



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIANA DE FRANÇA OLIVEIRA DA SILVA

**FORMULAÇÃO E EFEITO DO TRATAMENTO DE UMA
NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE MILHO RICO EM
CANABIDIOL SOBRE O COMPORTAMENTO E
PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS COM
AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPRÓICO**

Recife
2022

MARIANA DE FRANÇA OLIVEIRA DA SILVA

**FORMULAÇÃO E EFEITO DO TRATAMENTO DE UMA
NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE MILHO RICO EM
CANABIDIOL SOBRE O COMPORTAMENTO E
PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS COM
AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPRÓICO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Recife
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586f

Silva, Mariana de França Oliveira da
FORMULAÇÃO E EFEITO DO TRATAMENTO DE UMA NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE MILHO RICO EM
CANABIDIOL SOBRE O COMPORTAMENTO E PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS COM AUTISMO
INDUZIDO POR ÁCIDO VALPRÓICO / Mariana de França Oliveira da Silva. - 2022.

149 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Pabyton Goncalves Cadena.

Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2024.

1. Nanotecnologia.. 2. Canabinóides.. 3. Sistema Nervoso. . 4. Testículo.. I. Junior, Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva, orient. II. Cadena, Prof. Dr. Pabyton Goncalves, coorient. III. Título

CDD 620.8

MARIANA DE FRANÇA OLIVEIRA DA SILVA

FORMULAÇÃO E EFEITO DO TRATAMENTO DE UMA NANOEMULSÃO DE
ÓLEO DE MILHO RICO EM CANABIDIOL SOBRE O COMPORTAMENTO E
PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS COM AUTISMO INDUZIDO POR
ÁCIDO VALPRÓICO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em saúde.

Aprovada em: 13/10/2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Co-Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Fernanda Ribeiro Dias
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

À Deus.
Aos meus pais Luiz e Lucidalva.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos que tem me proporcionado, pela proteção e pela inspiração. Aos meus pais, Lucidalva da Silva e Luiz de França, que sempre apoiaram minhas escolhas e decisões. Obrigada por todo amor e investimento na minha educação, o que foi primordial para que eu chegasse até aqui.

As minhas irmãs, Clarissa de França e Indira Oliveira, pelo companheirismo e apoio.

Ao meu orientador, Valdemiro Amaro da Silva Júnior, por me abraçar como orientanda e acreditar no meu trabalho e dedicação.

Ao meu co-orientador, Pabyton Gonçalves Cadena, pelos ensinamentos e por ter me apresentado a nanotecnologia, essa ciência tão maravilhosa e inovadora.

As pós-doutorandas Fernanda Dias e Sandra Torres por todo auxílio na execução dos cortes e análises histológicas, em especial à Fernanda por todo o apoio moral e psicológico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos!

“O importante é não parar de questionar”.
(Albert Einstein)

RESUMO

O autismo é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado principalmente pelo comprometimento da comunicação, do desenvolvimento social e cognitivo. O canabidiol (CBD) é um canabinóide lipofílico, que apresenta efeitos farmacológicos no sistema nervoso central que podem trazer benefícios aos indivíduos autistas uma vez que não há tratamento medicamentoso-padrão disponível. Nanoemulsões são sistemas de entrega que aumentam a solubilidade em água e a biodisponibilidade de compostos lipofílicos como o canabidiol. Este estudo propôs a formulação de uma nanoemulsão de óleo de milho rico em canabidiol, assim como avaliou o efeito desta nanoemulsão sobre alterações comportamentais e parâmetros testiculares em um modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico (VPA). As nanoemulsões foram desenvolvidas com óleo de CBD em diferentes concentrações (5, 10 e 20%) e as características macroscópicas e físico-químicas foram avaliadas. As formulações se mostraram estáveis após o estresse térmico e centrifugação, e apresentaram um tamanho de gotícula menor que 200 nm, além de um índice de polidispersidade e potencial zeta reduzido, caracterizando a homogeneidade das mesmas. Para a indução do autismo, 10 ratas receberam 500 mg/kg de VPA diluído em solução salina ou apenas solução salina por via intraperitoneal durante o período pré-natal. Os machos nascidos das fêmeas expostas ao VPA constituíram o grupo VPA (controle positivo), CBDON1 (tratados com nanoemulsão de óleo a 10%) e CBDON2 (tratados com nanoemulsão de óleo a 10%). Os machos nascidos das fêmeas expostas à solução salina constituíram o grupo controle (negativo). Foram realizados cinco testes de comportamentos nos quais foram avaliados a ansiedade, a atividade locomotora e exploratória, estereotipias, índice de sociabilidade e índice de preferência social. Os animais expostos ao VPA durante o período pré-natal apresentaram um aumento da ansiedade e das estereotipias, e uma redução da atividade exploratória, do índice de sociabilidade e índice de preferência social, alterações comportamentais compatíveis com o autismo. A análise das alterações morfométricas testiculares foi realizada a partir da análise da morfometria dos túbulos seminíferos, densidade volumétrica e volume dos componentes tubulares, percentagem e volume dos componentes do intertúbulo, e parâmetros estereológicos e morfométricos da células de Leydig. A exposição pré-natal ao VPA gerou um aumento do tamanho testicular, do diâmetro, volume e comprimento dos túbulos seminíferos, diâmetro do lúmen, índice túbulo somático, índice epitélio somático, assim como aumentou o volume do núcleo, do citoplasma das células de Leydig e os níveis das enzimas antioxidantes superóxido desmutase (SOD) e glutathiona (GST). Por outro lado, a exposição ao VPA reduziu a altura e densidade volumétrica do epitélio, assim como diminuiu os níveis séricos de testosterona. O tratamento com as nanoemulsões de CBD foi efetivo em reverter as alterações comportamentais compatíveis com o autismo, reduzir a morte neuronal no hipocampo, melhorar os parâmetros testiculares e atenuar a redução dos níveis de testosterona geradas pela exposição pré-natal ao ácido valpróico. No entanto, as formulações não alteraram os níveis de SOD e GST, pois o aumento da atividade enzimática pode não ter sido necessária devido a uma provável prevenção contra danos teciduais gerada pelo CBD.

Palavras chave: Cannabis. Canabinóides. Sociabilidade. Estresse Oxidativo. Testosterona.

ABSTRACT

Autism is a neurodevelopmental disorder mainly characterized by impaired communication, social, and cognitive development. Cannabidiol (CBD) is a lipophilic cannabinoid, which has pharmacological effects on the central nervous system that can bring benefits to autistic individuals since there is no standard drug treatment available. Nanoemulsions are delivery systems that increase the water solubility and bioavailability of lipophilic compounds such as cannabidiol. This study proposed the formulation of a corn oil nanoemulsion rich in cannabidiol, as well as evaluating the effect of this nanoemulsion on behavioral changes and testicular parameters in an animal model of autism induced by valproic acid (VPA). Nanoemulsions were developed with CBD oil at different concentrations (5, 10, and 20%) and the macroscopic and physicochemical characteristics were evaluated. The formulations were stable after thermal stress and centrifugation, and showed a droplet size smaller than 200 nm, in addition to a reduced polydispersity index and zeta potential, characterizing their homogeneity. For the induction of autism, 10 female rats received 500 mg/kg of VPA diluted in saline solution or saline solution alone intraperitoneally during the prenatal period. Males born from females exposed to VPA constituted the VPA group (positive control), CBDON1 (treated with 10% oil nanoemulsion), and CBDON2 (treated with 10% oil nanoemulsion). Males born from females exposed to saline solution constituted the control group (negative). Five behavioral tests were performed in which anxiety, locomotor and exploratory activity, stereotypes, sociability index, and social preference index were evaluated. Animals exposed to VPA during the prenatal period showed an increase in anxiety and stereotypes, and a reduction in exploratory activity, sociability index and social preference index, behavioral alterations compatible with autism. The analysis of testicular morphometric alterations was performed based on the analysis of the morphometry of the seminiferous tubules, volumetric density, and volume of the tubular components, percentage and volume of the intertubule components, and stereological and morphometric parameters of the Leydig cells. Prenatal exposure to VPA generated an increase in testicular size, diameter, volume, and length of seminiferous tubules, lumen diameter, tubulosomatic index, somatic epithelial index, as well as increased volume of the nucleus, the cytoplasm of Leydig cells, and levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GST). On the other hand, exposure to VPA reduced the height and volumetric density of the epithelium, as well as decreased serum testosterone levels. Treatment with CBD nanoemulsions was effective in reversing behavioral changes compatible with autism, reducing neuronal death in the hippocampus, improving testicular parameters, and attenuating the reduction in testosterone levels generated by prenatal exposure to valproic acid. However, the formulations did not change SOD and GST levels, as the increase in enzyme activity may not have been necessary due to probable prevention against tissue damage generated by CBD.

Keywords: Cannabis. Cannabinoids. Sociability. Oxidative Stress. Testosterone.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilil ciclase
CB1	Receptor canabinóide 1
CB2	Receptor canabinóides 2
CBC	Cannabichromene
CBD	Canabidiol
CBDV	Cannabidivarin
CBE	Cannabielsoin
CBG	Cannabigerol
CBL	Cannabicyclol
CBN	Cannabinol
CBND	Cannabinodiol
CBT	Cannabitriol
COF	Córtex orbitofrontal
DAGL	Diacilglicerol lipase
DSE	Supressão da excitação induzida pela despolarização
DSI	Supressão da inibição induzida pela despolarização
FAAH	Ácido graxo amida hidrolase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPR	Receptor acoplado a proteína G
LH	Hormônio luteinizante
LTD	Depressão sináptica de longa duração
MAGL	Monoacilglicerol lipase
NAPE	N-aracdonil-fosfatidiletanolamina

O-AEA	O-araquidonoil-etanolamida
PPAR α	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastrointestinal
TRP	Receptor de potencial transitório
VPA	Ácido valpróico
1,2 DAG	1,2-diacilglicerol
2-AG	2-araquidonoil-glicerol
2-AGE	2-araquidonoil-glicerol-éter
5-HT	Receptor de serotonina
Δ 9-THC	Delta 9-tetraidrocanabinol
Δ 8-THC	Delta-8-tetrahidrocannabinol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Transtorno do espectro autista	13
2.2	Cannabis e canabinóides	17
2.3	O sistema endocanabinóide	19
2.3.1	<i>Os endocanabinóides</i>	19
2.3.2	<i>Os receptores canabinóides</i>	23
2.4	O sistema endocanabinóide e o autismo	26
2.5	O sistema endocanabinóide e o sistema reprodutor masculino	28
2.6	Os sistemas nanotecnológicos	29
3	OBJETIVOS	31
4	CAPÍTULO 1 Nanoemulsions with CBD reduced autistic-like behaviors and neuronal death in a prenatal valproic acid rat model	32
5	CAPÍTULO 2 CBD rich oil nanoemulsion treatment ameliorates morphometric changes of testis and testosterone levels of rats exposed to valproic acid on prenatal period	72
6	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXO 1- DEPÓSITO DE PATENTE: BR 10 2021 026830 1, Instituto Nacional de Propriedade Industrial (NPI)	114

1 INTRODUÇÃO

O autismo é considerado um dos mais graves distúrbios neuropsiquiátricos infantis, apresentando uma alta prevalência em indivíduos do sexo masculino, atingido cerca de 1 a cada 68 indivíduos (GREEN et al., 2019; SIU; WEKSBERG, 2017). Trata-se de um transtorno do neurodesenvolvimento que se inicia na infância e afeta um número significativo de crianças e suas famílias (NIKOLOV et al., 2006). Esse transtorno é caracterizado principalmente por um comprometimento das habilidades de interação social recíproca e comunicação (ROULLET et al., 2013; BAMBINI-JUNIOR et al., 2011).

A diferente prevalência da doença relativa ao gênero chama a atenção, uma vez que crianças do gênero masculino são mais diagnosticadas que as do gênero feminino (VAN DER MIESEN et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre os fatores que podem estar relacionados com essas diferenças, além disso não há estudos que mostrem se a função reprodutiva em indivíduos autistas do gênero masculino é afetada.

A etiologia do autismo é multifatorial e envolve processos patológicos distintos, incluindo fatores genéticos e ambientais (complicações pré, peri e neonatais, além de causas imunomediadas) (ONORE et al., 2012). De acordo com Carbone (2020) alterações comportamentais observadas em indivíduos autistas podem estar relacionadas a uma condição neuroinflamatória crônica cerebral. O sistema endocanabinoide tem um papel fundamental no neurodesenvolvimento bem como na resposta inflamatória normal e muitos estudos têm mostrado um comprometimento da sinalização canabinoide no autismo (PIETROPAOLO, 2020; SU, 2021; ZOU, 2021).

O autismo gera consequências econômicas severas, uma vez que é crônico, o que repercute em custos para a sociedade (RANDELL et al., 2019). Porém, os tratamentos estabelecidos para crianças com autismo incluem intervenções psicossociais e educacionais, que tem como objetivo melhorar as habilidades sociais e comunicativas, não havendo tratamento medicamentoso específico disponível (NIKOLOV et al., 2006).

O ácido valpróico (VPA) é comercializado no mercado mundial como droga anticonvulsivante desde 1974, sendo utilizada devido a sua eficiência contra vários tipos de epilepsia e regulação do humor. Estudos clínicos mostram que a exposição ao ácido valpróico durante o período gestacional está associada ao desenvolvimento do transtorno do espectro autista (ARNDT et al., 2004). Esse último efeito parece envolver o aumento

na expressão de citocinas inflamatórias, a redução na atividade GABAérgica e a elevação da atividade glutamatérgica em diversas regiões do cérebro, o que desregula a atividade neuronal normal (EL-ANSARY et al., 2014; ROJAS, 2014; WEI et al., 2013; SUN et al., 2009; CHEZ et al., 2007; VARGAS et al., 2005).

Os fitocanabinóides são compostos isolados da *Cannabis* sp, popularmente conhecida como maconha, que é utilizada para fins medicinais desde 2.350 anos antes de cristo (APPENDINO et al., 2011). Os principais compostos canabinóides são o delta 9-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), responsável pelos efeitos psicotrópicos da planta e o canabidiol (CBD), principal composto não psicotrópico da *Cannabis* sp. Os efeitos farmacológicos dos canabinóides envolve a modulação direta ou indireta de receptores de membrana acoplados à proteína G inibitória, denominados receptores canabinóides 1 e 2 (CB1 e CB2, respectivamente) (MATOS, et al., 2017).

Os receptores canabinóides 1 e 2 fazem parte do sistema endocanabinóide, um sistema de controle endógeno envolvido, principalmente, na regulação da atividade neuronal e imunológica. Além dos receptores canabinóides 1 e 2, o sistema endocanabinóide é constituído por compostos derivados de lipídeos, os endocanabinóides, e pelas enzimas responsáveis pela síntese e degradação desses compostos (CRISTINO et al., 2020). Têm sido descrito que o sistema endocanabinóide desempenha um papel importante no sistema reprodutor masculino, uma vez que seus receptores e ligantes já foram encontrados em órgãos reprodutivos de humanos e roedores (CAPODICE et al., 2021).

Um grande número de estudos, tanto em humanos como em animais, confirmam o potencial terapêutico do CBD no tratamento de desordens no sistema nervoso central (SNC) como depressão, ansiedade, psicose e epilepsia (PEDRAZZI et al, 2014; MOREIRA et al., 2005). O CBD, assim como outros canabinóides, é uma molécula lipofílica com baixa biodisponibilidade oral (ALVES et al., 2020). A nanotecnologia oferece várias abordagens viáveis para a preparação de nanoformulações para aumentar a estabilidade físico-química e a biodisponibilidade de moléculas pouco solúveis (CHEN; INBARAJ, 2019)

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com nanoemulsão de óleo rico em CBD sobre o comportamento e morfologia testicular de ratos machos adultos submetidos a indução química de autismo por ácido valpróico durante o período pré-natal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transtorno do espectro autista

O transtorno do espectro autista é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por alterações cognitivas que ocorrem concomitantemente com outras condições (KODAK et al., 2020). Trata-se de uma patologia heterogênea com diversas apresentações e sintomas que variam de moderados a severos, sendo considerada um subgrupo dentro dos “transtornos invasivos do desenvolvimento” (AL-DEWIK et al., 2020; LORD et al., 2020). O autismo é caracterizado pelo comprometimento da comunicação e da interação social, além de um comportamento estereotipado, restrição de interesses, anormalidades sensoriais e déficits sociais e cognitivos (BHANDARI et al., 2020).

A etiologia da doença envolve processos patogênicos distintos, dentre eles fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Os componentes genéticos envolvem mutações em genes envolvidos na formação da sinapse, como os genes que codificam moléculas de adesão celular, proteínas do citoesqueleto, canais iônicos e moléculas envolvidas na sinalização celular (JOENSUU et al., 2018; QUARTIER et al., 2019). Os fatores epigenéticos envolvidos na etiologia do autismo incluem metilação do DNA, modificações de histonas e microRNAs. Tais alterações estão diretamente relacionadas a exposição pré-natal à fatores ambientais como vírus, gases tóxicos, metais pesados e fármacos (YOON et al., 2020). Modificações epigenéticas podem alterar a expressão de genes envolvidos na regulação da plasticidade e transmissão sináptica (KIMURA et al., 2019). Dentre os fatores ambientes destacamos anormalidades imunes, deficiência de zinco, idade materna ou paterna avançada, diabetes ou obesidade maternal, complicações no parto (trauma, hipóxia ou isquemia), aumento da atividade esteroideogênica, tratamento com inibidores da recaptção de serotonina e exposição ao ácido valpróico (BÖLTE et al., 2019; MODABBERNIA et al., 2017).

A variabilidade genética é considerada um dos principais contribuintes para a heterogeneidade do autismo (NGWA et al., 2017). Essa variabilidade abrange centenas de genes que afetam a homeostase neuronal e sináptica, e desempenham papéis fundamentais no neurodesenvolvimento (KRISHNAN et al., 2016; PINTO et al., 2014; HUGUET; BOURGERON, 2013; O’ROAK et al., 2012). A literatura cita que uma mutação do gene SHANK3 que codifica uma proteína associada à sinapse, foi relacionada ao comprometimento da linguagem e da comunicação social em indivíduos com autismo

(DURAND et al., 2007). A caracterização da heterogeneidade da doença torna-se mais complicada pela ocorrência de comorbidades que incluem ansiedade (WHITE et al., 2009), depressão (MAGNUSON; CONSTANTINO et al., 2011), deficiência intelectual (MATSON; SHOEMAKER et al., 2009; SIMONOFF et al., 2008), convulsões (TUCHMAN et al., 2010), insônia (GOLDMAN et al., 2009), distúrbios gastrointestinais (McELHANON et al., 2014), disfunção mitocondrial (ROSSGNOL; FRYE 2012) e anormalidades do sistema imunológico (ASHWOOD et al., 2006).

A presença de uma ou mais dessas comorbidades está associada a um quadro mais grave da doença. Indivíduos com autismo associado à epilepsia têm deficiências sociais mais graves em relação àqueles têm apenas autismo. Distúrbios do sono agravam os sintomas básicos da doença e estão correlacionados à problemas de comportamento diurno (MAZUREK; SOHL 2016; COHEH et al., 2006; SCHRECK et al., 2004). Comportamentos aberrantes estão associados a problemas gastrointestinais em crianças com autismo e as anormalidades imunológicas envolvendo citocinas, imunoglobulinas, inflamação, ativação celular e autoimunidade foram associados com a gravidade das deficiências comportamentais (CHAIDEZ et al., 2014; GOINES; VAN DE WATER, 2010; ASHWOOD et al., 2008; ASHWOOD et al., 2011). O melhor entendimento e caracterização dessas comorbidades é decisivo para a identificação de subgrupos distintos da doença (OUSLEY; CERMAK , 2014).

O diagnóstico da doença depende da gravidade e deficiência funcional, e essa análise deve incluir uma avaliação abrangente feita de preferência por uma equipe multidisciplinar. Essa avaliação visa diagnosticar definitivamente o autismo excluindo condições que imitam a doença (RANDALL et al., 2018). A classificação da gravidade do autismo é baseada nos níveis de suporte necessários para auxiliar as deficiências na comunicação social e interação social, padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades (TACHIBANA et al., 2017).

Diversas linhas investigativas sugerem que indivíduos autistas apresentam a homeostase sináptica e a regulação da circuitaria neuronal anormais (ABRAHAM et al., 2019). Estudos mostraram o envolvimento de mudanças na razão excitação/inibição neuronal do córtex orbitofrontal (COF) no desenvolvimento do autismo. Estas alterações resultaram em uma desorganização dos sinais excitatórios e um aumento da inibição local, prejudicando a comunicação do COF com o córtex límbico e a amígdala (LIU et al., 2019). A amígdala processa e integra informações referentes à recompensa, à cognição e às emoções, fazendo parte do sistema límbico (SHARP et al., 2017). Disfunções desta

região estão associadas às alterações moleculares nos circuitos GABAérgicos locais e principais neurônios de saída glutamatérgicas, e têm sido implicadas no componente social do autismo (HERRERO et al., 2020). Anormalidades no hipocampo também estão associadas ao autismo (XU et al., 2020). De fato, desequilíbrios na expressão de genes associados a neurosinalização glutamatérgica e GABAérgica foram encontradas no córtex cerebral, no cerebelo e no hipocampo em modelo de ratos com autismo (LENART et al., 2020). Dentre os fatores que contribuem para este desequilíbrio destacamos a neuroinflamação (EL ANSARY et al., 2014).

Alterações inflamatórias estão associadas ao autismo e esta condição está ligada à disfunção do sistema imune (TURBÉ et al., 2019). A hiperativação e proliferação da micróglia no sistema nervoso central (SNC) têm sido implicadas na patogênese da neuroinflamação que ocorre no autismo, uma vez que geram um microambiente prejudicial para os neurônios devido a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas ao oxigênio (LIAO et al., 2020). A micróglia é a principal responsável pela imunidade inata do cérebro (ANDOH et al., 2020). Além disso, desempenha vários papéis homeostáticos, como o direcionamento de células progenitoras e a comunicação com outras populações de células gliais favorecendo a formação de sinapses e regulando a atividade neuronal (WRIGHT-JIN; GUTMANN, 2019). A atividade prolongada ou desnecessária da micróglia que ocorre na ausência de desafios imunológicos resulta em neurotoxicidade (MATTA et al., 2019). No entanto, os fatores envolvidos na ativação exagerada da micróglia permanecem desconhecidos, embora haja relatos do envolvimento de mediadores inflamatórios liberados por mastócitos e de alterações no perfil de transcrição gênica da micróglia (TSILIONI; THEOHARIDIS, 2018).

O autismo é cerca de 4 vezes mais comum entre indivíduos do gênero masculino do que entre indivíduos do gênero feminino (LOOMES et al., 2017). Acredita-se que diferenças específicas do gênero como fatores hormonais, potencializam o risco em homens e/ou atenuam o risco de ocorrência da doença em mulheres (BEGGIATO et al., 2016; LAI et al., 2017). Um estudo mostrou que ratos machos com autismo apresentaram uma redução mais acentuada da atividade neuronal em diversas regiões do sistema nervoso central relacionadas ao comportamento, quando comparado às fêmeas (CHO et al., 2017). Além disso, há relatos que o desenvolvimento cerebral em machos e fêmeas é afetado de forma distinta no autismo (PEREZ-POUCHOLEN et al., 2016).

Muitas teorias foram propostas para explicar essa distribuição de gênero, incluindo a teoria do “cérebro masculino extremo”. A base desta teoria é que um perfil cognitivo masculino normal abrange indivíduos que são melhores em sistematizar (analisar e organizar) do que compreender emocionalmente (componente afetivo e cognitivo) e que o autismo pode ser considerado um extremo do que seria o “normal” no perfil masculino (BARON-COOHEN et al., 2002). Um mecanismo potencial para esta teoria é um elevação de esteróides sexuais fetais, que é apoiada por um estudo relatando que hormônios esteróides no líquido amniótico foram elevados em meninos que mais tarde foram diagnosticados com autismo (BARON-COOHEN et al., 2015).

Um estudo mostrou que mulheres têm maiores deficiências do que os homens, porém apresentam-se com mais comunicação social e sintomas de interação em detrimento das habilidades cognitivas e de linguagem, além de mostrarem pior função adaptativa, aumento do comportamento de externalização e irritabilidade, e menos estereotípias. Isso sugere que as mulheres requerem sintomas mais graves para serem diagnosticadas como autistas (FRAZIER et al., 2014; MANDY et al., 2012; SZATMARI et al., 2012). Por isso, considera-se que há um subregistro em mulheres, provavelmente devido à falta de identificação do problema nas mesmas, o que pode estar relacionado à diferenças na sua expressão clínica (GUANG et al., 2018). Mulheres são descritas como sendo mais capazes de camuflar os seus sintomas do que os homens e usar comportamentos compensatórios que suavizam seus desafios sociais (DEAN et al., 2016).

Apesar dos custos econômicos e sociais significativos, as opções de tratamento para melhorar os sintomas associados ao autismo são limitadas. Além disso, as evidências de sucesso são mínimas para apoiar o benefício da maioria dos tratamentos, o que torna a identificação de tratamentos eficazes um desafio (MCPHEETERS et al., 2011). Intervenções comportamentais realizadas no início da vida, são consideradas como tratamento padrão ouro para a melhora de sintomas comportamentais associados ao autismo (ELDVIK et al., 2009). No entanto, intervenções comportamentais intensivas envolvem diversos profissionais, sendo muitas vezes caras de implementar, além de requererem muitos recursos para serem executadas de forma eficaz, tornando-as inacessíveis para muitas crianças com autismo e suas famílias, especialmente àquelas com baixo poder aquisitivo (LORD et al., 2020).

Atualmente, apenas dois fármacos, a risperidona e a periciazina, são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento sintomático do autismo (NETO et al., 2019). A risperidona é classificada como um antipsicótico

adulto, sendo aprovada para o tratamento sintomático da irritabilidade, incluindo agressão, auto-agressão e acessos de raiva em crianças e adolescentes autistas. Esse fármaco atua bloqueando os receptores de dopamina e serotonina, e foi descrito como seguro e eficaz para o tratamento a curto prazo, com melhorias quanto ao comportamento estereotipado e hiperatividade. No entanto, efeitos colaterais significativos estão associados ao uso da risperidona, incluindo ganho de peso, aumento do apetite, sonolência, sedação, fadiga, vômitos, constipação, alterações do trato respiratório superior e hiperprolactinemia com consequente efeito feminilizante em ambos os sexos (ANDERSON et al., 2007). A periciazina é um antipsicótico típico utilizado como adjuvante no manejo a curto prazo de estados de ansiedade e psicose. Seu uso também está associado a efeitos colaterais como sonolência, vômitos, hiperfagia e sinais extrapiramidais leves (MORLEY et al., 2012). A eficiência desses tratamentos é limitada pela falta de ensaios clínicos controlados por placebo na população.

