

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**ANÁLISE DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE EXTRATOS DA ESPÉCIE
VEGETAL *Cannabis sativa* (Linnaeus) EM MODELOS DE ESTUDOS DE
AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS**

Tamires de Almeida Cruz

SEROPÉDICA

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE EXTRATOS DA ESPÉCIE
VEGETAL *Cannabis sativa* (Linnaeus) EM MODELOS DE ESTUDOS DE
AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS**

TAMIRES DE ALMEIDA CRUZ

Orientador

Prof. Dsc. Cristiano Jorge Riger

Co-orientadores

Prof. Dsc. Tiago Fleming Outeiro

Prof. Dsc. Douglas Siqueira de Almeida Chaves

Prof. Dsc. Marcos Dias Pereira

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Química**, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Área
de concentração Química.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C955a Cruz, Tamires de Almeida, 1993-
Análise dos efeitos biológicos de extratos da
espécie vegetal Cannabis sativa (Linnaeus) em modelos
de estudos de agregação de proteínas associadas a
doenças neurodegenerativas / Tamires de Almeida Cruz.
Seropédica, 2025.
173 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.
Coorientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.
Coorientador: Tiago Fleming Outeiro.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Química,
2025.

1. Parkinson, Doença de. 2. Alzheimer, Doença de. 3.
Maconha. 4. Saccharomyces cerevisiae. I. Riger,
Cristiano Jorge, 1972-, orient. II. Chaves, Douglas
Siqueira de Almeida, 1981-, coorient. III. Outeiro,
Tiago Fleming, 1976-, coorient. IV Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Química. V. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TAMIRES DE ALMEIDA CRUZ

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 12/12/2025

Cristiano Jorge Riger Dr. UFRRJ
(Orientador)

Daniela Cosentino Gomes Dra. UFRRJ

Renata Barbosa Lacerda Dra. UFRRJ

Elis Cristina Araújo Eleutherio Dra. UFRJ

Tuane Cristine Ramos Gonçalves Viera Dra. UFRJ



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E
CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

TERMO N° 1195/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 12/12/2025 17:58) CRISTIANO **(Assinado digitalmente em 15/12/2025 17:29)**

JORGE RIGER
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
IQ (11.39.00.21)
Matricula: ###442#0

DANIELA COSENTINO GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matricula: ###455#0

(Assinado digitalmente em 12/12/2025 15:20)

RENATA BARBOSA LACERDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matricula: ###795#2

(Assinado digitalmente em 15/12/2025 09:23)

ELIS CRISTINA ARAUJO ELEUTHERIO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.487-##

(Assinado digitalmente em 12/12/2025 16:46)

TUANE CRISTINE R
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.927-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **1195**, ano: **2025**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **12/12/2025** e o código de verificação: **e18c5ee4db**

Dedico esta tese à minha avó Maria Inês, que fez questão de assistir minha defesa de TCC presencialmente no auge dos seus 90 anos e, depois, minha defesa de dissertação, online, devido à pandemia. Apesar de eu tanto dizer que ela assistiria minha defesa de tese, ela descansou em 2024, mas sinto sua presença nesse momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter estado comigo em todo o processo e nos muitos desafios que surgiram ao longo destes anos.

Aos meus pais Rogério e Mônica, que sempre fizeram de tudo para que eu e meu irmão tivéssemos os melhores estudos e instruções. Sempre estiveram ao meu lado, com empenho, me dando suporte para que eu pudesse concluir meus objetivos, além de amor incondicional. Ao meu irmão Roger, que me inspira com sua dedicação profissional e ambição genuína.

Ao meu esposo Leandro, que foi o primeiro a me incentivar a seguir a carreira acadêmica, quando eu ainda estava receosa sobre o momento ideal, estando no meio de uma gestação. E em todos os momentos que desanimei e pensei em desistir, ele foi firme e me ajudou a ganhar forças para continuar.

Ao meu filho Murilo, que me motiva a ser melhor todos os dias. Sua existência é mais do que suficiente para me fazer sentir prazer na vida e em tudo que faço. Nosso amor é a minha maior força.

À minha sogra Sirleia, que sempre foi rede de apoio com meu filho e com a minha casa, junto aos meus pais, para que eu pudesse me dedicar.

À minha prima Morena, que juntamente com o Leandro, me empurrou para o doutorado. Sua trajetória profissional é extremamente inspiradora para mim e ouvir seu incentivo foi determinante.

Agradeço imensamente ao meu orientador Professor Dr. Cristiano Jorge Riger, que me acolheu em seu grupo de pesquisa com a maior ternura e respeito desde sempre. Sua habilidade em administrar relações interpessoais, em ser empático e respeitoso, me inspira a ser gentil e ouvir a necessidade do outro, o que é uma qualidade inestimável para um professor. Sua alegria em ver seus alunos crescerem e viverem experiências nunca antes imaginadas é extremamente simbólica. Sempre fez seu melhor para todos nós, profissional e pessoalmente.

Ao professor Dr. Tiago Fleming Outeiro, por ter aceitado nossa parceria em 2021, e ter sido disponível desde então. Sua vida atarefada e agenda organizada entre fusos horários jamais impediu que estivesse acessível e aberto para conversarmos. Foi um prazer ter aprendido tanto com ele e com seu grupo, entre congressos e meu doutorado sanduíche na Alemanha. Foi uma experiência incrível, que me abriu a mente, além de possibilidades.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves e Prof. Dr. Marcos Dias Pereira, por terem topado esse projeto e terem contribuído para minha formação, com suas ideias e experiências.

A todos os meus colegas do LEOM, que compartilharam seus sonhos, medos, histórias e angústias, entre experimentos e seminários. Foram eles que tornaram tudo mais leve e divertido, que tornaram a rotina menos exaustiva. Em especial, ao Rodrigo, que foi e é um grande amigo, além de meu consultor científico (rsrs). Todas as minhas ideias são discutidas com ele primeiramente. Amo nossa parceria! Dannel, Nathália e William, cada um com seu jeitinho e personalidade, dispostos a ajudarem SEMPRE, transformaram nossa relação de colegas de trabalho em amizade! Karine, com sua força e determinação, sempre ensinou a todos nós o quanto a eficiência pode ser alcançada quando se tem vontade. Sua criatividade e dedicação são impressionantes. Bárbara (Babi), com sua doçura e gentileza, sempre trouxe alegria para todos nós, especialmente para mim, quando caíamos no chão (literalmente) de tanto rir, depois de horas de cansaço no laboratório. E por fim, Edlene, que apesar de eu não ter tido a oportunidade de conviver no laboratório, sempre foi nosso modelo (meu e do Rodrigo) de legado para o laboratório. Espero ter contribuído com o grupo pelo menos um pouco do que ela contribuiu. Sinto muito orgulho de todos vocês e da relação amistosa que conquistamos!

Às minhas amigas, em especial Camila, Natália e Mariana, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos. Jamais poderei expressar a gratidão de ter conquistado essas amizades tão cedo na minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

RESUMO

CRUZ, Tamires de Almeida. **Análise dos efeitos biológicos de extratos da espécie vegetal *Cannabis sativa* (Linnaeu) em modelos de estudos de agregação de proteínas associadas a doenças neurodegenerativas.** 2025. 173p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

As doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, envolvem perda progressiva de neurônios e agregação de proteínas, incluindo α -sinucleína (aSyn) e β -amiloide (A β 42). Estratégias capazes de reduzir o estresse oxidativo e modular a agregação proteica são de grande interesse terapêutico. A *Cannabis sativa* apresenta composição química diversificada, incluindo canabinoides, flavonoides e terpenos, cujas interações biológicas ainda não foram totalmente exploradas. Neste estudo, quatro extratos hidrometanólicos de *C. sativa*, provenientes de diferentes genótipos e ricos em fitocanabinoides majoritários (THC, CBD e CBN), foram avaliados quanto a toxicidade, atividade antioxidante, proteção mitocondrial e modulação de agregação proteica. Utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* (cepas BY4741 e Δ yap1) não transformadas e transformadas com genes de aSyn ou A β 42, além de células humanas H4 expressando aSyn. A caracterização fitoquímica revelou que os extratos apresentavam diferentes proporções de THC (69,88 %), CBD (52,64 %) e CBN (47,38–58,64 %). Os extratos não apresentaram toxicidade relevante e mantiveram viabilidade celular em todas as cepas, incluindo Δ yap1, demonstrando ação independente do sistema antioxidante endógeno. Evidenciou-se forte efeito antioxidante, revertendo o desbalanço redox induzido por aSyn e A β 42. A proteção mitocondrial foi seletiva, ocorrendo frente a A β 42, mas não a aSyn. Em células H4, os extratos reduziram inclusões de aSyn e aumentaram a proporção de células livres de agregados. Em conclusão, os extratos de *C. sativa* exibem potencial antioxidante e modulador da agregação proteica, com efeitos seletivos sobre a função mitocondrial, fornecendo subsídios experimentais sólidos para futuras estratégias terapêuticas contra desordens neurodegenerativas.

Palavras-chave: *Cannabis sativa*, doenças neurodegenerativas, α -sinucleína, beta-amiloide, *Saccharomyces cerevisiae*, células H4.

ABSTRACT

CRUZ, Tamires de Almeida. **Analysis of the biological effects of extracts from the plant species *Cannabis sativa* (Linnaeu) extracts in models of protein aggregation associated with neurodegenerative diseases.** 2025. 173p. Thesis (Doctorate in Chemistry). Chemistry Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's, involve progressive loss of neurons and protein aggregation, including α -synuclein (aSyn) and β -amyloid (A β 42). Strategies capable of reducing oxidative stress and modulating protein aggregation are of great therapeutic interest. *Cannabis sativa* has a diverse chemical composition, including cannabinoids, flavonoids, and terpenes, whose biological interactions have not yet been fully explored. In this study, four hydromethanolic extracts of *C. sativa*, derived from different genotypes and rich in major phytocannabinoids (THC, CBD, and CBN), were evaluated for toxicity, antioxidant activity, mitochondrial protection, and protein aggregation modulation. Untransformed and transformed *Saccharomyces cerevisiae* (strains BY4741 and $\Delta yap1$) with aSyn or A β 42 genes were used, as well as human H4 cells expressing aSyn. Phytochemical characterization revealed that the extracts had different proportions of THC (69.88%), CBD (52.64%), and CBN (47.38–58.64%). The extracts showed no relevant toxicity and maintained cell viability in all strains, including $\Delta yap1$, demonstrating action independent of the endogenous antioxidant system. A strong antioxidant effect was evident, reversing the redox imbalance induced by aSyn and A β 42. Mitochondrial protection was selective, occurring in the presence of A β 42 but not aSyn. In H4 cells, the extracts reduced aSyn inclusions and increased the proportion of aggregate-free cells. In conclusion, *C. sativa* extracts exhibit antioxidant and protein aggregation modulating potential, with selective effects on mitochondrial function, providing solid experimental support for future therapeutic strategies against neurodegenerative disorders.

Keywords: *Cannabis sativa*, neurodegenerative diseases, alpha-synuclein, amyloid-beta, *Saccharomyces cerevisiae*, H4 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de Lewy bodies (LBs) a partir da agregação da aSyn e suas consequências celulares..	23
Figura 2. Estrutura primária e conformação tridimensional da aSyn..	25
Figura 3. Aspectos centrais da fisiopatologia da doença de Alzheimer associados à agregação do peptídeo β -amiloide..	28
Figura 4. Formação de placas β -amiloide a partir da clivagem diferencial da proteína precursora amiloide (APP)..	29
Figura 5. Fontes de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no ambiente celular.....	31
Figura 6. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial..	33
Figura 7. Síntese, degradação e sinalização dos endocanabinoides em neurônios pós-sinápticos	37
Figura 8. Artefatos funerários contendo vestígios de canabinoides psicoativos datados de aproximadamente 2.500 anos atrás.	39
Figura 9. Propaganda histórica dos cigarros Grimault promovendo o uso terapêutico da cannabis no tratamento de doenças respiratórias.....	40
Figura 10. Representações midiáticas da <i>Cannabis sativa</i> associadas à degeneração moral e à racialização no Brasil em meados do século XX..	41
Figura 11. Evolução temporal do número de publicações científicas indexadas no PubMed utilizando as palavras-chave “ <i>Cannabis sativa</i> ” e “Tetrahydrocannabinol”.	43
Figura 12. Evolução temporal do número de publicações científicas indexadas no PubMed utilizando a palavra-chave “Endocannabinoid system”.	43
Figura 13. Morfologia geral da planta <i>Cannabis sativa</i>	45
Figura 14. Estruturas químicas dos principais fitocanabinoides identificados na <i>C. sativa</i>	46
Figura 15. Biossíntese do ácido canabigerólico (CBGA), precursor central dos fitocanabinoides, na <i>Cannabis sativa</i>	47
Figura 16. Conversão enzimática do ácido canabigerólico (CBGA) em ácido tetrahydrocannabinólico (THCA).	48
Figura 17. Conversão biossintética do ácido canabigerólico (CBGA) nos principais fitocanabinoides de <i>Cannabis sativa</i>	49
Figura 18. Biossíntese dos canabinoides de cadeia lateral curta em <i>Cannabis sativa</i>	50
Figura 19. Expressão e síntese da aSyn em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	57
Figura 20. Constructos usados em H4 para modelo de agregação.	59
Figura 21. Mapa do vetor dos plasmídeos utilizados para a expressão de aSyn e A β 42 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
Figura 22. Desenho experimental dos ensaios de toxicidade, potencial antioxidante, oxidação intracelular e integridade mitocondrial com <i>S. cerevisiae</i>	72

Figura 23. Desenho experimental dos ensaios de Viabilidade Celular por citometria de fluxo e agregação proteica por imunocitoquímica e microscopia de fluorescência com H4.	76
Figura 24. Cromatogramas dos extratos de <i>C. sativa</i> obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Aranjio de Diodos.	79
Figura 25. Avaliação da toxicidade dos extratos de <i>Cannabis sativa</i> por ensaio colorimétrico de viabilidade celular baseado na redução da resazurina em leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
Figura 26. Curvas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> das cepas BY4741 e $\Delta yap1$ cultivadas em meio YPD contendo 2% (m/v) de glicose, na ausência e na presença de extratos de <i>C. sativa</i>	85
Figura 27. Avaliação da toxicidade dos extratos de <i>C. sativa</i> por ensaio de viabilidade celular baseado na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em <i>S. cerevisiae</i>	86
Figura 28. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de <i>C. sativa</i> por ensaio de viabilidade celular baseado na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em <i>S. cerevisiae</i> após indução de estresse oxidativo.	90
Figura 29. Quantificação dos níveis de oxidação intracelular em <i>S. cerevisiae</i> por ensaio fluorimétrico baseado em diclorofluoresceína (DCF) após indução de estresse oxidativo.	92
Figura 30. Validação da transformação com o plasmídeo p426GAL-aSyn-GFP por microscopia de fluorescência.	96
Figura 31. Quantificação dos níveis de oxidação intracelular em <i>S. cerevisiae</i> transformada com plasmídeos de expressão heteróloga, avaliada por ensaio fluorimétrico baseado em diclorofluoresceína (DCF).	97
Figura 32. Efeito dos extratos de <i>C. sativa</i> sobre a toxicidade da aSyn associada à função mitocondrial em <i>S. cerevisiae</i>	100
Figura 33. Ação do extrato E-THC sobre os danos mitocondriais induzidos pela expressão de aSyn em <i>S. cerevisiae</i>	101
Figura 34. Ação dos extratos de <i>C. sativa</i> sobre os danos mitocondriais induzidos pela expressão de aSyn em <i>S. cerevisiae</i>	102
Figura 35. Avaliação da viabilidade celular em <i>S. cerevisiae</i> expressando aSyn após tratamento com extratos de <i>C. sativa</i>	105
Figura 36. Ação dos extratos de <i>C. sativa</i> sobre os danos mitocondriais induzidos pela expressão do peptídeo A β 42 em <i>S. cerevisiae</i>	107
Figura 37. Avaliação da viabilidade celular em <i>S. cerevisiae</i> expressando A β 42 após tratamento com extratos de <i>C. sativa</i>	109
Figura 38. Avaliação da toxicidade dos extratos de <i>C. sativa</i> em células de neuroglioma humano H4 por citometria de fluxo.	113
Figura 39. Efeito dos extratos de <i>C. sativa</i> sobre a agregação de aSyn em células H4.	116
Figura 40. Potencial dos extratos de <i>C. sativa</i> na modulação da agregação de aSyn em células H4 avaliado por microscopia de fluorescência.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.	64
Tabela 2. Perfil de canabinoides dos diferentes extratos de <i>C. sativa</i> . Os quatro extratos analisados foram obtidos por extração hidrometanólica assistida por ultrassom e caracterizados quanto à presença dos fitocanabinoides majoritários: THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol), CBD (canabidiol) e CBN (cannabinol). A tabela apresenta a composição relativa de cada canabinoide em cada extrato.	79
Tabela 3. Vias de ação dos canabinoides em diferentes modelos experimentais.	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Δ^8 -THC – Δ^8 -tetrahydrocanabinol

2-AG – 2-araquinodoil-glicerol

AEA – Anandamida

APP – Amyloid Precursor Protein (Proteína Precursora Amiloide)

aSyn – proteína α -sinucleína

ATP – Adenosina Trifosfato

A β – peptídeo β -amiloide

A β 42 – peptídeo β -amiloide com 42 aminoácidos

CB₁R – Receptor canabinoide CB₁

CB₂R – Receptor canabinoide CB₂

CBC – Canabicromeno

CBD – Canabidiol

CBDA – Ácido canabidiólico

CBDV – Canabidivarina

CBG – Canabigerol

CBGA – Ácido canabigerólico

CBGV - Canabigerovarina

CBGVA – Ácido canabigerovarina

CBN – Canabinol

CTE – Cadeia Transportadora de elétrons

DA – Doença de Alzheimer

DAIP – Doença de Alzheimer de Início Precoce

DAIT – Doença de Alzheimer de Início Tardio

DMCBD – Dimetilcanabidiol

DP – Doença de Parkinson

EV – Empty Vector

FAD – Dinucleotídeo de Flavina e Adenina

GFP – Green Fluorescent Protein (Proteína Verde Fluorescente)

HAT – Hydrogen Atom Transfer (Transferência de Hidrogênio)

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

LBs – Lewy Bodies (Corpos de Lewy)

mPTP – Poro de Transição Mitocondrial

NAC – Non-Amyloid Component (Componente não-amiloide)

RNS – Reactive Nitrogen Species (Espécies Reativas de Nitrogênio)

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

SEC – Sistema Endocanabinoide

SET – Single Electron Transfer (Transferência monoeletrônica)

THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

THCA – Ácido tetrahydrocannabinólico

THCV – Tetrahydrocannabinivarina

TRPV1 – Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (Receptor de Potencial Transitório Vaniloide tipo 1)

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UPS – Ubiquitin-Proteasome System (Sistema Ubiquitina-Proteassoma)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Contexto geral das doenças neurodegenerativas.....	19
1.1.1. A doença de Parkinson e a proteína α -sinucleína (aSyn).....	22
1.1.2. A doença de Alzheimer e o peptídeo β -amiloide (A β).....	26
1.1.3. Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial	30
1.2. O sistema endocanabinoide e sua relação com a neuroproteção	35
1.3. <i>Cannabis sativa</i> : contexto histórico.....	38
1.3.1. <i>Cannabis sativa</i> : características e composição química.....	44
1.3.2. <i>Cannabis sativa</i> : potencial farmacológico	50
1.4. Modelos biológicos.....	53
1.4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
1.4.2. Neuroglioma humano: células H4	58
2. OBJETIVO GERAL.....	60
2.1. Objetivos específicos:	60
3. METODOLOGIA.....	61
3.1. Obtenção da espécie vegetal e processo extrativo	61
3.2. Perfil químico dos extratos de <i>C. sativa</i>	62
3.3. PARTE I – LEVEDURA	63
3.3.1. Culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e condições de crescimento	63
3.3.2. Transformação da levedura para modelo de aSyn	65
3.3.2.1. Propagação dos plasmídeos em <i>E. coli</i>	65
3.3.2.2. Preparação de leveduras competentes e transformação por eletroporação	66
3.3.2.3. Validação da transformação	67
3.3.3. Avaliação preliminar da toxicidade dos extratos de <i>C. sativa</i> ...67	
3.3.3.1. Triagem qualitativa da citotoxicidade dos extratos	67
3.3.3.2. Perfil de crescimento celular	68
3.3.4. Avaliação da toxicidade e potencial antioxidante dos extratos de <i>C. sativa</i> por viabilidade celular	68
3.3.5. Avaliação do ambiente redox intracelular	69
3.3.6. Avaliação do perfil protetor dos extratos de <i>C. sativa</i> frente à toxicidade induzida pelas proteínas agregantes	70
3.3.7. Avaliação da integridade mitocondrial	71

3.4. PARTE II – CÉLULAS H4	72
3.4.1. Cultura celular e transfecção	72
3.4.2. Citotoxicidade dos extratos de <i>C. sativa</i>	73
3.4.3. Imunocitoquímica	74
3.4.4. Quantificação das inclusões aSyn	75
3.4.5. Análise estatística	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
4.1. Perfil químico dos extratos de <i>C. sativa</i>	77
4.2. Avaliação da toxicidade dos extratos de <i>C. sativa</i> e perfil de crescimento celular	82
4.3. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de <i>C. sativa</i>	88
4.4. Avaliação dos efeitos biológicos dos extratos de <i>C. sativa</i> no ambiente redox intracelular de cepas de levedura expressando aSyn e Aβ42	95
4.5. Avaliação dos efeitos biológicos dos extratos de <i>C. sativa</i> na integridade da membrana mitocondrial e seu impacto na viabilidade celular de cepas de levedura expressando aSyn	98
4.6. Avaliação dos efeitos biológicos dos extratos de <i>C. sativa</i> na integridade da membrana mitocondrial e seu impacto na viabilidade celular de cepas de levedura expressando Aβ42	106
4.7. Avaliação dos efeitos dos extratos de <i>C. sativa</i> na formação de inclusões em células de neuroglioma H4 transfectadas com aSyn	111
5. CONCLUSÕES	124
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
7. ANEXO I: artigo originado desta Tese	162
1. Introduction	163
2. Materials and methods	164
2.1. Plant material, processing, and extraction	164
2.4. Yeast cell culture conditions	165
2.5. Evaluation of the toxicity and antioxidant potential of <i>C. sativa</i> extracts	165
2.6. Evaluation of the protective profile of <i>C. sativa</i> extracts against toxicity induced by aggregating proteins	165
2.7. Mitochondrial integrity assays	165
2.8. Flow cytometry	165
2.9. Immunocytochemistry	165
2.10. Statistical analysis	166
3. Results	166

3.1. Chemical profile of Cannabis sativa extracts	166
3.2. Impact of C. sativa extracts on yeast cell viability	166
3.3. Intracellular redox environment	167
3.4. Impact of the C. sativa extracts on mitochondrial integrity and protection against toxicity induced by aSyn protein	168
3.5. Cytotoxicity of C. sativa extracts in H4 cells	169
3.6. Effect of the extracts on aSyn inclusions	169
4. Discussion	170
5. Conclusion	175
CRedit authorship contribution statement	175
Funding	175
Declaration of competing interest	175
Appendix A. Supplementary data	175
References	176

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto geral das doenças neurodegenerativas

O aumento da expectativa de vida global aliado ao avanço da tecnologia e de pesquisas médicas têm despertado um olhar mais atento para doenças relacionadas a idades avançadas, tais como câncer, osteoporose, diabetes, hipertensão e doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Ben-shlomo, 2024; Passeri et al., 2024; Barbosa, 2021). Dados da Organização das Nações Unidas apontam que o número de pessoas acima de 60 anos poderá chegar a 25% da população mundial até 2050 (United Nations, 2020; United Nations, 2019).

A doença de Alzheimer (DA) é a mais prevalente dentre as doenças neurodegenerativas, tendo acometido em 2019 cerca de 55 milhões de pessoas no mundo (Breijyeh; Karaman, 2020); e tem mostrado projeções alarmantes com expectativa de crescimento exponencial até meados deste século (Zhang et al., 2025). Em 2021, a estimativa era de que cerca de 57 milhões de pessoas viviam com demência no mundo, e a DA correspondia a 60-70% desses casos (Rahman et al., 2025). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 10 milhões de novos casos de demência surgem no mundo a cada ano (OMS, 2021). Projeções indicam que o número de pessoas com demência no mundo pode subir de aproximadamente 57,4 milhões (2019) com impacto econômico de cerca de U\$ 2,8 trilhões, para aproximadamente 152,8 milhões podendo custar cerca de U\$ 16,9 trilhões até 2050 (Nichols et al., 2022; Zhu et al., 2025). No Brasil, estima-se que cerca de 1,2 milhão de pessoas vivem com DA, com cerca de 100.000 novos casos por ano (Agência GOV – Ministério da Saúde, 2023). Estudos recentes mostraram que na população brasileira a prevalência da DA é de cerca de 12% para pessoas acima de 65 anos, e mulheres correspondem a cerca de 59% dos casos (Da Silva et al., 2020). Em termos de mortalidade por DA no Brasil, entre 2010 e 2019 as mulheres representaram cerca de 64,5% dos casos, com faixa etária acima de 80 anos correspondendo a aproximadamente 75% (Matos et al., 2021).

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, sendo a principal doença motora, afetando cerca de 2% da população acima de 65 anos e de 4 a 5% da população acima de 85 anos (Erustes et al., 2025; Melo et al., 2018; Tysnes; Storstein, 2017). Estudos recentes estimam que casos de Parkinson em pessoas com mais de 55 anos mais que triplicaram desde 1990 (Luo et al., 2025; Ben-Shlomo, 2024). Estes dados projetam impactos devastadores para sistemas de saúde e altos custos sociais e econômicos (Zhang et al., 2025; Dauphinot et al., 2022). Em 2021, havia aproximadamente 11,7 milhões de casos de DP no mundo (Luo et al., 2025), e estima-se que até 2050 o número de casos aumente para 25,2 milhões, representando um aumento de 112% em relação a 2021 (Su et al., 2025). No Brasil, dados apontam que acima de 50 anos a prevalência da doença é de 0,84%, aumentando com a idade e sendo mais comum entre os homens (Dos Santos et al., 2024). O custo médio anual do tratamento da DP no Brasil é estimado em U\$4.000,00 (cerca de R\$21.000,00), sem diferenças significativas entre as regiões do país (Bovolenta et al., 2023). Sua manifestação tem como principais características a rigidez muscular, bradicinesia (lentidão ou ausência do movimento), tremor de repouso e instabilidade postural (Peña-Zelayeta et al., 2025; Rizvi et al., 2024; Hirsch et al., 2016); além de outros sintomas como depressão, ansiedade, sonolência diurna excessiva, perda de capacidade olfativa, distúrbios do sono, constipação intestinal, dificuldade para engolir e dispepsia (desconforto digestivo) (Peña-Zelayeta et al., 2025; Rizvi et al., 2024).

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à DA e à DP, ainda existe significativa ineficácia no retardo da progressão dessas doenças e suas eventuais curas; fazendo com que os tratamentos disponíveis atualmente sejam, em geral, paliativos com foco em aliviar os sintomas e proporcionar melhor qualidade de vida para os pacientes (Passeri et al., 2024; Prajjwal et al., 2023); o que reforça a urgência de se investigar terapias neuroprotetoras. Atualmente, nenhum medicamento é capaz de cessar a progressão da neurodegeneração na doença de Parkinson (Cooray et al., 2020). A natureza multifatorial dessas patologias, como neuroinflamação, agregação proteica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, entre outros, dificulta abordagens terapêuticas únicas e específicas (Kou et al., 2023); e tem fortalecido a busca por novas substâncias capazes de agir sobre múltiplos alvos biológicos

(Ribaud et al., 2021). Estudos recentes têm destacado a relevância de substâncias naturais como terapias promissoras, uma vez que compostos como polifenóis, flavonoides e lignanas, por exemplo, têm mostrado eficácia em ações múltiplas; podendo atuar como antioxidantes, anti-inflamatórios, modulando atividades enzimáticas e protegendo as funções mitocondriais, ainda que os dados clínicos permaneçam limitados (Andrade et al., 2023).

Embora as manifestações clínicas das doenças de Alzheimer e Parkinson sejam diferentes, sendo respectivamente declínio da memória e proeminência dos sintomas motores; acumulam-se evidências de que ambas compartilham mecanismos moleculares convergentes, como o acúmulo proteico, falha no metabolismo energético e disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção autofágica/proteassômica (Liu et al., 2023).

As doenças neurodegenerativas, em geral, são caracterizadas por perdas progressivas de neurônios vulneráveis e estão relacionadas a anormalidades conformacionais de proteínas, como a formação de oligômeros, que são agregados formados por monômeros ligados entre si, contendo a proteína α -sinucleína (aSyn) na DP e o peptídeo β -amiloide ($A\beta$) na DA (Brás et al., 2021). O acúmulo intracelular desses oligômeros gera inclusões proteicas, o que pode causar danos em lipídios de membranas, alterações no sistema autofágico, disfunções mitocondriais, danos oxidativos aumentados e morte celular (O'Regan et al., 2020). Na DA, peptídeos amiloides de 40 ou 42 aminoácidos, $A\beta$ 1-40 e $A\beta$ 1-42 respectivamente, podem ser gerados em decorrência da clivagem diferencial da Proteína Precursora Amiloide (APP) por γ - e β -secretases, acumulando-se nos ambientes intra e, principalmente, extracelular dos neurônios (França et al., 2017). Oligômeros formados pela proteína aSyn na DP são encontrados em pacientes com Parkinsonismo; indicando que a formação e o aumento desses aglomerados proteicos nos neurônios parecem estar bioquimicamente relacionados à disfunção e consequentemente morte neuronal (Henderson et al., 2019). Sinais de danos ou acúmulo proteico ativam respostas inflamatórias crônicas mediadas pela micróglia e astrócitos ativados, que liberam citocinas, quimiocinas e mediadores oxidativos, contribuindo para a destruição progressiva do tecido e comprometimento neuronal (Wareham et al., 2022).

Além do acúmulo proteico, em ambas as doenças são observadas falhas no metabolismo energético e na função mitocondrial, caracterizadas pelo

comprometimento de complexos da cadeia respiratória, perda de equilíbrio redox e diminuição do potencial de membrana mitocondrial; cuja capacidade reduzida da produção de ATP gera déficits no suporte energético para neurônios e células da glia, que são particularmente sensíveis a falhas metabólicas (Jurcău et al., 2022; Klemmensen et al., 2024). Concomitantemente, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*) impulsiona a progressão de ambas as doenças, uma vez que o sistema antioxidante endógeno não é capaz de atenuar níveis extremamente elevados de ROS, ocasionando oxidação de lipídios, proteínas e DNA, o que agrava a disfunção mitocondrial e pode intensificar as agregações proteicas previamente citadas (Jurcău et al., 2022).

Além disso, estudos apontam diminuição da atividade proteassômica, falha do lisossomo ou vacúolo decorrente da combinação entre a desorganização compartimental (bloqueio da fusão autofágica) e ineficiência degradativa (perda de acidez e da atividade enzimática) e comprometimento da autofagia/mitofagia em modelos de DA e DP. Essa disfunção não degrada eficientemente agregados proteicos e organelas defeituosas, gerando acúmulos proteicos intracelulares, aumentando a toxicidade para as células (Liu et al., 2023; Su et al., 2023). As vias não atuam isoladamente, e esta integração metabólica gera um efeito cascata; com proteínas mal enoveladas aumentando os danos oxidativos, danificando mitocôndrias; liberando sinais inflamatórios e impulsionando o prejuízo ao sistema proteolítico.

1.1.1. A doença de Parkinson e a proteína α -sinucleína (aSyn)

A DP é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, principalmente na substância nigra *Pars-compacta* (sistema nervoso central) e, em menor escala, no neostriado e no núcleo subtalâmico da gânglia basal. Estudos recentes indicam que essa degeneração neuronal na substância nigra *Pars-compacta* reduz drasticamente os níveis de dopamina no estriado, comprometendo a função da via nigro-estriatal (Martirosyan et al., 2024; Ramesh; Arachchige, 2023; Heng et al., 2023; Salvatore, 2024; Hirsch et al., 2016; Ludovico et al., 2002; Ludovico et al., 2003; Galvan; Wichmann, 2008); e também pelo enovelamento incorreto e agregação da proteína aSyn, formando inclusões intracitoplasmáticas

conhecidas como *Corpos de Lewy* (LBs, do inglês *Lewy Bodies*) (Amaral et al., 2024; Dominguez-meijide et al., 2021). O acúmulo intracelular dos LBs (Figura 1) enriquecidos em proteína aSyn gera inclusões proteicas semelhantes a fios, chamadas de neurites de Lewy, provocando os sintomas motores da doença (Skaper et al., 2018). A superexpressão desta proteína nos neurônios está diretamente relacionada com a patogênese da DP (Mehra et al., 2019; Outeiro et al., 2019). Embora os mecanismos não tenham sido completamente esclarecidos, a agregação da aSyn, juntamente com estresse oxidativo, excitotoxicidade, danos à bicamada lipídica, disfunção mitocondrial, alterações nos mecanismos de depuração celular como interrupções nas vias proteassomais e lisossomais, acúmulo anormal de ferro e neuroinflamação têm sido associados com os processos neurodegenerativos da DP (Amaral et al., 2024; Yu et al., 2024; Burré et al., 2018; Queiroz et al., 2022; Guardia-Laguarta et al., 2014; Di Maio et al., 2016).

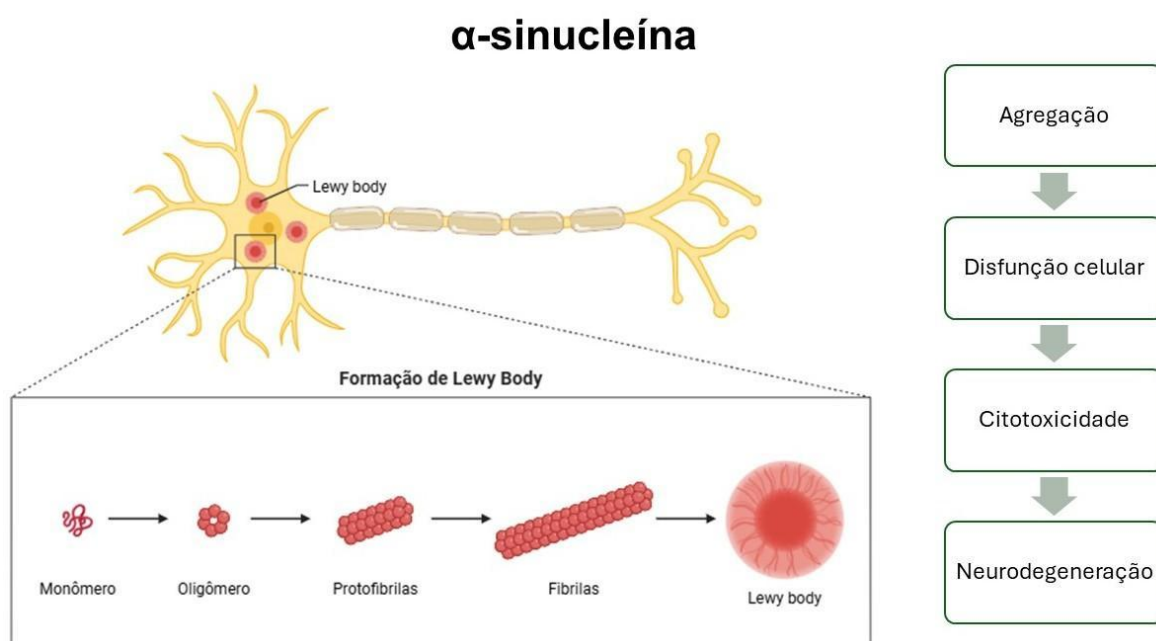


Figura 1. Formação de Lewy bodies (LBs) a partir da agregação da aSyn e suas consequências celulares. A agregação da aSyn inicia-se a partir da forma monomérica solúvel, evoluindo para a formação de oligômeros, protofibrilas e fibrilas, culminando na deposição de agregados insolúveis organizados em LBs, característicos da doença de Parkinson e de outras sinucleinopatias. Os diferentes estados agregados da aSyn estão associados a múltiplas disfunções celulares, incluindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, comprometimento do sistema ubiquitina–proteassoma e da autofagia, alterações no tráfego vesicular e sináptico, desregulação da homeostase do cálcio e ativação de vias de morte celular. Fonte: Adaptado de BioRender.

A aSyn é uma proteína neuronal abundantemente expressa nas terminações pré-sinápticas, que participa de processos fundamentais como a regulação da

liberação de neurotransmissores, o tráfego e a fusão de vesículas sinápticas, além de contribuir para a estabilidade da estrutura citoesquelética e a homeostase proteica (Hijaz; Volpicelli-Daley, 2020; Lautenschläger et al., 2017). Em condições fisiológicas, a aSyn apresenta uma conformação intrinsecamente desordenada, não possuindo estrutura secundária ou terciária estável, mas pode assumir estruturas α -hélice quando associada a membranas lipídicas. No entanto, sob condições patológicas essa proteína apresenta enovelamento incorreto (misfolding) e agrega-se em fibrilas amiloides altamente ordenadas; que constituem o principal componente dos LBs (Schmidt et al., 2025; LashueL et al., 2013). A hipótese, inicialmente relacionada à doença de Alzheimer, sugere que a agregação de proteínas nestas estruturas fibrilares ordenadas, originadas por interações proteicas aberrantes (interações não fisiológicas), está relacionada à disfunção neuronal e neurodegeneração (Tsoi et al., 2023; Rinauro et al., 2024; Hardy; Selkoe, 2002). Estes agregados levam a uma variedade de disfunções celulares e sinápticas, podendo levar à apoptose. O acúmulo progressivo da aSyn e a formação de oligômeros têm sido propostos como cruciais na patogênese da DP (Queiroz et al., 2022; Henderson et al., 2019).

Evidências recentes sugerem que formas anormais de aSyn interferem tanto na via autofagia-lisossomal quanto no sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), comprometendo a depuração de proteínas danificadas e organelas. A aSyn foi associada à diminuição da abundância e atividade do proteassoma, resultando em acúmulo de proteínas ubiquitinadas e interligando processos de agregação proteica, inflamação neuronal e falência bioenergética (Lázaro et al., 2014; Tang et al., 2021; Popova et al., 2021; Li; Li; Wu, 2022).

A aSyn é uma proteína de 140 aminoácidos (14 kDa, pKa 4,7), codificada pelo gene SNCA, localizado no braço longo do cromossomo 4 (região 4q22.1) (*NCBI gene ID: 6622*), expressa principalmente em neurônios sob condições fisiológicas (Twohig; Nielsen, 2019; Benskey et al., 2016; Shibasaki et al., 1995; Ingelsson, 2016). Possui três domínios estruturais distintos (Figura 2): i. um domínio N-terminal (resíduos 1-60) com sete repetições de 11 aminoácidos contendo o motivo consenso KTKEGV, responsável pela ancoragem a membranas lipídicas. Com exceção de quatro resíduos inseridos entre as repetições 4 e 5, as sequências seguem-se sem intervalo e mostram alta conservação nas três isoformas de

sinucleína (α -, β - e γ -); **ii.** um domínio central hidrofóbico (resíduos 61-95), antigamente conhecido como NAC (componente não amiloide, do inglês *non-amyloid component*), fundamental para a propensão à agregação amiloide; e **iii.** um domínio carboxi-terminal (resíduos 96-140), rico em resíduos ácidos, com estrutura desordenada em solução livre, que modula a solubilidade da proteína e a degradação da proteína (Bernal-Conde et al., 2020; Emamzadeh, 2016; Twohig; Nielsen, 2019).

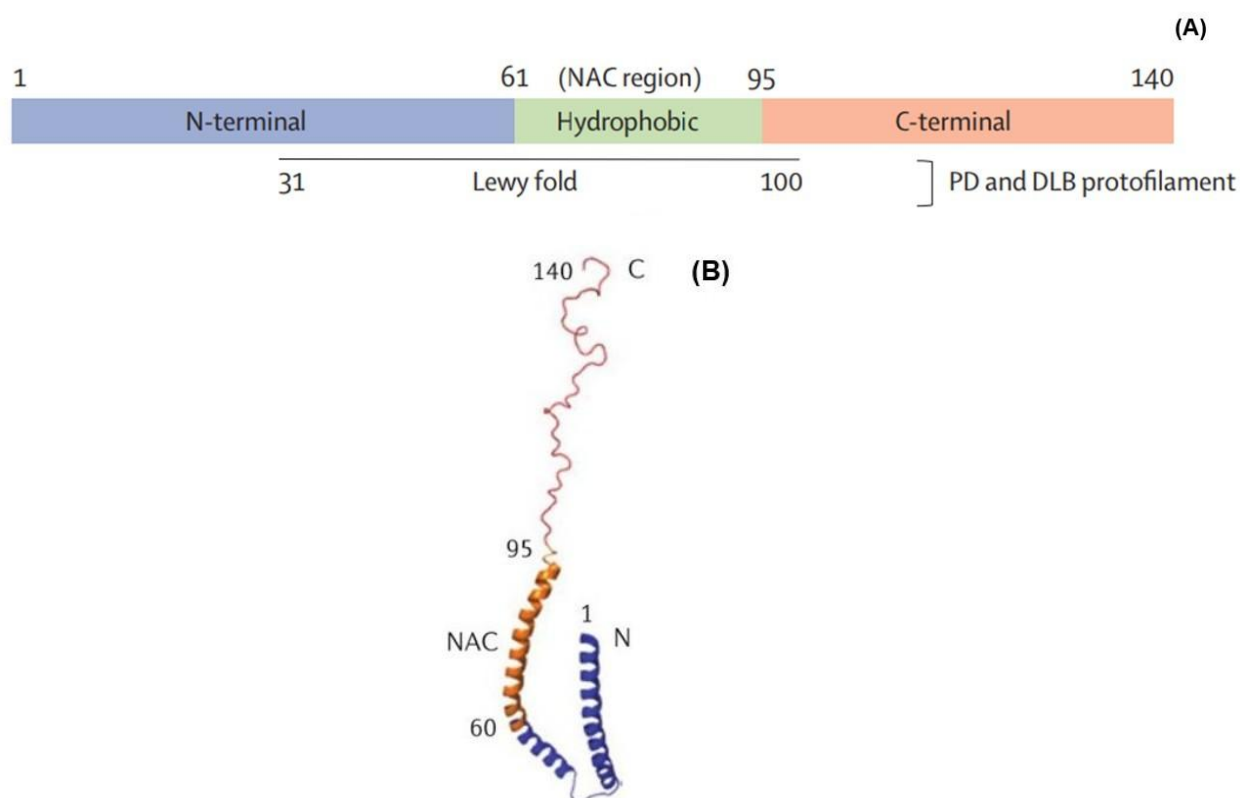


Figura 2. Estrutura primária e conformação tridimensional da aSyn. **(A)** Organização dos domínios estruturais da aSyn, destacando a região N-terminal anfipática, associada   ligação a membranas, o domínio hidrofóbico central (antiga região NAC), crítico para a agregação proteica, e a região C-terminal ácida, envolvida em interações proteína-proteína e na modulação da agregação. **(B)** Representação da estrutura tridimensional da proteína aSyn, evidenciando sua natureza intrinsecamente desordenada em condições fisiológicas. Fontes: (A) Goedert et al. (2024) e (B) Parihar et al. (2018).

No contexto genético, algumas variantes, como a substituição da Alanina-53-Treonina (A53T) no gene SNCA que codifica a proteína aSyn, alteram a propensão da aSyn a formar agregados ou comprometem sua função na manutenção da homeostase celular. Assim como esta substituição, outras mutações como a A30P

e E46K foram identificadas em famílias com formas hereditárias da DP; e demonstram, em modelos bioquímicos e celulares, maior tendência à oligomerização e toxicidade neuronal (Yaribash et al., 2025; Srinivasan et al., 2021; Boyer et al., 2020). Contudo, a maior parte dos casos de DP é idiopática, ou seja, de causa desconhecida, com estimativas recentes apontando apenas cerca de 10-15% dos pacientes com pelo menos um parente afetado; enquanto a maioria não tem história familiar identificável, o que reforça o papel importante de fatores ambientais na etiologia da doença (Li et al., 2025; Arienti et al., 2024). Muitos estudos têm investigado o papel de fatores ambientais na DP, como por exemplo a exposição a pesticidas e alterações do microbioma, que vem sendo apontadas como potenciais contribuintes para o início e/ou progressão da DP, possivelmente facilitando disfunções autonômicas e processos inflamatórios que favorecem a agregação da aSyn (Park et al., 2025; Amaral et al., 2024; Kulcsarova et al., 2023).

As mutações pontuais associadas a formas hereditárias da DP, como A53T, E46K e A30P, localizam-se no domínio N-terminal, alterando a interação da proteína com membranas e favorecendo conformações propensas à agregação (Yaribash et al., 2025; Bayati; McPherson 2024; Bernal-Conde et al., 2020). O domínio hidrofóbico é especialmente importante no processo de fibrilação, pois sua composição hidrofóbica facilita a formação de conformações insolúveis ricas em folhas β e estruturas oligoméricas intermediárias; e mutações ou modificações capazes de alterar esse domínio impactam diretamente no comportamento agregativo da aSyn (Bayati; McPherson, 2024; Bisi et al., 2021; Bernal-Conde et al., 2020; Twohig; Nielsen, 2019).

1.1.2. A doença de Alzheimer e o peptídeo β -amiloide (A β)

O Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível, caracterizada por declínio cognitivo, afetando principalmente a memória e a realização de atividades cotidianas, mas também a linguagem e o raciocínio. Além disso, sintomas neuropsiquiátricos como agitação, irritabilidade, apatia, delírios e alterações comportamentais também são características identificadas em pacientes com DA (Agência Brasil; Ministério Da Saúde, 2023).

A evolução da doença é compreendida em quatro estágios clínicos de progressão (Breijyeh; Karaman, 2020, Associação Brasileira De Alzheimer, 2011):

- I. **pré-clínico** – nesta fase não há sintomas clínicos evidentes; apesar de poder apresentar perda leve de memória, o paciente mantém a funcionalidade cognitiva sem prejuízo para as atividades diárias;
- II. **estágio leve** - os sintomas do Alzheimer começam a ser mais evidentes; o paciente começa a apresentar lapsos de memória, perda de concentração, dificuldade de lembrar de nomes e compromissos, desorientação, mudança de humor e depressão, mas ainda consegue realizar atividades cotidianas de forma independente;
- III. **estágio moderado** - a doença se espalha para as áreas do córtex cerebral agravando os sintomas, como perda de memória mais pronunciada, dificuldade de comunicação, desorientação espacial e temporal e dificuldade para executar atividades básicas, podendo precisar de assistência para tarefas cotidianas;
- IV. **estágio grave** - o gravíssimo acúmulo de placas senis e emaranhados neurofibrilares comprometem significativamente a memória e as habilidades cognitivas e funcionais, os pacientes não reconhecem familiares, apresentam incontinência urinária e fecal, dificuldade para engolir e têm dificuldades para realizar atividades vitais e fisiológicas básicas, dependendo completamente de assistência.

A DA pode manifestar-se de forma precoce, antes dos 65 anos, sendo denominada Doença de Alzheimer de Início Precoce (DAIP) e estando associada a um forte componente genético; ou de forma mais tardia, após os 65 anos, conhecida como Doença de Alzheimer de Início Tardio (DAIT), que representa o diagnóstico mais comumente encontrado (Lanoiselée et al., 2017; De Falco et al., 2016). Estudos mostraram que a DAIP representa cerca de 5 a 10% dos casos e está frequentemente associada a mutações genéticas específicas em genes como *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, com herança autossômica dominante (Lanoiselée et al., 2017); enquanto a DAIT representa 90% dos casos. Um estudo recente indicou que, além da idade avançada e histórico familiar, a presença de duas cópias do

alelo APOE ϵ 4 (um de cada progenitor) pode representar uma forma genética distinta da doença, com início dos sintomas cerca de 7 a 10 anos mais cedo quando comparada à doença sem essa variante (Shvetcov et al., 2025).

Neuropatologicamente a DA é caracterizada por atrofia cortical difusa, presença de placas senis compostas por depósitos de peptídeo β -amiloide, grande número de novos neurofibrilares compostos por proteína tau hiperfosforilada, degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal (Figura 3). Essas alterações são observadas em diversas regiões do cérebro, incluindo o hipocampo e o córtex entorrinal, e estão associadas ao declínio das funções cognitivas e comportamentais dos indivíduos afetados (Trejo-Lopez et al., 2022; Smith, 1999).

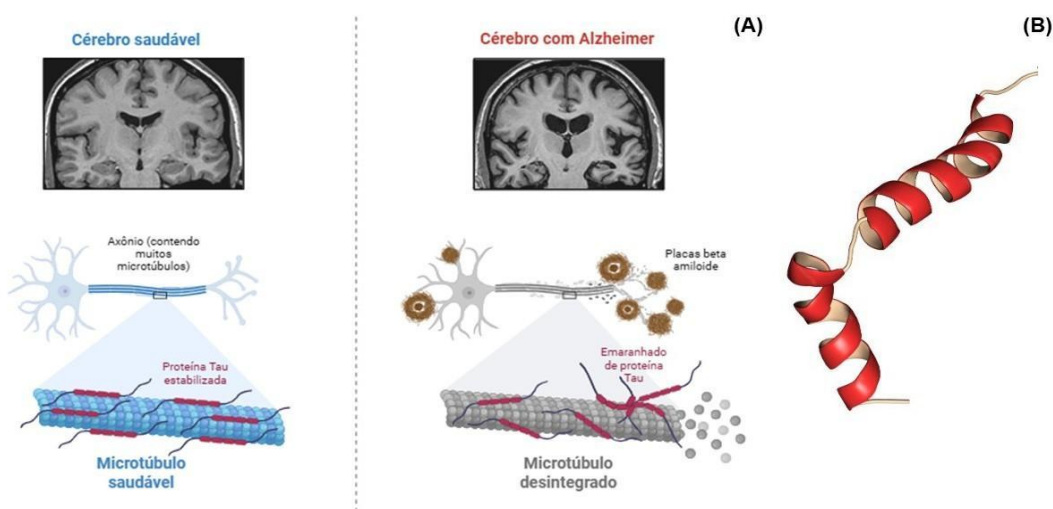


Figura 3. Aspectos centrais da fisiopatologia da doença de Alzheimer associados à agregação do peptídeo β -amiloide. (A) Representação comparativa entre um cérebro saudável e um cérebro acometido pela doença de Alzheimer, evidenciando a formação de placas extracelulares de β -amiloide e o acúmulo de emaranhados neurofibrilares constituídos pela proteína tau hiperfosforilada, alterações associadas à disfunção sináptica e à neurodegeneração progressiva. Fonte: Adaptado de BioRender. (B) Representação da estrutura molecular tridimensional do peptídeo β -amiloide, destacando sua conformação propensa à autoassociação e à formação de agregados amiloides. Fonte: Desenhado por Freepik.

Na DA o peptídeo β -amiloide acumula-se nos ambientes intra e, principalmente, extracelular. Peptídeos amiloides de 40 (A β 1-40) ou 42 (A β 1-42) aminoácidos de comprimento podem ser gerados em decorrência da clivagem diferencial, por γ - e β -secretases, da Proteína Precursora Amiloide (APP); uma glicoproteína transmembranar, composta por um domínio extracelular, um único domínio transmembrana e um domínio citoplasmático curto (Figura 4). A clivagem pela β -secretase define o N-terminal e a clivagem pela γ -secretase define o C-

terminal do peptídeo (Rukmangadachar et al., 2023). O peso molecular aproximado para A β 1-40 é de aproximadamente 4,3 kDa, já A β 1-42 tem dois resíduos extras hidrofóbicos no C-terminal, que aumentam a propensão à agregação e por isso é mais associado à patogênese da DA. Também há isoformas menores e fragmentos modificados com diferentes pontos de clivagem, gerando versões bastante heterogêneas do A β (Rukmangadachar et al., 2023; Koudinov et al., 1996; Kummer; Heneka, 2014; Vigo-Pelfrey et al., 1993). Em solução, sua conformação tende a ser desordenada, com pouca estrutura secundária; associadas a membranas ou agregados pode assumir conformações em folhas β ou misturas com giros e dobras, oligômeros ou fibrilas (Ma et al., 2022; Bamford et al., 2020).

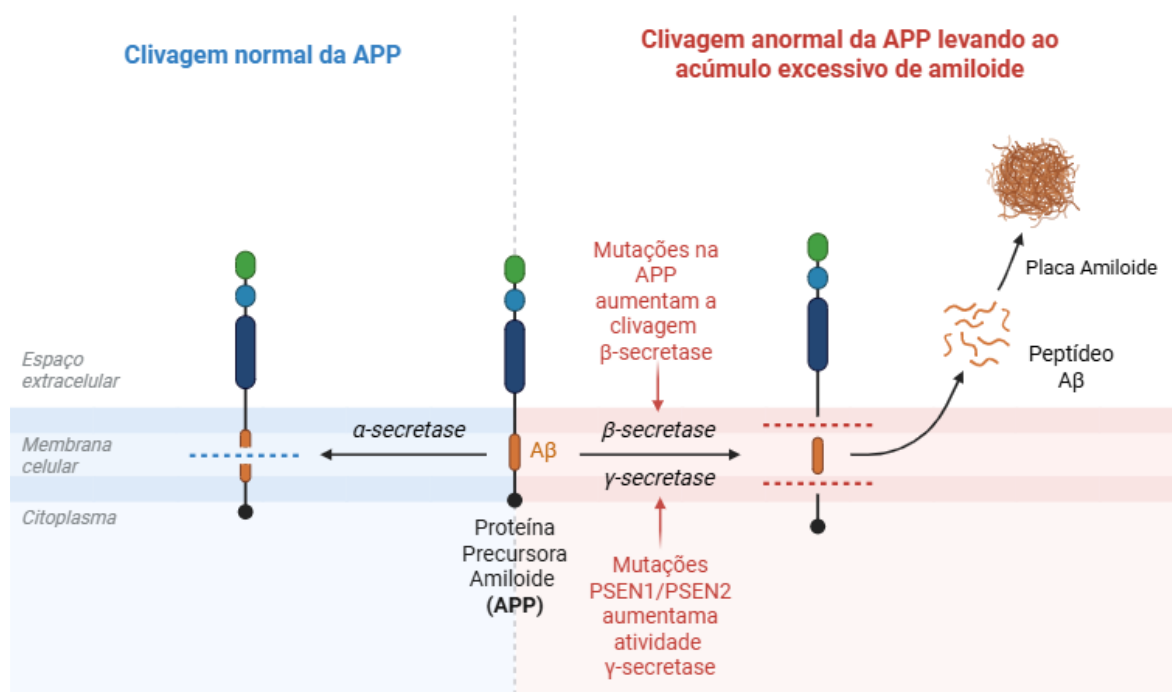


Figura 4. Formação de placas β -amiloide a partir da clivagem diferencial da proteína precursora amiloide (APP). O esquema apresenta as vias de processamento fisiológico e amiloidogênico da APP, eventos centrais na fisiopatologia da doença de Alzheimer. Na via não amiloidogênica (em azul), a clivagem inicial por α -secretase impede a geração de peptídeos β -amiloide. Em contraste, na via amiloidogênica (vermelho), a clivagem sequencial da APP por β - e γ -secretases resulta na liberação dos peptídeos β -amiloide, especialmente A β 1-40 e A β 1-42, os quais apresentam elevada propensão à autoassociação, formando oligômeros, fibrilas e, subsequentemente, placas amiloides extracelulares associadas à disfunção sináptica e à neurodegeneração progressiva observadas na doença de Alzheimer. Fonte: Adaptado de BioRender.

O mecanismo de ação do peptídeo A β ainda não está completamente elucidado, mas estudos sugerem que ele possa atuar na sinalização intercelular, regulação da homeostase neuronal e resposta imune. A remoção ou depuração do

A β envolve diversos mecanismos, e o desequilíbrio entre a produção, agregação e depuração de A β é importante na patogênese da DA (Ma et al., 2022; Kummer; Heneka, 2014). Em seu estado solúvel, A β normalmente não apresenta toxicidade; no entanto, seus oligômeros são considerados especialmente neurotóxicos, desencadeando disfunção sináptica, estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e alteração na permeabilidade da membrana (Rukmangadachar et al., 2023; Ma et al., 2022).

O acúmulo e a agregação dos peptídeos β -amiloides na forma de placas senis têm sido considerados como fatores principais para o desenvolvimento da doença (Bruni et al., 2020; França et al., 2017). Recentemente, estudos demonstraram que o estresse oxidativo é um evento central no processo de deposição de fibrilas, seguido de degeneração e morte celular; que pode ser induzido pela própria presença de A β , também relacionada à geração de ROS, e que, por sua vez, o aumento das ROS pode agravar a deposição de A β , caracterizando um ciclo vicioso de neurodegeneração (Tamagno et al., 2021; Reddy et al., 2009). Além disso, a função mitocondrial comprometida tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo na DA. Alterações na dinâmica mitocondrial, como fissão e fusão desreguladas, bem como falhas na mitofagia, contribuem para o acúmulo de ROS e danos celulares. Estudos sugerem que a restauração da função mitocondrial por meio de intervenções terapêuticas, como exercício físico e dieta antioxidante, pode retardar o início e a progressão da DA (Misrani et al., 2021). Portanto, o estresse oxidativo desempenha um papel crucial na patogênese da DA, interagindo com a deposição de A β e comprometendo a função mitocondrial. Estratégias terapêuticas que visam reduzir esses danos estão sendo investigadas como potenciais abordagens para o tratamento da doença.

