



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA - UNIPAMPA
CADASTRO DE PROJETO INSTITUCIONAL



Dados do Projeto

Número de Registro:	2025.PE.UR.4151	Código:	4151
Coordenador:	Daiana Silva de Avila	Controle:	87154
Área:	Pesquisa	Unidade Origem:	CAMPUS URUGUAIANA
Modalidade:	Projeto de Pesquisa	Telefone:	Não consta
Título:	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DO CBD, SEUS DERIVADOS E LIPOSSOMAS EM MODELOS DE DOENÇAS DE RELACIONADAS AO ENVELHECIMENTO E AO NEURODESENVOLVIMENTO EM <i>Caenorhabditis elegans</i>		
Execução:	De 14/04/2025 a 30/09/2028		
Autoriza Publicação Resumo:	Sim	Área de Conhecimento:	Ciências Biológicas
Formação Continuada:	Não		
Grupo de Pesquisa:	Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em <i>Caenorhabditis elegans</i> - GBToxCe	Possui interação com o setor produtivo:	Não
Cooperação interinstitucional dentro do país:	Não	Cooperação interinstitucional fora do país:	Não
Situação do Projeto:	Registrado		
Palavras-chave:	Canabidiol / Doenças neurodegenerativas / <i>C.elegans</i> / câncer / autismo		

Resumo do Projeto

A fase do desenvolvimento cerebral é um período muito crítico, visto que qualquer alteração pode levar a distúrbios do neurodesenvolvimento, como transtorno do espectro do autismo (TEA), transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) e dislexia. Por outro lado, as doenças relacionadas ao envelhecimento como Alzheimer (DA), Parkinson (DP) e câncer afetam milhões de pessoas e os tratamentos existentes causam efeitos colaterais nocivos aos pacientes e nem sempre são eficazes. Os fitocanabinóides extraídos da planta *Cannabis spp.* vêm demonstrando propriedades farmacológicas promissoras para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas. Entre os componentes bioativos presentes nesta planta estão o canabidiol (CBD), canabigerol (CBG), canabinol (CBN) e $\Delta 8$ -tetrahydrocannabinol ($\Delta 8$ -THC). No entanto, poucos estudos abordam a segurança e o efeito desses canabinóides frente a organismos vivos. Considerando a importância da busca de novas terapias antitumorais e neuroprotetoras, o nematóide *Caenorhabditis elegans* vem sendo utilizado em ensaios de triagens farmacológicas e toxicológicas, tornando-se de grande relevância para a obtenção de resultados rápidos, reprodutíveis e diminuindo o uso de vertebrados na pesquisa científica. De particular importância, o verme possui sistema endocanabinóide, apresenta as vias ortólogas às que controlam proliferação celular (e tumorigênese) como em humanos e há disponibilidade de cepas humanizadas que expressam o peptídeo beta amiloide, a alfa-sinucleína, marcadores de DA e DP, respectivamente. Também há disponibilidade de cepas mutantes que resultam em hiperplasia ou em alterações comportamentais relacionadas ao autismo. Considerando a necessidade de estudos de segurança e eficácia destes fitocanabinóides in vivo e da necessidade de reduzir a oxidação pela luz, calor, e a baixa biodisponibilidade destes óleos, neste estudo iremos desenvolver lipossomas como estratégia para melhorar a cinética dos compostos e comparar com suas formas livres em modelos de desordens do neurodesenvolvimento, hiperplasia, agregação de beta amiloide e de alfa-sinucleína em *Caenorhabditis elegans*.

Introdução e Justificativa

Extratos da planta *Cannabis spp.* têm sido usados há milhares de anos para tratar doenças humanas