2.2 Cannabis e canabinóides

As plantas do gênero *Cannabis* sp. são comumente utilizadas para fins medicinais. O uso medicinal da *Cannabis* sp. foi descrito há milhares de anos, desde antes de cristo. O imperador da China, Chen Nung, foi o primeiro a descrever as propriedades terapêuticas da *Cannabis* sp. em 2737 a.c. no seu compêndio sobre ervas medicinais chinesas (LI, 1974). Em 1839, o médico britânico Williams O'Shaugunessy descobriu as ações analgésicas, anticonvulsivantes, antieméticas, relaxante e orexigênica da planta, que esteve disponível na farmacopeia britânica e americana na forma de extrato e tintura por mais de 100 anos (O'SHAUGUNESSY, 1838-1840; IVERSEN et al., 2000). Em 1937, a *Cannabis* sp. foi removida da farmacopéia americana por estar associada a insanidade e deterioração intelectual e moral. No entanto, os canabinóides presentes na planta são compostos com propriedades terapêuticas cientificamente comprovadas (MALHOTA et al., 2021).

A *Cannabis* sp. apresenta mais de 500 componentes, dentre os quais aproximadamente 100 são hidrocarbonetos aromáticos denominados canabinóides, que incluem o delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC), delta-8-tetrahidrocannabinol (Δ 8-THC), o cannabigerol (CBG), o cannabichromene (CBC), o cannabiodiol (CBND), o

cannabielsoin (CBE), o cannabicyclol (CBL), o cannabinoil (CBN), o cannabitril (CBT), o cannabidivarin (CBDV), o cannabidiol (CBD) e tipos diversos (Figura 1).

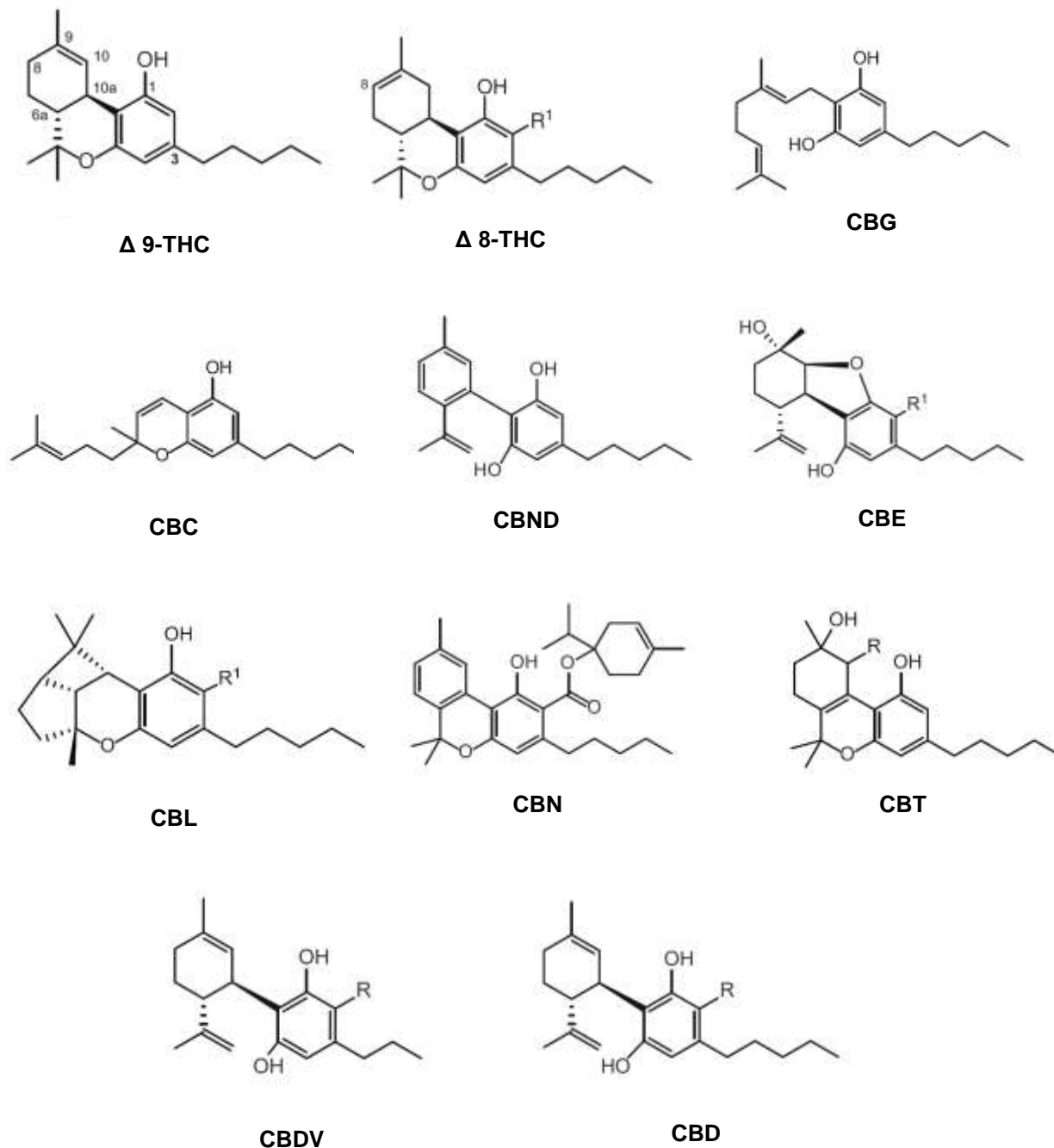


Figura 1. Estrutura química dos canabinóides (Adaptado de Elsohly, 2017).

Além dos canabinóides, a planta contém outras moléculas ativas como terpenos e flavonóides. (ELSOHLY et al., 2017; LIU et al., 2019).

Dentre os canabinóides, dois tem sido objeto de investigação científica devido às suas propriedades farmacológicas, o Δ^9 -THC e o CBD (LAFAYE et al., 2017). O Δ^9 -THC é o principal componente psicotrópico da planta e tem sido alvo de milhares de estudos relativos a sua farmacologia e toxicidade (JAVADI-PAYDAR et al., 2018; MLOST et al., 2020).

O CBD é um canabinóide não psicotrópico que tem sido amplamente investigado quanto ao seu potencial terapêutico. Inúmeros estudos descrevem as propriedades farmacológicas do CBD, incluindo a ação anticonvulsivante, ansiolítica, anti-psicótica, anti-inflamatória, anti-neoplásica, analgésica e neuroprotetora (MLOST et al., 2020; MORALES et al., 2017). Devido à natureza lipofílica dos canabinóides, pensou-se inicialmente que esses compostos exercem seus vários efeitos biológicos atravessando a membrana celular de forma inespecífica. No entanto, seguindo a descoberta do THC e subsequente emergência de vários canabinóides sintetizados quimicamente, o mapeamento e caracterização farmacológica dos locais de ligação de canabinóides no cérebro revelou a existência de dois receptores canabinóides (CB) semelhantes a receptores acoplados à proteína G, os receptores CB1 e CB2 (GONÇALVES et al., 2020; PERTWEE et al., 2010; PERTWEE et al., 2006; GAONI et al., 1964). A descoberta desses receptores trouxe ao conhecimento o sistema endocanabinóide, um sistema neuromodulador presente no sistema nervoso central e periférico, constituído pelos receptores canabinóides, pelos endocanabinóides e pelas enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos endocanabinóides (MICALÉ; DRAGO, 2018).

2.3 O sistema endocanabinóide

2.3.1 Os Endocanabinóides

Os agonistas endógenos para os receptores CB1 e CB2 foram definidos como endocanabinóides. Os endocanabinóides são derivados do ácido araquidônico e são representados principalmente pela N-araquidonoil-etanolamida (anandamida) e pelo 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (MILLER; MILLER, 2017). Porém, outros endocanabinóides já foram descritos, dentre os quais podemos destacar a O-araquidonoil-etanolamida (virodamine, O-AEA), 2-araquidonoil-glicerol-éter (éter noladin, 2-AGE) e a oleoil etanolamina (BOZKURT, 2019).

Os endocanabinóides são sintetizados no corpo e dendritos do neurônio pós-sináptico em resposta a ligação de neurotransmissores que geram influxo de Ca^{2+} . O aumento do Ca^{2+} intracelular ativa fosfolipases que atuam sobre os fosfolípidos de membrana produzindo endocanabinóides, que agem como neurotransmissores retrógrados, se ligando aos receptores canabinóides presentes na membrana pré-sináptica (CROCCO et al., 2020). O complexo proteína G_i ligado a esses receptores, após ativação, inibe canais de K^+ tipo D e M, e canais de Ca^{2+} tipo N e P/Q, e ao mesmo tempo ativa canais de K^+ conhecidos por serem retificados pela própria proteína G (do inglês “G-protein-gated inwardly-rectifying K^+ channels” - GIRK) e canais de K^+ do tipo A, o que gera hiperpolarização neuronal e o bloqueio da liberação de neurotransmissores tanto excitatórios como inibitórios (MATOS et al., 2017). Além disso, a redução nos níveis de AMPc gera diminuição da atividade da proteína quinase A (PKA), promovendo uma redução na fosforilação de canais de K^+ e aumento da saída desse íon da membrana pré-sináptica (ERLANDSON et al., 2018).

A síntese da anandamida ocorre a partir da hidrólise da N-aracdonil-fosfatidiletanolamina (NAPE) pela N-aracdonil-fosfatidiletanolamina-fosfolipase-D. A fosfolipase C, ao atuar sobre fosfoinositídeos de membrana, gera 1,2 diacilglicerol (1,2 DAG) e a hidrólise desse substrato pela diacilglicerol lipase (DAGL) origina o 2-AG (CRISTINO et al., 2019). A inativação da anandamida é mediada principalmente pela FAAH (Fatty acid amide hydrolase), localizada no retículo endoplasmático e mitocôndrias de neurônios pós-sinápticos, enquanto o 2-AG é inativado pela monoacilglicerol lipase (MAGL) de localização pré-sináptica (Figura 2) (SCHERMA et al., 2019).

As vias de degradação dos endocanabinóides geram moléculas ativas como prostamínas e ésteres de prostaglandina-glicerol que interagem com outros receptores, ou seja, as enzimas envolvidas nessas vias sintetizam outros mediadores de forma indireta (DI MARZO; PISCITELLI, 2015). A partir de tais evidências, é descrita uma definição de mediadores semelhantes aos endocanabinóides, que são mediadores da mesma classe química, que não estão necessariamente ligados a anandamida e ao 2-AG (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2014).

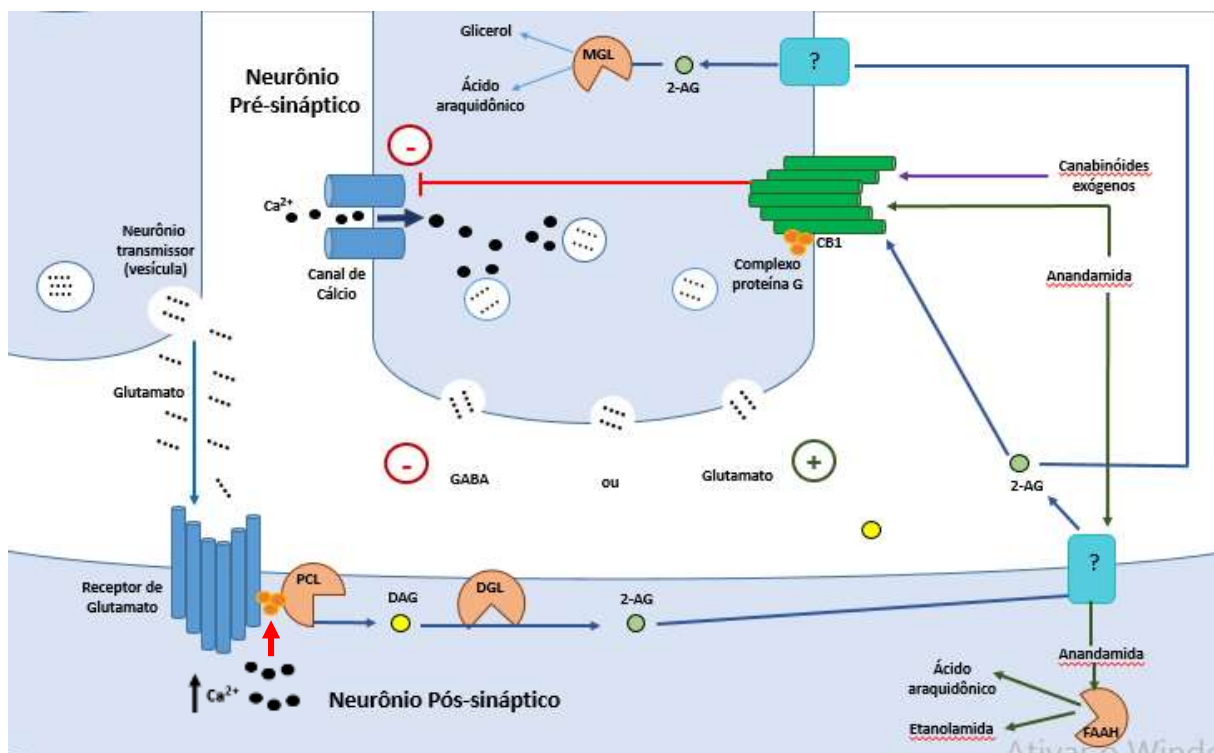


Figura 2. Representação esquemática do sistema endocanabinoide. MGL, monoacilglicerol lipase; 2-AG, 2-araquidonoil glicerol; PCL, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; DGL, diacilglicerol lipase; FAAH, amida hidrolase de ácido graxo; CB1, receptor canabinoide 1 (Adaptado de PERTWEE, 2008).

O nível basal de 2-AG é aproximadamente 1000 vezes maior do que o da anandamida no cérebro. Adicionalmente, o metabolismo alterado do 2-AG exerce efeitos importantes na sinalização retrógrada mediada por endocanabinoide. Diante desses fatos, é proposto que o 2-AG é o ligante endógeno primário para os receptores canabinoídes no sistema nervoso central (MURATAELA et al., 2014; DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2012; KATONA et al., 2008). No entanto, foi demonstrado que AEA inibe canais de Ca^{2+} tipo L de forma independente, bem como regula negativamente a biossíntese de 2-AG, ressaltando seu papel essencial na regulação da transmissão sináptica (MACCARRONE et al., 2008). A anandamida demonstrou contribuir para a transmissão sináptica mediada por endocanabinoídes de várias formas, dentre elas por meio de um mecanismo dependente de TRPV1 (KHLAIFIA et al., 2013; PUENTE et al., 2011; CHAVEZ et al., 2010).

Os efeitos fisiológicos dos endocanabinoídes no SNC envolvem duas formas de controle sobre a plasticidade neuronal de curta duração: a supressão da excitação (DSE)

ou inibição (DSI) induzida pela despolarização, nas quais neurônios pós-sinápticos ativam receptores pré-sinápticos estimulando ou inibindo a liberação do neurotransmissor (PARSONS; HURD, 2015; STUMPF et al., 2018). Geralmente, a sinalização retrógrada mediada por endocanabinoide começa com a produção de 2-AG em resposta ao aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular que ocorre com a ativação do receptor pós-sináptico. O 2-AG é então liberado e atravessa o espaço extracelular, por meio de um mecanismo ainda não totalmente elucidado e chega ao terminal pré-sináptico onde se liga ao receptor CB1 ativando-o (OHNO-SHOSAKU; KANO, 2014; CASTILLO et al., 2012; KANO et al., 2009).

O receptor CB1 suprime a liberação de neurotransmissor de duas maneiras: inibindo os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, com consequente redução do influxo pré-sináptico de Ca^{2+} ; e inibindo a adenilil ciclase (AC) e a subsequente produção de AMP cíclico e ativação da PKA, que está envolvida na depressão sináptica de longa duração (LTD) (redução fisiológica da atividade das sinapses neuronais), mecanismo envolvido na plasticidade sináptica responsável pela formação da memória de longo prazo (MAGLIO et al., 2017; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2014).

A plasticidade sináptica é essencial para as adaptações dos circuitos neurais necessários para aprender novas habilidades, formar novas memórias e gerar novos comportamentos adaptativos em resposta a estímulos ambientais e experiências individuais, sendo os endocanabinóides mediadores-chaves nesse processo (KANO et al., 2009; KATONA; FREUND, 2012). Defeitos na sinalização canabinoide contribuí para a desregulação da plasticidade neuronal promovendo um aumento da resposta ao estresse, dificuldades de aprendizado e memória, um estado emocional negativo e impulsão a atividades viciantes (VOLKOW et al., 2017).

O término da sinalização requer a degradação do 2-AG pela MAGL, que é expressa em terminais sinápticos seletivos e em células da glia (MURATAEVA et al., 2014). Os canabinóides também estão envolvidos no sistema de auto-inibição lenta de interneurônios corticais, atuando como mensageiros autócrinos que controlam a excitabilidade dos neurônios pós-sinápticos através da regulação de várias correntes de membrana (GANTZ; BEAN, 2017; GHOSH et al., 2018). Essa auto-inibição é dependente de receptores CB1 e também foi observada em neurônios piramidais, bem como em neurônios do hipocampo (MARINELLI et al., 2008; BACCI et al., 2004).

2.3.2 Os Receptores canabinóides

Os receptores de membrana descritos como alvos dos canabinóides foram descobertos em 1988 (CB1) e em 1993 (CB2) (DEVANE et al., 1988; MUNRO et al., 1993). Os receptores canabinóides são receptores acoplados à proteína G inibitória (Gi) e os seus mecanismos de ação envolvem a inibição da adenilciclase e consequente redução da produção de AMPcíclico a partir do ATP (LU et al., 2020).

Através de ferramentas como autoradiografia, hibridização *in situ* e imunohistoquímica, provou-se que o receptor CB1 é o receptor da família de receptores acoplados à proteína G mais amplamente expresso no cérebro (KANO et al., 2009). As regiões do cérebro com níveis mais altos de expressão do CB1 incluem o bulbo olfatório, hipocampo, gânglios da base e cerebelo. Uma expressão moderada do CB1 é encontrada no córtex cerebral, septo, amígdala, hipotálamo e partes do tronco cerebral e corno dorsal da medula espinhal. Regiões como o tálamo e o corno ventral da medula espinhal têm baixa expressão do CB1 (MACKIE et al., 2005). Estudos sugeriram uma expressão altamente concentrada do receptor CB1 em terminais pré-sinápticos, onde medeia a sinalização retrógrada de endocanabinóides (TSOU et al., 1998; KATONA et al., 1999). Porém, isso não exclui a existência de receptores CB1 em locais pós-sinápticos, uma vez que estudos funcionais demonstraram auto-inibição em neurônios neocorticais por endocanabinóides (MAROSO et al., 2016; MARINELLI et al., 2009; MARINELLI et al., 2008).

Além da expressão neuronal, o receptor CB1 é expresso, embora em grau muito inferior, em astrócitos, oligodendrócitos e microglia, onde medeia a transmissão sináptica (CASTILLO et al., 2012; STELLA et al., 2009). O receptor CB1 também é abundantemente expresso no sistema nervoso periférico (SNP), bem como em outros tecidos. No SNP o receptor CB1 é principalmente expresso em terminais nervosos simpáticos (MACARRONE et al., 2015; TAM et al., 2008; MACKIE et al., 2005). Além disso, esse receptor foi encontrado no gânglio trigeminal, gânglio da raiz dorsal e terminações nervosas dérmicas dos neurônios sensoriais primários, onde regula a nocicepção das fibras nervosas aferentes (CLAPPER et al., 2010; VERES et al., 2013).

No trato gastrointestinal (TGI), o receptor CB1 é encontrado no sistema nervoso entérico e em células não neuronais na mucosa intestinal, incluindo células enteroendócrinas, células imunes e enterócitos (IZZO et al., 2010). Por meio de rotas neuronais e não neuronais, o receptor CB1 modula a mobilidade do trato GI, a secreção de ácidos gástricos, fluidos, neurotransmissores e hormônios, bem como a

permeabilidade do epitélio intestinal. Curiosamente, o receptor CB1 hepático participa da regulação do balanço energético e metabolismo, porém a expressão desse receptor no fígado é muito baixa (MILLER; DEVI, 2011). No entanto, em condições patológicas, a expressão do CB1 em células hepáticas é aumentada. A expressão do receptor CB1 também foi relatada no tecido adiposo, músculo esquelético, osso, pele, olhos, pâncreas, sistema reprodutivo e em vários tipos de células cancerígenas (MACARRONE et al., 2015).

O receptor CB1 é codificado pelo gene CNR1 e consiste em 472 aminoácidos em humanos (473 aminoácidos em rato e camundongo, com 97-99% de semelhança na sequência de aminoácidos entre essas espécies). Diversas variações estruturais do receptor CB1 foram descritas. Dentre elas uma forma longa canônica e duas isoformas adicionais com terminal N mais curto foram relatadas como resultado de splicing alternativo (RYBERG et al., 2005; SHIRE et al., 1995). O RNA mensageiro dessas três isoformas já foram encontrados no cérebro humano em áreas ligadas ao controle motor, aprendizagem, emoção, memória e cognição, músculo esquelético, fígado, tecido adiposo, pele e ilhotas pancreáticas (LEVINSOHN 2020; LU 2020; GONZALES-MARISGAL et al., 2016). A isoforma longa canônica do receptor é encontrada em maior quantidade no cérebro e sistema músculo-esquelético, enquanto a isoforma curta mostra um nível de expressão mais alto no fígado e nas células das ilhotas pancreáticas, onde está envolvida no metabolismo (GONZALES-MARISGAL et al., 2016). A farmacologia e as propriedades fisiológicas dessas variantes ainda precisam ser exploradas, pois estudos realizados em modelos animais revelaram discrepâncias (STRAIKER et al., 2012; RYBERG et al., 2005; XIAO et al., 2005).

Já o receptor CB2 está expresso predominante nas células do sistema imunológico, com uma expressão moderada em outros tecidos periféricos, incluindo o sistema cardiovascular, TGI, fígado, tecido adiposo, osso e sistema reprodutivo (HOULETT et al., 2002). Em contrapartida, a expressão desse receptor no SNC e SNP é baixa (GONG et al., 2006). Embora a expressão do receptor CB2 no SNC seja limitada, é inegável que esse receptor desempenha um papel ativo nas atividades neurológicas, como nocicepção, dependência de drogas e neuroinflamação (DHOPESHWARKAR et al., 2014; ATWOOD et al., 2010). Além disso, estudos mostraram a presença intracelular do receptor CB2 em neurônios piramidais corticais pré-frontais, onde modula a

excitabilidade neuronal através da regulação do canal de Cl^- ativado por Ca^{2+} (DEN BOON et al., 2012).

O receptor CB2 é codificado pelo gene CNR2, que consiste em 360 aminoácidos em humanos. Compartilha apenas 44% de homologia com receptor CB1, e apresenta maiores variações entre espécies em relação ao CB1, uma vez que a homologia da sequência de aminoácidos é um pouco acima de 80% entre humanos e roedores (LHANG et al., 2015; LIU et al., 2009). Em humanos, duas isoformas do receptor CB2 foram identificadas, uma predominantemente expressa no testículo e em menor quantidade nas regiões de recompensa do cérebro, e a outra expressa principalmente no baço e em níveis mais baixos no cérebro (LIU et al., 2009). Entretanto, ambas as isoformas são expressas no sistema imunológico (LI et al., 2019).

Os receptores CB1 e CB2 foram os primeiros a serem descritos. Contudo, evidências farmacológicas mostraram que somente o Δ^9 -THC e seu análogo THCV são capazes de se ligar com alta afinidade a esses receptores (DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2010). Além disso, é descrito que o mecanismo de ação do CBD envolve a inibição da recaptação da anandamida e redução da sua hidrólise pela FAAH, e que a inibição do receptor CB1, mediada por este composto, é indireta (LUJÁN et al., 2020). Conseqüentemente, os endocanabinóides e fitocanabinóides têm mais alvos moleculares que CB1 e CB2. Dentre eles, o receptor de potencial transitório (TRP), que pertence a uma superfamília de canais catiônicos expressos em diversas áreas do sistema nervoso central (substância nigra, gânglios da base, hipocampo, locus ceruleus e córtex) e está envolvido na transdução de diversos estímulos (RUGGIERO et al., 2017). Esse receptor tem localização transmembrana e é quimicamente constituído por quatro subunidades com seis hélices cada. A superfamília TRP é constituída por 6 subfamílias: canônica (TRPC), vaniloide (TRPV), policistina (TRPP), mucolipina (TRPML), anquirina (TRPA) e melastatina (TRPM), totalizando 28 subtipos de canais iônicos. Dentre eles, seis (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 e TRPM8) podem ser ativados por canabinóides, sendo por isso chamados receptores canabinóides ionotrópicos ou receptores reportados como CB3, enquanto dos receptores CB1 e CB2 são considerados receptores canabinóides metabotrópicos (PATEL et al., 2016; LI et al., 2019).

A anandamida foi apontada como o primeiro agonista endógeno de canais TRPV1 em humanos e ratos. Além disso, esse composto antagoniza os canais TRPM8 (MULLER et al., 2019). O efeito estimulatório da anandamida sobre TRPV1 promove a

desensibilização do mesmo, representando o principal mecanismo através do qual esse mediador executa sua função biológica (DI MARZO; PISCITELLI, 2015). O TRPV1 também é ativado pelo 2-AG, porém em concentrações superiores a necessária para anandamida produzir o mesmo efeito. Dentre os fitocanabinóides CBD, CBG e CBDV ativam e dessensibilizam TRPV1, enquanto o CBD, CBDV e CBG antagonizam TRPM8. Adicionalmente, todos esses compostos junto com o CBC ativam e dessensibilizam TRPA1 em ratos (DE PETROCELLIS et al., 2008; DE PETROCELLIS et al., 2011).

Os canabinóide ativam fortemente TRPV2 com uma potência nominal THC> CBD> cannabigivarin (CBGV)> cannabigerol (CBG)> tetrahydrocannabivarin (THCV)> canabidivarin (CBDV)> CBN. Além disso, CBGV, THC, CBG, CBD e THCV induzem a dessensibilização de TRPV2 de uma forma dose dependente (DE PETROCELLIS et al., 2011). O TRPV3 é ativado pelo CBD e pelo THCV com alta eficácia e potência. O TRPV4 é ativado pelo CBDV e THCV, enquanto os outros canabinóides (incluindo CBGV, CBN e CBG) foram significativamente mais eficazes em dessensibilizar este canal do que ativá-lo (DE PETROCELLIS et al., 2012). A anandamida também pode causar ativação do TRPV4, embora de forma indireta, através de seus metabólitos (WATANABE et al., 2003).

