductive period (Figure 3). The results demonstrated in the figure 3 shows that the exposure to CBD and EXT did not affect their reproduction. Egg production capacity (Figure 3A) and brood size (Figure 3C) of the worms treated with 10, 150 and 600 μ M of CBD were not changed in comparison to the control group. The same data were found to worms exposed to 10, 40 and 150 μ M of EXT (Figure 3B and 3D).

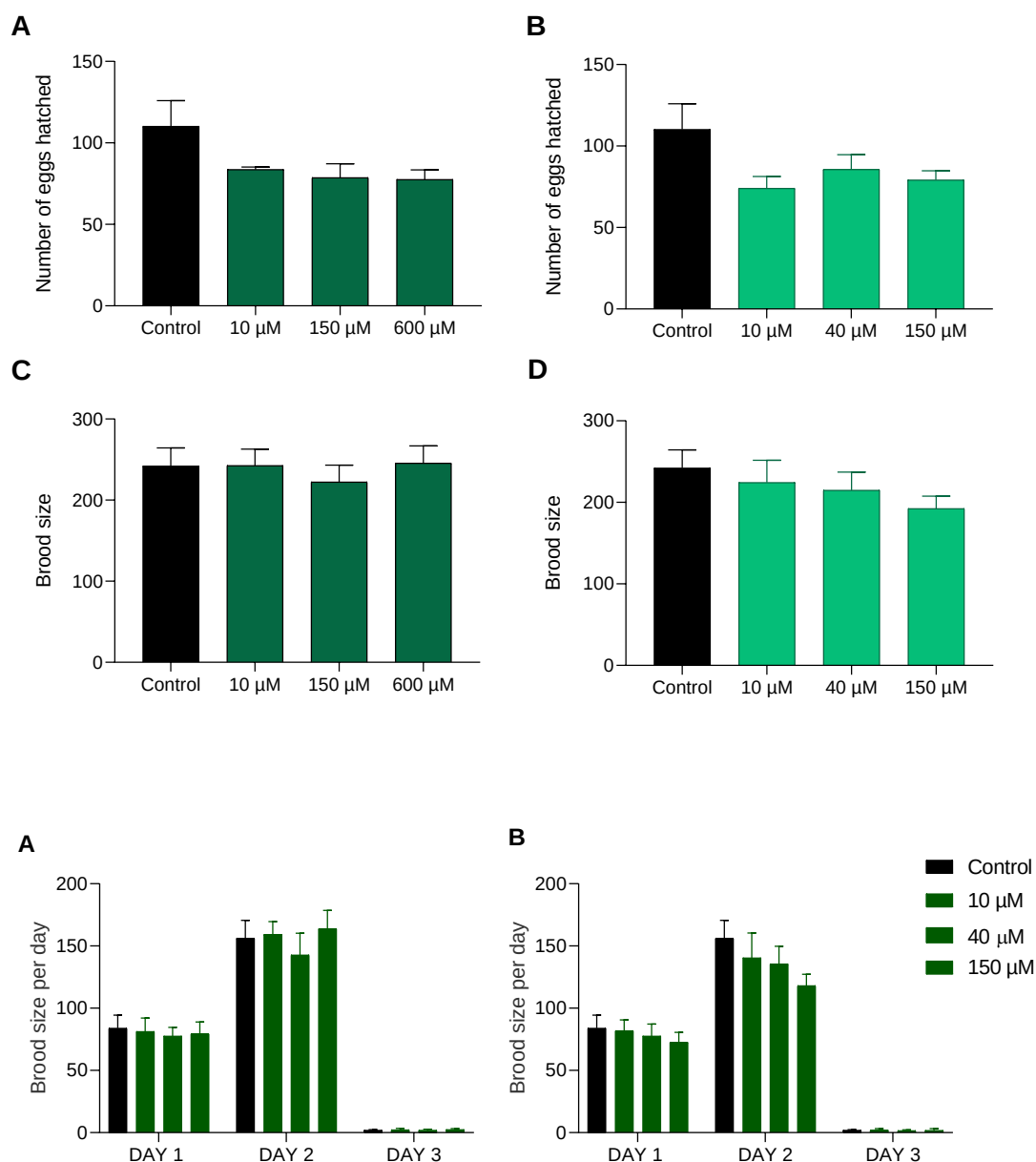


Figure 3 - Effect of CBD and EXT exposure on the reproductive capacity of worms. Egg production capacity of first adult day worms exposed in L1 for 48h to different concentrations of (A) CBD and (B) EXT (n=6). Total brood size of worms exposed to different concentrations of (C) CBD and (D) EXT (n=6). Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The results were analyzed by One-way ANOVA.

3.4 Exposure to CBD and EXT caused a decrease in swimming velocity

The swimming movements were analyzed to observe the effect of CBD and EXT treatment on the locomotion parameters of the worms (Figure 4). The results showed that the distance traveled by worms exposed to different concentrations of CBD (Figure 4A) and EXT (Figure 4B) was not affected after 48h compared to the respective control group.

However, the post hoc revealed a decrease in the swimming velocity of the worms exposed to 10, 150 and 600 μM of CBD (Figure 4C) and to 10, 40 and 150 μM of EXT (Figure 4D) compared to the control group.