1.1.3. Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial

O termo estresse oxidativo designa um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas oxidantes e a capacidade dos sistemas antioxidantes celulares, o que pode acarretar danos às biomoléculas (lipídios, proteínas, DNA) e comprometer a homeostase celular (Krishnamurthy et al., 2024; Murphy et al., 2022). As espécies reativas oxidantes incluem tanto as espécies reativas de oxigênio

(ROS) quanto as espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *Reactive Nitrogen Species*) (Hong et al., 2024; Forman; Zhang, 2021). As ROS podem ser radiculares (como ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, hidroxila $OH^{\cdot}$, peroxila $ROO^{\cdot}$ e alcoxila $RO^{\cdot}$) ou não radiculares (como peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , e oxigênio singlete 1O_2) (KRISHNAMURTY et al., 2024); já as RNS incluem espécies como óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), peroxinitrito ($ONOO^-$), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) (Hong et al., 2024).

As ROS são geradas continuamente em organismos aeróbicos e anaeróbicos como subprodutos do metabolismo fisiológico, principalmente na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e na atividade de enzimas oxidases (Figura 5); exercendo papel essencial na sinalização celular, participando da regulação da proliferação, diferenciação e apoptose, bem como resposta imune e inflamatória perante patógenos (Valko et al., 2007; Imlay et al., 2013; Demidchik, 2014). Além disso, atuam na ativação de vias de sinalização redox, responsáveis pela resposta adaptativa ao estresse e pela modulação da expressão gênica antioxidante (Sies; Jones, 2020; D'autréaux; Toledano, 2007). Dessa forma, as ROS não devem ser vistas apenas como agentes tóxicos, mas também como mediadores de processos fisiológicos vitais, cujo desequilíbrio leva ao estresse oxidativo e à disfunção celular associada a doenças neurodegenerativas.

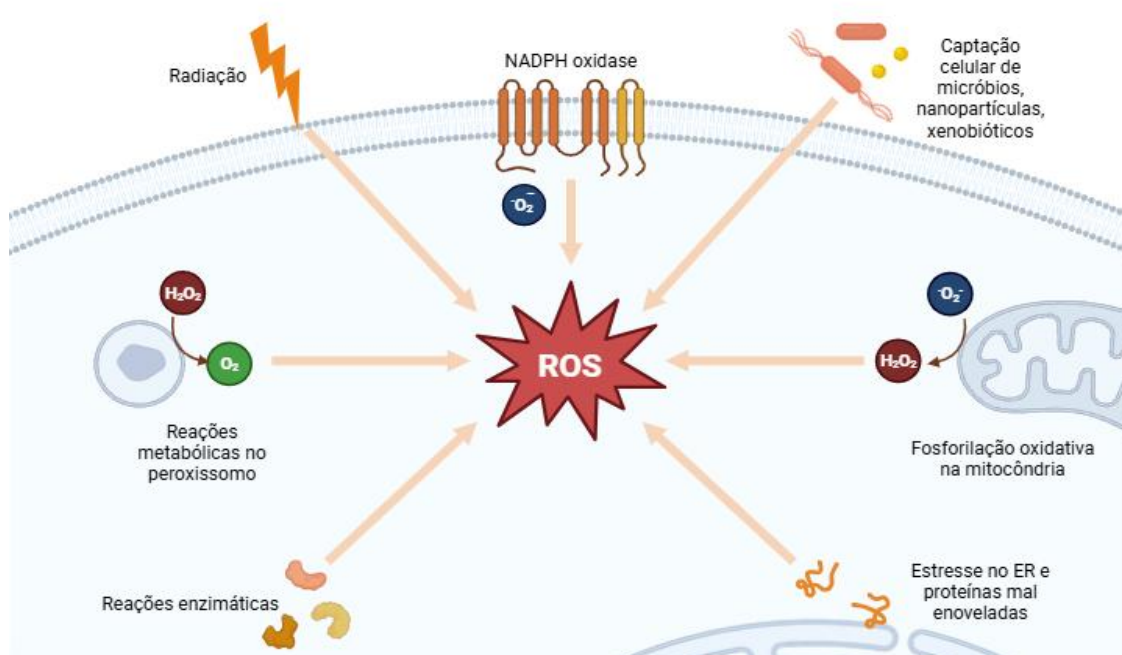


Figura 5. Fontes de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no ambiente celular. As ROS são moléculas altamente reativas derivadas do oxigênio, incluindo superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), que podem ser produzidas por diferentes organelas

e vias metabólicas. Na mitocôndria, o superóxido é gerado principalmente nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, como resultado do vazamento de elétrons durante o transporte para o oxigênio molecular; o $O_2^{\cdot-}$ é convertido em H_2O_2 por superóxido dismutases (SOD1 e SOD2), e H_2O_2 pode formar $OH^{\cdot}$ via reações de Fenton. Nos peroxissomos, o H_2O_2 é produzido durante a oxidação de ácidos graxos e metabolização de peróxidos, sendo degradado por catalase. No retículo endoplasmático, o estresse oxidativo associado ao enovelamento proteico gera H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. No citoplasma, enzimas como NADPH oxidases (NOX) e xantina oxidase contribuem para a formação de $O_2^{\cdot-}$ durante reações metabólicas. O equilíbrio entre a geração de ROS e a ação de sistemas antioxidantes intracelulares é essencial para a homeostase redox e para evitar danos a lipídios, proteínas e DNA. Fonte: Adaptado de BioRender.

Embora outras enzimas, como NADPH oxidase e xantina oxidase, também possam gerar espécies reativas, a fonte primária de ROS em células é a cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial (Figura 6), onde um “escape” de elétrons nos complexos I e III gera superóxido que pode ser convertido em H_2O_2 por meio da enzima superóxido dismutase (SOD) (Liu; Han et al., 2023; Krishnamurty et al., 2024; Hong et al., 2024). A SOD possui duas isoformas, uma enzima tetramérica localizada na matriz mitocondrial, a superóxido dismutase de manganês (Mn-SOD ou SOD2) e uma enzima dimérica localizada no espaço intermembrana mitocondrial, no citosol e no núcleo, a superóxido dismutase de cobre/zinco (Cu, Zn-SOD ou SOD1) (Miao; Clair, 2009). A SOD1 desempenha funções específicas em diferentes compartimentos celulares, sendo modulada por diversas modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, acetilação e palmitoilação (Eleutherio et al., 2021). Além de eliminar o superóxido do espaço intermembrana mitocondrial, a SOD1 também regula sua produção por meio da modulação da atividade do Complexo I da cadeia respiratória (Banks et al., 2017), estando ainda envolvida na regulação aeróbica (Tsang et al., 2018), processo essencial para a manutenção da saúde e funcionalidade neuronal (Monteiro Neto et al., 2025).

A célula possui mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos (catalase e glutathione peroxidase) e não enzimáticos (como a glutathione e vitaminas), que em condições fisiológicas são capazes de neutralizar esses oxidantes. Quando em condições patológicas, esse sistema oxidante pode ser intensificado, levando a um aumento excessivo dos níveis de ROS e sobrecarregando o sistema de defesa, chamado de dano oxidativo acumulativo (Jomova et al., 2024; Krishnamurty et al., 2024). O dano oxidativo pode se manifestar através de peroxidação lipídica,

carbonilação proteica, modificações de resíduos de aminoácidos como cisteína e metionina, e lesões nos DNAs nuclear e mitocondrial (Shields et al., 2021).

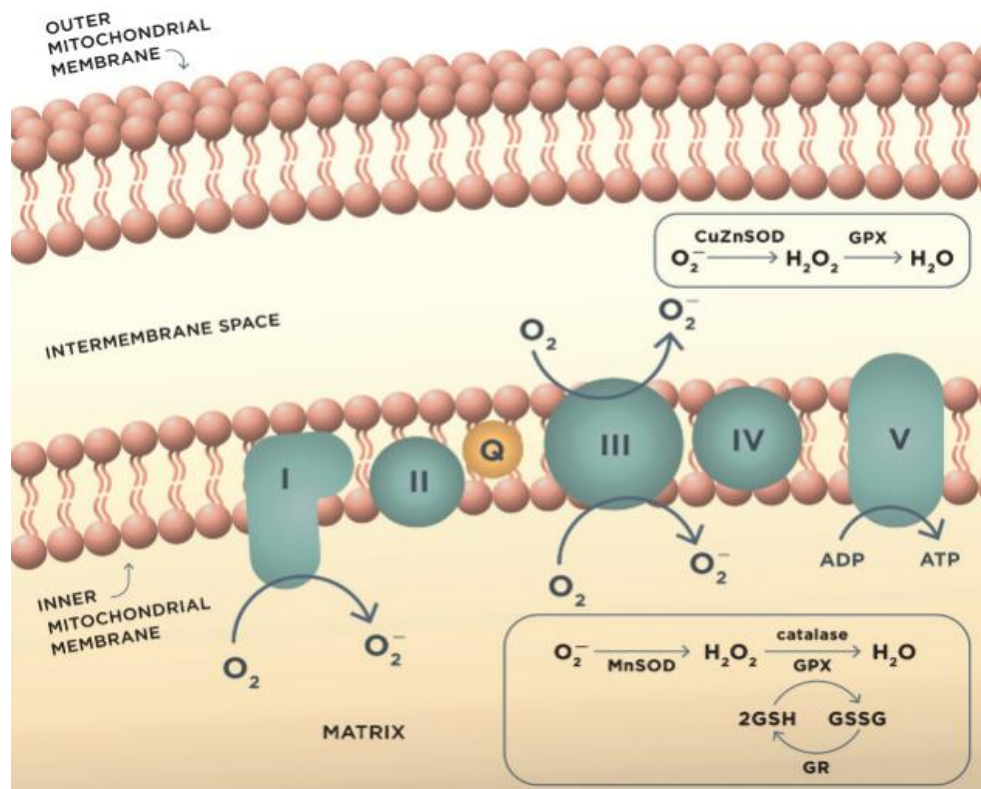


Figura 6. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Durante o transporte de elétrons na membrana interna mitocondrial, elétrons provenientes de NADH e $FADH_2$ fluem pelos complexos para reduzir oxigênio molecular a água. Pequenos vazamentos de elétrons nos complexos I e III podem levar à formação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O $O_2^{\cdot-}$ é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por ação das enzimas superóxido dismutases (SOD1 e SOD2), que pode ser posteriormente detoxificado por catalase ou glutathione peroxidase. Em presença de metais redox ativos, H_2O_2 pode gerar radicais hidroxila ($OH\cdot$) via reação de Fenton, aumentando o estresse oxidativo intracelular. A produção controlada de ROS nesse contexto tem papel fisiológico em sinalização celular, enquanto o excesso pode causar danos a proteínas, lipídios e DNA, contribuindo para processos de envelhecimento e neurodegeneração. Fonte: Tönnies; Trushina, 2017.

Este ciclo retroalimentado de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial é particularmente relevante em hipóteses de neurodegeneração. Em modelos de DA e DP disfunções no metabolismo mitocondrial são descritas como eventos iniciais da patogênese, com redução do potencial de membrana, liberação de citocromo c e ativação das vias de morte celular. Estudos recentes destacam que esse colapso energético amplia a vulnerabilidade neuronal perante a estressores adicionais (Murphy et al., 2022, Forman; Zhang, 2021).

A disfunção mitocondrial em neurônios caracteriza-se pela perda do potencial de membrana mitocondrial, redução na produção de ATP, aumento da produção de ROS e liberação de sinais pró-apoptóticos (citocromo c), eventos que aumentam a vulnerabilidade celular à agregação proteica e à neuroinflamação. Na DP, por exemplo, há evidências consistentes de déficit do complexo I da CTE e alterações morfológicas e funcionais mitocondriais que precedem a degeneração dopaminérgica. Além disso, mutações em genes ligados ao controle da qualidade mitocondrial, como *PINK1*, *Parkin* e *DJ-1*, reforçam o papel causal da mitocôndria na patogênese (Henrich et al., 2023; Li et al., 2021). Na DA, dados sugerem a “hipótese da cascata mitocondrial”, onde a disfunção mitocondrial contribui para o acúmulo de A β e para a perda sináptica (Bhatia et al., 2022).

Sistemas de remoção seletiva de mitocôndrias defeituosas (mitofagia) e dinâmicas de fissão/fusão controlam a qualidade mitocondrial celular. O desequilíbrio dessas vias, como por exemplo excesso de fissão mediado por *DRP1* ou deficiência mitofágica mediada por *PINK1/Parkin*, promove acúmulo de mitocôndrias disfuncionais geradoras de ROS. A perda da homeostase mitocondrial também alimenta respostas inflamatórias através da liberação de DNA mitocondrial e ROS, acentuando a neuroinflamação observada na DA e na DP (Misrani et al., 2021; Ray et al., 2021).

A disfunção mitocondrial está intimamente associada à ativação de vias apoptóticas intrínsecas, constituindo um elo central entre o estresse oxidativo e a morte neuronal em doenças neurodegenerativas. Sob condições de estresse redox, o acúmulo de ROS promove a oxidação de componentes lipídicos e proteicos da membrana mitocondrial, resultando na sua permeabilização (Choi et al., 2024). Essa perda de integridade facilita a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e a consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c, para o citosol. Uma vez no citoplasma, o citocromo c associa-se à proteína adaptadora Apaf-1 e à procaspase-9, formando o apoptossomo, que ativa caspases executoras (principalmente caspases 3 e 7), culminando na fragmentação do DNA e na morte celular programada. Esse mecanismo é amplamente descrito em neurônios dopaminérgicos e corticais sob condições de estresse oxidativo, reforçando a mitocôndria como um ponto de convergência entre o metabolismo energético e a sinalização apoptótica em

doenças como Parkinson e Alzheimer (Choi et al., 2024; Wang; Youle, 2009; Kroemer et al., 2007).

Dessa forma, do ponto de vista terapêutico mitocôndrias tornam-se alvos interessantes. Diversos estudos têm procurado estratégias que reduzam a geração de ROS, seja através de inibidores específicos ou ‘scavengers’ (neutralizadores de radicais livres) dirigidos à mitocôndria, ou que aumentem a biogênese mitocondrial (como o coativador transcricional *PGC-1 α*) ou que restaurem a qualidade mitocondrial, como por exemplo, através da ativação de mitofagia (Choi et al., 2024; Mi et al., 2021). A falha nos mecanismos antioxidantes e energéticos amplifica a agregação proteica e o colapso da homeostase celular.

1.2. O sistema endocanabinoide e sua relação com a neuroproteção

O sistema endocanabinoide (SEC) é uma rede de sinalização lipídica responsável por regular diversas funções patológicas e fisiológicas no sistema nervoso central e periférico (Di Marzo, 2006), envolvendo principalmente canabinoides endógenos como a anandamida (AEA) e o 2-araquínodoil-glicerol (2-AG), os receptores canabinoides CB₁ (CB₁R) e CB₂ (CB₂R) e enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos componentes envolvidos nas reações bioquímicas, como por exemplo araquínodoil-fosfatidiletanolamina-fosfolipase D (NAPE-PLD), diacil-glicerol lipase (DAGL), amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL) (Legare et al., 2022; Behl et al., 2022; Sugiura et al., 1995). Estudos têm demonstrado que o sistema endocanabinoide está envolvido com processos do desenvolvimento, neuroplasticidade, transdução de sinais, regulação metabólica, controle de apetite, resposta ao estresse, regulação do humor e de respostas emocionais e envolvimento no desenvolvimento neuronal (Kumar, 2024; Dallabrida et al., 2024; Thapa; Singh, 2023; Reddy et al., 2020). Além disso, o SEC possui papel modulatório nos sistemas de neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica (Peters et al., 2021).

Os receptores canabinoides CB₁ e CB₂ pertencem à super-família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs, do inglês *G Protein-Coupled Receptors*), e compartilham 44% de homologia na sequência de aminoácidos (Lu;

Mackie, 2021; Howlett; Abood, 2017). O CB₁R é amplamente expresso no sistema nervoso central, com localização predominante em neurônios pré-sinápticos nos gânglios basais, cerebelo, córtex e hipocampo, modulando a liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios (Martinez Ramirez, 2023; Howlett; Abood, 2017; Reggio, 2010; Svíženská et al., 2008) e desempenha papel central em modulação sináptica, estimula a via de recompensa dopaminérgica, atua nos metabolismos de glicose e lipídios, regulação de apetite, atividade motora, cognição, emoções e humor, memória e aprendizado (Fernández-Moncada et al., 2024; Behl et al., 2022; Onaivi et al., 2006; Mackie, 2005; Breivogel; Childers, 1998; Katzman et al., 2016; Maldonado et al., 2006; Gelfand; Cannon, 2006; Cota et al., 2003; Pagotto; Pasquali, 2005).

O CB₂R, por sua vez, é mais comumente encontrado no sistema imunológico (células imunes e queratinócitos), predominantemente nas células gliais e nos neurônios pós-sinápticos (Reggio, 2010; Svíženská et al., 2008; Gong et al., 2006); e atua nas respostas anti-inflamatórias e autoimunes, regula a adesão e o rolamento dos leucócitos no endotélio e a diferenciação das células T (Ramirez et al., 2012; Rom et al., 2013; Zhao et al., 2010; Braun, 2018; Gentili et al., 2019; Kong et al., 2014; Lowe et al., 2021). No contexto de doenças neurodegenerativas, CB₂R é considerado um alvo promissor na DA, pois estudos mostraram que a glia associada a placas amiloides apresenta superexpressão de CB₂R, e a ativação desse receptor na micróglia reduz a neuroinflamação e modula a depuração de agregados proteicos (Sobue et al., 2024; Ruiz De Martín Esteban et al., 2022).

Ambos os receptores canabinoides são ativados, principalmente, pelos canabinoides endógenos. Os endocanabinoides anandamida (AEA) e 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) são lipídios produzidos, sob demanda, a partir do ácido araquidônico para controle das necessidades fisiológicas do corpo, e são degradados em condição de homeostase fisiológica; desta forma, não há estoque destes canabinoides endógenos no organismo (Fonseca et al., 2025; Thapa; Singh, 2023; Behl et al., 2022; Di Marzo; De Petrocellis, 2012). A síntese da AEA (Figura 7) origina-se na hidrólise da molécula de N-araquidonoil-fosfatidil etanol (NAPE) pela enzima NAPE-PLD, e sua degradação é realizada principalmente pela FAAH, que é responsável pela degradação de ácidos graxos de amida. No entanto, sua degradação também pode ser realizada pela enzima ciclooxigenase-2 (COX-2)

para gerar prostamidas (Fonseca et al., 2025; Lu; Mackie, 2021; Woodward et al., 2008; Hermanson et al., 2013; Hermanson et al., 2014). Em geral, AEA possui afinidade moderada com ambos os receptores CB₁ e CB₂ e é ativada em resposta a estímulos de estresse (Mackie, 2005; Luk et al., 2004; Gonsiorek et al., 2000; Breivogel; Childers, 2000).

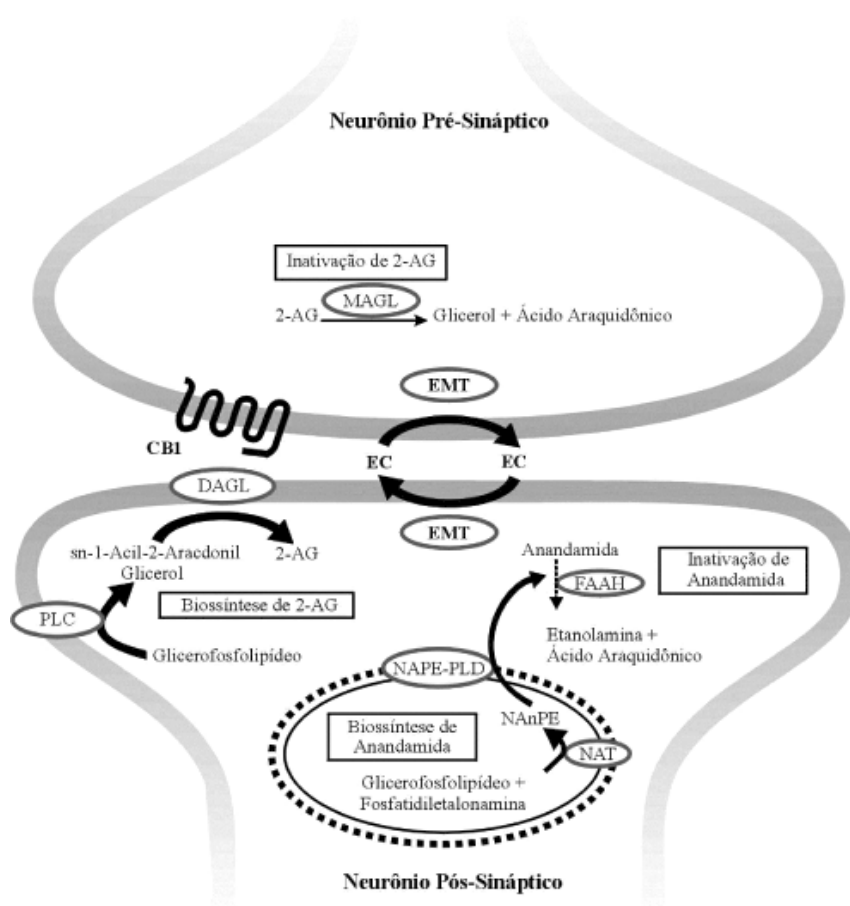


Figura 7. Síntese, degradação e sinalização dos endocanabinoides em neurônios pós-sinápticos. Os endocanabinoides anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) são lipídios sinalizadores sintetizados sob demanda nos neurônios pós-sinápticos a partir de precursores de membrana: a anandamida a partir de N-oleoiletanolamina (NAPE) via NAPE-fosfolipase D (NAPE-PLD), e o 2-AG a partir de diacylglicerol (DAG) via diacylglicerol lipase (DAGL). Após a liberação, esses endocanabinoides atuam de forma retrógrada, ligando-se aos receptores CB₁ e CB₂ na membrana pré-sináptica, modulando a liberação de neurotransmissores. A degradação ocorre através de enzimas específicas: hidrolase amida de ácidos graxos (FAAH) para anandamida e monoacylglicerol lipase (MAGL) para 2-AG. Esta via permite a regulação fina da neurotransmissão e da homeostase sináptica. Fonte: Godoy-Matos, 2006; Di Marzo, 2006.

O 2-AG, por sua vez, é um intermediário gerado em muitas vias do metabolismo lipídico, e por este motivo é mais abundante que a AEA. Sua síntese, geralmente, é resultado de uma sequência de hidrólises do araquidonoil contendo

fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) pela fosfolipase-C β (PLC- β) para formar diacilglicerol, que é então hidrolisado pela diacilglicerol lipase (DAGL) para formar 2-AG (Briand-Mésange et al., 2024; Shonesy et al., 2015; Jung et al., 2007; Murataeva et al., 2014). Sua degradação pode ser realizada, primariamente, por três enzimas hidrolíticas, a monoacilglicerol lipase (MAGL) e as hidrolases α/β domínios 6 e 12 (ABHD6 e 12); porém, as enzimas FAAH e COX-2 também podem atuar neste processo de metabolização para a produção de prostaglandinas (Tsuboi et al., 2018; Kim; Alger, 2004; Nomura et al., 2011; Reddy et al., 2020). O endocanabinoide 2-AG possui alta afinidade com os dois receptores canabinoides (Mackie, 2005; Gonsiorek et al., 2000; Breivogel; Childers, 2000; Neu et al., 2007; Hentges et al., 2005; Hashimotodani et al., 2005; Bender et al., 2006).

1.3. *Cannabis sativa*: contexto histórico

O uso milenar da planta *Cannabis sativa* como alternativa medicinal remonta aos primórdios da agricultura humana, tendo seu primeiro registro há cerca de 10.000 anos, estando presente em diversas culturas tradicionais (Hussain et al., 2021; Crocq, 2020; Charitos et al., 2021; Carlini, 2006). As primeiras evidências históricas de aplicação terapêutica e ritual da planta aparecem nas regiões da Ásia Central, Índia e China (Brusa et al., 2022; Jiang et al., 2006). Por volta de 2.700 a.C., no antigo livro “*Shen Nong Ben Cao Jing*”, atribuído ao imperador chinês Shen Nung, a *Cannabis* foi citada para o tratamento de reumatismos, constipação intestinal, malária, dores relacionadas ao sistema reprodutor feminino e como sedativo (Ziyan et al., 2023; Carlini, 2006).

Em 2019, uma análise arqueológica detectou vestígios de canabinoides psicoativos em artefatos funerários na China, datados de cerca de 2.500 anos atrás (Figura 8), sugerindo o uso da planta para fins medicinais, recreativos e ritualísticos (Ren et al., 2019). Na Índia, fontes tradicionais indicam que a planta e suas sementes eram consumidas em contexto religioso e que, já em cerca de 1.000 a.C., eram empregadas para prisão de ventre, cólicas menstruais, malária, reumatismo e dores de ouvido (Graeff, 1989; Chopra; Chopra, 1957); embora essas descrições careçam de evidências arqueológicas robustas. O cultivo e uso da *C. sativa* expandiram-se pela Ásia, chegando a regiões como Japão, Irã e Egito (Pisanti;

Bifulco, 2017). A difusão para o Ocidente ocorreu entre os séculos X e XII d.C., quando sementes de *C. sativa* foram encontradas nos restos de navios vikings datados de meados do século IX (Warf, 2014).



Figura 8. Artefatos funerários contendo vestígios de canabinoides psicoativos datados de aproximadamente 2.500 anos atrás. A imagem mostra queimadores de madeira e pedras carbonizadas recuperados de túmulos do cemitério de Jirzankal, no oeste da China. Resíduos orgânicos preservados nesses artefatos apresentaram a presença de canabinol (CBN), produto de degradação do tetrahydrocannabinol (THC), indicando o uso intencional de *Cannabis sativa* com propriedades psicoativas em contextos rituais funerários. Fonte: Ren et al., 2019.

No Brasil, um documento do Ministério das Relações Exteriores (Brasil) de 1959 afirma que a planta teria sido introduzida no país por volta de 1549 por meio de escravizados africanos, e que sementes de cânhamo eram transportadas em bonecas de pano amarradas às pontas das “tangas” (Martins et al., 2023). Em 1988, há relatos de que formulários médicos no Brasil teriam recomendado cigarros de *Cannabis indica* para bronquite crônica em crianças com asma, gripe e outros problemas respiratórios (Figura 9) (Carlini, 2006).

The image shows a historical advertisement from 1888. On the left is a pack of 'Cigarettes Indiennes' by Grimault & Co, Paris, which claims to be effective against asthma, bronchitis, and cough. To the right of the pack is a small box listing ailments: 'Asthma', 'Catarrhos', and 'Insomnia'. Below the pack is a large box titled 'CIGARROS INDIOS, Cannabis Indica' by Grimault & Co. It describes the benefits of the cigarettes for respiratory issues. To the right of this is a 'Formula para gripe' (Influenza formula) listing ingredients like 'Infusão flores peitoraes', 'Bensato de sodio', 'Alcoolato de canella', 'Tintura bryonia', 'Tintura cannabis indica', 'Mel de abelhas', and 'Narope de neonito'. It also includes instructions for use and a note about its effectiveness in Portugal.

CIGARROS INDIOS, Cannabis Indica
De GRIMAULT e C^{ia}

A dificuldade em respirar, a roncadura, os flatos, a aspiração sibilante acabam quasi logo, produz-se uma expectoração abundantissima quasi sempre em pouco tempo, torna-se mais facil, a respiração, mais branda a tosse e um dormir reparatorio afasta todos os symptomas assustadores que se tinham manifestado.

Formula para gripe

Infusão flores peitoraes	150,0
Bensato de sodio ...	4,0
Alcoolato de canella ...	5,0
Tintura bryonia ...	2,0
Tintura cannabis indica	15 gotas
Mel de abelhas ...	10,0
Narope de neonito ...	20,0

Uma colher de sopa de 3 em 3 horas.
Na convalescença: use 1 colher de **Vanaditol** após as refeições.
NOTA — A formula acima foi empregada em Portugal, na recente epidemia de gripe, dando optimos resultados.

um famoso formulário médico no Brasil, em 1888:

"Contra a bronchite chronica das crianças (...) fumam-se (cigarilhas Grimault) na asthma, na tísica laryngea, e em todas (...)"

Figura 9. Propaganda histórica dos cigarros Grimault promovendo o uso terapêutico da cannabis no tratamento de doenças respiratórias. A imagem apresenta um anúncio publicitário do final do século XIX/início do século XX que recomenda o uso dos cigarros Grimault para o alívio de crises de bronquite e asma, inclusive em crianças, refletindo a ampla aceitação médica e farmacêutica do uso terapêutico da *Cannabis sativa* antes de sua posterior criminalização, evidenciando a incorporação de preparados à base de cannabis na prática clínica da época. Fonte: Carlini, 2006.

Paralelamente ao uso medicinal, iniciou-se no Brasil uma campanha de estigmatização da planta. Em meados do século XIX e início do século XX, jornais no Rio de Janeiro associavam o uso da planta à “degeneração moral” e à “loucura” (Figura 10), especialmente vinculando-a às populações africanas e suas culturas tradicionais (Carlini, 2006). Em nível federal, o Decreto-Lei nº 891, de 25 de novembro de 1938, aprovou a Lei de Fiscalização de Entorpecentes, proibindo o plantio, a cultura, a colheita e a exploração, por particulares, da planta *Cannabis sativa* (e suas variedades) em todo o território nacional (Carvalho, 2017; Carlini, 2006). Posteriormente, a Lei nº 6.368, de 21 de outubro de 1976, estabeleceu sanções penais para quem mantivesse qualquer quantidade de maconha, mesmo que para uso pessoal.



Figura 10. Representações midiáticas da *Cannabis sativa* associadas à degeneração moral e à racialização no Brasil em meados do século XX. A imagem reúne a capa do jornal *O Globo* de 1956, publicada no Rio de Janeiro, e recortes de periódicos da época que associam o uso da *Cannabis sativa* à criminalidade, à degeneração moral e a estigmas de origem africana. Essas representações contribuíram para a construção de narrativas morais e raciais que influenciaram políticas proibicionistas e a marginalização social do uso da cannabis no Brasil. Fonte: Elias et al., 2020; Korytowski, 2016.

Nos Estados Unidos, em 1937 foi aprovada a “*Marihuana Tax Act*”, e em 1942 a *C. sativa* foi removida da “*United States Pharmacopeia*”, encerrando seu reconhecimento formal como medicamento (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017; U.S. FDA, 2019; Carlini, 2006).

A “corrida científica” em torno da *Cannabis sativa* começou entre 1838 e 1840, quando Sir William Brooke O’Shaughnessy avaliou de maneira sistemática as propriedades medicinais da planta (Crocq, 2020). O processo ganhou maior

impulso em 1899, quando Thomas Wood e colaboradores isolaram o canabinol (CBN) a partir de resinas da planta (Maioli et al., 2022). Em 1932, Robert Sidney Cahn elucidou parte da estrutura do CBN, que foi posteriormente caracterizada e sintetizada na década de 1940 por Roger Adams e Alexander Todd (Appendino, 2020). Em 1964, Raphael Mechoulam e Yehiel Gaoni elucidaram a estrutura do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), o que desencadeou uma intensa investigação da farmacologia dos canabinoides entre as décadas de 1970 e 1990 (Crocq, 2020). Em 1988, o grupo de Allyn Howlett identificou sítios ligantes específicos para o THC no cérebro (Maccarrone et al., 2022); e em 1990, o grupo de Lisa Matsuda clonou o receptor CB₁ (Matsuda et al., 1990). Em 1992, o laboratório de Mechoulam em colaboração com outros cientistas identificou o primeiro endocanabinoide, a anandamida (Maccarrone et al., 2022; Devane et al., 1992). Finalmente, em 1993, o receptor CB₂ foi clonado por Alistair Munro e colaboradores (Munro et al., 1993).

As descobertas iniciais sobre o sistema endocanabinoide desencadearam uma série de avanços subsequentes, ocorridos principalmente na década seguinte: foram identificados antagonistas dos receptores canabinoides, caracterizadas as enzimas envolvidas na síntese e degradação dos endocanabinoides, e isolado o segundo endocanabinoide, o 2-araquinodoilglicerol (2-AG) (Di Marzo; De Petrocellis, 2012; Gonsiorek et al., 2000).

Desde então, o interesse por estudos envolvendo a planta *Cannabis sativa* cresceu consideravelmente. Uma busca realizada para este trabalho na base de dados PubMed, com as palavras-chave “*Cannabis sativa*” e “*Tetrahydrocannabinol*”, revelou um aumento expressivo no número de publicações a partir do final da década de 1960, refletindo a intensificação da investigação sobre os canabinoides (Figura 11).

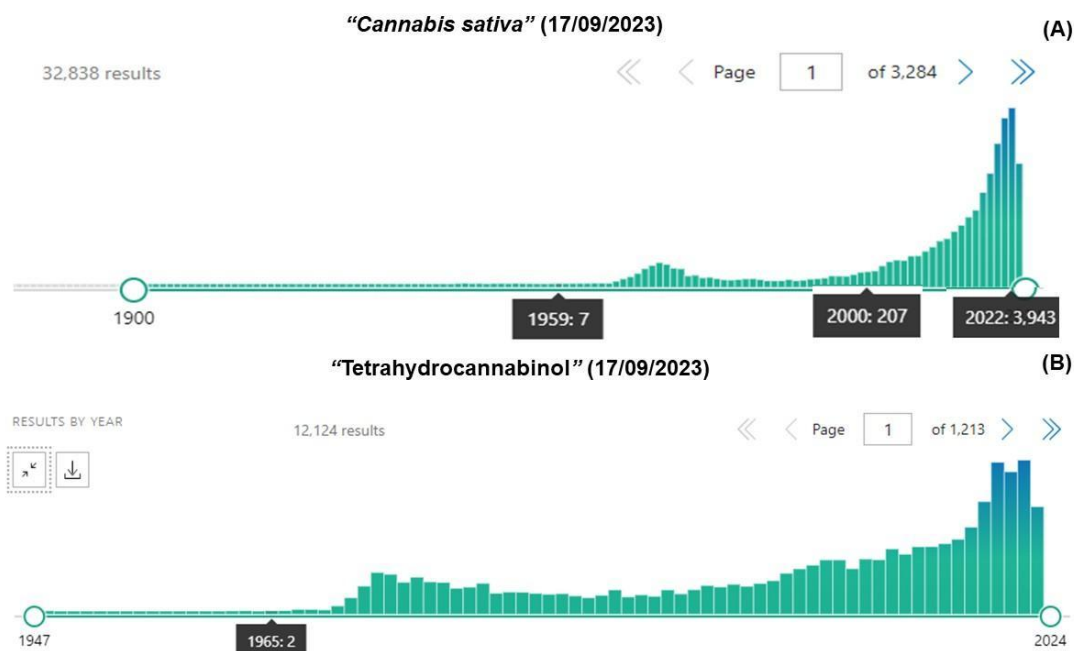


Figura 11. Evolução temporal do número de publicações científicas indexadas no PubMed utilizando as palavras-chave “Cannabis sativa” e “Tetrahydrocannabinol”. (A) Número de publicações por ano desde 1900 até a data da pesquisa, evidenciando o crescimento progressivo do interesse científico relacionado à *Cannabis sativa* e ao tetrahidrocanabinol (THC) ao longo do século XX e início do século XXI. (B) Período a partir de 1965, permitindo uma visualização mais detalhada do aumento expressivo no volume de estudos após a elucidação estrutural do THC e o avanço das pesquisas em farmacologia e neurociências. Fonte: PubMed (17/09/2023).

De modo análogo, ao realizar uma busca na base PubMed com a palavra-chave “*Endocannabinoid system*” observa-se um aumento expressivo nas publicações ao longo da década de 1990, refletindo o crescimento do reconhecimento do sistema endocanabinoide e de seu papel em fisiologia e farmacologia (Figura 12).

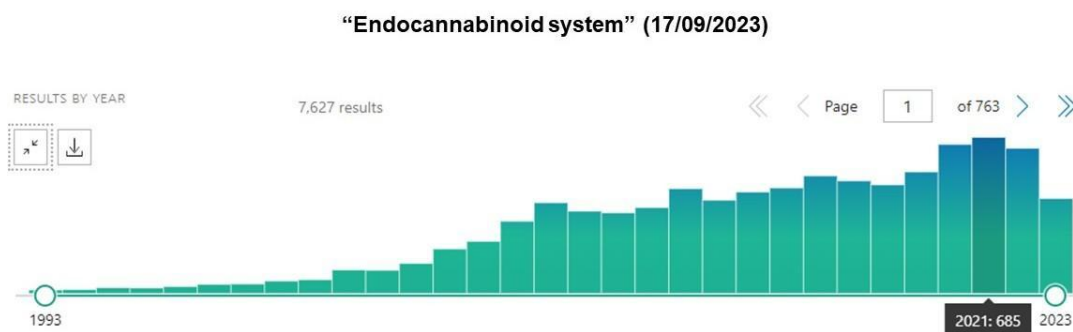


Figura 12. Evolução temporal do número de publicações científicas indexadas no PubMed utilizando a palavra-chave “Endocannabinoid system”. O gráfico apresenta o número de publicações por ano obtidas a partir de buscas realizadas na base de dados PubMed em 17/09/2023, considerando o período a partir de 1993. Observa-se um crescimento acentuado na produção

científica relacionada ao sistema endocanabinoide ao longo das décadas subsequentes, refletindo a identificação dos receptores canabinoides, a descoberta dos endocanabinoides endógenos e a consolidação desse sistema como um importante modulador de processos fisiológicos e patológicos. Fonte: PubMed (17/09/2023).

1.3.1. *Cannabis sativa*: características e composição química

A espécie *Cannabis sativa* L. pertence à família Cannabaceae, gênero *Cannabis*, e tradicionalmente tem sido subdividida – entre outras – nas subespécies *sativa*, *indica* e *ruderalis/spontanea*. Trata-se de uma angiosperma dicotiledônea que cresce livremente em diversas partes do mundo, especialmente em regiões tropicais e temperadas, adaptando-se a variados tipos de solo (Fidan, 2021). Seu ciclo anual é caracterizado por um crescimento vegetativo durante os meses com maior fotoperíodo (primavera e verão), e por floração quando a incidência luminosa diminui (outono e inverno). As plantas são majoritariamente dioicas, isto é, os espécimes femininas e masculinas ocorrem em exemplares diferentes, e podem variar de 1 a 6 metros de altura, dependendo das condições de cultivo e genética (Figura 13) (Silva et al., 2020; Malgorzata et al., 2021).

Em 1971, Fetterman propôs uma classificação quimiotaxonômica para a espécie, baseada na razão:

$$\frac{[THC] + [CBN]}{[CBD]}$$

Se esta expressão resultasse em um resultado > 1 , a planta seria classificada como “*chemo-type*” ou narcótica. Se o resultado fosse < 1 , seria classificada como “*fyber-type*” ou fibrosa. Além disso, descreveu que genética, fatores ambientais, tempo de cultivo e tratamentos como estocagem, secagem e extração impactam na composição química da planta (Lapierre et al., 2023; Malgorzata et al., 2021).

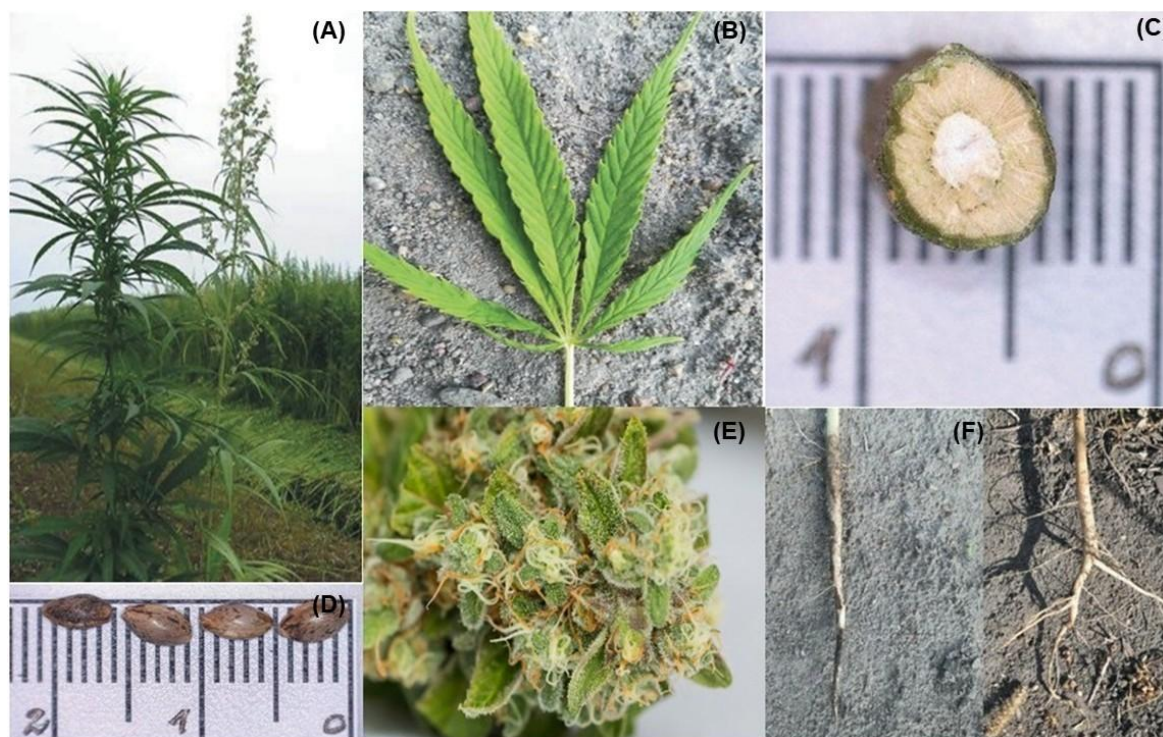


Figura 13. Morfologia geral da planta *Cannabis sativa*. (A) Espécimes feminino (à esquerda) e masculino (à direita), evidenciando o dimorfismo sexual característico da espécie. (B) Folha palmada com folíolos serrilhados, (C) caule, (D) semente, (E) flor e (F) sistema radicular. A diversidade morfológica apresentada reflete adaptações estruturais relevantes para o desenvolvimento, reprodução e produção de metabólitos secundários da planta. Fonte: Malgorzata et al., 2021.

A *C. sativa* apresenta um complexo fitoquímico diversificado, composto por canabinoides, terpenoides (principalmente sesquiterpenos e monoterpenos), flavonoides e alcaloides. Até o momento, cerca de 545 compostos naturais ativos foram extraídos e caracterizados da planta, dos quais pelo menos 144 são fitocanabinoides identificados, encontrados principalmente nos tricomas das inflorescências femininas (Lowe et al., 2021; Freeman et al., 2019; Khoury et al., 2022). Entre os fitocanabinoides mais conhecidos estão Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico (THCA), canabidiol (CBD), ácido canabidiólico (CBDA), dimetilcanabidiol (DMCBD), Δ^9 -tetrahydrocannabivarina (THCV), cannabinol (CBN), canabidivarina (CBDV), canabigerol (CBG), ácido canabigerólico (CBGA) e canabircromeno (CBC) (Figura 14) (Khoury et al., 2022; Gaoni; Mechoulam, 2002).

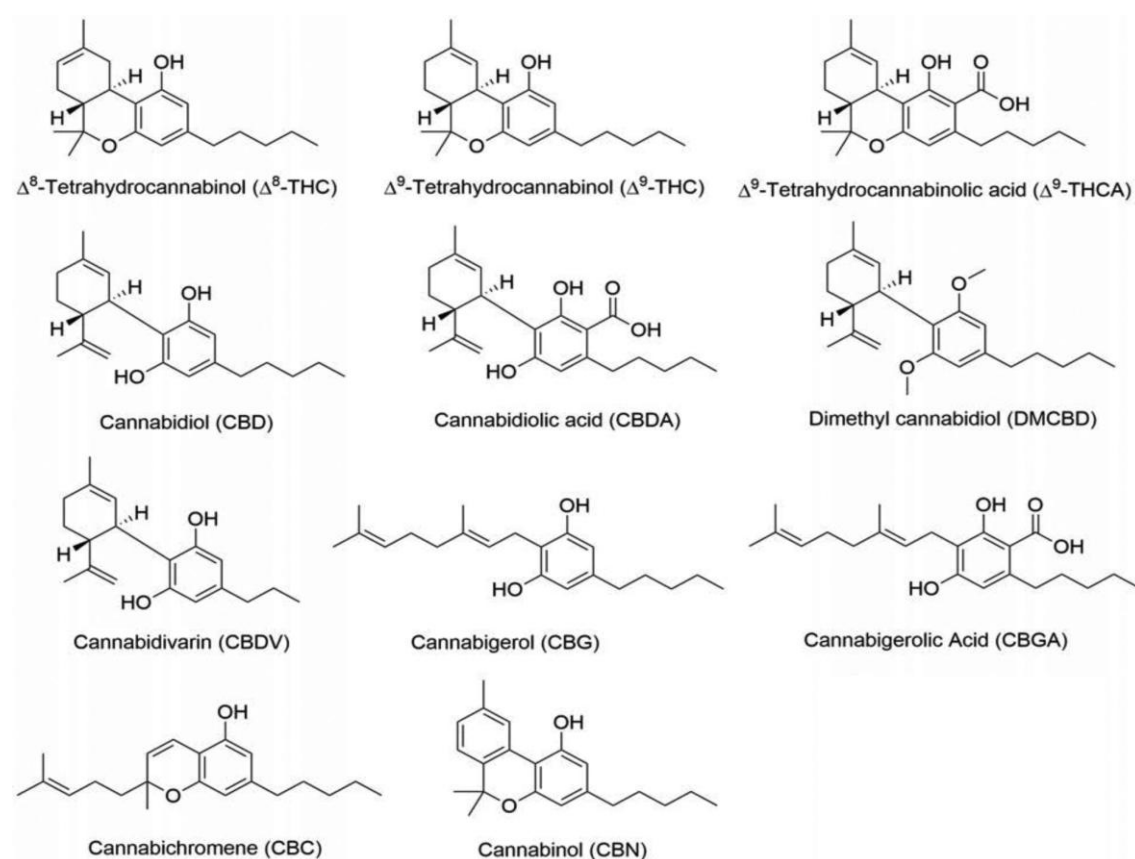


Figura 14. Estruturas químicas dos principais fitocanabinoides identificados na *C. sativa*.
 Fonte: Schubert et al., 2019.

A biossíntese dos fitocanabinoides na *C. sativa* inicia-se com os precursores ácido olivetólico (OLA) e geranil difosfato (GPP) (Gagne et al., 2012; Sirikantaramas et al., 2004; Sirikantaramas et al., 2005). A enzima olivetolato geraniltransferase (GOT) catalisa a formação do ácido canabigerólico (CBGA) pela prenilação do OLA com o GPP (Figura 15). O CBGA é considerado o canabinoide precursor, sendo convertido em três principais ácidos canabinoides: ácido tetrahydrocannabinólico (THCA) (Figura 16), ácido canabidiólico (CBDA) e ácido canabicromênico (CBCA) pela ação das enzimas THCA sintase (THCAS), CBDA sintase (CBDAS) e CBCA sintase (CBCAS), respectivamente (Taura et al., 1996). Esses ácidos canabinoides são convertidos em suas formas neutras - THC, CBD e CBC (Figura 17), respectivamente – por descarboxilação não enzimática, que ocorre espontaneamente com o tempo e a exposição ao calor (Hahm et al., 2025; Sirikantaramas et al., 2005). Além disso, o canabinol (CBN) pode ser encontrado como produto de degradação do THC, especialmente em materiais armazenados

por períodos prolongados ou expostos a condições inadequadas (Hahm et al., 2025; Jin et al., 2020).

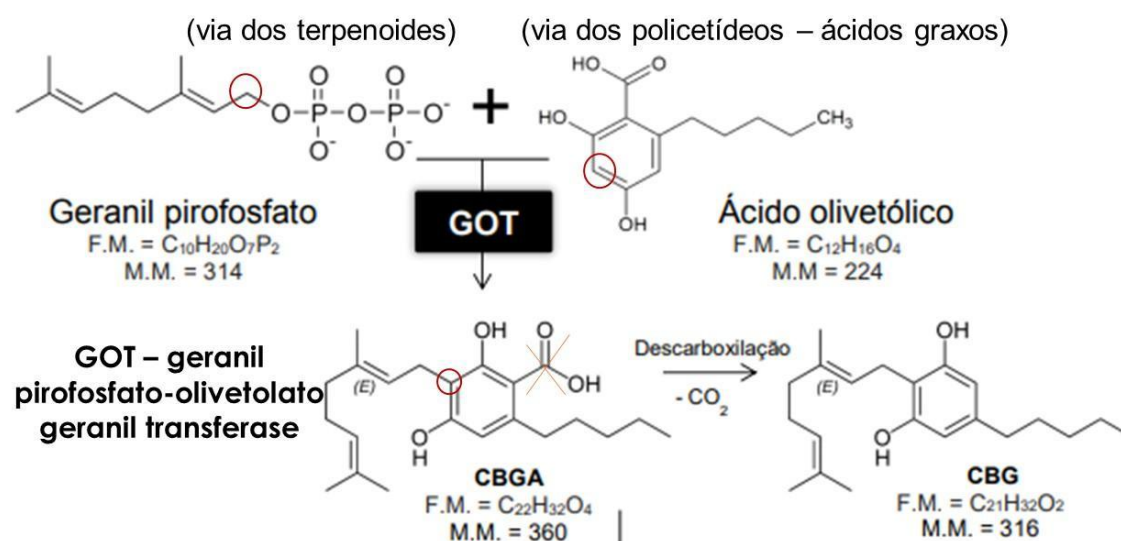


Figura 15. Biossíntese do ácido canabigerólico (CBGA), precursor central dos fitocanabinoides, na *Cannabis sativa*. O esquema ilustra a formação do ácido canabigerólico (CBGA) a partir da condensação do pirofosfato de geranila (GPP) com o ácido olivetólico, reação catalisada por uma preniltransferase específica. O CBGA atua como precursor biossintético comum para a formação dos principais fitocanabinoides ácidos, incluindo THCA, CBDA e CBCA, desempenhando papel central na diversidade química da planta. Fonte: Borille, 2016.

O ácido olivetólico é produzido pela via dos poliketídeos a partir de ácidos graxos, enquanto a GPP é derivada da via do mevalonato, típica da biossíntese de terpenos. A condensação dessas duas moléculas é catalisada pela enzima geranyl pirofosfato – olivetolato geranyltransferase (GOT), resultando na formação do CBGA. A descarboxilação do CBGA, por aquecimento ou exposição prolongada, produz o canabigerol (CBG) na sua forma neutra (Gagne et al., 2012; Gülck et al., 2020).

Mecanismo de reação da THC sintase:

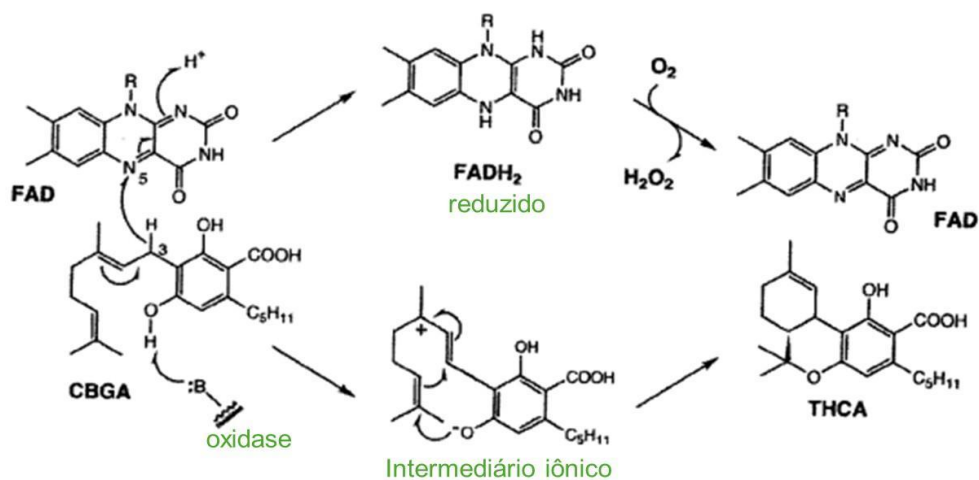


Figura 16. Conversão enzimática do ácido canabigerólico (CBGA) em ácido tetrahydrocannabinólico (THCA). A reação é catalisada pela enzima THCA sintase, na qual o CBGA é convertido em ácido tetrahydrocannabinólico (THCA), principal precursor biossintético do tetrahydrocannabinol (THC). Essa etapa enzimática é determinante para o perfil fitoquímico da *Cannabis sativa* e para a produção de canabinoides com atividade biológica. Fonte: Sirinkantaramas et al., 2004.

As enzimas THCAS, CBDAS e CBCAS pertencem à família das oxidases dependentes de FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina) e catalisam reações de oxirredução, utilizando oxigênio molecular como aceptor de elétrons. Esse mecanismo permite a produção dos canabinoides neutros correspondentes por meio de um processo de ciclização oxidativa (Sirinkantaramas et al., 2004).

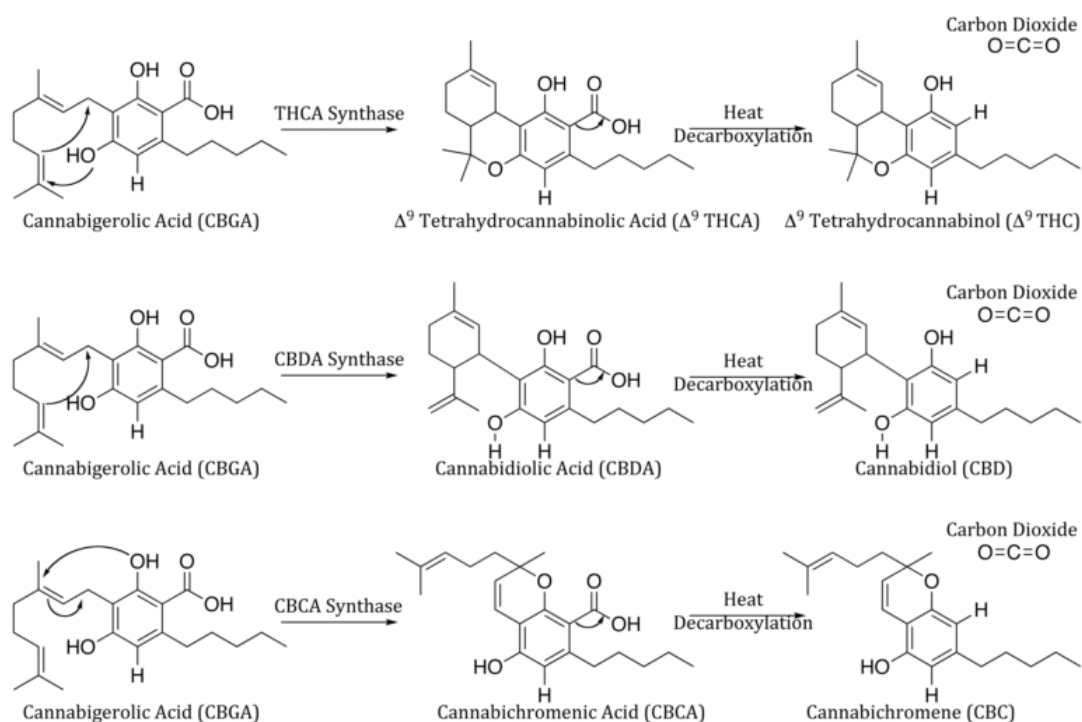


Figura 17. Conversão biossintética do ácido canabigerólico (CBGA) nos principais fitocanabinoides de *Cannabis sativa*. O esquema ilustra a conversão enzimática do CBGA nos ácidos tetrahydrocannabinólico (THCA), canabidiólico (CBDA) e canabicromênico (CBCA), catalisada pelas respectivas sintases específicas. Em etapa subsequente, esses canabinoides ácidos sofrem descarboxilação, resultando na formação das formas neutras biologicamente ativas tetrahydrocannabinol (THC), canabidiol (CBD) e canabicromeno (CBC). Fonte: Tegrapharma, 2025.

Na presença de ácido divarínico (olivetolato varínico), a enzima GOT pode condensar o GPP com este precursor alternativo, formando o ácido canabigerovarina (CBGVA). Após a descarboxilação, o CBGVA gera a molécula canabigerovarina (CBGV). Alternativamente, na presença das enzimas sintases Δ^9 -THCVS, CBDVS e CBCVS, o CBGVA é convertido a Δ^9 -THCVA, CBDVA e CBCVA, respectivamente (Figura 18) (Borille, 2016).