Outros receptores além dos CB e canais TRP têm sido propostos. Dentre eles, o receptor acoplado a proteína G55 (GPR55), o receptor de serotonina (5-HT), o receptor de dopamina, o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA) e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa e gama (PPAR α e γ) (DI MARZO et al., 2020; SILVESTRO et al., 2020). Outro receptor acoplado à proteína G, o GPR18 é ativado por mediadores semelhantes aos canabinóides, como a N-araquidonoil-glicina, enquanto os canais de cálcio tipo T são inibidos pelo CBD e pelo THC (KOHNO et al., 2006; ROSS et al., 2008; CAZADE et al., 2014).

2.4 O sistema endocanabinóide e o autismo

O sistema endocanabinóide modula a neurotransmissão e a plasticidade neuronal e evidências mostram o envolvimento desse sistema na fisiopatologia do autismo (LAMY et al., 2020). Estudos têm mostrado que o sistema endocanabinóide participa da modulação do comportamento de recompensa social (PIETROPAOLO et al., 2020). Além disso, experimentos revelaram níveis aumentados de FAAH no cérebro de modelos animais com autismo, e que a inibição desta enzima atenua a disfunção cognitiva e déficits

comportamentais (KERR et al., 2016; SERVADIO et al., 2016; WEI et al., 2016). Este último efeito parece ser mediado pela redução da disfunção sináptica gerada pela falta de anandamida. Isso sugere que a redução dos níveis de anandamida pode estar associada a sintomatologia do autismo. Outro estudo mostrou uma redução na sinalização endocanabinóide tanto em crianças autistas quanto em animais com autismo induzido experimentalmente. Ainda nesse estudo, foi observado que a administração de um inibidor seletivo da MAGL, enzima que hidrolisa o 2-AG, atenuou as alterações comportamentais observadas nos animais autistas (FOLKES et al., 2020; ZOU et al., 2021).

O sistema endocanabinóide representa um link entre o sistema imune e o SNC, e a neuroinflamação tem um papel fundamental na patogênese do autismo (PRATA et al., 2019). Estudos evidenciaram que o CBD atenua a hiperativação da micróglia e o estresse oxidativo em diferentes modelos animais de doenças neuroinflamatórias (CARBONE et al., 2020). Sabe-se que a micróglia expressa canabinóides endógenos e receptores canabinóides (CB2), e que a ativação desses receptores afeta a migração, a proliferação e a liberação de citocinas inflamatórias (LAFAYE et al., 2018).

O sistema endocanabinoide também tem um papel importante na regulação atividade neuronal mioentérica, função nervosa vagal e simpática e liberação de neuropeptídeos gastrointestinais como a grelina e colecistocinina que, por sua vez, modulam os níveis de endocanabinóides (SHARKEY; WILEY, 2016). Atualmente é descrito que a sinalização endocanabinoide tem efeitos na disbiose e vice-versa (CAN et al., 2016). O receptor CB1 foi implicado na disbiose induzida pelo aumento da permeabilidade intestinal, subsequente inflamação sistêmica e modulação da composição da microbiota (GUIDA et al., 2018; MEHRPOUYA-BAHRAMI et al., 2017; MUCCIOLI et al., 2010). Já o receptor CB2 parece mediar parcialmente os efeitos analgésicos dos probióticos contra dor visceral (ROSSEAU et al., 2007). Outros receptores endocanabinóides, incluindo TRPV1, GPR119 e PPAR α , reduzem a permeabilidade intestinal, e níveis alterados de seus ligantes endocanabinóides podem modular os efeitos negativos da disbiose (GEURTS et al., 2015). Várias evidências mostram uma ligação entre alterações na composição da microbiota intestinal e sintomas gastrointestinais e neurocomportamentais no autismo (FATTORUSSO et al., 2019).

Sendo assim, a modulação do sistema endocanabinóide pode ser uma ferramenta terapêutica promissora para alterações do comportamento, do estado inflamatório e de modificações da microbiota que ocorrem no autismo.

2.5 O sistema endocanabinóide e o sistema reprodutor masculino

O sistema endocanabinóide desempenha um papel importante no sistema reprodutor masculino. Estudos mostram que receptores e ligantes estão presentes no testículo, vesícula seminal, corpo cavernoso e espermatozoides de humanos e roedores (NIELSEN et al., 2019; COBELLIS et al., 2006). Francavilla et al. (2009) demonstraram que o sistema endocanabinóide ajuda a modular a função espermática, assim como a capacidade de fertilização. Na vesícula seminal é postulado que esse sistema pode modular a sua função secretora, e grande parte dos receptores canabinóides são expressos no epitélio seminal humano (ÜCKERT et al., 2017). Os receptores CB1 e CB2 também foram identificados no músculo liso do corpo cavernoso peniano (GRATZKE et al., 2010).

No entanto, tem sido descrito que a administração exógena de canabinóides, especialmente de THC, tem efeitos negativos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, uma vez que reduz os níveis séricos de hormônio luteinizante (LH) e testosterona. O efeito sobre a secreção de LH parece ser mediada por CB1, pois pode ser prevenida por pré-tratamento com SR141716, um antagonista específico do receptor canabinóide. Embora a expressão de CB1 tenha sido demonstrada na adenohipófise e hipotálamo de ratos, o efeito inibitório dos canabinóides sobre a liberação de gonadotrofinas parece ocorrer a montante da hipófise, pois a adição de THC em cultura de celular de células hipofisárias não alterou a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ou do LH (WITTMANN et al., 2007; WENGER et al., 2001).

Os canabinóides exercem efeitos sobre neurônios GnRH não apenas diretamente, mas também modulando a atividade das fibras neuronais vizinhas que controlam a liberação de GnRH (GAMMON et al., 2005). Em camundongos, Farkas e colaboradores demonstraram que a ativação pré-sináptica de CB1 em fibras GABA-érgicas inibe a liberação espontânea de GABA e a falta de ativação de receptores GABA nos neurônios GnRH impede a liberação de GnRH. Aliás, embora o GABA seja tipicamente um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, ele exerce um efeito excitatório paradoxal em neurônios GnRH maduros (LEHMANN et al., 2012). Além do receptor CB1, os receptores CB2 e TRPV1 também são expressos no hipotálamo

de camundongos (CRISTINO et al., 2006; TODMAN et al., 2005). A diminuição dos níveis de testosterona em animais expostos ao THC e AEA pode refletir uma combinação de efeitos centrais (hipotalâmico) e periféricos (testicular). As células de Leydig de ratos expressam CB1, e a exposição in vitro dessas células ao THC inibe a esteroidogênese (CACCIOLA et al., 2008; JAKUBOVIC et al., 1979).

2.6 Os sistemas nanotecnológicos

A nanotecnologia é uma das tecnologias mais promissoras do século 21 e consiste na manipulação, controle e fabricação de matéria em escala nanométrica (BAYDA et al., 2019). O uso desse tipo de tecnologia na terapêutica de doenças traz vantagens medicinais em relação aos medicamentos tradicionais, uma vez que, o tamanho nanométrico das moléculas favorece potencialização da ação dos fármacos e a consequente redução dos custos com saúde (BRUNI et al., 2018; NGWA et al., 2017). Entre vários nanossistemas, a nanoemulsão e os nanolipossomos são as duas nanoformulações mais comumente usadas em produtos farmacêuticos. Estudos pré-clínicos mostraram que nanopartículas e nanoemulsões fornecem uma promissora alternativa às tecnologias de formulação atuais e são adequadas para a administração oral de medicamentos com biodisponibilidade baixa (YIN et al., 2017).

As nanoemulsões são sistemas de entrega de substâncias que fornecem uma solubilidade aprimorada para medicamentos pouco solúveis, para melhorar sua biodisponibilidade (CHEN et al., 2020). Uma nanoemulsão contém duas ou mais substâncias imiscíveis, na qual as gotículas de um líquido são dispersas em um outro líquido, sendo estabilizada por emulsificantes ou surfactantes. Apresentam uma aparência leitosa ou translúcida, e um tamanho de partícula que varia de 20 a 200 nm, o que favorece a passagem através das membranas (CHOI; McCLEMENTS 2020; FENG et al., 2020; JARZCEBSKI et al., 2021). As nanoemulsões também podem reduzir a toxicidade dos fármacos, são baratas e de fácil fabricação.

O uso milenar da *Cannabis* sp. devido a suas propriedades antieméticas, analgésicas, antiinflamatórias e antiproliferativas, assim como a multiplicidade de produtos farmacêuticos e comestíveis produzidos a partir da planta, abre novas perspectivas e avanços nos estudos relacionados as vias de administração e sistemas de distribuição de produtos e medicamentos de cannabis (BRUNI et al., 2018; NGWA et al., 2017).

Os canabinóides são lipofílicos e a absorção dessas substâncias depende da via de administração. O CBD tem uma baixa solubilidade em água e consequente biodisponibilidade oral reduzida (6% em humanos) (GASTON et al., 2017). Além disso, tem baixa absorção intestinal e extensivo metabolismo de primeira passagem hepática, o que leva a uma farmacocinética não confiável (KNAUB et al., 2019). A baixa solubilidade aquosa dos compostos terapêuticos reduzem o percentual de aproveitamento dos mesmos. Consequentemente, a formulação de fármacos deve ser acompanhada de sistemas que aumentem a biodisponibilidade, atendendo a janela terapêutica de eficácia.

Vários métodos têm sido utilizados afim de aumentar ou favorecer a biodisponibilidade e solubilidade dos fármacos pouco solúveis incluindo formulações iônicas líquidas de ingredientes ativos, síntese de pró-drogas, dispersões sólidas, pellets de matriz de gelatina e sistemas de entrega a base de lipídeos (GROO et al., 2017; PUTRA et al., 2018; MA et al., 2016; WILSON et al., 2018; SCHULTZ 2018; ZGAIR 2016; ATSMON 2018). O potencial de nanoformulações para superar as limitações da baixa solubilidade e absorção, lipofilicidade e biodisponibilidade oral dos canabinóides já tem sido descrito (APARICIO-BLANCO et al., 2019; GREISH et al., 2018). Neste contexto, o uso dessas formulações podem trazer benefícios quanto ao uso de canabinóides para fins medicinais, uma vez que aumentam a biodisponibilidade e podem reduzir a dose utilizada.

3 OBJETIVOS

Formular nanoemulsões a partir de um óleo de milho rico em CBD em diferentes concentrações e analisar os efeitos do tratamento desta formulação sobre o perfil comportamental, hipocampo e parâmetros testiculares de ratos com autismo induzido por ácido valpróico.

CAPÍTULO 1

- ✓ Elaborar uma nanoemulsão a partir de um óleo de milho rico em CBD.
- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento com nanoemulsão de óleo rico CBD na reversão das modificações comportamentais geradas pela exposição pré-natal ao ácido valpróico.
- ✓ Descrever as alterações histológicas no hipocampo de ratos expostos ao ácido valpróico no período pré-natal.
- ✓ Analisar os efeitos do tratamento com nanoemulsão de óleo de milho rico CBD sobre as alterações hipocampais resultantes exposição pré-natal ao ácido valpróico.

CAPÍTULO 2

- ✓ Descrever as alterações morfométricas testiculares geradas pela exposição ao ácido valpróico no período pré-natal.
- ✓ Mensurar a testosterona plasmática de ratos expostos ao ácido valpróico no período pré-natal.
- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento com nanoemulsão de óleo de milho rico CBD sobre a testosterona plasmática e as alterações morfométricas testiculares promovidas pela exposição pré-natal ao ácido valpróico.
- ✓ Analisar os indicadores de estresse oxidativo no testículo de ratos expostos ao ácido valpróico no período pré-natal, assim como o efeito do tratamento com nanoemulsão de óleo de milho rico CBD sobre esses parâmetros.

CAPÍTULO 1

Nanoemulsions with CBD reduces autistic-like behaviors and neuronal death in a prenatal valproic acid rat model

26 **1. Introduction**

27 Autism spectrum disorder (ASD) is a heterogeneous neurodevelopmental
28 condition characterized by alterations in communication and social interaction associated
29 with restricted and repetitive behavior (American Psychiatric Association, 2013).
30 Comorbidities like seizures, self-injury, aggressive behavior, depression, sleep disorders,
31 and anxiety are also commonly observed (Besag et al., 2021). Numerous pathological
32 processes seem to be involved in the etiopathogenesis of autism, including genetic,
33 epigenetic, and environmental factors (Lai et al., 2014). Among the environmental
34 factors, prenatal exposure to valproic acid (VPA) has been described in humans and
35 rodents (Seiffe et al., 2022). ASD has severe economic consequences since it's chronic
36 and generates disability, which repercussions on costs for society. However, established
37 treatments for children with autism include psychosocial and educational interventions,
38 which aim to improve social and communication skills, with no specific drug treatment
39 available (Lord et al., 2020). The pharmacotherapy used is symptomatic with severe side
40 effects and is not effective (Turner et al., 2020).

41 Neuroinflammation in the prefrontal cortex is related to a reduction in exploratory
42 activity as well as social interaction (Codagnine et al., 2015). Furthermore, the increase
43 in pro-inflammatory marker (IL-6), decrease of anti-inflammatory marker (IL-10), and
44 elevated blood levels of TNF- α are associated with social deficits and aberrant social
45 behavior in autistic patients (Ross et al., 2013; Xie et al., 2017). Even, TNF- α neutralizing
46 antibody administration reduced anxiety in rodents (Chen et al., 2013).

47 Cannabis sp., popularly known as marijuana, has been used for medicinal
48 purposes for many years and cannabidiol (CBD) is the main non-psychoactive compound
49 of plants with therapeutic properties (Franco et al., 2019). CBD action involves the
50 modulation of the endocannabinoid system (ECS), composed mainly of cannabinoid

51 receptors 1 and 2 (CB1 e CB2), by endocannabinoids 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and
52 N-arachidonylethanolamine (anandamide or AEA), in addition to enzymes involved in
53 endocannabinoid synthesis and degradation (Cristino et al., 2020). CBD has a low affinity
54 for both CB1 and CB2 receptors, and CBD acts mainly through the inhibition of
55 intracellular reuptake and degradation of endocannabinoid anandamida (AEA) (Bisogno
56 et al., 2001). It has been reported that ECS dysfunction is associated with autism (Araújo
57 et al., 2019; Kerr et al., 2016). The inhibition of AEA degradation decreases synaptic
58 dysfunction in autistic rats attenuating the behavioral phenotype observed and AEA
59 signaling mediates social behaviors by oxytocin (Wei et al., 2016; Wu et al., 2020). A
60 recent report shows that inhibition of diacylglycerol lipase alfa (DGL- α), an enzyme that
61 catalyzes the biosynthesis of 2-AG, induces autism and associated comorbidities in adult
62 mice (Fyke 2021a). Furthermore, it was observed that CB1 knockout mice display
63 impairments in communication and social interaction (Fyke 2021b). Another study by
64 Folkes et al. (2020) shows that the activation of the basolateral amygdala-nucleus
65 accumbens glutamatergic circuit harms social interaction in mice and 2-AG
66 endocannabinoid signaling blocked this effect (Folkes et al., 2020). Thus,
67 phytocannabinoids may benefit autistic individuals due to their indirect action on ECS.

68 Biological barriers limit bioavailability in about 90% of therapeutic agents
69 (Cabrera-pérez 2018). The intestinal absorption capacity of drugs is influenced by their
70 physicochemical properties, the absorption capacity of epithelial cells, and intestinal
71 permeability (Lundquist et al. 2016). Cannabinoids are highly lipophilic molecules with
72 low aqueous solubility and very low oral bioavailability (Bruni et al., 2018). Low water
73 solubility leads to poor intestinal absorption. Therefore, it is important to use mechanisms
74 that improve the intestinal absorption capacity of lipophilic drugs (Choudhury 2019)
75 producing a nanoemulsion technology that overcomes all these limitations.

76 Currently, nanotechnology has been employed as a strategy for therapeutic agents
77 to be able to cross membranes, since it favors changes in physicochemical properties and
78 allows the formation of nanometric systems (Naqvi et al., 2020). Among the
79 nanotechnology products, we highlight nanoemulsions, which are colloidal dispersions
80 of oil-in-water (O/W) or water-in-oil (W/O) formulated using emulsifiers since they are
81 amphiphilic molecules (McClements et al., 2017). Oil-in-water emulsions are formed by
82 small oil droplets dispersed in water with a hydrophobic core formed by the oil molecules
83 and a hydrophilic membrane formed by emulsifier molecules (Choi et al., 2020). This
84 system increases the solubility of poorly soluble substances like CBD. The droplets have
85 dimensions between 1 and 200 nanometers and the small size enhances penetrability into
86 membranes (Thakkar et al., 2015). Systemic bioavailability and kinetic stability of drugs
87 increase when nanoemulsion is administered orally, increasing therapeutic potency
88 (Spaglova et al., 2021; Singh et al., 2017).

89 Therefore, the present study aims to evaluate the effect of CBD-rich corn oil
90 nanoemulsion treatment in autistic-like behaviors in a prenatal valproic acid rat model.
91 First, we developed and evaluated the nanoemulsion properties by measuring droplet size,
92 polydispersity index, and zeta potential. Finally, we analyzed the therapeutic effect of
93 these nanoemulsions in autistic-like behaviors like anxiety, exploratory activity,
94 repetitive behavior, sociability, and social preference.

95 **2. Materials and Methods**

96 *2.1. Obtaining and chemical analysis of CBD-rich corn oil*

97 CBD-enriched corn oil (CBDO) (Extract CBD 22-06-2020, CAS number 13956-
98 29-1, lot# CL001) was kindly donated from *Abrace Esperança (Paraíba, Brazil)* a non-
99 profit institution authorized by the Brazilian courts to cultivate and produce *Cannabis*
100 *sativa* derivatives in the form of oils and ointments. According to *Abrace*, the oil was

101 obtained by the alcoholic extraction method. In this study, CBDO at nominal
102 concentrations of 5, 10, and 20 mg/mL were used. The chemical analysis was carried out
103 by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The analysis was
104 performed in Agilent Technologies 8890 equipment, 7693A series auto-injector, coupled
105 to a selective mass detector (5977B inert model) with electron impact ionization (70 eV),
106 and quad-type analyzer. CBDO (5, 10, and 20 mg/mL) were filtered through a membrane
107 with 0.22 μm PTFE pores. Briefly, 100 μL of sample in the oily vehicle were diluted and
108 homogenized in 900 μL of chloroform (Vetec, CAS number 67663, lot# DCBD 0246V).
109 In the final samples, 35 μL of caffeine (CAF) (Cayman Chemical Company, CAS number
110 58082, lot# 05557523) was added as an internal standard at a concentration of 0,014
111 mg/mL. CBD was identified by their spectra in comparison with the authentic pattern
112 (Cerilliant, CAS number 67561, lot# FE10071912) contained in the equipment. Analyzes
113 were carried out at the federal police laboratory (Recife, Pernambuco, Brazil).

114 *2.2. Preparation of nanoemulsions*

115 The experiments were assayed at the *Universidade Federal Rural de Pernambuco*,
116 Brazil. The preparation of nanoemulsions was carried out according to Santos et al. (2020)
117 by the high-energy emulsification method. Oil-in-water (O/W) nanoemulsions were
118 produced using an oil phase containing 10% (w/w) of sorbitan monooleate 80 (Span 80,
119 Sigma, CAS number 1338438, lot# MKCK7756, EHL = 4.3) as a nonionic surfactant,
120 10% of CBDO (at the concentrations of 5, 10, and 20 mg/mL) or 10% of corn oil (without
121 CBD) mixed at 7 g for 5 min.

122 The aqueous phase was prepared using 10% of polysorbate 80 (Tween 80, Neon,
123 lot# 56538, EHL 15.0) as a nonionic surfactant and 70% water mixed at 7 g for 5 min. In
124 addition, 40 mg of propylparaben (Dinâmica, lot# 106924) in alcoholic solution, an
125 antimicrobial preservative, was added in the aqueous phase and mixed at 7 g for 5 min

126 for total ethanol evaporation. The oily phase was dripped into the aqueous phase under
127 magnetic stirring at 7 g at room temperature (27 °C) and then, the mixture was kept
128 stirring at 60 g for 20 hours. Nanoemulsions were stored at room temperature and
129 monitored for 2, 7, 15, and 30 days to the assessment of organoleptic characteristics
130 (dispersion phase, visual aspect, consistency, opacity, smell, and color) according to
131 ANVISA guidelines (2004). Thermal stress and centrifugation (at 1210 g for 30 minutes
132 - Centrifuge Kacil CE-01) analyses were also carried out. For the animal experiments,
133 nanoemulsions were prepared biweekly, kept at room temperature, and protected from
134 light.

135 2.3. Physicochemical analysis

136 The evaluated droplet size (nm), polydispersity index (PDI), and zeta potential (ζ
137 – mV) of CBDO nanoemulsion (CBDON) at concentrations of 5, 10, and 20 mg/mL
138 (CBDON0.5, CBDON1, and CBDON2, respectively) and empty nanoemulsion (corn oil)
139 were performed using the standard proton correlation spectroscopy (PCS) technique set
140 at 90° to 25°C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments UK) (Cadena et al., 2013).
141 Analyzes were done in triplicate.

142 2.4. Animals

143 The animal experiments were approved by the Ethics Committee on the Use of
144 Animals of UFRPE (License number #2881210120). Animals were supplied from
145 *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal* at the same University. Adult Female
146 Wistar rats (n=10) were placed in collective polypropylene cages (5 per cage), at 22 ± 2
147 °C, and a 12-hour light/dark cycle. The water and food were provided *ad libitum*. Females
148 were mated overnight. When spermatozoa were found in the vaginal smear was
149 considered as day 0.5 of pregnancy. A day 12.5, pregnant females (n = 8) received a single
150 dose of valproic acid (Sigma, CAS number 99661, lot# 1069665) intraperitoneally (500

151 mg/kg in 0.9% saline at a concentration of 250 mg/mL), and the remaining (n = 2)
152 received the same dose of saline in the same way (Control group). Male rats born from
153 valproic acid-treated female were randomly divided into three groups (n = 16 per group
154 x 3 = 48): VPA group, VPA group treated with 1 mL of 1% CBDON [1 mg/animal
155 (CBDON1)] and VPA group treated with 1 mL of 2% CBDON [2 mg/animal
156 (CBDON2)]. Offspring from females that receive saline intraperitoneally formed the
157 control group (n = 16). The control and VPA groups were treated with empty
158 nanoemulsions (corn oil) at a dose of 1 mL/animal. The nanoemulsions were administered
159 by gavage twice a day for 30 days. We did not have a group treated only with CBD-rich
160 oil because it was not possible to administer it to animals by gavage due to the high
161 viscosity of the oil.

162 *2.5. Behavioral Analysis*

163 Experimenters handled the animals daily for one week before the beginning of
164 behavioral tests. All behavioral tests were performed between 6:00 p.m. and 3:00 a.m.
165 The testing room was maintained with low-intensity lighting using a 40-watt red lamp in
166 all tests to maintain animal welfare. Materials (maze and boxes) were cleaned between
167 animals with 20% ethanol solution and dried with a paper towel. The schedule of animal
168 experiments is summarized in Figure 1.

169 *2.6. Elevated Plus Maze Test*

170 The elevated plus-maze (EPM) was performed as previously described by
171 Krauter et al. (2019) to assess anxiety. The EPM was mounted on a raised platform 60
172 cm from the floor and made of white polyvinyl chloride (PVC) with two open arms (36
173 x 6 x 1 cm³) and two closed arms (36 x 6 x 15 cm³) that cross perpendicularly. At postnatal
174 day (PND), 61 offspring rats were placed individually on the center of the platform
175 (intersection of the open and closed arm) facing the closed arm and allowed to explore

176 the maze for 5 minutes. During the test period, the following parameters were evaluated:
177 the number of entries into the open and closed arms and the time spent in each arm. These
178 measures were recorded and scored manually. The low anxiety behavior was defined
179 when animals explore the open arm longer, and the high level of anxiety was defined
180 when animals spent more time in the closed arm.

181 *2.7. Activity cage*

182 An activity cage was used to evaluate the locomotor activity and repetitive
183 behavior of rats as previously described by Zamberletti (2019). Additionally, we assess
184 rearing up behavior according to Choi et al. (2021). Briefly, the test was carried out in a
185 wooden box (66 x 57 x 40 cm³) with a black floor. To encourage the exploitation of
186 animals, the walls had 2 cm holes equally distributed in two rows. At PND 62, each rat
187 was placed in the box and let explore freely the environment for 5 min. The behavior was
188 recorded with a camera positioned above the box. The total distance covered, and the
189 number of rearing and grooming times were evaluated manually. The rearing up behavior
190 was defined as the elevation on the two hind legs, while grooming behavior was defined
191 as rubbing the body with paws or mouth and rubbing the head with paws.

192 *2.8. Three-Chamber Social Interaction Test*

193 The three-chamber social test was carried out to evaluate the animal's sociability
194 and interest in social novelty according to Zamberletti et al. (2019). The experiment was
195 carried out in a social test apparatus (105 x 60 x 35 cm³) internally divided into three
196 similar compartments (35 x 60 x 35 cm³) which allowed free access between them. Rats
197 usually prefer to spend more time with other rats and are more interested in a novel
198 intruder than a familiar one. The test consisted of three phases before starting the
199 experiment. First, each rat was habituated in and explored the box freely for 5 min. The
200 next phase was started immediately after the habituation period and evaluated the social

201 approach. A wire cage containing a stranger rat was put randomly in the right or left side
202 chamber. Stranger rat was randomly selected and belonged to the same lineage, age, and
203 sex as the experimental groups. In the contralateral chamber, an identical empty wire cage
204 was placed. The test was performed at PND 63 and consisted of placing the animals
205 individually in the central compartment and letting them freely explore all chambers for
206 10 min. Finally, the third phase provided a measure of preference for social novelty. For
207 this, a novel rat (unfamiliar) was placed inside of a wire cage previously empty and the
208 rat test was allowed to explore chambers for 10 min. All sessions were recorded and the
209 time spent in each chamber was measured with a stopwatch. The sociability index (SI)
210 and social preference index (SPI) was calculated as the ratio of time spent exploring the
211 stranger rat (second phase) or the unknown rat (third phase), and the total time of
212 exploration x 100.