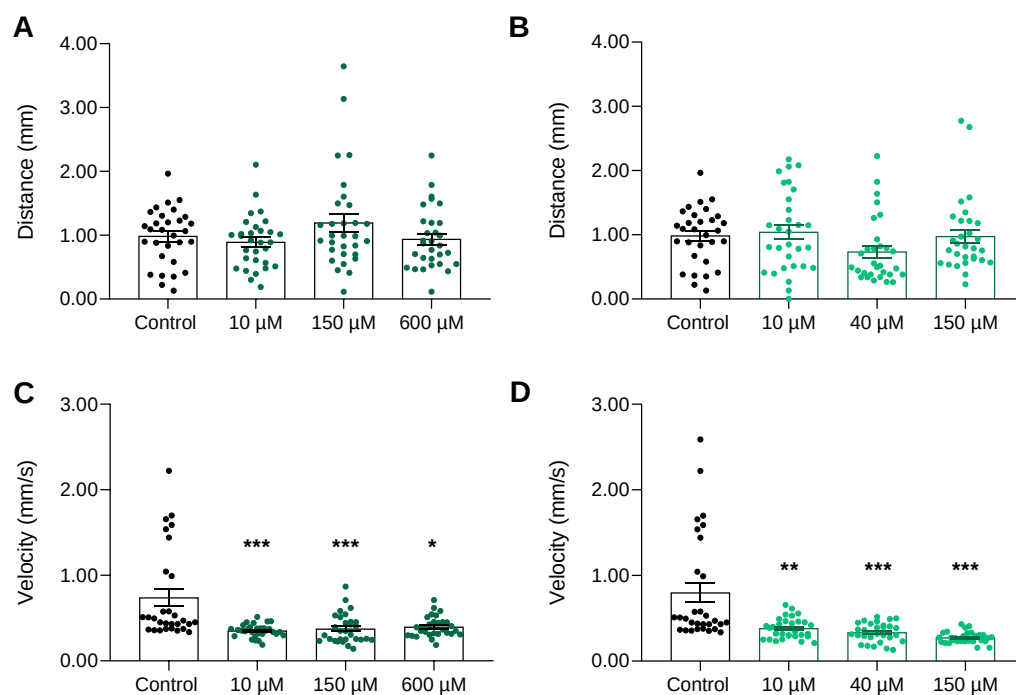


Figure 4 - Effect of CBD and EXT on worms swimming. Distance traveled by L4 worms exposed in L1 for 48h to different concentrations of (A) CBD and (B) EXT (n=30). Velocity of swimming worms exposed and to different concentrations of (C) CBD and (D) EXT (n=30). Data were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). The results were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis test following by Dunn's multiple comparisons test. (*) Indicates a statistically significant difference compared to the control group with * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.5 Effect of CBD and EXT on the dopaminergic system

To verify whether treatment with CBD and EXT influenced the dopaminergic system, swimming-induced paralysis with dopamine was used (Figure 5). Statistics analysis indicated that exposure with CBD (Figure 5A) and EXT (Figure 5B) did not alter the latency for paralysis of the worms in comparison to the required latency time of the respective control group.

Moreover, the integrity of the dopaminergic neurons was analyzed by assessing the intensity of fluorescence of neurons marked with GFP in BY200 and BZ555 strains. Exposure to isolated CBD did not impact the intensity of fluorescence in both BY200

(Figure 5C) and BZ555 (Figure 5E) compared to the control group. Similarly, EXT treatment also did not induce changes in fluorescence in BY200 (Figure 5D) and BZ555 (Figure 5F) in relation to the control group.

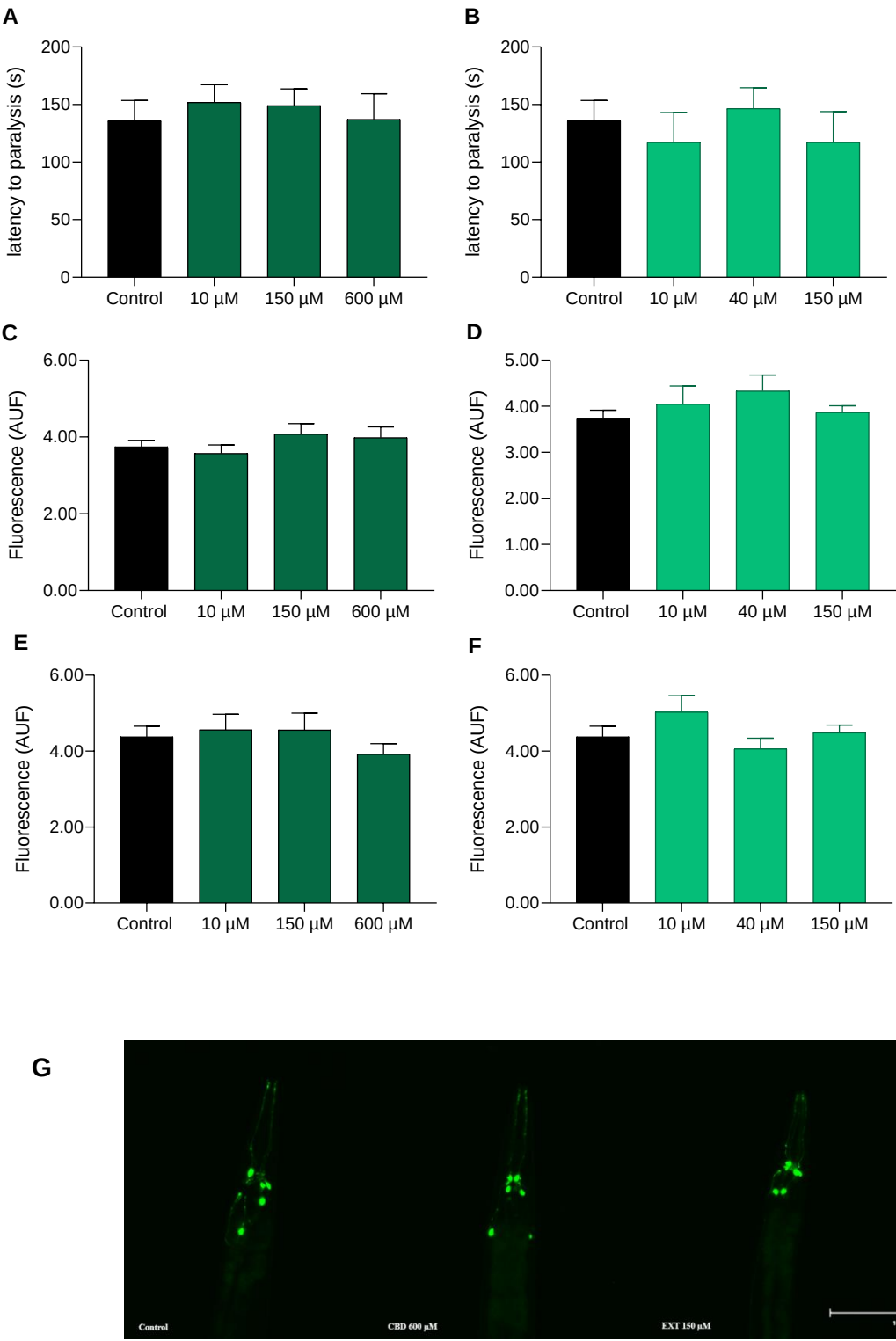


Figure 5 - Effect of CBD and EXT exposure on the dopaminergic system of worms. Swimming induced-paralysis in L4 worms exposed in L1 for 48h to different concentrations of (A) CBD and (B) EXT (n=6). Fluorescence intensity of dopaminergic neurons in BY200 worms exposed to DMSO 2% (control group) and to different concentrations of (C) CBD and (D) EXT (n=6). Fluorescence intensity of dopaminergic neurons in BZ555 worms exposed to different concentrations of (E) CBD and (F) EXT (n=6). (G) Representative images of BY200 strain showing dopaminergic neurons. Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The results were analyzed by One-way ANOVA test.

3.5 Effect of CBD and EXT on cholinergic system

The results depicted in Figure 6 illustrates the effect of CBD or EXT treatment on the cholinergic system of the worms. The egg laying assay was used to evaluate potential damage to cholinergic receptors through the egg release mechanism. The data indicated that the worms exposed to Levamisole were induced to oviposit in relation to the control with bacteria (data not showed). The results showed no significant changes between the number of eggs released by worms exposed to levamisole after CBD (Figure 6A) or EXT treatment (Figure 6B) when compared to the respective control groups. The cholinergic neurons was analyzed by the fluorescence intensity of the neurons marked with GFP in the LX929 strain. The results showed thar both exposure to CBD (Figure 6C) and EXT (Figure 6D) did not alter the fluorescence compared to the respective control groups, measured in worms after 48h of treatment.