e também utilizados como droga recreativa devido a sua capacidade de alterar a percepção sensorial e causar euforia. No entanto, a descoberta de um sistema endocanabinoide (eCBS) completo em humanos é recente 1990 (1). Esses achados estimularam a caracterização dos compostos bioativos da planta, como a do principal componente psicoativo, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e do canabidiol (CBD) (2). As próximas descobertas levaram à clonagem de receptores canabinóides e a revelação de seus ligantes endógenos (1). Porém, devido ao uso considerado ilegal em diversos países, há entraves para os estudos, portanto existem muitas lacunas sobre seus efeitos terapêuticos, segurança e os efeitos colaterais causados pelo uso crônico. Embora esse cenário tenha mudado devido aos seus benefícios medicinais e às transições para regulamentação da Cannabis spp. em muitos países, o progresso continua em um ritmo lento (3). O eCBS possui receptores endocanabinóides (CBRs), ligantes endógenos e enzimas de síntese e degradação (4). Existem dois receptores endocanabinóides, o tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2). Estes receptores possuem variadas funções de grande importância no sistema nervoso central (SNC) e periférico, como normalizar a homeostase do glutamato e reduzir a inflamação local (5). Os dois ligantes endocanabinóides mais estudados são a 2- araquidonoiletanolamina ou Anandamida (AEA) e o 2- araquidonoilglicerol (2-AG). Ambos são de extrema importância regulatória na função sináptica e possuem muitos pontos de interação com outros sistemas neuromoduladores e de sinalização, através da sua função de mensageiros retrógrados ao suprimirem a liberação dos neurotransmissores de forma transitória ou de longa duração, tanto nas sinapses excitatórias quanto inibitórias (6). A síntese de AEA e 2-AG são catalisadas por hidrólise tipo fosfolipase D específica de Nacilfosfatidiletanolamina (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 (MGL), respectivamente. Os endocanabinóides também possuem efeito regulatório no SNC em funções como cognição, analgesia e apetite (7). Além dos ligantes endógenos, canabinóides exógenos também podem interagir com o eCBS. A Cannabis spp. tem mais de 400 componentes bioativos, principalmente canabinóides, polifenóis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, óleos e ceras. Entre os fitocanabinóides mais estudados para a avaliação de atividades terapêuticas estão o canabidiol (CBD), canabigerol (CBG), canabinol (CBN) e tetrahydrocannabinol (THC) (8). O fitocanabinóide Canabidiol é o segundo constituinte majoritário da planta Cannabis spp. e é conhecido por não possuir efeito psicoativo como o apresentado pelo THC. Logo, apresenta propriedades farmacológicas potenciais para a ansiedade, esquizofrenia, adição, câncer, doenças intestinais inflamatórias e também é promissor para uma ampla gama de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (6,9). Além disso, seu óleo é licenciado para ser utilizado no tratamento de formas pediátricas raras de epilepsia resistente a tratamentos (10). Mais recentemente, estudos in vitro demonstraram que o CBD diminuiu a invasão de células de câncer cervical, câncer de pulmão e câncer de mama humano (11-13). Além disso, os autores verificaram que camundongos apresentaram uma inibição significativa da metástase pulmonar após o tratamento com o CBD (11). O canabigerol (CBG) é um canabinóide não psicoativo conhecido por suas propriedades farmacológicas frente a doenças inflamatórias, disfunção da bexiga, doença de Huntington e câncer, além de apresentar atividade antibacteriana e aliviar contrações musculares (8,14,15). O CBG demonstrou reduzir a proliferação celular em várias linhagens de células cancerosas humanas, incluindo células de câncer de mama, câncer de próstata, carcinoma colorretal, adenocarcinoma gástrico, carcinoma epitelóide oral, câncer de células tireoidianas, leucemias, além de glioma de ratos e células de melanoma de pele de camundongo (15,16). O canabinol (CBN) é um canabinóide levemente psicoativo com propriedades sedativas (8). Possui efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios e também é utilizado como alternativa eficiente ao THC devido seu efeito para aumentar o apetite (17). Estudos mostram que o CBN protege células nervosas da ferroptose através das mitocôndrias, de maneira independente dos receptores canabinóides (18), além de promover neuroproteção e normalizar os níveis de pressão intraocular, sendo um potencial terapêutico para o tratamento do glaucoma em camundongos (19). O Δ^8 - tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC) é um isômero do Δ^9 -THC e pode causar efeitos psicoativos semelhantes ao Δ^9 -THC, no entanto, esses efeitos são menos potentes (20). A natureza altamente lipofílica do THC o torna rapidamente solúvel no sangue, o que facilita sua ação para o tratamento de insônia, perda de apetite, náusea, doença de Alzheimer e câncer (8,21). Semlali A. et al (2021) verificaram que ambos os canabinóides (Δ^8 -THC e Δ^9 -THC) diminuem a proliferação celular, bloqueando a progressão do ciclo celular e aumentando sua apoptose e autofagia além de suprimir invasão de células de câncer oral (22). Apesar dos resultados promissores, vários destes estudos foram realizados in vitro e, portanto, estudos com animais são