213 *2.9. Histomorphometric analysis of the hippocampus and cerebral cortex*

214 The hippocampus and the cortical region close to it were photomicrographed using
215 a digital image capture system coupled to a Leica DM500® microscope (Leica
216 Microsystems, Heerbrugg, Suíça). In determining the volumetric density of the
217 hippocampus, quantifications were performed of all living neurons and of the necrotic
218 neurons constituting the hippocampus in its different layers CA1, CA2, CA3, hilum and
219 dentate gyrus (DG) of all animals in the different experimental groups.

220 To measure the diameter, photomicrographs were randomly taken in 70 fields per
221 experimental group, in the different layers of the hippocampus, at 400x magnification,
222 and analyzed using the Image J® program (National Institute of Health, USA).

223 The volumetric data of the cellular composition of the corticocerebral region over
224 the hippocampus were performed by capturing images and inserting a micrometric
225 graticule with 441 points of intersection at 400X magnification. They were counted (glial
226 cell, living neuron, necrotic neuron, neuropil, and blood vessel) in 10 fields randomly,

227 totaling 4,410 points in each animal in the different experimental groups. After obtaining
228 these data, the relationship between glial cell/living neuron and glial cell/necrotic neuron
229 was determined.

230 *2.10. Statistical analysis*

231 Statistical analyses were performed using the OriginPro 2015 academic software
232 (Origin Lab. Northampton, MA USA). Data were analyzed by one-way ANOVA
233 followed by Tukey's test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

234 **3. Results**

235 *3.1. Chromatographic profile of CBDO*

236 Chromatograms of the CBDO at 5, 10, and 20 mg/mL are shown in Figures 2A -
237 C, respectively. CBD was identified by their spectra in comparison with the authentic
238 pattern contained in the equipment. It was observed that the chemical composition of the
239 CBDO at 5, 10 and 20 mg/mL it was from 0.56 %, 0.93 % and 1.94 % of CBD,
240 respectively.

241 *3.2. Formulation analysis*

242 The nanoemulsions were characterized according to dispersion phase
243 (homogeneous or heterogeneous); aspect (presence or absence of lumps); consistency
244 (fluid, slightly thick, thick, or very thick); opacity (translucent, low opaque, or opaque);
245 smell (present or absent); and color (present or absent) over 30 days. During the period
246 evaluated, results revealed that all nanoemulsions were homogeneous, with no lumps and
247 no odor. The formulations had a fluid consistency, but nanoemulsion produced with oil
248 rich in CBD at a concentration of 2% was slightly thick. Regarding opacity, all
249 nanoemulsions were opaque due to addition to propylparaben preservative. Regarding
250 color, formulations showed a slightly yellowish tone as the concentration of CBD-rich oil
251 increased. To evaluate the stability, on the day of preparation and also 2, 7, 15, and 30

252 days after preparation, nanoemulsions were submitted to centrifugation and thermal
253 stress, remaining 24 hours under cooling (5 ± 2 °C), freezing (-20 ± 2 °C) and heating (40
254 e 50 ± 2 °C). Subsequently, the formulations were kept at room temperature (25 ± 2 °C)
255 for approximately one hour, and organoleptic characteristics were assessed again. Any
256 macroscopic physical change was observed in nanoemulsions after centrifuging, cooling,
257 freezing, and heating (creaming or phase separation), indicating good stability.

258 Concerning the physicochemical characteristics (Table 1), nanoemulsion
259 containing corn oil without CBD had a droplet size of 87.5 ± 1.0 nm, while CBDON0.5,
260 CBDON1, and CBDON2 had a droplet size of 107.6 ± 1.1 nm, 90.4 ± 1.3 nm and $72.6 \pm$
261 0.4 nm, respectively. All CBD formulations were characterized as nanoemulsions, as
262 they have vesicles with a droplet size smaller than 200 nm (McClements; Öztürk, 2021b).
263 PDI values are used to describe the degree of uniformity of vesicle size distribution, also
264 known as the heterogeneity index. A PDI less than 0.05 indicates a highly monodisperse,
265 i. e. homogeneous pattern, while a value greater than 0.7 shows that the sample has a very
266 broad, heterogeneous particle size distribution (Danaei et al., 2018). PDI of CBDON0.5,
267 CBDON1, and CBDON2 was 0.432, 0.360 e 0.290, respectively, while the nanoemulsion
268 without CBD had a PDI of 0.327. Thus, CBDON1 and CBDON2 were chosen for
269 administration to animals and subsequent behavioral assessment since they have the
270 lowest PDI.

271 These values indicate that the formulations are homogeneous, as they have a PDI
272 lower than 0.7. Zeta potential measurements were used to determine the stability of
273 colloidal systems. The formulation containing only corn oil showed a zeta potential of -
274 40.6 ± 0.1 mv. CBDON0.5, CBDON1 and CBDON2 showed a zeta potential of $-30.2 \pm$
275 1.3 mv, -26.0 ± 3.6 mv and -24.9 ± 0.1 , respectively.

276 *3.3. Anxiety behavior was alleviated by CBDON treatment*

277 Anxiety behavior was assessed by an elevated plus maze test. Time spent in the
278 closed arm was significantly higher in the VPA group as compared to the control group
279 ($F_{3,28} = 6.22$; $p < 0.005$) showing an anxiety behavior that usually occurs in autistic
280 individuals and valproic-acid-induced autism. In turn, the control group had a higher
281 percentage of time spent in the open arm ($F_{3,28} = 4.8$; $p < 0.05$), behavior considered
282 normal on this test. CBDON1 treatment significantly reduced the length of stay in the
283 closed arm as shown in Figure 3B and rescued the decrease of time spent the in open arm
284 (Figure 3A), suggesting a reduction in anxiety observed in the VPA-exposed group. VPA
285 group had the number of entries in the open arm ($F_{3,28} = 5.48$; $p < 0.05$) and closed arm
286 ($F_{3,28} = 5.88$; $p < 0.05$) reduced in relation to the control group, however, CBDON1
287 treatment attenuating this effect (Figure 3C, D).

288 *3.4. Exploratory activity was rescued, and stereotyped behavior was reduced by CBDON*
289 *treatment*

290 VPA group showed significantly reduction of total distance covered ($F_{3,28} = 9.18$;
291 $p < 0.05$) and number of rearing ($F_{3,40} = 7.23$; $p < 0.05$) when compared to control group.
292 CBDON1 and CBDON2 treatment significantly attenuated the decreased VPA group
293 total distance traveled and rearing up behavior (Figure 4A, B). The self-grooming
294 evaluation displayed increased time of repetitive self-grooming in VPA rats compared
295 with control rats ($F_{3,40} = 5.99$; $p < 0.05$). CBDON1 administration significantly reduced
296 the time spent in repetitive behavior in VPA rats (Figure 4C).

297 *3.5. The sociability index and social preference index were improved by CBDON*
298 *treatment*

299 In the first phase (sociability) on the three-chamber apparatus, the control group
300 exhibited a preference for the unfamiliar rat as compared to the empty cage, showing
301 normal sociability. VPA group has spent more time with empty cage ($F_{3,40} = 6.01$; $p <$

302 0.005) and less time with stranger rat ($F_{3,40} = 8.61$; $p < 0.05$) as compared to control group,
303 reflecting social avoidance. CBDON1 and CBDON2 treatment significantly attenuated
304 the decrease of time spent with stranger rats observed in the VPA-exposed group as well
305 as reduced the time spent in the empty cage (Figure 5A, B). VPA group exhibited a
306 decrease in the sociability index in relation to the control group. However, this parameter
307 was significantly reversed by CBDON1 and CBDON2 treatment (Figure 5C). In the
308 second phase (social preference) was observed preference of control group for unknown
309 rat ($F_{3,39} = 9.83$; $p < 0.05$) as compared to familiar rat ($F_{3,39} = 7.83$; $p < 0.05$). In contrast,
310 the VPA group spent significantly more time with the familiar rat than the unknown rat,
311 showing a reduced social preference (Figure 5D, E). CBDON treatment in both doses
312 reversed the social preference reduction in VPA rats. The VPA group exhibited a
313 reduction in social preference index as compared to the control group, which was
314 attenuated by the CBDON2 treatment ($F_{3,40} = 7.38$; $p < 0.05$) (Figure 5F).

315 *3.6. CBDON treatment restores neuron survival in the hippocampus and corticocerebral* 316 *region*

317 VPA animals had a decrease in cell viability compared to control animals and
318 treatment with CBDON2 attenuated this effect (table 2). At the same time, an increase in
319 cell mortality was observed in animals that received valproic acid in the prenatal period.
320 CBDON treatment at both doses reduced valproic acid-induced neuronal death (table 3).
321 The cellular composition of the cortical region can be observed in table 5. The animals
322 exposed to valproic acid showed a decrease in the number of viable neurons and an
323 increase in the number of red neurons (apoptotic). Consequently, there was an increase
324 and reduction of the glial/VN and glial/RN ratio, respectively. The number of blood
325 vessels was raised in the VPA group. All these alterations were reversed with CBDON
326 treatment in both doses. The measurements of the hippocampal layers CA1, CA2, CA3

327 and dentate gyrus are shown in table 4. VPA animals shown a reduction in all
328 hippocampal layers compared to control animals and CBDON at both doses recovered
329 the diameter of the hippocampal regions (figure 6).

330 **Discussion**

331 In the present study, we investigated the effect of CBDON administration on
332 autistic-like behaviors in a prenatal valproic acid rat model. Furthermore, we focused on
333 the preparation of CBD-rich oil nanoemulsion to enhance oil bioavailability and reduce
334 the dose administered to animals. Nanoemulsions are colloidal systems that may
335 potentially increase water solubility as well as the bioavailability of lipophilic bioactive
336 compounds. Despite the benefits, nanoemulsions can suffer instability phenomena
337 (McClements et al., 2021a). To assess nanoemulsion stability, mechanical and thermal
338 tests were carried out and macroscopic characteristics were evaluated for 30 days.
339 Exposure to high temperatures and centrifugation forces enhances the probability of
340 collision generating aggregation and increasing the coalescence rate (Dantas, 2021).
341 Nevertheless, nanoemulsions were macroscopically stable after tests, preserving
342 appearance and homogeneity.

343 Other parameters were used to evaluate the stability of nanoemulsions such as
344 droplet diameter, polydispersity index, and zeta potential. The CBDON showed vesicle
345 size larger than nanoemulsion without CBD. Moreover, it was observed that CBDON2
346 showed a smaller vesicle size than CBDON1. On the other hand, CBDON0.5 had a
347 droplet size larger than CBDON1. The results show that the presence of CBD modifies
348 the size of the nanoemulsion and that increasing the concentration of CBD decreases the
349 size of the vesicle. The size of the vesicle is important because it influences nanoemulsion
350 physicochemical and functional characteristics (Choi; McClements, 2020). Mikulcova et
351 al. (2017) reported that the reduced droplet size is related to greater stability and

352 nanoemulsions with large particles (such as 590 – 780 nm) quickly lose stability.
353 According to Stokes' law and Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory,
354 smaller particle size may result in a high electrostatic repulsion, preventing emulsion
355 coalescence and increasing the repulsion force between particles (Meng et al., 2018). Our
356 results corroborate the theory since they showed that particle size is directly related to
357 nanoemulsion stability.

358 The polydispersity index is an indicator of association in the particles; a small PDI
359 value indicates homogeneity and a high PDI value indicates a heterogeneous and
360 polydispersed distribution (Thuraisingam et al., 2023). The nanoemulsions had low PDI
361 values, which indicates they had a stable and uniform distribution. In addition, the PDI
362 value was inversely proportional to the CBD concentration, and CBDON1 and CBDON2
363 demonstrate lower PDI values than CBDON0.5, indicating the best monodispersity. Zeta
364 potential is an important physicochemical characteristic of formulations. These
365 parameters can determine vesicle surface charge, which may be cationic, anionic, or
366 neutral. Negative values indicate a greater interaction of repulsion forces between
367 vesicles, which ensures stability (Smith et al., 2017). The zeta potential obtained in all
368 formulations showed negative values, indicating good stability. Additionally, it was
369 observed that the presence of CBD altered the zeta potential of nanoemulsions, so the
370 higher concentration of CBD produced a lower zeta potential. Anionic surfactants were
371 used in the development of nanoemulsions and negative potential zeta may be related to
372 the presence of anions released by the surfactants (Shen et al., 2021). CBDON2 was the
373 most stable nanoemulsion based on the droplet size, PDI, and zeta potential value.

374 Currently, the use of CBD in individuals with autism has received attention
375 (Pretzsch 2019). Pre-clinical and clinical studies have shown the efficacy and safety of
376 CBD in the core symptoms of autism (Poleg 2019; Schleider 2018). In the current work,

377 to determine the effects of CBDON on behavioral changes we assess anxiety, locomotion,
378 exploratory activity, repetitive behavior, sociability, and social preference. We used the
379 prenatal valproic acid rat model since rodents prenatally exposed to this drug develop
380 behavioral phenotypes of the human condition. This model is a valid and reliable tool to
381 investigate the behavior and others features of autism (Bossu; Roux, 2019). Prenatal VPA
382 exposure has been shown to increase anxiety and stereotyped movements as well as
383 reduction of exploratory activity, sociability, and social preference. Several animals and
384 human studies have evidenced that exposure to VPA in intrauterine life results in
385 behavioral changes such as increased repetitive behavior (Schneide et al., 2004) and
386 anxiety (Wang et al., 2019; Schneide et al., 2007) along with a decrease in social
387 interaction and exploratory activity (Schneide et al., 2001) corroborating with our present
388 data.

389 In this study, CBDON in both doses significantly attenuated alterations induced
390 by VPA in behavioral parameters in rats. In the elevated plus maze test we observed an
391 increase in the anxiety of animals exposed to VPA. This behavior consists of aversion to
392 open spaces, which is seen as the animal spending more time in the closed arms of the
393 maze, a behavior reproduced by VPA animals. CBDON1 treatment was able to reduce
394 anxiety signs induced by prenatal VPA exposure. Exploratory activity was evaluated by
395 the number of rearing up and total distance covered. It was observed a reduction in rearing
396 up the number and total distance covered in the VPA group. It has been reported that
397 exploratory activity is reduced in VPA-exposed rodents, in accordance with our study
398 (Uccelli et al., 2021; Dobrovolsky et al., 2020; Pelsoczi et al., 2019).

399 Grooming behavior is innate in rodents. It consists of movements that involve the
400 licking of the forelegs, belly, and back in a stereotyped progression anteroposterior.
401 Excessive repetitive self-grooming in VPA rats may be analogous to repetitive motor

402 stereotypies and self-stimulation, a phenotype commonly observed in autism (Keller et
403 al., 2021). Many studies have shown an increase in self-grooming behavior in VPA rats
404 (McKinnell et al., 2021; Mohammadi et al., 2020; Gandhi; Lee, 2020; Wang et al., 2019).
405 Our results also show similar results. This parameter was rescued by CBDON1 e
406 CBDON2 treatment. VPA rats showed reduced sociability and preference social index,
407 in other words, VPA treatment impaired their social behavior. CBDON1 and CBDON2
408 treatments also reversed this effect.

409 Behavioral beneficial effects of CBD are related to the route of administration as
410 well as the dose used, and oral administration was reported to be more effective (Hlozec
411 2017). However, studies in animal models have shown effective CBD responses in
412 reverse behavior changes with high doses that ranged from 20 mg/kg to 120 mg/kg (Poleg
413 et al., 2021; Kaplan et al., 2017; Deiana et al., 2012). Thus, the use of nanoemulsion may
414 have increased the effectiveness of CBD, since it was observed positively results using
415 very small doses. In this context, the nanoemulsion is a great option to overcome the need
416 to administer CBD at high doses.

417 In the search for possible correlates of the effects observed at the behavioral level,
418 we performed histological analysis in the hippocampus of experimental groups. We found
419 that VPA generates an increase in cell death in the CA3 hippocampal region, as well as
420 reduces the number of viable neurons in regions CA1, CA2, CA3, and dentate gyrus.
421 These findings may also be related to neuroinflammation and microglial activation, since
422 this event contributes to neuronal dysfunction and death (Codagnone et al., 2015; Ross et
423 al., 2013). When overactivated in response to neuronal damage and genetic or
424 environmental factors, microglia cause widespread damage to neighboring neurons.
425 Indeed, reactive microglia kill neurons by producing neurotoxic factors and
426 proinflammatory molecules (Galvani et al., 2021).

427 Additionally, our study showed an increase in the number of blood vessels in the
428 cortical region of VPA animals. Neuroinflammation and microglial activation promote
429 angiogenesis which can justify our findings (Huang et al., 2020). Associated with this,
430 the occurrence of neurotoxic effects related to neuroinflammation and oxidative stress in
431 prenatal exposure to VPA was previously reported (Taleb et al., 2021; Kazlauskas et al.,
432 2019). In fact, VPA may trigger the formation of reactive oxygen species (ROS) (Al-
433 Askar et al., 2017; El-Ansary, 2016). ROS can cause damaging proteins, lipids, and DNA
434 of the neuronal cells during the neurodevelopmental process. In contrast, studies have
435 shown a beneficial effect of VPA reducing neuronal death and neuroinflammation, which
436 does not corroborate with our results (Chen et al., 2018; Cher et al., 2015).

437 It is important to point out that there is evidence of hippocampal structural
438 abnormalities in autistic individuals (Banker et al., 2021). Moreover, the dentate gyrus
439 and CA1/CA2/CA3 regions are involved in the circuitry underlying social memory
440 (Bertoni et al., 2021; Hitti et al., 2014). Additionally, the amygdala has long been linked
441 to social interaction and shares reciprocal connections with the ventral hippocampus, and
442 there is abnormal patterns of hippocampal and amygdala development in autistic patients
443 (Felix-Ortiz et al., 2014). Therefore, the behavioral changes observed in our study
444 corroborate the lesions found in the hippocampus.

445 CBDON in both doses has been found to reduce the death neurons and increase
446 the number of viable cells in the hippocampus and cortical region. In fact, it has been
447 demonstrated that CBD has a role of neuroprotective effects in various neurological
448 conditions. This neuroprotective role may be due to the reduction in brain oxidative stress
449 and inflammation (Atalai et al., 2019; Pelati et al., 2018). The decrease in the number of
450 cortical blood vessels may be related to a probable reduction in angiogenesis.

451

452 Conclusion

453 It has been concluded that nanoemulsions with CBD were efficient in attenuating
454 autistic-like behaviors in rats. This effect may be related to the reduction of neuronal
455 death in the hippocampus promoted by CBD. These findings bring a new perspective to
456 the treatment of the disease.

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477 **Referências**

- 478 ALI, A. et al. Developmental Vitamin D Deficiency Produces Behavioral Phenotypes of
479 Relevance to Autism in an Animal Model. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1187, 2019.
- 480 ARAUJO, D. J.; TJOA, K.; SAIJO, K. The Endocannabinoid System as a Window Into
481 Microglial Biology and Its Relationship to Autism. **Frontiers in Cellular**
482 **Neuroscience**, v. 13, 18 set. 2019.
- 483 BANKER, S. M. et al. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in
484 autism spectrum disorder. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 10, p. 793–807,
485 1 out. 2021.
- 486 BERTONI, A. et al. Oxytocin administration in neonates shapes hippocampal circuitry
487 and restores social behavior in a mouse model of autism. **Molecular**
488 **Psychiatry**, v. 26, n. 12, p. 7582–7595, 21 jul. 2021.
- 489 BESAG, F. M. C.; VASEY, M. J. Seizures and Epilepsy in Autism Spectrum Disorder.
490 **Psychiatr. Clin. North. Am.**, v. 44, n. 1, p. 51-68, 2021.
- 491 BLESSING, E. M. et al. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety
492 Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 825–836, 4 set. 2015.
- 493 BOSSU, J. L.; ROUX, S. The valproate model of autism. **Med. Sci. (Paris)**, v. 35, n. 3,
494 p. 236-243, 2019.
- 495 CHEN, J. et al. Protective effect of cannabidiol on hydrogen peroxide-induced apoptosis,
496 inflammation and oxidative stress in nucleus pulposus cells. **Molecular**
497 **Medicine Reports**, v. 14, n. 3, p. 2321–2327, 13 jul. 2016.
- 498 CHOI, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic
499 nutraceuticals: strategies for improving their formulation, stability,
500 functionality and bioavailability. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 29, n. 2, p. 149-
501 168, 2020.

- 502 CHOUDHURY H, GORAIN B, PANDEY M, et al. Strategizing biodegradable
503 polymeric nanoparticles to cross the biological barriers for cancer targeting. **Int**
504 **J Pharm.** 2019;565:509-522, 2019.
- 505 CRAWLEY J. N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors.
506 **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, 10 (4): 248-58, 2004.
- 507 CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded
508 endocannabinoid system in neurological disorders. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 1, p.
509 9-29, 2020.
- 510 DANTAS, A. G. B. et al. Development, Characterization, and Immunomodulatory
511 Evaluation of Carvacrol-loaded Nanoemulsion. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3899,
512 25 jun. 2021.
- 513 DEIANA, S. et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD),
514 cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol
515 (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and
516 CBD action on obsessive–compulsive behaviour. **Psychopharmacology**, v. 219,
517 n. 3, p. 859–873, 28 jul. 2011.
- 518 DOBROVOLSKY, A. P. et al. Beneficial effects of xenon inhalation on behavioral
519 changes in a valproic acid-induced model of autism in rats. **J. Transl. Med.**, v.
520 17, n. 1, p. 400, 2019.
- 521 DOS SANTOS, A. R. et al. Processo de obtenção de um aditivo alimentar a base de
522 nanoemulsão para a encapsulação de testosterona com uso na reversão sexual
523 de peixes. **BR1020200046292**. Set. 9, 2021.

- 524 FYKE, W. et al. Communication and social interaction in the cannabinoid-type 1
525 receptor null mouse: Implications for autism spectrum disorder. **Autism**
526 **Res.**, 2021a.
- 527 FYKE, W.; ALARCON, J. M.; VELINOV, M.; CHADMAN, K. K. Pharmacological
528 inhibition of the primary endocannabinoid producing enzyme, DGL- α , induces
529 autism spectrum disorder-like and co-morbid phenotypes in adult C57BL/J
530 mice. **Autism Res.**, v. 14, n. 7, p. 1375-1389, 2021b.
- 531 FOLKES, O. M. et al. An endocannabinoid-regulated basolateral amygdala nucleus
532 accumbens circuit modulates sociability. **J. Clin. Invest.** v. 130, n. 4; p. 1728-
533 1742, 2020.
- 534 FRANCO, V.; PERUCCA, E. Pharmacological and Therapeutic Properties of
535 Cannabidiol for Epilepsy. **Drugs**, v. 79, n. 13, p. 1435-1454, 2019.
- 536 FRANKOLA, K. A. et al. Targeting TNF-Alpha to Elucidate and Ameliorate
537 Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. **CNS & Neurological**
538 **Disorders - Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 391–403, 1 maio 2011.
- 539 GALVANI, G. et al. Inhibition of microglia overactivation restores neuronal survival in
540 a mouse model of CDKL5 deficiency disorder. **Journal of**
541 **Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, 8 jul. 2021.
- 542 GANDHI, T.; LEE, C. C. Neural Mechanisms Underlying Repetitive Behaviors in
543 Rodent Models of Autism Spectrum Disorders. **Front Cell Neurosci.**, v.14,
544 2020.
- 545 GASSOWSKA-DOBROWOLSKA, M. et al. Prenatal Exposure to Valproic Acid
546 Affects Microglia and Synaptic Ultrastructure in a Brain-Region-Specific
547 Manner in Young-Adult Male Rats: Relevance to Autism Spectrum Disorders.
548 **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, 2020.

- 549 HLOŽEK, T. et al. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and
550 THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration
551 in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. **European**
552 **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1223–1237, dez. 2017.
- 553 HUANG, Y. et al. Crosstalk between Inflammation and the BBB in Stroke. **Current**
554 **Neuropharmacology**, v. 18, n. 12, p. 1227–1236, 1 dez. 2020.
- 555 KAPLAN, J. S. et al. Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model
556 of Dravet syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.
557 114, n. 42, p. 11229–11234, 2 out. 2017.
- 558 KARHU, E. et al. Nutritional interventions for autism spectrum disorder. **Nutr. Rev.**, v.
559 78, n. 7, p. 515-531, 2020.
- 560 KAWAI, Y.; ARINZE, I. J. Valproic Acid–Induced Gene Expression through Production
561 of Reactive Oxygen Species. **Cancer Research**, v. 66, n. 13, p. 6563–6569, 1
562 jul. 2006.
- 563 KAZLAUSKAS, N. et al. Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on
564 sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience
565 in autism. **Psychoneuroendocrinology**, v. 110, p. 104441, 1 dez. 2019.
- 566 KELLER, R. et al. Stereotypies in the Autism Spectrum Disorder: Can We Rely on an
567 Ethological Model? **Brain Sci.**, v. 11, n. 6, p. 762, 2021.
- 568 KERR, D. M.; GILMARTIN, A.; ROCHE, M. Pharmacological inhibition of fatty acid
569 amide hydrolase attenuates social behavioural deficits in male rats prenatally
570 exposed to valproic acid. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 228-235,
571 2016.
- 572 KIDD, V. D. Cannabinoids in the Treatment of Autism Spectrum Disorder: Demanding
573 Data Before Using Fad Therapies. **Pediatric Neurology**, v. 88, p. 10-11, 2018.

- 574 KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Elevated Plus Maze Test for
575 Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Methods in Molecular Biology**,
576 p. 69–74, 11 dez. 2018.
- 577 KUMAR, S. et al. Drug carrier systems for solubility enhancement of BCS class II
578 drugs: A critical review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier**
579 **Systems**, v. 30, p. 217-256, 2013.
- 580 LAI J, DENG G, SUN Z, et al. Scaffolds biomimicking macrophages for a glioblastoma
581 NIR-Ib imaging guided photothermal therapeutic strategy by crossing blood–
582 brain barrier. **Biomaterials** 211:48–56, 2019.
- 583 LI, X. et al. Nano carriers for drug transport across the blood–brain Barrier. **Journal of**
584 **Drug Targeting**, v. 25, n. 1, p. 17-28, 2017.
- 585 LEE, E.; LEE, J.; KIM, E. Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism
586 Spectrum Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 10, p. 838–847, maio 2017.
- 587 LORD, C. et al. Autism spectrum disorder. **Nature reviews Disease primers, Nature**
588 **Publishing Group**, v. 6, n. 1, p. 5, 2020.
- 589 MABOU TAGNE, A. et al. A Novel Standardized Cannabis sativa L. Extract and Its
590 Constituent Cannabidiol Inhibit Human Polymorphonuclear Leukocyte
591 Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1833,
592 13 abr. 2019.
- 593 MARTIN, H. G. S.; MANZONI, O. J. Late onset deficits in synaptic plasticity in the
594 valproic acid rat model of autism. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8,
595 2014.
- 596 MCCLEMENTS, D.; ÖZTÜRK, B. Utilization of Nanotechnology to Improve the
597 Handling, Storage and Biocompatibility of Bioactive Lipids in Food
598 Applications. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 365, 8 fev. 2021.