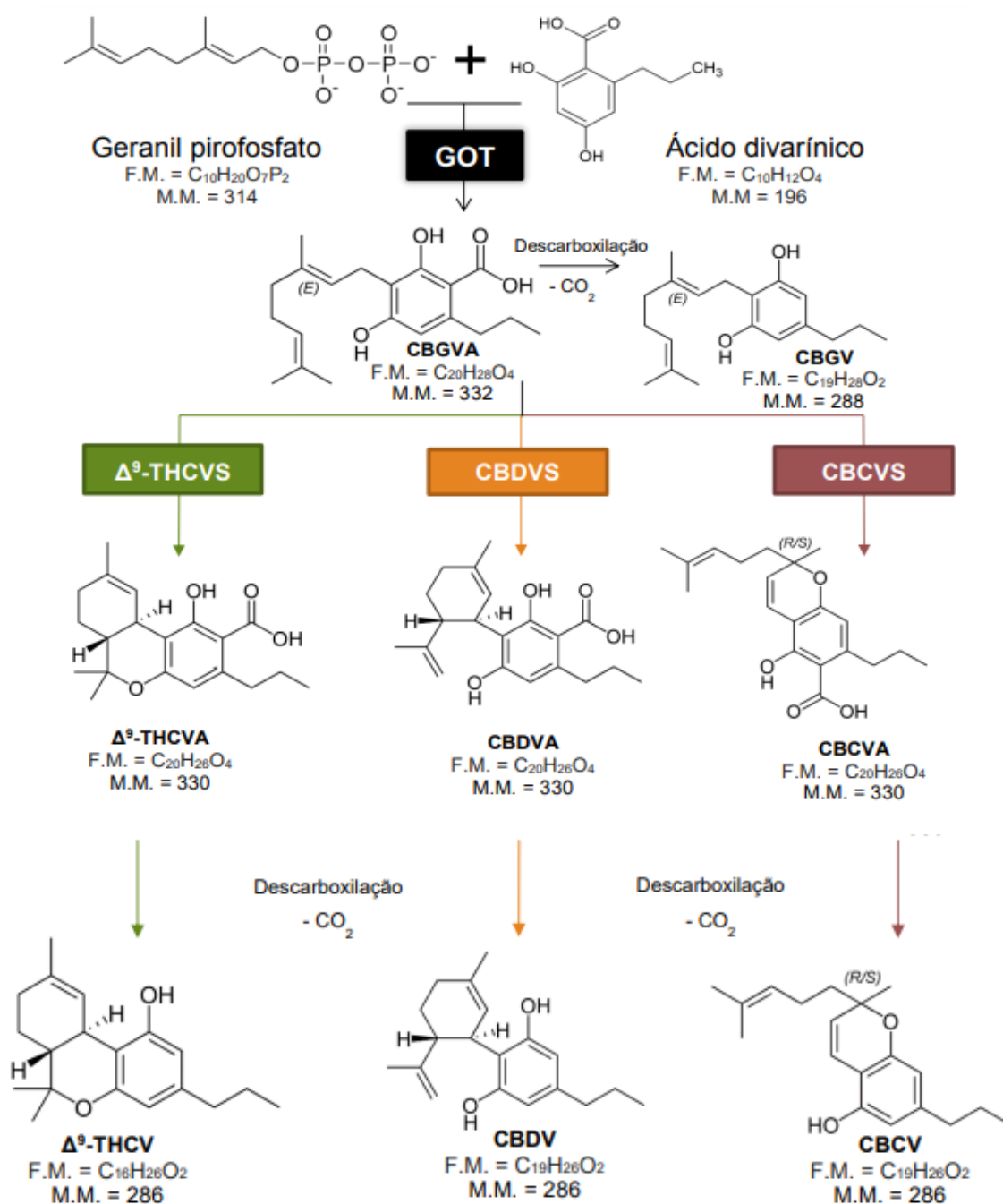


Figura 18. Biossíntese dos canabinoides de cadeia lateral curta em *Cannabis sativa*. O esquema mostra a conversão enzimática dos ácidos tetrahydrocannabivarínico (THCVA), canabidivarínico (CBDVA) e canabicroménico varínico (CBCVA) em seus correspondentes canabinoides neutros, THCV, CBDV e CBCV, através de descarboxilação. Esses compostos, assim como seus homólogos de cadeia mais longa (THC, CBD e CBC), apresentam relevância farmacológica e contribuem para a diversidade química da planta. Fonte: Borille, 2016.

1.3.2. *Cannabis sativa*: potencial farmacológico

Os canabinoides podem ser classificados em três grandes grupos: endocanabinoides, fitocanabinoides e canabinoides sintéticos. Os endocanabinoides são ligantes endógenos dos receptores canabinoides, modulando diversas funções fisiológicas, como regulação do apetite, dor, humor e memória. Os fitocanabinoides são compostos naturais extraídos da planta *C. sativa* que interagem com o SEC, mimetizando a ação dos endocanabinoides. Por sua vez, os canabinoides sintéticos são compostos artificiais desenvolvidos quimicamente para uso terapêutico, podendo atuar em diferentes alvos do SEC (Khoury et al., 2022).

Atualmente, os produtos derivados de *C. sativa* têm demonstrado eficácia significativa no alívio de efeitos adversos associados a tratamentos médicos agressivos, sendo especialmente relevantes como terapia paliativa (Abrams; Guzman, 2015; Cyr et al., 2018; Carter et al., 2011; Green; De-Vries, 2010). Esses efeitos são atribuídos, em grande parte, às suas propriedades sedativas, bem como à capacidade de reduzir sintomas de insônia, ansiedade, depressão, náuseas, vômitos e dores crônicas (Bar-Sela et al., 2013; Bar-Lev et al., 2018; Smith et al., 2012; Temel et al., 2010; Abrams et al., 2007; Langford et al., 2013, Nurmikko et al., 2007; Bennici et al., 2021).

Estudos indicam que o tratamento com *C. sativa* melhora significativamente a dor e a qualidade do sono em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (Bonn-Miller et al., 2014; Rehman et al., 2021; Khoury et al., 2022). Além disso, demonstrou reduzir a espasticidade em pacientes com esclerose múltipla (Fragoso et al., 2020; Killestein et al., 2004; Mecha et al., 2020) e apresentou eficácia positiva no manejo de convulsões epiléticas e insônia (Kuhathasan et al., 2021). Pesquisas recentes também sugerem que os canabinoides podem exercer efeitos neuroprotetores, mostrando potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DP e a DA (Russo, 2011; Zuardi et al., 2006). Especificamente em pacientes com DP, o uso da *C. sativa* tem sido associado à melhora do comportamento, da linguagem e comunicação, das habilidades motoras, do sono, do relaxamento muscular e do alívio da dor (Balash et al., 2017; Tzadok et al., 2016; Yenilmez et al., 2021).

Em modelos de doenças neurodegenerativas, extratos de *C. sativa* e seus fitocanabinoides, como o CBD, demonstraram restaurar o potencial de membrana

mitocondrial, reduzir a produção de ROS e normalizar os níveis de ATP, sugerindo um efeito protetor direto sobre a função mitocondrial (Atalay et al., 2019). O CBD tem sido amplamente estudado por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Liang et al., 2022). Além dos fitocanabinoides mais conhecidos, como THC e CBD, outros compostos como Δ^9 -THCV, CBN, CBDV, CBG e CBC (Khoury et al., 2022; Carvalho, 2017) têm atraído crescente interesse nos últimos anos (Liang et al., 2022; Maroon; Bost, 2018; Lewis et al., 2018; Nadal et al., 2017). O CBN, em particular, demonstrou potencial neuroprotetor significativo. Estudos recentes indicam que o CBN pode atrasar significativamente o início da doença em um modelo de esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Liang et al., 2022).

Mechoulam et al. (2007) descreveram estudos clínicos avaliando a eficácia terapêutica do CBD, isolado ou em combinação com outros fitocanabinoides, no sistema nervoso central e periférico para diferentes transtornos. Em pacientes com esquizofrenia o CBD apresentou um perfil antipsicótico promissor, mostrando potencial terapêutico para distúrbios psiquiátricos (Leweke et al., 2000; Zuardi et al., 2006; Leweke et al., 2012; Schubart et al., 2011). O canabidiol mostrou um potencial do tipo ansiolítico em estudo realizado com ratos *Wistar* (Gomes et al., 2011) e efeito do tipo antidepressivo em camundongos *Swiss* (Zanelati et al., 2010), sugerindo seu potencial para o manejo de alguns transtornos psiquiátricos.

Uma pesquisa pré-clínica *in vitro* de danos cerebrais hipóxico-isquêmicos em camundongos recém-nascidos apontou um perfil neuroprotetor interessante para isquemia neonatal, que foi relacionada com a combinação das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do CBD isolado (Castillo et al., 2010). Outros estudos exploraram as propriedades descritas para o canabidiol apostando em combinações com outros canabinoides; por exemplo, com o Δ^9 -THC, cujas pesquisas mostraram efeitos neuroprotetores para a doença de Huntington e redução da atrofia estriatal causada por ácido 3-nitropropiónico *in vivo*, usando ratos *Sprague-Dawley* adultos (Sagredo et al., 2011; Sagredo et al., 2007). Usando o mesmo modelo de estudo, combinações dos fitocanabinoides CBD e Δ^9 -THC foram neuroprotetoras (Valdeolivas et al., 2012). A combinação do CBD com o provável fitocanabinoide Δ^9 -THCV foi estudada *in vivo* e *in vitro* em modelos da

doença de Parkinson, onde promoveram ação neuroprotetora contra a toxicidade da 6-hidroxidopamina (Lastres-Becker et al., 2005; García et al., 2011).

Além disso, o CBD já mostrou potencial neuroprotetor em outras doenças neurodegenerativas, como acidente vascular cerebral, Alzheimer e esclerose múltipla (Hayakawa et al., 2007; Mishima et al., 2005; Braidá et al., 2003; Hayakawa; Mishima; Fujiwara, 2010; Esposito et al., 2006; Kozela et al., 2011); sendo que para esta última, a combinação do CBD com o Δ^9 -THC foi recentemente licenciada como um agente de alívio de sintomas para o tratamento de espasticidade e dor (Sastre-Garriga et al., 2011).

1.4. Modelos biológicos

1.4.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Embora vários aspectos das doenças estejam além da capacidade de um organismo unicelular como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, este modelo celular é extremamente valioso para estudar processos biológicos básicos e altamente conservados entre eucariotos, tais como biogênese mitocondrial, síntese proteica, tráfego vesicular e vias autofágicas (Pereira et al., 2012; Menezes et al., 2015; Delenclos et al., 2019). Na verdade, a simplicidade relativa da levedura, quando comparada às células humanas, tem sido amplamente explorada para acelerar a descoberta de novos fármacos e alvos terapêuticos (Epremyan et al., 2023; Outeiro; Lindquist, 2003; Vandeboek et al., 2005).

O cultivo de *S. cerevisiae* tem vantagens práticas e econômicas, incluindo crescimento rápido em meios de baixo custo, manipulação genética facilitada e ausência de patogenicidade em condições padrão (Menezes et al., 2015; Epremyan et al., 2023; Delenclos et al., 2019). A levedura é mantida por congelamento em presença de glicerol e pode ser geneticamente modificada com alta eficiência (deleção, mutação, inserção de DNA) devido ao conhecimento amplo do seu genoma eucariótico, que foi o primeiro a ser sequenciado (Bayandina; Mukha, 2023; Miller-Fleming et al., 2008).

Este organismo possui metabolismo aeróbico facultativo, podendo alternar entre fermentação e respiração de acordo com a disponibilidade de hexoses (geralmente glicose). Quando a glicose está em alta concentração, o metabolismo fermentativo é predominante (primeira fase exponencial de crescimento), sendo caracterizado por um rápido crescimento devido à divisão celular acelerada. Nessa fase, ocorre a fermentação das hexoses presentes no meio, resultando na produção de etanol. À medida que o substrato se esgota, inicia-se a transição para respiração (fase diáuxica). Nessa fase, o crescimento celular estagna-se e os mecanismos metabólicos são ativados para iniciar o metabolismo aeróbico. Na fase pós-diáuxica o crescimento celular é retomado, porém em um ritmo mais lento em comparação à fase fermentativa. Nessa fase, o etanol produzido durante a fermentação é utilizado como fonte de energia até seu esgotamento. Então, a taxa de proliferação diminui e há aumento da morte celular, mantendo constante a quantidade de células por algum tempo (fase estacionária), até que todas as células morrem por falta de nutrientes (Herman, 2002; Busti et al., 2010).

A conservação de mecanismos entre *S. cerevisiae* e eucariotos superiores envolve: ciclo celular, transporte intracelular, manutenção do potencial redox mitocondrial, sistemas de defesa antioxidante, autofagia e controle da qualidade proteica (Bayandina; Mukha, 2023; Ruetenik; Barrientos, 2018; Brás, 2019). Como todos os eucariotos, a levedura *S. cerevisiae* dispõe de sistemas de defesa antioxidante, nos quais destacam-se enzimas como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. O fator de transcrição Yap1p (*Yeast Associated Protein 1*) representa um componente central dessa resposta na levedura. Yap1p atua como regulador redox-sensível, ligando-se ao DNA em regiões promotoras específicas, capazes de ativar ou reprimir a expressão gênica, ajustando a produção de proteínas de defesa antioxidante em resposta a estressores como peróxido de hidrogênio e metais pesados (Moye-Rowley et al., 1989; Schnell; Entian, 1991; Wu et al., 1993; Coleman et al., 1999; Delaunay et al., 2000; Rodrigues-Pousada et al., 2005; Wysocki; Tamás, 2010).

A localização de Yap1p é citoplasmática (Delaunay et al., 2002; Yan et al., 1998); porém sob condições de estresse oxidativo, pares de grupos sulfidrilas (-SH) em cisteínas de Yap1p formam pontes dissulfeto, o que altera sua conformação e bloqueia a interação com Crm1p, um receptor de exportação nuclear (Lovato et al.,

2017). Consequentemente, Yap1p acumula-se no núcleo promovendo a transcrição de genes (Gulshan et al., 2005; Okazaki et al., 2007) como tiorredoxina (*TRX2*), catalase (*CTT1*) e superóxido dismutase (*SOD1*), que codificam enzimas essenciais para a eliminação de ROS. Este mecanismo de ativação da Yap1 é fundamental para que a célula preserve sua viabilidade e integridade em ambientes com estresse oxidativo. O fator de transcrição Yap1p age como um regulador-chave da resposta ao estresse oxidativo, garantindo que a célula seja capaz de se adaptar e se defender contra as espécies reativas de oxigênio que podem ser prejudiciais para sua integridade e funcionamento. (Temple et al., 2005).

Na biologia de mamíferos, incluindo seres humanos, o homólogo funcional mais estudado ao Yap1p é o Nrf2p (Fator Nuclear Eritróide Relacionado ao Fator 2). O Nrf2p também regula a resposta antioxidante à toxicidade causada por substâncias químicas e radicais livres. Em condições basais, Nrf2p é retido no citosol por sua interação com uma proteína reguladora chamada Keap1p, mas sob estresse oxidativo Nrf2p é liberado e transloca-se para o núcleo da célula ativando a expressão de genes de detoxificação, reparo de DNA e defesa antioxidante. O Nrf2p desempenha um papel crítico na proteção das células contra danos oxidativos e no equilíbrio do estado redox. Assim, embora Yap1p e Nrf2p existam em organismos distintos e sigam vias de sinalização diferentes, ambos são cruciais para o controle redox e a adaptação celular ao estresse oxidativo (Zanotto-Filho et al., 2016; Forman et al., 2016).

A levedura *S. cerevisiae* tem sido empregada como um modelo interessante e relevante para estudos relacionados a mecanismos de neurodegeneração. Diversas proteínas humanas associadas a essas patologias têm sido expressas heterologicamente na levedura, o que permitiu recapitular fenótipos como agregação proteica e toxicidade celular dose-dependente (Outeiro; Lindquist, 2003; Vandebroek et al., 2005). Esses modelos de levedura modificados revelam disfunções celulares observadas também em pacientes ou em modelos de eucariotos superiores, incluindo comprometimento da endocitose, desregulação transcricional, ativação de marcas de apoptose, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Joyner et al., 2010). Recentemente, vários estudos destacaram a levedura como ferramenta útil para investigar mutações associadas à doença de Parkinson. Por exemplo, a expressão

do gene humano *SNCA* em levedura permitiu analisar diretamente o impacto de variantes desse gene nas funções celulares básicas (delenclos et al., 2019).

No primeiro modelo de DP em levedura foi utilizada a fusão do gene humano *SNCA*, que codifica a proteína aSyn em levedura, com a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) sob controle do promotor galactose-induzível (*GAL1*). A expressão de uma cópia do gene humano produziu quantidades moderadas de aSyn-GFP, permitindo que a proteína se associasse parcialmente à membrana plasmática, mas não mostrou agregação significativa, não sendo tóxica para as células de levedura, refletindo uma condição “não patológica”. A expressão de duas cópias do *SNCA* sob o mesmo promotor *GAL1*, por sua vez, eleva a quantidade de aSyn produzida a níveis acima da capacidade da célula de manter o enovelamento e degradação adequados, levando à insolubilidade da proteína e à formação de inclusões citoplasmáticas, o que induziu citotoxicidade relevante (Figura 19); sugerindo que a expressão de duas cópias leva à superexpressão de aSyn em levedura suficiente para provocar danos celulares, conforme também observado em algumas formas humanas da doença (Tenreiro; Outeiro, 2016). Nessas células, a aSyn-GFP localizava-se preferencialmente na membrana plasmática quando presente em cópias simples; entretanto, em células que expressam duas cópias do gene foram observadas inclusões intracelulares dependentes da concentração da proteína aSyn-GFP (Miller-Fleming et al., 2008). Estudos subsequentes revelaram que essas inclusões formadas em levedura correspondem a aglomerados de vesículas e membranas, resultado da disfunção causada pela aSyn no tráfego vesicular. Esse fenômeno possui paralelo patológico com os LBs observados em cérebros de pacientes com DP (Tenreiro; Outeiro, 2016).

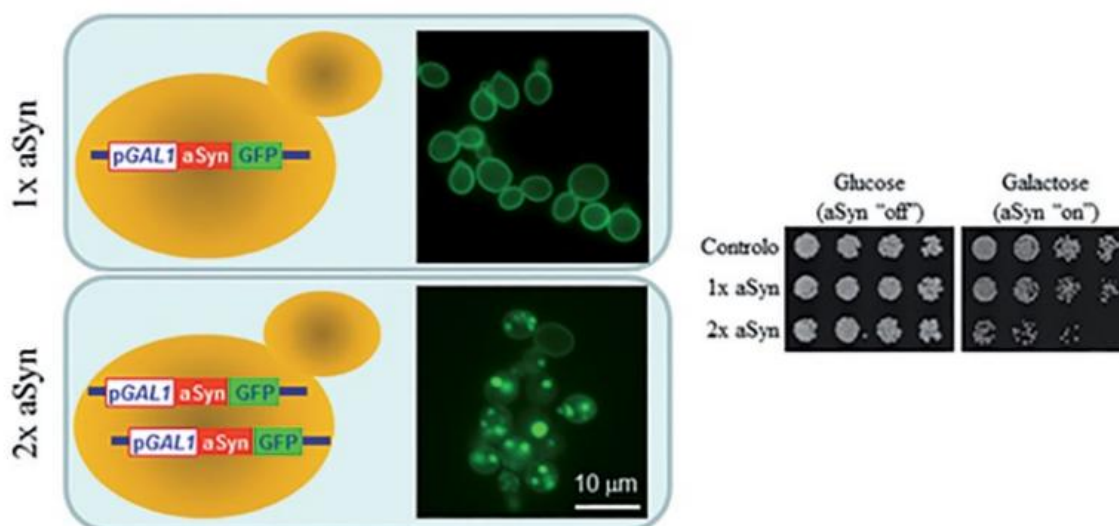


Figura 19. Expressão e síntese da aSyn em *Saccharomyces cerevisiae*. Produção de aSyn em levedura com uma única cópia do gene e em células contendo duas cópias, evidenciando como a quantidade de gene influencia os níveis de proteína expressa. Modelos de levedura com diferentes doses de aSyn permitem investigar os efeitos da superexpressão da proteína, incluindo agregação, toxicidade e disfunções celulares associadas às sinucleinopatias. Fonte: TENREIRO; OUTEIRO, 2016.

Também foi demonstrado que, em células selvagens, a aSyn contendo a mutação A53T é direcionada à membrana plasmática por meio da via secretora, induzindo estresse no retículo endoplasmático. Em contraste, estudos recentes indicam que aSyn com a mutação A30P é direcionada ao vacúolo através da via endocítica, onde sofre degradação proteolítica (Tenreiro; Outeiro, 2016). A toxicidade decorrente da expressão de aSyn em levedura está associada à interferência em múltiplas vias celulares, incluindo endocitose, tráfego vesicular (especialmente do retículo endoplasmático para o Golgi), aumento do estresse oxidativo e formação de ROS, disfunção mitocondrial, deficiência do proteassoma e autofagia (Outeiro; Lindquist, 2003; Sancenon et al., 2012; Soper et al., 2008). A indução de apoptose também foi reproduzida em leveduras, reforçando a relevância deste modelo (Miller-Fleming et al., 2008).

Além disso, há evidências de que a aSyn forma inclusões citosólicas tóxicas em levedura, com mecanismos patológicos similares aos observados em neurônios humanos, incluindo disfunção no tráfego vesicular e estresse oxidativo (Tenreiro; Outeiro, 2016). Diversos grupos têm utilizado este modelo para investigar compostos capazes de modular processos patológicos associados à neurodegeneração, incluindo polifenóis e outros compostos bioativos (Brás et al.,

2019; Nevzglyadova et al., 2018; Gupta et al., 2018; Kardani et al., 2017; Lee et al., 2011; Macedo et al., 2017; Popova et al., 2015; Rencus-Lazar et al., 2019; Tardiff et al., 2013; Zampol; Barros, 2018).

A formação de espécies radicais está frequentemente associada a danos celulares que podem culminar em alterações neurológicas. Em resumo, a levedura constitui um modelo biológico simplificado, porém eficiente, para estudar mecanismos patológicos da DP e para a avaliação de potenciais estratégias terapêuticas.

1.4.2. Neuroglioma humano: células H4

Uma das linhagens de células não-neuronais mais comumente utilizadas para o estudo dos mecanismos bioquímicos envolvendo doenças neurodegenerativas são as linhagens de neuroglioma humano H4, que são células com alta capacidade de transfecção e manipulação genética facilitada. Em especial, essa linhagem é muito utilizada na investigação da agregação e toxicidade da aSyn pois são células facilmente transfectadas com aSyn humana, tanto na forma selvagem quanto em suas formas mutantes (Tabrizi et al., 2000; Mclean et al., 2001; Outeiro et al., 2008; Lázaro et al., 2016). É importante ressaltar que por serem derivadas de um tumor glial, as células H4 não apresentam um fenótipo neuronal completo, limitando sua capacidade de reproduzir fielmente a morfologia e conectividade sináptica dos neurônios humanos (Delenclos et al., 2019).

Modelos estabelecidos de H4 frequentemente empregam a co-expressão de variantes modificadas de aSyn, como o constructo SynT juntamente com sinfilina-1 (Figura 20) para promover a formação de inclusões intracelulares, permitindo o estudo de mecanismos de proteostase, autofagia e estresse oxidativo (Popova et al., 2021; Lázaro et al., 2014). Neste modelo transfectado, o gene da aSyn é acoplado a uma proteína pré-sináptica composta de 919 resíduos de aminoácidos, a sinfilina-1; onde essa co-transfecção resulta na formação de inclusões no citoplasma. A sinfilina-1, assim como a aSyn, está presente na maioria dos LBs (aglomerados proteicos) da substância nigra e em outras regiões do cérebro, e

parece estar diretamente relacionada com a formação dessas inclusões (Silva, 2013).

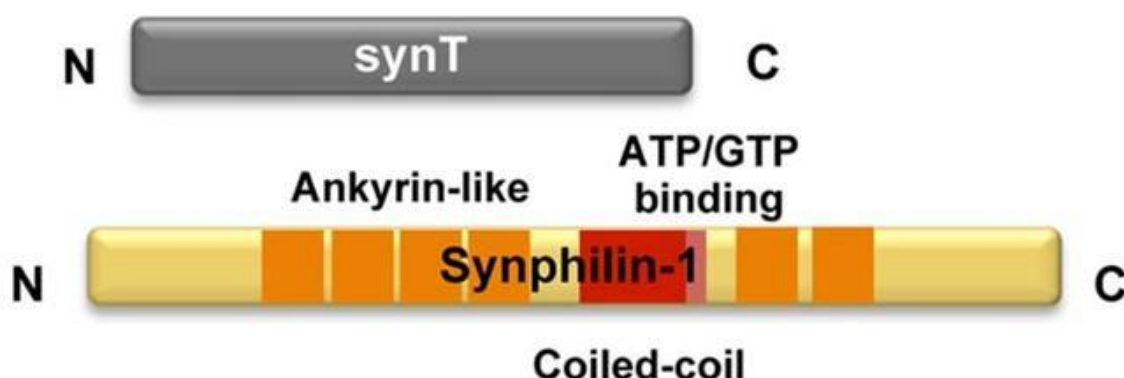


Figura 20. Constructos usados em H4 para modelo de agregação. Fonte: LÁZARO et al., 2014.

Estudos em H4 demonstraram que a superexpressão de aSyn pode induzir fenômenos que mimetizam processos observados em cérebros de pacientes com DP, como alterações do ciclo celular, disfunção mitocondrial, ativação de vias de resposta ao DNA e acúmulo de proteínas ubiquitinadas (Sampaio-Marques et al., 2019). Outros estudos utilizaram H4 para investigar a captação e liberação extracelular de aSyn, e avaliar compostos capazes de modular sua agregação ou toxicidade (Gustafsson et al., 2017; Moree et al., 2015).

Dessa forma, ambos os modelos biológicos foram escolhidos para este trabalho: células de *S. cerevisiae* transformadas geneticamente para mimetizar o ambiente intracelular observado nas duas doenças citadas; e células de neuroglioma H4 co-transfectadas com uma forma modificada da proteína aSyn, acoplada à GFP.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades biológicas de quatro extratos da espécie vegetal *Cannabis sativa* (Linnaeus) de diferentes genótipos visando seu potencial antioxidante e sua ação protetora frente a diferentes modelos de estudo expressando genes de proteínas relacionadas às doenças neurodegenerativas.

2.1. Objetivos específicos:

- a. Obter por extração hidrometanólica com ultrassom extratos da espécie *Cannabis sativa* ricos em fitocanabinoides de quatro genótipos diferentes;
- b. Determinar os perfis químicos dos quatro extratos de *C. sativa* quanto aos seus fitocanabinoides majoritários de acordo com cada genótipo da planta;
- c. Relacionar os perfis químicos dos extratos com as atividades biológicas determinadas nas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sem transformação (BY4741 e $\Delta yap1$) e transformadas com genes das proteínas aSyn e A β 42;
- d. Verificar a dependência da ação antioxidante dos quatro extratos sobre o sistema endógeno da levedura *S. cerevisiae* através do fator de transcrição antioxidante Yap1p;
- e. Avaliar o potencial antioxidante dos quatro extratos de *C. sativa* frente à presença das proteínas aSyn e A β 42 nas cepas transformadas de *S. cerevisiae*;
- f. Correlacionar a ação antioxidante dos extratos com o potencial de proteção contra a ação citotóxica da proteína α -sinucleína e do peptído β -amiloide;
- g. Determinar o potencial biológico dos quatro extratos de *C. sativa* na funcionalidade mitocondrial de *S. cerevisiae* sob influência da toxicidade das proteínas aSyn e A β 42;
- h. Avaliar a influência dos quatro extratos no padrão de agregação da proteína α -sinucleína em células de neuroglioma (H4), bem como seus impactos na sobrevivência celular.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção da espécie vegetal e processo extrativo

As plantas de *Cannabis sativa* utilizadas neste estudo foram fornecidas pela Associação de Canabinologia (Canapse), mediante convênio firmado com a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob o processo nº 23083.002965/2020-11.

Foram selecionados quatro genótipos distintos de flores de *C. sativa*, cada um pesando 100 gramas de material vegetal seco. O processo consistiu na secagem das flores em estufa ventilada a 110°C por 48 horas, promovendo a descarboxilação dos canabinoides ácidos (THCA, CBDA e CBNA), convertendo-os em suas formas neutras bioativas (THC, CBD e CBN, respectivamente) (Citti et al., 2018).

Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas (Solab/SL-32) até obtenção de pó fino homogêneo e peneirado (malha de 0,5 mm). A extração foi realizada utilizando solução de metanol:água (9:1) em banho de ultrassom (60 W, 40kHz) (Ecosonics/Q550) por 10 minutos à temperatura ambiente (~25°C). Após o tratamento ultrassônico, as suspensões foram filtradas em papel de filtro qualitativo 80 g e os solventes foram removidos em evaporador rotatório (Heidolph) sob pressão reduzida, a 40°C, até completa evaporação do solvente.

A escolha da mistura metanol:água (9:1) fundamentou-se em estudos prévios que demonstram a alta eficiência de solventes hidroalcoólicos na extração de compostos bioativos de *Cannabis sativa*, incluindo canabinoides descarboxilados, flavonoides e outros metabólitos secundários de polaridade intermediária. O metanol favorece a solubilização de compostos semipolares, enquanto a pequena fração de água melhora a penetração no tecido vegetal e a extração de metabólitos mais polares. Além disso, o uso de ultrassom potencializa a difusão do solvente na matriz vegetal, aumentando o rendimento e reduzindo o tempo de extração (Lazarjani et al., 2021; Chemat et al., 2017).

Os extratos brutos secos foram classificados de acordo com o canabinoide majoritário, determinado em análise cromatográfica posterior:

- E-THC – extrato com Δ^9 -tetrahydrocannabinol como componente majoritário;
- E-CBD – extrato com canabidiol como componente majoritário;
- E-CBN – extrato com cannabinol como componente majoritário;
- E-CBN+ – extrato com concentração elevada de cannabinol.

Todos os extratos foram acondicionados em tubos de vidro âmbar, vedados hermeticamente, e armazenados a 4°C até o momento das análises para evitar degradação foto-oxidativa (Elsohly; Gul, 2021).

3.2. Perfil químico dos extratos de *C. sativa*

Os extratos de *C. sativa* foram previamente solubilizados em metanol (10 mg.mL⁻¹) sob agitação magnética por 5 minutos e filtrados em filtros a 45 mm (Millipore/Merk) antes da injeção. As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)) acoplado a detector de diodos (PDA) (Shimadzu®, Japão), constituído por: controlador CBM-40, bomba LC-20AR de alta pressão, desgaseificador em linha DGU-405, detector espectrofotométrico de arranjo de fotodiodos SPDM40, amostrador automático SIL-10AF, coletor de frações FRC-10A e forno de coluna CTO-40S.

A separação foi conduzida em coluna cromatográfica Phenomenex® C18 (150 x 3,0 mm, 2,6 µm de diâmetro de partícula). A temperatura do forno foi mantida a 40°C. A fase móvel foi composta por metanol (fase B) e água ultrapura contendo 0,01% (v/v) de ácido fórmico (fase A), em modo isocrático (82% de fase B). A taxa de fluxo foi de 1,0 mL.min⁻¹, o volume de injeção de 50 µL, e o tempo total de corrida de 47 minutos. O espectro de absorção foi monitorado entre 190 e 500 nm, sendo o comprimento de onda de 280 nm adotado para quantificação dos canabinoides, conforme reportado por outros autores (CITTI, 2018; PELLATI, 2018). O metanol grau HPLC foi obtido da Supelco e a água ultrapura foi obtida da Milli-Q/Merck.

Os canabinoides foram identificados pela comparação dos seus perfis cromatográficos de soluções-padrão multicomponentes certificadas de (-)- δ^9 -THC,

CBN e CBD (Cerillant/Sigma- Aldrich[®], Brasil), e pelos seus tempos de retenção durante a análise.

Para os ensaios com levedura, os extratos de *C. sativa* foram previamente dissolvidos em etanol absoluto (Merck, grau HPLC), diluídos na proporção 1:20 e armazenados a 4°C em microtubos, protegidos da luz. Os estoques foram preparados a uma concentração de 500 µg.mL⁻¹. Para os ensaios com células H4, os extratos de *C. sativa* foram preparados em DMSO (dimetilsulfóxido) puro e armazenados à temperatura ambiente, em estoques de 2,0 mg.mL⁻¹.

3.3. PARTE I – LEVEDURA

3.3.1. Culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e condições de crescimento

Cinco cepas de *S. cerevisiae* foram utilizadas para avaliação biológica dos extratos de *C. sativa* (Tabela 1). As cepas recombinantes foram gentilmente fornecidas pelo professor Dr. Tiago Outeiro e mantidas sob condições padronizadas de armazenamento.

A cepa p426GAL-aSyn-GFP (referida como aSyn) contém o gene humano SNCA fusionado à GFP, sob o controle do promotor induzível GAL1, permitindo expressão dependente de galactose (Tenreiro et al., 2014). A cepa pAG426gal:ssAβ1-42 (referida como Aβ42) expressa o peptídeo humano β-amiloide 1-42 sob o mesmo promotor. Ambas foram construídas a partir do vetor pRS426GAL (Figura 21), que também foi utilizado na forma de vetor vazio (EV) como controle negativo de expressão.

Tabela 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

Cepas	Genótipos	Fenótipos
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Controle
Δ <i>yap1</i>	Isogênica da BY4741 exceto <i>YML007w::kanMX4</i>	Cepa deficiente no fator de transcrição <i>YAP1</i> (defesa antioxidante)
P426	pRS426GAL	Controle (plasmídeo P426 vazio)
P426-α-syn	p426GAL-aSyn-GFP	Cepa transformada com o gene da aSyn
P426-Aβ42	pAG426gal:ssAβ1-42	Cepa transformada com o gene do β-amiloide

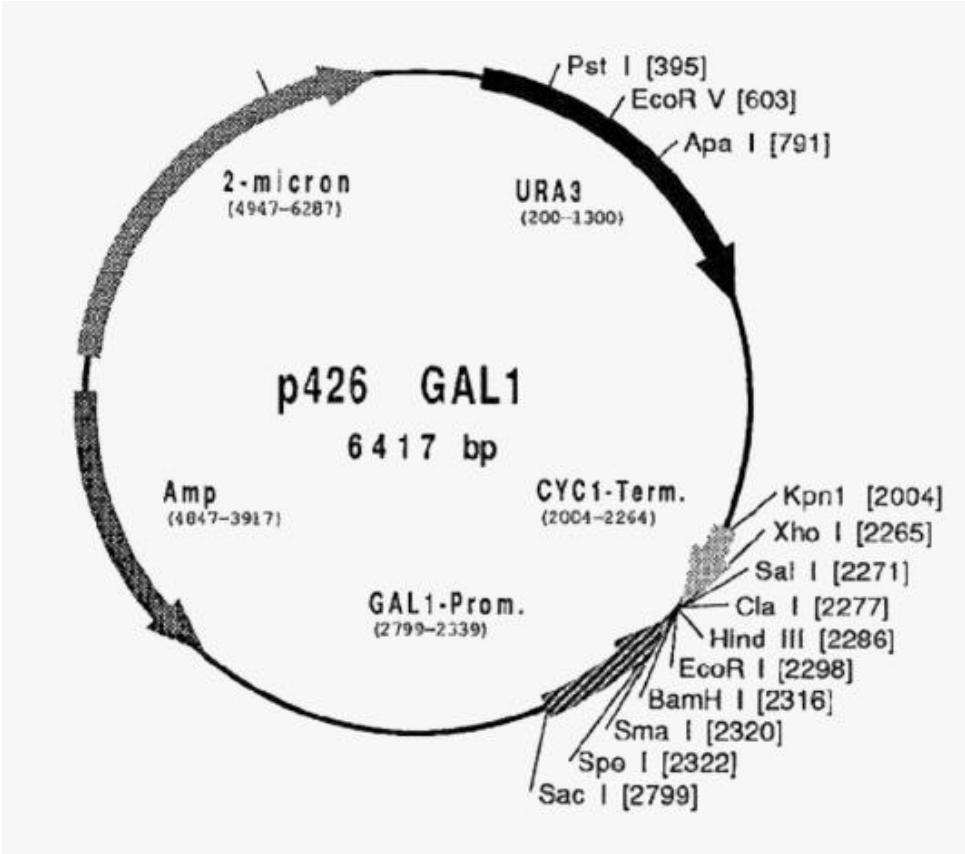


Figura 21. Mapa do vetor dos plasmídeos utilizados para a expressão de aSyn e Aβ42 em *Saccharomyces cerevisiae*. Construção do plasmídeo, promotor, sequência codificante da proteína heteróloga (aSyn ou Aβ42), elementos regulatórios e marcadores de seleção. Este vetor permite a expressão controlada das proteínas de interesse, possibilitando o estudo da agregação proteica, toxicidade e efeitos celulares associados a modelos de sinucleinopatias e patologia amiloidogênica. Fonte: Mumberg et al., 1994.

As cepas BY4741 e sua isogênica mutante Δ*yap1* foram mantidas em meio sólido YPD 2% (2% glicose, 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% ágar; Difco,

EUA) a 4°C. O pré-cultivo foi realizado em meio YPD 2% líquido (sem ágar) sob agitação orbital de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA®, Brasil), a 28°C, durante 24 h.

Para o cultivo das cepas transformadas (P426, P426- α -syn e P426-A β 42) foi utilizado meio sintético definido sem uracila (SD-Ura) sólido, composto por 2% glicose, 0,67% base nitrogenada sem aminoácidos (Difco™), 0,1% mix dropout de aminoácidos sem uracila e 2% ágar, mantidas a 4°C. Para o crescimento experimental, as culturas foram transferidas para meio SD líquido sem uracila (–Ura), e mantidas a 30°C sob agitação de 160 rpm por 24 horas. A indução da expressão das proteínas humanas foi realizada substituindo-se a glicose do meio por 2% galactose (SDgal), e incubando-se por 2 horas, tempo suficiente para ativação do promotor *GAL1*.

As cepas descritas na Tabela 1 foram utilizadas para avaliação qualitativa e quantitativa da toxicidade dos extratos e de seus perfis antioxidantes; avaliação do impacto dos extratos no ambiente redox intracelular e na função mitocondrial perante toxicidade causada pelas proteínas aSyn e A β 42.

3.3.2. Transformação da levedura para modelo de aSyn

3.3.2.1. Propagação dos plasmídeos em *E. coli*

Os plasmídeos pRS426GAL e p426GAL-aSyn-GFP foram propagados em bactérias multicompetentes (*Escherichia coli* DH5 α). Uma alíquota de 50 μ L de suspensão bacteriana foi inoculada em 25 mL de meio LB líquido (1% peptona de caseína, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl; Difco™) e incubada ‘overnight’ a 37°C sob agitação orbital de 200 rpm.

No dia seguinte, um volume correspondente a OD₆₀₀ = 0,08 foi transferido para 300 mL de meio LB fresco e cultivado a 37°C/200 rpm até atingir OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,7. As células foram resfriadas no gelo por 1 hora e centrifugadas a 4°C/4.000 rpm por 5 min. O pellet foi ressuspenso em 100 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril, mantido no gelo por mais 1 h, centrifugado novamente e ressuspenso em CaCl₂ 0,1 M estéril.

Transformação química: 2 μL de plasmídeo (pRS426GAL ou p426GAL-aSyn-GFP) ou água estéril (controle) foram adicionados a 200 μL de uma suspensão contendo células competentes, misturados suavemente, e incubados no gelo por 30 minutos. As suspensões receberam choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguido de 2 minutos no gelo. Em seguida, 80 μL de meio SOC (LB suplementado com 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 e 20 mM glicose) foram adicionados e as células recuperadas por 1 h a 37°C/200 rpm. As células foram centrifugadas (13.000 rpm, 10 min), ressuspensas em 100 μL de água mili-Q estéril, e 200 μL da suspensão foram plaqueados em meio LB sólido (LB + 2% ágar LB + 1% ágar + 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ampicilina). Colônias foram incubadas 'overnight' a 37°C. A purificação dos plasmídeos foi realizada utilizando PureYield Plasmid Miniprep System (Promega®) conforme protocolo do fabricante.

3.3.2.2. Preparação de leveduras competentes e transformação por eletroporação

A cepa de *S. cerevisiae* BY4741 foi cultivada 'overnight' em YPD 2% líquido a 28°C/160 rpm. No dia seguinte, a suspensão celular correspondente a $\text{OD}_{600} = 0,1$ foi inoculada em 100 mL de YPD fresco e cultivada até $\text{OD}_{600} = 0,7-1,5$. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 5 minutos) e ressuspensas em 25 mL de tampão LiAc/DTT/TE (0,1 M LiAc, 10 mM DTT, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 e 1 mM EDTA), incubadas 1 h à temperatura ambiente com homogeneização suave a cada 10 minutos.

Após centrifugação (3.000 rpm, 5 min, 4°C), os pellets foram lavados duas vezes em água mili-Q gelada, seguidos de lavagem em 10 mL de sorbitol 1 M, centrifugados (3.000 rpm, 5 min, 4°C) e ressuspensos em 100 μL de sorbitol 1 M.

Para eletroporação, 2 μL da suspensão de cada plasmídeo foram adicionados a 40 μL de leveduras competentes, incubados no gelo por 5 minutos, transferidos para cubeta de eletroporação de 0,2 mm, e eletroporados em Gene Pulser Xcell (Bio-Rad®) com os parâmetros: 1,5 kV, 25 μF , 200 ohms, durante aproximadamente 3 segundos. Imediatamente, 1,0 mL de YPD 2% gelado foi adicionado.

As suspensões foram incubadas a 28°C/160 rpm por 2 h, centrifugadas (13.000 rpm, 5 min), ressuspensas em 100 µL de água, e plaqueadas em SD 2% dropout sem uracila e incubadas a 28°C por aproximadamente 72 horas até o crescimento de colônias.

3.3.2.3. Validação da transformação

Utilizando o Zeiss Observer microscópio Z1 (Zeiss®) com objetiva confocal (ZeissPlan-Apochromat 63 x 1.4Oil), e pacote de software ZEN BLACK para a detecção da proteína aSyn fusionada à proteína fluorescente GFP nas cepas P426 e P426-aSyn. Imagens foram obtidas com o auxílio do software Image J para confirmar a inserção dos plasmídeos na levedura através da detecção da fluorescência da GFP.

3.3.3. Avaliação preliminar da toxicidade dos extratos de *C. sativa*

3.3.3.1. Triagem qualitativa da citotoxicidade dos extratos

A toxicidade inicial dos extratos de *C. sativa* foi avaliada com base na conversão do indicador redox resazurina (Sigma-Aldrich™) em resorufina. Este ensaio baseia-se na capacidade de células metabolicamente ativas de reduzir o corante resazurina, que em solução emite coloração no comprimento de onda do azul, em resorufina, que em solução emite coloração no comprimento de onda do rosa (O'Brien, 2000). As cepas BY4741 e $\Delta yap1$ foram cultivadas 'overnight' em meio YPD 2% a 28°C, sob agitação orbital de 160 rpm em incubadora tipo shaker. No dia seguinte, placas de 96 poços estéreis receberam 50 µL de meio YPD fresco em cada poço. Os extratos foram adicionados em diluições seriadas, com concentrações variando de 250 a 0,10 µg.mL⁻¹. Devido à escassez de informações de toxicidade de extratos brutos de *C. sativa* em levedura, a faixa de concentrações foi determinada a partir do cruzamento de dados de toxicidade de extratos de diferentes plantas e a toxicidade de canabinoides isolados. A distribuição foi feita

em triplicata, para avaliação qualitativa da citotoxicidade dose-dependente. Após a diluição seriada, adicionou-se, em cada poço, 10 µL de suspensão celular previamente diluída a fim de se obter absorvância de 0,04 por poço. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. (SOLAB®, São Paulo, Brasil) a 28°C por aproximadamente 24 h. Após incubação, adicionou-se 10 µL de resazurina 0,01% (w/v) em cada poço, durante 30 minutos. Por fim, as amostras foram inspecionadas visualmente: o surgimento de coloração rosa é indicativo da presença de atividade metabólica, enquanto a violeta indica inatividade do metabolismo (Torres et al., 2018).

Os controles utilizados foram:

- CN: meio YPD + levedura (controle basal de crescimento);
- CP: meio YPD + levedura + H₂O₂ 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM e 0,625 mM (controle positivo de toxicidade);
- CC: meio YPD + resazurina 0,01% (controle de cor);
- CS: meio YPD + levedura + etanol 10%, 5%, 2,5%, 1,25% e 0,625% (solvente dos extratos, controle de efeito do veículo).

3.3.3.2. Perfil de crescimento celular

As cepas BY4741 e $\Delta yap1$ foram cultivadas 'overnight' em YPD 2% sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker. No dia seguinte, 0,1 mg.mL⁻¹ de suspensão celular foi adicionada em meio YPD fresco, na presença ou ausência dos extratos de *C. sativa* a 100 µg.mL⁻¹, em triplicata. Alíquotas de 100 µL da suspensão celular foram coletadas a cada 2 h durante o período de crescimento (24 horas). As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (UV/Vis, Biospectro®, Brasil) a 570 nm para obtenção da curva de crescimento celular. Neste experimento foram utilizados dois controles: células + meio YPD (crescimento basal), e células + meio YPD + H₂O₂ 2,0 mM (controle de estresse oxidativo).

3.3.4. Avaliação da toxicidade e potencial antioxidante dos extratos de *C. sativa* por viabilidade celular

As cepas de *S. cerevisiae* (cepas BY4741 e $\Delta yap1$) foram inicialmente cultivadas em meio líquido YPD 2% sob agitação constante de 160 rpm em incubadora tipo shaker, a 28°C, 'overnight'. Após o crescimento, um volume correspondente a 1,0 mg de células foi coletado, lavado e ressuspenso em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (PBS) 0,5 M (pH 6,0), e essa suspensão incubada com extratos de *C. sativa* (25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) no shaker por 2 horas. Após o período de exposição aos extratos, alíquotas correspondentes a 40 μg de células foram retiradas, diluídas ($10^4\times$) e plaqueadas em duplicata em meio sólido YPD 2% por espalhamento utilizando a alça de Drigalski flambada a cada contato com as suspensões celulares, como esquematizado no desenho experimental (Figura 22).

As suspensões celulares remanescentes foram incubadas com o agente oxidante peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 2,0 mM por 1 h, em 1,0 mL de tampão PBS 0,5 M (pH 6,0) sob agitação constante de 160 rpm. Em seguida, novas alíquotas de 40 μg de células foram retiradas, diluídas adequadamente e plaqueadas em duplicata em meio sólido YPD 2%.

Todas as placas foram incubadas a 28°C por 48 horas em incubadora do tipo B.O.D., sendo posteriormente realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para estimativa da viabilidade celular, tanto na condição basal quanto após o estresse oxidativo. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

3.3.5. Avaliação do ambiente redox intracelular

Todas as cepas de *S. cerevisiae* foram cultivadas sob agitação constante de 160 rpm em incubadora tipo shaker, a 28°C 'overnight'. Após o crescimento, um volume correspondente a 1,0 mg da suspensão celular foi coletado, lavado e ressuspenso em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (PBS) 0,5 M (pH 6,0), e incubado com extratos de *C. sativa* (25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) no shaker por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com água estéril e ressuspensas em PBS (pH 7,8). Para a detecção do ambiente redox intracelular, adicionou-se 20 μL de solução 1,0 mM de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) (Sigma, EUA)

preparada em etanol às suspensões celulares, e as amostras foram incubadas sob as mesmas condições por 20 minutos no shaker, sem exposição à luz para evitar fotodegradação da sonda fluorescente. Para indução de estresse oxidativo nas cepas sem expressão das proteínas aSyn e Aβ42 (BY4741 e $\Delta yap1$), as células foram lavadas novamente com água estéril e incubadas em uma etapa adicional com H₂O₂ a 2,0 mM por 1 h.

As suspensões celulares foram centrifugadas e os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços para leitura da fluorescência em leitor de microplacas (HIDEX®, Turku, Finlândia), utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 520 nm, respectivamente. Nas cepas expressando proteínas agregantes (aSyn e Aβ42), a etapa de H₂O₂ foi dispensada, permitindo avaliar exclusivamente o impacto dessas proteínas sobre o ambiente redox intracelular.

3.3.6. Avaliação do perfil protetor dos extratos de *C. sativa* frente à toxicidade induzida pelas proteínas agregantes

As cepas de *S. cerevisiae* (EV, aSyn e Aβ42) foram cultivadas em meio SD 2%, sob agitação constante de 160 rpm em incubadora tipo shaker, a 28°C ‘overnight’. No dia seguinte, as células foram lavadas e transferidas para meio SDgal 2% e incubadas no shaker por 2 horas, visando a indução da expressão das proteínas agregantes. Após o período de indução, uma suspensão celular correspondente a 1,0 mg de células foi coletada, lavada e ressuspensa em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (PBS) 0,5 M (pH 6,0), e incubada com extratos de *C. sativa* (5, 10, 15 e 25 µg.mL⁻¹) no shaker por 2 horas.

Ao final do período de tratamento, alíquotas correspondentes a 20 µg de células foram diluídas em série e plaqueadas em meio SD sólido 2%. As placas foram incubadas em incubadora B.O.D. a 28°C, e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas após 72 horas, permitindo avaliar o efeito protetor dos extratos sobre a toxicidade induzida pelas proteínas agregantes.

3.3.7. Avaliação da integridade mitocondrial

As cepas de *S. cerevisiae* (EV, aSyn e Aβ42) foram cultivadas em meio SD 2%, sob agitação constante de 160 rpm em incubadora tipo shaker, a 28°C 'overnight'. No dia seguinte, as células foram lavadas e transferidas para meio SDgal 2% e incubadas no shaker por 2 horas, visando a indução da expressão das proteínas agregantes. Após o período de indução, uma suspensão celular correspondente a 1,0 mg de células foi coletada, lavada e ressuspensa em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (PBS) 0,5 M (pH 6,0), e incubada com extratos de *C. sativa* (5, 10, 15 e 25 µg.mL⁻¹) no shaker por 2 horas.

Após a conclusão da etapa padrão de tratamento das células, adicionou-se 10 µL do reagente JC-1 (1,0 mM, iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) ou o desacoplador da cadeia transportadora de elétrons FCCP (10 µM, fluorocarbonil-cianeto fenil-hidrazona) às suspensões celulares. As amostras foram incubadas por 40 min, protegidas da luz, para permitir o acúmulo do corante nas mitocôndrias em função do potencial de membrana. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com tampão PBS (pH 7,4), sendo ressuspensas no mesmo tampão. As suspensões celulares foram centrifugadas e os sobrenadantes foram coletados e transferidos para placas de 96 poços pretas, apropriadas para leitura de fluorescência.

A fluorescência foi medida utilizando leitor de microplacas (HIDEX, Turku, Finlândia), nas seguintes faixas de comprimento de onda: verde (excitação: 488 nm; emissão: 525 nm) e vermelho (excitação: 534 nm; emissão: 590 nm). O resultado foi expresso como a razão RED/GREEN, definida pela fórmula:

$$\text{Razão de fluorescência do JC-1 (RFJ)} = \frac{\text{fluorescência (vermelho)}}{\text{fluorescência (verde)}}$$

Essa razão permite avaliar a integridade mitocondrial mantendo o potencial de membrana em níveis homeostáticos, sendo valores mais elevados indicativos de mitocôndrias mais saudáveis.

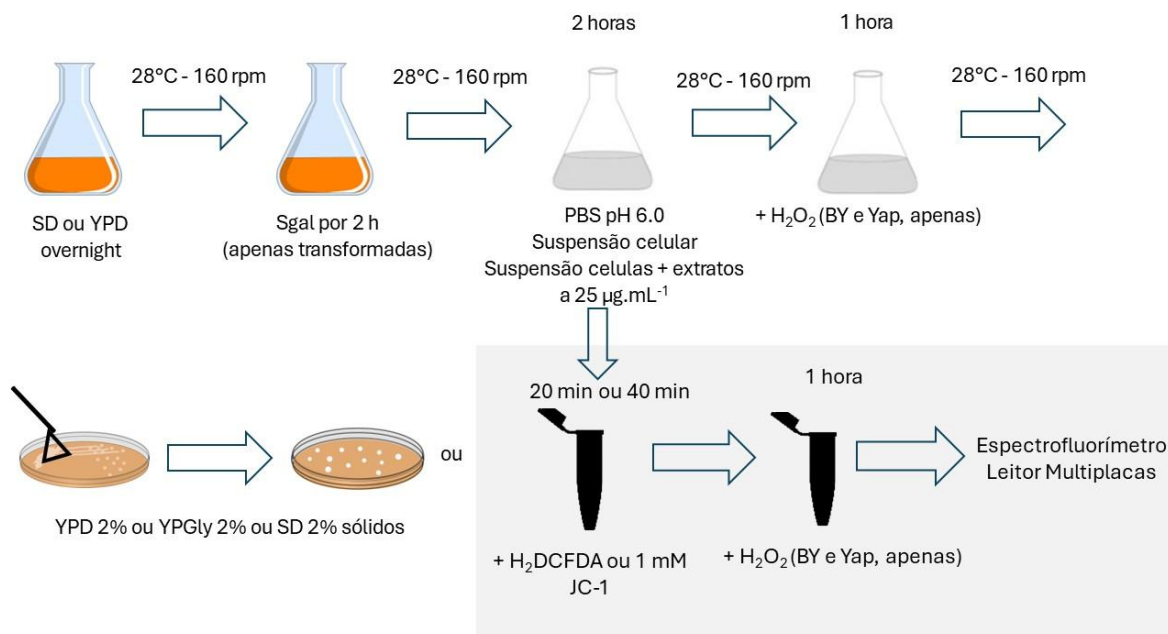


Figura 22. Desenho experimental dos ensaios de toxicidade, potencial antioxidante, oxidação intracelular e integridade mitocondrial com *S. cerevisiae*.

3.3.8. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD) de no mínimo três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. Dependendo do desenho experimental, foram aplicadas análises de one-way ANOVA ou two-way ANOVA, seguidas pelo pós-teste de Tuckey para múltiplas comparações. Considerou-se diferença estatisticamente significativa para * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), e **** ($p < 0,0001$).

3.4. PARTE II – CÉLULAS H4

3.4.1. Cultura celular e transfecção

Células de neuroglioma humano H4 foram mantidas em meio OPTIMEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies – Gibco, Carlsbad, CA, USA),

suplementado com 10% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum (FBS) Gold, PAA, Cölbe, Germany) e 1% de penicilina-estreptomicina (PAN, Aidenbach, Germany) em incubadora a 37°C, sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

As células foram cultivadas em placas de 12 poços (Costar, Corning, New York, USA), na densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço, em 1,0 mL de meio OPTIMEM por poço. Após 24 horas de cultivo, o meio foi substituído por 900 µL de meio OPTIMEM fresco, iniciando o processo de transfecção.

A solução de transfecção (Mastermix) foi preparada na proporção 1:3 (w/v) (DNA:FuGENE), adicionando-se 100 µL de meio OPTIMEM sem suplementação por poço e o reagente de transfecção FuGENE® 6 (Promega, Madison, USA). Após 5 minutos de incubação, adicionou-se DNA plasmidial (pcDNA3.1) contendo os genes para aSyn e sinfilina-1, em proporção 1:1 (w/w). A mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, e em seguida 100 µL da solução Mastermix foram adicionados a cada poço, totalizando 1,0 mL por poço.

As células foram mantidas em incubação a 37°C por 48 horas. A fim de padronizar com os experimentos realizados em levedura (ativação da proteína agregante seguido de tratamento com os extratos), as células foram tratadas 24 horas após a transfecção, com os extratos de *C. sativa*, por mais 24 h, em duas concentrações finais: 1,0 ou 10 µg.mL⁻¹. O desenho experimental foi esquematizado na Figura 23.

3.4.2. Citotoxicidade dos extratos de *C. sativa*

Após 48 horas da transfecção e 24 horas de tratamento com os extratos de *C. sativa*, as suspensões celulares foram coletadas de cada poço e transferidas para microtubos correspondentes. Os poços da placa foram lavados com 1,0 mL de PBS (pH 7,4), e em seguida adicionou-se 200 µL de solução de tripsina em cada poço, com incubação a 37°C por 5 minutos, para promover o desprendimento das células aderidas. Após a digestão, 300 µL de meio OPTIMEM fresco foram adicionados, e as suspensões resultantes foram homogeneizadas e transferidas para os tubos previamente preparados.

As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por aspiração, e o pellet foi ressuspenso em 1,0 mL de PBS contendo 2% de FCS (soro de bezerro fetal). A partir desta etapa, as amostras foram mantidas em banho de gelo para preservação celular.

Como controle positivo para morte celular, amostras foram aquecidas em placa térmica com agitação a 95°C durante 15 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 2,0 µL de iodeto de propídio (*Propidium Iodide* - PI) para cada 1,0 mL de suspensão celular, e as amostras foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo Guava® (Luminex Technologies), utilizando o software GuavaSoft™ v2.6. Foram analisados 5.000 eventos.

3.4.3. Imunocitoquímica

Após 48 horas da transfecção e 24 horas após os tratamentos com os extratos de *C. sativa*, as células H4 cultivadas em placas de 12 poços contendo 'coverslips' estéreis foram lavadas com PBS (pH 7,4) e fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS, em intervalos de 5 minutos, e posteriormente permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte do agente permeabilizante, procedeu-se o bloqueio de ligações inespecíficas com albumina de soro bovino (BSA) 5%, adicionando-se 0,5 mL por poço e incubando por 1 hora na placa de agitação, protegido da luz.

Em seguida, adicionaram-se 300 µL de solução contendo o anticorpo primário Purified mouse anti- α -synuclein (clone 42, BD610787, BD Biosciences), diluído 1:1000 em PBS, e as placas foram seladas com parafilme e incubadas a 4°C 'overnight'.

No dia seguinte após o descarte do anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes com PBS (5 minutos cada) e adicionaram-se 300 µL de solução contendo o anticorpo secundário Donkey Anti-Mouse Alexa Fluor 488 (diluição 1:1000) para incubação por 1 h à temperatura ambiente, em placa de agitação e na ausência de luz. Após o descarte do anticorpo secundário, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS, em intervalos de 5 min. Para coloração

nuclear, adicionou-se solução de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich, D8417) (1:5000 Dulbecco's PBS) por 10 min, seguida de três lavagens em PBS. As 'coverslips' foram então cuidadosamente removidas com pinça estéril, lavadas por imersão em água bidestilada e montadas em lâminas contendo uma gota de reagente de montagem Fluorescent-G (Invitrogen®, sem DAPI).

Após a secagem das lâminas, as imagens foram adquiridas em um Microscópio de Epifluorescência Zeiss Axio Observer (Carl Zeiss AG, Jena, Alemanha) equipado com lente objetiva 100x (imersão em óleo). Para cada condição experimental foram registradas 150 imagens com parâmetros de exposição pré-definidos e idênticos entre as amostras.