necessários. Visando respeitar a política dos 3Rs (refine, reduce and replace) e acelerar os estudos, utilizando um modelo animal bem caracterizado e adequado, o nematoide *Caenorhabditis elegans* vem sendo amplamente utilizado. O *C. elegans* é um modelo in vivo que vem sendo utilizado em ensaios de triagens farmacológicas e toxicológicas. Esse modelo apresenta diversas vantagens, entre elas o baixo custo de manutenção, rápida reprodução, possibilidade de monitorar o desenvolvimento larval até a morte, e também foi o primeiro ser vivo a ter o seu genoma e transcriptoma completamente sequenciado e caracterizado, respectivamente (23). Uma de suas vantagens mais marcantes é sua transparência anatômica, tornando possível visualizar proteínas marcadas com proteína verde fluorescente (GFP) (23). Através de engenharia genética, foi possível criar cepas que expressam a-sinucleína e o peptídeo b-amilóide humanos mutados, o que permite a agregação destes e o desenvolvimento de fenótipos característicos no verme (24,25). Além disso, as vias clássicas cujas mutações levam a câncer em humanos (vias Wnt, Notch e Ras) estão presentes neste nematoide, sendo já demonstrado que mutações nestas vias levam a formações de tumores e fenótipos específicos que podem ser utilizados para avaliação de atividade antitumoral (26-28). Os genes *nlg-1* e *nrnx-1* que codificam as proteínas neuroligina (NLGN) e neurexina 1 (NRNX1) e que são responsáveis pela adesão neuronal adequada, estão presentes no nematoide e mutações levam a alterações comportamentais, características de neuroatopia. O *C. elegans* também possui eCBS homólogo ao dos mamíferos (29), mas ainda são escassos os estudos com estes modelos de condições. Além disso, por se tratar de moléculas lipofílicas, apresentam baixa solubilidade em água, o que resulta em uma biodisponibilidade oral em torno de 6% necessitando de altas doses para exercer efeito terapêutico. Isso tudo também resulta em diferentes perfis farmacocinéticos, além do óleo ser susceptível à oxidação e degradação em altas temperaturas (30). Portanto, estratégias para melhorar o perfil farmacocinético são necessárias e dentre essas estratégias está o desenvolvimento de novos sistemas de entrega, como os lipossomas. Já existem formulações aprovadas pelo FDA, como o Marqibo®, uma formulação lipossomal de vincristina (31). Em particular, os lipossomas também conseguem atravessar a barreira cérebro-sangue aumentando a concentração da droga carregada no cérebro 12-15. Nosso grupo já demonstrou que os lipossomas são biocompatíveis e apresentam baixa toxicidade nos diferentes modelos animais avaliados, inclusive o *Caenorhabditis elegans* (32). Desta forma, fica evidente a necessidade de mais estudos para elucidar os efeitos farmacológicos e toxicológicos, assim como a eficácia do CBD e seus derivados. Considerando a utilidade do *C. elegans* para estudos mecanísticos e a disponibilidade de cepas que mimetizam as doenças de Parkinson, Alzheimer, desordens do neurodesenvolvimento e câncer, este estudo hipotetiza que o tratamento com óleo de CBD se mostrará promissor em melhorar a qualidade de vida dos animais através da melhora na comunicação neuronal, diminuição dos agregados de proteínas malformadas e dos tumores, com melhora na vida e na qualidade de vida dos animais tratados. Também hipotetizamos que os lipossomas terão um efeito melhor em função da melhora das características farmacocinéticas do CBD.

Objetivos

Objetivo geral Avaliar a segurança e o efeito farmacológico do óleo de Canabidiol, seus sintéticos e sua formulação em lipossomas utilizando modelos humanizados para as doenças Alzheimer e Parkinson em *Caenorhabditis elegans* e em mutantes para câncer e desordens do neurodesenvolvimento. **Objetivos específicos** -Determinar a segurança do tratamento com canabidiol, canabigerol, canabinol e Δ^8 -tetrahydrocannabinol e seus lipossomas em *Caenorhabditis elegans* utilizando cepas humanizadas para as Doenças de Parkinson e Alzheimer e câncer; - Avaliar se os tratamentos irão amenizar os fenótipos de paralisia e alteração no movimento natatório causados pela agregação de alfa-sinucleína e peptídeo β -amilóide em *C. elegans*; -Verificar se os tratamentos irão amenizar os fenótipos de esterilidade e infertilidade através da avaliação de parâmetros reprodutivos como tamanho da progênie, postura de ovos e produção de ovos em *C. elegans*; -Investigar se os tratamentos irão amenizar os fenótipos multivulva através da avaliação do número de pseudovulvas e sua área em *C. elegans*; - Avaliar se os tratamentos irão reduzir as alterações comportamentais em mutantes para neuroligina e neurexina em *C. elegans*; -Investigar diferença na eficácia dos diferentes tratamentos, em especial nas formulações com lipossomas.

Materiais e Métodos

Materiais: Os reagentes **5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (código 21884), Dopamina (código H8502), pentilenotetrazol (código P6500), Paraquat (código 36541), Methyl viologen dichloride hydrate (código 856177), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (código D9132) e D-Luciferin sodium salt (L6882) serão obtidos da Sigma-Aldrich.**