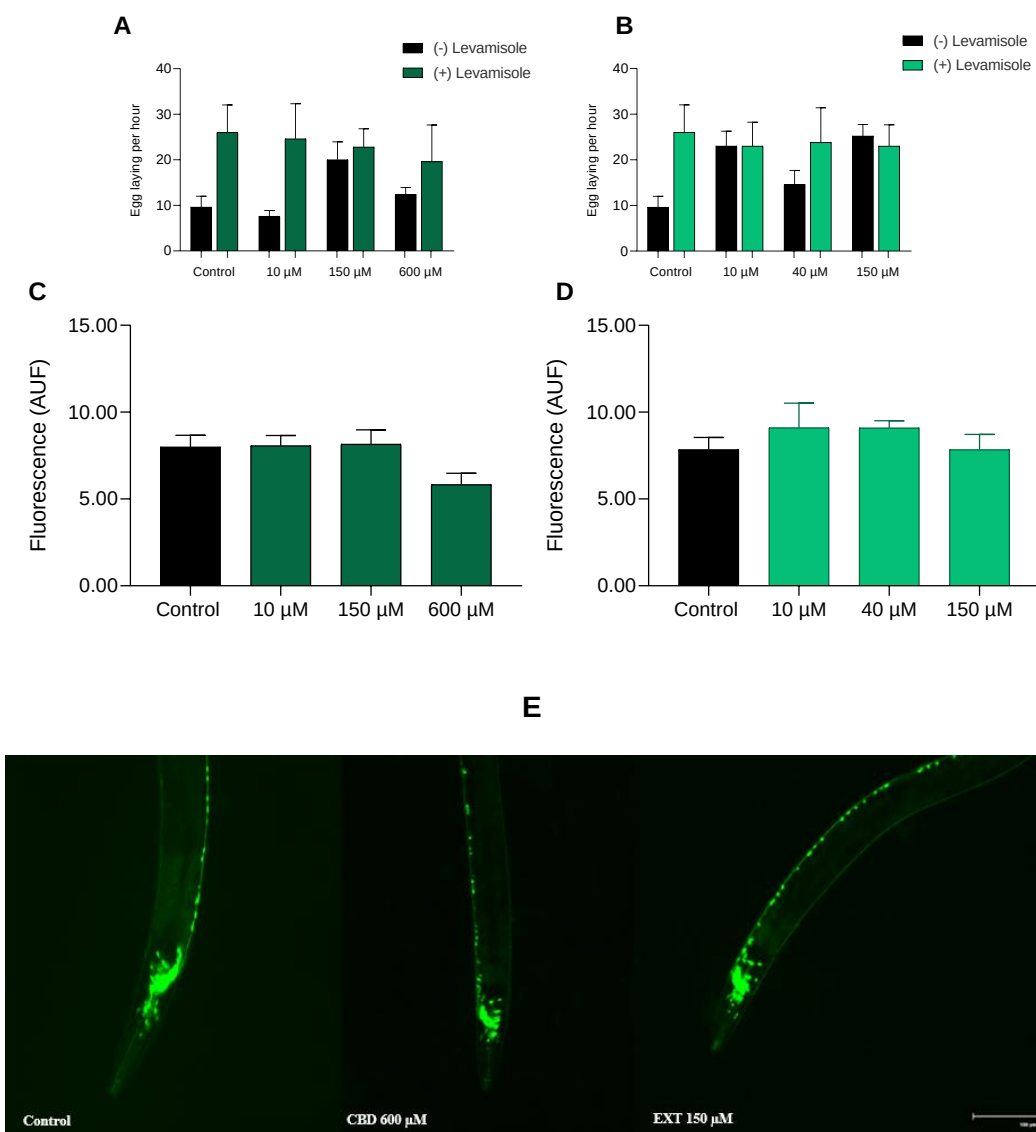


Figure 6 - Effect of CBD and EXT exposure on the cholinergic system of worms. Egg-laying difference between worms with levamisole and without levamisole after exposure to CBD (A) and (EXT) at the first adult day (n=5). The results were analyzed by Two-way ANOVA test. Number of fluorescence intensity of cholinergic neurons in LX929 worms exposed to different concentrations of (C) CBD and (D) EXT (n=6). (E) Representative images of LX929 strain showing cholinergic neurons. The results were analyzed by One-way ANOVA test. All data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

4. Discussion

The use of Cannabis can lead to adverse effects that remain unknown, especially regarding its long-term use in early-life. This uncertainty raises particular concern in the context of prescribing cannabinoid-based medicines, especially for babies and children in early childhood, which are crucial phases for brain and body development (de Freitas et al., 2022). Our study demonstrated that CBD treatment presented toxicity from 600 μ M,

causing worm mortality following 48h exposure. Additionally, exposure to cannabinoids at concentrations of 150 μ M and 600 μ M during the animal's initial larval stage influences its development, affecting body length and area, as well as the locomotor capacity. However, reproductive, dopaminergic, and cholinergic systems did not indicate to be impaired after treatments.

To investigate the toxicity of cannabidiol on developmental parameters and long-term exposure, we performed a chronic exposure from the first larval stage of the worms. We began the analyzes by performing a concentration curve to determine the safe range of EXT and CBD (Figure 1S), based in the study carried out by Land, 2020. It is important to highlight that the concentrations for the EXT were obtained considering the CBD concentration present in the EXT formulation (5%). Taking into account the concentration curve, we followed the assays using 10, 40 and 150 μ M of EXT and 10, 150 and 600 μ M of CBD to evaluate the effects at low, medium and high concentrations.

The first study involving *C. elegans* to evaluate long-term exposure to both cannabinoids concluded that concentrations of 10, 40 and 100 μ M are considered safe (Land et al., 2020). In line with this, our study demonstrated that concentrations lower than 150 μ M did not affect the survival of the animals (Figure 1). However, the highest tested concentration of 600 μ M for CBD reduced the survival rate of the worms (Figure 1). The chronic exposure carried out by Land et al (2020) was performed only with treatments of up to 100 μ M. Despite this, when evaluating acute toxicity, they have also observed toxic effects at higher concentrations, resulting in reduced motility of the worms treated with 4000 μ M. Although the difference in exposure protocols between Land's study and ours, both indicate caution about the possible toxicity caused by cannabinoids in worms. Of note, EXT contained only 5% CBD, therefore it was not possible to reach concentrations greater than 150 μ M. Therefore, there is a possibility that the EXT could also cause alterations in these parameters at higher concentrations.