A análise das inclusões de aSyn foi realizada no software Fiji (ImageJ, open-source). As imagens foram convertidas para o formato binário ("*binary*"), aplicando-se um limiar ("*threshold*") para distinguir as inclusões do fundo ("*background*"). A quantificação do número de inclusões foi obtida utilizando o plugin '*Analyze particles*' com parâmetros constantes para todas as amostras.

3.4.4. Quantificação das inclusões aSyn

As células H4 transfectadas foram analisadas por microscopia de epifluorescência e classificadas de acordo com o padrão de inclusões intracelulares de aSyn. As células foram agrupadas em quatro categorias, conforme o padrão morfológico observado:

- 0 inclusões: células sem sinais de agregação;
- < 5 inclusões: células com menos de 5 inclusões;
- ≥ 5-9 inclusões: células com número intermediário de inclusões;
- > 10 inclusões: células com alta carga agregacional.

Os resultados foram expressos como percentual do número total de células transfectadas, obtido a partir de três experimentos independentes, realizados sob as mesmas condições experimentais. Para a quantificação da agregação, foram analisadas pelo menos 50 células por variante e por experimento, totalizando no

mínimo 150 células por condição. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD).

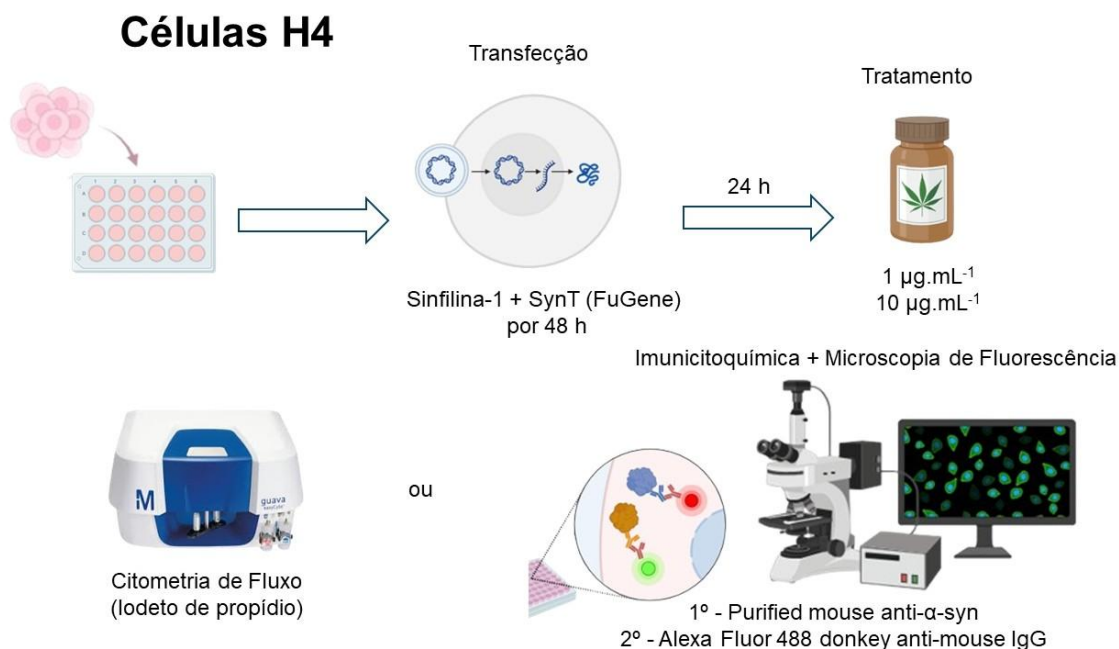


Figura 23. Desenho experimental dos ensaios de Viabilidade Celular por citometria de fluxo e agregação proteica por imunocitoquímica e microscopia de fluorescência com H4.

3.4.5. Análise estatística

A análise estatística foi conduzida no software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foram aplicados testes de one-way ANOVA ou two-way ANOVA, conforme o delineamento experimental, seguidos do pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas. Considerou-se diferença estatisticamente significativa para * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), e **** ($p < 0,0001$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A espécie *C. sativa* tem recebido cada vez mais atenção em pesquisas que envolvem perspectivas de tratamentos terapêuticos relacionados à progressão das doenças neurodegenerativas, condições neurológicas e dores crônicas; particularmente devido às suas propriedades analgésicas e seus múltiplos efeitos farmacológicos, como atividades antioxidantes e neuroprotetoras (Erustes et al., 2025; Noskova et al., 2022; Bennici et al., 2021). Apesar destas aplicações terapêuticas promissoras, pesquisas relacionadas aos efeitos do material bruto da planta, como extratos e óleos, permanecem limitadas (Legare et al., 2022). A fim de melhorar a compreensão sobre os efeitos biológicos desta planta, especialmente relacionados ao seu potencial antioxidante e sua atividade neuroprotetora, foram utilizados, neste estudo, quatro extratos de *C. sativa* com diferentes perfis de canabinoides majoritários.

4.1. Perfil químico dos extratos de *C. sativa*

Para determinar o perfil químico dos extratos de *C. sativa* neste trabalho, empregou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD). Essa abordagem combina a separação dos compostos da amostra via fases móvel e estacionária, permitindo que os distintos componentes sejam eluídos em diferentes tempos conforme suas interações químicas, com a detecção simultânea da absorvância em múltiplos comprimentos de onda (faixa de 190 a 800 nm) por meio de um detector de diodos. Estudos recentes ressaltam que métodos que utilizam este sistema de análise são amplamente utilizados e validados para análise de fitocanabinoides, sendo adequados tanto para suas formas ácidas quanto neutras sem a necessidade de derivatização dos compostos (Stefkov et al., 2022; Herrera et al., 2024).

As amostras foram injetadas em um sistema cromatográfico equipado com coluna reversa (partículas C18) a temperatura controlada, e conectada a arranjo de diodos para detecção. Conforme o eluente atravessa a coluna, os metabólitos interagem diferentemente com a fase estacionária, resultando em sucessivos

tempos de retenção distintos. O eluente então atravessa a célula de detecção, na qual os fotodiodos medem a absorção de luz em vários comprimentos de onda simultaneamente, possibilitando um registro espectral de cada pico cromatográfico (Herrera et al., 2024).

Uma vez que a composição química dos extratos de *C. sativa* pode variar dependendo do método de extração, um estudo recente avaliou diferentes métodos de extração para esta planta, incluindo maceração e os métodos Soxhlet, ultrassom e extração supercrítica com CO₂; e demonstrou que maceração, ultrassom e extração com CO₂ foram os melhores métodos para retenção de canabinoides ácidos devido às baixas temperaturas. Para aumentar a concentração de canabinoides neutros, é necessário adicionar energia ao sistema através de altas temperaturas ou luz UV. A fim de avaliar se o solvente teria alguma influência na composição química, o estudo também avaliou e comparou o uso dos solventes mais comuns, como metanol e etanol, e sugeriu que estes são os mais efetivos para o isolamento dos canabinoides (Rožanc et al., 2021).

Quatro extratos com diferentes perfis químicos foram obtidos seguindo o processo de extração a partir das flores de *C. sativa*. Os componentes majoritários encontrados nas análises cromatográficas em associação com os perfis de absorvância foram comparados com perfis de padrões desses canabinoides, e suas concentrações foram calculadas com base na área do pico. Os extratos exibiram variação significativa nos seus perfis químicos, como mostrado nos cromatogramas (Figura 24), e foram codificados de acordo com seu componente canabinoide majoritário (Tabela 2).

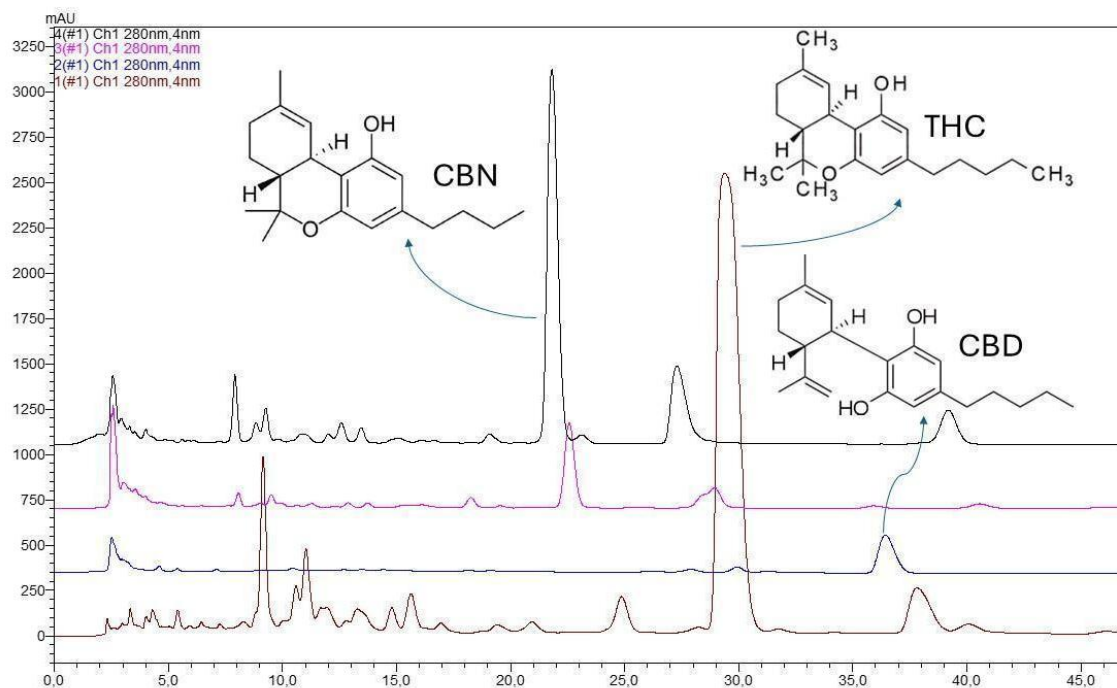


Figura 24. Cromatogramas dos extratos de *C. sativa* obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Aranjo de Diodos. Marrom: E-THC; Azul: E-CBD; Rosa: E-CBN; Preto: E-CBN+. Coluna: Fortis C18 (100 x 3 mm diâmetro interno e tamanho de partícula 2.6 μ m). Fase móvel: metanol (B) + 0,01% água ultrapura em ácido fórmico (A) em modo gradiente inicial a 80% B (0-2 min 80% B, 6 min 83% B, 8 min 85% B, 12 min 85% B e 18 min 80% B). Análise de fluxo: 1,0 mL.min⁻¹, volume de injeção de 20 μ L e faixa de absorção de 190 nm a 500 nm, com comprimento de onda selecionado de 280 nm, e tempo de análise de 47 min.

Tabela 2. Perfil de canabinoides dos diferentes extratos de *C. sativa*. Os quatro extratos analisados foram obtidos por extração hidrometanólica assistida por ultrassom e caracterizados quanto à presença dos fitocanabinoides majoritários: THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol), CBD (canabidiol) e CBN (cannabinol). A tabela apresenta a composição relativa de cada canabinoide em cada extrato.

Extratos	Canabinoides (%)		
	(THC)	(CBD)	(CBN)
E-THC	69,88	-	-
E-CBD	4,65	52,64	-
E-CBN	4,29	2,08	47,38
E-CBN+	-	-	58,64

O extrato E-THC apresentou 69,88% de THC em sua composição e os canabinoides CBD e CBN não foram detectados. O extrato E-CBD apresentou 52,64% de CBD, 4,65% de THC e CBN não foi detectado. Os extratos contendo

CBN como canabinoide majoritário diferenciaram-se significativamente no que diz respeito ao perfil químico. Enquanto E-CBN apresentou 47,38% de CBN em sua composição, além de 4,29% de THC e 2,08% de CBD; E-CBN+ apresentou maior percentual de CBN (58,64%), mas THC e CBD não foram detectados.

O estudo de Rožanc et al. (2021) destacou a influência dos métodos de extração na composição química e nas propriedades biológicas dos extratos. Os métodos de extração por ultrassom com metanol utilizados neste estudo e no trabalho de Rožanc et al. (2021) mostram diferenças determinantes no perfil químico final dos extratos. Ultrassom aplicado sobre material não descarboxilado utilizando metanol puro resultou em extratos caracterizados principalmente por THCA e CBDA, com baixos níveis de THC, CBD e ausência de CBN. Neste presente estudo utilizou-se o método de extração por ultrassom com o solvente metanol, mas visto que este método retém uma maior quantidade de canabinoides ácidos, uma etapa adicional de secagem a 110°C foi adotada no processamento da planta a fim de favorecer a produção de canabinoides neutros tais como Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), canabidiol (CBD) e cannabinol (CBN), de modo que a matriz vegetal já continha majoritariamente formas neutras antes do processo de extração. Aliado a isso, o uso de metanol:água (9:1) modificou a seletividade do sistema, favorecendo a extração de canabinoides neutros e de compostos semipolares adicionais, refletidos no aparecimento de outras bandas nos extratos E-THC e E-CBN+. Dessa forma, embora ambos os estudos empreguem ultrassom como técnica de extração, a combinação entre descarboxilação prévia e solvente hidroalcoólico explica por que os extratos aqui obtidos apresentam altas proporções de THC, CBD e CBN, enquanto Rožanc et al. obtiveram predominantemente formas ácidas.

Outro estudo demonstrou que a otimização da extração por ultrassom, variando tempo, potência e solvente, altera significativamente os rendimentos de canabinoides e terpenos, o que reforça que a simples aplicação da técnica de ultrassom não garante um perfil químico constante (Addo et al., 2022). Casiraghi et al. (2022) também mostraram que a configuração do ultrassom e a escolha do solvente modulam fortemente a seletividade por diferentes canabinoides, o que corrobora nossa observação de que a mistura metanol:água (9:1) favoreceu formas neutras após descarboxilação. Além disso, o estudo de Wang et al. (2016) sobre

cinética de descarboxilação fornece evidência clara de que temperaturas elevadas ($> 100^{\circ}\text{C}$) promovem conversão eficiente de THCA em THC e formação de CBN, explicando diretamente os elevados teores neutros obtidos em nosso método. Estudos que utilizam outros métodos, como extração com CO_2 supercrítico, apresentam perfis muito distintos com preservação de ácidos ou extração diferente de terpenos, o que reforça que a combinação de descarboxilação térmica e solvente polar pode ser determinante para a obtenção de extratos ricos em canabinoides neutros (Rovetto; Aieta, 2017; Jokić et al., 2022). Por fim, um trabalho de revisão destaca que tanto a secagem/descarboxilação quanto a escolha do método de extração e do solvente são cruciais para modular o perfil de canabinoides, justificando as diferenças observadas entre nosso trabalho e os extratos de Rožanc et al. (2021) obtidos sem tratamento térmico prévio (Lazarjani et al., 2021).

Além dos perfis de canabinoides majoritários serem diferentes, os extratos, principalmente E-THC e E-CBN+, apresentaram bandas adicionais nos cromatogramas, que não foram identificadas. Os extratos de *C. sativa* geralmente contêm outros metabólitos, incluindo terpenos, flavonoides, compostos fenólicos, esteroides, canabinoides menores e produtos de oxidação, conforme amplamente demonstrado por análises GC–MS e LC–MS de extratos brutos (Jin et al., 2020; Camargo et al., 2023; Izzo et al., 2020; Radwan et al., 2021). Esse conjunto de metabólitos tem sido identificado por abordagens metabolômicas empregando UHPLC-MS/MS e GC-MS; reforçando que extratos obtidos por solventes polares, como metanol, frequentemente associado à extração assistida por ultrassom, tendem a recuperar, além dos canabinoides neutros e ácidos, uma fração expressiva de compostos fenólicos e flavonoides; enquanto métodos mais apolares priorizam terpenos e lipídios. Assim, o perfil metabólico da planta é complexo e diversificado, e a literatura confirma que *C. sativa* contém múltiplas classes químicas além das mais populares (Pelatti et al., 2018; Izzo et al., 2020; Isidore et al., 2021).

É importante destacar que um dos tópicos mais controversos relacionados aos canabinoides diz respeito às suas habilidades de interagirem uns com os outros (efeito “*intra-entourage*”) e com outras classes de compostos (efeito “*inter-entourage*”) (André et al., 2024; Finlay et al., 2020; Christensen et al., 2023).

Revisões sistemáticas recentes reforçam que efeitos sinérgicos podem ocorrer por vias paralelas, como metabólicas, farmacocinéticas ou em alvos moleculares distintos, mas permanecem inconsistentes entre estudos. Santiago et al. (2019) mostraram que terpenos comuns (como mirceno, limoneno e pineno) não modulam a atividade de Δ^9 -THC nos receptores CB₁/CB₂, indicando que a sinergia não ocorre necessariamente a nível receptor. Desta forma, a análise de extratos brutos, e não apenas de canabinoides isolados, é cientificamente justificável para capturar possíveis interações químicas e biológicas decorrentes dessa matriz complexa.

4.2. Avaliação da toxicidade dos extratos de *C. sativa* e perfil de crescimento celular

O ensaio de capacidade metabólica baseado na resazurina permanece amplamente validado como ferramenta sensível para avaliar a manutenção da atividade metabólica celular e a toxicidade em células de *S. cerevisiae*. Nesse método, a substância resazurina (azul-violeta) é reduzida por células metabolicamente ativas à resorufina (rosa), sendo possível determinar qualitativamente a concentração inibitória da atividade metabólica. A conversão ocorre por meio de enzimas redutoras dependentes de NADH, FADH₂ e NADPH presentes nas mitocôndrias, no citosol e nas frações microssomais (Braissant et al., 2020; Růžicka et al., 2008; Sangkaew et al., 2022; Torres et al., 2018). Essa conversão pode ser detectada por colorimetria (mudança de cor) e fluorimetria (excitação ~530-570 nm, emissão ~580-590 nm), refletindo a atividade metabólica global das células vivas (Braissant et al., 2020; O'brien et al., 2000). Embora qualitativo, o ensaio fornece uma estimativa confiável dos níveis de toxicidade celular provocados pela presença de compostos estranhos para esse modelo biológico, e permite identificar faixas de concentração não citotóxicas de compostos bioativos de forma rápida e prática. Vale ressaltar que a resazurina é um composto não tóxico para esse modelo biológico (PETTIT et al., 2005). Um estudo demonstrou que a levedura *S. cerevisiae* reduz a resazurina de forma proporcional à viabilidade celular (Bitacura, 2018).

No presente estudo essa abordagem foi utilizada para verificar a toxicidade dos extratos de *C. sativa* em cepas de *S. cerevisiae* (BY4741 e $\Delta yap1$), além de determinar a faixa de concentração não-citotóxica para ensaios subsequentes. A ausência do gene *YAP1*, um regulador-chave da resposta antioxidante em leveduras, confere à cepa mutante maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (Rodrigues-Pousada et al., 2019). Assim, a comparação entre ambas as cepas permite inferir se os extratos afetam o equilíbrio redox celular. Os resultados mostraram que ambas as cepas BY4741 e sua isogênica $\Delta yap1$ apresentaram uma suspensão celular com coloração rosa no CN (meio + células) caracterizando células metabolicamente ativas, e suspensão celular com coloração azul-violeta no controle positivo para estresse (CP), induzido por H_2O_2 , indicando metabolismo celular comprometido (Figura 25). A cor rosa observada nos controles do composto e do solvente (CC e CS, respectivamente), exceto para etanol 10% na cepa $\Delta yap1$, indica a baixa interferência no metabolismo basal intracelular, incapaz de causar alterações que comprometam o potencial redox das células. Nos extratos, a concentração de etanol (veículo) variou de 2,5% ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a 0,00001% ($0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

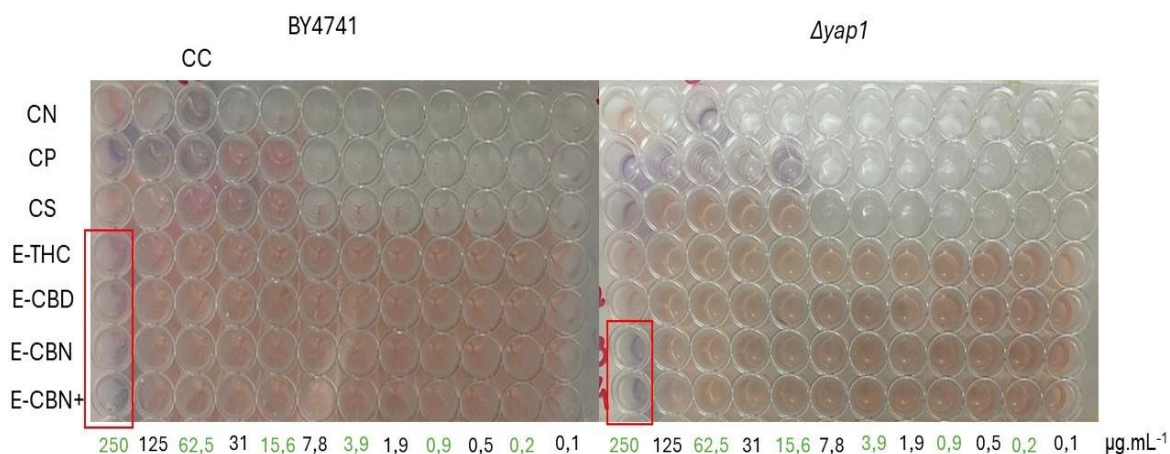


Figura 25. Avaliação da toxicidade dos extratos de *Cannabis sativa* por ensaio colorimétrico de viabilidade celular baseado na redução da resazurina em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Células das cepas BY4741 (esquerda) e $\Delta yap1$ (direita) foram cultivadas em meio YPD e distribuídas em placas de 96 poços. As células foram expostas a concentrações crescentes dos extratos ($0,1$ – $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 24 h, a 28°C . A viabilidade celular foi determinada pela adição de resazurina a $0,01\%$ (m/v), seguida de incubação por 30 min, sendo a redução do corante utilizada como indicador da atividade metabólica celular. Foram utilizados os seguintes controles experimentais: controle negativo (CN), contendo meio YPD e células; controle positivo oxidativo (CP), contendo meio YPD, células e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25 e $0,625 \text{ mM}$; controle de solvente (CS), contendo meio YPD, células e etanol nas concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25 e $0,625\%$ (v/v); e controle do corante (CC), contendo meio YPD e resazurina a $0,01\%$ (m/v), na ausência de células. As imagens representam o resultado visual do ensaio após o

período de incubação, permitindo a comparação qualitativa da viabilidade celular entre as cepas selvagem e *Δyap1* em resposta aos tratamentos.

A análise qualitativa de toxicidade utilizando o ensaio de resazurina em *S. cerevisiae* identificou que os extratos E-CBN e E-CBN+ reduziram a atividade metabólica das células apenas na concentração de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto concentrações inferiores mantiveram o padrão de coloração com tons róseos. O resultado encontrado para a concentração de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ corrobora estudos que demonstram que extratos obtidos a partir de plantas e folhas de *C. sativa*, bem como o óleo essencial, óleo extraído de suas sementes e até mesmo os canabinoides isolados, exibiram atividade antimicrobiana e citotóxica dose-dependente contra bactérias e fungos, incluindo *S. cerevisiae*, e em modelos eucarióticos simples, dependendo da composição do extrato e da concentração utilizada (Schofs et al., 2021; Appendino et al., 2008; Chen et al., 2024; Jordan et al., 2024; Kahn et al., 2014). Além disso, alcaloides, flavonoides e fenóis também são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas (Chandra et al., 2017) e estão presentes no extrato bruto de *C. sativa* (Elsohly; Slade, 2005). Por isso, é de crucial importância verificar as concentrações não-citotóxicas destas substâncias nas células da levedura *S. cerevisiae*, visto que essa toxicidade pode variar com a composição do extrato e os modelos de estudo (Wang et al., 2019).

Assim, os nossos dados encontram-se dentro da ordem de grandeza observada em modelos similares e justificam a prospecção de análises quantitativas para estes extratos, bem como a aplicação de ensaios complementares de crescimento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para a confirmação do perfil citotóxico observado. Desta forma, uma concentração intermediária de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi adotada para verificar não somente uma possível inibição da proliferação celular, mas também para verificar se haveria uma toxicidade tempo-dependente nesta concentração.

Para avaliação do perfil de crescimento celular, as cepas foram inoculadas em meio YPD 2% na presença dos extratos na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e alíquotas das suspensões celulares foram coletadas em diferentes períodos para leitura da absorvância em espectrofotômetro durante 24 h (Figura 266). Os controles, em ambos os gráficos, representam o crescimento basal das respectivas

cepas na presença apenas do meio de cultura. Para controle positivo de estresse oxidativo, utilizou-se o agente estressor H_2O_2 (2,0 mM). É possível observar que ambas as cepas tiveram seus crescimentos completamente comprometidos quando expostos ao peróxido de hidrogênio, confirmando a efetividade do agente na diminuição da taxa de crescimento celular.

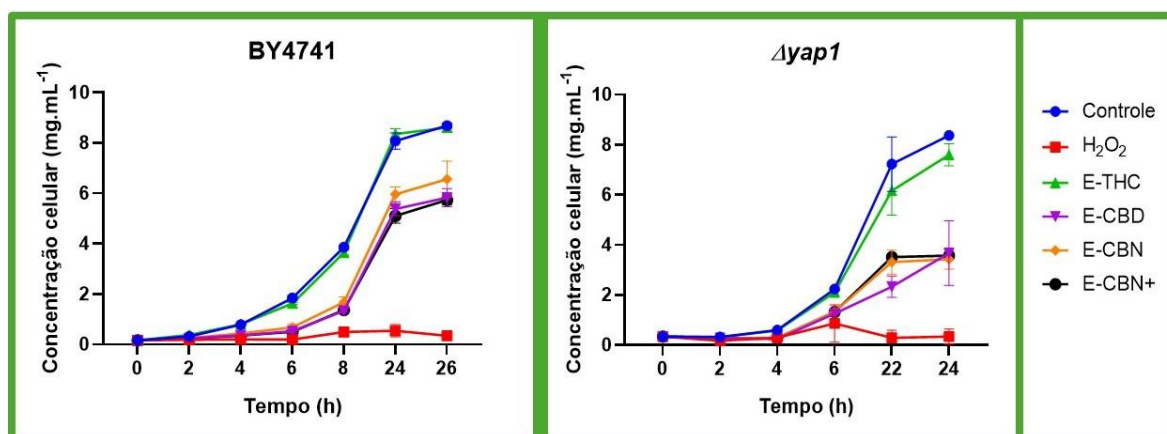


Figura 26. Curvas de crescimento de *S. cerevisiae* das cepas BY4741 e $\Delta yap1$ cultivadas em meio YPD contendo 2% (m/v) de glicose, na ausência e na presença de extratos de *C. sativa*. As células foram cultivadas previamente em meio YPD até a fase exponencial (fase de crescimento), ajustadas para uma concentração inicial de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. As culturas foram incubadas por 24 h a 28 °C, sob agitação constante de 160 rpm em shaker orbital. Os extratos foram adicionados ao meio de cultura nas concentrações de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, no tempo 0, permanecendo em contato com as células durante todo o período experimental. A cinética de crescimento celular foi monitorada por leitura de absorvância a 570 nm em espectrofotômetro, em diferentes tempos. Os valores de absorvância foram utilizados como medida indireta da concentração celular e expressos em função do tempo de incubação. As curvas apresentadas correspondem às cepas BY4741 (esquerda) e $\Delta yap1$ (direita), permitindo a comparação do crescimento celular entre a cepa selvagem e a cepa deficiente no fator de transcrição Yap1, envolvido na resposta ao estresse celular. Os dados representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Em ambas as cepas, o tratamento com E-THC não impactou o crescimento celular, apresentando valores estatisticamente iguais aos controles. Os tratamentos com os extratos E-CBD, E-CBN e E-CBN+ retardaram o crescimento celular em aproximadamente 2 horas na cepa BY4741. Enquanto o controle apresentou concentração de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ após 6 horas, as células tratadas com estes extratos atingiram esta mesma concentração 8 horas após o início do experimento. Esta diminuição na taxa de proliferação celular não necessariamente está relacionada à danos celulares oriundos da toxicidade dos extratos, pois pode refletir no tempo de adaptação metabólica aos compostos presentes nos extratos. Após 24 horas, o crescimento e a proliferação das células incubadas na presença de E-CBD, E-CBN

e E-CBN+ atingiram aproximadamente 75% do crescimento do controle na cepa BY4741. Já para a cepa $\Delta yap1$, os tratamentos não impactaram significativamente nas 6 horas iniciais do crescimento, porém 24 horas após o tempo zero a concentração celular era menor que 50% do crescimento na presença dos extratos E-CBD, E-CBN e E-CBN+ comparados ao controle. Este resultado demonstra que a ausência de Yap1p, principal fator de transcrição envolvido na resposta antioxidante em leveduras, aumenta a sensibilidade celular a compostos com potencial pró-oxidante, uma vez que na ausência dos extratos as células mutantes mostraram perfil de crescimento similar à BY4741, mas na presença dos extratos este crescimento foi negativamente afetado.

Para minimizar o impacto de toxicidade tempo-dependente dos extratos no perfil metabólico celular, a concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi adotada para os experimentos subsequentes. A toxicidade desta concentração, foi então avaliada a partir da capacidade das cepas BY4741 e $\Delta yap1$ de gerar células-filhas viáveis após a incubação com os quatro extratos. Após 72 h de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contabilizadas e apresentadas como percentuais. Os resultados não indicaram toxicidade significativa sob estas condições (Figura 27).

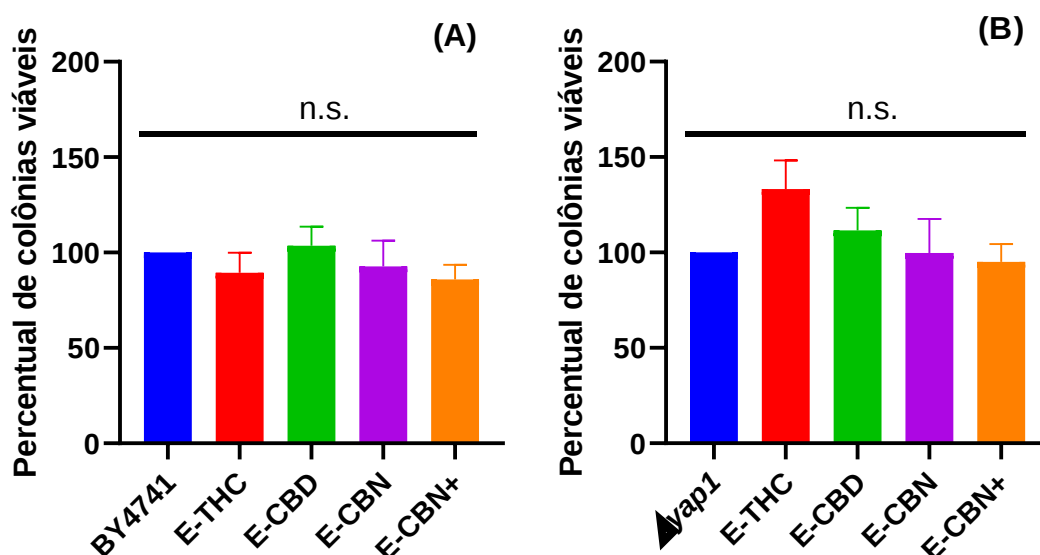


Figura 27. Avaliação da toxicidade dos extratos de *C. sativa* por ensaio de viabilidade celular baseado na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em *S. cerevisiae*. Células das cepas BY4741 (A) e $\Delta yap1$ (B) foram cultivadas em meio YPD contendo 2% (m/v) de glicose e incubadas com os extratos na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 2 h, a 28°C , 160 rpm. Após o período de exposição, alíquotas apropriadas foram seriamente diluídas em água destilada estéril e

plaqueadas em meio YPD sólido (2% m/v), seguidas de incubação por 48-72 h a 28 °C para formação das colônias. A viabilidade celular foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônia, sendo os resultados expressos como porcentagem em relação ao respectivo controle não tratado de cada cepa. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, considerando-se 0,05 como nível de significância. Diferenças estatisticamente não significativas (n.s.) foram determinadas em comparação com o respectivo controle de cada cepa.

O comportamento não-tóxico dos extratos na levedura corroborou um estudo realizado anteriormente em que folhas de *C. sativa* foram lavadas e secas a 38°C durante 4-5 dias, e o pó obtido após moagem foi embebido em quatro solventes distintos: água, etanol, metanol e acetona. Após 24 horas em evaporador rotatório, as preparações foram filtradas em papel de filtro e concentradas até a secagem sob vácuo a 40°C. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada através do método modificado de difusão em disco sobre ágar para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana para estes três últimos (Kaur et al., 2015). A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *C. sativa* também foi testada em *S. cerevisiae* e a concentração inibitória mínima para este microrganismo foi superior ao limite de detecção e, portanto, considerada, não-inibitória (Nissen et al., 2010).

A adoção de doses baixas de extratos de *C. sativa* é fundamental para explorar seus efeitos benéficos com segurança, minimizando riscos de citotoxicidade ou efeitos adversos. Estudos celulares demonstraram que extratos de cânhamo (1 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) não causam toxicidade em queratinócitos e fibroblastos, e até aumentam a proliferação em concentrações intermediárias ($\sim 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sugerindo que concentrações modestamente baixas podem promover atividade metabólica sem comprometer a viabilidade celular (Zagórska-Dziok et al., 2021). Além disso, pesquisas clínicas e farmacológicas enfatizam a abordagem 'start low, go slow' para canabinoides; ou seja, começar com doses mínimas para avaliar resposta terapêutica e segurança, especialmente com compostos como CBD e THC, cujos efeitos são muito dependentes da dose (Academia Brasileira de Canabinoides, 2025). Há também evidência de sinergia em concentrações baixas, por exemplo, sobre células de carcinoma; pois frações combinadas de CBD e CBC ou CBD e THC mostraram efeitos citotóxicos superiores ao CBD isolado,

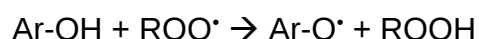
reforçando que extratos completos podem ter atividade mesmo em doses relativamente reduzidas (Blal et al., 2023).

Com a intenção de usar a menor concentração segura possível, considerando os resultados preliminares, onde concentrações abaixo de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não apresentaram citotoxicidade no ensaio de resazurina, mas a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrou impactar a proliferação celular na curva de crescimento, somados à não citotoxicidade observada a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no ensaio de viabilidade celular; a concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi adotada para os experimentos subsequentes neste trabalho.

4.3. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *C. sativa*

Canabinoides exibem elevada capacidade antioxidante atribuída à presença de grupamentos fenólicos e grupos hidroxila em suas estruturas químicas, que conferem capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio e neutralizar as ROS (Borges et al., 2013; Jîtcă et al., 2023; Stone et al., 2020) por meio de mecanismos clássicos de transferência de hidrogênio (HAT, do inglês *Hydrogen Atom Transfer*) ou transferência monoelétrica (SET, do inglês *Single Electron Transfer*), estabilizando o radical formado no composto antioxidante. A estabilização ocorre pela ressonância do radical fenóxi, distribuindo a densidade eletrônica ao longo do anel aromático e de substituintes conjugados presentes na estrutura de diversos fitocannabinoides, como THC, CBD e CBG. Essa deslocalização reduz a reatividade da espécie radical e impede a propagação das reações em cadeia de oxidação lipídica (Addo et al., 2023; Borges et al., 2013).

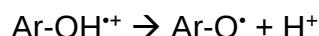
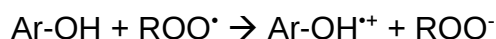
Na HAT, o canabinoide contendo um grupo fenólico ($-\text{OH}$) reage por meio de reações radicalares com ROS, como $\cdot\text{OH}$ ou $\text{ROO}\cdot$. Nesse caso o radical recebe um átomo de hidrogênio ($\text{H}\cdot$) da hidroxila fenólica:



O radical formado $\text{Ar-O}\cdot$ (radical fenóxi) é estabilizado por ressonância, distribuindo a densidade de spin pelo anel aromático, reduzindo significativamente sua reatividade. Como a espécie formada é mais estável, a cadeia de oxidação não

é propagada, contribuindo para a interrupção do processo oxidativo de lipídios, proteínas ou DNA (Addo et al., 2023).

Na SET, o canabinoide doa um elétron para o radical e o cátion-radical (Ar-OH^{•+}) rapidamente perde um próton (H⁺):



Forma-se o radical fenóxi ressonante e estável, que não propaga reações oxidativas.

Estudos recentes indicam que compostos como Δ^9 -THC e CBD apresentam atividades antioxidantes comparáveis à de vitaminas clássicas como C, A e E (Borges et al., 2013; Jîtcă et al., 2023; Hacke et al., 2019). Dawidowicz e colaboradores demonstraram que outros fitocanabinoides, como CBN, CBG, CBGA e Δ^9 -THCA exibem capacidade significativa de eliminar radicais livres e reduzir íons metálicos em ensaios espectrofotométricos (DPPH, ABTS, ORAC e FRAP) (Dawidowicz et al., 2021). Além dos canabinoides, o material extraído das folhas de *C. sativa* contém flavonoides e terpenoides, classes de metabólitos vegetais reconhecidas por suas propriedades antioxidantes (Atalay et al., 2019; Jin et al., 2020). Há evidências de que a combinação (ou sinergia) entre canabinoides, flavonoides e terpenoides pode amplificar seus efeitos antioxidantes em ambientes celulares, potencializando a regulação do estresse oxidativo intracelular (Dawidowicz et al., 2021; Jin et al., 2020).

Para avaliar o perfil de ação antioxidante dos extratos usados neste trabalho, as cepas BY4741 e $\Delta yap1$ foram submetidas ao agente estressor H₂O₂ (2,0 mM). Após o período de incubação com os quatro extratos (25 µg.mL⁻¹), as células foram expostas a peróxido de hidrogênio durante 1 h, plaqueadas e incubadas. As unidades formadoras de colônias foram contabilizadas e apresentadas na forma de percentual, adotando-se células não expostas a nenhum agente externo como 100% de viabilidade celular (controle negativo para estresse) (Figura 28).

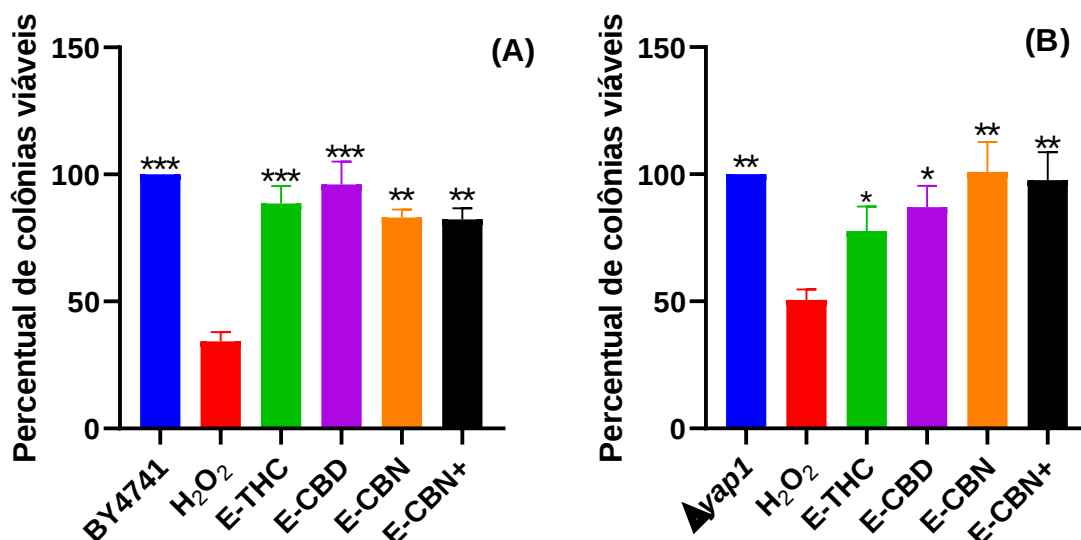


Figura 28. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *C. sativa* por ensaio de viabilidade celular baseado na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em *S. cerevisiae* após indução de estresse oxidativo. Células das cepas BY4741 (A) e $\Delta yap1$ (B) foram cultivadas em meio YPD contendo 2% (m/v) de glicose. O estresse oxidativo foi induzido pela exposição das células ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração de 2,0 mM por 1 h, a 28 °C, sob agitação a 160 rpm. Células mantidas apenas em meio YPD foram utilizadas como controle negativo para estresse, enquanto células expostas exclusivamente ao H_2O_2 constituíram o controle positivo para estresse. Após a indução do estresse oxidativo, as células foram incubadas com os extratos na concentração de 25 $\mu g \cdot mL^{-1}$ por 2 h, a 28 °C, sob agitação a 160 rpm. Em seguida, alíquotas apropriadas foram seriamente diluídas em água destilada estéril e plaqueadas em meio YPD sólido (2% m/v), seguidas de incubação por 48–72 h a 28 °C para formação das colônias. A viabilidade celular foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônia, sendo os resultados expressos como porcentagem em relação ao controle positivo para estresse de cada cepa. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), em comparação com o controle positivo para estresse de cada cepa.

Mesmo em um quadro de estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 na cepa BY4741 (Figura 28A), as células pré-tratadas com os extratos de *Cannabis sativa* a 25 $\mu g \cdot mL^{-1}$ preservaram sua capacidade de geração de células-filhas. O controle negativo para estresse (BY4741 no gráfico) foi utilizado como referência percentual para unidades de colônia. O controle positivo para estresse apresentou menos de 40% de colônias viáveis comparado ao valor de referência, enquanto os tratamentos com E-CBN e E-CBN+ apresentaram mais de 80%, e E-THC e E-CBD mais de 90%. Na cepa $\Delta yap1$ (Figura 28B), o agente estressor afetou o número de colônias em torno de 50% comparado ao valor de referência. Os tratamentos com E-CBN e E-CBN+ promoveram valores de unidades formadoras de colônias iguais

ao controle sem estresse, enquanto E-CBD atingiu mais de 85% de viabilidade. E-THC, por sua vez, apresentou percentual 25% maior após o estresse oxidativo.

Os resultados obtidos demonstram que os extratos de *C. sativa* apresentaram efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em *S. cerevisiae*. A viabilidade celular observada após os tratamentos indica que os compostos presentes nesses extratos possuem potencial para neutralizar ROS e/ou reforçar mecanismos endógenos de defesa antioxidante. O comportamento distinto entre as cepas BY4741 e $\Delta yap1$ reforça a importância do fator de transcrição Yap1p, principal regulador do sistema antioxidante endógeno da levedura. Esse fator controla a expressão de genes responsáveis pela detoxificação de peróxidos e manutenção do equilíbrio redox, incluindo *TRX1*, *TRX2* e *TRR1* (componentes do sistema tioredoxina), *GSH1*, *GSH2* e *GPX2* (componentes do sistema glutatona) e *SOD2* (enzima superóxido dismutase) (Rodrigues-Pousada et al., 2019).

Na cepa selvagem BY4741, a integridade funcional de Yap1p garante resposta adaptativa eficiente ao estresse oxidativo, permitindo que os extratos potencializem uma rede antioxidante já ativa. Já na cepa $\Delta yap1$, a ausência desse fator compromete severamente a capacidade celular de lidar com espécies reativas, resultando em acúmulo de peróxidos e oxidação de proteínas e lipídios (Rodrigues-Pousada et al., 2019). Contudo, mesmo nesse contexto desfavorável, todos os extratos restauraram a viabilidade celular, especialmente E-CBN e E-CBN+, que atingiram níveis próximos ao controle negativo (~100%), indicando que seus constituintes atuam de forma independente da via de transcrição mediada por Yap1p.

A fim de avaliar o ambiente redox intracelular, as células foram submetidas novamente ao agente estressor peróxido de hidrogênio e a oxidação intracelular foi estimada através da utilização do composto H₂DCFDA (Figura 29), que ultrapassa a membrana plasmática e, no interior das células, sofre desacetilação por esterases. No ambiente intracelular, H₂DCF inicialmente não fluorescente é convertida em DCF (diclorofluoresceína) fluorescente, e sua concentração é quantificada fluorimetricamente em comprimento de onda específico (Jakubowski; Bartosz, 1997).

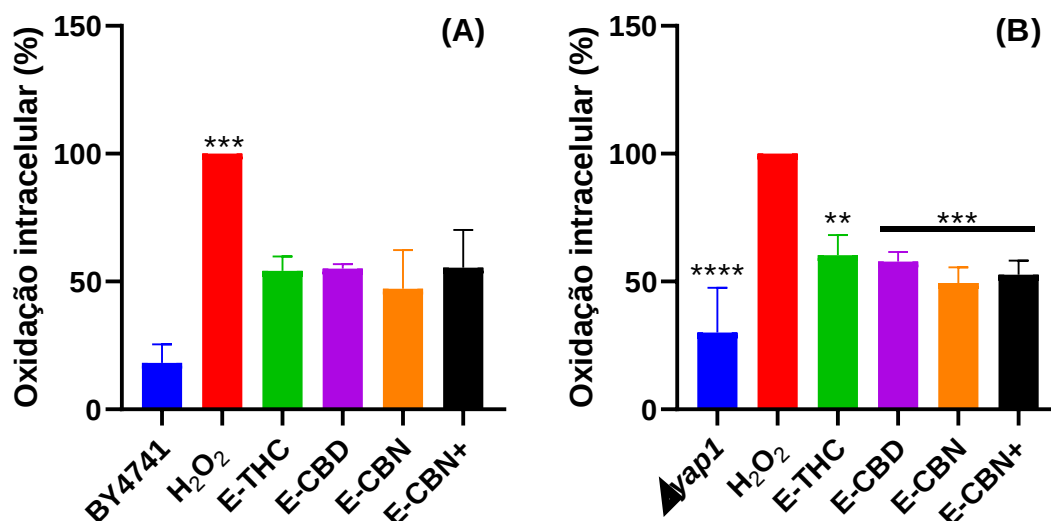


Figura 29. Quantificação dos níveis de oxidação intracelular em *S. cerevisiae* por ensaio fluorimétrico baseado em diclorofluoresceína (DCF) após indução de estresse oxidativo. Células das cepas BY4741 (A) e $\Delta yap1$ (B) foram cultivadas em meio YPD contendo 2% (m/v) de glicose. O estresse oxidativo foi induzido pela exposição das células ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 2,0 mM por 1 h, a 28 °C, sob agitação a 160 rpm, sendo esse grupo considerado o controle positivo para oxidação intracelular. Para avaliação do efeito dos extratos, as células foram inicialmente incubadas com os extratos de *C. sativa* na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 2 h, a 28 °C, sob agitação a 160 rpm, e posteriormente expostas ao H₂O₂ (2,0 mM) nas mesmas condições experimentais. Após os tratamentos, as células foram incubadas com o corante diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) a 1 mM por 20 min, a 28 °C, no escuro. A fluorescência resultante, proporcional aos níveis de espécies reativas intracelulares, foi quantificada em leitor de microplacas, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488/520 nm. Os resultados foram expressos como percentual de fluorescência em relação ao respectivo controle de cada cepa. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), em comparação com o controle de cada cepa.

Na figura 29 observa-se que as células estressadas com H₂O₂ (2,0 mM), em ambas as cepas, apresentaram alto percentual de fluorescência, que foi usado como referência (100%) de nível de fluorescência. O controle de BY4741 apresentou cerca de 18% da fluorescência referência e o controle de $\Delta yap1$ cerca de 30%. Esse percentual aumentado desta cepa em relação à BY4741 pode ser justificado pela sua deficiência no sistema de defesa antioxidante. Para ambas as cepas, todos os extratos reduziram estatisticamente o estresse oxidativo, com redução na faixa de 45 a 55%, mostrando a capacidade dos extratos em proteger parcialmente a homeostase redox.

Alguns estudos (

Tabela 3) já mostraram anteriormente que os compostos extraídos da *C. sativa* exibem atividades antioxidantes relevantes, e que esta atividade pode ser atribuída a múltiplos mecanismos, como: **(i) ação direta como captadores de radicais:** os grupos fenólicos e hidroxilas dos fitocanabinoides são capazes de doar elétrons e neutralizar radicais livres; **(ii) redução com íons metálicos:** atividade quelante; **(iii) proteção mitocondrial e reforço de defesas enzimáticas:** o aumento ou estabilização de enzimas antioxidantes resulta em menor produção de ROS e preserva a função bioenergética; e **(iv) efeitos sinérgicos:** entre os fitocanabinoides e entre os canabinoides e terpenos ou flavonoides presentes nos extratos, potencializando a atividade antioxidante.

A redução significativa da fluorescência em ambas as cepas sugere que os extratos não apenas neutralizaram diretamente ROS formadas a partir do H_2O_2 , mas também preservaram o metabolismo mitocondrial. Estudos anteriores já indicaram que fitocanabinoides podem modular a função mitocondrial, reduzindo o vazamento de elétrons da cadeia respiratória e, conseqüentemente, a formação de superóxidos (Atalay et al., 2019; Ruiz-Valdepeñas et al., 2010).

Tabela 3. Vias de ação dos canabinoides em diferentes modelos experimentais.

Compostos ou extratos	Modelo experimental e ensaio	Mecanismo principal de ação antioxidante	Principais resultados	Referências
CBD	Neurônios e astróglia de ratos DPPH, ABTS e FRAP	Doação de elétrons e prótons; ativação da via Nrf2; atividade de SOD e catalase	Redução dos níveis de ROS e aumento de atividade enzimática	Atalay et al., 2019
THC	DPPH e ABTS	Captura direta de radicais peróxila e hidroxila; atividade redutora	Capacidade antioxidante similar à do α -tocoferol	Dawidowicz et al., 2021
CBN	DPPH e FRAP	Doação de elétrons; redução de íons metálicos	Poder antioxidante intermediário entre CBD e THC	Dawidowicz et al., 2021
CBG	Astróglia de rato e córtex isolado; DCFH-DA;	Redução de ROS; regulação de enzimas (SOD, CAT, GPx)	Diminuição do estresse oxidativo e aumento da sobrevivência	Di Giacomo et al., 2020
CBGA	DPPH, ABTS, ORAC	'Scavenging' de radicais; redução de metais	Sequestro de radicais e potencial prevenção de oxidação lipídica	Dawidowicz et al., 2021
THCA	DPPH e FRAP	Doação de elétrons e hidrogênio	Ação antioxidante comparável à quercetina e vitamina C	Dawidowicz et al., 2021

Extratos de <i>C. sativa</i> (folhas e flores)	DPPH, ABTS, ORAC e <i>in vivo</i> (ratos)	Sinergismo entre canabinoides, flavonoides e terpenos; enzimas antioxidantes hepáticas	Efeito neuroprotetor e redução de MDA; capacidade 'scavenging' de radicais	Cásedas et al., 2022
Mix de canabinoides (CBD + CBG)	Modelos neuronais e gliais de ratos	Modulação de vias antioxidantes e anti-inflamatórias	Efeito sinérgico antioxidante e neuroprotetor superior aos compostos isolados	Vacek et al., 2021

Esses achados reforçam que o efeito antioxidante dos extratos de *C. sativa* é multifatorial, envolvendo ação direta de canabinoides sobre espécies reativas, modulação de vias antioxidantes endógenas (dependentes e independentes de Yap1p) e sinergia entre diferentes classes de metabólitos, incluindo flavonoides e terpenoides, que podem amplificar a capacidade redutora global dos extratos (Russo, 2019). Além disso, a correlação positiva entre os extratos ricos em CBN e CBD e a elevada viabilidade celular sugere que o perfil químico do extrato influencia diretamente sua eficácia antioxidante. Estudos químicos prévios indicam que CBN, derivado oxidativo do Δ^9 -THC, possui potencial redutor mais pronunciado e maior estabilidade frente à oxidação (Dawidowicz et al., 2021); o que é coerente com seu desempenho superior observado neste estudo. Em conjunto, estes resultados sustentam a hipótese de que os extratos de *C. sativa* atuam como agentes protetores do equilíbrio redox intracelular, promovendo redução de danos oxidativos e preservação da integridade celular, mesmo na ausência de mecanismos genéticos clássicos de defesa antioxidante.

4.4. Avaliação dos efeitos biológicos dos extratos de *C. sativa* no ambiente redox intracelular de cepas de levedura expressando aSyn e A β 42

O potencial antioxidante da *C. sativa* é amplamente documentado na literatura, e os resultados obtidos neste trabalho corroboram tais evidências. No entanto, os efeitos biológicos dos extratos brutos dessa planta perante os danos

induzidos por proteínas agregantes relacionadas a doenças neurodegenerativas ainda permanecem pouco explorados.

Entre as proteínas envolvidas em processos neurodegenerativos destacam-se a A β e a aSyn, ambas associadas à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e morte celular (Meng et al., 2025; Shen; Dettmer, 2024; Geibl et al., 2024). O peptídeo A β , derivado da clivagem anormal da APP, tende a se autoagregar em estruturas oligoméricas e fibrilares, promovendo disfunção sináptica, aumento da produção de ROS e ativação de vias apoptóticas (Meng et al., 2024; Azargoonjahromi, 2024; Araki, 2023; Hardy; Selkoe, 2002; Butterfield; Boyd-Kimball, 2020). Esses agregados afetam diretamente o metabolismo mitocondrial, levando à redução da atividade de complexos da cadeia respiratória e liberação de citocromo c, eventos também observados em modelos de *Saccharomyces cerevisiae* expressando A β (Treusch et al., 2011; Chen et al., 2017).

A expressão da aSyn mutante reduz a atividade proteassômica e aumenta os níveis de ROS. Com a redução do potencial de membrana, liberação do citocromo c e atividade aumentada das caspases 9 e 3, envolvidas no processo de morte celular, há indicativo de morte celular induzida pela aSyn mutante (Ganjam et al., 2019; Perfeito; Rego, 2012). A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo são aspectos significantes da toxicidade da aSyn em leveduras expressando níveis proeminentes desta proteína (Sampaio-Marques et al., 2019; Su et al., 2010). A fim de explorar os efeitos biológicos observados nos experimentos realizados com as cepas BY4741 e $\Delta yap1$ tratadas com os extratos de *C. sativa*, como o promissor potencial antioxidante e a manutenção da viabilidade celular, em cepas associadas às doenças neurodegenerativas, utilizou-se neste trabalho duas cepas de BY4741 transformadas contendo os genes codificadores da proteína aSyn (Figura 30) e do peptídeo β -amiloide (A β), além do plasmídeo vazio usado como controle.



alfa-syn

Figura 30. Validação da transformação com o plasmídeo p426GAL-aSyn-GFP por microscopia de fluorescência.

Com o intuito de avaliar se a presença desses genes e a geração dessas proteínas relacionadas à formação de agregados proteicos auxiliam no desbalanceamento do ambiente redox no interior da célula, foi quantificada a oxidação intracelular das cepas expressando A β 42 e aSyn utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente (Figura 31). Neste caso, entretanto, não foi adicionado um agente estressor exógeno (H₂O₂), permitindo observar apenas o impacto endógeno desta expressão proteica.

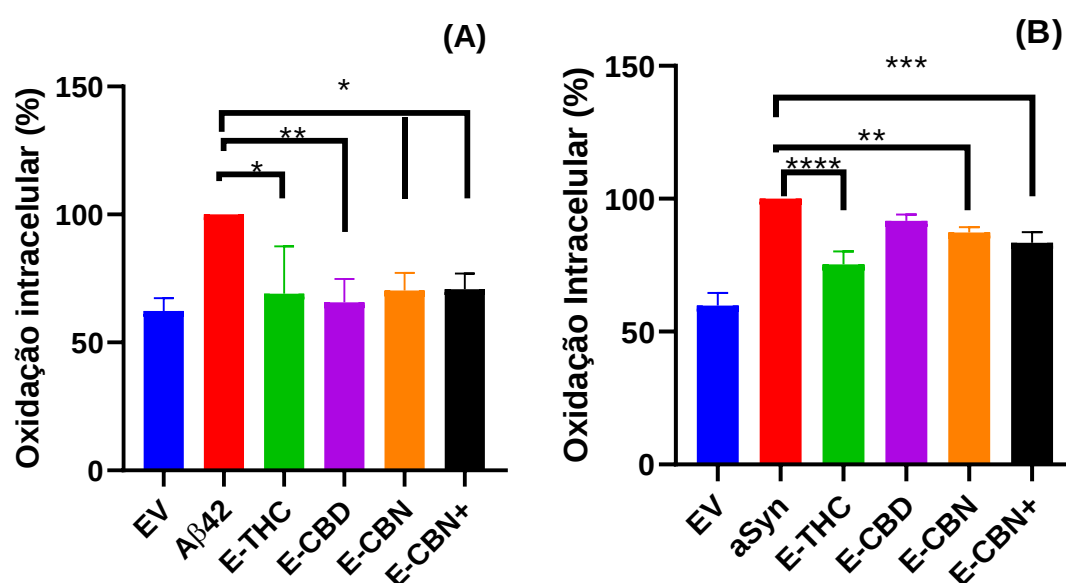


Figura 31. Quantificação dos níveis de oxidação intracelular em *S. cerevisiae* transformada com plasmídeos de expressão heteróloga, avaliada por ensaio fluorimétrico baseado em diclorofluoresceína (DCF). Células da cepa BY4741 foram transformadas com o plasmídeo vazio p426GAL (EV) ou com plasmídeos contendo sequências codificantes para o peptídeo β -amiloide 1–42 (pAG426GAL:ssA β 1-42) (A) ou para a proteína aSyn fusionada à GFP (p426GAL-aSyn-GFP) (B). A expressão das proteínas heterólogas foi induzida por galactose, 28 °C/160 rpm, por 2 h. Para avaliação do efeito dos extratos, as células expressando A β 42 ou aSyn foram incubadas com os extratos de *C. sativa* na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 2 h, a 28 °C/160 rpm. Após os tratamentos, os níveis de oxidação intracelular foram determinados por incubação com o corante diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) a 1 mM por 20 min, no escuro, sendo a fluorescência quantificada em leitor de microplacas, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 488/520 nm. Os resultados foram expressos como percentual de fluorescência em relação aos respectivos controles não tratados (A β 42 ou aSyn) em cada condição experimental. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), em comparação com ambos os controles (A β 42 e aSyn) em cada condição.