Cepas e manutenção dos *Caenorhabditis elegans*: As cepas utilizadas durante o estudo serão N2 (tipo selvagem); OW13 pkl52386[unc-54p::alpha-syn::YFP + unc-119(+)]; UA44 (baln11[Pdat-1::α-synuclein, Pdat-1::GFP]); CL2355 smg-1(cc546); pCL45 [Psnb-1::human Amyloid beta 1-42::3'UTR(long);Pmtl-2::GFP]; CL2006 dvls2 [Punc-54::human A-beta 3-42; pRF4 (rol-6(su1006), JK3476 [ceh-22(q632) sma-1(e30) V/nT1 [qls51] (IV;V)]; JK1107 [glp-1(q224) III]; BS3164 [unc-32(e189) glp-1(ar202) III]; SD939 [mpk-1(ga111) unc-79(e1068) III]; MT4244 [unc-24(e138) let-60(n1046) IV]; VC228 [nlg-1(ok259)] X e SG1 [nrx-1(ds1) V] . Todas as cepas serão obtidas do *Caenorhabditis* Genetic Center (Minesota, USA), assim como a cepa de *Escherichia coli* OP50 usada como alimento para os vermes. Durante este estudo, os nematoides serão mantidos em meio NGM (nematode growth media) e bactéria *E. coli* OP50, conservados em incubadora a 15 °C ou 20°C, dependendo da necessidade da cepa para que ocorra o desenvolvimento apropriado dos animais. As cepas CL2355 e CL2006 precisam ser mantidas a 15 °C e sofrer uma troca de temperatura para 20°C para expressar o peptídeo β-amiloide, em todos os ensaios essas cepas serão expostas a essa temperatura a partir do estágio L4.

Sincronização: Para obtenção dos vermes em seu estágio L1, eles deverão passar por um processo de sincronização. Este processo consiste na utilização de uma solução de hipoclorito de sódio (2%) + hidróxido de sódio (10 M), para que assim a cutícula dos vermes grávidos se rompa e obtenham-se os ovos. 14 horas depois as larvas L1 eclodem dos ovos, que poderão assim ser utilizadas para os tratamentos. Tratamento: Os vermes no primeiro estágio larval (L1) ou adultos (estágio L4) serão tratados com os diferentes fitocanabinóides livres ou em lipossomas nas concentrações de 10µM, 40 µM, 100 µM diariamente até o décimo dia de vida para cada grupo. As concentrações escolhidas para o tratamento são as mesmas utilizadas pelo Hunter Land et al. (2020) (33), as quais mimetizam as usadas em tratamentos humanos. Avaliação dos neurônios dopaminérgicos nas cepas UA44 e ZZ002: Nos dias 6, 7 e 10 a fluorescência de todos os neurônios dopaminérgicos (4CEP e 2ADE) de cada cepa (UA44, ZZ002) serão avaliados no microscópio Fluid Cell Imaging Station® (Thermo Fisher Científico) para avaliação da neurodegeneração através da contagem dos neurônios perdidos de cada animal, bem como na população total. O ensaio será feito em triplicata e 10 animais de cada grupo serão analisados por dia.

Basal slowing: Este ensaio será realizado nos dias 6, 7 e 10 de vida adulta nas cepas UA44 e ZZ002 e consiste em avaliar a desaceleração basal do corpo do verme na presença ou falta de comida. Quando o sistema dopaminérgico está intacto, os animais ficam mais lentos quando encontram alimento. Placas NGM com bactéria *E. coli* OP50 no centro serão preparadas no dia do ensaio. O movimento será avaliado por um minuto e a resposta será registrada como desaceleração basal = ([taxa de ausência de movimento de alimentos - taxa de presença de movimento de alimentos]) / taxa de presença de movimento de alimentos 29. Pelo menos 10 vermes por grupo serão utilizados em cada ensaio. Será utilizada **dopamina** como controle positivo. Para controle negativo, será utilizado **paraquat e o Methyl viologen dichloride hydrate**

Body bends, velocidade, amplitude do bend: Nos dias 6, 7 e 10 de vida adulta será realizado o teste para a avaliação dos movimentos natatórios, velocidade de e distância de natação percorrida. Cinco vermes serão transferidos para uma placa de 24 poços, contendo 200µL de salina (NaCl 0,9%) em cada poço. Por 30 segundos os vermes serão ambientados e então gravados por 1 minuto, usando a lupa Olympus SZ2-LGB, um adaptador para smartphone e um smartphone para gravar os vídeos. O Tracker video analysis and modeling tool software será então usado para rastrear a locomoção de cada verme. Será avaliada a velocidade média, os movimentos de natação e a distância de natação percorrida para cada grupo de 5 animais. Pelo menos três experimentos independentes serão realizados e 10 animais de cada grupo analisados por experimento.

Ensaio de sobrevivência, longevidade e taxa de paralisia: Os animais serão expostos aos diferentes grupos de tratamento todos os dias durante o ensaio, à 20°C. O tratamento será adicionado as placas contendo meio NGM e será usada como fonte de alimento a bactéria *E. coli* OP50 previamente exposta a UV. Cada grupo será diariamente transferidos para novas placas, até que todos estejam mortos. Serão considerados mortos todos os vermes que não responderem ao estímulo do toque. Todas as cepas passarão por esse ensaio. A taxa de paralisia será avaliada junto com a longevidade, onde os vermes que não responderem ao toque, não apresentarem nenhum movimento de corpo e mexerem apenas a cabeça serão considerados paralisados.