Next, we measured the length and body area of *C. elegans* in their last larval stage – L4. It was possible to observe that CBD at 150 and 600 μ M (Figure 2A-B) and EXT 40 and 150 μ M (Figure 2C-D) reduced both parameters. Although concentrations below 600 μ M of CBD and exposure to EXT did not reduce the survival rate, these treatments presented toxicity by delaying the development of the worms. In addition to recreational use, children can be exposed to cannabis through breast milk or when using the plant for medicinal purposes. However, the childhood is still a crucial period for neurodevelopment and the population may be more vulnerable to these chronic exposures (Blohm et al.,

2019). Therefore, exposure to cannabinoids in children is concerning and can have serious adverse effects, such as acute neurological symptoms, lethargy, seizures and coma (Breijyeh et al., 2021). Studies have shown that the use of *Cannabis* at this stage of childhood is causing an increase in aggressive behaviors, attention deficit and hyperactivity (Bara et al., 2021; Blohm et al., 2019; J. O. Lo et al., 2022). Besides, studies support the hypothesis that premature exposure to exogenous cannabinoids can alter the physiology of the endocannabinoid system and impair brain maturation, causing the appearance of disorders in later periods, such as psychotic or depressive behaviors, and being a risk factor for psychiatric disorders such as autism spectrum disorder (Rubino & Parolaro, 2016; Scott, 2023).

Some studies have shown that cannabinoids can affect the reproductive system in *in vivo* models (Li et al., 2023; J. O. Lo et al., 2022). In this sense, we analyzed the reproductive system through egg production capacity and progeny size during the reproductive period. The number of eggs produced per worm was evaluated on the first day of adulthood by counting only at this point in the entire reproduction period, and no statistical significance was found between control and treated groups (Figure 3A-B). In line with this, brood size indicated that the reproductive system was not affected by exposure to CBD and EXT (Figure 3C-D). The controversial results can be attributed to variations in the models used, covering trials with humans (J. O. Lo et al., 2022) zebrafish (Li et al., 2023) and *C. elegans*, and involving different concentrations and exposure protocols.

The swimming test results demonstrated that our exposure with CBD and EXT impacted the worm's mobility, decreasing swimming speed in all concentrations tested (Figure 4C-D), however, without interfering with the distance traveled by the animals (Figure 4A-B). A decrease in *C. elegans* motility was also identified by Land and co-workers (2020), after acute exposure to 4000 μ M of CBD. The parameters evaluated in the swimming test indicate the worm's movement capacity, requiring the animal to perform contraction and relaxation activities (Schuske et al., 2004). These processes involve the interaction of many neurotransmitter systems, including the cholinergic, dopaminergic, GABAergic, and serotonergic systems (Vidal-Gade et al., 2011; Xu et al., 2021).

Given this, we decided to investigate other targets of toxicity, starting with the analysis of the dopaminergic system of *C. elegans*. We evaluated the head neuronal viability through the GFP fused to dopamine transporter promoter (DAT-1). ~~In both~~

~~BY200 (Figure 5C-D) and BZ555 (Figure 5E-F) strains, chronic exposure to CBD and EXT caused no damage to dopaminergic neurons. First, we used BZ555 strain (Figure 5E-F), in which chronic exposure to CBD and EXT did not cause damage to dopaminergic neurons. Afterwards, we decided to analyze the neurons marked in the BY200 strain due to its mutation in the rol-6 gene, which cause a defect in the worm's cuticle, making it more sensitive when compared to BZ555 (Smith, 2019).~~

Next, we used the swimming induced paralysis assay to investigate a possible change in dopamine signaling. Worms exposed to CBD or EXT treatments were subjected to high concentrations of dopamine that stimulate paralysis of swimming movements. A change in the latency time for worm paralysis indicates that the treatment interfered with dopamine signaling with dopaminergic neuronal receptors (Kudumala, Sirisha, Serena Sossi, 2017). Our study showed no significant difference in latency time, indicating that dopaminergic signaling was not affected by exposure to CBD and EXT (Figure 5A-B).

The dopaminergic system has been a focal point in *C. elegans* studies that evaluate the therapeutic potential of cannabinoids for diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. In these studies, CBD prevented dopaminergic neurodegeneration and recovered degenerated neurons in *C. elegans* models for Parkinson's and Alzheimer's (Guedes et al., 2023; Muhammad et al., 2022; Shrader et al., 2020; Vanin et al., 2022; F. Wang et al., 2023; Z. Wang et al., 2021; Zhang et al., 2022).. Our study demonstrated that the treatment did not cause damage to the dopaminergic system, contributing to its use in studies in diseases related to this neuronal system as a mechanism of action.

To examine the potential relationship between the cholinergic system and the observed alterations in worm development and locomotion, we evaluated the cholinergic neurons using a transgenic strain in which neurons are tagged with GFP. The fluorescence intensity of head neurons of LX929 strain was not affected by chronic treatment with EXT or CBD (Figure 6A-B). Subsequently, we used the egg-laying assay to investigate a possible change in presynaptic cholinergic signaling. Worms exposed to CBD or EXT treatments were subjected to Levamisole, a cholinergic agonist that acts on nicotinic receptors, causing muscle contraction and oviposition. Our study demonstrated that cholinergic signaling was also not affected by exposure to CBD and EXT (Figure 5A-B).

Based on our results, we can observe that the changes in the swimming test were not caused by damage to dopaminergic and cholinergic neurons, nor to the dopaminergic system through DAT-1 transporters or at the presynaptic cholinergic level. However, the observed reduction in worm speed may be associated with other systems, not addressed

in this study, like GABAergic, and serotonergic systems (Schuske et al., 2004; Vidal-Gade et al., 2011), or possibly linked to dopaminergic and cholinergic systems but through mechanisms distinct from those analyzed in this study. Finally, despite the important findings of the study, we had limitations in investigating higher concentrations of EXT due to its low concentration of CBD in the formulation. Furthermore, we have not yet been able to identify the exact mechanism of action of the tested cannabinoids.

Overall, chronic exposure to high concentrations of EXT and CBD during the early stage of the worm's life affected its development, causing alterations in its size and ability to move. Thus, our study supports the information that cannabinoid treatment during the first phase of life directly influences organism development, requiring a critical assessment in the prescription of cannabis-based medications for pediatric disorders. However, low concentrations such as 10 μ M showed no toxicity to the worm in any analyzed parameter, making it an interesting concentration to further explore the pharmacological potential of the isolate.

5. Conclusion

In conclusion, our study suggests the potential adverse effects of chronic exposure to high concentrations of CBD and EXT, derived from *Cannabis sativa*, during the early stages of *C. elegans* development. Although our findings revealed a significant impact on the development and locomotor capabilities of the worms, particularly at concentrations greater than 150 μ M, it was observed that the treatment did not exhibit toxicity at 10 μ M, making it an interesting concentration for pharmacological studies. Furthermore, we have not yet been able to identify the exact mechanism of action of the tested cannabinoids. The potential risks associated with cannabinoid exposure, especially in vulnerable populations such as infants and children, highlight the importance of comprehensive investigations to determine safety parameters and identify optimal dosages. As the therapeutic use of cannabinoids increases, an assessment that prioritizes patient safety and well-being becomes necessary. Further studies exploring the impact on neurotransmitter systems, reproductive health and long-term consequences are essential for a more comprehensive understanding of the potential benefits and risks associated with *cannabis*-based therapies.