Como esperado, as expressões do peptídeo A β 42 e da proteína aSyn causaram um aumento significativo nos níveis de oxidação no ambiente intracelular, confirmando que ambos os agregados comprometem a homeostase redox. Para a cepa expressando A β 42, todos os extratos reverteram significativamente o quadro oxidativo causado pela presença do peptídeo β -amiloide. Interessantemente, apenas E-CBD (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) falhou em reduzir significativamente o estresse oxidativo induzido pela proteína aSyn. Por outro lado, nesta cepa o extrato E-THC reduziu a oxidação intracelular em aproximadamente 25%, enquanto E-CBN e E-CBN+ reduziram em aproximadamente 13% e 16,5%, respectivamente. O efeito do CBD é descrito como dose-dependente (Muhammad et al., 2022; Jîtcă et al., 2023; Winklmayr et al., 2019), e em concentrações moderadas pode não ser capaz de exercer nível suficiente de atividade para aliviar significativamente o estresse oxidativo induzido pela presença de aSyn (Tassaneesuwat et al., 2025; Campos et al., 2016; Bhunia et al., 2022). Estudos prévios indicam que o CBD pode atuar tanto como antioxidante quanto como modulador de proteínas redox-sensíveis, dependendo da dose e do tipo celular (Atalay et al., 2019; Campos et al., 2016).

A mitocôndria é um dos principais alvos celulares afetados tanto pela toxicidade proteica quanto pela ação de compostos lipofílicos como os canabinoides. Evidências mostram que fitocanabinoides como Δ^9 -THC, CBD e CBN podem interagir com membranas mitocondriais devido à sua alta hidrofobicidade, modulando componentes da cadeia transportadora de elétrons, o potencial de membrana e a produção de ROS (Fišar et al., 2014; Maccarrone et al., 2011). Esses efeitos apresentam um comportamento bifásico: em concentrações moderadas, os canabinoides podem reduzir o estresse oxidativo e melhorar a homeostase redox; enquanto concentrações mais elevadas são capazes de induzir desacoplamento mitocondrial, redução da fosforilação oxidativa e aumento de permeabilidade de membranas (Bénard et al., 2012; Ryan et al., 2009).

4.5. Avaliação dos efeitos biológicos dos extratos de *C. sativa* na integridade da membrana mitocondrial e seu impacto na viabilidade celular de cepas de levedura expressando aSyn

A modulação da bioenergética mitocondrial tem emergido como uma estratégia promissora na busca por terapias neuroprotetoras baseadas em substâncias naturais. Diversos metabólitos secundários de origem vegetal demonstram capacidade de restaurar o equilíbrio redox e preservar a função mitocondrial ao atuarem sobre múltiplos alvos, incluindo a biogênese mitocondrial, a dinâmica fissão-fusão e o controle do potencial de membrana. Compostos fenólicos tais como canabinoides, flavonoides e ácidos fenólicos, bem como terpenoides e alcaloides exibem propriedades antioxidantes diretas, neutralizando espécies reativas; e indiretas, por indução de vias de sinalização citoprotetoras, como Nrf2/ARE (fator de transcrição que regula a resposta celular ao estresse oxidativo, ativando elementos de resposta antioxidante – ARE) e PGC-1 α (biogênese mitocondrial). Em levedura, essas vias estimulam a expressão de enzimas antioxidantes endógenas (Sod2p – superóxido dismutase, Gpx1p – glutathione peroxidase) e a regulação de proteínas ligadas à biogênese mitocondrial, como Abf2p – análoga do fator de transcrição mitocondrial TFAM em mamíferos e Nrf1p – fator respiratório nuclear; contribuindo para a manutenção da homeostase energética e resistência celular ao estresse oxidativo (Plata-Peña et al., 2023; Liu et al., 2021).

Alguns estudos têm demonstrado que os canabinoides podem influenciar a atividade das mitocôndrias (Fišar et al., 2014) e o papel de diversas proteínas de membrana, através de mecanismos receptores independentes (Maccarrone et al., 2011) baseados na incorporação destes canabinoides, que são moléculas lipofílicas, à bicamada lipídica da membrana celular (Tian et al., 2011). No contexto mitocondrial, essa classe de compostos pode acumular-se em regiões mais hidrofóbicas da membrana interna, desemparelhando interações intermoleculares e interferindo na dinâmica estrutural e na função dos complexos proteicos da cadeia respiratória (Fišar et al., 2014). No entanto, o impacto desta interação no aumento de estresse oxidativo e na formação de ROS não é completamente esclarecido, especialmente em organismos inferiores como a levedura, que não expressam receptores canabinoides.

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi medido por fluorescência nas cepas de levedura expressando aSyn e A β 42 e tratadas com extratos de *C. sativa* na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Como esperado, a expressão das proteínas

agregantes reduziu significativamente o $\Delta\Psi_m$, indicando disfunção mitocondrial substancial. Na cepa expressando aSyn, os extratos não foram capazes de restaurar a integridade mitocondrial (Figura 32A), sugerindo que, embora apresentem atividade antioxidante, os compostos presentes nos extratos não impediram a perda do potencial de membrana induzida pela presença de aSyn.

É amplamente estabelecido na literatura que os agregados proteicos podem ser tóxicos para as células em geral. Quando as proteínas funcionais sofrem modificações químicas ou conformacionais, perdem suas funções originais e começam a agregar-se dentro das células, formando inclusões que perturbam os processos celulares e geralmente levam à morte celular (Chung et al., 2018; Wen et al., 2023; Huang et al., 2019). Para investigar a hipótese se os extratos poderiam neutralizar essa toxicidade, foi realizado um ensaio de viabilidade celular para avaliar o impacto dos extratos na toxicidade induzida pela agregação de aSyn em células de levedura (Figura 32B).

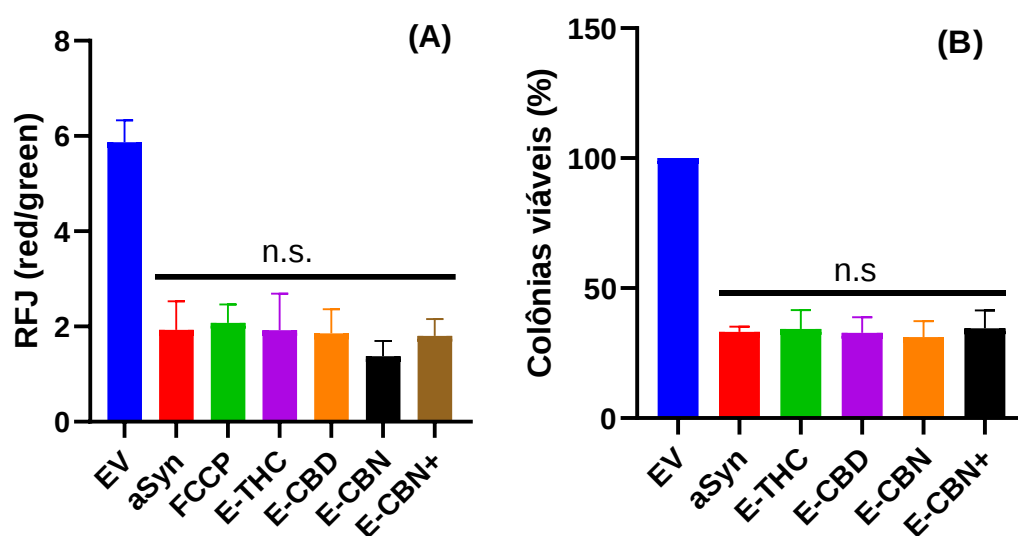


Figura 32. Efeito dos extratos de *C. sativa* sobre a toxicidade da aSyn associada à função mitocondrial em *S. cerevisiae*. (A) Avaliação da integridade mitocondrial em células expressando aSyn por meio da quantificação do potencial de membrana mitocondrial utilizando o corante JC-1. (B) Viabilidade celular determinada por ensaio de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), expressa como percentual em relação ao controle. Células da cepa BY4741 foram transformadas com o plasmídeo vazio pRS426GAL (EV) ou com o plasmídeo p426GAL-aSyn-GFP para expressão da aSyn. A expressão da proteína heteróloga foi induzida por galactose, por 2 h. Como controle positivo para despolarização mitocondrial, células expressando aSyn foram expostas ao desacoplador mitocondrial FCCP na concentração de 10 μM . Para avaliação do efeito dos extratos, células expressando aSyn foram incubadas com os extratos de *C. sativa* na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 2 h, a 28 °C/160 rpm. Para o ensaio de potencial de membrana mitocondrial, as células foram incubadas com JC-1 a 1 mM por 40 min, a 28 °C, no escuro, e a fluorescência foi quantificada em leitor de microplacas, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de

488/525 nm (monômero, verde) e 534/590 nm (agregado, vermelho). Os resultados foram expressos como razão entre as intensidades de fluorescência verde/vermelha (RFJ), refletindo alterações no potencial de membrana mitocondrial. Para o ensaio de viabilidade celular, após os tratamentos, alíquotas apropriadas foram seriamente diluídas em água destilada estéril e plaqueadas em meio YPD sólido (2% m/v), seguidas de incubação por 48-72 h a 28 °C para formação das colônias. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade em relação ao controle correspondente. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. Diferenças estatisticamente não significativas (n.s.) foram determinadas em comparação com o respectivo controle experimental.

Os resultados demonstraram que nenhum dos extratos na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de melhorar a viabilidade celular afetada pela aSyn, corroborando os dados obtidos no potencial de membrana mitocondrial com a mesma concentração dos extratos e mesma cepa, e reforçando a hipótese de que o comprometimento da função mitocondrial está diretamente associado à perda de viabilidade celular.

É de conhecimento científico que muitas respostas celulares são dose-dependentes; portanto também avaliou-se o potencial de membrana em concentrações acima de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (50, 100 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 33). As concentrações mais elevadas dos extratos não somente não apresentaram proteção da integridade mitocondrial como agravaram os danos mitocondriais, possivelmente devido a efeitos pró-oxidantes em doses elevadas, como perturbação da bicamada lipídica. Neste ensaio utilizou-se o pré-tratamento com E-THC como uma amostragem inicial deste possível impacto.

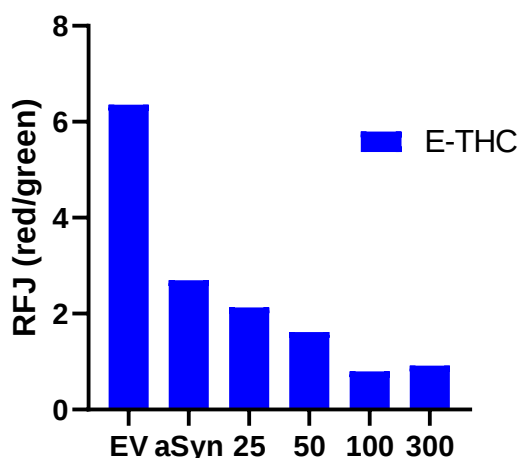
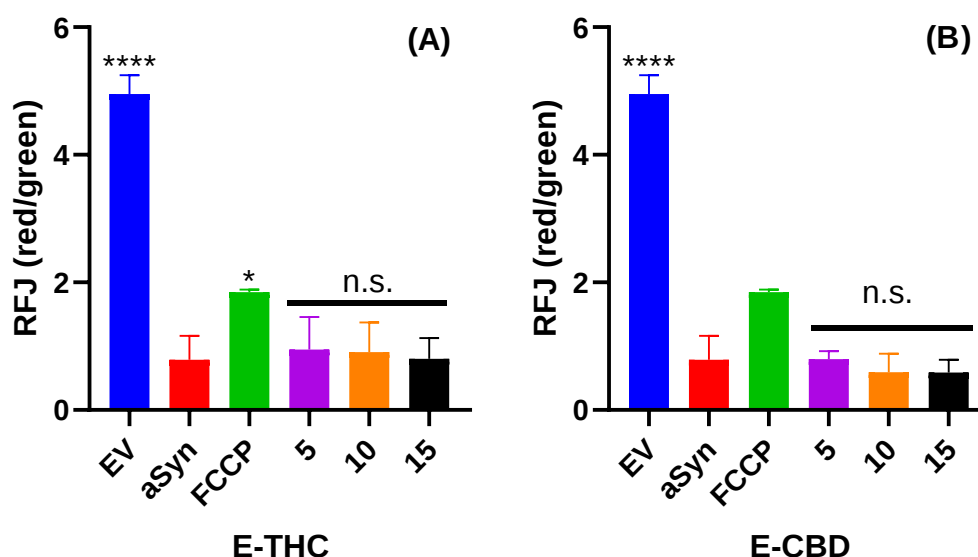


Figura 33. Ação do extrato E-THC sobre os danos mitocondriais induzidos pela expressão de aSyn em *S. cerevisiae*. A integridade mitocondrial foi avaliada em células expressando aSyn por

meio da quantificação do potencial de membrana mitocondrial utilizando o corante JC-1. Células da cepa BY4741 foram transformadas com o plasmídeo vazio pRS426GAL (EV) ou com o plasmídeo p426GAL-aSyn-GFP para expressão da aSyn. A expressão da proteína heteróloga foi induzida por galactose, por 2 h. Para avaliação do efeito do extrato, células expressando aSyn foram incubadas com o extrato E-THC nas concentrações de 25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 2 h, a 28 °C, 160 rpm. Após os tratamentos, as células foram incubadas com JC-1 a 1 mM por 40 min, a 28 °C, no escuro. A fluorescência foi quantificada em leitor de microplacas, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488/525 nm (monômero, fluorescência verde) e 534/590 nm (agregado, fluorescência vermelha). Os resultados foram expressos como razão entre as intensidades de fluorescência verde/vermelha, refletindo alterações no potencial de membrana mitocondrial. Os dados apresentados correspondem aos valores obtidos nos experimentos realizados. Não foi realizada análise estatística em razão do número insuficiente de réplicas experimentais (n), sendo os resultados apresentados de forma descritiva.

Visto que os quatro extratos possuem percentuais e perfil químico de fitocanabinoides diferenciados, visto que geraram resultados similares mas não iguais para as cepas BY4741 e $\Delta yap1$, resolveu-se ampliar esta análise utilizando concentrações menores de todos os extratos (5, 10 e 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Entretanto, mesmo nessas faixas mais baixas, os extratos continuaram incapazes de reverter os danos mitocondriais causados pela aSyn (Figura 34), o que também se refletiu na manutenção da baixa viabilidade celular.



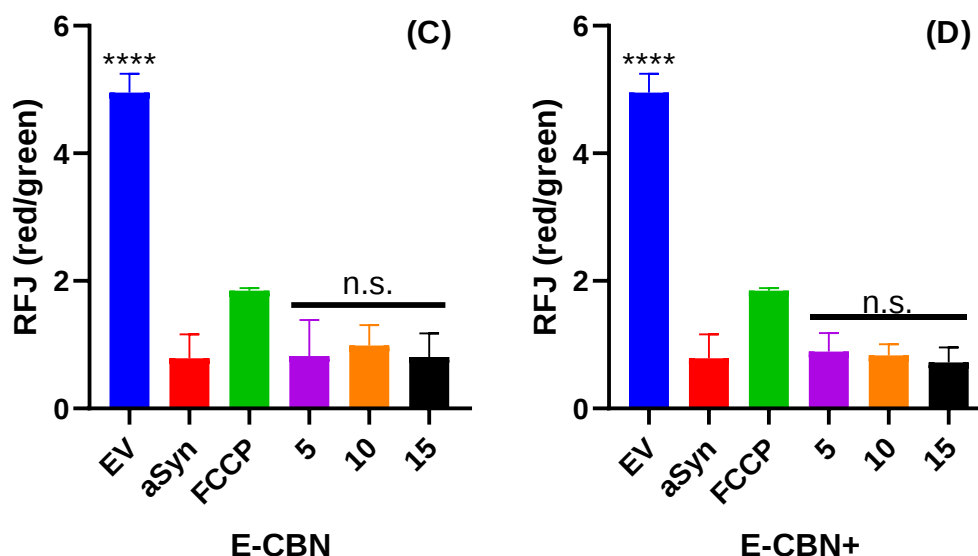


Figura 34. Ação dos extratos de *C. sativa* sobre os danos mitocondriais induzidos pela expressão de aSyn em *S. cerevisiae*. A integridade mitocondrial foi avaliada em células expressando aSyn por meio da quantificação do potencial de membrana mitocondrial utilizando o corante JC-1. Células da cepa BY4741 foram transformadas com o plasmídeo vazio pRS426GAL (EV) ou com o plasmídeo p426GAL-aSyn-GFP para expressão da aSyn. A expressão da proteína heteróloga foi induzida por galactose, por 2 h. Para avaliação do efeito dos extratos, células expressando aSyn foram incubadas com os extratos E-THC (A), E-CBD (B), E-CBN (C) e E-CBN+ (D) nas concentrações de 5, 10 e 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 2 h, a 28 °C, 160 rpm. Após os tratamentos, as células foram incubadas com JC-1 a 1 mM por 40 min, a 28 °C, no escuro. A fluorescência foi quantificada em leitor de microplacas, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488/525 nm (monômero, fluorescência verde) e 534/590 nm (agregado, fluorescência vermelha). Os resultados foram expressos como razão entre as intensidades de fluorescência verde/vermelha, refletindo alterações no potencial de membrana mitocondrial. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$), em comparação com o controle aSyn. Diferenças estatisticamente não significativas (n.s.) foram determinadas em relação ao respectivo controle.

Na figura 34 é possível observar que a proteína aSyn e o desacoplador FCCP afetam negativamente o potencial de membrana mitocondrial, mas por mecanismos distintos. A aSyn afeta negativamente o potencial de membrana mitocondrial por várias vias patológicas. Estudos *in vitro* mostram que formas agregadas ou em excesso de aSyn podem induzir despolarização da membrana mitocondrial através da ativação do poro de transição mitocondrial (mPTP), o que compromete a fosforilação oxidativa e a capacidade de síntese de ATP (Bir et al., 2014). Além disso, a porção N-terminal da aSyn interage com proteínas da membrana mitocondrial, promovendo aumento da permeabilidade mitocondrial e ativação de mPTP, resultando em queda do $\Delta\Psi_m$ (Shen et al., 2014). Em comparação, o

desacoplador químico FCCP induz uma despolarização “forçada” aguda da membrana ao dissipar o gradiente de prótons, enquanto a aSyn causa despolarização mais crônica e patológica, associada à disfunção mitocondrial, aumento de ROS e redução da produção energética. Modelos celulares também demonstraram que a deficiência de aSyn leva a um $\Delta\Psi_m$ mais baixo, e curiosamente, a adição de aSyn monomérica “resgata” parte desse potencial, indicando que níveis fisiológicos de aSyn são necessários para manter a bioenergética mitocondrial (Ludtmann et al., 2016).

O potencial antioxidante observado anteriormente nos extratos de *C. sativa* aparentemente não foi suficiente para reverter a disfunção mitocondrial causada pela presença da aSyn, uma vez que os extratos não foram capazes de preservar a integridade mitocondrial na presença da proteína citotóxica, o que pode estar relacionado a um fenômeno físico-químico. A natureza lipofílica dos canabinoides permite sua inserção na membrana mitocondrial, o que pode modificar sua fluidez e desestabilizar gradientes de prótons, levando à dissipação parcial do potencial de membrana e a consequente liberação do marcador JC-1 para o citosol, explicando, em parte, a ausência de fluorescência mitocondrial intensa mesmo em condições não tóxicas aparentes (Maccarrone et al., 2011; Fišar et al., 2014).

A análise de viabilidade celular por contagem de unidades formadoras de colônias na presença da aSyn é fundamental pois revela a capacidade das células de se proliferarem e formarem células-filhas viáveis, algo que depende criticamente das funções mitocondriais. Se o potencial de membrana mitocondrial estiver comprometido, a célula ainda pode manter alguma produção de ATP, mesmo que em níveis reduzidos; o que pode ser suficiente para a sua sobrevivência, mas não para sustentar a geração de colônias. Por isso, a contagem de UFC funciona como uma análise funcional complementar para mostrar se a célula é capaz de se dividir repetidamente, o que exige uma bioenergética eficiente. Se as mitocôndrias estiverem tão comprometidas (por exemplo, por peroxidação lipídica, inibição de proteases mitocondriais ou distúrbios na mitofagia) que a geração de ATP seja insuficiente, isso pode resultar em colônias muito pequenas, chamadas de ‘*petites*’ ou até na ausência de colônias, refletindo perda de viabilidade proliferativa. Assim, o ensaio de formação de colônias na presença de aSyn ajuda a revelar o impacto funcional do comprometimento mitocondrial na capacidade de regeneração celular

(Shen; Dettmer, 2014). Desta forma, o ensaio de viabilidade celular com concentrações menores também foi realizado (Figura 35).

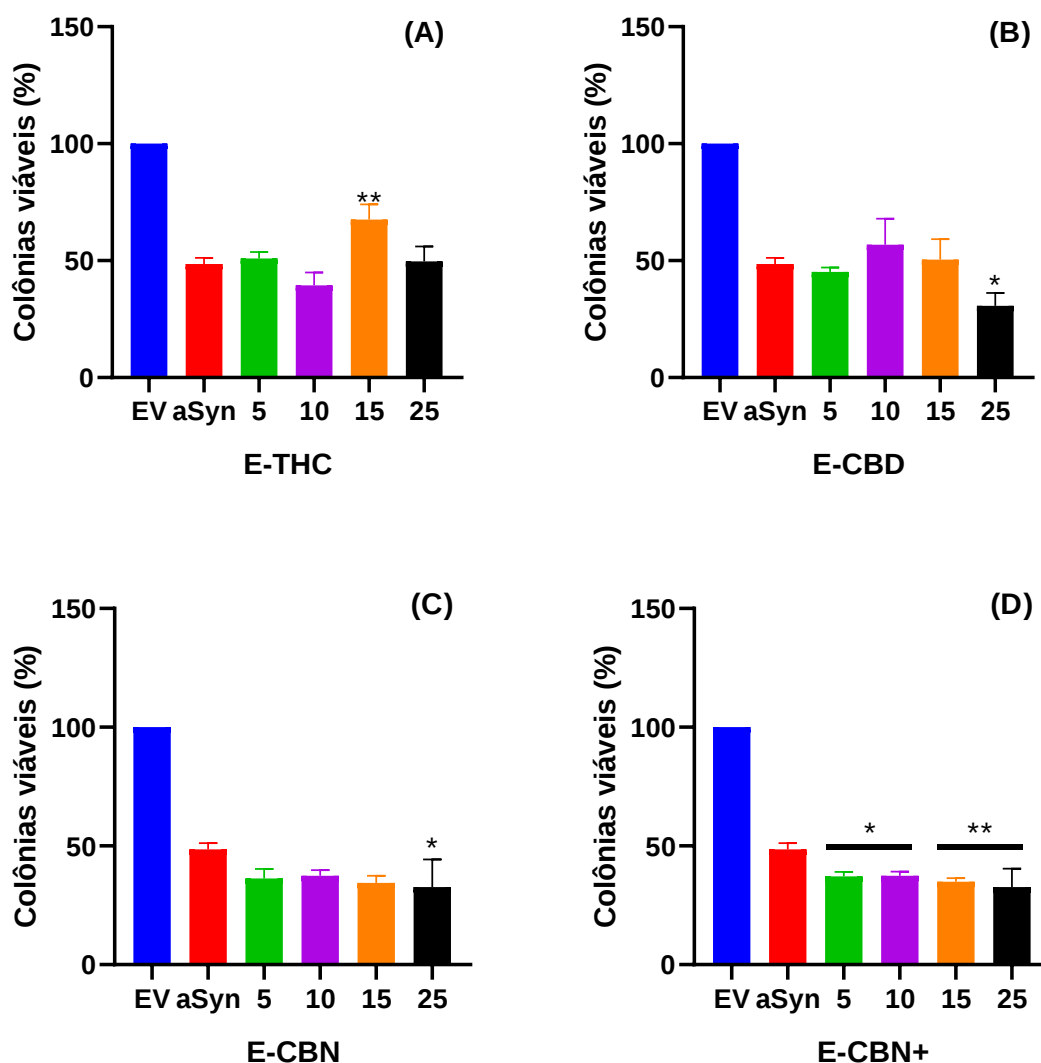


Figura 35. Avaliação da viabilidade celular em *S. cerevisiae* expressando aSyn após tratamento com extratos de *C. sativa*. Células da cepa BY4741 foram transformadas com o plasmídeo vazio pRS426GAL (EV) ou com o plasmídeo p426GAL-aSyn-GFP para expressão da aSyn. A expressão da proteína heteróloga foi induzida por galactose, por 2 h. Para avaliação do efeito dos extratos, células expressando aSyn foram incubadas com os extratos E-THC (A), E-CBD (B), E-CBN (C) e E-CBN+ (D) nas concentrações de 5, 10, 15 e 25 µg·mL⁻¹ por 2 h, a 28 °C, 160 rpm. Após os tratamentos, alíquotas apropriadas foram seriamente diluídas em água destilada estéril e plaqueadas em meio YPD sólido (2% m/v), seguidas de incubação por 48-72 h a 28 °C para formação das colônias. A viabilidade celular foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), sendo os resultados expressos como porcentagem em relação ao respectivo controle não tratado. Os dados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), em comparação com o respectivo controle.

Apesar do extrato E-THC ter apresentado diferença estatística na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, é razoável considerar que, em geral, este extrato não foi capaz de reverter a disfunção bioenergética associada ao baixo potencial de membrana mitocondrial induzido pela aSyn; uma vez que concentrações menores e maiores deste extrato não forneceram regulação do ambiente intracelular suficiente para a geração de células-filhas. Do mesmo modo, a maior toxicidade observada nos extratos E-CBD, E-CBN e especialmente E-CBN+ em altas concentrações, reduzindo ainda mais a geração de células-filhas, é compatível com o entendimento de que a proliferação celular exige mitocôndrias plenamente funcionais e produção adequada de ATP. Assim, estes resultados corroboram a hipótese de que mesmo quando algum $\Delta\Psi_m$ residual persiste, as células só formam colônias se a bioenergética estiver preservada, o que não ocorreu na presença da aSyn e dos extratos testados nas concentrações mais elevadas.

4.6. Avaliação dos efeitos biológicos dos extratos de *C. sativa* na integridade da membrana mitocondrial e seu impacto na viabilidade celular de cepas de levedura expressando A β 42

O peptídeo A β , especialmente em sua forma oligomérica, provoca disfunção mitocondrial ao interagir com componentes cruciais da organela, como ciclofilina D (CypD), VDAC e a ATP sintase, favorecendo a abertura do poro de transição mitocondrial (mPTP), o que resulta em despolarização do potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), aumento de ROS, disfunção da fosforilação oxidativa e queda na síntese de ATP (Pagani; Eckert, 2011; Du; Yan, 2010; Atlante et al., 2022). Além disso, A β pode interferir na dinâmica mitocondrial, trazendo um desbalanceamento entre fissão e fusão, e promover sobrecarga de cálcio intra-mitocondrial, agravando a geração de estresse oxidativo e abrindo o mPTP (Monsalvo-Maraver et al., 2023; Meng et al., 2024).

Os ensaios de integridade mitocondrial por análise do potencial de membrana e da geração de células-filhas por viabilidade celular também foram realizados com a cepa de levedura expressando A β 42, nas mesmas concentrações utilizadas na cepa aSyn (5, 10, 15 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 36).

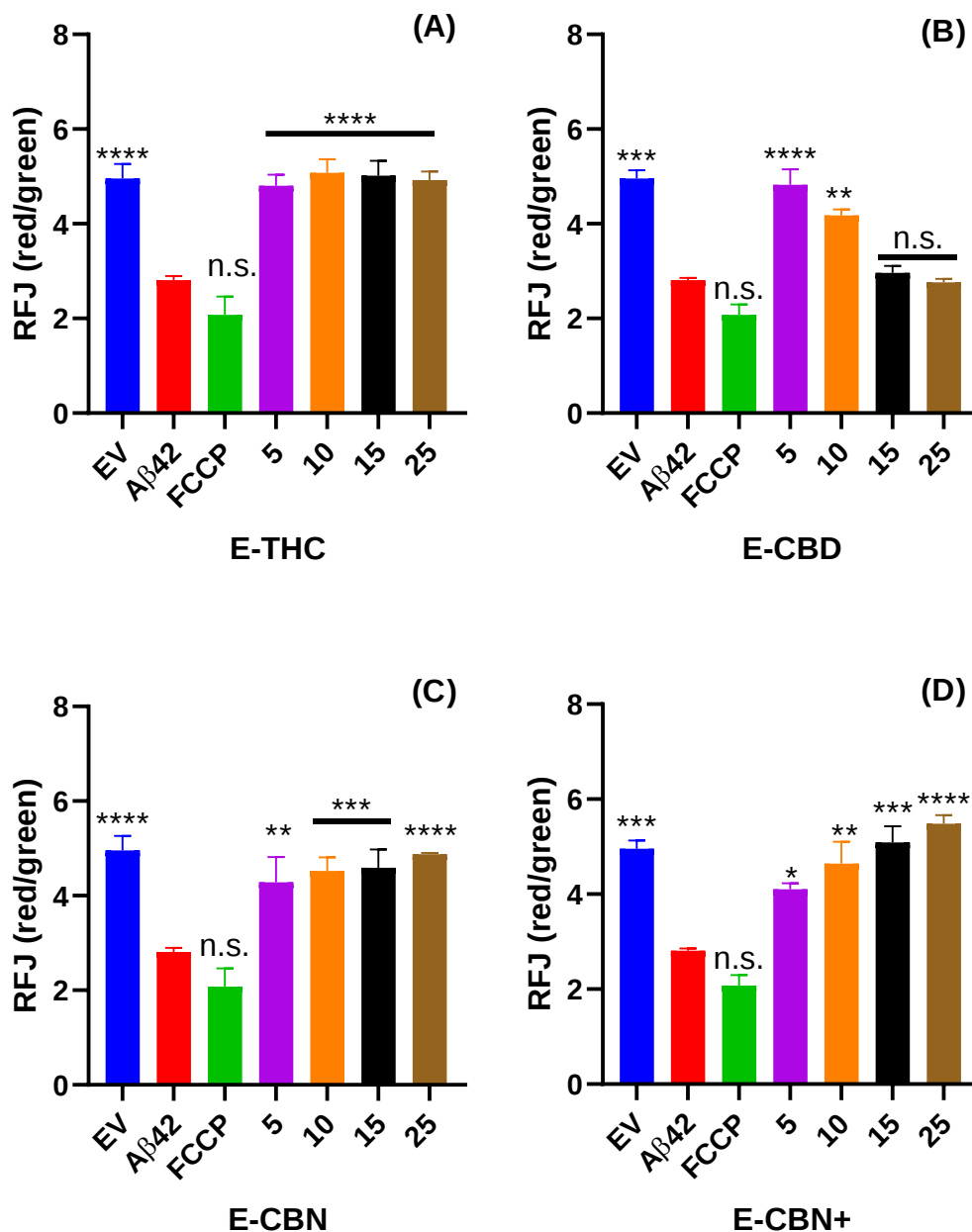


Figura 36. Ação dos extratos de *C. sativa* sobre os danos mitocondriais induzidos pela expressão do peptídeo Aβ42 em *S. cerevisiae*. A integridade mitocondrial foi avaliada em células expressando Aβ42 por meio da quantificação do potencial de membrana mitocondrial utilizando o corante JC-1. Células da cepa BY4741 foram transformadas com o plasmídeo vazio pRS426GAL (EV) ou com o plasmídeo pAG426GAL:ssAβ1-42 para expressão do peptídeo β-amiloide. A expressão da proteína heteróloga foi induzida por galactose, 28 °C/160 rpm, por 2 h. Para avaliação do efeito dos extratos, células expressando Aβ42 foram incubadas com os extratos E-THC (A), E-CBD (B), E-CBN (C) e E-CBN+ (D) nas concentrações de 5, 10, 15 e 25 μg·mL⁻¹ por 2 h, a 28 °C/160 rpm. Como controle positivo para despolarização mitocondrial, células expressando Aβ42 foram expostas ao desacoplador mitocondrial FCCP na concentração de 10 μM. Após os tratamentos, as células foram incubadas com JC-1 a 1 mM por 40 min, a 28 °C, no escuro. A fluorescência foi quantificada em leitor de microplacas, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488/525 nm (monômero, fluorescência verde) e 534/590 nm (agregado, fluorescência vermelha). Os resultados foram expressos como razão entre as intensidades de fluorescência verde/vermelha, refletindo alterações no potencial de membrana mitocondrial. Os dados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi

realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), em comparação com o respectivo controle.

O extrato E-THC preservou a integridade da membrana mitocondrial de maneira uniformemente significativa para todas as concentrações testadas, igualando-se estatisticamente à integridade mitocondrial encontrada nas células sem expressão de A β 42 (EV) (Figura 36A). Os canabinoides podem modular vários processos mitocondriais, incluindo dinâmica mitocondrial e mitofagia, metabolismo bioenergético e apoptose (Milano; Capasso, 2018). O extrato E-CBD, por sua vez, destacou-se na manutenção do potencial mitocondrial na menor concentração (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) igualando-se à função mitocondrial observada no EV; e menor preservação mitocondrial nas concentrações de 15 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sugerindo uma relação dose-dependente, onde as maiores concentrações foram menos eficientes em preservar a atividade mitocondrial. O extrato E-CBN também apresentou uma relação dose-dependente, ainda que discreta, com todas as concentrações apresentando atividade mitocondrial muito similar ou igual às células sem expressão de A β 42. E-CBN+, por sua vez, mostrou uma relação dose-dependente muito expressiva, onde a maior concentração (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi a mais eficiente na preservação mitocondrial, superando, inclusive, a atividade funcional das mitocôndrias das células com o plasmídeo vazio (EV). Uma pesquisa recente indicou que o CBN tem como alvo as mitocôndrias e preserva suas funções, como regulação redox, potencial de membrana, bioenergética, biogênese e modulação da dinâmica de fusão/fissão (Dawidowicz et al., 2021). Esses resultados indicam que os diferentes fitocanabinoides possuem mecanismos de ação distintos sobre as mitocôndrias, o que pode estar relacionado tanto a propriedades estruturais específicas quanto a interações diferenciadas com componentes da membrana mitocondrial.

Uma vez que as disfunções bioenergéticas causadas por A β comprometem a viabilidade celular, já que a redução de ATP e o aumento de estresse redox disparam vias pró-apoptóticas e levam à morte celular (Meng et al., 2024; Nikolaeva et al., 2022), a viabilidade celular da cepa expressando A β 42 para estas concentrações dos extratos também foi avaliada (Figura 37).

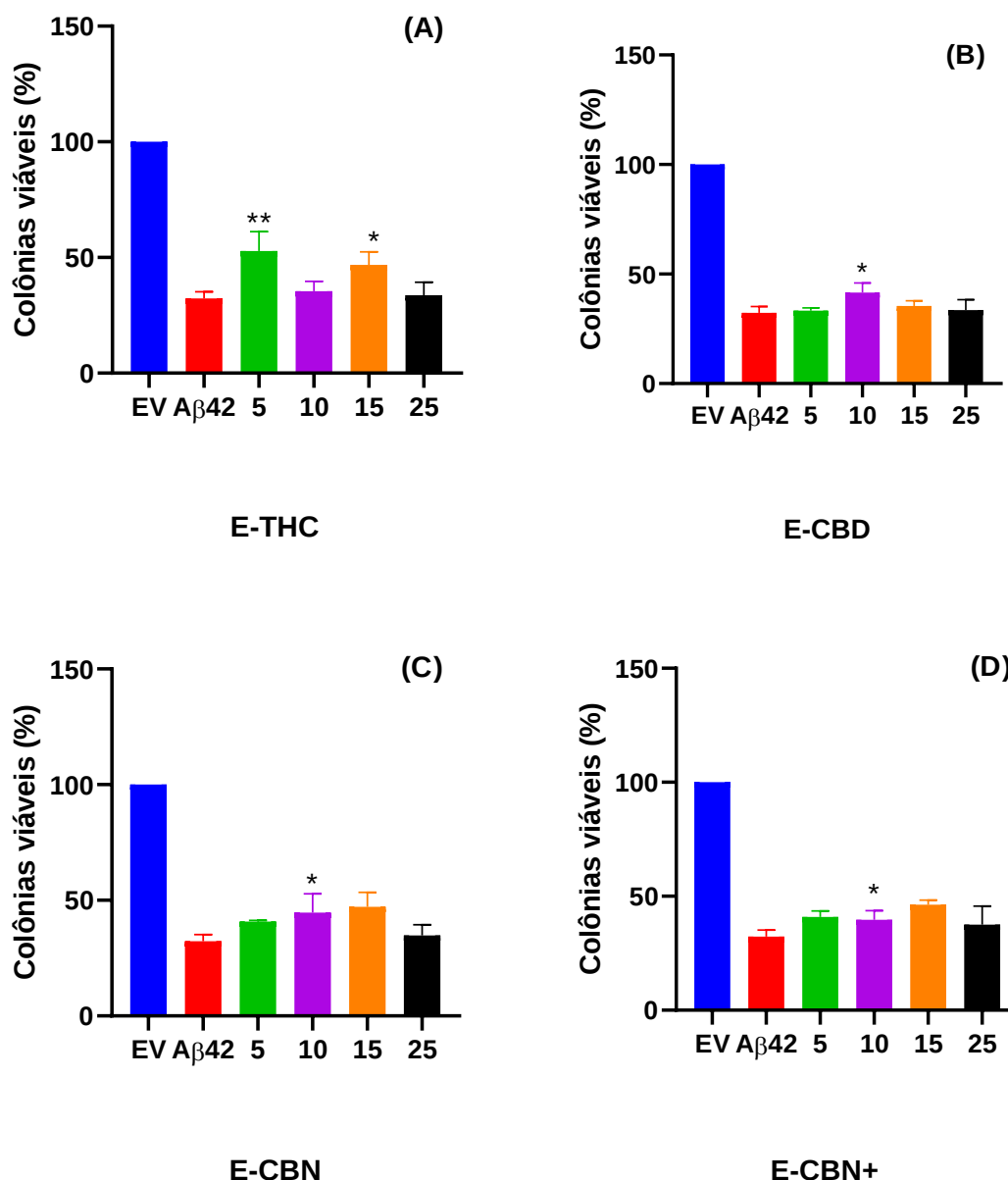


Figura 37. Avaliação da viabilidade celular em *S. cerevisiae* expressando Aβ42 após tratamento com extratos de *C. sativa*. Células da cepa BY4741 foram transformadas com o plasmídeo vazio pRS426GAL (EV) ou com o plasmídeo pAG426GAL:ssAβ1-42 para expressão do peptídeo β-amiloide. A expressão da proteína heteróloga foi induzida por galactose, por 2 h. Para avaliação do efeito dos extratos, células expressando Aβ42 foram incubadas com os extratos E-THC (A), E-CBD (B), E-CBN (C) e E-CBN+ (D) nas concentrações de 5, 10, 15 e 25 μg·mL⁻¹ por 2 h, a 28 °C, 160 rpm. Após os tratamentos, alíquotas apropriadas foram seriamente diluídas em água destilada estéril e plaqueadas em meio YPD sólido (2% m/v), seguidas de incubação por 48–72 h a 28 °C para formação das colônias. A viabilidade celular foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), sendo os resultados expressos como porcentagem em relação ao respectivo controle não tratado. Os dados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * (p < 0,05) e ** (p < 0,01), em comparação com o respectivo controle.

O extrato E-THC apresentou a melhor viabilidade celular na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; enquanto os extratos E-CBD, E-CBN e E-CBN+ a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. De maneira geral, a avaliação da viabilidade celular da cepa expressando A β 42 demonstrou, que apesar dos extratos conseguirem proteger a integridade mitocondrial, eles não foram capazes de restaurar de forma proporcional a viabilidade celular. Além da despolarização do potencial mitocondrial, a presença do peptídeo A β 42 ativa receptores de morte celular, aumenta o influxo de cálcio, gera estresse oxidativo citosólico e altera o citoesqueleto.

Os extratos da *C. sativa*, especialmente o CBD, podem proteger a integridade mitocondrial frente ao peptídeo A β por meio de efeitos antioxidantes, indução de mitofagia mediada por Atg32p, e estabilização do potencial de membrana mitocondrial; reduzindo a geração de ROS e favorecendo a reciclagem de mitocôndrias danificadas (Mackay et al., 2009; De Fazio et al., 2011; Martin; Bendahmane, 2010; Gualco et al., 2009). No entanto, apesar dessa proteção mitocondrial, a melhora na viabilidade celular pode ser limitada, pois o A β ativa múltiplas vias tóxicas (como apoptose, disfunção de cálcio e estresse oxidativo não mitocondrial) que não são completamente revertidas apenas com suporte mitocondrial. Além disso, os canabinoides, embora citoprotetores, não são necessariamente agentes pró-proliferativos; em alguns casos, os efeitos benéficos mitocondriais podem não ser suficientes para restaurar completamente a produção de ATP necessário para a divisão celular (Salgado et al., 2024; Iuvone et al., 2004).

A discrepância observada em que os extratos de *Cannabis sativa* ofereceram proteção significativa à cepa expressando A β 42, mas não à cepa com aSyn, pode refletir diferenças fundamentais nos mecanismos de toxicidade de cada proteína citotóxica. Enquanto o peptídeo A β 42 tende a induzir um estresse oxidativo extramitocondrial, disfunção de tráfego vesicular e ativação da resposta imune (Song et al., 2024; Baldensperger et al., 2025), a proteína aSyn interage diretamente com o compartimento mitocondrial, perturbando complexos da cadeia respiratória, o módulo TOM/TIM de importação mitocondrial e promovendo fragmentação mitocondrial (Shen et al., 2024). Essas interações tornam a toxicidade da aSyn mais resistente à modulação por antioxidantes genéricos ou compostos que atuam principalmente na neutralização de ROS citosólicas. Portanto, a eficácia dos extratos contra A β 42, mas não aSyn, sugere que sua ação

está mais alinhada com a mitigação de estresse oxidativo gerado por agregados proteicos que impactam predominantemente vias citoplasmáticas, do que com interferência nos processos internos mitocondriais complexos causados pela aSyn (Zhang et al., 2024; Puspita et al., 2017; Ding et al., 2018).

Em conjunto, os resultados indicam que os efeitos dos extratos de *Cannabis sativa* sobre a integridade mitocondrial e a viabilidade celular dependem fortemente do tipo de proteína agregante expressa e da composição fitoquímica predominante de cada extrato. Na cepa expressando aSyn, nenhum dos extratos testados demonstrou capacidade protetora significativa, sugerindo que a toxicidade mitocondrial induzida pela aSyn é mais resistente à modulação antioxidante e lipídica promovida pelos canabinoides. Essa resistência pode estar relacionada à interação direta da aSyn com a membrana mitocondrial, levando à formação de poros e à dissipação irreversível do potencial de membrana, um processo que os compostos de *C. sativa* aparentemente não conseguiram mitigar nas concentrações estudadas. Por outro lado, na cepa expressando A β 42 observou-se que o E-THC e, em menor grau, os extratos ricos em CBN foram capazes de preservar a integridade mitocondrial e a viabilidade celular, indicando uma possível ação protetora seletiva contra o estresse mitocondrial associado à agregação do peptídeo. Essa diferença sugere que os canabinoides podem modular vias distintas de toxicidade proteica, possivelmente pela estabilização de membranas e modulação redox, e reforça a importância de se compreender os mecanismos moleculares específicos de interação entre compostos fitocanabinoides e os diferentes tipos de agregados proteicos. Evidências pré-clínicas indicam que certos fitocanabinoides (por exemplo, THC e CBN) podem preservar a integridade mitocondrial e a viabilidade celular frente ao estresse induzido por agregados de A β , atuando por mecanismos que incluem inibição da agregação proteica, proteção da função mitocondrial e modulação do balanço redox (Marsh et al., 2024; Gugliandolo et al., 2023; Wang et al., 2022; Liang et al., 2022).

4.7. Avaliação dos efeitos dos extratos de *C. sativa* na formação de inclusões em células de neuroglioma H4 transfectadas com aSyn

Os achados obtidos em *S. cerevisiae* sugeriram que os extratos de *C. sativa* são capazes de preservar a homeostase redox em condições de estresse oxidativo agudo (H_2O_2) e na presença de agregados proteicos de β -amiloide, mas não reverteram a disfunção mitocondrial associada à expressão de aSyn. Esse padrão é particularmente relevante porque mecanismos de toxicidade mediados por aSyn são amplamente conservados evolutivamente, incluindo a interferência na cadeia respiratória, acúmulo de ROS e alteração da morfologia mitocondrial (Shen; Dettmer, 2024; Su et al., 2010).

O modelo de células de neuroglioma H4 co-transfectadas com aSyn truncada (SynT) e sinfilina-1 tem sido amplamente utilizado para o estudo da formação de inclusões intracelulares semelhantes aos corpos de Lewy (McLean et al., 2001; Lázaro et al., 2014; Albert et al., 2021; Wu et al., 2019). Essa coexpressão favorece o acúmulo e a agregação de aSyn, uma vez que a sinfilina-1 atua como proteína adaptadora que facilita a interação intermolecular e a ubiquitinação da aSyn (Alvarez-Castelao; Castaño, 2011; Liani et al., 2004; Eyal et al., 2006). Nessa configuração a sinfilina-1 interage com a aSyn, promovendo a agregação e a formação de inclusões citoplasmáticas visíveis. Assim, a diminuição do número de inclusões observada após o tratamento com os extratos sugeriria uma interferência direta na nucleação ou propagação dos agregados de aSyn; ou ainda, uma modulação positiva dos sistemas celulares de controle proteico, como o proteassoma e a autofagia lisossomal. Assim, esse modelo permite estudar de forma robusta os mecanismos de agregação proteica relacionados à DP (Tatenhorst et al., 2016; Kilpatrick et al., 2013; Seebauer et al., 2022).

Primeiramente, a citotoxicidade dos extratos de *C. sativa* em células humanas de neuroglioma H4 foi avaliada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio. O PI é um composto fluorescente hidrofóbico que pode atravessar membranas celulares danificadas/comprometidas, ligando-se ao DNA e emitindo sinal fluorescente; agindo, portanto, como marcador de morte celular por perda de integridade das membranas. Em células viáveis, o PI não pode atravessar a membrana plasmática intacta e não emite fluorescência detectável.

Para cada amostra foram analisados 5.000 eventos (células). Os resultados foram dados em percentual de células mortas relativo ao número total de eventos. O controle de células H4 apresentou aproximadamente 2% de células mortas, e o

veículo (DMSO) exibiu aproximadamente 2,4%, indicando que o solvente não exerceu efeito tóxico significativo. Os resultados mostraram ausência de citotoxicidade relevante para todos os extratos testados (E-THC, E-CBD, E-CBN e E-CBN+) nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em células H4 quando comparados aos grupos controle e veículo (DMSO) (Figura 38). Apesar da diferença estatística apresentada pelo E-THC na concentração de 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em comparação ao controle, a morte celular abaixo de 3% em um total de 5000 eventos somada à ausência de toxicidade a 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ não foi considerada suficientemente expressiva para caracterizar uma toxicidade significativa do extrato E-THC. Esses dados indicam que, dentro dessa faixa de concentração, os extratos não comprometem a viabilidade das células, fornecendo base segura para prosseguir com as análises morfológicas subsequentes.

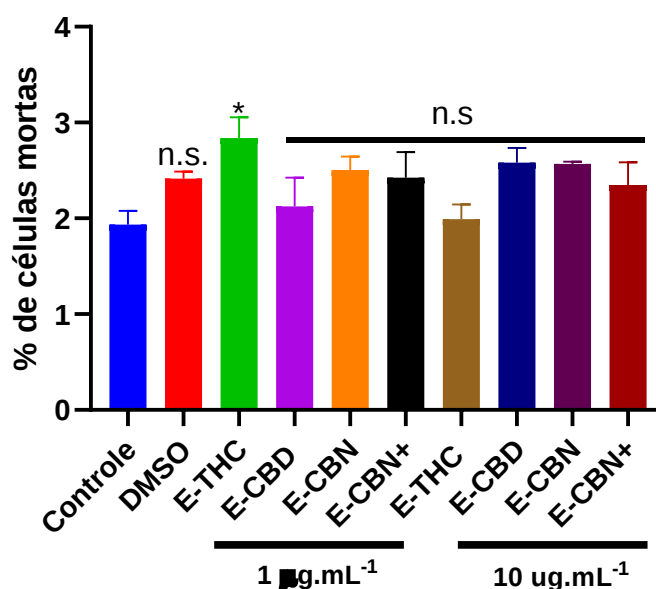
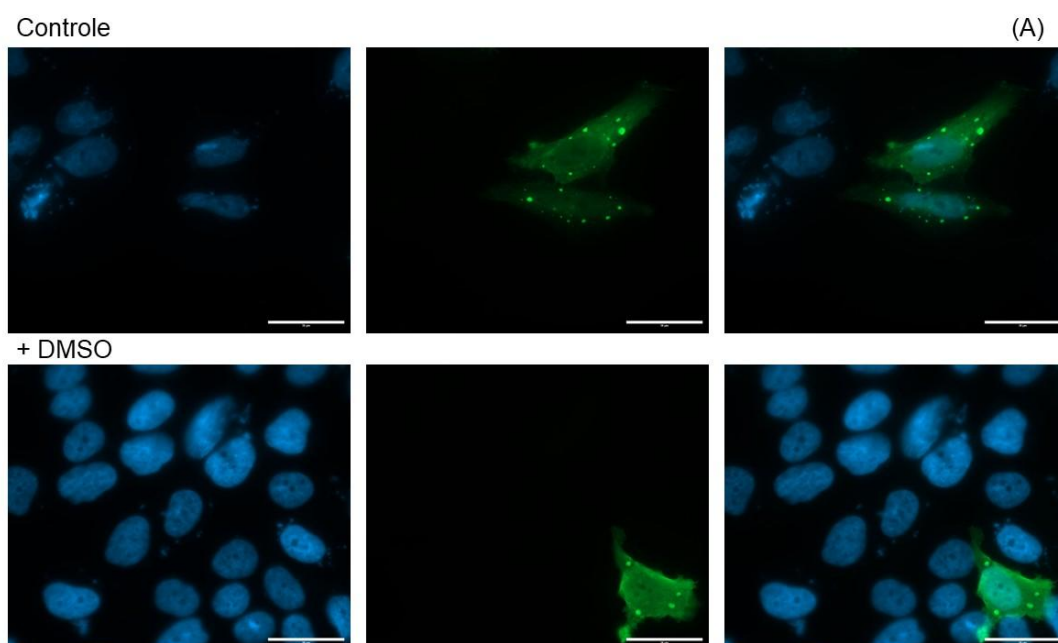


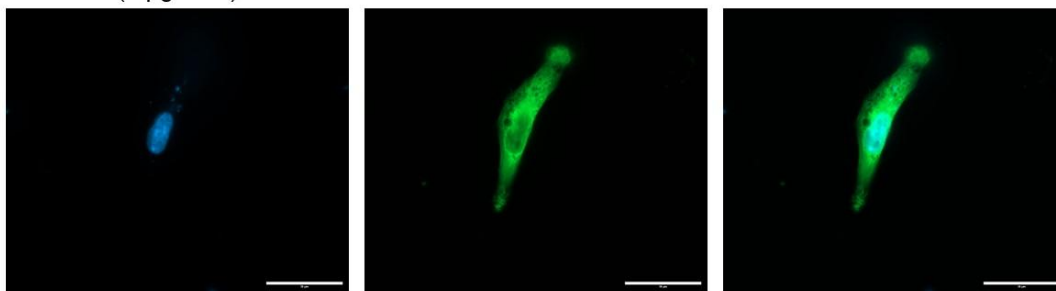
Figura 38. Avaliação da toxicidade dos extratos de *C. sativa* em células de neuroglioma humano H4 por citometria de fluxo. Células H4 foram cultivadas em meio condições padrão. O grupo controle corresponde a células H4 sem tratamento, enquanto o grupo DMSO refere-se às células expostas apenas ao veículo. Para avaliação da toxicidade dos extratos, as células foram incubadas com os extratos de *C. sativa* nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, por 24 h. Após o período de exposição, a viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (PI) como marcador de integridade de membrana plasmática, permitindo a discriminação entre células viáveis e não viáveis. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$), em comparação com o controle. Diferenças estatisticamente não significativas (n.s.) também foram determinadas em comparação com o controle.

A investigação do impacto dos extratos E-THC, E-CBD, E-CBN e E-CBN+ sobre o processo de agregação da aSyn baseou-se em um modelo celular amplamente validado que consiste na co-expressão de sinfilina-1 e SynT, uma variante da aSyn (Lázaro et al., 2014; Dominguez-Meijide et al., 2021). Após 24 horas da co-transfecção com ambos os plasmídeos, as células foram tratadas com os extratos nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, permanecendo em contato por 24 h adicionais. Quarenta e oito horas após a transfecção (24 h após o tratamento) foi realizada a imunocitoquímica para detecção de aSyn, e as imagens foram adquiridas através de microscopia de fluorescência (Figura 39A).

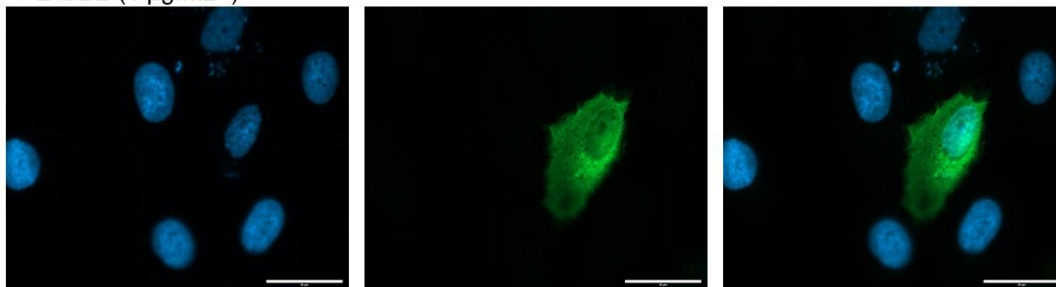
A heterogeneidade das inclusões observadas foi categorizada em quatro grupos distintos, de acordo com o número de inclusões intracelulares: 0 inclusões (células livres de inclusões); < 5 inclusões (células com menos de 5 inclusões); ≥ 5 -9 inclusões (células com 5 a 9 inclusões) e ≥ 10 inclusões (células com 10 ou mais inclusões). Essa categorização permitiu uma análise quantitativa e comparativa do padrão de agregação, elucidando o impacto diferencial de cada extrato no processo de formação de inclusões (Figura 39B e 39C).