Avaliação da agregação de α-sinucleína e de β-amilóide: Vermes sincronizados serão mantidos em placas NGM / OP50 até atingirem o estágio L4 e então serão tratados. Vermes adultos serão diariamente tratados até o dia do ensaio. Nos dias 6, 7 e 10 o ensaio será realizado. Os vermes

então serão lavados três vezes para remover a bactéria e as fotos para avaliar a agregação da α -sinucleína utilizando a cepa OW13 pKs2386[unc-54p::alpha-syn::YFP + unc-119(+)], a qual agrega a α -sinucleína no músculo e é marcada com YFP. Para obter imagens in vivo de agregados A β , vamos usar o corante X-34 (1,4-bis (3-carboxi-4- hidroxifenil)etenil) -benzeno). Para este fim, vermes CL2006 serão expostos a choque térmico por 1 hora a 37 ° C (Zevian e Yanowitz 2014). Em seguida, os vermes serão submetidos ao corante (1mM) por 2 horas. Em seguida, os vermes serão lavados 3 vezes com NaCl (0,5%) para remover o excesso de corante e transferidos para placas com E.coli OP50. Após 1h, os vermes serão transferidos para lâminas. Em ambos os ensaios os vermes serão anestesiados com levamisol (1mM) e as imagens serão obtidas com Fluid Cell Imaging Station® (Thermo Fisher Científico). A intensidade média de fluorescência de 5 vermes por grupo será medida usando o software ImageJ.

Ensaio de níveis de espécies reativas de oxigênio: Os animais tratados serão coletados das placas e transferidos para microtubos. Após lavagens para remoção da E. coli, os animais serão tratados com **5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate** por 1h, no escuro. Após, serão lavados para remoção do excesso do reagente e transferidos para microplacas de 96 poços, para realização da leitura da fluorescência em leitora de microplacas (Tecan). Para confirmação do potencial antioxidante do extrato, este será analisado frente o radical DPPH (**2,2-difenil-1-picril-hidrazila**)

Ensaio de quimiotaxia: Vermes sincronizados serão mantidos em placas NGM / OP50 até atingirem o estágio L4 e então serão tratados. Vermes adultos serão diariamente tratados até o dia do ensaio. Nos dias 6, 7 e 10 o ensaio será realizado. Os vermes então serão lavados três vezes para remover a bactéria. As placas para o ensaio de quimiotaxia serão divididas em 4 quadrantes serão iguais, com um ponto em cada quadrante marcado com um T para teste e C para controle. Será usado 1 de EtOH 95% (controle) e butanona 10% (atrativo). Em torno de 200 animais serão pipetados no ponto de origem do ensaio. O índice de quimiotaxia será calculado de acordo com a seguinte equação: "(IQ). $IQ = [(nButanona) - (nEtOH)] / [(Total-nOrigem)]$, onde n representa o número de vermes em cada quadrante. Será utilizado **pentilenotetrazol** como controle negativo/

Ensaio de reprodução: Para realização dos ensaios de reprodução serão avaliados o tamanho da progênie, a postura de ovos e o número de ovos dentro dos nematoides de todas as cepas. O tamanho da progênie será estimado pela análise individual do tamanho total da ninhada ao longo do período reprodutivo. Um (1) verme por concentração, em triplicatas, serão analisados em cada experimento independente. A postura de ovos será avaliada no primeiro dia do período reprodutivo dos nematoides. Será verificado o número de ovos postos por dois (2) vermes por concentração, durante o período de 1h, utilizando o agonista colinérgico levamisol (500 mM) para estimular a ovoposição e analisar a integridade do sistema colinérgico. O número de ovos dentro dos nematoides será avaliado no primeiro dia do período reprodutivo. O número de ovos de cinco (5) vermes por concentração será mensurado após adição de uma solução de lise (NaOH 1M, NaClO 1%, e H2O destilada), para que a cutícula dos vermes grávidos seja rompida, liberando os ovos para análise.

Níveis de ATP: Os níveis de ATP serão quantificados seguindo a metodologia descrita por Soares et al. (2022). A bioluminescência de cem vermes (linhagem PE255) será medida nos dias 4 e 7 da fase adulta, durante o período de exposição ou 3 dias após a remoção do ambiente de exposição (10^o dia). As medições serão realizadas após reação com **D-Luciferin sodium salt** por 15 min, com intervalos de 15 s, utilizando um leitor de microplacas (Tecan). Os valores de luminescência foram normalizados pela fluorescência da GFP e pelos níveis de proteína determinados pelo método de Bradford .