Data Availability Statement

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgements/Funding

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aran, A., & Cayam-Rand, D. (2020). Medical cannabis in children. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10386>
- Arnold, J. C., McCartney, D., Suraev, A., & McGregor, I. S. (2023). The safety and efficacy of low oral doses of cannabidiol: An evaluation of the evidence. *Clinical and Translational Science*, 16(1), 10–30. <https://doi.org/10.1111/cts.13425>
- Bara, A., Ferland, J. M. N., Rompala, G., Szutorisz, H., & Hurd, Y. L. (2021). Cannabis and synaptic reprogramming of the developing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(7), 423–438. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00465-5>
- Beers, J. L., Fu, D., & Jackson, K. D. (2021). *Cytochrome P450-Catalyzed Metabolism of Cannabidiol to the Active Metabolite 7-Hydroxy-Cannabidiol S*. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000350>
- Blohm, E., Sell, P., & Neavyn, M. (2019). Cannabinoid toxicity in pediatrics. *Current Opinion in Pediatrics*, 31(2), 256–261. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000739>
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., Bufo, S. A., Karaman, R., & Scrano, L. (2021). Cannabis: A Toxin-Producing Plant with Potential Therapeutic Uses. *Toxins*, 13(2), 1–2. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13020117>
- Brighenti, V., Protti, M., Anceschi, L., Zanardi, C., Mercolini, L., & Pellati, F. (2021). Emerging challenges in the extraction, analysis and bioanalysis of cannabidiol and related compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113633. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113633>
- Carvalho, R. K., Santos, M. L., Souza, M. R., Rocha, T. L., Guimarães, F. S., Anselmo-Franci, J. A., & Mazaro-Costa, R. (2018). Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive toxicity in male Swiss mice. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1215–1223. <https://doi.org/10.1002/jat.3631>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- de Freitas, F. D., Pimenta, S., Soares, S., Gonzaga, D., Vaz-Matos, I., & Prior, C. (2022). The role of cannabinoids in neurodevelopmental disorders of children and adolescents. *Revista de Neurologia*, 75(7), 189–197. <https://doi.org/10.33588/RN.7507.2022123>
- Estrada-Valencia, R., de Lima, M. E., Colonnello, A., Rangel-López, E., Saraiva, N. R., de Ávila, D. S., Aschner, M., & Santamaría, A. (2021). *The Endocannabinoid System in Caenorhabditis elegans* (Vol. 17, p. 10.1007/112). https://doi.org/10.1007/112_2021_64
- Frandsen, J., & Narayanasamy, P. (2022). Effect of Cannabidiol on the Neural Glyoxalase Pathway Function and Longevity of Several *C. elegans* Strains Including a *C. elegans* Alzheimer's Disease Model. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(8), 1165–1177. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00667>

- Gingrich, J., Choudhuri, S., Cournoyer, P., Downey, J., & Muldoon Jacobs, K. (2023). Review of the oral toxicity of cannabidiol (CBD). *Food and Chemical Toxicology*, 176(April), 113799. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113799>
- Guedes, C., Garcia, A., Anderson, E., César, H. F. F. L., Carneiro, A., Abílio, V. C., Zuardi, A. W., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A., Bincoletto, C., Smaili, S. S., Reckziegel, P., & Pereira, G. J. S. (2023). Cannabidiol Recovers Dopaminergic Neuronal Damage Induced by Reserpine or α - synuclein in *Caenorhabditis elegans*. *Neurochemical Research*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03905-z>
- Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants*, 12(6), 1–43. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>
- Huestis, M. A. (2007). *Human Cannabinoid Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790152>
- Hunt, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37(1), 50–59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>
- Jiang, R., Yamaori, S., Takeda, S., Yamamoto, I., & Watanabe, K. (2011). Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sciences*, 89(5–6), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.018>
- Kudumala, Sirisha, Serena Sossi, L. C. (2017). Swimming induced paralysis is a valuable behavioral assay to assess dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148.
- Land, M. H., Toth, M. L., MacNair, L., Vanapalli, S. A., Lefever, T. W., Peters, E. N., & Bonn-Miller, M. O. (2020). Effect of Cannabidiol on the Long-Term Toxicity and Lifespan in the Preclinical Model *Caenorhabditis elegans*. *Cannabis and Cannabinoid Research*. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0103>
- Legare, C. A., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2022). Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. *Pharmacology*, 107(3), 131–149. <https://doi.org/10.1159/000521683>
- Lehtonen, M., Reisner, K., Auriola, S., Wong, G., & Callaway, J. C. (2008). Mass-Spectrometric Identification of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Nematodes. *Chemistry & Biodiversity*, 5(11), 2431–2441. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890208>
- Li, L., Fan, B., Kong, Z., Zhang, Y., Zhao, M., Simal-Gandara, J., Wang, F., & Li, M. (2023). Short-term exposure of Cannabidiol on Zebrafish (*Danio Rerio*): Reproductive Toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(30), 75668–75680. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27792-7>
- Lo, J. O., Hedges, J. C., & Girardi, G. (2022). Impact of cannabinoids on pregnancy, reproductive health, and offspring outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 227(4), 571–581. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.05.056>
- Lo, L. A., Christiansen, A., Eadie, L., Strickland, J. C., Kim, D. D., Boivin, M., Barr, A. M., & MacCallum, C. A. (2023). Cannabidiol-associated hepatotoxicity: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Internal Medicine*, 293(6), 724–752. <https://doi.org/10.1111/joim.13627>
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Muhammad, F., Liu, Y., Wang, N., Zhao, L., Zhou, Y., Yang, H., & Li, H. (2022).