- 599 MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and
600 performance using mixed emulsifiers: A review. **Adv. Colloid Interface Sci.**,
601 v. 251, p. 55-79, 2018.
- 602 MCCLEMENTS, D. J.; LI, F.; XIAO, H. The nutraceutical bioavailability classification
603 scheme: Classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral
604 bioavailability. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 6,
605 p. 299-327, 2015.
- 606 MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Potential biological fate of ingested nanoemulsions:
607 Influence of particle characteristics. **Food & Function**, v. 3, p. 202-220, 2012.
- 608 MCCLEMENTS, J. D. et al. Inhibition of Ostwald Ripening in Model Beverage
609 Emulsions by Addition of Poorly Water Soluble Triglyceride Oils. **Journal of**
610 **Food Science**, v. 77, n. 1, p. C33–C38, 2 dez. 2011.
- 611 MCCOY, M.K. et al. TNF: a key neuroinflammatory mediator of neurotoxicity and
612 neurodegeneration in models of Parkinson's disease. **Adv. Exp. Med. Biol.** 691,
613 539–540, 2011.
- 614 MCKINNELL, Z. E.; MAZE, T.; RAMOS, A.; CHALLANS, B.; PLAKKE, B. Valproic
615 acid treated female Long-Evans rats are impaired on attentional set-shifting.
616 **Behav. Brain Res.**, v. 397, 2021.
- 617 MENG, Q. et al. Improved absorption of β -carotene by encapsulation in an oil-in-water
618 nanoemulsion containing tea polyphenols in the aqueous phase. **Food Res. Int.**,
619 v. 116, p. 731-736, 2019.
- 620 MIKULCOVA, V.; KASPARKOVA, V.; HUMPOLICEK, P.; BUNKOVA, L.
621 Formulation, characterization and properties of hemp seed oil and its
622 emulsions. **Molecules**, v. 22, n. 5, 2017.

- 623 MOHAMMADI, S.; ASADI-SHEKAARI, M.; BASIRI, M.; PARVAN,
624 M.; SHABANI, M.; NOZARI, M. Improvement of autistic-like behaviors in
625 adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of
626 NMDA receptor function. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 237, n. 1, p. 199-
627 208, 2020.
- 628 MORRIS, G. et al. Intertwined associations between oxidative and nitrosative stress and
629 endocannabinoid system pathways: Relevance for neuropsychiatric
630 disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological**
631 **Psychiatry**, v. 114, p. 110481, mar. 2022.
- 632 MORRIS, G. et al. Inflammation, and Nitro-oxidative Stress as Drivers of
633 Endocannabinoid System Aberrations in Mood Disorders and
634 Schizophrenia. **Molecular Neurobiology**, 26 mar. 2022.
- 635 NARDO, M. et al. Cannabidiol reverses the mCPP-induced increase in marble-burying
636 behavior. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 544–550, 25
637 out. 2013.
- 638 NAQVI, S.; PANGHAL, A.; FLORA, S. J. S. Nanotechnology: A Promising Approach
639 for Delivery of Neuroprotective Drugs. **Front. Neurosci.**, v. 14, p. 494, 2020.
- 640 PELSOCI, P. et al., Disrupted Social Hierarchy in Prenatally Valproate-Exposed
641 Autistic-Like Rats. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 13, p. 295, 2020.
- 642 POLEG, S. et al. Behavioral aspects and neurobiological properties underlying medical
643 cannabis treatment in Shank3 mouse model of autism spectrum
644 disorder. **Translational Psychiatry**, v. 11, p. 524, 13 out. 2021.
- 645 POLEG, S.; GOLUBCHIK, P.; OFFEN, D.; WEIZMAN, A. Cannabidiol as a suggested
646 candidate for treatment of autism spectrum disorder. **Prog.**
647 **Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 89, p. 90-96, 2019.

- 648 PRETZSCH, C. M. et al. Effects of cannabidiol on brain excitation and inhibition
649 systems; a randomised placebo-controlled single dose trial during magnetic
650 resonance spectroscopy in adults with and without autism spectrum disorder.
651 **Neuropsychopharmacology**, v. 0, p. 1-8, 2019.
- 652 SCHLEIDER, L. B. L.; MECHOULAM, R.; SABAN, N.; MEIRI, G.; NOVACK, V.
653 Real life Experience of Medical Cannabis Treatment in Autism: Analysis of
654 Safety and Efficacy. **Scientific Reports**, v. 9, p. 200, 2018.
- 655 SCHNEIDER T, LABUZ D, PRZEWŁOCKI R. Nociceptive changes in rats after
656 prenatal exposure to valproic acid. **Polish Journal of Pharmacology**, 53:531–
657 4, 2001.
- 658 SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed
659 to Valproic Acid: Animal Model of Autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30,
660 n. 1, p. 80–89, 7 jul. 2004.
- 661 SCHNEIDER, T. et al. Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic
662 system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal
663 model of autism. **Psychopharmacology**, v. 193, n. 4, p. 547–555, 13 maio 2007.
- 664 SEIFFE, A., RAMÍREZ, M. F., SEMPÉ, L., & DEPINO, A. M. Juvenile handling rescues
665 autism-related effects of prenatal exposure to valproic acid. **Scientific**
666 **Reports**, 12(1) doi: 10.1038/s41598-022-11269-7, 2022.
- 667 SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug
668 delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28-49, 2017.
- 669 SHEN, X.; WANG, J.; XIN, G. Effect of the Zeta Potential on the Corrosion Resistance
670 of Electroless Nickel and PVDF Composite Layers Using Surfactants. **ACS**
671 **Omega**, v. 6, n. 48, p. 33122–33129, 24 nov. 2021.

- 672 SHER, Y. et al. Valproic Acid for Treatment of Hyperactive or Mixed Delirium:
673 Rationale and Literature Review. **Psychosomatics**, v. 56, n. 6, p. 615–625,
674 nov. 2015.
- 675 SHOVAL, G. et al. Prohedonic Effect of Cannabidiol in a Rat Model of
676 Depression. **Neuropsychobiology**, v. 73, n. 2, p. 123–129, 2016.
- 677 SMITH, M. C.; CRIST, R. M.; CLOGSTON, J. D.; MCNEIL, S. E. Zeta potential: a
678 case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Anal Bioanal. Chem.**,
679 v. 409, n. 24, p. 5779-5787, 2017.
- 680 ŠPAGLOVÁ, M.; CUCHAROVÁ, M.; CIERNA, M.; PONIŠT, S.; BAUEROVÁ, K.
681 Microemulsions as Solubilizers and Penetration Enhancers for Minoxidil
682 Release from Gels. **Gels**, v. 7, n. 26, 2021.
- 683 TALEB, A. et al. Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in
684 autism and its implications for pharmacological treatment. **Biomedicine &**
685 **Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111322, maio 2021.
- 686 THAKKAR, H. P.; KHUNT, A.; DHANDE, R. D.; PATEL, A. A. Formulation and
687 evaluation of itraconazole nanoemulsion for enhanced oral bioavailability.
688 **J. Microencapsul.**, v. 32, n. 6, p. 559-569, 2015.
- 689 TRAETTA, M. E. et al. Long-Lasting Changes in Glial Cells Isolated From Rats
690 Subjected to the Valproic Acid Model of Autism Spectrum Disorder. **Frontiers**
691 **in Pharmacology**, v. 12, 5 ago. 2021.
- 692 TURNER, M. The role of drugs in the treatment of autism. **Aust Prescr.**, v. 43, n. 6, p.
693 185-190, 2020.

- 694 UCCELLI, N. A. Neurobiological substrates underlying corpus callosum
695 hypoconnectivity and brain metabolic patterns in the valproic acid rat model of
696 autism spectrum disorder. **J. Neurochem.**, v. 159, n. 1, p. 128-144, 2021.
- 697 WANG, J. et al. Increased Expression of Kv10.2 in the Hippocampus Attenuates
698 Valproic Acid-Induced Autism-Like Behaviors in Rats. **Neurochem. Res.**, v.
699 44, n. 12, p. 2796-2808, 2019.
- 700 WANG, R.; HAUSKNECHT, K.; SHEN, R. Y.; HAJ-DAHMANE, S. Potentiation of
701 Glutamatergic Synaptic Transmission Onto Dorsal Raphe Serotonergic
702 Neurons in the Valproic Acid Model of Autism. **Front. Pharmacol.**, v. 16, n.
703 9, 2018.
- 704 WANG, G. et al. Advances in lipid-based drug delivery: Enhancing efficiency for
705 hydrophobic drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, p. 1475-1499,
706 2015.
- 707 WEI, D. et al. Enhancement of Anandamide-Mediated Endocannabinoid Signaling
708 Corrects Autism-Related Social Impairment Cannabis. **Cannabinoid Res.**, v.
709 1, n. 1, p. 81-89, 2016.
- 710 WILLIAMS, H. D. et al. Lipid-based formulations and drug supersaturation:
711 Harnessing the unique benefits of the lipid digestion/absorption pathway.
712 **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 2976-2992, 2013a.
- 713 WILLIAMS, H. D. et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and
714 development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, p. 315-499, 2013b.
- 715 WU, H. F.; LU, T. Y.; CHU, M. C.; CHEN, P. S.; LEE, C. W.; LIN, H. C. Targeting
716 the inhibition of fatty acid amide hydrolase ameliorate the endocannabinoid-
717 mediated synaptic dysfunction in a valproic acid-induced rat model of Autism.
718 **Neuropharmacology**, v. 162, 2020.

Tables

Table 1. Influence evaluations of cannabidiols according to droplet size, polydispersity index (PDI), and zeta potential ζ (mv) of oil-in-water (O/A) nanoemulsions of CBD and corn oil nanoemulsion without CBD (empty - E).

Produced Formulation	Droplet size (nm)	PDI	ζ (mv)
Corn – E	87.5 ± 1.0^a	0,327	-40.6 ± 0.1^a
CBDON0.5	107.6 ± 1.1^b	0,432	$-30.2 \pm 1.3^{b,c}$
CBDON1	90.4 ± 1.3^c	0,360	$-26.0 \pm 3.6^{c,d}$
CBDON2	72.6 ± 0.4^d	0,290	-24.9 ± 0.1^d

Experimental groups were compared with control (^a) and between the groups (^{b, c, d}) by one-way ANOVA (Average size $F_{3,11} = 555.38$, $p < 0.001$ and ζ (mv) $F_{3,11} = 41.88$, $p < 0.001$) followed by Tukey test with $p < 0.05$.

Table 2. Quantification of the population of viable neurons (VN) in the hippocampus (C1, C2, C3, hilum and dentate gyrus) of control, VPA, CBDON1 and CBDON2 groups. Each experimental group was compared with control (^a) and VPA group (^b) by one-way ANOVA followed by Tukey's test and considered significant when $p < 0.05$.

Parameters	Control	VPA	CBDON1	CBDON2	P
Hippocampus					
VN					
CA1	$429,2 \pm 42,6^a$	$349,8 \pm 89,8^b$	$305,0 \pm 42,6^b$	$429,6 \pm 67,8^a$	0,0013

CA2	134,7 ± 33,7 ^a	116,8 ± 34,0 ^b	101,2 ± 25,9	163,0 ± 25,0 ^a	0,0024
CA3	83,8 ± 50,3	64,5 ± 20,2	52,0 ± 7,3	58,9 ± 21,0	0,2067
HILUS	89,5 ± 44,5	93,0 ± 21,5	89,1 ± 11,9	90,9 ± 25,7	0,9939
DG	1226 ± 343,5	1170 ± 232,6	1424 ± 132,3	1294 ± 287,1	0,2934

Table 3. Quantification of the population of red neurons (RN) in the hippocampus (C1, C2, C3, hilum and dentate gyrus) of control, VPA, CBDON1 and CBDON2 groups. Each experimental group was compared with control (^a) and VPA group (^b) by one-way ANOVA followed by Tukey's test and considered significant when $p < 0.05$.

Parameters	Control	VPA	CBDON1	CBDON2	P
Hippocampal RN					
CA1	13,2 ± 7,9	32,7 ± 23,5	36,4 ± 22,8	23,5 ± 12,1	0,1125
CA2	15,7 ± 15,1	17,7 ± 9,0	17,7 ± 16,0	16,6 ± 18,0	0,9939
CA3	5,7 ± 3,6 ^a	32,2 ± 33,9 ^b	11,0 ± 7,9 ^a	11,4 ± 7,0 ^a	0,0476
HILUS	4,2 ± 1,6	16,8 ± 23,8	13,2 ± 15,6	8,6 ± 10,6	0,4807
DG	69,8 ± 55,5	103,3 ± 84,0	50,1 ± 46,1	50,0 ± 29,0	0,2670

Table 4. Diameter of the neuronal population in the hippocampus (C1, C2, C3, hilum and dentate gyrus) of control, VPA, CBDON1 and CBDON2 groups. Each experimental group was compared with control (^a) and VPA group (^b) by one-way ANOVA followed by Tukey's test and considered significant when $p < 0.05$.

Parameters	Control	VPA	CBDON1	CBDON2	P
Measurements					
CA1	32,2 ± 3,4 ^a	28,7 ± 3,5 ^b	31,9 ± 6,3 ^a	33,5 ± 6,0 ^a	0,0001
CA2	56,4 ± 11,4 ^a	45,0 ± 11,0 ^b	63,9 ± 12,5 ^a	59,0 ± 9,9 ^a	0,0001
CA3	49,6 ± 7,3 ^a	40,2 ± 7,2 ^b	57,1 ± 12,0 ^a	42,4 ± 10,1 ^a	0,0001
DG	51,4 ± 7,6 ^a	44,9 ± 10,4 ^b	50,2 ± 12,1 ^a	48,6 ± 9,2 ^a	0,0004

Table 5. Morphometric parameters of the cell population in corticocerebral region of control, VPA, CBDON1 and CBDON2 groups. Each experimental group was compared with control (^a) and VPA group (^b) by one-way ANOVA followed by Tukey's test and considered significant when $p < 0.05$.

Parameters	Control	VPA	CBDON1	CBDON2	P
Hippocampus					
Morphometry					
GLIAL	27,5 ± 2,0	23,1 ± 6,8	27,4 ± 1,5	27,0 ± 2,0	0,1112
VN	46,7 ± 5,5 ^a	44,6 ± 14,8 ^b	52,9 ± 1,5 ^a	55,0 ± 1,6 ^a	0,0433
RN	4,1 ± 0,5 ^a	14,2 ± 4,7 ^b	3,1 ± 0,7 ^a	3,4 ± 0,8 ^a	0,0001
NEUROPIIL	359,9 ± 4,3	355,4 ± 18,8	355,1 ± 2,6	353,0 ± 1,7	0,5646
VESSEL	2,8 ± 0,5 ^a	3,7 ± 2,2 ^b	2,3 ± 0,4 ^a	1,8 ± 0,2 ^a	0,0213
GLIAL/VN	0,6 ± 0,10	0,5 ± 0,08	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,02	0,4722
GLIAL/RN	8,8 ± 2,7 ^a	2,7 ± 2,0 ^b	11,3 ± 2,4 ^a	10,5 ± 3,9 ^a	0,0001

GLIAL – glial cells; VN – viable neurons; RN – red neurons.

Captions for figures

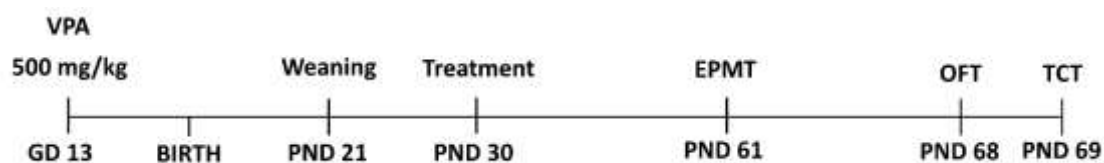


Figure 1. Schematic representation of study schedule. GD, gestacional day; PND, postnatal day; EPMT, elevated plus maze test; OFT, open field test; TCT, tree chamber test.

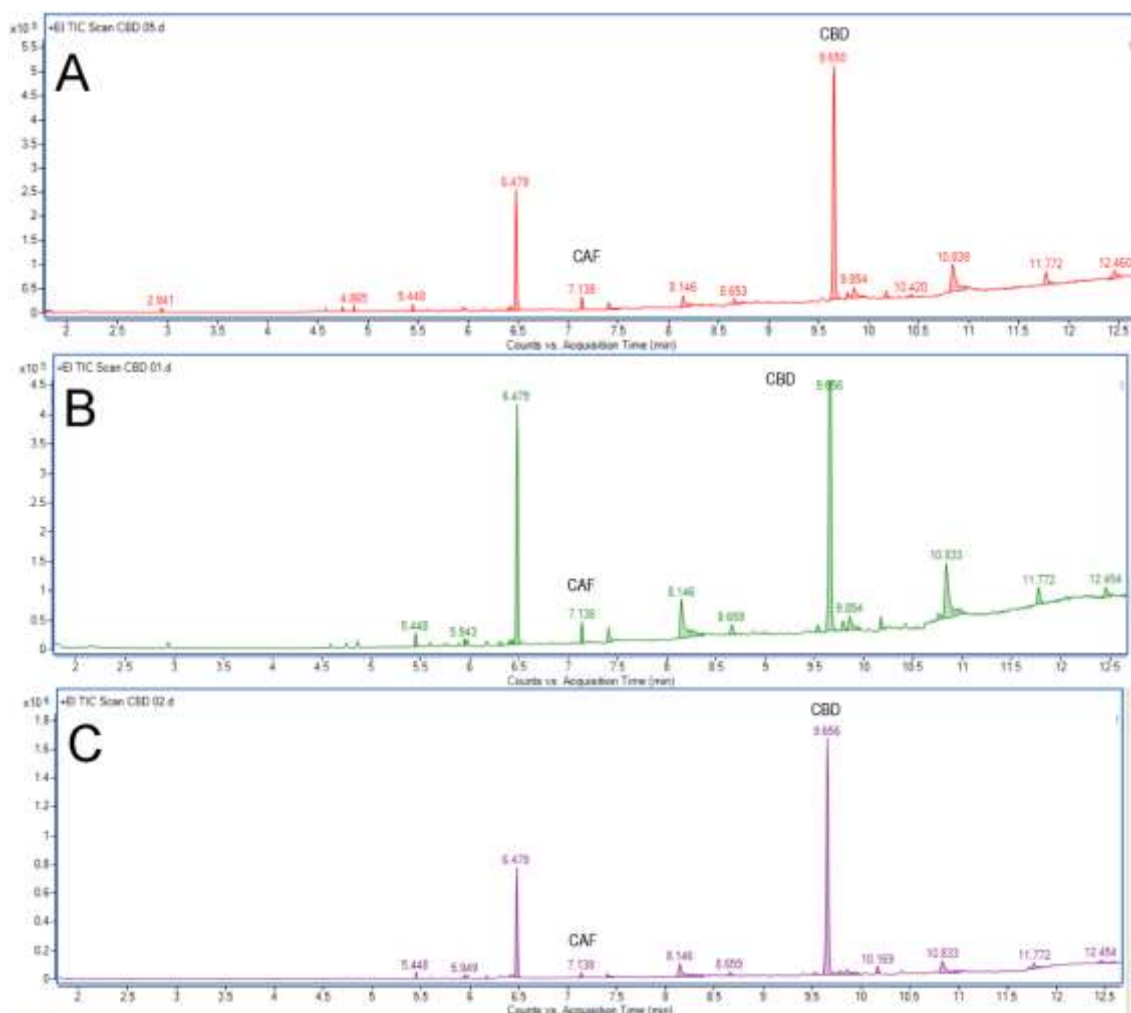


Figure 2. Chromatographic profile of CBD analyte at concentrations of 5 mg/ml (A), 10 mg/ml (B), 20 mg/ml (C) and the internal caffeine (CAF) pattern (0.014 mg/ml).

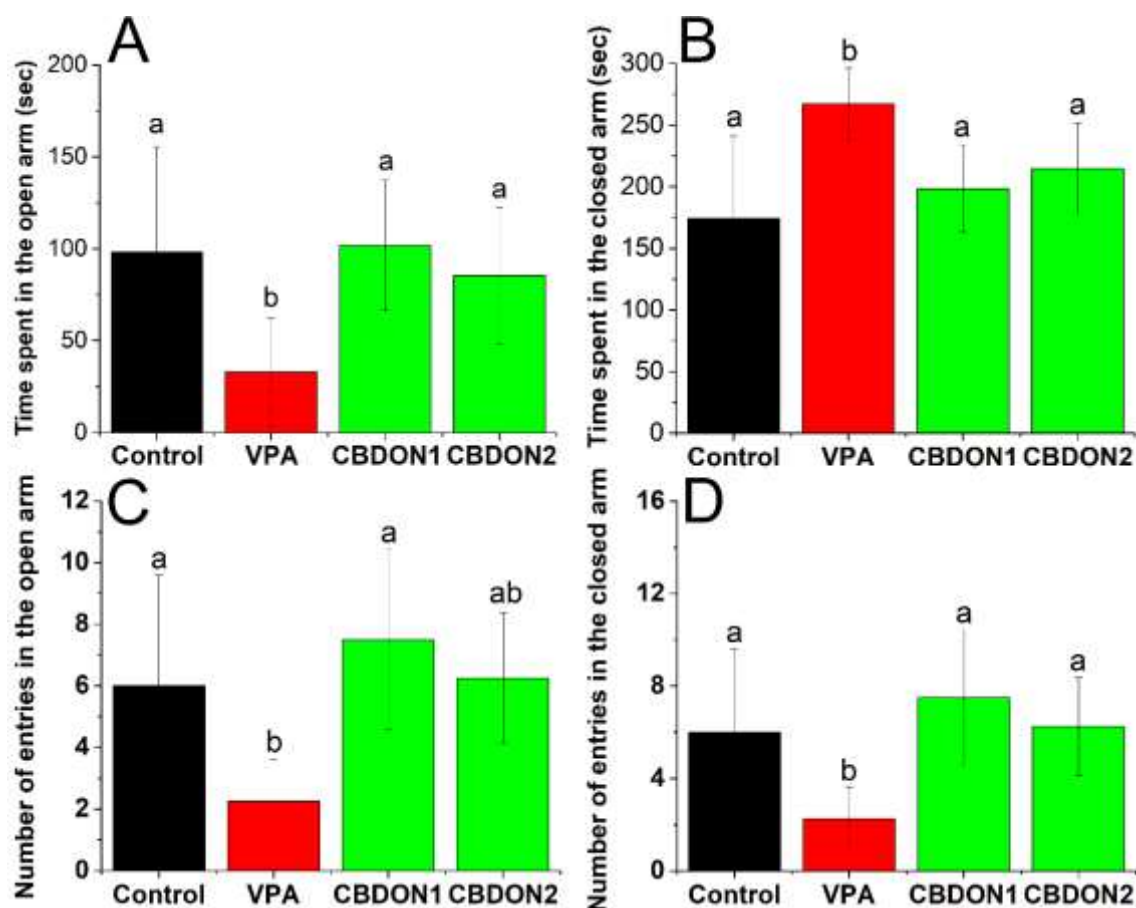


Figure 3. Effect of prenatal VPA exposure (VPA group) and CBD-enriched *Cannabis* oil nanoemulsion (CBDON) treatment at the concentrations of 1 mg/animal (CBDON1) and 2 mg/animal (CBDON2) on autistic rats' anxiety. A, B Time spent in the open and close arm, respectively, in elevated plus maze test. C, D Number of entries in the open and close arm, respectively, in elevated plus maze test. Each experimental group was compared with control (^a) and VPA group (^b) by one-way ANOVA followed by Tukey's test and considered significant when $p < 0.05$. (A). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.99$, CBDON2 $p = 0.92$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p = 0.07$). (B). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.005$, CBDON1 $p = 0.70$, CBDON2 $p = 0.28$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p = 0.11$). (C). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.005$, CBDON1 $p = 0.51$, CBDON2 $p = 0.91$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p = 0.07$). (D). Tukey post hoc test against control group

(VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.67$, CBDON2 $p = 0.99$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.005$, CBDON2 $p < 0.05$).

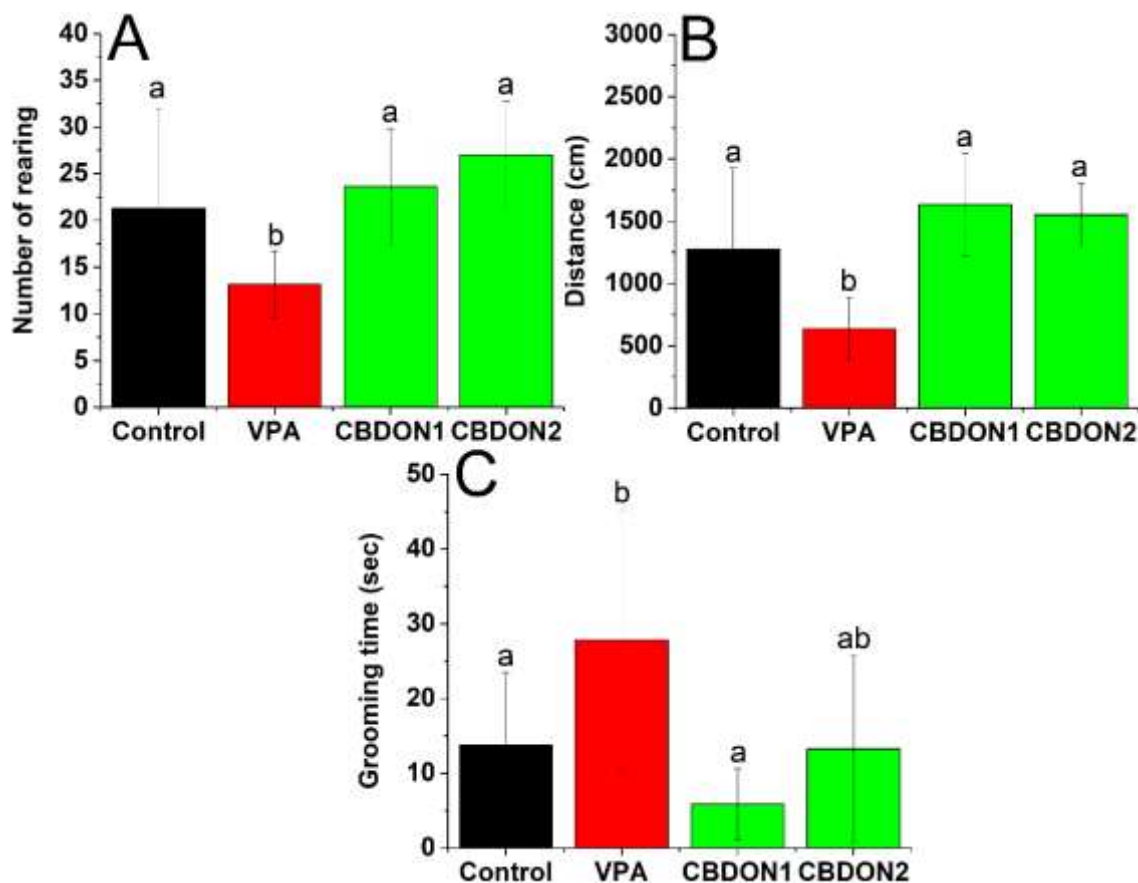


Figure 4. Effect of prenatal VPA exposure (VPA group) and CBD-enriched *Cannabis* oil nanoemulsion treatment at the concentrations of 1 mg/animal (CBDON1) and 2 mg/animal (CBDON2) on autistic rats' exploratory activity and stereotype behavior (grooming). A Rearing up number in open field test. B Total distance traveled in open field test. C Grooming time in open field test. Each experimental group was compared with control (^a) and VPA group (^b) by one-way ANOVA followed by Tukey's test and considered significant when $p < 0.05$. (A). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.88$, CBDON2 $p = 0.31$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p < 0.05$). (B). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.01$, CBDON1 $p = 0.34$, CBDON2 $p = 0.56$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$,

CBDON2 $p < 0.05$). (C). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.50$, CBDON2 $p = 0.99$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.005$, CBDON2 $p = 0.06$).