Ensaio de fenótipo multivulva: Cinco vermes da cepa MT4244 serão expostos conforme descrito acima e avaliados no terceiro dia adulto (terceiro dia após a exposição). Esses vermes superexpressam o gene let-60 localizado nas células vulvares e envolvido na regulação positiva do desenvolvimento vulvar. O número de fenótipos de multivulva e sua área serão avaliados e comparados com o grupo controle. As imagens serão obtidas usando um microscópio Nikon Eclipse 50i (Tóquio, Japão) usando levamisol (1 mM) para anestesia de vermes e a área tumoral será quantificada usando o software Image J. Análise da linhagem germinativa: As células germinativas no braço gonadal das cepas N2, JK3476, JK1107, BS3164, SD939 e MT4244 serão coradas com 4',6-diamino-2-fenil-indol (DAPI), um corante fluorescente que possui afinidade com o DNA. Cinco (5) vermes selecionados aleatoriamente serão fixados em etanol e incubados com 1mg.mL⁻¹ de DAPI nas lâminas por 20 minutos. Os nematoides serão montados em lâminas e analisados com um microscópio de fluorescência Fluid Cell Imaging Station® (Thermo Fisher Scientific).

Ensaio de saída do alimento: O ensaio de saída da comida será realizado com as cepas N2 (tipo selvagem), com indução de comportamentos tipo TEA, VC228 nlg-1(ok259) e SG1 [nrx-1(ds1) V], conforme SCOTT et al., 2017, sem pré-condicionamento do campo alimentar. Para o ensaio, 10 µL de bactéria E. coli OP50 serão adicionados no centro da placa, no dia anterior à análise. Posteriormente, sete vermes de cada grupo no primeiro dia de adulto (48h após a exposição) serão transferidos para o campo de bactéria. Um evento de saída da comida será definido quando todo o corpo do verme sair do campo com bactéria (Figura 3). O ensaio será contado durante 30 minutos nos tempos de 2 e 24 horas, em 6 experimentos independentes.

Análise estatística: Os dados serão expressos como média $\pm$ DP e submetidos ao teste de normalidade. De acordo com os resultados obtidos, será feita análise de variância paramétrica unilateral (ANOVA) de uma via para os dados de sobrevivência, reprodução e fenótipo multivulva, seguido de pós teste de Tukey. Referente aos dados de longevidade será feita a análise de Kaplan Meier. Serão considerados resultados estatisticamente significativos com nível de significância $p < 0,05$. Todos os experimentos serão realizados em duplicata em três experimentos independentes.

Resultados Esperados

Esperamos que as formulações de CBD não apresentem toxicidade nas concentrações testadas, para que assim possamos proceder com segurança aos estudos com os modelos de doenças neurodegenerativas e câncer; esperamos que os fitocanabinóides veiculados na forma de lipossomas sejam mais eficazes por melhorar a sua biodisponibilidade; a partir dos resultados obtidos, espera-se formar pelo menos três mestres vinculadas ao PPGBioquímica, e ao final do processo experimental, almejamos a publicação de pelo menos três artigos científicos de alta relevância internacional.

Relação Ensino, Pesquisa, Extensão

As atividades de Pesquisa realizadas durante a iniciação científica auxiliam na compreensão de um todo, elucidam a aplicação dos conhecimentos teóricos em experiências práticas e aplicadas e ajudam na integração dos saberes. Esta inserção dos graduandos em projetos de pesquisa e a aproximação com mestrands e doutorandos resulta em troca de experiências e permite descobrir a carreira científica como opção profissional. A política institucional da UNIPAMPA e os projetos político-pedagógicos dos cursos de graduação preconizam a ampliação e fortalecimento da produtividade científica, através da promoção de atividades que potencializem o desenvolvimento local e regional de forma ética e sustentável. Este projeto, em especial, oportunizará ao discente estudar os mais variados temas, aplicando conhecimentos de componentes curriculares diversos.

Geração de Resíduos

Descrição detalhada dos resíduos: O principal resíduo químico gerado será dos tratamentos com fitocanabinóides em placas de cultivo bacteriológico. Os resíduos biológicos serão bactéria E. coli OP50 em meios de bactoágar. Quantidade que será gerada aproximada: 100 ml de resíduos de CBD e 10L de ágar contendo E. coli. **Destino dos resíduos:** Tratamento no local de geração. **Descrever o tratamento que será efetuado:** O biológico será autoclavado e descartado em lixo biológico após condensar. O químico será armazenado em containers e descartado no programa de descarte de resíduos da UNIPAMPA **Acondicionamento para posterior tratamento.** **Descrever os seguintes itens:** Local onde será armazenado até a realização do tratamento: Será armazenado dentro do laboratório 101 do NUPEVI. **Embalagem que será usada:** Em embalagem de plástico

Referências

1. Freund, A. F., Katona, A. & Piomelli, D. Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. (2003) doi:10.1152/physrev.00004.2003.-Research.
2. Bridgeman, M. B. & Abazia, D. T. Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. Pharm. Ther. 42, 180 (2017).
3. Freeman, A. M. et al. How does cannabidiol (CBD) influence the acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans? A systematic review. Neuroscience and Biobehavioral Reviews vol. 107 696712 (2019).
4. Di Marzo, V. & Piscitelli, F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. Neurotherapeutics vol. 12 692698 (2015).
5. Aymerich, M. S. et al. Cannabinoid pharmacology/therapeutics in chronic degenerative disorders affecting the central nervous system. Biochemical Pharmacology vol. 157 6784 (2018).
6. Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E. & Hashimoto, Y. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. Neuron vol. 76 7081 (2012).
7. Cooray, R., Gupta, V. & Suphioglu, C. Current Aspects of the Endocannabinoid System and Targeted THC and CBD Phytocannabinoids as Potential Therapeutics for Parkinson's and