- Neuroprotective effects of cannabidiol on dopaminergic neurodegeneration and α -synuclein accumulation in *C. elegans* models of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 93(December 2021), 128–139.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.09.001>
- Oakes, M. D., Law, W. J., Clark, T., Bamber, B. A., & Komuniecki, R. (2017). Cannabinoids activate monoaminergic signaling to modulate key *C. elegans* behaviors. *Journal of Neuroscience*, 37(11), 2859–2869.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3151-16.2017>
- Oakes, M., Law, W. J., & Komuniecki, R. (2019). Cannabinoids stimulate the TRP channel-dependent release of both serotonin and dopamine to modulate behavior in *C. elegans*. *Journal of Neuroscience*, 39(21), 4142–4152.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2371-18.2019>
- Pamplona, F. A., Phytolab, E., Alfaro De Prá, M., Leyre Urigüen, B., Crowley, K., de Vries, S. T., & Moreno-Sanz, G. (2018). *Self-Reported Effectiveness and Safety of Trokie R Lozenges: A Standardized Formulation for the Buccal Delivery of Cannabis Extracts*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00564>
- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A. K., Kumar, V., Ponnusamy, S. K., & Naik, S. (2022). Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere*, 289, 133012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133012>
- Poleg, S., Golubchik, P., Offen, D., & Weizman, A. (2019). Cannabidiol as a suggested candidate for treatment of autism spectrum disorder. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.08.030>
- Prati-donaduzzi. (n.d.). *Canabidiol Prati-Donaduzzi*.
- Rubino, T., & Parolaro, D. (2016). The impact of exposure to cannabinoids in adolescence: Insights from animal models. *Biological Psychiatry*, 79(7), 578–585.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.024>
- Saúde, M. da, & Fiocruz. (2023). *NOTA TÉCNICA Estado atual das evidências sobre usos terapêuticos da*. <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-divulga-nota-tecnica-sobre-cannabis-medicinal>
- Schönhofen, P., de Medeiros, L. M., Bristot, I. J., Lopes, F. M., De Bastiani, M. A., Kapczinski, F., Crippa, J. A. S., Castro, M. A. A., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2015). Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins. *Molecular Neurobiology*, 52(1), 26–37.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8843-1>
- Schuske, K., Beg, A. A., & Jorgensen, E. M. (2004). The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 407–414.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.005>
- Scott, J. C. (2023). Impact of Adolescent Cannabis Use on Neurocognitive and Brain Development. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 32(1), 21–42. <https://doi.org/10.1016/J.CHC.2022.06.002>
- Shrader, S. H., Tong, Y. G., Duff, M. B., Freedman, J. H., & Song, Z. H. (2020). Involvement of dopamine receptor in the actions of non-psychoactive phytocannabinoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(4), 1366–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.021>
- SILVA, M. L. V. DA. (2022). *Como tendência do mercado turístico em países legalizados natal/rn 2022*.
- Smith, L. L., Ryde, I. T., Hartman, J. H., Romersi, R. F., Markovich, Z., & Meyer, J. N. (2019). Strengths and limitations of morphological and behavioral analyses in detecting dopaminergic deficiency in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology*, 74,

- 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.07.002>
- U.S. Food and Drug Administration. (2018). Epidiolex - New Drug Application [WWW Document]. *Drugs@FDA FDA Approv. Drug Prod.* https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210365lbl.pdf
- van Es-Remers, M., Spadaro, J. A., Poppelaars, E., Kim, H. K., van Haaster, M., de Wit, M., Iliopoulou, E., Wildwater, M., & Korthout, H. (2022). *C. elegans* as a test system to study relevant compounds that contribute to the specific health-related effects of different cannabis varieties. *Journal of Cannabis Research*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00162-9>
- Vanin, A. P., Tamagno, W. A., Alves, C., Mesacasa, L., Santin, L. F., Sutorillo, N. T., Bilibio, D., Müller, C., Galon, L., & Kaizer, R. R. (2022). Neuroprotective potential of Cannabis sativa-based oils in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19598-3>
- Viana, T. G. (2016). *PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE DO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM EVENTOS AVERSIVOS* Tese apresentada ao Programa de Pós.
- Vidal-Gade, A., Topper, S., Young, L., Crisp, A., Kressin, L., Elbel, E., Maples, T., Brauner, M., Erbguth, K., Axelrod, A., Gottschalk, A., Siegel, D., & Pierce-Shimomura, J. T. (2011). *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), 17504–17509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108673108>
- Wang, F., Jin, T., Li, H., Long, H., Liu, Y., Jin, S., Lu, Y., Peng, Y., Liu, C., Zhao, L., & Wang, X. (2023). Cannabidiol alleviates α -synuclein aggregation via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 37(2), e22735. <https://doi.org/10.1096/fj.202200278RR>
- Wang, Z., Zheng, P., Chen, X., Xie, Y., Weston-Green, K., Solowij, N., Chew, Y. L., & Huang, X. F. (2022). Cannabidiol induces autophagy and improves neuronal health associated with SIRT1 mediated longevity. *GeroScience*, 44(3), 1505–1524. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00559-7>
- Wang, Z., Zheng, P., Xie, Y., Chen, X., Solowij, N., Green, K., Chew, Y. L., & Huang, X. F. (2021). Cannabidiol regulates CB1-pSTAT3 signaling for neurite outgrowth, prolongs lifespan, and improves health span in *Caenorhabditis elegans* of A β pathology models. *FASEB Journal*, 35(5), 1–18. <https://doi.org/10.1096/fj.202002724R>
- Xu, Y., Zhang, L., Liu, Y., Topalidou, I., Hassinan, C., Ailion, M., Zhao, Z., Wang, T., Chen, Z., & Bai, J. (2021). Dopamine receptor DOP-1 engages a sleep pathway to modulate swimming in *C. elegans*. *IScience*, 24(4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102247>
- Zhang, Y., Li, H., Jin, S., Lu, Y., Peng, Y., Zhao, L., & Wang, X. (2022a). Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in *C. elegans* via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. *European Journal of Pharmacology*, 919(January), 174829. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174829>
- Zhang, Y., Li, H., Jin, S., Lu, Y., Peng, Y., Zhao, L., & Wang, X. (2022b). Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in *C. elegans* via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. *European Journal of Pharmacology*, 919. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2022.174829>

Supplementary Materials

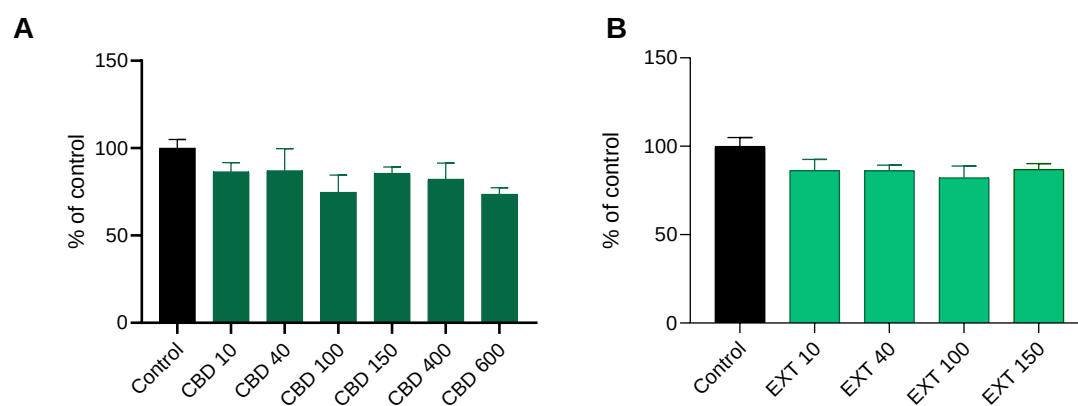


Figure 1S – Concentration curve of CBD and EXT exposure. Survival rate of worms exposed to DMSO 2% (control group) and to (A) 10, 40, 100, 150 400 and 600 µM of CBD and (B) 10, 40, 100 and 150 µM of EXT (n=6) after 48 h of exposure (L4 stage). Data were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). The results were analyzed by One-way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparisons test.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da *Cannabis sativa* pela sociedade já ocorre há muitos anos devido ao seu potencial terapêutico proporcionado pelo CBD, bem como ao seu uso recreativo associado ao THC. Além disso, extratos de *Cannabis sativa* e produtos de CBD isolado já vem sendo prescritos para o tratamento e atenuação de muitas patologias, principalmente relacionadas com distúrbios neuronais. Porém, estudos demonstram que os canabinoides podem apresentar toxicidade para o organismo, sendo mais preocupante para a população infantil, fase crítica para o neurodesenvolvimento.