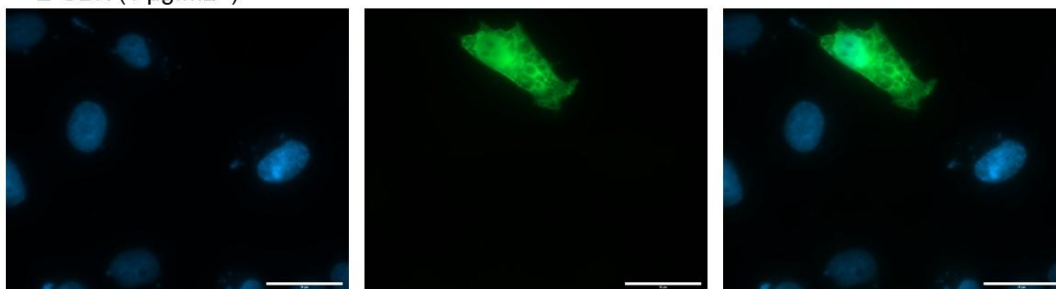
+ E-THC ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)



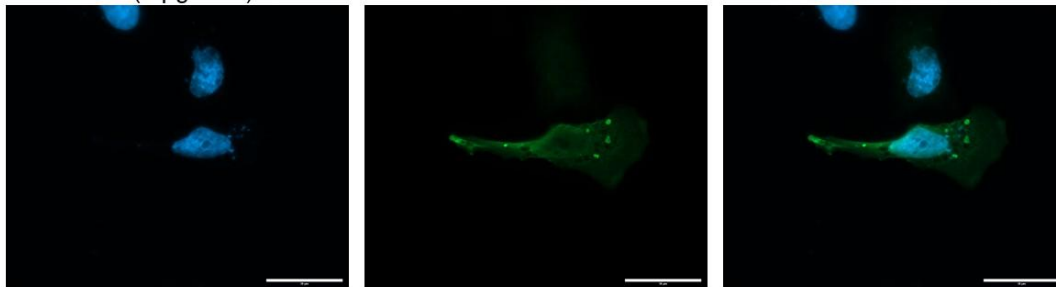
+ E-CBD ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

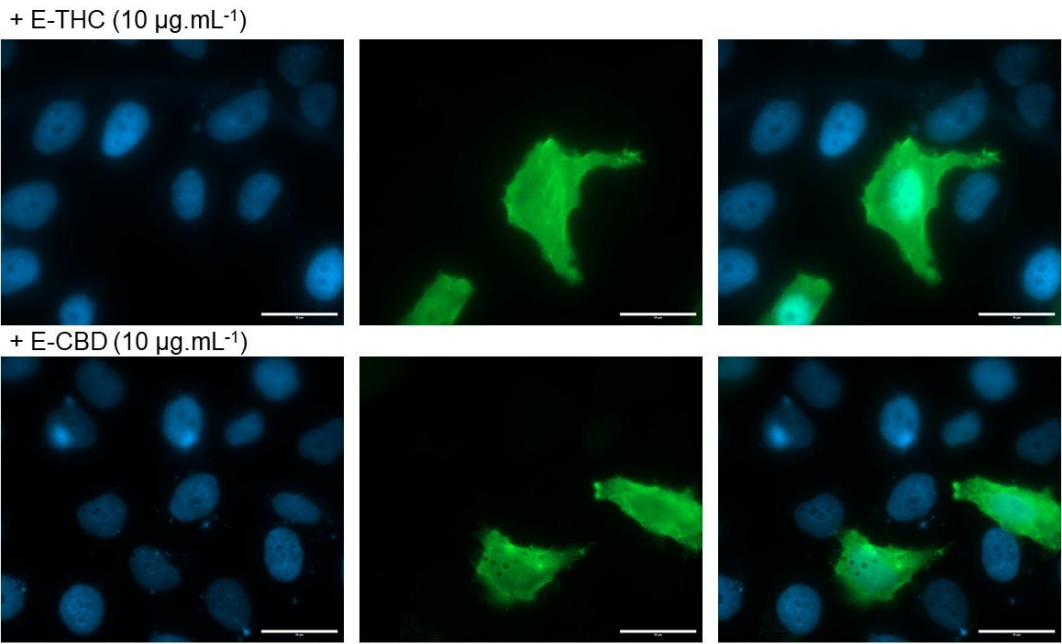


+ E-CBN ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

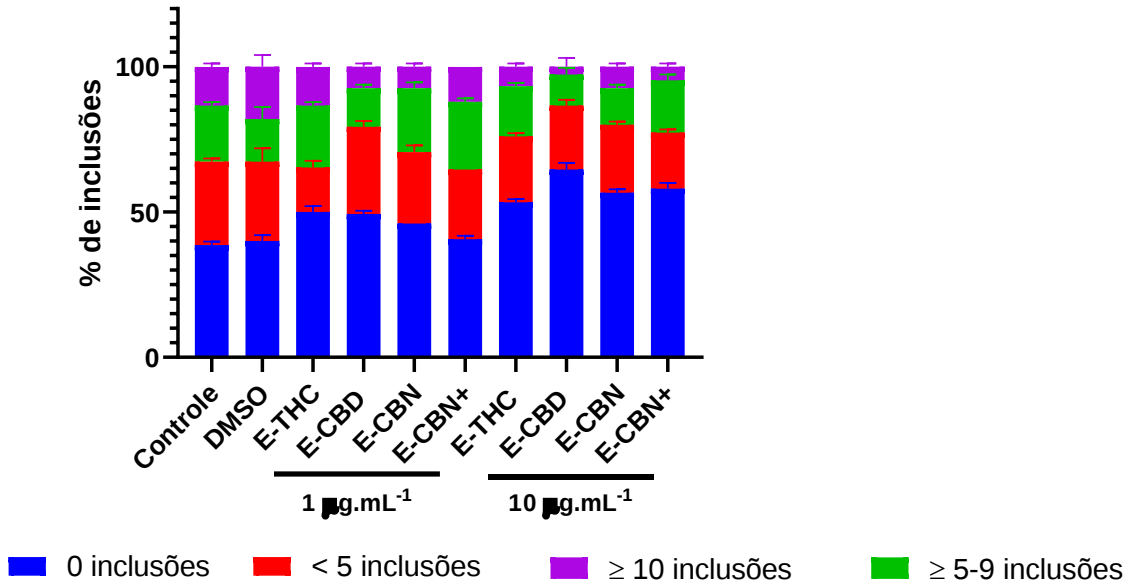


+ E-CBN+ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)





(B)



(C)



Figura 39. Efeito dos extratos de *C. sativa* sobre a agregação de aSyn em células H4. (A) Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência demonstrando a formação de inclusões intracelulares contendo aSyn em células de neuroglioma humano H4. O modelo

experimental baseia-se na coexpressão da forma truncada da aSyn (SynT) em conjunto com a sinfilina-1, estratégia amplamente utilizada para indução e visualização de agregados citoplasmáticos de aSyn. As células foram submetidas aos tratamentos experimentais com os extratos de *C. sativa* sob as condições especificadas (1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por 24 h). Barra de escala: 30 μm . **(B)** Quantificação do número de inclusões contendo aSyn em células H4. Para cada condição experimental, foram conduzidos três experimentos independentes, sendo analisadas 50 células por experimento. **(C)** Classificação das células em grupos distintos de acordo com o padrão morfológico das inclusões observadas, conforme descrito previamente na literatura. A metodologia empregada para o modelo de agregação e os critérios de classificação das inclusões basearam-se no trabalho de Lázaro et al. (2014). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Dunnett's, conforme apresentado na Figura 40.

Na figura 39A é possível observar imagens representativas das células H4 com seus núcleos marcados com DAPI (primeira coluna), a fluorescência verde causada pela transfecção de aSyn-GFP (segunda coluna) e as imagens sobrepostas (terceira coluna). As células escolhidas para as imagens mostram o resultado quantitativo mais expressivo obtido para cada condição. Representando o grupo controle, é possível observar na imagem duas células H4 com diversas inclusões de aSyn. Da mesma forma, como o uso do veículo DMSO não alterou estatisticamente o quantitativo de células com inclusões, é possível observar na figura 39A uma célula contendo inclusões de aSyn. Como os tratamentos com os extratos apresentaram maior quantidade de células livres de inclusões, vê-se nas imagens referentes aos tratamentos células H4 sem inclusões de aSyn. Para destacar que o extrato E-CBN+ na concentração de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi o menos eficiente em aumentar o número de células com 0 inclusões, a imagem de uma célula contendo agregados de aSyn foi escolhida para representação desta condição.

O grupo controle de células H4 exibiu aproximadamente 39% de células livres de inclusões, enquanto o controle do veículo (DMSO) apresentou resultado similar (~40%), indicando que o solvente não interferiu na formação de inclusões (Figura 40). A exposição aos extratos de *C. sativa* revelou padrões distintos de distribuição de inclusões intracelulares, com diferenças relacionadas tanto ao tipo de extrato quanto à concentração. Em ambas as concentrações (1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), E-THC aumentou o percentual de células sem inclusões para aproximadamente 50% e 53%, respectivamente; sugerindo um efeito protetor contra a formação de agregados. O extrato E-CBD, por sua vez, apresentou comportamento dose-dependente: a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ elevou o número de células livres de inclusões para cerca de 50%, e a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o valor atingiu ~65%, representando a maior redução no

número de células com inclusões entre todos os tratamentos. Os extratos ricos em CBN (E-CBN e E-CBN+) apresentaram respostas mais discretas a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (~46% e ~41% de células sem inclusões, respectivamente), sem diferença significativa em relação ao controle. Entretanto, na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ambos os extratos aumentaram expressivamente a proporção de células sem inclusões (~57% para E-CBN e ~58% para E-CBN+), superando inclusive o desempenho de E-THC sugerindo que CBN pode exercer ação antiagregante em concentrações mais altas.

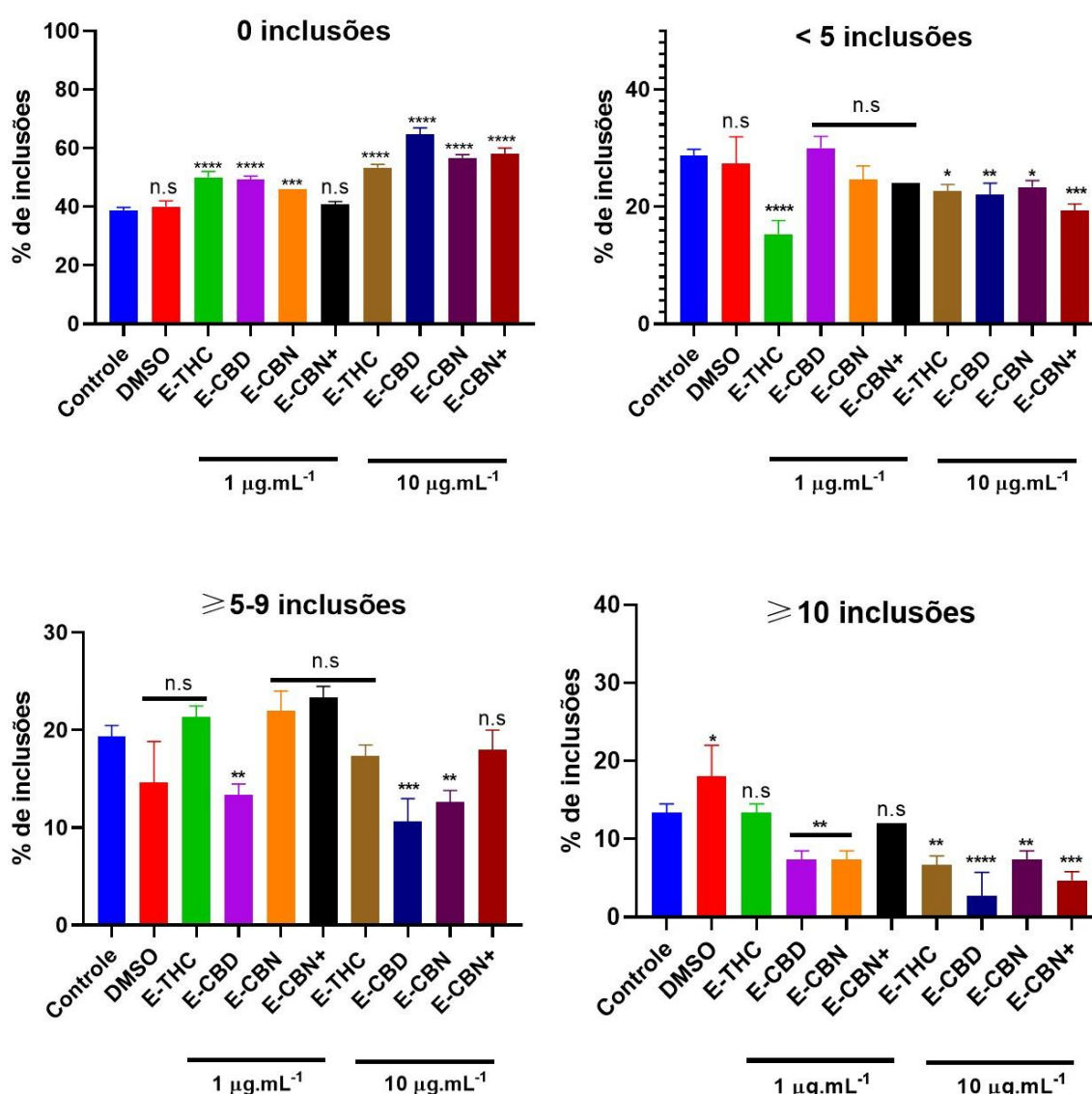


Figura 40. Potencial dos extratos de *C. sativa* na modulação da agregação de aSyn em células H4 avaliado por microscopia de fluorescência. Células de neuroglioma humano H4 foram submetidas ao modelo experimental de agregação de aSyn baseado na coexpressão da forma truncada da aSyn (SynT) em conjunto com a sinfilina-1, conforme descrito previamente na literatura.

Após a expressão das proteínas heterólogas, as células foram tratadas com os extratos de *C. sativa* nas condições experimentais estabelecidas (1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por 24 h). A agregação de aSyn foi avaliada por microscopia de fluorescência, seguida da quantificação do número de inclusões intracelulares por célula. Foram conduzidos três experimentos independentes, sendo analisadas 50 células por experimento. As células foram classificadas em grupos distintos de acordo com o padrão de inclusões observado: ausência de inclusões (0), menos de 5 inclusões (< 5), entre 5 e 9 inclusões ($\geq 5-9$) e 10 ou mais inclusões (≥ 10). Os resultados foram expressos como a distribuição das células entre as diferentes categorias de inclusão. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Dunnett, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), em comparação com o respectivo controle.

Quanto ao grupo de células contendo menos de 5 inclusões (< 5 inclusões), os controles (controle de H4 e veículo) apresentaram médias semelhantes (29% e 27,5% de células, respectivamente). Na concentração de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ E-THC diminuiu significativamente essa população para cerca de 15,5%, enquanto os outros extratos (E-CBD, E-CBN e E-CBN+) não mostraram redução significativa. Na concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ todos os extratos reduziram de forma significativa as células com < 5 inclusões, com valores próximos entre si: E-THC, E-CBD e E-CBN apresentaram aproximadamente 23% de redução, enquanto E-CBN+ apresentou 19,5%.

Para o padrão de 5 a 9 inclusões, nenhuma diferença foi observada entre os controles. E-THC e E-CBN+ mantiveram valores semelhantes aos controles em ambas as concentrações. E-CBN também não mostrou diferença relevante na concentração de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; no entanto, em 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mostrou uma discreta redução de 19% para 13%. O extrato E-CBD, novamente, exibiu o efeito mais pronunciado, reduzindo o número de células com 5-9 inclusões para aproximadamente 13,5% com 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para aproximadamente 11% com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; indicando uma redução efetiva na progressão da agregação.

Aproximadamente 13% das células do grupo controle e do controle com DMSO apresentaram dez ou mais inclusões (≥ 10 inclusões). Para a concentração de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ E-THC e E-CBN+ foram incapazes de reduzir o número de células identificadas com inclusões (~13,5% e 12%, respectivamente). Em contrapartida, E-CBD e E-CBN reduziram expressivamente o número de células com 10 ou mais inclusões para aproximadamente 7,5%, indicando um efeito protetor mais pronunciado mesmo em baixa concentração. Na concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, todos os extratos apresentaram redução estatisticamente significativa no número de

células com ≥ 10 inclusões. O extrato E-CBD mostrou o efeito mais efetivo, diminuindo essa população para aproximadamente 3%, enquanto E-THC, E-CBN e E-CBN+ apresentaram valores de aproximadamente 7%, 7,5% e 5%, respectivamente. Esses resultados sugerem que todos os extratos de *C. sativa* podem interferir na formação ou estabilização de agregados de aSyn, embora o extrato rico em CBD apresente a ação mais robusta e dose-dependente.

De maneira geral, todos os extratos de *C. sativa* melhoraram a capacidade das células de prevenir ou remover as inclusões de aSyn, sendo que a concentração mais alta ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) promoveu os melhores resultados para todos os tratamentos (Figura 40). No entanto, observou-se que o extrato rico em THC (E-THC) aparentemente foi mais eficiente em corrigir ou prevenir a formação de inclusões em células com poucos ou zero agregados. Na presença de muitas inclusões, seu papel antiagregante não foi tão pronunciado, exceto em células com as mais de 10 inclusões na concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Com relação à quantidade de inclusões por célula, os tratamentos influenciaram significativamente esse parâmetro. Com exceção dos extratos E-THC e E-CBN+ (ambos na concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), todos os demais reduziram significativamente o número de células com 10 ou mais inclusões, especialmente em $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; sugerindo uma forte interferência dos extratos nos mecanismos de formação e maturação das inclusões proteicas.

Os canabinoides exercem seus efeitos através da modulação do sistema endocanabinoide, composto principalmente pelos receptores CB₁ e CB₂ (Behl et al., 2022; Mackie, 2005; Onaivi et al., 2006), além dos canais TRPV1 (do inglês, *Transient Receptor Potential Vanilloid type 1*) (Erustes et al., 2025; Behl et al., 2022; Sugiura et al., 1995; Devane et al., 1992). O CB₁R é amplamente expresso no córtex, hipocampo e gânglios da base, enquanto o CB₂R, originalmente descrito em células imunocompetentes (linfócitos, neutrófilos e monócitos), também é encontrado em regiões cerebrais, incluindo o hipotálamo e a substância nigra (Behl et al., 2022; Mackie, 2005; Onaivi et al., 2006). Estudos recentes demonstraram que os canabinoides também interagem com o canal TRPV1, um canal catiônico altamente expresso em neurônios, astrócitos e micróglia (Wi, 2020), e participa na ativação pós-sináptica das vias sensíveis a Ca^{2+} (Erustes et al., 2025; Edwards et al., 2014). Além disso, os endocanabinoides AEA e 2-AG modulam os receptores

CB₁ e CB₂ e ativam TRPV1 (Behl et al., 2022). A produção destes endocanabinoides pode ser estimulada pelos fitocanabinoides via ativação dos receptores canabinoides ou via inibição de FAAH (que é responsável pela degradação de AEA), por exemplo (Chung et al., 2019; Lapraire et al., 2015). O THC é considerado um agonista exógeno do receptor CB₁, ligando-se a este receptor em um sítio ortoestérico, e seu efeito psicoativo parece estar relacionado a esta forte interação. Por outro lado, estudos têm mostrado que o CBD interage com o CB₁R em um sítio alostérico, mudando a conformação deste receptor e reduzindo a eficácia do THC. Essa interação antagônica do CBD sobre o THC tem sido muito debatida nos últimos anos, mas ainda não está completamente elucidada (Bennici et al., 2021; Chung et al., 2019; Morales et al., 2016; Lapraire et al., 2015).

O extrato E-CBD foi o mais efetivo contra a formação de inclusões de aSyn em ambas as concentrações, mas especialmente na concentração de 10 µg.mL⁻¹, promovendo um aumento do número de células sem inclusões e uma redução dose-dependente do número de inclusões intracelulares. Já está bem estabelecido que o CBD pode modular as atividades de CB₁R, CB₂R, TRPV1 e FAAH (Peres et al., 2018; Patricio et al., 2020; Mujahid et al., 2025; Bisogno et al., 2001), além de atuar sobre outros alvos como receptores δ-opioid e 5-HT_{1A} serotoninérgicos (Kathmann et al., 2006). Uma vez que CBD pode modular diferentes alvos, o mecanismo exato pelo qual o CBD reduz a agregação de aSyn ainda requer elucidação. Um estudo recente de Erustes e colaboradores investigaram a relação entre o CBD e a aSyn via autofagia *in vitro*, e concluiu que o CBD induziu a autofagia em células SH-SY5Y com acúmulo de aSyn selvagem; e o fluxo autofágico aumentado promoveu a redução do número de aSyn citosólica (Erustes et al., 2025). O mesmo estudo também demonstrou que esses efeitos foram mediados pela ativação de CB₁R. Complementarmente, outro estudo destacou que o CBD foi capaz de reverter alterações no comportamento locomotor e na morfologia de neurônios após exposição de cepas de *Caenorhabditis elegans* à reserpina (alcaloide que bloqueia transportadores de monoaminas, impedindo a liberação normal de neurotransmissores importantes, e por este motivo é usada como indutor de DP em animais), reduzindo a toxicidade induzida por aSyn reforçando seu potencial neuroprotetor e modulador de proteostase (Da Cruz Guedes et al., 2023).

Embora o E-THC tenha demonstrado um efeito protetor mais discreto, aumentando o número de células sem inclusões e reduzindo o número de células com menos de 5 inclusões em ambas as concentrações, seu potencial antiagregante aparentemente foi mitigado em células com números elevados de inclusões. Isto pode sugerir a possibilidade do THC atuar com mais eficiência na prevenção da formação de agregados e não na limpeza de células com inclusões já formadas. Entretanto, não há nada na literatura que sustente a hipótese de que o Δ^9 -THC interfira diretamente na agregação de proteínas, indicando que qualquer modulação da proteostase observada neste estudo deve ser interpretada como um efeito indireto ou ainda como uma possibilidade a ser investigada em experimentos específicos. No entanto, sua atuação parece alinhar-se principalmente aos mecanismos neuroprotetores já descritos para fitocanabinoides, os quais incluem modulação do sistema endocanabinoide, redução de estresse oxidativo e supressão de respostas inflamatórias (Hasbi; George, 2025; Paes-Colli et al., 2022).

Já os extratos ricos em CBN (E-CBN e E-CBN⁺) apresentaram atividade dependente da dose, sendo mais eficazes em concentrações mais altas, o que é coerente com relatos recentes de que o CBN, produto oxidado do THC, possui efeitos neuroprotetores e antioxidantes capazes de preservar a função mitocondrial (Silvestro et al., 2025; Dar et al., 2025). Embora ambos os extratos E-CBN e E-CBN⁺ apresentem CBN como canabinoide majoritário, suas composições químicas são distintas. E-CBN⁺ exibe dois picos adicionais no cromatograma. De acordo com a literatura, a hipótese é de que esses picos corresponderiam a fitocanabinoides ácidos, e estes podem estar interferindo nos efeitos avaliados. No entanto, é importante ressaltar que não é possível afirmar, sem o comparativo com padrões, que essas bandas pertencem a estes canabinoides, podendo corresponder, inclusive, a outras classes de moléculas. Já o E-CBN contém pequenas proporções de THC (4,29%) e CBD (2,08%), que podem atuar sinergicamente com o CBN por meio do efeito comitiva (*entourage effect*), fenômeno descrito para interações entre diferentes canabinoides (efeito *intra-entourage*) e entre canabinoides e outras classes de fitoquímicos (efeito *inter-entourage*), como terpenos e flavonoides (Stasiłowicz et al., 2021; Ferber et al., 2020).

Os terpenos, por exemplo, podem modular a afinidade e a bioatividade dos canabinoides em receptores CB₁ e TRPV1, ampliando ou modulando seus efeitos farmacológicos (Stasiłowicz et al., 2021; Russo et al., 2011; Walentiny et al., 2011). Recentemente, um estudo avaliou os extratos de *C. sativa* *in vivo* e *in vitro* e sugeriu que a eficácia anti-inflamatória e antidepressiva está associada à interação sinérgica entre múltiplos compostos bioativos da planta, reforçando a importância do perfil fitoquímico completo para a atividade neuroprotetora observada (Shin et al., 2024).

Esses resultados, em conjunto, indicam que os fitocanabinoides podem interferir no ciclo de agregação da aSyn, possivelmente atuando tanto na fase inicial de oligomerização quanto na estabilização de agregados já formados, além de modular vias celulares associadas à degradação proteica e ao controle redox. O conjunto dos resultados obtidos neste modelo humano corrobora e amplia os achados observados nos experimentos com *S. cerevisiae*, sugerindo que os extratos de *C. sativa* exercem efeitos multifacetados sobre os mecanismos de agregação proteica e estresse oxidativo celular. A redução consistente no número de inclusões intracelulares em células tratadas com os extratos está de acordo com o potencial antioxidante previamente evidenciado nas cepas BY4741 e $\Delta yap1$, onde os mesmos extratos reduziram a oxidação intracelular e preservaram a viabilidade celular sob condições de estresse oxidativo.

A inabilidade dos extratos em restaurar o potencial de membrana mitocondrial nas leveduras com aSyn, contrastando com a redução significativa das inclusões proteicas nas células H4, sugere que os mecanismos de toxicidade e proteção dependem do contexto celular. Em *S. cerevisiae*, a citoproteção canabinoide parece depender mais da resposta antioxidante e da homeostase redox global, mediada por fatores como Yap1p e enzimas antioxidantes mitocondriais (Su et al., 2010). Já nas células H4 os resultados apontam para uma ação direta dos fitocanabinoides sobre vias de controle de proteostase e autofagia, reduzindo a carga de agregados de aSyn, em especial pelo CBD, que demonstrou o efeito mais robusto. Esses achados alinham-se ao estudo de Erustes et al. (2025), demonstrando que o CBD ativa CB₁R e TRPV1, induz autofagia e reduz o acúmulo de aSyn em células humanas SH-SY5Y; e ao trabalho de Da Cruz Guedes et al. (2023), que

observaram efeito neuroprotetor do CBD contra a toxicidade induzida por aSyn em *C. elegans*.

Assim, é plausível que o efeito protetor dos extratos de *C. sativa* em células H4 envolva a modulação do sistema endocanabinoide, levando à ativação coordenada de vias de sinalização associadas à autofagia, à regulação do cálcio intracelular (via TRPV1) e à redução de ROS; culminando em menor formação de inclusões proteicas e maior estabilidade celular.

A comparação entre os dois modelos biológicos evidencia ainda que; enquanto *S. cerevisiae* permite avaliar com precisão os efeitos mitocondriais e oxidativos iniciais da toxicidade proteica, o modelo H4 revela o impacto dos canabinoides sobre mecanismos humanos de degradação proteica e dinâmica de inclusões, oferecendo uma visão integrada da ação neuroprotetora multifatorial dos fitocanabinoides. Em conjunto, os resultados reforçam o potencial de compostos derivados de *C. sativa* como moduladores da proteostase e da função mitocondrial, aspectos centrais na fisiopatologia da DP e de outras sinucleinopatias. Esses resultados reforçam o potencial terapêutico de extratos canabinoides multicomponentes na prevenção da formação de agregados patológicos de aSyn; e apontam para a necessidade de se investigar os mecanismos moleculares subjacentes, particularmente no que se refere à ativação de vias antioxidantes endógenas (como Nrf2/ARE), e à regulação de autofagia e degradação proteica.

5. CONCLUSÕES

Cannabis sativa é uma planta com uma composição única devido à alta presença de canabinoides. Os perfis químicos dos extratos destacaram a presença de canabinoides neutros (THC, CBD e CBN) em sua composição, o que é coerente com o método de extração adotado neste trabalho. Neste estudo, quatro extratos de *Cannabis sativa* ricos em diferentes fitocanabinoides (THC, CBD e CBN) revelaram comportamento não tóxico às células de *S. cerevisiae*, conforme atestado nos ensaios de toxicidade realizados (resazurina, curva de crescimento e viabilidade celular), tanto na cepa controle (BY4741) quanto na cepa mutante ($\Delta yap1$), em concentrações abaixo de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Nos ensaios antioxidantes (viabilidade celular com peróxido de hidrogênio e oxidação intracelular), ficou evidente que os extratos de *C. sativa* exercem notável ação protetora nas cepas BY4741 e $\Delta yap1$, especialmente na cepa mutante, demonstrando atuarem de maneira independente do sistema de defesa antioxidante endógeno da levedura, uma vez que a cepa mutante possui o fator de transcrição do sistema de defesa antioxidante deletado. Além disso, os extratos também apresentaram capacidade de controlar e até mesmo reverter os danos causados pela proteína aSyn e o peptídeo A β 42 no ambiente redox intracelular. Este potencial antioxidante dos extratos parece ser independente dos seus perfis químicos, uma vez que os canabinoides majoritários envolvidos podem atuar de maneira semelhante nas reações antioxidantes. A redução no ambiente oxidativo intracelular no modelo *Saccharomyces cerevisiae* expressando aSyn e A β 42 indicou que os extratos (E-THC, E-CBD, E-CBN e E-CBN+) podem contribuir na manutenção da homeostase redox intracelular, minimizando efeitos potenciais relacionados ao desenvolvimento de DP e DA.

Os extratos, no entanto, não promoveram proteção mitocondrial após dano induzido pela toxicidade da aSyn em células de levedura, em contraste com a proteção mitocondrial observada após indução pelo peptídeo A β 42, indicando uma forte seletividade no mecanismo de proteção mitocondrial, sugerindo que a ação dos extratos está mais alinhada com a mitigação de estresse oxidativo gerado por agregados proteicos que impactam predominantemente vias citoplasmáticas do que com interferência nos processos internos mitocondriais complexos causados pela aSyn.

Além disso, os extratos também foram efetivos em reduzir o número de inclusões de aSyn no citoplasma de células H4 (neuroglioma) e em aumentar o número de células humanas expressando aSyn livres de inclusões, uma característica predominante em pacientes com doença de Parkinson. Estes achados sugerem que apesar de os extratos de *C. sativa* apresentarem efeitos promissores na modulação de inclusões de aSyn e proteção antioxidante intracelular, os mecanismos de ação sinérgica destes extratos com relação à proteção mitocondrial ainda precisam ser investigados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, D. I. et al. Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: A randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, v. 68, p. 515–521, 2007.

ABRAMS, D. I.; GUZMAN, M. Cannabis in cancer care. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 97, p. 575–586, 2015.

ACADEMIA BRASILEIRA DE CANABINOIDES. Doses dos Canabinoides: Uma Abordagem Personalizada. Disponível em: <https://academiadecanabinoides.com.br/blog-post2>. Acesso em: 24 nov. 2025.

ADDI, P. W. et al. Microwave- and Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids and Terpenes from Cannabis Using Response Surface Methodology. *Molecules*, v. 27, n. 24, p. 8803, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27248803>.

ADDI, P. W. et al. Relationship between Total Antioxidant Capacity, Cannabinoids and Terpenoids in Hops and Cannabis. *Plants*, v. 12, n. 6, p. 1225, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12061225>.

AGÊNCIA BRASIL. Alzheimer: condição afeta 1,2 milhão de pessoas no Brasil. Agência Gov, 08 out. 2023. Disponível em: <https://agenciagov.ebc.com.br/noticias/202310/alzheimer-condicao-afeta-1-2-milhao-de-pessoas-no-brasil>. Acesso em: 19 nov. 2025.

ALBERT, K. et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor reduces α -synuclein aggregation and propagation and alleviates behavioral alterations in vivo. *Molecular Therapy*, v. 29, n. 9, p. 2821–2840, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.035>.

ALVAREZ-CASTELAO, B.; CASTAÑO, J. G. Synphilin-1 inhibits alpha-synuclein degradation by the proteasome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 68, n. 15, p. 2643–2654, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0592-3>.

ALZHEIMER'S DISEASE. *Frontiers in Public Health*, v. 12, p. 1453489, 2024. DOI: 10.3389/fpubh.2024.1453489.

AMARAL, L. et al. A versatile yeast model identifies the pesticides cymoxanil and metalaxyl as risk factors for synucleinopathies. *Chemosphere*, v. 364, p. 143039, 2024.

ANDRADE, S. et al. Therapeutic potential of natural compounds in neurodegenerative diseases: insights from clinical trials. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 212, 2023.

ANDRÉ, R. et al. The entourage effect in cannabis medicinal products: A comprehensive review. *Pharmaceutics*, v. 17, n. 11, p. 1543, 2024.

APPENDINO, G. The early history of cannabinoid research. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, v. 31, p. 919–929, 2020. DOI: 10.1007/s12210-020-00956-0.

ARAKI, W. A β oligomer toxicity-reducing therapy for the prevention of Alzheimer's disease: importance of the Nrf2 and PPAR γ pathways. *Cells*, v. 12, n. 10, p. 1386, 2023.

ARIENTI, F. et al. Family history in Parkinson's disease: a national cross-sectional study. *Movement Disorders Clinical Practice*, v. 11, n. 11, p. 1434–1440, 2024.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. Doença de Alzheimer. BVS Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/doenca-de-alzheimer-3/>. Acesso em: 24 nov. 2025.

ATALAY, S.; JAROCKA-KARPOWICZ, I.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants*, v. 9, n. 1, p. 21, 2019. DOI: 10.3390/antiox9010021.

ATLANTE, A. et al. Dysfunction of mitochondria in Alzheimer's disease: ANT and VDAC interact with toxic proteins and aid to determine the fate of brain cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 14, p. 7722, 2022.

AZARGOONJAHROMI, A. The duality of amyloid- β : its role in normal and Alzheimer's disease states. *Molecular Brain*, v. 17, p. 44, 2024. DOI: 10.1186/s13041-024-01118-1.

BALASH, Y. et al. Medical cannabis in Parkinson disease: real-life patients' experience. *Clinical Neuropharmacology*, v. 40, p. 268–272, 2017.

BALDENSPERGER, T.; PREISLER, M.; BECKER, C. F. W. Non-enzymatic posttranslational protein modifications in protein aggregation and neurodegenerative diseases. *RSC Chemical Biology*, v. 6, n. 2, p. 129–149, 2025.

BAMFORD, R. A. et al. The interaction between contactin and amyloid precursor protein and its role in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v. 424, p. 184–202, 2020.

BANKS, C. J. et al. Acylation of superoxide dismutase 1 (SOD1) at K122 governs SOD1-mediated inhibition of mitochondrial respiration. *Molecular and Cellular Biology*, v. 37, n. 20, p. e00354-17, 2017.

BARBOSA, A. et al. O potencial terapêutico do canabidiol em doenças neurodegenerativas. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, v. 10, n. 1, p. 84–103, 2021.

BAR-LEV SCHLEIDER, L.; ABUHASIRA, R.; NOVACK, V. Medical cannabis: aligning use to evidence-based medicine approach. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 84, n. 11, p. 2458–2462, 2018. DOI: 10.1111/bcp.13657.

BAR-SELA, G. et al. The medical necessity for medicinal cannabis: prospective, observational study evaluating the treatment in cancer patients on supportive or

palliative care. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 510392, 2013.

BAYANDINA, S. V.; MUKHA, D. V. Saccharomyces cerevisiae as a model for studying human neurodegenerative disorders: viral capsid protein expression. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 24, p. 17213, 2023. DOI: 10.3390/ijms242417213.

BAYATI, A.; MCPHERSON, P. S. Alpha-synuclein, autophagy-lysosomal pathway, and Lewy bodies: mutations, propagation, aggregation, and the formation of inclusions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 300, n. 10, p. 107742, 2024. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.107742.

BEHL, T. et al. Exploration of multiverse activities of endocannabinoids in biological systems. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, p. 5734, 2022. DOI: 10.3390/ijms23105734.

BÉNARD, G. et al. Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature Neuroscience*, v. 15, n. 4, p. 558–564, 2012.

BENDER, V. A. et al. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 16, p. 4166–4177, 2006.

BENNICI, A. et al. Safety of medical cannabis in neuropathic chronic pain management. *Molecules*, v. 26, p. 6257, 2021.

BEN-SHLOMO, Y. et al. The epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet*, v. 403, n. 10423, p. 283–292, 2024.

BENSKEY, M. J.; PEREZ, R. G.; MANFREDSSON, F. P. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function – implications for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 137, n. 3, p. 331–359, 2016.

BERNAL-CONDE, L. D. et al. Alpha-synuclein physiology and pathology: a perspective on cellular structures and organelles. *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, p. 1399, 2020.

BHATIA, S. et al. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: opportunities for drug development. *Current Neuropharmacology*, v. 20, n. 4, p. 675–692, 2022. DOI: 10.2174/1570159X19666210517114016.

BHUNIA, Sukanya et al. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: A comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 989717, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.989717.

BIR, A. et al. α -Synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells: implications in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 131, n. 6, p. 868–877, 2014. DOI: 10.1111/jnc.12966.

BISI, Nicolò et al. α -Synuclein: an all-inclusive trip around its structure, influencing factors and applied techniques. *Frontiers in Chemistry*, v. 9, p. 666585, 2021.

BISOGNO, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, p. 845–852, 2001. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704327.

BITACURA, J. G. The use of Baker's yeast in the resazurin reduction test: a simple, low-cost method for determining cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Microbiology & Biology Education*, v. 19, 2018. DOI: 10.1128/jmbe.v19i2.1599.

BLAL, K. et al. The effect of cannabis plant extracts on head and neck squamous cell carcinoma and the quest for cannabis-based personalized therapy. *Cancers*, v. 15, n. 2, p. 497, 2023. DOI: 10.3390/cancers15020497.

BONN-MILLER, M. O.; BABSON, K. A.; VANDREY, R. Using cannabis to help you sleep: heightened frequency of medical cannabis use among those with PTSD. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 136, p. 162–165, 2014.

BORGES, R. S. et al. Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. *Molecules*, v. 18, n. 10, p. 12663–12674, 2013. DOI: 10.3390/molecules181012663.

BORILLE, B. T. *Caracterização química da planta Cannabis sativa L. a partir de sementes apreendidas pela Polícia Federal no estado do Rio Grande do Sul*. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

BOVOLENTA, Tânia Maria et al. Average annual cost of Parkinson's disease in a Brazilian multiethnic population. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 117, p. 105897, 2023.

BRAIDA, D. et al. Post-ischemic treatment with cannabidiol prevents electroencephalographic flattening, hyperlocomotion and neuronal injury in gerbils. *Neuroscience Letters*, v. 346, p. 61–64, 2003.

BRAISSANT, O.; ASTASOV-FRAUENHOFFER, M.; WALTIMO, T.; BONKAT, G. A review of methods to determine viability, vitality, and metabolic rates in microbiology. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 547458, 2020.

BRÁS, I. C. et al. Yeast-based screens to target alpha-synuclein toxicity. *Methods in Molecular Biology*, v. 1948, p. 145–156, 2019.

BRÁS, Inês Caldeira et al. Common molecular mechanisms underlie the transfer of alpha-synuclein, Tau and huntingtin and modulate spontaneous activity in neuronal cells. *bioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.07.18.452825.

BRAUN, M. Selective activation of cannabinoid receptor-2 reduces neuroinflammation after traumatic brain injury via alternative macrophage polarization. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 68, p. 224–237, 2018.

BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules*, v. 25, n. 24, p. 1–28, 2020.

BREIVOGEL, C. S.; CHILDERS, S. R. Cannabinoid agonist signal transduction in rat brain: comparison of cannabinoid agonists in receptor binding, G-protein activation, and adenylyl cyclase inhibition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 295, n. 1, p. 328–336, 2000.

BREIVOGEL, C. S.; CHILDERS, S. R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiology of Disease*, v. 5, n. 6, p. 417–431, 1998.

BRIAND-MÉSANGE, Fabienne et al. From classical to alternative pathways of 2-arachidonoylglycerol synthesis: AlterAGs at the crossroad of endocannabinoid and lysophospholipid signaling. *Molecules*, v. 29, n. 15, p. 3694, 2024.

BRUNI, A. C.; BERNARDI, L.; GABELLI, C. From beta amyloid to altered proteostasis in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, v. 64, p. 101126, 2020.

BRUSA, Paola; BARATTA, Francesca; COLLINO, Massimo; BEN-SHABAT, Shimon. Medicinal cannabis: evolution of therapeutic use, future approaches and other implications. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.999068.

BURRÉ, Jacqueline; SHARMA, Manu; SÜDHOF, Thomas C. Cell biology and pathophysiology of α -synuclein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 3, p. a024091, 2018.

BUSTI, S.; COCCETTI, P.; ALBERGHINA, L.; VANONI, M. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors*, v. 10, n. 6, p. 6195–6240, 2010.

BUTTERFIELD, D. Allan; BOYD-KIMBALL, Debra. Oxidative stress, amyloid- β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 62, n. 3, p. 1345–1367, 2018.

CAMARGO, F. D. G. et al. Genome-scale metabolic reconstruction, non-targeted LC-QTOF-MS based metabolomics data, and evaluation of anticancer activity of *Cannabis sativa* leaf extracts. *Metabolites*, v. 13, n. 7, p. 788, 2023.

CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 119–127, 2016.

CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v. 55, n. 4, p. 314–317, 2006. DOI: 10.1590/S0047-20852006000400008.

CARTER, G. T. et al. Cannabis in palliative medicine: improving care and reducing opioid-related morbidity. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*, v. 28, p. 297–303, 2011.

CARVALHO, V. M. Farmacocannabis – UFRJ: the first laboratory in Brazil to analyze therapeutic products derived from *Cannabis*. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, v. 4, n. 16, p. 44–49, 2017.

CÁSEDAS, G.; MOLINER, C.; MAGGI, F.; MAZZARA, E.; LÓPEZ, V. Evaluation of two different *Cannabis sativa* L. extracts as antioxidant and neuroprotective agents. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 1009868, 2022.

CASIRAGHI, A. et al. Ultrasound-assisted extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* for medicinal purpose. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 12, p. 2718, 2022.

CASTILLO, A. et al. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors. *Neurobiology of Disease*, v. 37, p. 434–440, 2010.

CHANDRA, H. et al. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials: a review. *Plants*, v. 6, n. 2, p. 16, 2017.

CHARITOS, I. A. et al. The cannabis spread throughout the continents and its therapeutic use in history. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets*, v. 21, n. 3, p. 407–417, 2021.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products: theory, applications, and guidelines. *Ultrason Sonochem.*, v. 34, p. 540–560, 2017.

CHEN, G. F. et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 38, n. 9, p. 1205–1235, 2017.

CHEN, S. et al. Investigation of cannabidiol-induced cytotoxicity in human hepatic cells. *Toxicology*, v. 506, p. 153884, 2024. DOI: 10.1016/j.tox.2024.153884.

CHENG, H.; FIERRO, A.; PESSOA-MAHANA, C. D. Cannabidiol binding and negative allosteric modulation at the cannabinoid type 1 receptor in the presence of delta-9-tetrahydrocannabinol: an in silico study. *PLoS ONE*, v. 14, n. 7, e0220025, 2019.

CHOI, E. H.; KIM, M. H.; PARK, S. J. Targeting mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species for neurodegenerative disease treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 14, p. 7952, 2024.

CHOPRA, I. C.; CHOPRA, R. N. The use of cannabis drugs in India. ***Bulletin on Narcotics***, p. 4–29, 1957.

CHRISTENSEN, C. *et al.* Decoding the postulated entourage effect of medicinal cannabis: what it is and what it isn't. ***Biomedicines***, v. 11, n. 8, p. 2323, 2023.

CHUNG, C. G.; LEE, H.; LEE, S. B. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v. 75, n. 17, p. 3159-3180, 2018.

CITTI, C. *et al.* Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 149, p. 532-540, 2018.

COLEMAN, S. T.; EPPING, E. A.; STEGGERDA, S. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. Yap1p ativa a transcrição do gene de uma forma específica de oxidante. ***Molecular and Cellular Biology***, v. 19, p. 8302-8313, 1999.

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***, v. 57, n. 11, p. 4878-4890, 2020.

COTA, D. *et al.* The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. ***The Journal of Clinical Investigation***, v. 112, n. 3, p. 423-431, 2003.

CROCQ, M. A. History of cannabis and the endocannabinoid system. ***Dialogues in Clinical Neuroscience***, v. 22, n. 3, p. 223-228, 2020.

CYR, C. *et al.* Cannabis in palliative care: current challenges and practical recommendations. ***Annals of Palliative Medicine***, v. 7, p. 463–477, 2018.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. ***Nature Reviews Molecular Cell Biology***, v. 8, n. 10, p. 813-824, 2007.

DA CRUZ GUEDES, E. *et al.* Cannabidiol recovers dopaminergic neuronal damage induced by reserpine or aSyn in *Caenorhabditis elegans*. ***Neurochemical Research***, 2023. DOI: 10.1007/s11064-023-03905-z.

DA SILVA, E. V. *et al.* Características sociais, demográficas e prevalência de doença de Alzheimer em idosos na população brasileira: uma revisão de literatura. In: ***Anais do Congresso de Geriatria e Gerontologia do UNIFACIG***, 2020.

DALLABRIDA, K. G. *et al.* Endocannabinoid system changes throughout life: implications and therapeutic potential for autism, ADHD, and Alzheimer's disease. ***Brain Sciences***, v. 14, n. 6, p. 592, 2024.

DAR, N. J. et al. Cannabinol (CBN) alleviates age-related cognitive decline by improving synaptic and mitochondrial health. *Redox Biology*, v. 84, p. 103692, 2025.

DAUPHINOT, V. et al. Economic and caregiver impact of Alzheimer's disease across the disease spectrum: a cohort study. *Alzheimer's Research & Therapy*, v. 14, n. 1, p. 34, 2022.

DAWIDOWICZ, A. L.; OLSZOWY-TOMCZYK, M.; TYPEK, R. CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia*, v. 152, p. 104915, 2021.

DE FALCO, A. et al. Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives. *Química Nova*, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016.

DE FAZIO, S. et al. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*, v. 480, n. 7376, p. 259–263, 2011. DOI: 10.1038/nature10547.

DELAUNAY, A.; ISNARD, A.-D.; TOLEDANO, M. B. Detecção de H_2O_2 através da oxidação do fator de transcrição Yap1. *EMBO Journal*, v. 19, p. 5157-5166, 2000.

DELAUNAY, A.; PFLIEGER, D.; BARRAULT, M.-B.; VINH, J.; TOLEDANO, M. B. Um tiol peroxidase é um receptor de H_2O_2 e um transdutor redox na ativação do gene. *Cell*, v. 111, p. 471-481, 2002.

DELENCLOS, M. et al. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of Neurochemistry*, v. 150, n. 5, p. 566-576, 2019.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, v. 109, p. 212–228, 2015.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DI GIACOMO, V. et al. Antioxidant and neuroprotective effects induced by cannabidiol and cannabigerol in rat CTX-TNA2 astrocytes and isolated cortexes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 10, p. 3575, 2020.

DI MAIO, R. et al. α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, v. 8, 2016. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf3634.

DI MARZO, V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, p. 134–140, 2006.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoid research—going back and looking forward. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 13, n. 11, p. 757-764, 2012.

DING, H. et al. Asiatic acid prevents oxidative stress and apoptosis by inhibiting the translocation of α -synuclein into mitochondria. *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, p. 431, 2018.

DOMINGUEZ-MEIJIDE, A. et al. Effects of pharmacological modulators of α -synuclein and tau aggregation and internalization. *Scientific Reports*, v. 10, p. 12827, 2020.

DU, H.; YAN, S. S. Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1802, n. 1, p. 198–204, 2010.

EDWARDS, J. G. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. In: **ABDEL-SALAM, O. (ed.).** *Capsaicin as a Therapeutic Molecule*. Progress in Drug Research, v. 68. Basel: Springer, 2014.

ELEUTHERIO, E. C. A. et al. SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 697, p. 108701, 2021.

ELIAS, Josemar da Silva Junior; OLIVEIRA, Bernardina Maria Juvenal Freire de; BARBOSA, Maria Nilza Rosa. Anseios e devaneios: a memória social envolta ao progresso de legalização da maconha para fins medicinais no Brasil. *Perspectivas em Ciência da Informação*, v. 25, n. 3, p. 63-81, 2020.

ELSohly, M. A.; GUL, W. Constituents of *Cannabis sativa*. In: PERTWEE, R. G. (ed.). *Handbook of Cannabis*. Oxford: Oxford University Press, 2021. p. 3–22.

ELSOHLY, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, v. 78, n. 5, p. 539-548, 2005. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.09.011.

EMAMZADEH, F. N. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of Research in Medical Sciences*, v. 21, p. 29, 2016. DOI: 10.4103/1735-1995.181989.

EPREMYAN, K. K.; MAMAEV, D. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Alzheimer's disease: Significant Benefit from the Yeast-Based Models. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 12, p. 9791, 2023. DOI: 10.3390/ijms24129791.

ERUSTES, A. G. et al. Cannabidiol induces autophagy via CB1 receptor and reduces α -synuclein cytosolic levels. *Brain Research*, v. 1850, p. 149414, 2025. DOI: 10.1016/j.brainres.2024.149414.

ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neuroscience Letters*, v. 99, p. 91–95, 2006.

EYAL, A. et al. Synphilin-1A: an aggregation-prone isoform of synphilin-1 that causes neuronal death and is present in aggregates from alpha-synucleinopathy patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 15, p. 5917–5922, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0509707103.

FERBER, S. G. et al. The “entourage effect”: Terpenes coupled with cannabinoids for the treatment of mood disorders and anxiety disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 18, p. 87–96, 2020. DOI: 10.2174/1570159X17666190903103923.

FERNÁNDEZ-MONCADA, I. et al. Type-1 cannabinoid receptors and their ever-expanding roles in brain energy processes. **Journal of Neurochemistry**, v. 168, n. 5, p. 693-703, 2024.

FIDAN, M.; SÜZERER, V.; ONAY, A. *Cannabis sativa* L.: origin, distribution, taxonomy and biology. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://derleme.gen.tr/index.php/derleme/article/view/454>.

FINLAY, D. B. et al. Terpenoids from cannabis do not mediate an entourage effect by acting at cannabinoid receptors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 359, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00359.

FIŠAR, Z.; SINGH, N.; HROUDOVÁ, J. Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. **Toxicology Letters**, v. 231, n. 1, p. 62-71, 2014.

FONSECA, Carlos D. F.; ZENDULKA, Ondřej; JUŘICA, Jan. Cannabinoids and the endocannabinoid system in the regulation of cytochrome P450 metabolic activity—a review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 16, p. 1599012, 2025.

FORMAN, H. J. Glutathione – From antioxidant to post-translational modifier. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 64-67, 2016.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689-709, 2021. DOI: 10.1038/s41573-021-00233-1.

FRAGOSO, Y. D.; CARRA, A.; MACIAS, M. A. Cannabis and multiple sclerosis. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 20, p. 849–854, 2020.

FRANÇA, M. B.; LIMA, K. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1442-1452, 2017.

FREEMAN, T. P.; HINDOCHA, C.; GREEN, S. F.; BLOOMFIELD, M. A. P. Medicinal use of cannabis-based products and cannabinoids. **BMJ**, v. 365, p. l1141, 2019. DOI: 10.1136/bmj.l1141.

GAGNE, S. J. et al. Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 31, p. 12811–12816, 2012.

GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of parkinsonism. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, n. 7, p. 1459–1474, 2008. DOI: 10.1016/j.clinph.2008.03.017.

GANJAM, G. K. et al. Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. **Cell Death & Disease**, v. 10, p. 865, 2019. DOI: 10.1038/s41419-019-2091-2.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 217–224, 1971.

GARCÍA, C. et al. Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 1495–1506, 2011.

GEIBL, F. F. et al. α -Synuclein pathology disrupts mitochondrial function in dopaminergic and cholinergic neurons at risk in Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 19, p. 69, 2024. DOI: 10.1186/s13024-024-00756-2.

GELFAND, E. V.; CANNON, C. P. Rimonabant: a cannabinoid receptor type 1 blocker for management of multiple cardiometabolic risk factors. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 10, p. 1919–1926, 2006.

GENTILI, M. et al. Selective CB2 inverse agonist JTE907 drives T cell differentiation towards a Treg cell phenotype and ameliorates inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease. **Pharmacological Research**, v. 141, p. 21–31, 2019.

GODOY-MATOS, Amélio F. de et al. O sistema endocanabinóide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 390–399, 2006.

GOEDERT, M. et al. Abandon the NAC in α -synuclein. **The Lancet Neurology**, v. 23, n. 7, p. 669, 2024.

GOMES, F. V.; RESSEL, L. B. M.; GUIMARÃES, F. S. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT_{1A} receptors. **Psychopharmacology**, v. 213, p. 465–473, 2011.

GONG, J.-P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.

GONSIOREK, W.; SWANSON, L. et al. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol binds to human CB2 and demonstrates full agonist activity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 3, p. 861–867, 2000.

ORMAN, M. Sir William Brooke O'Shaughnessy (1809–1889) – medical cannabis pioneer. *Indian Journal of History of Science*, v. 52, n. 2, p. 211–226, 2017.

GRAEFF, Frederico Guilherme. *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. São Paulo: E.P.U., 1989.

GREEN, A. J.; DE-VRIES, K. Cannabis use in palliative care: an examination of the evidence and the implications for nurses. *Journal of Clinical Nursing*, v. 19, p. 2454–2462, 2010.

GUALCO, G. et al. Composite lymphoma: EBV-positive classic Hodgkin lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 17, n. 1, p. 72–76, 2009. DOI: 10.1097/PAI.0b013e31817c551f.

GUARDIA-LAGUARTA, C. et al. α -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *Journal of Neuroscience*, v. 34, p. 249–259, 2014. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014.

GUGLIANDOLO, A. et al. Δ 8-THC protects against amyloid beta toxicity by modulating ER stress *in vitro*: a transcriptomic analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 7, p. 6598, 2023. DOI: 10.3390/ijms24076598.

GÜLCK, T. et al. Phytocannabinoids: origins and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, v. 19, n. 6, p. 1141–1158, 2020.

GULSHAN, K.; ROVINSKY, S. A.; COLEMAN, S. T.; MOYE-ROWLEY, W. S. Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 40524–40533, 2005.

GUPTA, A. et al. The yeast stress-inducible Ssa Hsp70 reduces α -synuclein toxicity by promoting its degradation through autophagy. *PLoS Genetics*, v. 14, n. 10, p. e100, 2018.

GUSTAFSSON, G. et al. Cellular uptake of α -synuclein oligomer-selective antibodies is enhanced by extracellular α -synuclein and mediated by Fc γ receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 37, n. 1, p. 121–131, 2017. DOI: 10.1007/s10571-016-0352-5.

HACKE, A. C. M. et al. Probing the antioxidant activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in *Cannabis sativa* extracts. *Analyst*, v. 144, n. 16, p. 4952–4961, 2019.

HAHM, S. et al. Influence of temperature stress on the major cannabinoid composition in *Cannabis sativa*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, v. 66, n. 1, p. 1-10, 2025.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, v. 297, p. 353-356, 2002.

HASBI, A.; GEORGE, S. R. Multilayered neuroprotection by cannabinoids in neurodegenerative diseases. **Exploration of Neuroprotective Therapy**, v. 5, p. 100498, 2025.

HASHIMOTODANI, Y. et al. Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. **Neuron**, v. 45, n. 2, p. 257-268, 2005.

HAYAKAWA, K. et al. Repeated treatment with cannabidiol but not Δ^9 -tetrahydrocannabinol has a neuroprotective effect without the development of tolerance. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 1079-1087, 2007.

HAYAKAWA, K.; MISHIMA, K.; FUJIWARA, M. Therapeutic potential of non-psychotropic cannabidiol in ischemic stroke. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 2197-2212, 2010.

HENDERSON, M. X.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M.-Y. α -Synuclein pathology in Parkinson's disease and related α -synucleinopathies. **Neuroscience Letters**, v. 709, p. 134316, 2019.
(obs.: referência duplicada, mantive apenas uma – confirme se deseja as duas)

HENG, N. et al. Striatal dopamine loss in early Parkinson's disease: systematic review and novel analysis of dopamine transporter imaging. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 10, n. 4, p. 539–546, 2023. DOI: 10.1002/mdc3.13687.

HENRICH, M. T. et al. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease – a key disease hallmark with therapeutic potential. **Molecular Neurodegeneration**, v. 18, n. 1, p. 83, 2023.

HENTGES, S. T.; LOW, M. J.; WILLIAMS, J. T. Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 42, p. 9746-9751, 2005.

HERMAN, P. K. Stationary phase in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 602-607, 2002.

HERMANSON, D. J. et al. Substrate-selective COX-2 inhibition as a novel strategy for therapeutic endocannabinoid augmentation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 7, p. 358-367, 2014.

HERMANSON, D. J. et al. Substrate-selective COX-2 inhibition decreases anxiety via endocannabinoid activation. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 1291-1298, 2013.

HERRERA, J. G. et al. Analysis of cannabinoids in medicinal cannabis products: a comprehensive review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, n. 1, 2024.

HIJAZ, B. A.; VOLPICELLI-DALEY, L. A. Initiation and propagation of α -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, v. 15, n. 1, p. 19, 2020.

HIRSCH, L. et al. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, v. 46, n. 4, p. 292-300, 2016.

HONG, Yuhang et al. Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants*, v. 13, n. 3, p. 312, 2024.

HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E. CB1 and CB2 receptor pharmacology. *Advances in Pharmacology*, v. 80, p. 169-206, 2017.

HUANG, Chaolie et al. Intrinsically aggregation-prone proteins form amyloid-like aggregates and contribute to tissue aging in *Caenorhabditis elegans*. *eLife*, v. 8, p. e43059, 2019.

HUSSAIN, T. et al. *Cannabis sativa* research trends, challenges, and new-age perspectives. *iScience*, v. 24, n. 12, p. 103391, 2021.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 7, p. 443-454, 2013.

INGELSSON, Martin. Alpha-synuclein oligomers — neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other Lewy body disorders. *Frontiers in Neuroscience*, v. 10, p. 408, 2016.

ISIDORE, E.; KARIM, H.; IOANNOU, I. Extraction of phenolic compounds and terpenes from *Cannabis sativa* L. by-products: from conventional to intensified processes. *Antioxidants*, v. 10, n. 6, p. 942, 2021. DOI: 10.3390/antiox10060942.

IUVONE, T. et al. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, n. 1, p. 134–141, 2004. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2003.02327.x.

IZZO, L. et al. Analysis of phenolic compounds in commercial *Cannabis sativa* L. inflorescences using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules*, v. 25, n. 3, p. 631, 2020. DOI: 10.3390/molecules25030631.

JAKUBOWSKI, W.; BARTOSZ, G. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 29, n. 11, p. 1297–1301, 1997.

JIANG, H. E. et al. A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 108, p. 414–422, 2006.

JIN, Dan et al. Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 3309, 2020.

JÎTCĂ, G. et al. Cannabidiol: bridge between antioxidant effect, cellular protection, and cognitive and physical performance. *Antioxidants*, v. 12, n. 2, p. 485, 2023.

JOKIĆ, S. et al. Terpenes and cannabinoids in supercritical CO₂ extracts of industrial hemp inflorescences: optimization of extraction, antiradical and antibacterial activity. *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 9, p. 1117, 2022. DOI: 10.3390/ph15091117.

JOMOVA, K. et al. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of Toxicology*, v. 98, p. 1323–1367, 2024. DOI: 10.1007/s00204-024-03696-4.

JORDAN, E. N. et al. Integrated omics of *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2-1C reveals pleiotropic drug resistance and lipidomic adaptations to cannabidiol. *npj Systems Biology and Applications*, v. 10, n. 1, p. 63, 2024.

JOYNER, P. M. et al. Probing the metabolic aberrations underlying mutant huntingtin toxicity in yeast and assessing their degree of preservation in humans and mice. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 1, p. 404–412, 2010.

JUNG, K-M. et al. A key role for diacylglycerol lipase- α in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Molecular Pharmacology*, v. 72, n. 3, p. 612–621, 2007.

JURCĂU, M. C. et al. The link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in the pathophysiology of Alzheimer's disease: therapeutic implications and future perspectives. *Antioxidants*, v. 11, n. 11, p. 2167, 2022. DOI: 10.3390/antiox11112167.

KARDANI, J.; SETHI, R.; ROY, I. Nicotine slows down oligomerisation of α -synuclein and ameliorates cytotoxicity in a yeast model of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, v. 1863, n. 6, p. 1454–1463, 2017.

KATHMANN, M. et al. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 372, p. 354–361, 2006. DOI: 10.1007/s00210-006-0033-x.