Alzheimer's Diseases: a Review. *Molecular Neurobiology* vol. 57 48784890 (2020). 8. Pattnaik, F. et al. Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere* 289, 133012 (2022). 9. Fasinu, P. S., Phillips, S., ElSohly, M. A. & Walker, L. A. Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. *Pharmacotherapy* vol. 36 781796 (2016). 10. Friedman, D., French, J. A. & Maccarrone, M. Safety, efficacy, and mechanisms of action of cannabinoids in neurological disorders. *The Lancet Neurology* vol. 18 504512 (2019). 11. Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H. & Hinz, B. Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem. Pharmacol.* 79, 955966 (2010). 12. Elbaz, M. et al. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: Novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. *Mol. Oncol.* 9, 906919 (2015). 13. Kovalchuk, O. et al. The effect of cannabis dry flower irradiation on the level of cannabinoids, terpenes and anti-cancer properties of the extracts. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 29, 101736 (2020). 14. Valdeolivas, S. et al. Neuroprotective Properties of Cannabigerol in Huntington's Disease: Studies in R6/2 Mice and 3-Nitropropionate-lesioned Mice. *Neurotherapeutics* 12, 185199 (2015). 15. Deiana, S. Potential Medical Uses of Cannabigerol: A Brief Overview. in *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* vol. 7 958967 (Elsevier, 2017). 16. Baek, S. H. et al. Boron trifluoride etherate on silica-A modified lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Arch. Pharm. Res.* 21, 353356 (1998). 17. Galatov, M. L. D. Z. N. K. I. Analysis of Potential Anti-Cancer Effects of Cannabinol and Cannabidiol using HCC1806 and HEK293 Cell Lines | URSCA Proceedings. Vol. 4. MacEwan University Library, Edmonton, Canada <https://journals.macewan.ca/ursca/article/view/1582> (2018). 18. Liang, Z. et al. Cannabinol inhibits oxytosis/ferroptosis by directly targeting mitochondria independently of cannabinoid receptors. *Free Radic. Biol. Med.* 180, 3351 (2022). 19. Somvanshi, R. K. et al. Cannabinol modulates neuroprotection and intraocular pressure: A potential multi-target therapeutic intervention for glaucoma. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1868, 166325 (2022). 20. António, J., Ribeiro, C. & Fernando Pessoa, U. A Cannabis e suas aplicações terapêuticas. 145 (2014). 21. Kleckner, A. S. et al. Opportunities for cannabis in supportive care in cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 11, 175883591986636 (2019). 22. Semlali, A., Beji, S., Ajala, I. & Rouabhia, M. Effects of tetrahydrocannabinols on human oral cancer cell proliferation, apoptosis, autophagy, oxidative stress, and DNA damage. *Arch. Oral Biol.* 129, 105200 (2021). 23. Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* (2015) doi:10.1534/genetics.115.176099. 24. Cooper, J. F. & Van Raamsdonk, J. M. Modeling Parkinson's disease in *C. elegans*. *Journal of Parkinson's Disease* vol. 8 1732 (2018). 25. Griffin, E. F., Caldwell, K. A. & Caldwell, G. A. Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chemical Neuroscience* vol. 8 25962606 (2017). 26. Medina, P. M., Ponce, J. M. & Cruz, C. A. Revealing the anticancer potential of candidate drugs in vivo using *Caenorhabditis elegans* mutant strains. *Transl. Oncol.* 14, 100940 (2021). 27. Kobet, R. A. et al. *Caenorhabditis elegans*: A Model System for Anti-Cancer Drug Discovery and Therapeutic Target Identification. *Biomol. Ther. (Seoul)*. 22, 371383 (2014). 28. Lee, M.-H. & Yoon, D. S. A Phenotype-Based RNAi Screening for Ras-ERK/MAPK Signaling-Associated Stem Cell Regulators in *C. elegans*. in vol. 1622 207221 (2017). 29. Estrada-Valencia, R. et al. The Endocannabinoid System in *Caenorhabditis elegans*. in vol. 17 10.1007/112 (2021). 30. 10. Millar, S. A., Maguire, R. F., Yates, A. S. & O'sullivan, S. E. Towards better delivery of cannabidiol (Cbd). *Pharmaceuticals* vol. 13 115 (2020). 31. Allen, T. M. & Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 65 3648 (2013) 32. Roncato, J. F. F. et al. Lipid reducing potential of liposomes loaded with ethanolic extract of purple pitanga (*Eugenia uniflora*) administered to *Caenorhabditis elegans*. *J. Liposome Res.* 29, 274282 (2019). 33. Land, M. H. et al. Effect of Cannabidiol on the Long-Term Toxicity and Lifespan in the Preclinical Model *Caenorhabditis elegans*. *CannabisCannabinoid Res. can.* 2020.0103 (2020) doi:10.1089/can.2020.0103