Em resumo, nossa pesquisa aborda sobre os possíveis efeitos adversos decorrentes da exposição prolongada a concentrações elevadas de CBD e EXT. Embora tenhamos observado que a exposição de concentrações acima de 150 μ M pode apresentar alteração significativa no desenvolvimento e na locomoção dos vermes, essa exposição não alterou parâmetros de reprodução e integridade de neurônios colinérgicos e dopaminérgicos. Além disso, verificou-se que o tratamento não foi tóxico a 10 μ M, revelando-se uma concentração promissora para estudos farmacológicos.

Porém, a existência da possível toxicidade causada pela exposição a canabinoides, especialmente em populações vulneráveis como bebês e crianças, e o aumento na utilização de medicamentos a base de *Cannabis sativa* destaca a necessidade de investigações abrangentes visando estabelecer parâmetros de segurança e determinar dosagens ideais. Estudos adicionais, abordando o impacto nos sistemas de neurotransmissores, do neurodesenvolvimento, saúde reprodutiva e nas consequências a longo prazo, são essenciais para uma compreensão mais completa dos potenciais benefícios e riscos associados às terapias baseadas em *Cannabis sativa*.

7. REFERÊNCIAS

- Aran, A., & Cayam-Rand, D. (2020). Medical cannabis in children. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 11(1), 1–10.
<https://doi.org/10.5041/RMMJ.10386>
- Arnold, J. C., McCartney, D., Suraev, A., & McGregor, I. S. (2023). The safety

- and efficacy of low oral doses of cannabidiol: An evaluation of the evidence. *Clinical and Translational Science*, 16(1), 10–30.
<https://doi.org/10.1111/cts.13425>
- Bara, A., Ferland, J. M. N., Rompala, G., Szutorisz, H., & Hurd, Y. L. (2021). Cannabis and synaptic reprogramming of the developing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(7), 423–438. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00465-5>
- Beers, J. L., Fu, D., & Jackson, K. D. (2021). *Cytochrome P450-Catalyzed Metabolism of Cannabidiol to the Active Metabolite 7-Hydroxy-Cannabidiol* S. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000350>
- Blohm, E., Sell, P., & Neavyn, M. (2019). Cannabinoid toxicity in pediatrics. *Current Opinion in Pediatrics*, 31(2), 256–261.
<https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000739>
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., Bufo, S. A., Karaman, R., & Scrano, L. (2021). Cannabis: A Toxin-Producing Plant with Potential Therapeutic Uses. *Toxins*, 13(2), 1–2. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13020117>
- Brighenti, V., Protti, M., Anceschi, L., Zanardi, C., Mercolini, L., & Pellati, F. (2021). Emerging challenges in the extraction, analysis and bioanalysis of cannabidiol and related compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113633.
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113633>
- Carvalho, R. K., Santos, M. L., Souza, M. R., Rocha, T. L., Guimarães, F. S., Anselmo-Franci, J. A., & Mazaro-Costa, R. (2018). Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive toxicity in male Swiss mice. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1215–1223. <https://doi.org/10.1002/jat.3631>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407.
<https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- de Freitas, F. D., Pimenta, S., Soares, S., Gonzaga, D., Vaz-Matos, I., & Prior, C. (2022). The role of cannabinoids in neurodevelopmental disorders of children and adolescents. *Revista de Neurologia*, 75(7), 189–197.
<https://doi.org/10.33588/RN.7507.2022123>
- Estrada-Valencia, R., de Lima, M. E., Colonnello, A., Rangel-López, E., Saraiva, N. R., de Ávila, D. S., Aschner, M., & Santamaría, A. (2021). *The*

- Endocannabinoid System in Caenorhabditis elegans* (Vol. 17, p. 10.1007/112). https://doi.org/10.1007/112_2021_64
- Frandsen, J., & Narayanasamy, P. (2022). Effect of Cannabidiol on the Neural Glyoxalase Pathway Function and Longevity of Several *C. elegans* Strains Including a *C. elegans* Alzheimer's Disease Model. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(8), 1165–1177. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00667>
- Gingrich, J., Choudhuri, S., Cournoyer, P., Downey, J., & Muldoon Jacobs, K. (2023). Review of the oral toxicity of cannabidiol (CBD). *Food and Chemical Toxicology*, 176(April), 113799. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113799>
- Guedes, C., Garcia, A., Anderson, E., César, H. F. F. L., Carneiro, A., Abílio, V. C., Zuardi, A. W., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A., Bincoletto, C., Smaili, S. S., Reckziegel, P., & Pereira, G. J. S. (2023). Cannabidiol Recovers Dopaminergic Neuronal Damage Induced by Reserpine or α - synuclein in *Caenorhabditis elegans*. *Neurochemical Research*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03905-z>
- Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants*, 12(6), 1–43. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>
- Huestis, M. A. (2007). *Human Cannabinoid Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790152>
- Hunt, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37(1), 50–59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>
- Jiang, R., Yamaori, S., Takeda, S., Yamamoto, I., & Watanabe, K. (2011). Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sciences*, 89(5–6), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.018>
- Kudumala, Sirisha, Serena Sossi, L. C. (2017). Swimming induced paralysis is a valuable behavioral assay to assess dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148.
- Land, M. H., Toth, M. L., MacNair, L., Vanapalli, S. A., Lefever, T. W., Peters, E. N., & Bonn-Miller, M. O. (2020). Effect of Cannabidiol on the Long-Term