KATZMAN, M. A.; FURTADO, M.; ANAND, L. Targeting the endocannabinoid system in psychiatric illness. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 36, n. 6, p. 691–703, 2016.

KAUR, S. et al. Antimicrobial potential of three common weeds of Kurukshetra: an in vitro study. *Research Journal of Microbiology*, v. 10, p. 280–287, 2015. DOI: 10.3923/jm.2015.280.287.

KHAN, B. A.; WARNER, P.; WANG, H. Antibacterial properties of hemp and other natural fibre plants: a review. *BioRes.*, v. 9, n. 2, p. 3642–3659, 2014. DOI: 10.15376/biores.9.2.3642-3659.

KHOURY, M.; COHEN, I.; BAR-SELA, G. “The Two Sides of the Same Coin”—Medical Cannabis, Cannabinoids and Immunity: Pros and Cons Explained. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 2, p. 389, 2022.

KILLESTEIN, J.; POLMAN, C. The therapeutic value of cannabinoids in MS: Real or imaginary? *Multiple Sclerosis*, v. 10, p. 339–340, 2004.

KILPATRICK, K. et al. Chemical induction of Hsp70 reduces α -synuclein aggregation in neuroglioma cells. *ACS Chemical Biology*, v. 8, n. 7, p. 1460–1468, 2013. DOI: 10.1021/cb400017h.

KIM, J.; ALGER, B. E. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nature Neuroscience*, v. 7, n. 7, p. 697–698, 2004.

KLEMMENSEN, M. M. et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Neurotherapeutics*, v. 21, n. 1, p. e00292, 2024. DOI: 10.1016/j.neurot.2023.10.002.

KONG, W. et al. Selective CB2 receptor activation ameliorates EAE by reducing Th17 differentiation and immune cell accumulation in the CNS. *Cellular Immunology*, v. 287, n. 1, p. 1–17, 2014.

KORYTOWSKI, I. Quando e por que a maconha foi proibida no Brasil? [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <http://sopanomel.blogspot.com.br/2016/11/quando-foi-proibidamaconha-no-brasil.html>. Acesso em: 13 set. 2017.

KOU, X. et al. A Review on the Natural Components Applied as Lead Compounds for Potential Multi-target Anti-AD Theranostic Agents. *Current Medical Chemistry*, v. 30, n. 40, p. 4586–4604, 2023.

KOUDINOV, A. R. et al. Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 223, n. 3, p. 592–597, 1996.

KOZELA, E. et al. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 163, p. 1507–1519, 2011.

KRISHNAMURTHY, H. K. et al. Oxidative stress: fundamentals and advances in quantification techniques. *Frontiers in Chemistry*, v. 12, p. 1470458, 2024.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, v. 87, n. 1, p. 99–163, 2007.

KUHATHASAN, N. et al. The use of cannabinoids for insomnia in daily life: Naturalistic study. *Journal of Medical Internet Research*, v. 23, 2021.

- KULCSAROVA, K. et al.** Pesticides and the Microbiome-Gut-Brain Axis: Convergent Pathways in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, v. **13**, n. 7, p. 1079–1106, 2023.
- KUMAR, U.** Cannabinoids: Role in Neurological Diseases and Psychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, v. **26**, n. 1, p. 152, 2024.
- KUMMER, M. P.; HENKA, M. T.** Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimer's Research & Therapy*, v. **6**, n. 3, p. 28, 2014.
- LANGFORD, R. M. et al.** A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray... *Journal of Neurology*, v. **260**, p. 984–997, 2013.
- LANOISELÉE, H.-M. et al.** APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease. *PLoS Medicine*, v. **14**, n. 3, p. e1002270, 2017.
- LAPIERRE, É.; MONTHONY, A. S.; TORKAMANEH, D.** Genomics-based taxonomy to clarify cannabis classification. *Genome*, v. **66**, n. 8, p. 202–211, 2023.
- LAPRAIRIE, R. B. et al.** Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, v. **172**, n. 20, p. 4790–4805, 2015.
- LASHUEL, H. A. et al.** The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*, v. **14**, n. 1, p. 38–48, 2013.
- LASTRES-BECKER, I. et al.** Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, v. **19**, p. 96–107, 2005.
- LAUTENSCHLÄGER, J.; KAMINSKI, C. F.; SCHIERLE, G. S. K.** α -Synuclein—regulator of exocytosis, endocytosis, or both? *Trends in Cell Biology*, v. **27**, n. 7, p. 468–479, 2017.
- LAZARJANI, M. P.; YOUNG, O.; KEBEDE, L.; SEYFODDIN, A.** Processing and extraction methods of medicinal cannabis: a narrative review. *Journal of Cannabis Research*, v. **3**, n. 1, p. 32, 2021. DOI: 10.1186/s42238-021-00087-9.
- LÁZARO, D. F. et al.** Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS Genetics*, v. **10**, n. 11, p. e1004741, 2014. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004741.
- LÁZARO, D. F. et al.** The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation. *Acta Neuropathologica Communications*, v. **4**, p. 128, 2016. DOI: 10.1186/s40478-016-0402-8.
- LEE, Y. J. et al.** Defects in very long chain fatty acid synthesis enhance alpha-synuclein toxicity in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, v. **6**, n. 1, 2011.
- LEGARE, C. A.; RAUP-KONSAVAGE, W. M.; VRANA, K. E.** Therapeutic potential of cannabis, cannabidiol, and cannabinoid-based pharmaceuticals. *Pharmacology*, v. **107**, n. 3–4, p. 131–149, 2022.

LEWEKE, F. M. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational Psychiatry*, v. 2, p. e94, 2012.

LEWEKE, F. M. et al. Different effects of nabilone and cannabidiol on binocular depth inversion in man. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 66, p. 175–181, 2000.

LEWIS, M. A.; RUSSO, E. B.; SMITH, K. M. Pharmacological foundations of cannabis chemovars. *Planta Medica*, v. 84, p. 225–233, 2018.

LI, J. L. et al. Mitochondrial function and Parkinson's disease: from the perspective of the electron transport chain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 14, p. 797833, 2021.

LI, M.; YE, X.; HUANG, Z.; YE, L.; CHEN, C. Global burden of Parkinson's disease from 1990 to 2021: a population-based study. *BMJ Open*, v. 15, n. 4, p. e095610, 2025.

LI, Y.; LI, S.; WU, H. Ubiquitination-proteasome system (UPS) and autophagy: two main protein degradation machineries in response to cell stress. *Cells*, v. 11, n. 5, p. 851, 2022.

LIANG, Z.; SORIANO-CASTELL, D.; KEPCHIA, D. et al. Cannabinol inhibits oxytosis/ferroptosis by directly targeting mitochondria independently of cannabinoid receptors. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 180, p. 33–51, 2022.

LIANI, E.; EYAL, A.; AVRAHAM, E. et al. Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 15, p. 5500–5505, 2004.

LIU, G.; MA, J. Y.; HU, G.; JIN, H. Identification and validation of a novel ferroptosis-related gene model for predicting the prognosis of gastric cancer patients. *PLoS One*, v. 16, n. 7, e0254368, 2021.

LIU, J.; DUAN, W.; DENG, Y. et al. New insights into molecular mechanisms underlying neurodegenerative disorders. *Journal of Integrative Neuroscience*, v. 22, n. 3, p. 58, 2023.

LIU, J.; HAN, X.; ZHANG, T. et al. Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 16, 116, 2023.

LOVATO, F. L.; TEIXEIRA DA ROCHA, J. B.; DALLA CORTE, C. L. Diphenyl diselenide protects against methylmercury-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* via the Yap1 transcription factor. *Chemical Research in Toxicology*, v. 30, n. 5, p. 1134–1144, 2017.

LOWE, H.; STEELE, B.; BRYANT, J.; TOYANG, N.; NGWA, W. Non-cannabinoid metabolites of *Cannabis sativa* L. with therapeutic potential. *Plants*, v. 10, n. 400, 2021.

LU, H. C.; MACKIE, K. Review of the endocannabinoid system. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, v. 6, n. 6, p. 607–615, 2021.

LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; ALMEIDA, A.; SILVA, M. T. et al. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, p. 2598–2606, 2002.

LUDOVICO, P.; SANSONETTY, F.; SILVA, M. T.; CORTE-REAL, M. Acetic acid induces a programmed cell death process in the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Research*, v. 3, p. 91–96, 2003.

LUDTMANN, M. H.; ANGELOVA, P. R.; NINKINA, N. N. et al. Monomeric alpha-synuclein exerts a physiological role on brain ATP synthase. *The Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 41, p. 10510–10521, 2016.

LUK, T.; XIE, Y.; BUKHARI, I.; MACINTYRE, J.; LAMBERT, D. Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 3, p. 495, 2004.

LUO, Y.; QIAO, L.; LI, M. et al. Global, regional, national epidemiology and trends of Parkinson's disease from 1990 to 2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 16, 1498756, 2025.

MA, C.; HONG, F.; YANG, S. Amyloidosis in Alzheimer's disease: pathogeny, etiology, and related therapeutic directions. *Molecules*, v. 27, 1210, 2022.

MACCARRONE, M. Tribute to Professor Raphael Mechoulam, the founder of cannabinoid and endocannabinoid research. *Molecules*, v. 27, n. 1, 323, 2022.

MACCARRONE, M.; BERNARDI, G.; AGRÒ, A. F.; CENTONZE, D. Cannabinoid receptor signalling in neurodegenerative diseases: a potential role for membrane fluidity disturbance. *British Journal of Pharmacology*, v. 163, n. 7, p. 1379–1390, 2011.

MACEDO, D.; et al. Phycocyanin protects against alpha-synuclein toxicity in yeast. *Journal of Functional Foods*, v. 38, p. 553–560, 2017.

MACKAY, D. R.; ELGORT, S. W.; ULLMAN, K. S. The nucleoporin Nup153 has separable roles in early mitotic progression and the resolution of mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. 6, p. 1652–1660, 2009.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 168, p. 299–325, 2005.

McLEAN, P. J.; KAWAMATA, H.; HYMAN, B. T. Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome-sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience*, v. 104, p. 901–912, 2001.

MAECHA, M.; CARRILLO-SALINAS, F. J.; FELIÚ, A.; MESTRE, L.; GUAZA, C. Perspectives on cannabis-based therapy of multiple sclerosis: a mini-review. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 14, p. 34, 2020.

MAIOLI, C.; MATTOTEIA, D.; AMIN, H. I. M.; MINASSI, A.; CAPRIOGLIO, D. Cannabinol: history, syntheses, and biological profile of the greatest “minor” cannabinoid. *Plants*, v. 11, n. 21, 2896, 2022.

MALDONADO, R.; VALVERDE, O.; BERRENDERO, F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends in Neurosciences*, v. 29, n. 4, p. 225–232, 2006.

MALGORZATA STRZELCZYK; LOCHYNSKA, M.; CHUDY, M. Systematics and botanical characteristics of industrial hemp *Cannabis sativa* L. *Journal of Natural Fibers*, 2021.

MAROON, J.; BOST, J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. *Surgical Neurology International*, v. 9, p. 91, 2018.

MARSH, D. T.; PARKER, L.; HUGHES, R. et al. The structurally diverse phytocannabinoids cannabichromene, cannabigerol and cannabinol significantly inhibit amyloid β -evoked neurotoxicity and changes in cell morphology in PC12 cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 134, n. 3, p. 293–309, 2024.

MARTIN, A.; BENDAHDANE, A. A blessing in disguise: transposable elements are more than parasites. *Epigenetics*, v. 5, n. 5, p. 378–380, 2010.

MARTINEZ RAMIREZ, C. E.; RUIZ-PÉREZ, G.; STOLLENWERK, T. M. et al. Endocannabinoid signaling in the central nervous system. *Glia*, v. 71, n. 1, p. 5–35, 2023.

MARTINOSYAN, A.; ANSARI, R.; PESTANA, F. et al. Unravelling cell type-specific responses to Parkinson’s disease at single-cell resolution. *Molecular Neurodegeneration*, v. 19, n. 7, 2024.

MARTINS, D. A.; et al. Current legislation on medical cannabis in Brazil. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 45, n. 1, e20220025, 2023.

MATOS, D. F.; et al. Epidemiological characterization of Alzheimer mortality in Brazil from 2010 to 2019. 2021.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.

MECHOULAM, R.; PETERS, M.; MURILLO-RODRIGUEZ, E.; HANUS, L. O. Cannabidiol – recent advances. *Chemical Biodiversity*, v. 4, p. 1678–1692, 2007.

MEHRA, S.; SAHAY, S.; MAJI, S. K. aSyn misfolding and aggregation: implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1867, p. 890–908, 2019.

MELO, T. Q.; COPRAY, S. J. C. V. M.; FERRARI, M. F. R. Alpha-synuclein toxicity on protein quality control, mitochondria and endoplasmic reticulum. *Neurochemical Research*, v. 43, n. 12, p. 2212–2223, 2018.

MENEZES, R.; TENREIRO, S.; MACEDO, D.; SANTOS, C. N.; OUTEIRO, T. F. From the baker to the bedside: yeast models of Parkinson's disease. *Microbial Cell*, v. 2, n. 8, p. 262–279, 2015.

MENG, K.; et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases: mechanisms and corresponding therapeutic strategies. *Biomedicines*, v. 13, n. 2, p. 327, 2025.

MENG, X.; SONG, Q.; LIU, Z. et al. Neurotoxic β -amyloid oligomers cause mitochondrial dysfunction – the trigger for PANoptosis in neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 16, 1400544, 2024.

MI, Y.; et al. Mitochondria-targeted therapeutics for Alzheimer's disease: the good, the bad, the potential. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 34, n. 8, p. 611–630, 2021.

MIAO, Lu; CLAIR, Daret K. St. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 344–356, 2009.

MILANO, W.; CAPASSO, A. Neuroprotection by cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Alzheimer's & Dementia: Cognitive Neurology*, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2018.

MILLER-FLEMING, Leonor; GIORGINI, Flaviano; OUTEIRO, Tiago F. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, v. 3, n. 3, p. 325–338, 2008.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICA (Brasil). Histórico da política nacional sobre drogas. Disponível em: <https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/sua-protecao/politicas-sobre-drogas/subcapas-senad/historico-da-pnad>. Acesso em: dia mês ano.

MISHIMA, K. et al. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. *Stroke*, v. 36, p. 1071–1076, 2005.

MISRANI, A.; TABASSUM, S.; YANG, L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 13, 617588, 2021. DOI: 10.3389/fnagi.2021.617588.

MONSALVO-MARAVAR, L. Á. et al. Amyloid Beta Peptide-Mediated Alterations in Mitochondrial Dynamics and its Implications for Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*, v. 22, n. 7, p. 1039–1056, 2023. DOI: 10.2174/1871527321666220616094036.

MONTEIRO NETO, J. R. et al. SOD1, A Crucial Protein for Neural Biochemistry: Dysfunction and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, p. 1-21, 2025.

MORALES, P.; HURST, D. P.; REGGIO, P. H. Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, v. 103, p. 103–131, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-45541-9_4.

MOREE, B. et al. Small Molecules Detected by Second-Harmonic Generation Modulate the Conformation of Monomeric α -Synuclein and Reduce Its Aggregation in Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 46, p. 27582–27593, 2015. DOI: 10.1074/jbc.M114.636027.

MOYE-ROWLEY, W. S.; HARSHMAN, K. D.; PARKER, C. S. Yeast YAP1 encodes a new form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes & Development*, v. 3, p. 283–292, 1989.

MUHAMMAD, F. et al. Neuroprotective effects of cannabidiol on dopaminergic neurodegeneration and α -synuclein accumulation in *C. elegans* models of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, v. 93, p. 128–139, 2022. DOI: 10.1016/j.neuro.2022.09.001.

MUJAHID, K. et al. Cannabidiol as an immune modulator: A comprehensive review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 33, n. 3, 2025. DOI: 10.1007/s44446-025-00005-7.

MUMBERG, D. et al. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 5767–5768, 1994.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993. DOI: 10.1038/365061a0.

MURATAEVA, N.; STRAIKER, A.; MACKIE, K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 6, p. 1379–1391, 2014.

MURPHY, M. P. et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, v. 4, p. 651–662, 2022. DOI: 10.1038/s42255-022-00591-z.

NADAL, X. et al. Tetrahydrocannabinolic acid is a potent PPAR γ agonist with neuroprotective activity. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, n. 23, p. 4263–4276, 2017.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research*. Washington, DC: The National Academies Press, 2017. Disponível em: <https://nap.nationalacademies.org/read/24625/chapter/4>. Acesso em: dia mês ano.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. NCBI Gene ID: 6622. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6622>. Acesso em: dia mês ano.

NEU, A.; FÖLDY, C.; SOLTESZ, I. Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, v. 578, n. 1, p. 233–247, 2007.

NEVZGLYADOVA, O. V. et al. Yeast red pigment modifies cloned human α -synuclein pathogenesis in Parkinson disease models in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. *Neurochemistry International*, v. 120, p. 172–181, 2018.

NICHOLS, Emma et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, v. 7, n. 2, p. e105–e125, 2022.

NIKOLAEVA, N. S. et al. The role of a pathological interaction between β -amyloid and mitochondria in the occurrence and development of Alzheimer's disease. *Acta Naturae*, v. 14, n. 3, p. 19–34, 2022. DOI: 10.32607/actanaturae.11723.

NISSEN, L. et al. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, v. 81, n. 5, p. 413–419, 2010.

NOMURA, D. K. et al. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science*, v. 334, n. 6057, p. 809–813, 2011.

NOSKOVA, E. et al. Screening System of *Cannabis sativa* Extracts Based on Their Mitochondrial Safety Profile Using Cytochrome c Oxidase Activity as a Biomarker. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 1315, 2023. DOI: 10.3390/ijms24021315.

NURMIKKO, T. J. et al. Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain*, v. 133, p. 210–220, 2007.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, v. 242, n. 1–2, p. 179–188, 2000.

O'REGAN, G. C. et al. Wild-type huntingtin regulates human macrophage function. *Scientific Reports*, v. 10, p. 17269, 2020.

OKAZAKI, S. et al. A formação de ligações dissulfeto de várias etapas em Yap1 é necessária para a detecção e transdução do sinal de estresse de H₂O₂. *Molecular Cell*, v. 27, p. 675–688, 2007.

OMS. Organização Mundial da Saúde. 2021.

ONAIWI, E. S. et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1074, p. 514–536, 2006. DOI: 10.1196/annals.1369.052.

OUTEIRO, T. F. et al. Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Molecular Neurodegeneration*, v. 14, p. 5, 2019.

OUTEIRO, T. F. et al. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS ONE*, v. 3, e1867, 2008.

OUTEIRO, T. F.; LINDQUIST, S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, v. 302, n. 5651, p. 1772–1775, 2003.

PAES-COLLI, Yolanda et al. Phytocannabinoids and cannabis-based products as alternative pharmacotherapy in neurodegenerative diseases: from hypothesis to clinical practice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 16, p. 917164, 2022.

PAGANI, L.; ECKERT, A. Amyloid-beta interaction with mitochondria. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 925050. DOI: 10.4061/2011/925050.

PAGOTTO, U.; PASQUALI, R. Fighting obesity and associated risk factors by antagonising cannabinoid type 1 receptors. *The Lancet*, v. 365, n. 9468, p. 1363–1364, 2005.

PARIHAR, A. et al. Alpha synuclein and Parkinson's disease. In: *Pathology, Prevention and Therapeutics of Neurodegenerative Disease*. p. 1–14, 2018.

PARK, S. J.; KIM, K. W.; LEE, E. J. Gut–brain axis and environmental factors in Parkinson's disease: bidirectional link between disease onset and progression. *Neural Regeneration Research*, v. 20, n. 12, p. 3416–3429, 2025.

PASSERI, E. et al. Alzheimer's disease: treatment strategies and their limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 22, p. 13954, 2022.

PATRICIO, F.; MORALES-ANDRADE, A. A.; PATRICIO-MARTÍNEZ, A.; LIMÓN, I. D. Cannabidiol as a therapeutic target: evidence of its neuroprotective and neuromodulatory function in Parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 595635, 2020.

PELLATI, F. et al. New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules*, v. 23, p. 2639, 2018.

PEÑA-ZELAYETA, Laura et al. Redefining non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Journal of Personalized Medicine*, v. 15, n. 5, p. 172, 2025.

PEREIRA, C. et al. Contribution of yeast models to neurodegeneration research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 941232, 2012.

PERES, Fernanda F. et al. Cannabidiol as a promising strategy to treat and prevent movement disorders? *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 482, 2018.

PERFEITO, Rita; REGO, Ana Cristina. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. *Revista Neurociências*, v. 20, n. 2, p. 273–284, 2012.

PETERS, K. Z.; CHEER, J. F.; TONINI, R. Modulating the neuromodulators: dopamine, serotonin, and the endocannabinoid system. *Trends in Neurosciences*, v. 44, n. 6, p. 464–477, 2021.

PETTIT, R. K. et al. Microplate Alamar Blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 7, p. 2612–2617, 2005.

PISANTI, S.; BIFULCO, M. Modern history of medical cannabis: from widespread use to prohibitionism and back. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 38, p. 195–198, 2017.

PLATA-PEÑA, L. et al. Experimental validation of seminal miR-31-5p as biomarker for azoospermia and evaluation of the effect of preanalytical variables. *Andrology*, v. 11, n. 4, p. 668–676, 2023.

POPOVA, B. et al. α -Synuclein decreases the abundance of proteasome subunits and alters ubiquitin conjugates in yeast. *Cells*, v. 10, n. 9, p. 2229, 2021.

POPOVA, B.; KLEINKNECHT, A.; BRAUS, G. H. Posttranslational modifications and clearing of α -synuclein aggregates in yeast. *Biomolecules*, v. 5, n. 2, p. 617–634, 2015.

POPOVA, Blagovesta et al. Sumoylation protects against β -synuclein toxicity in yeast. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 11, p. 94, 2018.

PRAJJWAL, Priyadarshi et al. Parkinson's disease updates: addressing the pathophysiology, risk factors, genetics, diagnosis, along with the medical and surgical treatment. *Annals of Medicine & Surgery*, v. 85, p. 4887–4902, 2023.

PUSPITA, L.; CHUNG, S. Y.; SHIM, J. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*, v. 10, p. 53, 2017.

QUEIROZ, D. D. et al. A water-soluble manganese(II) octanedioate/phenanthroline complex acts as an antioxidant and attenuates alpha-synuclein toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, v. 1868, n. 10, p. 166475, 2022.

RADWAN, M. M.; CHANDRA, S.; GUL, S.; ELSOHLY, M. A. Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of *Cannabis*. *Molecules*, v. 26, n. 9, p. 2774, 2021.

RAHMAN, M. et al. Epidemiology and risk factors of Alzheimer's disease and related dementias in South and Southeast Asia: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open*, v. 15, n. 8, e105955, 2025.

RAMESH, S.; ARACHCHIGE, A. S. P. M. Depletion of dopamine in Parkinson's disease and relevant therapeutic options: a review of the literature. *AIMS Neuroscience*, v. 10, n. 3, p. 200, 2023.

RAY, B. et al. Mitochondrial and organellar crosstalk in Parkinson's disease. *ASN Neuro*, v. 13, p. 17590914211028364, 2021.

REDDY, V. et al. Targeting the endocannabinoid system: a predictive, preventive, and personalized medicine-directed approach to the management of brain pathologies. *EPMA Journal*, v. 11, n. 2, p. 217–250, 2020.

REDDY, V. P. et al. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 16, n. 4, p. 763–774, 2009.

REGGIO, P. H. Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 14, p. 1468–1486, 2010.

REHMAN, Y. et al. Cannabis in the management of PTSD: a systematic review. *AIMS Neuroscience*, v. 8, p. 414–434, 2021.

REN, M. et al. The origins of cannabis smoking: chemical residue evidence from the first millennium BCE in the Pamirs. *Science Advances*, v. 5, n. 6, p. eaaw1391, 2019.

RENCUS-LAZAR, S. et al. Yeast models for the study of amyloid-associated disorders and development of future therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 6, p. 1–10, 2019.

RIBAUDO, G.; MEMO, M.; GIANONCELLI, A. Multi-target natural and nature-inspired compounds against neurodegeneration: a focus on dual cholinesterase and phosphodiesterase inhibitors. *Applied Sciences*, v. 11, n. 11, p. 5044, 2021.

RINAURO, D. J. et al. Misfolded protein oligomers: mechanisms of formation, cytotoxic effects, and pharmacological approaches against protein misfolding diseases. *Molecular Neurodegeneration*, v. 19, n. 1, p. 20, 2024.

RIZVI, S. Z. H. et al. Spectrum of non-motor symptoms in Parkinson's disease — A review. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*, v. 18, n. 3, p. 72–80, 2024.

RODRIGUES-POUSADA, C. et al. Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview. *Microbial Cell*, v. 6, n. 6, p. 267, 2019.

RODRIGUES-POUSADA, C.; NEVITT, T.; MENEZES, R. The yeast stress response. *FEBS Journal*, v. 272, n. 11, p. 2639–2647, 2005.

ROM, S. et al. Selective activation of cannabinoid receptor 2 in leukocytes suppresses their engagement of the brain endothelium and protects the blood–brain barrier. *The American Journal of Pathology*, v. 183, n. 5, p. 1548–1558, 2013.

ROVETTO, L. J.; AIETA, N. V. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 129, p. 16–27, 2017.

ROŽANC, J. et al. Different *Cannabis sativa* extraction methods result in different biological activities against a colon cancer cell line and healthy colon cells. *Plants*, v. 10, p. 566, 2021. DOI: 10.3390/plants10030566.

RUETENIK, A.; BARRIENTOS, A. Exploiting post-mitotic yeast cultures to model neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 11, 2018. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00400.

RUIZ DE MARTÍN ESTEBAN, S. et al. Cannabinoid CB2 receptors modulate microglia function and amyloid dynamics in a mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 841766, 2022.

RUIZ-VALDEPEÑAS, L. et al. Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: an intravital microscopy study. *Journal of Neuroinflammation*, v. 8, n. 1, p. 5, 2011.

RUKMANGADACHAR, L. A.; BOLLU, P. C. Amyloid beta peptide. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.

RUSSO, E. B. Cannabis therapeutics and the future of neurology. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, v. 12, p. 51, 2018.

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

RUSSO, E. B. The case for the entourage effect and conventional breeding of clinical cannabis: no “strain,” no gain. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 434025, 2019.

RŮŽICKA, F.; HOLÁ, V. Průkaz životaschopných, metabolicky aktivních kvasinkových bunek pomocí kolorimetrického média [Detection of viable metabolically active yeast cells using a colorimetric assay]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, v. 57, n. 1, p. 4–7, 2008.

RYAN, D. et al. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 7, p. 2053–2063, 2009.

SAGREDO, O. et al. Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused by 3-nitropropionic acid *in vivo* by mechanisms independent of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. *European Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 843–851, 2007.

SAGREDO, O. et al. Neuroprotective effects of phytocannabinoid-based medicines in experimental models of Huntington’s disease. *Journal of Neuroscience Research*, v. 89, p. 1509–1518, 2011.

SALGADO, K. D. C. B. et al. Cannabidiol protects mouse hippocampal neurons from neurotoxicity induced by amyloid β -peptide25-35. *Toxicology in Vitro*, v. 99, p. 105880, 2024.

SALVATORE, M. F. Dopamine signaling in substantia nigra and its impact on locomotor function—Not a new concept, but neglected reality. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 2, p. 1131, 2024.

SAMPAIO-MARQUES, B. et al. α -Synuclein toxicity in yeast and human cells is caused by cell cycle re-entry and autophagy degradation of ribonucleotide reductase 1. *Aging Cell*, v. 18, n. 4, e12922, 2019.

SANCENON, V. et al. Suppression of α -synuclein toxicity and vesicle trafficking defects by phosphorylation at S129 in yeast depends on genetic context. *Human Molecular Genetics*, v. 21, n. 11, p. 2432–2449, 2012.

SANGKAEW, A.; KOJORNNA, T.; TANAHASHI, R.; TAKAGI, H.; YOMPAKDEE, C. A novel yeast-based screening system for potential compounds that can alleviate human α -synuclein toxicity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 132, n. 2, p. 1409–1421, 2022.

SANTIAGO, M.; SACHDEV, S.; ARNOLD, J. C.; MCGREGOR, I. S.; CONNOR, M. Absence of entourage: terpenoids commonly found in *Cannabis sativa* do not modulate the functional activity of Δ^9 -THC at human CB1 and CB2 receptors. *Cannabis and Cannabinoid Research*, v. 4, n. 3, p. 165–176, 2019. DOI: 10.1089/can.2019.0016.

SASTRE-GARRIGA, J.; VILA, C.; CLISSOLD, S.; MONTALBAN, X. THC and CBD oromucosal spray (Sativex®) in the management of spasticity associated with multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 11, p. 627–637, 2011.

SCHLEIDER, L. B. et al. Prospective analysis of safety and efficacy of medical cannabis in large unselected population of patients with cancer. *European Journal of Internal Medicine*, v. 49, p. 37–43, 2018.

SCHMIDT, S. I.; OKARMUS, J.; MADSEN, D. A. et al. Formation of seeding-competent α -synuclein aggregates in parkin-deficient iPSC-derived human neurons. *npj Parkinson's Disease*, v. 11, p. 180, 2025. DOI: 10.1038/s41531-025-01038-4.

SCHNELL, N.; ENTIAN, K. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators. *European Journal of Biochemistry*, v. 200, n. 2, p. 487–493, 1991.

SCHOFS, L.; SPARO, M. D.; SANCHEZ BRUNI, S. F. The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. *Pharmacology Research & Perspectives*, v. 9, n. 2, p. e00761, 2021.

SCHUBART, C. D. et al. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizophrenia Research*, v. 130, p. 216–221, 2011.

SCHUBERT, D. et al. Efficacy of cannabinoids in a pre-clinical drug-screening platform for Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, v. 56, n. 11, p. 7719–7730, 2019.

SEEBAUER, L. et al. Interaction of alpha synuclein and microtubule organization is linked to impaired neuritic integrity in Parkinson's patient-derived neuronal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, p. 1812, 2022. DOI: 10.3390/ijms23031812.

SHEN, J. et al. α -Synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability. *Brain Research*, v. 1591, p. 14–26, 2014.

SHEN, L.; DETTMER, U. Alpha-synuclein effects on mitochondrial quality control in Parkinson's disease. *Biomolecules*, v. 14, n. 12, p. 1649, 2024.

SHIBASAKI, Y.; BAILLIE, D. A.; ST CLAIR, D.; BROOKES, A. J. High-resolution mapping of SNCA encoding alpha-synuclein... *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 71, n. 1, p. 54–55, 1995.

SHIELDS, H. J.; TRAA, A.; VAN RAAMSDONK, J. M. Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review of comparative and experimental studies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 628157, 2021.

SHIN, J. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory and antidepressant-like effects of *Cannabis sativa* L. extracts. *Plants*, v. 13, p. 1619, 2024. DOI: 10.3390/plants13121619.

SHONESY, B. C. et al. The initiation of synaptic 2-AG mobilization requires both an increased supply of diacylglycerol precursor and increased postsynaptic calcium. *Neuropharmacology*, v. 91, p. 57-62, 2015.

SHVETCOV, A. et al. APOE ϵ 4 carriers share immune-related proteomic changes across neurodegenerative diseases. *Nature Medicine*, p. 1-12, 2025.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.

SILVA, F. M. Alpha-synuclein phosphorylation role on Parkinson's disease. 2013. 52 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.**

SILVA, L. F. S. Estudo morfológico e agrônômico de germoplasma de *Cannabis sativa* L. 2020. **Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.** Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/159507/001023496.pdf>.

SILVESTRO, S. et al. Cannabinol's modulation of genes involved in oxidative stress response and neuronal plasticity: a transcriptomic analysis. *Antioxidants*, v. 14, n. 6, p. 744, 2025. DOI: 10.3390/antiox14060744.

SIRIKANTARAMAS, S. et al. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant & Cell Physiology*, v. 46, p. 1578–1582, 2005.

SIRIKANTARAMAS, S. et al. The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 39767–39774, 2004.

SKAPER, S. D.; FACCI, L.; ZUSSO, M.; GIUSTI, P. An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the neuron. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 12, p. 72, 2018.

SMITH, M. D. A. C. Doença de Alzheimer. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 21, n. 2, p. 1-5, 1999.

SMITH, T. J. et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: the integration of palliative care into standard oncology care. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, p. 880–887, 2012.

SOBUE, A. et al. Microglial cannabinoid receptor type II stimulation improves cognitive impairment and neuroinflammation in Alzheimer's disease mice by controlling astrocyte activation. *Cell Death & Disease*, v. 15, p. 858, 2024.

SONG, N. et al. Focusing on mitochondria in the brain: from biology to therapeutics. *Translational Neurodegeneration*, v. 13, n. 1, p. 23, 2024.

SOPER, J. H. et al. α -Synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 3, p. 1093-1103, 2008.

SRINIVASAN, E. et al. Alpha-synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Frontiers in Medicine*, v. 8, p. 736978, 2021.

STASIŁOWICZ, A.; TOMALA, A.; PODOLAK, I.; CIELECKA-PIONTEK, J. *Cannabis sativa* L. as a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 778, 2021.

STEFKOV, G. et al. Analytical techniques for phytocannabinoid profiling of *Cannabis* and cannabis-based products – a comprehensive review. *Molecules*, v. 27, n. 3, p. 975, 2022.

STONE, N. L.; MURPHY, A. J.; ENGLAND, T. J.; O'SULLIVAN, S. E. A systematic review of minor phytocannabinoids with promising neuroprotective potential. *British Journal of Pharmacology*, v. 177, n. 19, p. 4330–4352, 2020.

SU, D. et al. Projections for prevalence of Parkinson's disease and its driving factors in 195 countries and territories to 2050: modelling study of Global Burden of Disease Study 2021. *BMJ*, v. 388, 2025.

SU, L. J. et al. Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *Disease Models & Mechanisms*, v. 3, p. 194–208, 2010. DOI: 10.1242/dmm.004267.

SU, X. et al. Exploring molecular signatures related to the mechanism of aging in different brain regions by integrated bioinformatics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 16, p. 1133106, 2023.

SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 215, n. 1, p. 89–97, 1995. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2437.

SVÍŽENSKÁ, I.; DUBOVÝ, P.; ŠULCOVÁ, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures—A short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 90, n. 4, p. 501–511, 2008.

TABRIZI, S. J. et al. Expression of mutant alpha-synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. *Human Molecular Genetics*, v. 9, p. 2683–2689, 2000.

TAMAGNO, E. et al. Oxidative Stress and Beta Amyloid in Alzheimer's Disease: Which Comes First, the Chicken or the Egg? *Antioxidants*, v. 10, n. 9, p. 1479, 2021. DOI: 10.3390/antiox10091479.

TANG, Q. et al. Alpha-Synuclein defects autophagy by impairing SNAP29-mediated autophagosome-lysosome fusion. *Cell Death & Disease*, v. 12, p. 854, 2021. DOI: 10.1038/s41419-021-04138-0.

TARDIFF, D. F. et al. Yeast reveal a “druggable” Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α -synuclein toxicity in neurons. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 979–983, 2013.

TASSANEESUWAN, N. et al. Discovering the Potential of Cannabidiol for Cosmeceutical Development at the Cellular Level. *Pharmaceuticals*, v. 18, n. 2, p. 202, 2025.

TATENHORST, L. et al. Fasudil attenuates aggregation of α -synuclein in models of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 4, p. 39, 2016. DOI: 10.1186/s40478-016-0310-y.

TAURA, F.; MORIMOTO, S.; SHOYAMA, Y. Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L.: biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 17411–17416, 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.29.17411.

TEGRAPHARMA. Canabinoides: o que são, tipos e indicações. 2024. Disponível em: <https://tegrapharma.com/canabinoides-o-que-sao-tipos-e-indicacoes/>. Acesso em: 20 nov. 2025.

TEIXEIRA-DOS-SANTOS, D. et al. Parkinson's disease in Brazil: prevalence and patient characteristics in a nationwide representative population-based cohort. *Movement Disorders*, v. 39, suppl. 1, 2024. Disponível em: <https://www.mdsabstracts.org/....> Acesso em: 10 nov. 2025.

TEMEL, J. S. et al. Early palliative care for patients with metastatic non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 363, p. 733–742, 2010.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Respostas celulares complexas a espécies reativas de oxigênio. *Trends in Cell Biology*, v. 15, p. 319–326, 2005.

TENREIRO, S.; ECKERMANN, K.; OUTEIRO, T. F. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 7, p. 42, 2014. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00042.

TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. A levedura como modelo para estudar as bases moleculares da doença de Parkinson. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*, v. 12, 2016.

THAPA, S.; SINGH, S. K. The role of endocannabinoid system in neuroprotection: molecular targets and therapeutic opportunities. *Integrative Medicine Reports*, v. 2, n. 1, p. 72–86, 2023.

TIAN, X. et al. The interaction of cannabinoid receptor agonists, CP55940 and WIN55212-2 with membranes using solid-state ²H NMR. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, v. 1808, n. 9, p. 2095–2101, 2011.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 2017.

TORRES, A. R. et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 51, n. 6, p. 1–10, 2018.

TREJO-LOPEZ, J. A.; YACHNIS, A. T.; PROKOP, S. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, v. 19, n. 1, p. 173–185, 2022. DOI: 10.1007/s13311-021-01146-y.

TREUSCH, S. et al. Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science*, v. 334, n. 6060, p. 1241–1245, 2011.

TSANG, C. K. et al. SOD1 phosphorylation by mTORC1 couples nutrient sensing and redox regulation. *Molecular cell*, v. 70, n. 3, p. 502–515. e8, 2018.

TSOI, P. S.; QUAN, M. D.; FERREON, J. C.; FERREON, A. C. M. Aggregation of disordered proteins associated with neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 4, p. 3380, 2023.

TSUBOI, K. et al. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism. *Inflammation and Regeneration*, v. 38, p. 28, 2018. DOI: 10.1186/s41232-018-0086-5.

TWOHIG, D.; NIELSEN, H. M. α -Synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, v. 14, p. 23, 2019. DOI: 10.1186/s13024-019-0320-x.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 124, p. 901–905, 2017. DOI: 10.1007/s00702-017-1686-y.

TZADOK, M. et al. CBD-enriched medical cannabis for intractable pediatric epilepsy: the current Israeli experience. *Seizure – European Journal of Epilepsy*, v. 35, p. 41–44, 2016.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Potential legal pathways for the sale of non-psychotropic hemp products. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/128528/download>. Acesso em: 20 nov. 2025.

UNITED NATIONS. *World population ageing 2019*. New York: United Nations, 2020.

UNITED NATIONS. *World population ageing 2019: Highlights*. New York: United Nations, 2019.

VACEK, J. et al. Antioxidant function of phytocannabinoids: molecular basis of their stability and cytoprotective properties under UV-irradiation. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 164, p. 258–270, 2021. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.012.

VALDEOLIVAS, S. et al. Sativex-like combination of phytocannabinoids is neuroprotective in malonate-lesioned rats, an inflammatory model of Huntington's disease: role of CB1 and CB2 receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 3, p. 400–406, 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VANDEBROEK, T. et al. Phosphorylation and aggregation of protein tau in humanized yeast cells and in transgenic mouse brain. *New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders*, v. 256, p. 15–19, 2005.

VIGO-PELFREY, C.; LEE, D.; KEIM, P.; LIEBERBURG, I.; SCHENK, D. B. Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry*, v. 61, n. 5, p. 1965–1968, 1993. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb09841.x.

WALENTINY, D. Matthew et al. The endogenous cannabinoid anandamide shares discriminative stimulus effects with Δ^9 -tetrahydrocannabinol in fatty acid amide hydrolase knockout mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 656, n. 1–3, p. 63–67, 2011.

WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics*, v. 43, p. 95–118, 2009. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134850.

WANG, K. et al. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. *Natural Product Research*, v. 33, n. 10, p. 1423–1430, 2019.

WANG, M. et al. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array–mass spectrometry. *Cannabis and Cannabinoid Research*, v. 1, n. 1, p. 262–271, 2016. DOI: 10.1089/can.2016.0020.

WANG, Yanhong et al. Low-dose delta-9-tetrahydrocannabinol as beneficial treatment for aged APP/PS1 mice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 5, p. 2757, 2022.

WAREHAM, L. K. et al. Solving neurodegeneration: common mechanisms and strategies for new treatments. *Molecular Neurodegeneration*, v. 17, p. 23, 2022. DOI: 10.1186/s13024-022-00524-0.

WARF, B. High points: An historical geography of cannabis. *Geographical Review*, v. 104, p. 414–438, 2014.

WEN, Jun-Hao et al. Cellular protein aggregates: formation, biological effects, and ways of elimination. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 10, p. 8593, 2023.

WINKLMAYR, M. et al. Dose-dependent cannabidiol-induced elevation of intracellular calcium and apoptosis in human articular chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 37, n. 12, p. 2540–2549, 2019. DOI: 10.1002/jor.24430.

WOODWARD, D. F.; LIANG, Y.; KRAUSS, A. H.-P. Prostaglandin-ethanolamides and their pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. 3, p. 410–419, 2008.

WU, A. et al. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 25, p. 18850–18858, 1993.

WU, J. Z. et al. Dihydromyricetin and salvianolic acid B inhibit alpha-synuclein aggregation and enhance chaperone-mediated autophagy. *Translational Neurodegeneration*, v. 8, p. 18, 2019. DOI: 10.1186/s40035-019-0159-7.

WYSOCKI, R.; TAMÁS, M. J. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 34, n. 6, p. 925–951, 2010.

XIE, Z. et al. *Cannabis sativa*: origin and history, glandular trichome development, and cannabinoid biosynthesis. ***Horticulture Research***, v. 10, n. 9, 2023. DOI: 10.1093/hr/uhad150.

YAN, C.; LEE, L. H.; DAVIS, L. I. Crm1p medeia a exportação nuclear regulada de um fator de transcrição semelhante a AP-1 de levedura. ***EMBO Journal***, v. 17, p. 7416–7429, 1998.

YARIBASH, S.; MOHAMMADI, K.; SANI, M. A. Alpha-synuclein pathophysiology in neurodegenerative disorders: A review focusing on molecular mechanisms and treatment advances in Parkinson's disease. ***Cellular and Molecular Neurobiology***, v. 45, p. 30, 2025. DOI: 10.1007/s10571-025-01544-2.

YENILMEZ, F. et al. Cannabis in Parkinson's disease: the patients' view. ***Journal of Parkinson's Disease***, v. 11, p. 309–321, 2021.

YU, X.; JIA, Y.; DONG, Y. Research progress on the cannabinoid type-2 receptor and Parkinson's disease. ***Frontiers in Aging Neuroscience***, v. 15, p. 1298166, 2024. DOI: 10.3389/fnagi.2023.1298166.

ZAGÓRSKA-DZIOK, M. et al. Positive effect of *Cannabis sativa* L. herb extracts on skin cells and assessment of cannabinoid-based hydrogels properties. ***Molecules***, v. 26, n. 4, p. 802, 2021.

ZAMPOL, M. A.; BARROS, M. H. Melatonin improves survival and respiratory activity of yeast cells challenged by alpha-synuclein and menadione. ***Yeast***, v. 35, n. 3, p. 281–290, 2018.

ZANELATI, T. V. et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. ***British Journal of Pharmacology***, v. 159, p. 122–128, 2010.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Alkylating agent–induced NRF2 blocks endoplasmic-reticulum–stress-mediated apoptosis via control of glutathione pools and protein thiol homeostasis. ***Molecular Cancer Therapeutics***, v. 15, n. 12, p. 3000–3014, 2016.

ZHANG, Nanlong; CHAI, Shuren; WANG, Jixing. Assessing and projecting the global impacts of Alzheimer's disease. ***Frontiers in public health***, v. 12, p. 1453489, 2025.

ZHANG, X. et al. Enhancing mitochondrial proteolysis alleviates alpha-synuclein-mediated cellular toxicity. ***NPJ Parkinson's Disease***, v. 10, n. 1, p. 120, 2024. DOI: 10.1038/s41531-024-00733-y.

ZHAO, Y. et al. Activation of cannabinoid CB2 receptor ameliorates atherosclerosis associated with suppression of adhesion molecules. ***Journal of Cardiovascular Pharmacology***, v. 55, n. 3, p. 292–298, 2010.

ZHU, W. et al. Trends and inequalities in the global burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2021: a Chinese perspective. *BMC Public Health*, v. 25, p. 2977, 2025.

ZUARDI, A. W. et al. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, p. 421–429, 2006.

7. ANEXO I: artigo originado desta Tese

Fitoterapia 188 (2026) 106968

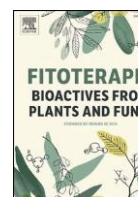


Contents lists available at ScienceDirect

Fitoterapia

journal

www.elsevier.com/locate/fit



Research Paper

Cannabis sativa extracts reduce inclusion formation in a cell model of alpha-synuclein aggregation

Tamires de Almeida Cruz ^a, Rodrigo de Paulo Osorio ^a, Neide Mara de Menezes Epifanio ^b, Madiha Merghani ^c, Marcos Dias Pereira ^d, Douglas Siqueira de Almeida Chaves ^b, Tiago Fleming Outeiro ^{c,d,e,f}, Cristiano Jorge Riger ^{a,*}

^a Federal Rural University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil

^b Federal Rural University of Rio de Janeiro, Pharmaceutical Science Department, Biological and Health Sciences Institute, Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil ^c University Medical Center Gottingen, Department of Experimental Neurodegeneration, Center for Biostructural Imaging of Neurodegeneration, Gottingen, Germany ^d Translational and Clinical Research Institute, Faculty of Medical Sciences, Newcastle University, Framlington Place, Newcastle, Upon Tyne, NE2 4HH, UK ^e Max Planck Institute for Natural Science, 37075 Gottingen, Germany

^f Scientific employee with an honorary contract at Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Gottingen, Germany

^{*} Federal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Center for Mathematical and Natural Sciences, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Alpha-synuclein

Protein aggregation

Parkinson's disease, *cannabis sativa*

Neurodegeneration

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is classified as a synucleinopathy due to the accumulation of protein inclusions rich in the alpha-synuclein (aSyn) protein. Identifying effective pharmacological therapies is important to slow the progression and minimize the symptoms of these diseases. *Cannabis sativa* has a diverse chemical profile depending on its genotype, including several classes of substances, such as cannabinoids, flavonoids, terpenes, and alkaloids. In this study, we evaluated the effects of four *C. sativa* extracts with different phytocannabinoid chemical profiles in two cellular models that reproduce alterations in cellular homeostasis common during the cellular phase of PD and other synucleinopathies. We used *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with plasmid DNA and genetically modified human cells (H4), both expressing aSyn. The results showed that all the extracts were antioxidants, decreasing intracellular oxidation levels and increasing the number of daughter cells in yeast cells, but did not prevent mitochondrial damage. Besides, the extracts reduced the number of intracellular inclusions in H4 cells and increased the number of cells without inclusions. Phytochemical characterization revealed extracts rich in Tetrahydrocannabinol – THC (69.88 %), Cannabidiol – CBD (52.64 %), and Cannabinol – CBN (47.38 % and 58.64 %), and we concluded that, regardless of these percentages, all *C. sativa* extracts showed protective biological activity against toxicity caused by alpha-synuclein production, both in yeast cells and H4 cells.

1. Introduction

Parkinson's Disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disorder [1,2] and is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons, along with the accumulation of aggregated alpha-synuclein (aSyn) in cytoplasmic inclusions known as Lewy Bodies (LBs) [3,4]. Moreover, the overexpression of this protein in neurons is directly implicated in the pathogenesis of PD [5,6]. Numerous studies have highlighted the toxic effects of aSyn overexpression, including its role in aggregation process, oxidative stress, damage to membrane lipids, mitochondrial deficits, autophagic dysfunction, and neuronal cell death [3,7–12].

Saccharomyces cerevisiae has become a widely used model for investigating the basic molecular underpinnings of synucleinopathies versatility and high degree of conservation, facilitating structural studies of proteins and cellular responses to protein aggregation [13]. Overexpressing aSyn in yeast induces cytotoxicity, promoting the translocation of the protein from the plasma membrane to the cytoplasm, where it aggregates into vesicles [3,12]. Additionally, H4 neuroglioma cells have been used to explore the biochemical mechanisms involved in synucleinopathies [14].

The phytochemical complex produced by *Cannabis sativa* has garnered significant pharmacotherapeutic

interest since the elucidation of the endocannabinoid system, a lipid-based signaling pathway

responsible for regulating a wide range of physiological functions within the body [15]. While comprehensive understanding of this system remains limited, it is now recognized as a complex network involving mainly endogenous cannabinoids (anandamide and 2-arachidonoylglycerol), cannabinoid receptors (CB₁R and CB₂R), and enzymes related to fatty acid metabolism [15–18]. Phytocannabinoids, such as Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), have been shown to modulate the endocannabinoid system [17,19,20]; While a group of terpenophenolics have shown potential therapeutic effects against neurodegenerative diseases [21,22]. Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties of CBD have been extensively studied and characterized [23–25]. Aqueous and ethanol extracts of *C. sativa* leaves have demonstrated antiapoptotic and antioxidant activities in motor neurons [26], decreasing tremors and bradykinesia in PD patients [27]. Several studies have established a relationship between cannabinoids, both endogenous and phytocannabinoids, and the modulation of autophagy. Given that aSyn aggregates can cause cytotoxicity leading to cell death, autophagy represents a potential therapeutic target in PD [1,28]. Vrechi [29] and colleagues reported that CBD induced autophagy in astrocytes and neuroblastoma cells, while other studies have demonstrated autophagy induction by CBD in neurons and animal models [30,31].

* Corresponding author at: BR465, km 7, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23897-000, sala 24.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2025.106968>

Received 26 August 2025; Received in revised form 17 October 2025; Accepted 31 October 2025 Available online 2 November 2025

0367-326X/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Other cannabinoids such as cannabinol (CBN), cannabivarin (CBDV), cannabigerol (CBG) and cannabichromene (CBC) have gained increasing attention in recent years [32,33]. Interestingly, cannabinoids have also been shown to modulate various mitochondrial processes, including mitochondrial dynamics and mitophagy, bioenergetic metabolism, and apoptosis [34]. Recent studies indicate that CBN targets mitochondria and preserves their functions, such as redox regulation, membrane potential, bioenergetics, biogenesis, and modulation of fusion/fission dynamics [35]. Given the action of phytocannabinoids in different pathways related to neurodegenerative diseases, we investigated the possible effects of these molecules on protein aggregation, one of the pillars of these diseases. In this study, we investigated the effect of *C. sativa* extracts with distinct chemical profiles on the pattern of intracellular protein aggregation, oxidative stress levels, mitochondrial function, and the impact of these factors on cell survival in *S. cerevisiae* and in human H4 cells expressing the aSyn protein.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, processing, and extraction

Four extracts were obtained from *Cannabis sativa* flower genotypes, cultivated by an association in collaboration with UFRRJ under process number 23083.002965/2020–11. One hundred grams of each genotype of *C. sativa* flowers were dried in a ventilated oven at 110 °C/48 h to decarboxylate the acidic cannabinoids and obtaining their neutral forms. This was followed by pulverization using a knife mill. The extraction was performed using ultrasound (60 W, 10 min) in a methanol:water solution (9:1). After extraction, the extracts were filtered and dried using a rotary evaporator for quantification of the crude extracts.

Extracts were classified according to their chemical profile as: *E*-THC – extract rich in THC; *E*-CBD - extract rich in CBD; *E*-CBN - extract rich in CBN; *E*-CBN+ - extract with a higher concentration of CBN. The extracts were stored in amber tubes at 4 °C before the analysis of chemical and biological characterization. 2.2. Chemical profile of *C. sativa* extracts

Extracts were solubilized (10 mg.mL⁻¹) in methanol and filtered for the analysis. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis coupled with the Diode Array Detector were performed using Shimadzu equipment. The equipment consisted of an HPLC controller system, computer interface model CBM-40, semi-preparative high-pressure pump model LC-20AR, membrane degasser (on-line) model DGU-405, photodiode array spectrophotometric detector model SPD40, automatic sampler model SIL-10 AF, fraction collector model FRC-10 A, and column oven model CTO-40S. The method was developed using a Phenomenex C18 chromatographic column (150 × 3 mm, 2.6 µm particle size), with the oven temperature set at 40 °C. The mobile phase was composed of methanol (B) and ultrapure water with 0.01 % formic acid (A) in an isocratic mode with 82 % B, a flow rate of 1 mL.min⁻¹, an injection volume of 50 µL, and a PDA absorption range from 190 nm to 500 nm, with an analysis time of 47 min. Detection was performed at 280 nm. Methanol HPLC grade was obtained from Supelco. Ultrapure water was obtained from Milli-Q/Merck. The cannabinoids were identified by comparing their chromatograms to a multi-component certified solution standard of (–)-δ9-THC, cannabinol (CBN) and cannabidiol (CBD), by Cerillant/Sigma-aldrich, Brazil, and by their retention times during the analysis.

2.3. Cell culture and transfection

Human neuroglioma cells (H4) were maintained in Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies-Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10 % fetal bovine serum gold (FBS) (PAA, Colbe, Germany) and 1 % penicillin-streptomycin (PAN, Aidenbach, Germany) at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. For the experiments with H4 cells, the extracts were dissolved in pure DMSO and stored at room temperature at a concentration of 2 mg.mL⁻¹.

Twenty-four hours before transfection, cells were seeded in 12 or 24- well plates (Costar, Corning, New York, USA). Equal amounts of plasmids encoding for synT and synphilin-1 (described in Lazaro et al., 2014) [8] were transfected using the FuGENE6 Transfection Reagent (Promega, Madison, USA) at a 1:3 ratio, following the manufacturer's instructions. Transfection was performed for 48 h. Cells were treated with the *C. sativa* extracts at 1 and 10 µg.mL⁻¹, always 24 h after transfection.

2.4. Yeast cell culture conditions

In this study, three *S. cerevisiae* strains were used: BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*), p426GAL-aSyn-GFP (referred to as aSyn in this study), which contains the human SNCA gene fused to GFP under the regulation of the inducible GAL1 promoter, as a model for aSyn, and P426 with the empty vector pRS426GAL (referred to as EV in this study), used as a control.

The BY4741 strain was cultured in YPD medium (2 % (w/v) glucose, 1 % (w/v) yeast extract, and 2 % (w/v) peptone). Strains containing plasmid DNA were cultured in synthetic medium (SD) without uracil, containing 0.67 % (w/v) nitrogen base without amino acids (Difco), and 2 % (w/v) glucose supplemented with amino acids (histidine, methionine, and leucine) at a concentration of 0.79 g.L⁻¹. To induce the expression of aSyn, glucose was replaced with 2 % (w/v) galactose (SDgal). Expression of aSyn was induced by the GAL1 promoter, which was activated after incubating the yeast cells in galactose for 2 h. For the yeast experiments, the extracts were dissolved in ethanol, diluted at 1:20, and kept at 4 °C, with a stock concentration of 500 µg.mL⁻¹.

2.5. Evaluation of the toxicity and antioxidant potential of *C. sativa* extracts

Cells of the BY4741 strain were incubated at 28 °C/160 rpm for 2 h in phosphate buffer (0.5 M, pH 6.0) with *C. sativa* extracts (25 µg.mL⁻¹). To evaluate yeast cells' viability, aliquots corresponding to 40 µg of cells were diluted and plated in duplicate on 2 % YPD solid medium. The antioxidant activity of the extracts was evaluated based on yeast cell plating in the presence of the stress agent H₂O₂ and intracellular oxidation via 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). After removing the aliquots for the previous plating, the remaining cell suspensions were exposed to H₂O₂ (2.0 mM) for 1 h in PBS. Colony-forming units were counted after 48 h of incubation at 28 °C in a B.O.D incubator.

After the initial treatment with extracts described above, H₂DCFDA solution was then added to the cell suspension, and the yeast cells were incubated under the same conditions for an additional 15 min. To induce oxidative stress, same H₂O₂ step was performed. Subsequently, aliquots of the suspensions were

transferred to a 96-well plate, and fluorescence of the supernatant was measured using a microplate reader with excitation and emission wavelengths of 488 and 520 nm, respectively.

2.6. Evaluation of the protective profile of *C. sativa* extracts against toxicity induced by aggregating proteins

EV and aSyn strains were preincubated in SD medium, resuspended in SDgal medium, and maintained for 2 h in a refrigerated shaking incubator (28 °C/160 rpm) to induce protein expression. Cell suspensions were then incubated with the different *C. sativa* extracts at concentrations ranging from 5 to 25 µg.mL⁻¹ for 2 h. Subsequently, 20 µg of cells were serially diluted and plated on solid medium with 2 % SD dropout. Colony-forming units were counted after 72 h.

2.7. Mitochondrial integrity assays

EV and aSyn strains were cultured in SD medium and resuspended in SDgal for 2 h (28 °C/160 rpm). Following this, cells were treated with *C. sativa* extracts for 2 h (28 °C/160 rpm), and 10 µL of JC-1 reagent (1.0 mM) was added. FCCP was used as an additional control. After 40 min of incubation with JC-1, aliquots were transferred to a black 96-well plate. Fluorescence was measured using a microplate reader in two different wavelength ranges: green (excitation: 488 nm and emission: 525 nm) and red (excitation: 534 nm and emission: 590 nm). The result was expressed as the red/green fluorescence ratio.

2.8. Flow cytometry

H4 cells were cultured in a 24-well plate, trypsinized, collected and cell suspension was centrifuged. Supernatant was discarded, and the pellet resuspended in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline containing 0.1 % propidium iodide. A total of 5000 events were counted in triplicate for each experiment using a Millipore Guava EasyCite Flow Cytometer.