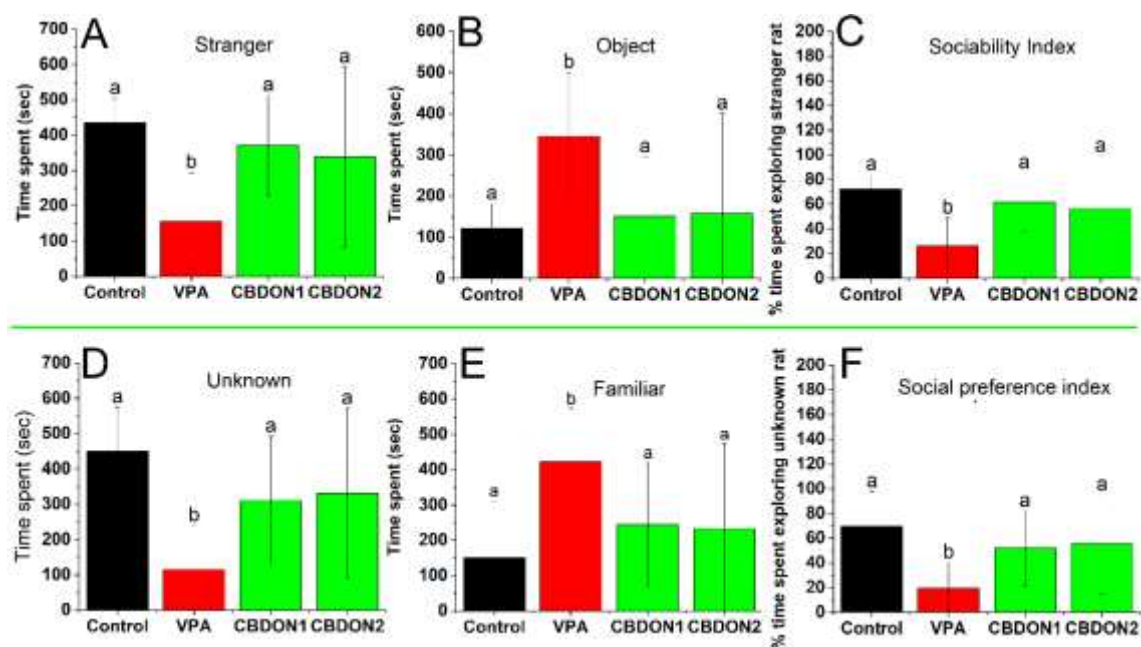


Figure 5. Effect of prenatal VPA exposure (VPA group) and CBD-enriched *Cannabis* oil nanoemulsion treatment at the concentrations of 1 mg/animal (CBDON1) and 2 mg/animal (CBDON2) on autistic rats' sociability index and social preference index. A, B Time spent with stranger rat and object on three chamber tests. C, D Time spent with novel rat (unknown) and familiar rat (stranger) on three chamber tests. E, F Sociability and social preference index. Each experimental group was compared with control (^a) and VPA group (^b) by one-way ANOVA followed by Tukey's test and considered significant when $p < 0.05$. (A). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.75$, CBDON2 $p = 0.47$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p < 0.05$). (B). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.005$, CBDON1 $p = 0.97$, CBDON2 $p = 0.94$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p < 0.05$). (C). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.75$,

CBDON2 $p = 0.47$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p < 0.05$).

(D). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.24$, CBDON2 $p = 0.37$) and against VPA group (CBDON1 $p < 0.05$, CBDON2 $p < 0.05$).

(E). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.005$, CBDON1 $p = 0.63$, CBDON2 $p = 0.72$) and against VPA group (CBDON1 $p = 0.12$, CBDON2 $p = 0.09$).

(F). Tukey post hoc test against control group (VPA $p < 0.05$, CBDON1 $p = 0.51$, CBDON2 $p = 0.67$) and against VPA group (CBDON1 $p = 0.06$, CBDON2 $p < 0.05$).

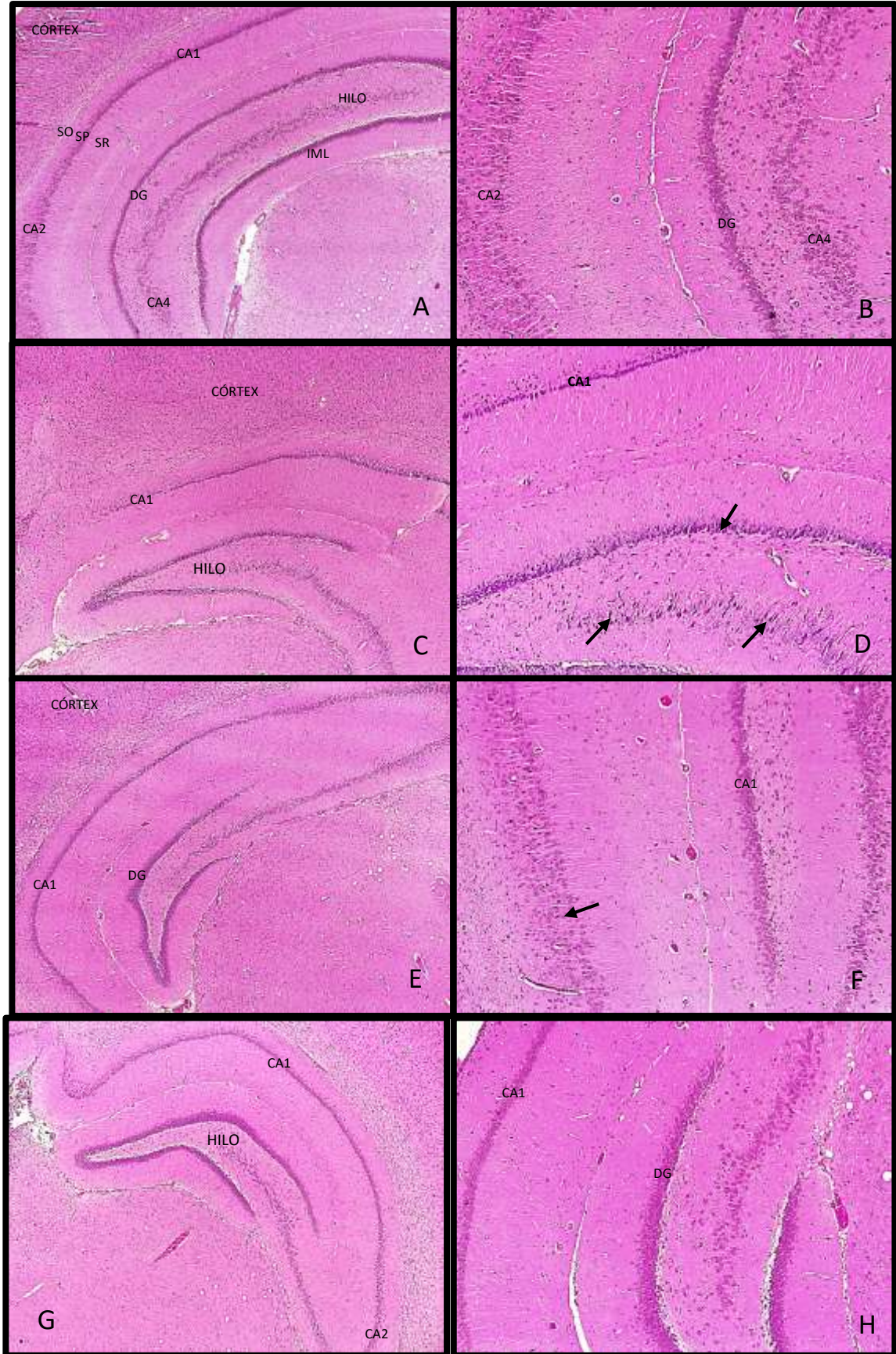


Figure 6. Representative photomicrographs from the hippocampus of control, VPA, CBDON1 and CBDON2 groups. Figure 5A and 5B: Photomicrograph of the hippocampal structure of the control group, which can be seen in the absence of neuronal death in all structures CA1, CA2, CA3, CA4, hilum, dentate gyrus (DG), internal molecular layer (IML), in addition to of the stratum pyramidale (SP), stratum oriens (SO) and stratum radiatum (SR). Figure 5C and 5D: VPA group, in which an intense reduction in the thickness of the CA1 cell layer can be observed and in some areas there is an absence of neuron bodies. Note intense necrosis of neuron bodies (arrow), mainly in the hilum area, dentate gyrus and CA1. Figure 5E and 5F: CBDON1 group, maintenance of hippocampus structures and intense reduction of neuronal necrosis can be observed. Figure 5G and 5H: CBDON2 group, note the maintenance of structures, as well as the presence of rare necrotic neurons.

CAPÍTULO 2

**CBD rich oil nanoemulsion treatment ameliorates morphometric changes of testis
and testosterone levels of rats exposed to valproic acid**

1 **CBD rich oil nanoemulsion treatment ameliorates morphometric changes of testis**
2 **and testosterone levels of rats exposed to valproic acid**

3

4 **Abstract**

5 Studies have shown the beneficial actions of cannabidiol in the treatment of many
6 diseases. However, due to its lipophilic nature, cannabidiol has a low oral bioavailability.
7 At the same time, other works described malefic effects associated with *Cannabis* use.
8 Valproic acid is a widely used antiepileptic drug that has been linked to fertility problems.
9 Hence, we investigated the effects of chronic administration of cannabidiol nanoemulsion
10 on morphology testis, as well as on testosterone levels of rats exposed to valproic acid.
11 Thirty days male Wistar rats born of females treated with valproic acid were used for the
12 study and were divided into control and treated groups. In the treated groups, 1 ml of
13 cannabidiol nanoemulsions in different concentrations was administered orally twice for
14 30 consecutive days. Testis were taken after rats eutanásia. Testis morphometry revealed
15 a significant reduction of Leydig cell number and testosterone levels, in valproic acid
16 exposed group. In the same way, the germinal epithelium was reduced and seminiferous
17 tubules diameter increased on valproic acid group. The antioxidant enzyme levels
18 superoxide dismutase and glutathione also were elevated. All these alterations were
19 reversed by treatment with cannabidiol nanoemulsion. These findings indicate a positive
20 effect of cannabidiol on male reproductive system.

21 **Keywords: Cannabinoids. Leydig cell. Nanotecnology. Morphometry.**

22

23

24 **1. Introduction**

25 The *Cannabis* plant has been used for many years due to its medical properties.
26 Many studies have shown the positive effect of *Cannabis* compounds in the treatment of
27 many diseases (Khalsa et al., 2021; Baswan et al., 2020; Zamberletti et al., 2019).
28 *Cannabis* contains several chemical components among them flavonoids, terpenoids,
29 alkaloids, and cannabinoids. The Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) is the first-most
30 abundant cannabinoid of the plant followed by cannabidiol (CBD) (Amin; Ali., 2019).
31 THC and CBD are the most-studied components of the *Cannabis* plant and have different
32 biological effects. THC is the major psychotropic compound of recreational *Cannabis*,
33 unlike CBD, that displays therapeutic applications (Parker et al., 2019). The cannabinoids
34 effects are mediated by the endocannabinoid system (ECS) modulation (Cristino et al.,
35 2020).

36 The ECS is composed of cannabinoid receptors, endocannabinoids (eCBs), and
37 the enzymes involved in the synthesis, degradation, and transport of the eCBs. ECS has
38 an important role in the modulation of numerous neurophysiological and immunological
39 processes in the body (Capodice; Kaplan, 2021). ECS components are also widely
40 expressed in the periphery organs, including the testis (Nielsen, 2019). The role of ECS
41 in the male reproductive system is emerging and the presence of complete enzymatic
42 machinery to synthesize and metabolize eCBs has been demonstrated in the male
43 reproductive tract (Sayed et al., 2021).

44 At the same time, the chronic use of *Cannabis* and exogenous administration of
45 THC are related to potent negative effects on rodents and human reproduction (Lee et al.,
46 2020; López-Cardona et al., 2018). Smoking marijuana can negatively affect male
47 reproductive potential by affecting the homeostasis of the ECS (Nassan et al., 2019; Du
48 Plessis et al., 2015).

49 Currently, there is a great interest in the potential medical use of CBD. Several
50 studies in humans and animals have shown that CBD has positive effects on various
51 neurological and inflammatory disorders (Urits et al., 2020). Despite the scientific
52 evidence supporting the therapeutic potential of CBD, the impact and effects of its long-
53 term use on the male reproductive system have not yet been fully elucidated.

54 Valproic acid (VPA) is the most used drug for the treatment of epilepsy and other
55 neurological and psychiatric disorders (Zhu et al., 2017). However, its use may be
56 compromised due to its potential adverse effects on the gastrointestinal, neurological,
57 hematological, and reproductive systems. The mechanism by which VPA exerts its
58 effects on reproduction are not completely understood (Zhao et al., 2018). Altered serum
59 sex hormone levels and oxidative stress with testis damage have been proposed (Conei et
60 al., 2021; Khan 2011).

61 Nanoemulsions are substance delivery systems that provide improved solubility
62 for poorly soluble drugs to improve their bioavailability (CHEN et al., 2020).
63 Cannabinoids are lipophilic and the absorption of these substances depends on the route
64 of administration. CBD has a low water solubility and consequent reduced oral
65 bioavailability (GASTON et al., 2017). Furthermore, it has low intestinal absorption and
66 extensive hepatic first-pass metabolism, which leads to unreliable pharmacokinetics
67 (KNAUB et al., 2019). The low aqueous solubility of therapeutic compounds reduces
68 their utilization percentage. Consequently, drug formulation must be accompanied by
69 systems that increase bioavailability, meeting the therapeutic window of efficacy.

70 Therefore, this study aimed to evaluate the effects of chronic treatment CBD oil
71 nanoemulsion on testis morphometry and testosterone levels in rats exposed to VPA.

72 **2.Materials and Methods**

73 *2.1. Preparation of nanoemulsions*

74 The experiments were performed at the *Universidade Federal Rural de*
75 *Pernambuco*, Brazil. The preparation of nanoemulsions was carried out according to
76 Santos et al. (2020) by the high-energy emulsification method. Oil/water nanoemulsions
77 were produced using an oil phase containing 10% (w/w) of sorbitan monooleate 80 (Span
78 80, Sigma, CAS number 1338438, lot# MKCK7756, EHL = 4.3) as a nonionic surfactant,
79 10% of CBDO (at the concentrations of 5, 10, and 20 mg/mL) or 10% of corn oil (without
80 CBD) mixed at 7 g for 5 min.

81 The aqueous phase was prepared using 10% of polysorbate 80 (Tween 80, Neon,
82 lot# 56538, EHL 15.0) as a nonionic surfactant and 70% water mixed at 7 g for 5 min. In
83 addition, 40 mg of propylparaben (Dinâmica, lot# 106924) in alcoholic solution, an
84 antimicrobial preservative, was added in the aqueous phase and mixed at 7 g for 5 min
85 for total ethanol evaporation. The oily phase was dripped into the aqueous phase under
86 magnetic stirring 7 g at room temperature (27 °C) and then, the mixture was kept stirring
87 at 60 g for 20 hours. Nanoemulsions were stored at room temperature and monitored for
88 2, 7, 15, and 30 days to the assessment of organoleptic characteristics (dispersion phase,
89 visual aspect, consistency, opacity, smell, and color) according to ANVISA guidelines
90 (ANVISA, 2004). Thermal stress and centrifugation (at 1210 g for 30 minutes -
91 Centrifuge Kacil CE-01) analyses were also carried out. For the animal experiments,
92 nanoemulsions were prepared biweekly, kept at room temperature, and protected from
93 light.

94 2.2. *Animals*

95 The animal experiments were approved by Ethics Committee on the Use of
96 Animals of UFRPE (License number #2881210120). Animals were provided from
97 *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal* at the same University. Adult Female
98 Wistar rats (n=10) were placed in collective polypropylene cages (5 per cage), at 22 ± 2

99 °C, and a 12-hour light/dark cycle. The water and food were supplied *ad libitum*. Females
100 were mated overnight. When spermatozoa were found in the vaginal smear was
101 considered as day 0.5 of pregnancy. A day 12.5, pregnant females (n = 8) received a single
102 dose of valproic acid (Sigma, CAS number 99661, lot# 1069665) intraperitoneally (500
103 mg/kg in 0.9% saline at a concentration of 250 mg/mL), and the remaining (n = 2)
104 received the same dose of saline in the same way (Control group). Males rats born from
105 valproic acid-treated female were randomly divided into three groups (n = 16 per group
106 x 3 = 48): VPA group, VPA group treated with 1 mL of 1% CBDON [1 mg/animal
107 (CBDON1)] and VPA group treated with 1 ml of 2% CBDON [2 mg/animal (CBDON2)].
108 Offspring from females that receive salina intraperitoneally formed the control group (n
109 = 16). The control and VPA groups were treated with empty nanoemulsions (corn oil) at
110 a dose of 1 mL/animal. The nanoemulsions were administered by gavage for the animals
111 from postnatal day 30 twice a day for 60 days.

112 2.3. Material collection and light microscopy

113 Euthanasia occurred after intraperitoneal administration of ketamine (60 mg/kg)
114 and xylazine (20mg/kg), blood was collected by caudal vena cava the testis were
115 collected. Testis were dissected, weighed and fixed by immersion in Karnovsky (4%
116 Glutaraldehyde + 2.5% paraformaldehyde in 0.01M sodium cacodylate buffer, pH7.4)
117 (Karnovsky 1965) and destined for histomorphometric and pathological evaluation.

118 The material was dehydrated in an increasing series of ethanol and embedded
119 in methacrylate (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Semi-serial
120 sections of 3 µm were obtained using a rotating microtome (RM 2255, Leica Biosystems,
121 Nussloch, Germany), respecting the interval of at least 39 µm between sections.
122 Histological preparations were stained with toluidine blue + sodium borate (1%). For the
123 morphometric analysis, images captured in a bright field photomicroscope (Olympus BX

124 -53, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan)
125 were used. All images were analyzed using the Image J® program (National Institute of
126 Health, USA).

127 *2.4. Body and testis biometry*

128 The material was dehydrated in an increasing series of ethanol and embedded
129 in methacrylate (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Semi-serial
130 sections of 3 µm were obtained using a rotating microtome (RM 2255, Leica Biosystems,
131 Nussloch, Germany), respecting the interval of at least 39 µm between sections.
132 Histological preparations were stained with toluidine blue + sodium borate (1%). For the
133 morphometric analyses, images captured in a brightfield photomicroscope were used
134 (OlympThe testes were weighed on a precision balance (BEL Mark 160/0.0001g). To
135 determine the weight of the testis parenchyma, the albuginea was removed and weighed,
136 discounting weight from that obtained for the entire testis. Based on body and testis
137 weights, the gonadosomatic index (GSI) was calculated by dividing testis weight by body
138 weight and multiplied by 100 (Amann 1970).The parenchymosomatic index (SPI) was
139 determined by division of the testis parenchyma weight by the body weight and multiplied
140 by 100. The parenchyma weight being obtained by the testis weight subtracted by the
141 weight of the albuginea.us BX -53, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera
142 (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). All images were analyzed using the Image J®
143 program.

144 *2.5. Morphometric analysis of the testis*

145 *2.5.1. Tubular compartment*

146 The volumetric proportion of seminiferous tubules was estimated from counting
147 266 points in 10 random fields, totaling 2,660 points for each animal, the results were
148 expressed as a percentage. The volume (ml) of each testis component was estimated

149 considering the percentage occupied by each component multiplied by the volume of the
150 testis parenchyma. As the density of the mammalian testis is around 1 (Johnson et al.
151 1981; Tae et al. 2005), testis mass was considered equal to its volume. The tubulosomatic
152 index (ITS) was calculated by dividing the seminiferous tubule volume by the body
153 weight multiplied by 100 (Amann 1970). The epitheliosomatic index (IES) was obtained
154 by dividing the volume of the seminiferous epithelium divided by the body weight
155 multiplied by 100. The mean tubular diameter per animal was obtained from the
156 measurement, at random, of 20 cross-sections of seminiferous tubules that presented the
157 contour of the circular as possible, without considering the phase of the epithelium within
158 the cycle (França and Cardoso 1998). In the same sections used to measure the tubular
159 diameter, the height of the seminiferous epithelium was measured.

160 The total length of the seminiferous tubules in meters was estimated from the
161 knowledge of the volume occupied by them (VTS) in both testes and the mean tubular
162 diameter (πR^2) obtained for each animal (Attal, 1963; Dorst, 1974). The total tubule
163 length per gram of testis was calculated from the formula: CTS/g = Total tubule
164 length/Gross testis weight (g).

165 *2.5.2 Intertubular compartment*

166 Leydig cells differentiated between nucleus and cytoplasm, connective tissue
167 cells and fibers, macrophages, blood and lymphatic vessels were investigated, obtaining
168 the volumetric proportions between these components. For this, 1000 points projected on
169 images captured from the intertubule region were recorded, in the different histological
170 sections of the testis of each animal, using a 40X objective. The volume of each
171 intertubule component per testis, expressed in ml, was estimated by multiplying the
172 percentage occupied by them in the testes multiplied by the parenchyma weight of a testis
173 and divided by 100. Calculation of the percentage occupied by the intertubule elements

174 in the testes was obtained by multiplying the volumetric ratio of intertubule by the
175 volumetric ratio of element/100 (Dias et al. 2020).

176 The mean nuclear diameter of Leydig cells was measured using a 40X objective.
177 Thirty Leydig cell nuclei were measured in each animal. The nuclear, cytoplasmic and
178 volumes (μm^3) of each Leydig cell per animal were calculated using the following
179 formulas: Nuclear volume = $\frac{4}{3} \pi R^3$, where R = nuclear radius Cytoplasmic volume = %
180 cytoplasm X nuclear volume / % nucleus Cell volume = nuclear volume + cytoplasmic
181 volume. Calculations of the number of Leydig cells per testis and per gram of testis were
182 performed using the following formulas: Number of Leydig cells per testis = volume that
183 the Leydig cell occupies per testis (μm^3) / volume of a Leydig cell (μm^3) Number of
184 Leydig cells per gram of testis = volume that the Leydig cell occupies per gram of testis
185 (μm^3) / volume of a Leydig cell (μm^3) Where: volume that the Leydig cell occupies per
186 testis = proportion of Leydig cell in the testis X parenchyma weight of one testis / 100.
187 The volume that the Leydig cell occupies per gram of testis = volume that the Leydig cell
188 occupies per testis / gross weight of a testis The Leydigosomatic index (ILS) is a
189 parameter that aims to quantify the investment, in Leydig cells, in relation to body weight,
190 being calculated through the formula: ILS = volume that the Leydig cell occupies in the
191 testes / BW x 100, where BW=body weight (Dias et al. al. 2020).

192 2.6. Oxidative Stress

193 After euthanasia, the right testicle was promptly harvested, weighed, and
194 immediately frozen in liquid nitrogen, being stored at -80°C until use. Samples were
195 homogenized in potassium phosphate buffer (pH 7.4, 0.2M) containing 1M EDTA, using
196 a homogenizer (OMNI) and centrifuged ($13,800 \times g$ at 4°C for 10 min). The supernatant
197 was used to obtain the concentrations of the antioxidant enzymes superoxide dismutase
198 (SOD), catalase (CAT), and glutathione-S-transferase (GST), as well as the levels of nitric

199 oxide (NO), and malondialdehyde (MDA), along with total protein concentration. The
200 biochemical data were normalized in relation to total protein levels in the supernatant.
201 The analyses were performed in duplicate. All enzyme activities were determined by
202 duplicate using a spectrophotometer (UV-Mini 1240, Shimadzu) or an ELISA reader
203 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

204 NO production was determined indirectly through the nitrite/nitrate content by the
205 standard Griess reaction (Ricart-Jané et al. 2002). H₂O₂ production was determined
206 according to Oliveira (Siddiqui et al. 2005). CAT activity was evaluated by measuring
207 the decomposition rate of H₂O₂ (Aebi 1984), SOD activity was determined in accordance
208 to Siddiqui et al (2005) protocol, and GST through the formation of 1-chloro-2,4-
209 dinitrobenzene (CDNB) conjugate (Habig et al., 1974). MDA levels were measured
210 according to the protocol reported by Gutteridge and Halliwell (Gutteridge and Halliwell
211 1990). Protein oxidation was also analyzed by the quantification of protein carbonyls in
212 liver tissue pellets using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) method (Levine et al.
213 1990). The total protein concentration was measured by Lowry method (Lowry et al.
214 1951) and used for the homogenization of the stress data.

215 *2.7 Determination of total antioxidant capacity (FRAP)*

216 The total antioxidant capacity was estimated according to the ferric reducing
217 capacity of plasma (FRAP) with the method described by Benzie and Strain, (1996) using
218 TPTZ (2, 4, 6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) as a substrate.

219 *2.8 Hormone determination*

220 The hormone Testosterone was determined using commercial enzyme
221 immunoassay (EIA) kits following supplier protocol (USA diagnostics). The samples
222 were run in duplicates. In order to validate the results, a serial dilution of the samples was
223 performed.