- Toxicity and Lifespan in the Preclinical Model *Caenorhabditis elegans*. *Cannabis and Cannabinoid Research*.
<https://doi.org/10.1089/can.2020.0103>
- Legare, C. A., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2022). Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. *Pharmacology*, 107(3), 131–149.
<https://doi.org/10.1159/000521683>
- Lehtonen, M., Reisner, K., Auriola, S., Wong, G., & Callaway, J. C. (2008). Mass-Spectrometric Identification of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Nematodes. *Chemistry & Biodiversity*, 5(11), 2431–2441. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890208>
- Li, L., Fan, B., Kong, Z., Zhang, Y., Zhao, M., Simal-Gandara, J., Wang, F., & Li, M. (2023). Short-term exposure of Cannabidiol on Zebrafish (*Danio Rerio*): Reproductive Toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(30), 75668–75680. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27792-7>
- Lo, J. O., Hedges, J. C., & Girardi, G. (2022). Impact of cannabinoids on pregnancy, reproductive health, and offspring outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 227(4), 571–581.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.05.056>
- Lo, L. A., Christiansen, A., Eadie, L., Strickland, J. C., Kim, D. D., Boivin, M., Barr, A. M., & MacCallum, C. A. (2023). Cannabidiol-associated hepatotoxicity: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Internal Medicine*, 293(6), 724–752. <https://doi.org/10.1111/joim.13627>
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Muhammad, F., Liu, Y., Wang, N., Zhao, L., Zhou, Y., Yang, H., & Li, H. (2022). Neuroprotective effects of cannabidiol on dopaminergic neurodegeneration and α -synuclein accumulation in *C. elegans* models of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 93(December 2021), 128–139.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.09.001>
- Oakes, M. D., Law, W. J., Clark, T., Bamber, B. A., & Komuniecki, R. (2017). Cannabinoids activate monoaminergic signaling to modulate key C.

- elegans behaviors. *Journal of Neuroscience*, 37(11), 2859–2869.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3151-16.2017>
- Oakes, M., Law, W. J., & Komuniecki, R. (2019). Cannabinoids stimulate the TRP channel-dependent release of both serotonin and dopamine to modulate behavior in *C. elegans*. *Journal of Neuroscience*, 39(21), 4142–4152. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2371-18.2019>
- Pamplona, F. A., Phytolab, E., Alfaro De Prá, M., Leyre Urigüen, B., Crowley, K., de Vries, S. T., & Moreno-Sanz, G. (2018). *Self-Reported Effectiveness and Safety of Trokie R Lozenges: A Standardized Formulation for the Buccal Delivery of Cannabis Extracts*.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00564>
- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A. K., Kumar, V., Ponnusamy, S. K., & Naik, S. (2022). Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere*, 289, 133012.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133012>
- Poleg, S., Golubchik, P., Offen, D., & Weizman, A. (2019). Cannabidiol as a suggested candidate for treatment of autism spectrum disorder. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.08.030>
- Prati-donaduzzi. (n.d.). *Canabidiol Prati-Donaduzzi*.
- Rubino, T., & Parolaro, D. (2016). The impact of exposure to cannabinoids in adolescence: Insights from animal models. *Biological Psychiatry*, 79(7), 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.024>
- Saúde, M. da, & Fiocruz. (2023). *NOTA TÉCNICA Estado atual das evidências sobre usos terapêuticos da*. <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-divulga-nota-tecnica-sobre-cannabis-medicinal>
- Schönhofen, P., de Medeiros, L. M., Bristot, I. J., Lopes, F. M., De Bastiani, M. A., Kapczinski, F., Crippa, J. A. S., Castro, M. A. A., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2015). Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins. *Molecular Neurobiology*, 52(1), 26–37. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8843-1>
- Schuske, K., Beg, A. A., & Jorgensen, E. M. (2004). The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 407–414.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.005>

- Scott, J. C. (2023). Impact of Adolescent Cannabis Use on Neurocognitive and Brain Development. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 32(1), 21–42. <https://doi.org/10.1016/J.CHC.2022.06.002>
- Shrader, S. H., Tong, Y. G., Duff, M. B., Freedman, J. H., & Song, Z. H. (2020). Involvement of dopamine receptor in the actions of non-psychoactive phytocannabinoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(4), 1366–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.021>
- SILVA, M. L. V. DA. (2022). *Como tendência do mercado turístico em países legalizados natal/rn 2022*.
- U.S. Food and Drug Administration. (2018). Epidiolex - New Drug Application [WWW Document]. *Drugs@FDA FDA Approv. Drug Prod*. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210365lbl.pdf
- van Es-Remers, M., Spadaro, J. A., Poppelaars, E., Kim, H. K., van Haaster, M., de Wit, M., Iliopoulou, E., Wildwater, M., & Korthout, H. (2022). *C. elegans* as a test system to study relevant compounds that contribute to the specific health-related effects of different cannabis varieties. *Journal of Cannabis Research*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00162-9>
- Vanin, A. P., Tamagno, W. A., Alves, C., Mesacasa, L., Santin, L. F., Sutorillo, N. T., Bilibio, D., Müller, C., Galon, L., & Kaizer, R. R. (2022). Neuroprotective potential of Cannabis sativa-based oils in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19598-3>
- Viana, T. G. (2016). *PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE DO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM EVENTOS AVERSIVOS Tese apresentada ao Programa de Pós*.
- Vidal-Gade, A., Topper, S., Young, L., Crisp, A., Kressin, L., Elbel, E., Maples, T., Brauner, M., Erbguth, K., Axelrod, A., Gottschalk, A., Siegel, D., & Pierce-Shimomura, J. T. (2011). *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), 17504–17509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108673108>
- Wang, F., Jin, T., Li, H., Long, H., Liu, Y., Jin, S., Lu, Y., Peng, Y., Liu, C., Zhao, L., & Wang, X. (2023). Cannabidivarin alleviates α -synuclein aggregation

- via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 37(2), e22735. <https://doi.org/10.1096/fj.202200278RR>
- Wang, Z., Zheng, P., Chen, X., Xie, Y., Weston-Green, K., Solowij, N., Chew, Y. L., & Huang, X. F. (2022). Cannabidiol induces autophagy and improves neuronal health associated with SIRT1 mediated longevity. *GeroScience*, 44(3), 1505–1524. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00559-7>
- Wang, Z., Zheng, P., Xie, Y., Chen, X., Solowij, N., Green, K., Chew, Y. L., & Huang, X. F. (2021). Cannabidiol regulates CB1-pSTAT3 signaling for neurite outgrowth, prolongs lifespan, and improves health span in *Caenorhabditis elegans* of A β pathology models. *FASEB Journal*, 35(5), 1–18. <https://doi.org/10.1096/fj.202002724R>
- Xu, Y., Zhang, L., Liu, Y., Topalidou, I., Hassinan, C., Ailion, M., Zhao, Z., Wang, T., Chen, Z., & Bai, J. (2021). Dopamine receptor DOP-1 engages a sleep pathway to modulate swimming in *C. elegans*. *IScience*, 24(4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102247>
- Zhang, Y., Li, H., Jin, S., Lu, Y., Peng, Y., Zhao, L., & Wang, X. (2022a). Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in *C. elegans* via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. *European Journal of Pharmacology*, 919(January), 174829. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174829>
- Zhang, Y., Li, H., Jin, S., Lu, Y., Peng, Y., Zhao, L., & Wang, X. (2022b). Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in *C. elegans* via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. *European Journal of Pharmacology*, 919. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2022.174829>