2.9. Immunocytochemistry

Forty-eight hours after transfection and 24 h after treatment, H4 cells were washed with PBS and fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) for 10 min at room temperature (RT). Permeabilization was then performed using 0.5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA) for 15 min at RT. Cells were blocked with 1.5 % Bovine Serum Albumin (BSA) in Dulbecco's PBS for 1 h. Subsequently, cells were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody: Purified mouse anti-aSyn (1:1000, BD 610787 Transduction Laboratory, New Jersey, USA). After washing, the secondary antibody, Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), was applied for 1 h at RT. Nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Sigma- Aldrich, D8417) (1:5000 Dulbecco's PBS) for 10 min. After a final wash, coverslips were mounted by using Fluoromount-G (Invitrogen) and analyzed under fluorescence microscopy.

Images were captured using a Zeiss Axio Observer epifluorescence microscope equipped with a 100× oil objective lens. A total of 150 images were acquired per experimental condition with predefined settings. To quantify the number of aSyn inclusions, a "binary" black and white image was generated, allowing a threshold to be applied for differentiating inclusions from the background. Image analysis was subsequently performed using the "Analyze particles" plugin in the Fiji open-source software.

Transfected H4 cells were identified and scored based on the pattern of aSyn inclusions, classified into four groups: cells without inclusions (0 inclusions), less than five inclusions (<5 inclusions), between five and nine inclusions (≥5–9 inclusions) and more than ten inclusions (>10 inclusions). Results were expressed as the percentage of the total number of transfected H4 cells from three independent experiments per condition. For aggregation quantification, at least 50 cells per variant and per experiment were counted.

2.10. Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± standard deviation from at least three independent experiments. Statistical significance was determined using one-way and two-way ANOVA and Dunnett's post-test, with the analysis conducted using GraphPad Prism 8 software.

3. Results

3.1. Chemical profile of *Cannabis sativa* extracts

Four distinct extracts were obtained following the extraction process. To assess the chemical composition of these extracts, high-performance liquid chromatography-diode arrays (HPLC-DAD) analysis was conducted. The major compounds were compared with standards of cannabinoids, and their concentrations were calculated based on the peak area. The extracts exhibited significant variation in their chemical profiles, as evidenced by both the chromatograms (Fig. 1). The extract with the highest concentration of THC was designated as *E*-THC, while the one with CBD as the major component was labeled *E*-CBD. The remaining two extracts, which contained CBN as the predominant cannabinoid, were named *E*-CBN and *E*-CBN+, with the "+" signal indicating the extract with the higher concentration of CBN.

E-THC extract presented 69.88 % of THC in its composition, and CBD and CBN were not detectable. *E*-CBD extract presented 52.64 % of CBD, 4.65 % of THC, and CBN was not detectable. The other two extracts presented CBN as a major component, but with different concentrations. *E*-CBN had 47.38 % of CBN in its composition, and also THC (4.29 %) and CBD (2.08 %) amounts. On the other hand, *E*-CBN+ presented a higher percentage of CBN (58.64 %), and THC and CBD were not detectable.

3.2. Impact of *C. sativa* extracts on yeast cell viability

Toxicity of the extracts (25 µg.mL⁻¹) was assessed in the BY4741 strain by evaluating the ability to generate viable daughter yeast cells after incubation with the four extracts. After 72 h of incubation, colony- forming units were counted, and results indicated no significant toxicity under these conditions (Fig. 2a). An additional experiment was conducted using an oxidative stressor to investigate the response of the extracts in relation to cell viability. After treatment with the four extracts (25 µg.mL⁻¹), yeast cells were exposed to 2.0 mM H₂O₂ for 1 h (Fig. 2b). All extracts significantly mitigated the oxidative stress induced by hydrogen peroxide, demonstrating notable antioxidant potential.

Specifically, the treatments resulted in a percentage of viable colonies statistically comparable to the control, whereas yeast cells subjected to H_2O_2 without any treatment exhibited less than 40 % viable colonies.

3.3. Intracellular redox environment

Intracellular oxidation was assessed using the compound H_2DCFDA , which permeates the plasma membrane and undergoes deacetylation by esterases within the cells (H_2DCF). In the intracellular environment H_2DCF is converted to DCF (fluorescent), and its concentration is quantified fluorometrically at a specific wavelength [36]. Based on the antioxidant potential of the extracts in the yeast cell viability assay (Fig. 2b), the intracellular redox environment was assessed in the yeast

Fig. 1. Chromatograms of *C. sativa* extracts obtained by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array. Brown: E-THC; Blue: E-CBD; Pink: E-CBN; Black: E-CBN+. Column: Fortis C18 (100 × 3 mm internal diameter and 2.6 µm particle size). Mobile phase: methanol (B) + ultrapure water 0.01 % in formic acid (A) in gradient mode starting at 80 % B (0–2 min 80 % B, 6 min 83 % B, 8 min 85 % B, 12 min 85 % B and 18 min 80 % B). Analysis flow: 1.0 mL/min, injection volume of 20 µL and absorption range from 190 nm to 500 nm, with the 280 nm wavelength selected, with an analysis time of 47 min. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

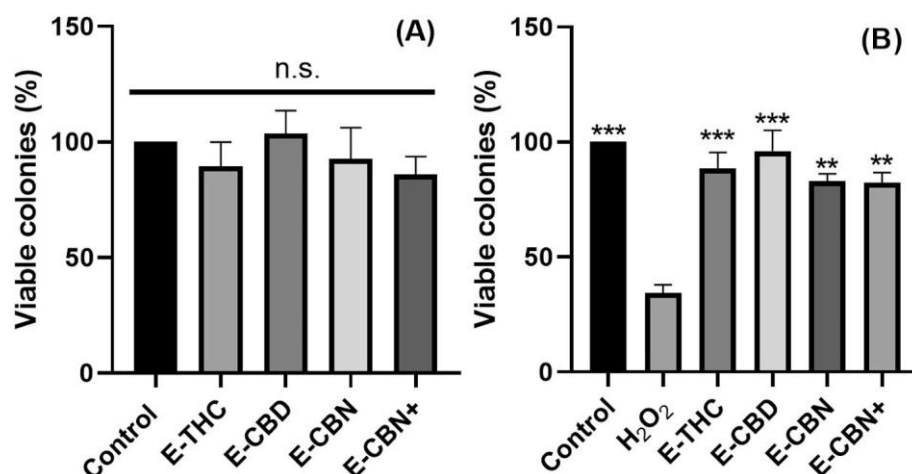


Fig. 2. Cell viability assay using yeast strain BY4741. Control: yeast cells without any treatment. H_2O_2 : yeast cells exposed only to H_2O_2 (2.0 mM) for 1 h. Colony-forming units were counted on YPD 2 % solid medium after incubation with the extracts ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 2 h. (A) Toxicity of the extracts. (B) Antioxidant potential: after pretreatment with the extracts, yeast cells were exposed to H_2O_2 (2.0 mM) for 1 h. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of at least 3 independent experiments. Statistical analysis: One-Way ANOVA and Tukey's post-test with ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) representing significant differences compared to the

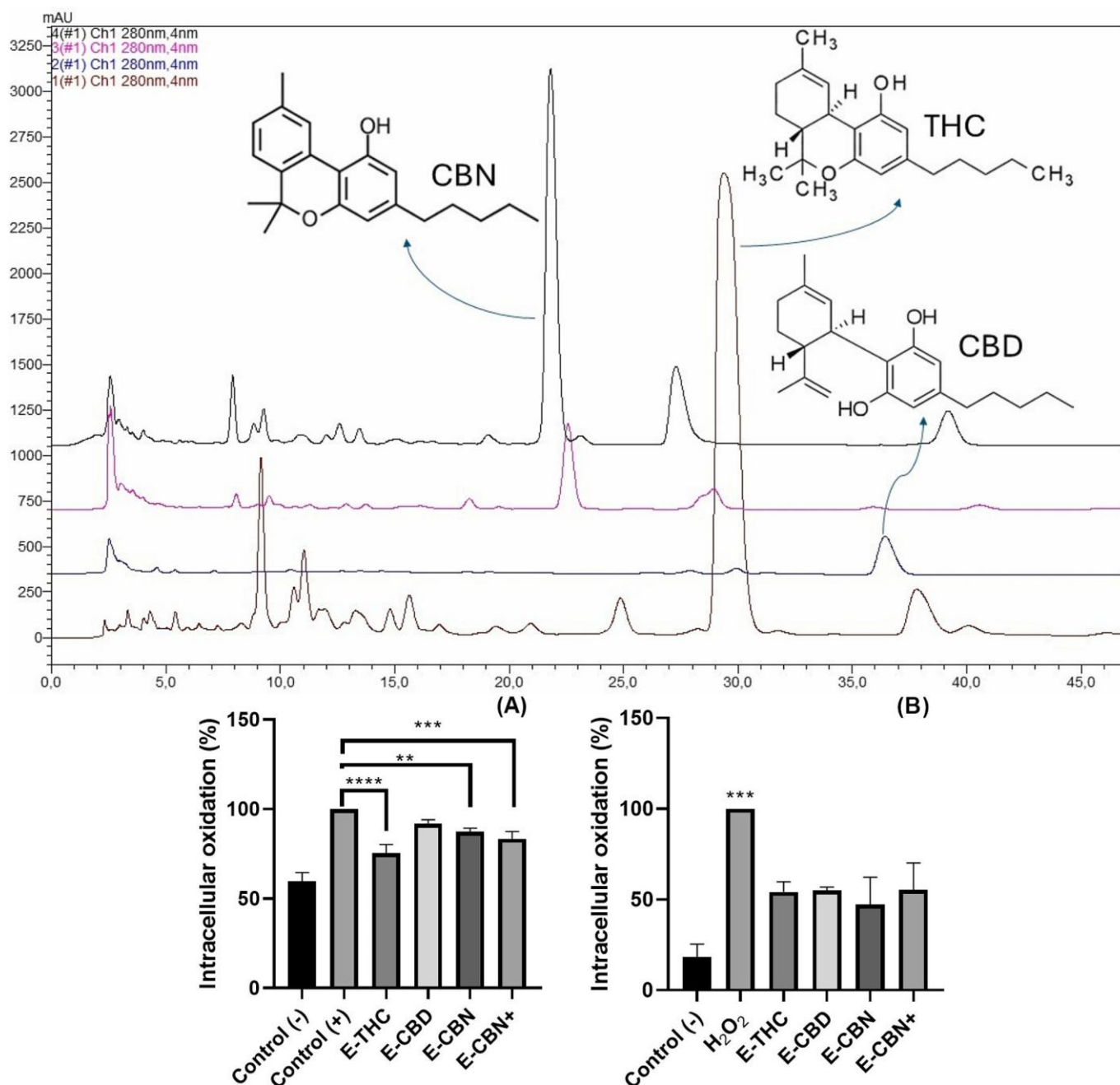


Fig. 3. Intracellular oxidation levels. Quantification of fluorescent percentage. (A) Control (-): Empty vector (p426GAL); Control (+): yeast cells expressing aSyn (p426GAL-aSyn-GFP). The remaining columns represent yeast cells expressing aSyn protein and treated with extracts (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 2 h. (B) Control (-): BY4741 cells without any treatment. H_2O_2 : cells exposed only to H_2O_2 (2.0 mM) for 1 h. The remaining columns represent yeast cells stressed with H_2O_2 (2.0 mM) and pretreated with the extracts (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 2 h. Data are presented as mean $\pm$ SD of 3 independent experiments. Statistical analysis: One-Way ANOVA and Tukey's post-test, with ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and **** ($p < 0.0001$) representing significant differences relative to both controls (aSyn and H_2O_2). control. Not significant (n.s.) compared to the control.

strain expressing aSyn. As anticipated, aSyn expression increased intracellular oxidative stress (Fig. 3a).

Interestingly, only the E-CBD extract failed to significantly reduce the oxidative stress induced by aSyn. Conversely, the E-THC extract reduced intracellular oxidation by approximately 25 %, while E-CBN and E-CBN+ extracts reduced oxidation by 13 % and 16.5 %, respectively. For comparison, this

experiment was also conducted with BY4741 strain (Fig. 3b), where all extracts effectively reduced fluorescence by approximately 50 %.

3.4. Impact of the *C. sativa* extracts on mitochondrial integrity and protection against toxicity induced by aSyn protein

Oxidative damage to the mitochondrial membrane has an impact on cellular dynamics and homeostasis and it

is one of the main factors associated with cell death [37]. JC-1 is a fluorochrome commonly used to study mitochondrial integrity, particularly in the context of apoptosis. The cyanine dye forms aggregates in the mitochondria of healthy cells, emitting red fluorescence due to high membrane potential. As apoptosis progresses and the mitochondrial membrane collapses (reducing membrane potential), JC-1 can no longer accumulate in the organelle. In this case, the dye migrates to the cytoplasm, where its monomeric form is predominant and exhibits green fluorescence [38].

Mitochondrial membrane potential was measured by fluorescence in yeast strains expressing aSyn and treated with *C. sativa* extracts (25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). As expected, aSyn caused substantial mitochondrial damage, however *C. sativa* extracts were unable to prevent the decline in membrane potential (Fig. 4a).

In order to assess whether different concentrations of

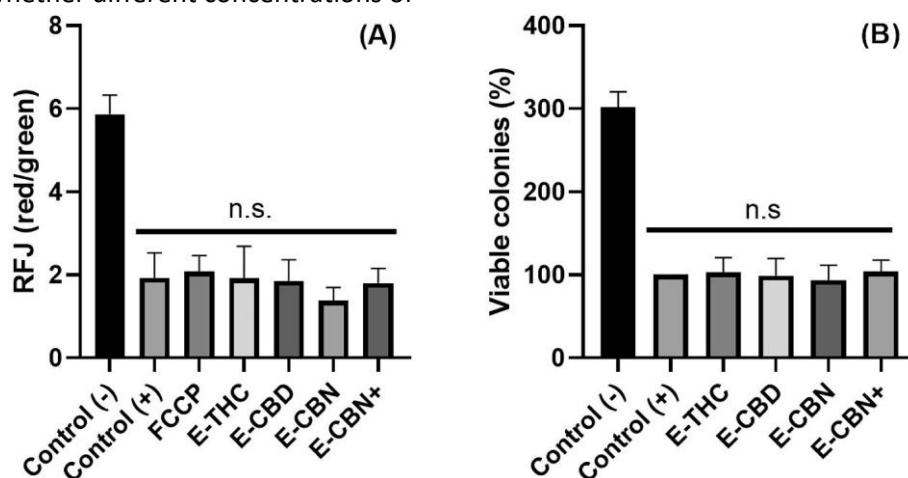


Fig. 4. Effect of *C. sativa* extracts on aSyn toxicity and mitochondrial activity. **(A)** Assessment of the mitochondrial integrity in aSyn-expressing cells by quantifying the membrane potential using JC-1. **(B)** Cell viability assay by colony-forming units expressed as a percentage. Control (-): Empty vector (pRS426GAL); Control (+): yeast cells expressing aSyn (p426GAL-aSyn-GFP); + FCCP: yeast cells expressing aSyn after exposure to the inhibitor FCCP (10 μM). The remaining columns represent aSyn-expressing cells treated with extracts (25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 2 h. Data are presented as mean $\pm$ SD of 3 independent experiments. Statistical analysis: One-Way ANOVA and Tukey's post-test. Not significant (n.s.) compared to the positive controls.

C. sativa extracts could better protect the mitochondrial membrane, a range of lower and higher concentrations was assessed (Figs. S1 and S2). No higher concentrations (50, 100 and 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) were able to preserve mitochondrial integrity in the presence of aSyn-induced damage in yeast cells. In fact, there was a tendency for mitochondrial damage to worsen at these higher concentrations. Consequently, the experiment was repeated using lower concentrations of the extracts (5, 10 and 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). However, even at these lower concentrations, the extracts were unable to mitigate the mitochondrial damage caused by aSyn-expressing cells.

Cell viability assay using the aSyn yeast strain incubated with the extracts (Fig. 4b) revealed that mitochondrial damage was directly related to the loss of viable cells and again demonstrated that the four extracts were not able to reverse the damage promoted by the generation of the alpha-synuclein protein in the yeast cells. Consequently, as in the mitochondrial integrity experiment, lower concentrations were evaluated for aSyn, but the treatments still failed to protect the yeast cells (Fig. S3).

3.5. Cytotoxicity of *C. sativa* extracts in H4 cells

The toxicity of the extracts in H4 human cells was assessed using flow cytometry (Fig. 5). Propidium iodide (PI) is a fluorescent, hydrophobic molecule that can enter cells with damaged or compromised plasma membranes, binding to DNA and emitting a fluorescent

signal. In healthy cells, PI cannot cross the intact plasma membrane. However, in dead or damaged cells, PI penetrates the cell and binds to DNA, generating fluorescence. Control H4 cells showed around 2 % of dead cells, and the vehicle (DMSO) exhibited approximately 2.4 %. The results demonstrated no relevant difference in cell death between the extracts at concentrations of 1 and 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ when compared to the control groups.

3.6. Effect of the extracts on aSyn inclusions

To assess the impact of the four *C. sativa* extracts on aSyn inclusions, the aggregation process was conducted

using a well-established model, which involved the co-expression of a modified version of aSyn (SynT) and synphilin-1, a protein found in LBs that interacts with aSyn, using H4 cells. After 24 h of co-transfection with both plasmids, H4 cells were treated with the extracts at 1 and 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ concentrations. Forty-eight hours after transfection, immunocytochemistry was performed, and images were acquired using fluorescence microscopy (Fig. 6a). To better illustrate the heterogeneity of the inclusions observed in the H4 cells, they were categorized into four distinct groups based on the number of inclusions present (Fig. 6b). Cells without inclusions (0 inclusions), cells with less than five inclusions (< 5 inclusions), cells with five to nine inclusions (≥ 5 –9 inclusions), or cells with ten or more inclusions (≥ 10 inclusions). This categorization provided a clearer understanding of the influence of different extracts on the inclusion pattern in H4 cells.

Control group showed approximately 39 % of H4 cells without inclusions, while the vehicle control (DMSO) exhibited a similar result (~ 40 %). Exposure to the extracts revealed distinct patterns in the number of H4 cells without inclusions (0 inclusions) and H4 cells with varying numbers of inclusions. At both concentrations (1 and 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *E*-THC increased the percentage of H4 cells with 0 inclusions to ~ 50 % and ~ 53 %, respectively, suggesting a protective effect against inclusion formation. At 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *E*-CBD showed a similar increase in H4 cells without inclusions (~ 50 %), and at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, this number rose to ~ 65 %, indicating an even more effective reduction in inclusions at higher concentration. At 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the CBN-rich extracts (*E*-CBN and *E*-CBN+) showed the lowest number of H4 cells without inclusions (~ 46 % and ~ 41 %, respectively), with no significant difference compared to the control. However, at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ both CBN extracts exhibited a significant increase in H4 cells without inclusions (~ 57 % for *E*-CBN and ~ 58 % for *E*-CBN+), surpassing the *E*-THC group.

Both controls (control and vehicle) showed approximately 29 % and 27.5 % of H4 cells with <5 inclusions, respectively, with no significant difference. At 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *E*-THC significantly decreased the number

of H4 cells with <5 inclusions to approximately 15.5 %, while other extracts (*E*-CBD, *E*-CBN and *E*-CBN+) showed no significant reduction. At 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ all extracts significantly reduced the number of H4 cells with <5 inclusions. *E*-THC and *E*-CBN showed approximately 23 % of H4 cells with <5 inclusions, *E*-CBD had 22 % and *E*-CBN+ had approximately 19.5 %. Regarding cells with 5–9 inclusions, no significant difference was observed between the control and vehicle groups. *E*-THC and *E*-CBN+ showed no significant difference at both concentrations (1 and 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) relative to the controls. *E*-CBN also showed no significant difference at 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, however at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ it decreased from 19 % in controls to ~ 13 %, showing a modest effect on the higher concentration. *E*-CBD extract showed the most notable effect, reducing H4 cells with 5–9 inclusions to approximately 13.5 % at 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and approximately 11 % at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicating an effective reduction of inclusions in this group. About 13 % of control and DMSO-treated H4 cells had more than or equal to 10 inclusions (≥ 10 inclusions). At 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *E*-THC and *E*-CBN+ were unable to reduce the number of cells with ≥ 10 inclusions (~ 13.5 % and 12 %, respectively). Both *E*-CBD and *E*-CBN reduced the number of cells with ≥ 10 inclusions to approximately 7.5 %. At 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, all the extracts significantly decreased the number of cells with ≥ 10 inclusions, with *E*-CBD showing the most effective reduction (~ 3 %). *E*-THC, *E*-CBN and *E*-CBN+ presented approximately 7 %, 7.5 % and 5 %, respectively.

In summary, *E*-CBD emerged as the most effective extract in reducing aSyn inclusions in H4 cells, particularly at the higher concentration (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). All extracts demonstrated a varying degree of protection against inclusion formation, with *E*-THC and *E*-CBN+ showing moderate effects and *E*-CBN showing better results compared to these two, particularly at higher concentrations.

4. Discussion

Despite the promising therapeutic applications responsible for the increasing attention that *C. sativa* has received [1,39,40], research on the effects of crude plant material such as extracts and oils remains

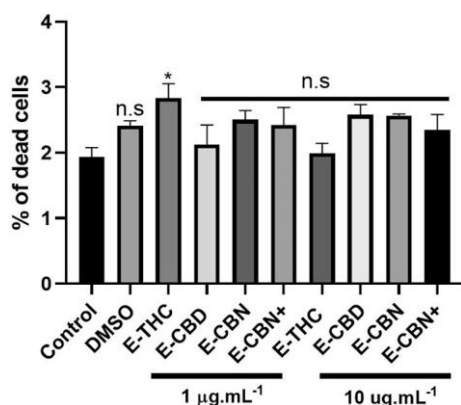
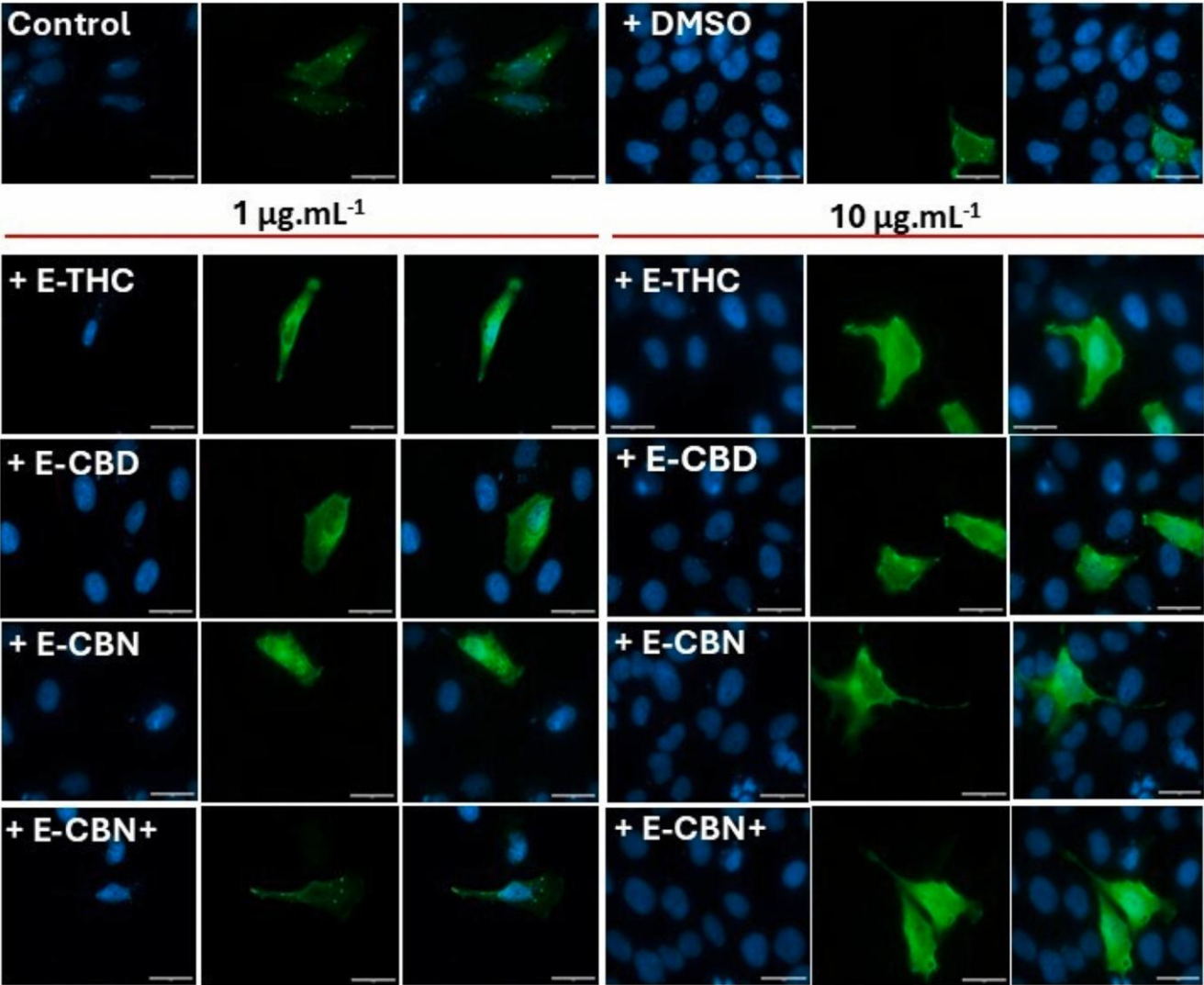


Fig. 5. Evaluation of the toxicity of *C. sativa* extracts on H4 cells using flow cytometry. Control: H4 neuroglioma cells without any treatment; DMSO: H4 cells exposed to DMSO vehicle. The remaining columns show H4 cells incubated with the extracts at 1 and 10 µg.mL⁻¹. Data are presented as mean ± SD of 3 independent experiments. Statistical analysis: One-Way ANOVA and Tukey's post-test, with * ($p < 0.05$) representing significant differences compared to the control. Not significant (n.s.) relative to control.

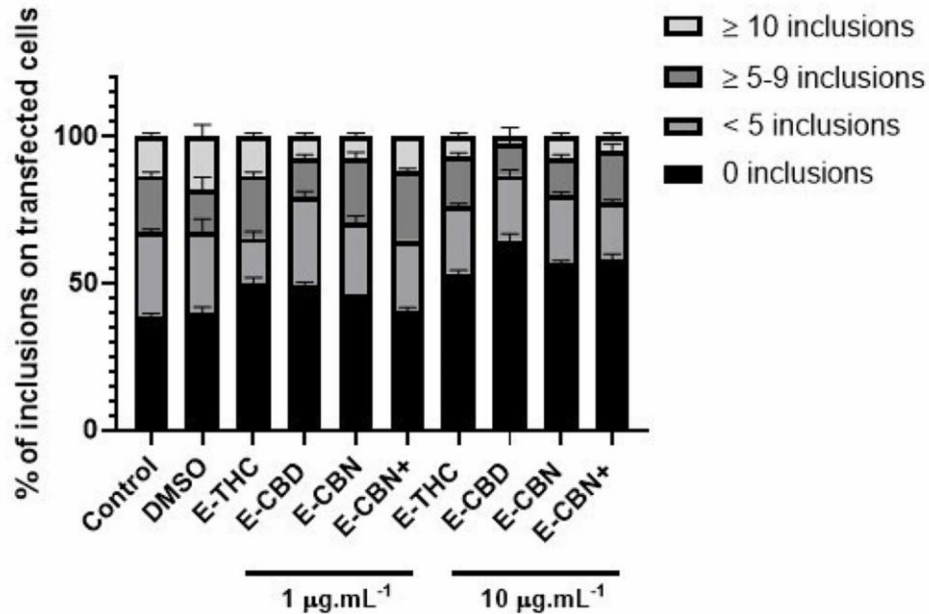
limited [16]. The *C. sativa* species exhibits remarkable genetic and phenotypic diversity, giving rise to distinct genotypes with varied morphological, biochemical, and physiological characteristics. This variability results from a combination of genetic inheritance and environmental adaptation, which has led to the development of diverse local varieties and modern

cultivars selected for medicinal applications. In the present study, we produced extracts from genotypes obtained from an association responsible for cultivating and producing *C. sativa*-derived preparations. These extracts were chemically characterized, and distinct chemical compositions were identified, likely reflecting the specific genetic crossings performed by the producers. We selected four different *C. sativa* extracts, with a distinct cannabinoid profile to explore their biological effects, especially their antioxidant and neuroprotective potential. The biosynthesis of cannabinoids in *C. sativa* begins with the precursor molecules olivetolic acid (OLA) and geranyl diphosphate (GPP) [41–43]. These precursors condense to form cannabigerolic acid (CBGA), which is considered the precursor cannabinoid. CBGA is converted into tetrahydrocannabinolic acid (THCA), cannabidiolic acid (CBDA) and cannabichromenic acid (CBCA) by THCA synthase (THCAS), CBDA synthase (CBDAS) and CBCA synthase (CBCAS), respectively [44]. Upon decarboxylation (e.g., through heat) these

(A)



(B)



(caption on next page)

Fig. 6. Effect of *C. sativa* extracts on aSyn aggregation in H4 cells.

(A) Images demonstrating cellular inclusions containing aSyn. This model consists of cells co-expressing SynT together with synphilin-1, as previously described by Lazaro et al., 2014 [8]. Scale bar: 30 μ m. **(B)** Quantification of inclusions in H4 cells (neuroglioma). Three independent experiments were conducted, and fifty cells were scored per experiment and classified into distinct groups according to the inclusion pattern. Statistical analysis: One-Way ANOVA and Dunnett's post-test, available in Fig. S4 in the supplementary material.

acidic compounds are converted to their neutral forms: THC, CBD, and CBC, respectively. Depending on storage conditions, such as temperature and time, crude material may also contain cannabinol (CBN), a degradation product of THC [45]. For this reason, the most relevant genotypic differences among *C. sativa* accessions are associated with cannabinoid biosynthesis. Variations in the THCAS and CBDAS genes determine the relative proportions of THC and CBD [46,47]. Our results revealed apparent differences in chemical composition among the extracts. Such variation is likely linked to the differential enzyme activity of THCAS and CBDAS. Extracts with higher THC concentrations likely correspond to genotypes exhibiting strong THCAS activity and weak CBDAS expression. In contrast, those rich in CBD likely possess active CBDAS and inactive THCAS, a pattern characteristic of hemp-type varieties [48]. In genotypes or samples with elevated CBN levels, the compound was most likely produced as an oxidative degradation product of THC, rather than being synthesized through a dedicated enzymatic pathway, as reported in the literature [49].

It is known that the chemical composition of plant extracts changes depending on the extraction method (maceration, soxhlet, ultrasound, and supercritical CO₂

extraction) [50,51]. Previous studies have revealed that maceration, ultrasound, or supercritical CO₂ extraction methods at room temperature produce higher yields of acidic phytocannabinoids [50]. However, endogenous cannabinoids have greater potential to interact with the mammalian endocannabinoid system in their neutral form [52]. Therefore, the ultrasound extraction method was used, and a drying step of the extracts at 110 °C was added to obtain their neutral forms (THC, CBD, and CBN). Furthermore, we performed the extraction using methanol as the solvent, since methanolic and ethanolic extractions are the most effective for isolating a higher percentage of phytocannabinoids [50]. As a result, different genotypes of the *C. sativa* species resulted in four extracts with different chemical profiles regarding the main cannabinoids (Fig. 1), as well as other substances that may include other cannabinoids, flavonoids and terpenoids [53–56].

Cannabinoids have high antioxidant capacity mainly due to the presence of phenolic hydroxyls [57], for example Δ^9 -THC and CBD exhibited greater antioxidant activity compared to vitamins A, C, and E [58]. CBN, CBG, CBGA, CBDA, and Δ^9 -THCA have also demonstrated potential intervention in antioxidant actions, since they can eliminate free radicals, prevent the oxidation process and reduce metal ions [35]. Beyond cannabinoids, the

material extracted from *C. sativa* leaves also contain flavonoids and terpenoids, which are chemical classes with known antioxidant properties [45,59,60].

Synergistic effects of cannabinoids, flavonoids, and terpenoids could have a significant impact on the regulation of the oxidative environment inside the cell [45].

Expression of mutant aSyn reduces proteasome activity, increases intracellular levels of reactive oxygen species and causes mitochondrial deficits [61–63].

Mitochondrial dysfunction and oxidative stress are significant aspects of aSyn toxicity in yeast expressing prominent levels of this protein [8,64]. To explore the promising antioxidant potential of these extracts in contact with the BY4741 strain (empty vector - p426GAL) (Fig. 2b), the intracellular redox environment was also evaluated in the aSyn yeast strain (Fig. 3a and b). As expected, the presence of the aSyn protein caused an increase in intracellular oxidative stress. It was also observed that all extracts (except *E*-CBD) at a concentration of 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (non-cytotoxic concentration for yeast - Fig. 2a) reduced the oxidative stress caused by the presence of this protein. This antioxidant effect was corroborated in the assay with H_2O_2 as a stressor.

In this study, we used three strains of *S. cerevisiae*: BY4741, transformed with the empty vector (EV), and transformed with the alpha-synuclein protein (aSyn) gene. We identified non-cytotoxic concentrations of the extracts (up to 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Fig. 2a), confirmed the toxicity of aSyn associated with mitochondrial integrity (Fig. 4a) and the generation of daughter cells (Fig. 4b), and demonstrated the antioxidant activity of the extracts (Figs. 2b, 3a, and b) in yeast cells stressed by aSyn generation or by the presence of hydrogen peroxide (2.0 mM). However, to more efficiently evaluate the action of the different *C. sativa* extracts (*E*-THC, *E*-CBD, *E*-CBN, and *E*-CBN+) in mammalian cells, we used transfected H4 human cells producing aSyn. Using lower concentrations of the extracts (1.0 and 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), visual (Fig. 6a) and quantitative (Fig. 6b) analyses demonstrated that all *C. sativa* extracts were able to improve the H4 cell's ability to prevent or eliminate aSyn inclusions, with the higher concentration being more efficient in cleaning aSyn (Fig. 6b).

It is important to consider that cannabinoids interact with CB₁R, a cannabinoid receptor located in cortex, hippocampus, and basal ganglia, and CB₂R, a cannabinoid receptor expressed in lymphocytes, neutrophils, and monocytes, although it can also be expressed in the brain, including hypothalamus [17]. Additionally, studies have identified that cannabinoids can interact with Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) [1,17]. TRPV1 is highly expressed in neurons, astrocytes, and microglia [65] and it participates in postsynaptic activation of Ca^{2+} -sensitive pathways [1,66]. Moreover, the endocannabinoids AEA and 2-AG modulate CB₁R and CB₂R receptors and activate TRPV1 [17]. Endocannabinoid production can be stimulated by the phytocannabinoids via activation of cannabinoid receptors or via inhibition of FAAH (which is responsible for AEA degradation) [67,68].

E-CBD extract was the most effective against inclusions formation at both concentrations, but especially at 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, increasing the number of H4 cells without inclusions and reducing the number of intracellular inclusions in a dose-dependent way. It is already known that CBD can modulate the activity of CB₁R, CB₂R, TRPV1, FAAH [69,70] and other receptors such as δ -opioid and serotonin 5-HT_{1A} [71]. Since CBD can modulate different targets, it is still necessary to clarify exactly which mechanism can be responsible for aSyn aggregation reduction in H4 cells. However, a very recent published study investigated the relationship between CBD and aSyn via autophagy in vitro and they concluded that CBD induced autophagy in SH-SY5Y cells with accumulation of WT aSyn and the increased autophagic flux promoted a reduction in the number of cytosolic aSyn [1]. This same study also demonstrated that these effects were mediated by CB₁R activation. Another study highlighted that CBD was able to reverse alterations in locomotion behavior and neuron morphology caused by reserpine in *Caenorhabditis elegans* strains and it was able to counteract aSyn impairments [30].

Despite having a higher concentration of CBN, the chemical composition of CBN-rich extracts is completely different. In addition to *E*-CBN+ presenting two peaks in the chromatogram that may represent other phytocannabinoids not identified in this study (Fig. 1) and that may contribute to a synergistic effect, there is

another important hypothesis to be considered. Even in very low quantities, E-CBN contains THC (4.29 %) and CBD (2.08 %) in its composition, which may be acting in conjunction with CBN through the so-called “entourage effect”, already described in several studies but still controversial. Some studies have reported that cannabinoids present a more efficient pharmacological response when there are interactions between them (intra- *entourage* effect) or between cannabinoids and other classes of molecules (inter-*entourage* effect), such as terpenes and flavonoids [72,73]. Terpenoids, for example, can significantly modulate or alter the bioactivity of cannabinoids [72]. Recently, a study tested the anti-inflammatory and antidepressant-like effects of *C. sativa* leaves in vivo e in vitro and they suggest that the efficacy of the extracts in the study was related to the *entourage* effect between the different bioactive phytochemicals found in the plant [74].

5. Conclusion

Four *Cannabis sativa* extracts rich in different phytocannabinoids (THC, CBD, and CBN) demonstrated antioxidant potential independent of their chemical profiles. A decrease in the intracellular oxidative environment in the *Saccharomyces cerevisiae* model with aSyn indicates that the extracts (E-THC, E-CBD, E-CBN and E-CBN+) may contribute to maintaining cellular redox homeostasis, minimizing potential effects related to the development of Parkinsonism. Additionally, the extracts were also effective in reducing the number of aSyn inclusions in the cytoplasm of H4 cells (neuroglioma) and increasing the number of aSyn-expressing human cells without inclusions, a predominant characteristic in patients with Parkinson’s disease. It is important to note that the extracts did not promote mitochondrial protection after damage induced by aSyn toxicity in yeast cells. These findings suggest that although *C. sativa* extracts may have promising effects on modulating aSyn inclusions and intracellular antioxidant protection, the underlying mechanisms of the synergistic action of these extracts in relation to mitochondrial protection still need to be investigated.

CRedit authorship contribution statement

Tamires de Almeida Cruz: Methodology, Investigation, Data curation, Conceptualization, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Rodrigo de Paulo Osorio:** Methodology, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Neide Mara de Menezes Epifanio:** Methodology, Investigation. **Madiha Merghani:** Methodology, Investigation. **Marcos Dias Pereira:** Resources, Methodology, Conceptualization, Writing – review & editing. **Douglas Siqueira de Almeida Chaves:** Resources, Methodology, Conceptualization, Writing – review & editing. **Tiago Fleming Outeiro:** Supervision, Resources, Methodology, Data curation, Conceptualization, Writing – review & editing. **Cristiano Jorge Riger:** Supervision, Methodology, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization, Writing – review & editing.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brazil) – Finance Code 001, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - Rio de Janeiro) - Finance Code E-26/210.982/ 2024, and the TFO is funded by DFG SFB1286, Project B8.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing interests that could have appeared to influence this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2025.106968>.

[org/10.1016/j.fitote.2025.106968](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2025.106968).

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] A.G. Erustes, V.C. Abílio, C. Bincoletto, M. Piacentini, G.J.S. Pereira, S.S. Smaili, Cannabidiol induces autophagy via CB1 receptor and reduces α -synuclein cytosolic levels, *Brain Res.* 1850 (2025) 149414, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.149414>.
- [2] O.B. Tysnes, A. Storstein, Epidemiology of Parkinson's disease, *J. Neural Trans.* (Vienna, Austria: 1996) 124 (2017) 901–905, <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>.
- [3] L. Amaral, F. Mendes, M. Corte-Real, A. Rego, T.F. Outeiro, S.R. Chaves, A versatile yeast model identifies the pesticides cymoxanil and metalaxyl as risk factors for synucleinopathies, *Chemosphere* 364 (2024) 143039, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143039>.
- [4] A. Dominguez-Mejide, E. Vasili, A. Konig, M.-S. Cima-Omori, A.I. Opakua, A. Leonov, S. Ryazanov, M. Zweckstetter, C. Griesinger, T.F. Outeiro, Effects of pharmacological modulators of α -synuclein and tau aggregation and internalization, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 12827, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69744-y>.
- [5] S. Mehra, S. Sahay, S.K. Maji, aSyn misfolding and aggregation: implications in Parkinson's disease pathogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1867 (2019) 890–908, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.03.001>.
- [6] T.F. Outeiro, D.J. Koss, D. Erskine, L. Walker, M. Kurzawa-Akanbi, D. Burn, P. Donaghy, C. Morris, J.P. Taylor, A. Thomas, J. Attems, I. McKeith, Dementia with Lewy bodies: an update and outlook, *Mol. Neurodegener.* 14 (2019) 5, <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0306-8>.
- [7] X. Yu, Y. Jia, Y. Dong, Research progress on the cannabinoid type-2 receptor and Parkinson's disease, *Front. Aging Neurosci.* 15 (2024) 1298166, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1298166>.
- [8] D.F. Lazaro, E.F. Rodrigues, R. Langohr, H. Shahpasandzadeh, T. Ribeiro, Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation, *PLoS Genet.* 10 (11) (2014) e1004741, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004741>.
- [9] J. Klucken, A.M. Poehler, D. Ebrahimi-Fakhari, J. Schneider, S. Nuber, Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A1-sensitive autophagy pathway, *Autophagy* 8 (2012) 754–766, <https://doi.org/10.4161/auto.19371>.
- [10] R. Hernandez-Vargas, L. Fonseca-Ornelas, I. Lopez-Gonzalez, J. Riesgo-Escovar, M. Zurita, Synphilin suppresses alpha-synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease Drosophila model, *Genesis* 49 (2011) 392–402, <https://doi.org/10.1002/dvg.20740>.
- [11] R.A. Fredenburg, C. Rospigliosi, R.K. Meray, J.C. Kessler, H.A. Lashuel, The impact of the E46K mutation on the properties of alpha-synuclein in its monomeric and oligomeric states, *Biochemistry* 46 (2007) 7107–7118, <https://doi.org/10.1021/bi7000246>.
- [12] T.F. Outeiro, S. Lindquist, Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology, *Science* 302 (5651) (2003) 1772–1775, <https://doi.org/10.1126/science.1090439>.
- [13] S. Tenreiro, T.F. Outeiro, Simple is good: yeast models of neurodegeneration, *FEMS Yeast Res.* 10 (2010) 970–979, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1366.2010.00649.x>.
- [14] K.K. Chung, Y. Zhang, K.L. Lim, Y. Tanaka, H. Huang, J. Gao, C.A. Ross, V. Dawson, T.M. Dawson, Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease, *Nat. Med.* 7 (10) (2001) 1144–1150, <https://doi.org/10.1038/nm1001-1144>.
- [15] V. di Marzo, A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 134–140, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.010>.
- [16] C.A. Legare, W.M. Raup-Konsavage, K.E. Vrana, Therapeutic potential of cannabis, cannabidiol, and cannabinoid-based pharmaceuticals, *Pharmacology* 107 (3–4) (2025) 131–149, <https://doi.org/10.1159/000521683>.
- [17] T. Behl, R. Makkar, A. Sehgal, S. Singh, H.A. Makeen, M. Albratty, H.A. Alhazmi, A. M. Meraya, S. Bungau, Exploration of multiverse activities of endocannabinoids in biological systems, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 5734, <https://doi.org/10.3390/ijms23105734>.
- [18] T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, K. Waku, 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215 (1) (1995) 89–97, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>.
- [19] E.S. Onaivi, H. Ishiguro, J.P. Gong, S. Patel, A. Perchuk, P.A. Meozzi, L. Myers, Z. Mora, P. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B.E. Akinshola, Q.R. Liu, B. Hope, S. Iwasaki, T. Arinami, L. Teasensfitz, G.R. Uhl, Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074 (2006) 514–536, <https://doi.org/10.1196/annals.1369.052>.
- [20] K. Mackie, Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system, *Handb. Exp. Pharmacol.* 168 (2005) 299–325, https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_10.
- [21] E.B. Russo, Cannabis therapeutics and the future of neurology, *Front. Integr. Neurosci.* 12 (2018) 51, <https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00051>.
- [22] A.W. Zuardi, History of cannabis as a medicine: a review, *Rev. Bras. Psiquiatr.* 28 (2) (2006) 153–157, <https://doi.org/10.1590/S1516-44462006000200015>.
- [23] J. Maroon, J. Bost, Review of the neurological benefits of phytocannabinoids, *Surg. Neurol. Int.* 9 (1) (2018) 91, https://doi.org/10.4103/sni.sni_45_18.
- [24] M.A. Lewis, E.B. Russo, K.M. Smith, Pharmacological foundations of cannabis chemovars, *Planta Med.* 84 (2018) 225–233, <https://doi.org/10.1055/s-0043-122240>.
- [25] X. Nadal, C. Del Río, S. Casano, B. Palomares, C. Ferreira-Vera, C. Navarrete, C. Sanchez-Carnerero, I. Cantarero, M.L. Bellido, S. Meyer, G. Morello, G. Appendino, E. Munoz, Tetrahydrocannabinolic acid is a potent PPAR agonist with neuroprotective activity, *Br. J. Pharmacol.* 174 (23) (2017) 4263–4276, <https://doi.org/10.1111/bph.14019>.
- [26] B.Z.J. Moosavi, M. Tehranipour, M. Mollashahi, H. Mahmoodzadeh, Neuroprotective effects of *Cannabis sativa* leaves extracts on α -motoneurons density after sciatic nerve injury in rats, *Life. Sci. J.* 10 (2025) 644–648.
- [27] I. Lotan, T.A. Treves, Y. Roditi, R. Djaldetti, Cannabis (medical marijuana) treatment for motor and non-motor symptoms of Parkinson disease, *Clin. Neuropharmacol.* 37 (2014) 41–44, <https://doi.org/10.1097/wnf.0000000000000016>.
- [28] Y.S. Lin, W.H. Huang, K.F. Hsu, M.J. Tang, W.T. Chiu, Reversion of chemoresistance by endocannabinoid-induced ER stress and autophagy activation in ovarian cancer, *Am. J. Cancer Res.* 13 (9) (2023) 4163–4178.
- [29] T.A.M. Vrech, A.H.F.F. Leao, I.B.M. Morais, V.C. Abílio, A.W. Zuardi, J.E. Hallak, J.A. Crippa, C. Bincoletto, R.P. Ureshino, S.S. Smaili, G.J.S. Pereira, Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 5434, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84879-2>.
- [30] E. da Cruz Guedes, A.G. Erustes, A.H.F.F. Leao, C.A. Carneiro, V.C. Abílio, A. W. Zuardi, J.E.C. Hallak, J.A. Crippa, C. Bincoletto, S.S. Smaili, P. Reckziegel, G.J. S. Pereira, Cannabidiol recovers dopaminergic neuronal damage induced by reserpine or aSyn in *Caenorhabditis elegans*, *Neurochem. Res.* (2023), <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03905-z>.
- [31] Z. Wang, P. Zheng, X. Chen, Y. Xie, K. Weston-Green, N. Solowij, Y.L. Chew, X. F. Huang, Cannabidiol induces autophagy and improves neuronal health associated with SIRT1 mediated longevity, *Geroscience* 44 (3) (2022) 1505–1524, <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00559-7>.
- [32] M. Khoury, I. Cohen, BAR-SELA, G., The two sides of the same coin—medical cannabis, cannabinoids, and immunity: pros and cons explained, *Pharmaceutics* 14 (2022) 389, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020389>.
- [33] V.M. Carvalho, Farmacannabis - UFRJ: the first laboratory in Brazil to analyze therapeutic products derived from Cannabis, *Br. J. Anal. Chem.* 4 (16) (2017) 44–49.
- [34] W. Milano, A. Capasso, Neuroprotection by cannabinoids in neurodegenerative diseases, *Alzheimer's Dement Cogn. Neurol.* 2 (1) (2018) 1–7, <https://doi.org/10.15761/ADCN.1000120>.
- [35] A.L. Dawidowicz, O.-T. Malgorzata, T. Rafal, CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action, *Fitoterapia* 152 (2021) 104915, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104915>.
- [36] W. Jakubowski, G. Bartosz, Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (11) (1997) 1297–1301, [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00056-3).
- [37] C.M. Grant, F.H. Maciver, I.W. Dawes, Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* 410 (2–3) (1997) 219–222, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00592-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00592-9).
- [38] L.M. Martins, Efeito de uma proteína antiapoptótica obtida da hemolinfa de *Lonomia obliqua* sobre as mitocôndrias de *C. elulas* Sf-9, *Sao Paulo, 2011*.
- [39] E. Noskova, R. Fernandez, J. García, E. Ochoa, C. Domínguez-Fernández, A. Adell, A. Laso, M.F. Andres, A. González-Coloma, E. Astigarraga, et al., Screening system of Cannabis sativa extracts based on their mitochondrial safety profile using cytochrome c oxidase activity as a biomarker, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 1315, <https://doi.org/10.3390/ijms24021315>.
- [40] A. Bennici, C. Mannucci, F. Calapai, L. Cardia, I. Ammendolia, S. Gangemi, G. Calapai, D. Griscti Soler, Safety of medical Cannabis in neuropathic chronic pain management, *Molecules* 26 (2021) 6257, <https://doi.org/10.3390/molecules26206257>.
- [41] S.J. Gagne, J.M. Stout, E. Liu, J.E. Page, Identification of olivetolic acid cyclase from Cannabis sativa reveals a unique catalytic route to plant polyketides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 12811–12816, <https://doi.org/10.1073/pnas.1200330109>.
- [42] J.M. Stout, Z. Boubakir, S.J. Ambrose, R.W. Purves, J.E. Page, The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in Cannabis sativa trichomes, *Plant J.* (2012), <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.04949.x> no–no.
- [43] M. Fellermeier, W. Eisenreich, A. Bacher, M.H. Zenk, Biosynthesis of cannabinoids incorporation experiments with ¹³C-labeled glucoses, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 1596–1604, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02030.x>.
- [44] F. Taura, S. Morimoto, Y. Shoyama, Purification and characterization of Cannabidiolic acid synthase from Cannabis sativa L.: biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the Oxidocyclization of Cannabigerolic acid to Cannabidiolic acid, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 17411–17416, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17411>.
- [45] D. Jin, K. Dai, Z. Xie, J. Chen, Secondary metabolites profiled in Cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes, *Sci. Rep.* 10 (2020) 3309, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60172-6>.
- [46] E.P.M. De Meijer, et al., The inheritance of chemical phenotype in Cannabis sativa L, *Genetics* 163 (1) (2003) 335–346, <https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.335>.
- [47] G.D. Weiblen, J.P. Wenger, K.J. Craft, M.A. Elsohly, Z. Mehmedic, E.L. Treiber, M. D. Marks, Gene duplication and divergence affecting drug content in Cannabis sativa, *New Phytol.* 208 (4) (2015) 1241–1250, <https://doi.org/10.1111/nph.13562>.
- [48] G. Mandolino, A. Carboni, Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement, *Euphytica* 140 (1) (2004) 107–120, <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4759-6>.
- [49] L.O. Hanu's, S.M. Meyer, E. Munoz, O. Taglialetela-Scafati, G. Appendino, Phytocannabinoids: a unified critical inventory, *Nat. Prod. Rep.* 33 (12) (2016) 1357–1392, <https://doi.org/10.1039/C6NP00074F>.

- [50] J. Rožanc, P. Kotnik, M. Milojević, L. Gradišnik, M. KnezHrnčič, Z. Knez, U. Maver, Different Cannabis sativa extraction methods result in different biological activities against a colon cancer cell line and healthy colon cells, *Plants* 10 (2021) 566, <https://doi.org/10.3390/plants10030566>.
- [51] F. Chemat, M. Abert Vian, A.-S. Fabiano-Tixier, M. Nutrizio, A. Režek Jambrak, P. E.S. Munekata, J.M. Lorenzo, F.J. Barba, A. Binello, G. Cravotto, A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products, *Green Chem.* 22 (2025) 2325–2353, <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>.
- [52] P. Morales, D.P. Hurst, P.H. Reggio, Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 103 (2017) 103–131, https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_4.
- [53] L. Schofs, M.D. Sparo, S.F. Sanchez Bruni, The antimicrobial effect behind Cannabis sativa, *Pharmacol. Res. Perspect.* 9 (2021) e00761, <https://doi.org/10.1002/prp2.761>.
- [54] J.A. Paez, N.E. Campillo, Innovative therapeutic potential of cannabinoid receptors as targets in Alzheimer's disease and less well-known diseases, *Curr. Med. Chem.* 26 (18) (2019) 3300–3340, <https://doi.org/10.2174/0929867325666180226095132> (PMID: 29484980).
- [55] S.A. Bonini, M. Premoli, S. Tambaro, A. Kumar, G. Maccarinelli, M. Memo, A. Mastinu, *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history, *J. Ethnopharmacol.* 227 (2025) 300–315, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>. PMID: 30205181.
- [56] S. Pisanti, A.M. Malfitano, E. Ciaglia, A. Lamberti, R. Ranieri, G. Cuomo, M. Abate, G. Faggiana, M.C. Proto, D. Fiore, C. Laezza, M. Bifulco, Cannabidiol: state of the art and new challenges for therapeutic applications, *Pharmacol. Ther.* 175 (2017) 133–150, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041> (PMID: 28232276).
- [57] N.L. Stone, A.J. Murphy, T.J. England, S.E. O'Sullivan, A systematic review of minor phytocannabinoids with promising neuroprotective potential, *Br. J. Pharmacol.* 177 (19) (2020) 4330–4352, <https://doi.org/10.1111/bph.15185>.
- [58] A.C.M. Hacke, D. Lima, F. De Costa, K. Deshmukh, N. Li, A.M. Chow, J.A. Marques, J.P. Pereira, K. Kerman, Probing the antioxidant activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in Cannabis sativa extracts, *Analyst* 144 (16) (2025) 4952–4961, <https://doi.org/10.1039/c9an00890j>.
- [59] N.R. Ryz, D.J. Remillard, E.B. Russo, Cannabis roots: a traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain, *Cannab. Cannabinoid. Res.* 2 (2017) 210–216, <https://doi.org/10.1089/can.2017.0028>.
- [60] F. Pellati, V. Bringhenti, J. Sperlea, L. Marchetti, D. Bertelli, S. Benvenuti, New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in Cannabis sativa L. (hemp), *Molecules* 23 (2018) 2639, <https://doi.org/10.3390/molecules23102639>.
- [61] G. Faustini, F. Bono, A. Valerio, M. Pizzi, P. Spano, A. Bellucci, Mitochondria and alpha-synuclein: friends or foes in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Genes* 8 (2025) pii: E377, <https://doi.org/10.3390/genes8120377>.
- [62] A.T. Marvian, D.J. Koss, F. Aliakbari, D. Morshedi, T.F. Outeiro, In vitro models of synucleinopathies: informing on molecular mechanisms and protective strategies, *J. Neurochem.* 150 (5) (2019) 535–565, <https://doi.org/10.1111/jnc.14707>.
- [63] M.H. Fu, C.W. Wu, Y.C. Lee, C.Y. Hung, I.C. Chen, K.L.H. Wu, Nrf2 activation attenuates the early suppression of mitochondrial respiration due to the alpha-synuclein overexpression, *Biom. J.* 41 (2018) 169–183, <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.02.005>.
- [64] L.J. Su, P.K. Auluck, T.F. Outeiro, E. Yeager-Lotem, J.A. Kritzer, D.N. Tardiff, Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models, *Dis. Model. Mech.* 3 (2010) 194–208, <https://doi.org/10.1242/dmm.004267>.
- [65] R. Wi, Y.C. Chung, B.K. Jin, Functional crosstalk between CB and TRPV1 receptors protects nigrostriatal dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease, *J. Immunol. Res.* 2020 (1) (2020) 5093493, <https://doi.org/10.1155/2020/5093493>.
- [66] J.G. Edwards, TRPV1 in the central nervous system: Synaptic plasticity, function, and pharmacological implications, in: O. Abdel-Salam (Ed.), *Capsaicin as a Therapeutic Molecule. Progress in Drug Research* vol. 68, Springer, Basel, 2014, https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0828-6_3.
- [67] H. Chung, A. Fierro, C.D. Pessoa-Mahana, Cannabidiol binding and negative allosteric modulation at the cannabinoid type 1 receptor in the presence of delta-9-tetrahydrocannabinol: An In Silico study, *PLoS One* 14 (7) (2019), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220025> e0220025.
- [68] R.B. Laprairie, A.M. Bagher, M.E. Kelly, E.M. Denovan-Wright, Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor, *Br. J. Pharmacol.* 172 (20) (2015) 4790–4805, <https://doi.org/10.1111/bph.13250>.
- [69] R.S. Borges, J.B. Junior, R.B. Viana, A.C. Baetas, E. Orestes, M.A. Andrade, K. M. Honorio, A.B.F. da Silva, Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants, *Molecules* 18 (10) (2013) 12663–12674, <https://doi.org/10.3390/molecules181012663>.
- [70] T. Bisogno, L. Hanus, L. De Petrocellis, S. Tchilibon, D.E. Ponde, I. Brandi, Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide, *Br. J. Pharmacol.* 134 (2001) 845–852, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>.
- [71] M. Kathmann, K. Flau, A. Redmer, C. Trankle, E. Schlicker, Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372 (2006) 354–361, <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0033-x>.

- [72] A. Stasiłowicz, A. Tomala, I. Podolak, J. Cielecka-Piontek, Cannabis sativa L. as a treatment of mood disorders and anxiety disorders, *Curr. Neuropharmacol.* 18 (2020) 87–96, <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190903103923>. Mol. Sci. 22 (2021) 778, <https://doi.org/10.3390/ijms22020778>. [74] J. Shin, S. Choi, A.Y. Park, S. Ju, B. Kweon, D.-U. Kim, G.-S. Bae, D. Han, E. Kwon, S.G. Ferber, D. Namdar, D. Hen-Shoval, G. Eger, H. Koltai, G. Shoval, L. Shbiro, J. Hong, In vitro and in vivo anti-inflammatory and antidepressant-like effects of A. Weller, The “entourage effect”: Terpenes coupled with cannabinoids for the Cannabis sativa L. Extracts. *Plants* 13 (2024) 1619, <https://doi.org/10.3390/plants13121619>.