224 2.9 Statistical analysis

225 The results were submitted to a normality test (Shapiro-Wilk). The data were
226 submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Student Newman-Keuls test.
227 Statistical analysis was performed using the SPSS software package for Windows (SPSS,
228 Chicago, IL) and the results were reported as mean \pm standard deviation of the mean.
229 Statistical significance was set at $p < 0.05$.

230 The principal component analysis (PCA) was performed to verify possible
231 clusters, eliminate redundancies and define the most important variables during the
232 separation of groups. For that, data were transformed (ranging) for standardization due to
233 different scale magnitudes. The level of importance of each variable was determined by
234 eigenvector values (McGarigal *et al.*, 2000), with substantial correlation values
235 determined for each attribute in relation to principal components (PC) 1 and 2. The level
236 of importance of each PC was determined by the Broken-stick method, where eigenvalues
237 exceeding the expected values were kept for interpretation. Analyses were performed
238 using the Fitopac 2.1.2.85 software (Shepherd, 2010).

239 3. Results

240 3.1. Biometry

241 Biometric and testis parameters are shown in Table 1. Valproic acid reduced
242 body weight (BW) and increased testis weight (PT) and albuginea weight (PA), as well
243 as parenchymosomatic (PSI) and gonadosomatic (GSI) indices of the test. There were no
244 changes related to these parameters in the groups treated with CBDON 1 and 2.

245 3.2. Tubular components

246 The VPA group presented an increased seminiferous tubule (DT) diameter. It
247 was not related to the increase in the epithelium, but to the increase in the diameter and
248 percentage of the lumen. The length of the seminiferous tubule was also increased by

249 valproic acid (CTS). The height and percentage of the epithelium, in turn, was reduced in
250 the VPA group and remained at values significantly close to the control in the groups
251 treated with CBDON at both doses. Seminiferous tubule area (STAr) and lumen area
252 (Lar) increased in the VPA group and this increase was reflected in the proportion of
253 tubular epithelium (TER) (Table 2 and 3). With reduced epithelium height and increased
254 tubular diameter, there was an increase in tubule-epithelium ratio in the VPA group,
255 which was also reversed with CBDON treatment. The reduction in the height of the
256 epithelium in the VPA group also generated a reduction in the epithelial percentage and
257 an increase in the percentage of lumen. Valproic acid also increased the volume of the
258 tunica propria, the epithelial-somatic index (ESI) and the tubulosomatic index (TSI), with
259 such alterations being absent in the groups treated with CBDON at both doses (Table 3).

260 *3.3. Intertubular components*

261 In the evaluation of the intertubule, the proportion of the nucleus of Leydig cells,
262 as well as the number of Leydig cells per gram of testis were reduced with valproic acid.
263 However, there was an increase in the proportion of cytoplasm and this increase was
264 reflected in an increase in individual Leydig cell volume, as well as in the increase in
265 Leydig cell volume per testis, intertubule volume and somatic intertubule index (Table
266 4). Associated with this, valproic acid increased leydigomatic index (Table 5). CBDON2
267 treatment increased Leydig cytoplasm volume, while CBDON1 reduced nucleus volume.

268 *3.4. Hormone determination*

269 The levels of testosterone were significantly decreased in animals rats exposed to
270 valproic acid during pregnancy compared to the controls (Figure 4). Treatment with CBD
271 nanoemulsions rescued the reduction promoted by VPA.

272 *3.5. Oxidative stress*

273 Oxidative stress is a response to the imbalance between cellular antioxidant
 274 capacity and species production (oxygen and nitrogen), leading to damage to
 275 macromolecules such as lipids, proteins and DNA. Although no increase in nitric oxide
 276 and catalase was observed in the VPA group, which mischaracterizes oxidative stress,
 277 valproic acid promoted increased levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione
 278 (GST), important antioxidant enzymes (Figure 3). The animals treated with CBDON1
 279 showed no changes in the levels of these enzymes.

280 *3.6. Principal component analysis*

281 The total variance of the data was 89.21%, with the most important attributes of
 282 the group having correlation values > 0.6 (Figure 6). For PC1 (horizontal axis), the most
 283 relevant attributes and their correlation values were P. gonads (g) (0.1689); P. albuginea
 284 2T (g) (0.1653); P. Par. 2T (g) (0.1688); IGS (%) (0.1678); Epithelium height (-0.1677);
 285 tubule diameter (μm) (0.1234); Lume Diameter (μm) (0.1622); %tubule (0.1391); %
 286 epithelium (-0.1595); % tunic (-0.1450); % lumen (0.1542); vol. tubule (mL) (0.1687);
 287 vol. Epithelium (mL) (0.1690); vol. Tunic (mL) (0.1685); vol. Lumen (mL) (0.1657); ITS
 288 (%) (0.1682); CTT (m) (0.1672); CTT/g test. (-0.1069); IES (0.1670); IPS (0.1679);
 289 tubule area (0.1486); lumen area (0.1646); epithelium area (0.1242); tubule/epithelial
 290 ratio (0.1658); %intertubule (-0.1391);Vol. intertubule (ml) (0.1663); %VS(Ts) (-
 291 0.1314); % CL (Ts) (-0.1102); % leydig (Ts) (-0.1208); % MAC (Ts) (-0.1083); D.
 292 Leydig(μm) (0.1053); Vol.Ley/Ts (ml)(0.1611); Vol.Ley/gT (ml) (-0.1228); ILS
 293 (%) (0.1472); IIS (0.1538); vol. (EL mL)Ts (0.1185); vol. (Nuc Ley mL) Ts (0.1434); vol.
 294 (Cit Ley mL) Ts (0.1564); vol. (Ley mL) Ts (0.1611); vol. (TC mL) Ts (0.0702); SOD
 295 (0.1621); MDA (-0.1486). The separation of treatments from the control was evidenced
 296 by changes in tubular and intertubular parameters as well as SOD and MDA.

297 In PC2 (vertical axis), the parameters responsible for separating the treatments
298 were PC(g) (-0.1754); tubule diameter(μm)(0.1703);CTT/g test.(-0.1900); % NL(Ts) (-
299 0.2138); % CL (Ts)(0.1821); %leydig (Ts)(0.1617);% MAC (Ts)(0.1925);
300 Vol.nuc.leyd(μm^3) (0.1677); Vol.cyto.ley(μm^3)(0.2501); Vol.cel.leydig(μm^3)(0.2451);
301 Vol.Ley/gT (ml)(0.1522); N ley/Ts (-0.2093); N ley/gT (-0.2222); vol. (VS mL) Ts
302 (0.2434); vol. (TC mL) Ts (-0.2212); vol. (MAC mL)Ts (0.1567); FRAP (0.1973); NO
303 (0.2192); GST (0.1522). The separation of the treated groups was evident in the graph,
304 this difference was due to changes in Leydig cells, total antioxidant activity, nitric oxide
305 and macrophage.

306 The PCA showed 4 different data groups: a first with a control close to the CBD-
307 treated groups and separate from these three groups the groups that had induced autism
308 without any treatment (Figure 5).

309 **4. Discussion**

310 The results of the present study show that CBDON treatment ameliorates
311 negative modifier of male reproductive system promoted to VPA prenatal exposure in
312 rats. VPA treatment resulted into a reduction in the body weight and increase in testis
313 weight. Reduction in the body weight by VPA treatment may be due to the gastrointestinal
314 (GI) disturbances such as dysbiosis, which are already reported in animals born to females
315 treated with VPA in the prenatal period models of valproic acid-induced autism, as well
316 as in clinical trials with children (KONG et al., 2021; SRIKANTHA; MOHAJERI, 2019).
317 dysbiosis can lead to a decrease in the ability of the intestine to absorb nutrients
318 (TAKAKURA; PIMENTEL, 2020). In contrast, it has been reported that VPA treatment
319 increases the body weight in humans particularly in the woman who are on VPA therapy
320 (EL-KHATIB et al., 2007). The increase in testis weight can be attributed to the increase
321 in the intertubule, associated with the increase in the tubular lumen, which may be

322 associated with increased secretory activity of Sertoli cells. CBDON treatment at both
323 doses reversed these effects.

324 Previous work has shown that treatment with VPA causes degeneration and
325 atrophy of the seminiferous tubules (HAMED et al, 2015; NISHIMURA et al, 2000;
326 SUKHORUM et al, 2016) as well as total loss of the germinal epithelium (HAMED et al,
327 2015). In the present work, tubule diameter increased (SUKHORUM et al, 2016) in the
328 VPA group. However, this increase is not related to the epithelium, but to the diameter
329 and percentage of lumen. The epithelial reduction is influenced by the luminal increase,
330 but the treatment with VPA caused an increase in the lumen, for this reason the
331 differences between epithelium height and lumen diameter were not complementary,
332 increasing the diameter tubular and and the tubule-epithelium relation.

333 Khan et al. (2011) showed that chronic treatment (10 to 28 days) with VPA
334 induced morphological changes such as a reduction in the number and diameter of the
335 seminiferous tubule of Swiss mice, which does not corroborate our findings. However,
336 these effects may be delayed, since they were dose dependent and the animals were
337 treated for a long period. CBDON treatment reversed these tubular changes. Greco et al.
338 (2021) reported that the use of cannabinoids has deleterious effects on the germinal
339 epithelium. In fact they demonstrated that exposure to these substances generates tubular
340 deformation and degeneration, shrunken seminiferous tubules, and increased luminal
341 diameter. Nonetheless, these effects are related to THC and not CBD.

342 Valproic acid caused morphological changes in Leydig cells of male rats
343 exposed to this compound during the gestational period. In the intertubular components
344 analysis, the proportion of the nucleus of Leydig cells and the number of Leydig cells per
345 gram of testis were increased by the VPA. On the other hand, there was an increase in the
346 proportion of Leydig cytoplasm. This last effect generated an increase in individual

347 volume, as well as in the volume of Leydig cells per testis, intertubule volume and somatic
348 intertubule index. These changes may be related to a compensatory mechanism to reverse
349 the reduction in testosterone levels related to the reduction in the number of Leydig cells.

350 Indeed, testosterone levels confirm the suppression of functional capacity of
351 these cells. It has been reported that long-term VPA treatment decreases serum
352 concentration of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)
353 (TALLON et al., 2021). In contrast, Roste et al. (2002) reported that male Wistar rats
354 treated with VPA daily, twice daily for a period of 90 days, showed a statistically
355 significant increase in LH and FHS levels, which therefore may be related to a reduction
356 in negative feedback on testosterone-mediated pituitary gland. Adiccionally, another
357 study showed a reduction of testosterone levels of VPA-treated male mice (CHO et al.,
358 2020). At the same time, the same study displayed an increase of 5α -reductase activity as
359 well as dihydrotestosterone levels.

360 The treatment of CBDON reversed the reduction in testosterone levels observed
361 in animals exposed to valproic acid. In fact, mice and rat Leydig cells express CB1
362 (WENGER et al., 2001; JAKUBOVIC et al., 1979). Moreover, cannabinoids and
363 endocannabinoid system have been suggested to modulate the Leydig cells LH
364 responsiveness. Carvalho et al. (2020) showed a negative effect of CBD in testis
365 morphometry and testosterone levels. However, we must consider that these studies used
366 much higher doses of CBD, while in the present study, a reduced dose was used and, in
367 order to promote greater and better absorption and bioavailability, CBD oil was
368 incorporated into a nanoemulsion.

369 In our study, valproic acid increased the levels of the antioxidant enzymes SOD
370 and GST. SOD is the enzyme that catalyzes the dismutation reaction of superperoxide
371 into oxygen and less reactive hydrogen peroxide (H_2O_2), while GST catalyzes the removal

372 of H₂O₂. Thus, despite the apparent absence of oxidative stress, since malondialdehyde
373 and nitric oxide did not change, the increase in the activity of both enzymes may be related
374 to an attempt to control some local tissue damage that could be occurring, preventing
375 imbalances, such as excess H₂O₂, which would lead to oxidative stress and, therefore, to
376 cell death (GARCIMARTÍNA et al., 2017). However, in contrast to our study, Tabatabaei
377 et al. (1999) reported that VPA increased clearance of selenium, copper and zinc which
378 are cofactors of GST. In addition, oxidative stress has also been reported to be one of the
379 factors responsible for testis changes caused by VPA treatment (OURIQUE et al., 2016;
380 CONEI et al., 2021). The treatment with CBDON1 did not change the levels of SOD and
381 GST, that is, it was not necessary to increase the antioxidant activity, since CBDON1
382 probably avoided possible tissue damage.

383 There is growing concern about the possible adverse effects generated by VPA
384 on reproductive and endocrine functions, corroborating the present investigation
385 (KROGENAES et al., 2008). CBD nanoemulsion treatment reversed these effects. This
386 have important implications since exogenous cannabinoids has been describe as negative
387 modulators of male reproductive system. However, it is important to note that such
388 negative effects are associated with smoking or others compounds found in *Cannabis*.

389 **5. Conclusion**

390 In conclusion, our study showed a preclinical evidence of the benefic effect of
391 CBD chronic treatment on testis injuries following prenatal VPA exposure in the male
392 rats. CBD nanoemulsions were able to mitigate the testis morphological damaged and
393 revert the decrease levels of testosterone caused by VPA. It is suggested that this effect
394 may be mediated in part by reduction in oxidative stress mediated by CBD. Thus, the
395 present study display for the first time the positive effect of CBD on male reproductive
396 system, since cannabinoids have been associated with deleterious effects on this system.

397 **References**

- 398 AMANN, RP. "The Male Rabbit. IV. Quantitative Testis Histology and Comparisons
399 between Daily Sperm Production as Determined Histologically and Daily Sperm
400 Output." **Fertil Steril** 21: 662–72, 1970.
- 401 ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004.
- 402 ATTAL J, COURT M. "Développement Testiculaire et Établissement de La
403 Spermatogenèses Chez Le Taureau." **Ann Biol Anim Biochim Biophys** 3: 219–
404 41, 1963.
- 405 BASWAN, S. M. et al. Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and
406 Disorders. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 927–
407 942, 2020.
- 408 BELLADELLI, F. et al. The association between cannabis use and testis function in men:
409 A systematic review and meta-analysis. **Andrology**, v. 9, n. 2, p. 503–510, 15 dez.
410 2020.
- 411 CARVALHO, R. K. et al. Chronic cannabidiol exposure promotes functional impairment
412 in sexual behavior and fertility of male mice. **Reproductive Toxicology**, v. 81, p.
413 34–40, out. 2019.
- 414 CARVALHO, R. K. et al. Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive
415 toxicity in male Swiss mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 9, p. 1215–
416 1223, 16 maio 2018.
- 417 CACCIOLA, G. et al. Expression of Type-1 Cannabinoid Receptor During Rat
418 Postnatal Testis Development: Possible Involvement in Adult Leydig Cell
419 Differentiation1. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 4, p. 758–765, 1 out. 2008.

- 420 COBELLIS, G. et al. Endocannabinoid System in Frog and Rodent Testis: Type-1
421 Cannabinoid Receptor and Fatty Acid Amide Hydrolase Activity in Male Germ
422 Cells1. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 1, p. 82–89, 1 jul. 2006.
- 423 CRISTINO, L. et al. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and
424 vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse
425 brain. **Neuroscience**, v. 139, n. 4, p. 1405–1415, jan. 2006.
- 426 DIAS, F.C.R., GOMES, M.L.M., MELO, F.C.S.A.; MENEZES, T.P., MARTINS
427 A.L.P.; CUPERTINO, M.C.; OTONI, W.C.; MATTA, S.L.P. “Pfaffia Glomerata
428 Hydroalcoholic Extract Stimulates Penile Tissue in Adult Swiss Mice Pfaffia
429 Glomerata Hydroalcoholic Extract Stimulates Penile Tissue in Adult Swiss Mice.”
430 **Journal of Ethnopharmacology**, 261 (August): 113182, 2020.
431 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113182>.
- 432 DORST VJ, SAJONSKI H. “Morphometrische Untersuchungen Am Tubulussystem
433 Des Schweinehodens Während Der Postnatalen Entwicklug.” **Monatsh Ver Med**,
434 no. 29: 650–52, 1974.
- 435 DU PLESSIS, S. S.; AGARWAL, A.; SYRIAC, A. Marijuana, phytocannabinoids, the
436 endocannabinoid system, and male fertility. **Journal of Assisted Reproduction
437 and Genetics**, v. 32, n. 11, p. 1575–1588, 16 ago. 2015.
- 438 EL-KHATIB F, RAUCHENZAUNER M, LECHLEITNER M, HOPPICHLER F,
439 NASER A, WALDMANN M, et al. Valproate, weight gain and carbohydrate
440 craving: a gender study. **Seizure**, 16:226–32, 2007.
- 441 FRANCAVILLA, F. et al. Characterization of the Endocannabinoid System in Human
442 Spermatozoa and Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1
443 Receptor in Their Fertilizing Ability. **Endocrinology**, v. 150, n. 10, p. 4692–
444 4700, 6 jul. 2009.

- 445 FRANÇA, L. R., and F. M. CARDOSO. Duration of Spermatogenesis and Sperm
446 Transit Time through the Epididymis in the Piau Boar. **Tissue and Cell**, 30 (5):
447 573–82, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(98\)80038-4](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(98)80038-4).
- 448 GAMMON, C. M. et al. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by
449 Cannabinoids. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4491–4499, out. 2005.
- 450 GRATZKE, C. et al. Localization and Function of Cannabinoid Receptors in the Corpus
451 Cavernosum: Basis for Modulation of Nitric Oxide Synthase Nerve
452 Activity. **European Urology**, v. 57, n. 2, p. 342–349, fev. 2010.
- 453 HUESTIS, M. A. et al. Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. **Current**
454 **Neuropharmacology**, v. 17, n. 10, p. 974–989, 2019.
- 455 JAKUBOVIC, A.; MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Effects of cannabinoids on
456 testosterone and protein synthesis in rat testis leydig cells in vitro. **Molecular and**
457 **Cellular Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 41–50, jul. 1979.
- 458 JOHNSON, L., C.S. PETTY, and W.B. NEAVES. A New Approach to Quantification
459 of Spermatogenesis and Its Application to Germinal Cell Attrition during Human
460 Spermogenesis. **Biol Reprod** 25: 217–26, 1981.
- 461 KARNOVSKY, M. J. 1965. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of Righ
462 Osmolality for Use in Electron Microscopy. **J. Cell Biol.** 27 (15): 137.
- 463 KHALSA, J. H. et al. COVID-19 and Cannabidiol (CBD). **Journal of Addiction**
464 **Medicine**, v. Publish Ahead of Print, 14 dez. 2020.
- 465 KROGENAES AK, TAUBOLL E, STIEN A, OSKAM IC, LYCHE JL, DAHL E, et al.
466 Valproate affects reproductive endocrine function, testis diameter and some semen
467 variables in non-epileptic adolescent goat bucks. **Theriogenology**. 70:15–26, 2008.
- 468 LEE, M. S. et al. Delta-9 THC can be detected and quantified in the semen of men who
469 are chronic users of inhaled cannabis. **Journal of Assisted Reproduction and**

- 470 **Genetics**, v. 37, n. 6, p. 1497–1504, 30 abr. 2020.
- 471 LEHMANN, K.; STEINECKE, A.; BOLZ, J. GABA through the Ages: Regulation of
472 Cortical Function and Plasticity by Inhibitory Interneurons. **Neural Plasticity**, v.
473 2012, p. 1–11, 2012.
- 474 LÓPEZ-CARDONA, A. P. et al. Effect of chronic THC administration in the
475 reproductive organs of male mice, spermatozoa and in vitro
476 fertilization. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, p. 294–303, 1 nov. 2018.
- 477 MCGARIGAL, K., S. CUSHMAN, and S. STAFFORD. Multivariate Statistic for
478 Wildlife and Ecology Research. **The Quarterly Review of Biology**, 76 (3): 283,
479 2000. <https://doi.org/10.1086/657098>.
- 480 NASSAN, F. L. et al. Marijuana smoking and markers of testis function among men from
481 a fertility centre. **Human Reproduction**, v. 34, n. 4, p. 715–723, 6 fev. 2019.
- 482 SAYED, T. S.; BALASINOR, N. H.; NISHI, K. Diverse role of endocannabinoid
483 system in mammalian male reproduction. **Life Sciences**, v. 286, p. 120035, dez.
484 2021.
- 485 SHEPHERD, G. J. **Fitopac 2.1.2.85. Manual Do Usuário 1** (versão 1): 5, 2010.
486 <http://pedroisenlohr.webnode.com.br/fitopac/>.
- 487 TAE, H.J., JANG, B.G., AHN, D.C., CHOI, E.Y., KANG, H.S., KIM, N.S., LEE, J.H.,
488 PARK, S.Y., YANG, H.H., AND I.S. KIM. “Morphometric Studies on the Testis
489 of Korean Ring-Necked Pheasant (*Phasianus 56 Colchicus Karpowi*) during the
490 Breeding and Non-Breeding Seasons.” **Veterinary Research Communications**,
491 no. 7: 629–43, 2005.
- 492 TODMAN, M. G.; HAN, S. K.; HERBISON, A. E. Profiling neurotransmitter receptor
493 expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green

494 fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. **Neuroscience**, v. 132,
495 n. 3, p. 703–712, jan. 2005.

496 ÜCKERT, S. et al. Expression and distribution of key proteins of the endocannabinoid
497 system in the human seminal vesicles. **Andrologia**, v. 50, n. 2, p. e12875, 8 ago.
498 2017.

499 WENGER; FERNÁNDEZ-RUIZ; RAMOS. Immunocytochemical Demonstration of
500 CB1 Cannabinoid Receptors in the Anterior Lobe of the Pituitary Gland. **Journal**
501 **of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 11, p. 873–878, 24 dez. 2001.

502 WENGER, T. et al. The Central Cannabinoid Receptor Inactivation Suppresses
503 Endocrine Reproductive Functions. **Biochemical and Biophysical Research**
504 **Communications**, v. 284, n. 2, p. 363–368, jun. 2001.

505 WITTMANN, G. et al. Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-
506 Immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. **The Journal of Comparative**
507 **Neurology**, v. 503, n. 2, p. 270–279, 2007.

508

509

510

511

512

513

514

Tables

Table 1. Testis and biometric parameters of adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with cannabinoids in the postnatal period.

	Control	VPA	CBDON 1%	CBDON 2%
BW (g)	379.25±9,18 ^a	293,00±4,97 ^b	277,50±30,13 ^b	319,50±8,06 ^c
TW (g)	3,26±0,14 ^a	6,82±0,74 ^b	3,96±1,58 ^a	3,05±0,18 ^a
AW (g)	0,31±0,11 ^a	0,67±0,18 ^b	0,40±0,15 ^a	0,38±0,06 ^a
PW (g)	2,95±0,14 ^a	6,15±0,73 ^b	3,56±1,47 ^a	2,68±0,16 ^a
GSI (%)	0,86±0,05 ^a	2,33±0,26 ^b	1,44±0,58 ^a	0,96±0,04 ^a
PSI (%)	0,78±0,04 ^a	2,10±0,25 ^b	1,29±0,54 ^a	0,84±0,04 ^a

BW - body weight; TW – testis weight; AW – albugínea weight; PW – parenchyma weight. GSI – gonadosomatic index; PSI – parenchymosomatic index. Data are reported as mean ± standard deviation of the mean (n=6). Different letters between treatments differ significantly at p<0.05 (Student Newman Keuls test).

Table 2: Tubular morphometry of adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with cannabinoids in the postnatal period.

	Control	VPA	CBDON 1%	CBDON 2%
TD (µm)	234,70±5,53 ^a	251,59±8,88 ^b	244,85±9,23 ^a	246,17±14,20 ^a
EH (µm)	88,19±5,27 ^a	78,98±2,96 ^b	84,76±2,91 ^a	88,77±2,95 ^a
LD (µm)	59,97±13,57 ^a	93,62±4,80 ^b	75,33±6,41 ^a	68,63±8,72 ^a
STL (m)	62,28±4,74 ^a	112,56±24,40 ^b	69,31±28,77 ^a	51,59±6,11 ^a
STL/g (m/g)	19,11±1,31 ^a	16,41±2,28 ^a	17,48±1,49 ^a	16,92±2,20 ^a
STAr (µm²x10⁴)	43874,38±2370,5 ^a	52095,16±5836,55 ^a	47114,03±3592,60 ^a	47688,16±5378,13 ^a
LAr (µm²x10⁴)	2931,33±1400,82 ^a	6707,21±811,40 ^a	4478,61±755,47 ^a	3742,14±918,79 ^a
EAr (µm²x10⁴)	40943,05±1845,10 ^a	45387,95±5866,93 ^b	42635,42±3036,38 ^a	43946,02±4486,27 ^a
TER	1,07±0,03 ^a	1,15±0,03 ^b	1,10±0,01 ^a	1,08±0,01 ^a

TD – tubular diameter; EH – epithelium height; LD – lumen diameter; STL – seminiferous tubules length; STL/g - seminiferous tubules length per gram of testis; STAr- seminiferous tubule area; Lar- lumen area; EAr – epithelium área; TER – tubule epithelium ratio. Data are reported as mean ± standard deviation of the mean (n=6). Different letters between treatments differ significantly at p<0.05 (Student Newman Keuls test).

Table 3: Volumetric density and volumes of tubular components of adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with CBD nanoemulsions in the postnatal period.

	Control	VPA	CBDON 1%	CBDON 2%
ST (%)	92,52±0,75 ^a	93,79±0,35 ^a	91,60±1,00 ^a	91,13±1,03 ^a
EP (%)	80,32±1,60 ^a	76,69±1,46 ^b	80,91±0,51 ^a	81,61±1,20 ^a
TP (%)	1,55±0,29 ^a	1,30±0,13 ^b	1,51±0,24 ^a	1,81±0,09 ^a
L (%)	10,64±0,57 ^a	15,80±1,23 ^b	9,17±1,13 ^c	7,71±0,25 ^d
ST (ml)	2,73±0,15 ^a	5,77±0,69 ^b	3,27±1,37 ^a	2,44±0,15 ^a
EP (ml)	2,37±0,15 ^a	4,72±0,59 ^b	2,88±1,19 ^a	2,18±0,14 ^a
TP(ml)	0,05±0,01 ^a	0,08±0,01 ^b	0,06±0,03 ^a	0,05±0,01 ^a
L (ml)	0,31±0,01 ^a	0,97±0,11 ^b	0,33±0,16 ^a	0,21±0,01 ^a
TSI (%)	0,72±0,05 ^a	1,97±0,24 ^b	1,19±0,50 ^a	0,76±0,04 ^a
ESI (%)	0,62±0,05 ^a	1,61±0,20 ^b	1,05±0,44 ^a	0,68±0,03 ^a

ST– volumetric density of seminiferous tubules; EP – volumetric density of seminiferous epithelium; TP – volumetric density of tunica propria; L – volumetric density of lumen; STV – seminiferous tubules volume; TSI – tubulesomatic index; ESI – epithelium-somatic index; Data are reported as mean ± standard deviation of the mean (n=6). Different letters between treatments differ significantly at p<0.05 (Student Newman Keuls test).