Possui Bolsistas

Não, mas vou pleitear em alguma chamada

Unidades e Cursos

Unidade	Curso
Campus Uruguaiana	Doutorado em Bioquímica (URDB)
Campus Uruguaiana	Farmácia (URFAR)
Campus Uruguaiana	Mestrado em Bioquímica (URMBQ)

Equipe Executora

Nome	E-mail	Tipo	Função	CH Semanal	Período Participação
Aline de Castro da Silva	alinesilva.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Bolsista	40	De 14/04/2025 a 31/03/2027
Daiana Silva de Avila	daianaavila@unipampa.edu.br	Docente	Coordenador	1	De 14/04/2025 a 31/03/2027
Heloisa Aiolfi Padilha	heloisapadilha.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Bolsista	40	De 14/04/2025 a 31/03/2027
Jean Freitas Reginatto	jeanreginato.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Bolsista	20	De 14/04/2025 a 31/03/2027
Julia Dorneles Saleh	juliasaleh.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Bolsista	20	De 15/04/2025 a 31/03/2027

Cronograma

Data Início	Data Fim	Atividade	Carga Horária	Local	Membros
14/04/2025	31/03/2027	Manutenção e tratamento dos animais	2	GBToxCe	Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha, Jean Freitas Reginatto, Julia Dorneles Saleh
14/04/2025	31/03/2027	Avaliação dos neurônios dopaminérgicos nas cepas UA44 e ZZ002	2	GBToxCe	Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha
14/04/2025	31/03/2027	Análises comportamentais: basal slowing, quimiotaxia e saída do alimento	4	GBToxCe	Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha, Jean Freitas Reginatto, Julia Dorneles Saleh
14/04/2025	31/03/2027	Body bends, velocidade, amplitude do bend	4	GBToxCe	Jean Freitas Reginatto, Julia Dorneles Saleh
14/04/2025	31/03/2027	Body bends, velocidade, amplitude do bend	40	GBToxCe	Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha, Jean Freitas Reginatto, Julia Dorneles Saleh
14/04/2025	31/03/2027	Ensaios de reprodução	40	GBToxCe	Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha, Jean Freitas Reginatto, Julia Dorneles Saleh
14/04/2025	31/03/2027	Ensaio de fenótipo multivulva e de análise da linhagem germinativa	40	GBToxCe	Julia Dorneles Saleh, Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha, Jean Freitas Reginatto
14/04/2025	31/03/2027	Análise estatística, participação em eventos, redação de trabalhos e seminários de grupo	40	GBToxCe	Aline de Castro da Silva, Daiana Silva de Avila , Heloisa Aiolfi Padilha, Jean Freitas Reginatto, Julia Dorneles Saleh
01/04/2026	31/03/2027	Avaliação da agregação de α -sinucleína e de β -amilóide	40	GBToxCe	Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha
01/06/2026	30/09/2028	Avaliação da atividade anticâncer do CBD	20	UNIPAMPA/CAMPUS URUGUAIANA	Jean Freitas Reginatto, Julia Dorneles Saleh, Aline de Castro da Silva, Heloisa Aiolfi Padilha
01/03/2027	14/04/2027	Entrega do Relatório Final	10	UNIPAMPA/CAMPUS URUGUAIANA	Daiana Silva de Avila

Planejamento de Despesas

Despesas de Custeio	Opção	Valor Estimado (R\$)	Fonte de Financiamento	Especificações
Auxílio a Estudantes (Bolsas)	Já Possui	50.000,00	Edital Interno	Pro-IC, FAPERGS, CNPq
Diárias	Não Necessita	0,00		
Passagens	Não Necessita	0,00		
Material de Consumo	Necessita	50.000,00	Edital Externo	reagentes como ágar, peptona, plásticos como microtubos, falcons, ponteiras, placas de petri
Serviços de Terceiros (Pessoa Física)	Não Necessita	0,00		
Serviços de Terceiros (Pessoa Jurídica)	Não Necessita	0,00		
Outros	Não Necessita	0,00		
Total		100.000,00		

Despesas de Capital	Opção	Valor Estimado (R\$)	Fonte de Financiamento	Especificações
---------------------	-------	----------------------	------------------------	----------------

Equipamentos e Material Permanente	Já Possui	0,00	Edital Interno e Externo	balança, incubadora BOD, centrífuga, microscópios
------------------------------------	-----------	------	--------------------------	---

Total Geral de Despesas (R\$): **100.000,00**

Alternativas caso a fonte de financiamento não se confirme: bolsa PQ da pesquisadora ou recursos próprios

Documento gerado por: Daiana Silva De Avila **Data/Hora:** 28/09/2026 às 21:41:24