Table 4: Percentage and volume of intertubule components of adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with CBD nanoemulsions in the postnatal period.

	Control	VPA	CBDON 1%	CBDON 2%
IT(%)	7,48±0,75 ^a	6,21±0,35 ^a	8,40±1,00 ^a	8,87±1,03 ^a
VS (%)	0,19±0,04 ^a	0,09±0,04 ^a	0,17±0,07 ^a	0,34±0,09 ^a
EL (%)	0,51±0,04 ^a	0,58±0,07 ^a	0,25±0,13 ^a	0,49±0,15 ^a
NL (%)	0,80±0,08 ^a	0,53±0,13 ^b	0,65±0,12 ^a	0,47±0,13 ^a
CL (%)	5,49±0,40 ^a	4,88±0,35 ^a	7,03±0,85 ^b	7,46±0,63 ^b
Leydig (%)	6,29±0,47 ^a	5,41±0,43 ^b	7,68±0,88 ^a	7,94±0,75 ^b
CT (%)	0,16±0,04 ^a	0,11±0,01 ^a	0,16±0,04 ^a	0,11±0,04 ^a
MAC (%)	0,12±0,08 ^a	0,12±0,06 ^a	0,15±0,05 ^a	0,17±0,02 ^a
IT (ml)	0,22±0,02 ^a	0,38±0,05 ^b	0,29±0,10 ^a	0,24±0,03 ^a
VS (ml)	0,0045±0,0022 ^a	0,0055±0,0020 ^a	0,0061±0,0043 ^a	0,0073±0,0042 ^a
EL (ml)	0,0197±0,0087 ^a	0,0280±0,0121 ^a	0,0076±0,0011 ^a	0,0110±0,0058 ^a
NL (ml)	0,0235±0,0022 ^a	0,0324±0,0102 ^a	0,0220±0,0061 ^a	0,0126±0,0033 ^a
CL (ml)	0,1618±0,0152 ^a	0,3008±0,0461 ^b	0,2451±0,0894 ^a	0,1997±0,0209 ^a
Leydig (ml)	0,1853±0,0169 ^a	0,3332±0,0533 ^b	0,2670±0,0945 ^a	0,2123±0,0234 ^a
CT (ml)	0,0075±0,0056 ^a	0,0069±0,0013 ^a	0,0056±0,0024 ^a	0,0030±0,0011 ^a
MAC (ml)	0,0036±0,0022 ^a	0,0073±0,0043 ^a	0,0048±0,0035 ^a	0,0064±0,0038 ^a
IIS (%)	0,058±0,004 ^a	0,130±0,017 ^b	0,106±0,041 ^b	0,074±0,010 ^a

VS – Blood vessel; EL – Lymphatic space; NL- Leydig cell nucleus; CL - Leydig cell

cytoplasm; CT – connective tissue; MAC – macrophage; IIS – Somatic Intertubule Index.

Data expressed as mean±SD. Different letters, between treatments, differ significantly from each other ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Table 5: Morphometric and stereological parameters of Leydig cells from adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with CBD nanoemulsions in the postnatal period.

	Control	VPA	CBDON 1%	CBDON 2%
Leydig Nuclear Diameter(μm^3)	5,77 \pm 0,49 ^a	6,35 \pm 0,25 ^a	6,43 \pm 0,38 ^a	6,08 \pm 0,15 ^a
Leydig Nucleus Volume(μm^3)	94,80 \pm 16,29 ^a	127,72 \pm 7,66 ^b	140,38 \pm 25,79 ^b	117,78 \pm 8,84 ^a
Cytoplasm volume and Leydig(μm^3)	714,88 \pm 222,53 ^a	1326,77 \pm 452,86 ^a	1571,37 \pm 484,24 ^a	1963,87 \pm 589,04 ^b
Leydig cell volume(μm^3)	817,19 \pm 247,96 ^a	1254,71 \pm 220,36 ^a	1711,75 \pm 505,75 ^b	2081,65 \pm 597,82 ^b
Leydig volume / t (x106)	0,185 \pm 0,017 ^a	0,333 \pm 0,053 ^b	0,267 \pm 0,095 ^a	0,212 \pm 0,023 ^a
Leydig volume / gt (x106)	0,057 \pm 0,006 ^a	0,049 \pm 0,003 ^a	0,069 \pm 0,009 ^b	0,070 \pm 0,008
Leydig cell number / t (x106)	241,96 \pm 69,43 ^a	248,95 \pm 107,03 ^a	163,99 \pm 63,67 ^a	109,28 \pm 34,24 ^a
Leydig cell number / gt (x106)	74,69 \pm 22,65 ^a	36,09 \pm 12,51 ^b	41,91 \pm 8,54 ^b	36,07 \pm 12,45 ^b
Leydigosomatic Index (%)	0,049 \pm 0,004 ^a	0,114 \pm 0,019 ^b	0,098 \pm 0,038 ^b	0,066 \pm 0,007 ^a

Data expressed as mean \pm SD. Different letters, between treatments, differ significantly from each other ($p \leq 0.05$) (Student Newman Keuls).

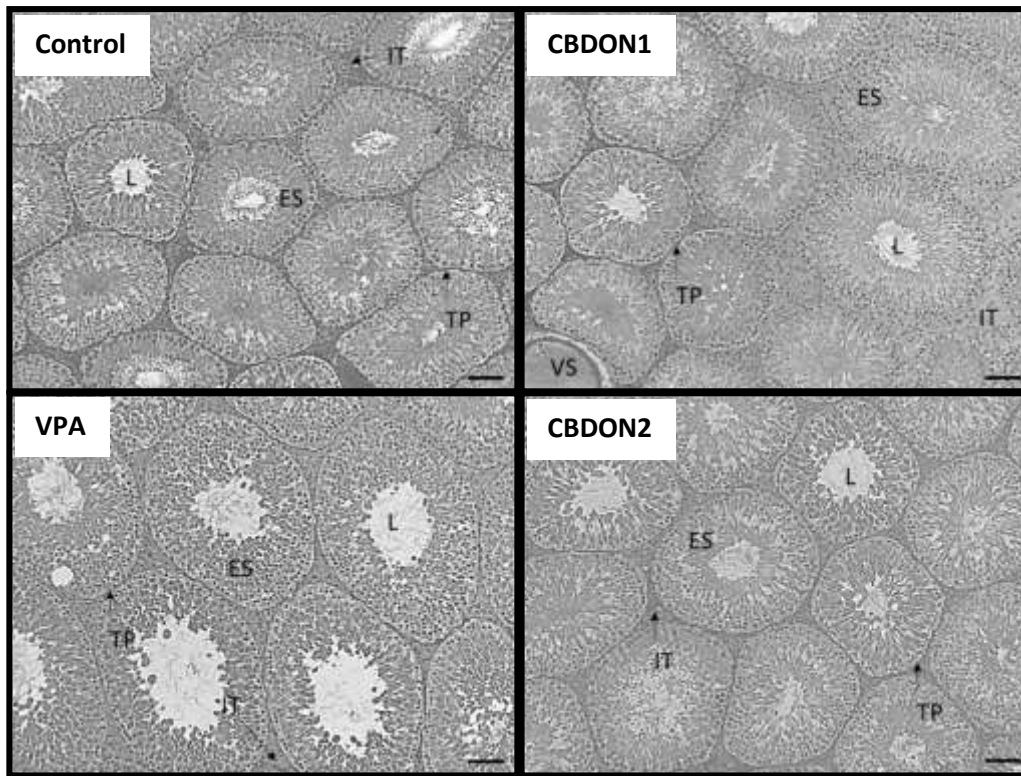
Caption for figures

Figure 1. Testis histology of adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with cannabinoids in the postnatal period. L-Lume; ES – seminiferous epithelium; TP- own tunic; SV – blood vessel; IT - intertubule. Bar = 100 μ m.

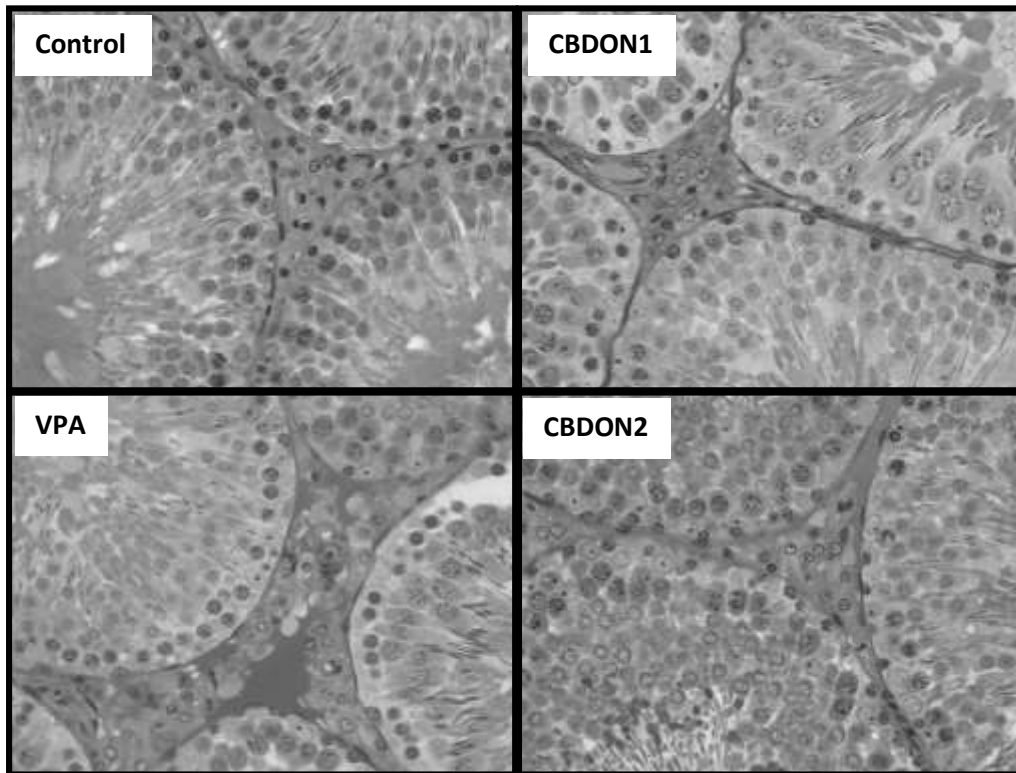


Figure 2: Histology of the intertubular compartment of adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with CBD nanoemulsions in the postnatal period.

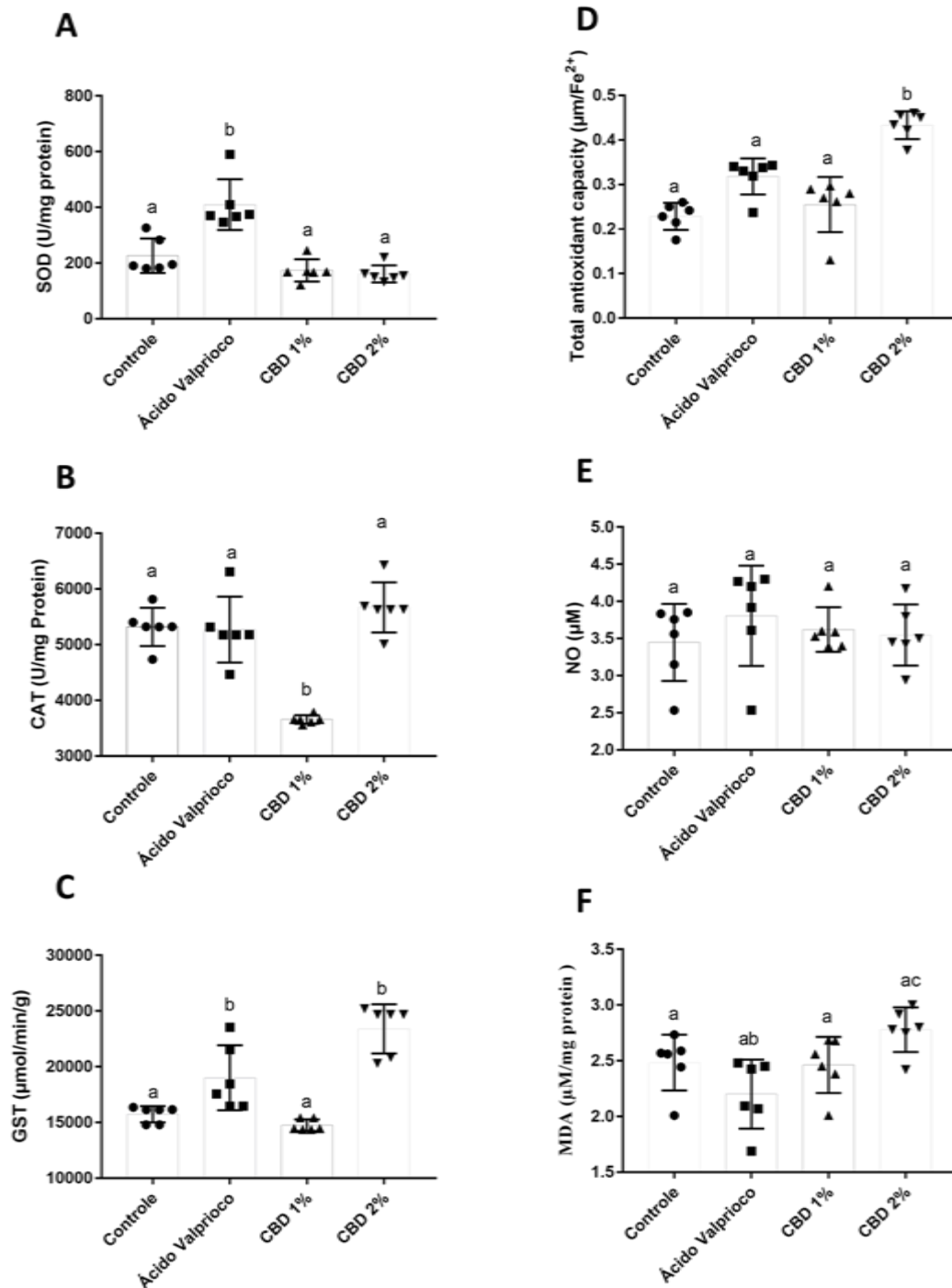


Figure 3: Superoxide dismutase (SOD) levels; catalase (CAT); Glutathione (GST); nitric oxide (NO); malondialdehyde (MDA) and total antioxidant activity. Data expressed as mean \pm SD. Different letters, between treatments, differ significantly from each other ($p\leq 0.05$) (Student Newman Keuls).

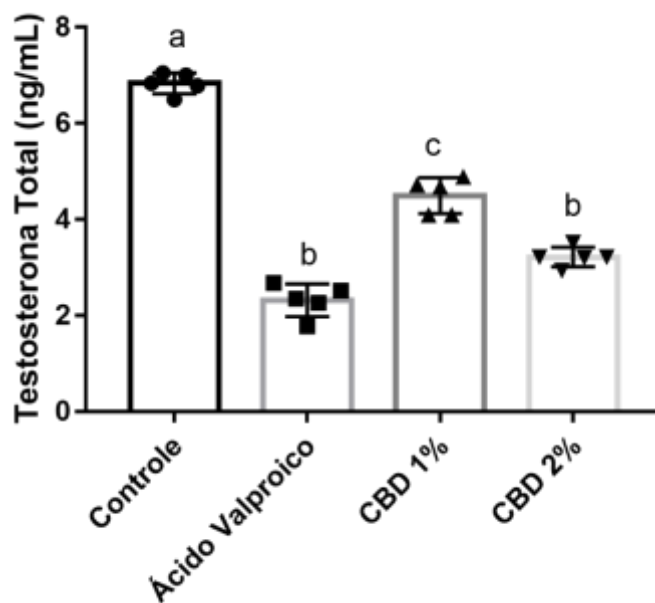


Figure 4: Serum levels of testosterone of adult rats exposed to valproic acid during pregnancy and treated with CBD nanoemulsions in the postnatal period. Data expressed as mean \pm SD. Different letters, between treatments, differ significantly from each other ($p \leq 0.05$) (Student Newman Kleus).

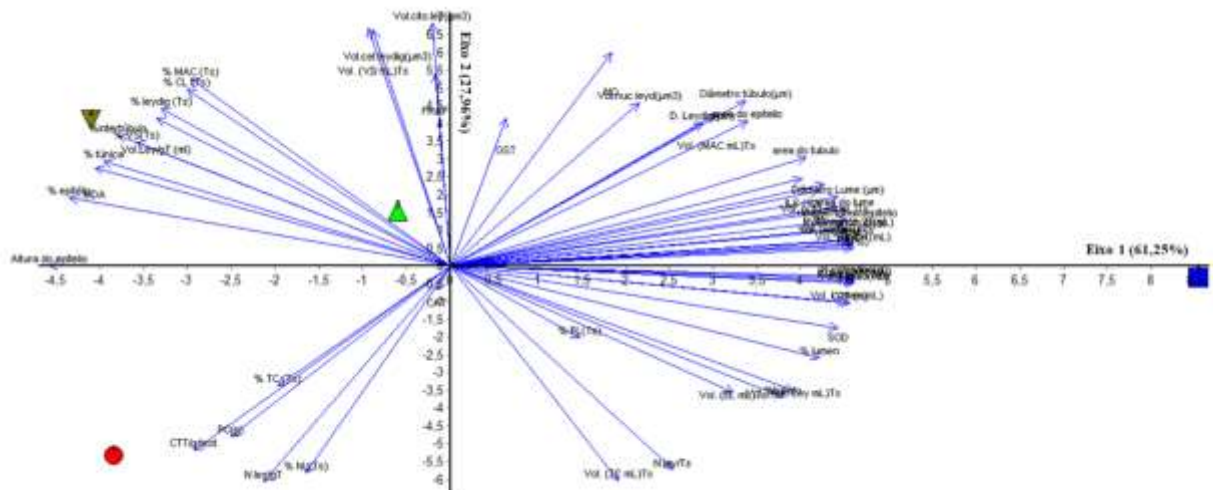


Figure 5: Principal component analysis. Red circle – control; blue square – Valproic acid; Light green triangle – CBD 1%; dark green triangle – CBD 2%

6 CONCLUSÕES

- ✓ Este estudo fornece evidências da capacidade do CBD de reduzir a morte neuronal no hipocampo e conseqüentemente melhorar alterações comportamentais associados ao autismo, uma condição para qual não há tratamento disponível.
- ✓ A exposição pré-natal ao VPA gera alterações morfológicas severas no parênquima testicular e redução dos níveis de testosterona, e o tratamento com nanoemulsão de CBD reverte tais alterações.
- ✓ Baseando-se nas características físico-químicas dos canabinóides, o uso de uma nanoemulsão de óleo de CBD permitiu um resultado satisfatório utilizando doses bastante reduzidas.
- ✓ O desenvolvimento de um protocolo terapêutico que minimize as alterações hipocámpais comportamentais assim como os danos testiculares promovidos pela exposição pré-natal ao VPA possibilita melhoria na qualidade de vida de indivíduos autistas e desmistifica a *Cannabis* como uma planta relacionada à transgressão, uma vez que o seu uso pode ser desviado para obtenção de fármacos que beneficiem à população no tratamento de patologias.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. R. Proteomic Investigations of Autism Brain Identify Known and Novel Pathogenetic Processes. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, 2019.

AL-DEWIK, N. et al. Overview and Introduction to Autism Spectrum Disorder (ASD). **Adv. Neurobiol.**, v. 24, p. 3-42, 2020.

ANDERSON, G. M. et al. Effects of short-and long-term risperidone treatment on prolactin levels in children with autism. **Biol. Psychiatry**, v. 61, p. 545-550, 2007.

ANDOH, M.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. Microglia in animal models of autism spectrum disorders. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 173, p. 239-273, 2020.

APARICIO-BLANCO, J.; ROMERO, I. A.; MALE, D. K.; SLOWING, K.; TORRES-SUAREZ, A.I. Cannabidiol enhances the passage of lipid nanocapsules across the blood-brain barrier both *in vitro* and *in vivo*. **Mol. Pharm.**, v. 16, n. 5, p. 1999-2010, 2019.

APPENDINO, G.; CHIANESE, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Cannabinoids: Occurrence and medicinal chemistry. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 1085-1099, 2011.

ARNNDT, T. L.; STODGELL, C. M.; RODIER, P. M. The teratology of autism. **J. devl neurociencia**, v. 23, p. 189-199, 2004.

ASHWOOD, P.; KRAKOWIAK, P.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; HANSEN, R.; PESSAH, I. N.; VAN DE WATE, J. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. **J. Neuroimmunol.**, v. 232, p. 196-199, 2011b;

ASHWOOD, P. et al. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. **J. Neuroimmunol.**, v. 204, p. 149-153, 2008.

ASHWOOD, P.; WILLS, S.; VAN DE WATER, J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, p. 1-15, 2006.

ATSMON, J. et al. PTL401, a new formulation based on pro-nano dispersion technology, improves oral cannabinoids bioavailability in healthy volunteers. **J. Pharm. Sci.**, v. 107, n. 5, p. 1423-1429, 2018.

ATWOOD, B.K.; MACKIE, K. CB2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 160, p. 467-479, 2010.

BAMBINI-JÚNIOR, V., et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. **Brain research**, v. 1408, p. 8-16, 2011.

BARON-COHEN, S. et al. Elevated fetal steroidogenic activity in autism. **Mol. Psychiatry**, v. 20, p. 369-376, 2015.

BARON-COHEN, S. The extreme male brain theory of autism. **Trends Cogn. Sci.**, v. 6, p. 248-254, 2002.

BAYDA, S.; ADEEL, M.; TUCCINARDI, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, p. 112, 2020.

BERGMANN, S.; KODAK, T. Autism Spectrum Disorder Characteristics, Associated Behaviors, and Early Intervention. **Pediatr. Clin. N. Am.**, v. 67, 525-535, 2020.

BHANDARI, R.; PALIWAL, J. K.; KUHAD, A. Neuropsychopathology of Autism Spectrum Disorder: Complex Interplay of Genetic, Epigenetic, and Environmental Factors. **Adv. Neurobiol.**, v. 24, 97-141.

BOGGS, D. et al. The effects of cannabidiol (CBD) on cognition and symptoms in outpatients with chronic schizophrenia a randomized placebo controlled trial. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 235, n. 7, p. 1923-1932, 2018.

BÖLTE, S.; GIRDLER, S.; MARSCHIK, P. B. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 1275-1297.

BOZKURT, T. E. Endocannabinoid System in the Airways. **Molecules**, v. 24, p. 4626, 2019.

BRAILOIU, G. C. et al. Differential activation of intracellular versus plasmalemmal CB2 cannabinoid receptors. **Biochemistry**, v. 53, p. 4990-4999, 2014.

BRUNI, N.; PEPA, C. D.; OLIARO-BOSSO, S.; PESSIONE, E.; GASTALDI, D.; DOSIO, F. Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. **Molecules**, v. 23, p. 2478, 2018.

CANI, P. D. Endocannabinoids—at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 12, p. 133-143, 2016.

CARBONE, E.; MANDUCA, A.; CACCHIONE, C.; VICARI, S.; TREZZA, V. Healing autism spectrum disorder with cannabinoids: a neuroinflammatory story. **Neurosci. Biobehav. Ver.**, v. 121, p.128-143, 2021.

CASTILLO, P.E.; YOUNTS, T.J.; CHAVEZ, A.E.; HASHIMOTODANI, Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron.**, v. 76, p. 70-81, 2012.

CHAIDEZ, V.; HANSEN, R. L.; HERTZ-PICCIOTTO, I. Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 44, p. 1117-1127, 2014.

CHEN, B. H.; INBARAJ, B. S. Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. **Nutrients**, v. 11, p. 1052, 2019.

CHEN, L. H.; Cheng, L. C.; Doyle, P. S. Nanoemulsion-Loaded Capsules for Controlled Delivery of Lipophilic Active Ingredients. **Adv. Sci.**, v. 7, 2020.

CHEZ, M. G., DOWLING, T., PATEL, P. B., KHANNA, P., KOMINSKY, M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. **Pediatr. Neurol.**, v. 36, p. 361-365, 2007.

CHOI, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic nutraceuticals: strategies for improving their formulation, stability, functionality and bioavailability. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 29, n. 2, p. 149-168, 2020.

CLAPPER, J. R. et al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. **Nat. Neurosci.**, v. 13, p. 1265-1270, 2010.

COHEN, S.; CONDUIT, R.; LOCKLEY, S. W.; RAJARATNAM, S. M. W.; CORNISH, K. M. The relationship between sleep and behavior in autism spectrum disorder (ASD): a review. **J. Neurodev. Disord.**, v. 6, p. 44, 2014.

CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nat. Rev. Neurol.**, n. 16, n. 1, p. 9-29, 2020.

DEAN, M.; HARWOOD, R.; KASARI, C. The art of camouflage: Gender differences in the social behaviors of girls and boys with autism spectrum disorder. **Autism**, v. 6, p. 678-689, 2017.

- DEN BOON, F.S. et al. Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, p. 3534-3539, 2012.
- DHOPEHWARKAR, A.; MACKIE, K. CB2 cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? **Mol. Pharmacol.**, v. 86, p. 430-437, 2014.
- DI MARZO, V. The endocannabinoidome as a substrate for noneuphoric phytocannabinoid action and gut microbiome dysfunction in neuropsychiatric disorders. **Dialogues Clin. Neurosci.**, v. 22, n. 3, p. 259-269, 2020.
- DURAND, C. M. et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. **Nat. Genet.**, v. 39, p. 25-27, 2007.
- EL-ANSARY, A.; AL-AYADHI, L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. **Journal of neuroinflammation**, p. 11-189, 2014.
- ELDEVIK, S.; HASTINGS, R. P.; HUGHES, J. C.; JAHR, E.; EIKESETH, S.; CROSS, S. Meta-analysis of Early Intensive Behavioral Intervention for children with autism. **J. Clin. Child. Adolesc. Psychol.**, v. 38, p. 439-450, 2009.
- ELSOHLY, M. A.; RADWAN, M. M.; GUL, W.; CHANDRA, S.; GALAL, A. Phytochemistry of Cannabis sativa L. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, v. 103, p. 1-36, 2017.
- FATTORUSSO, A.; DI GENOVA, L.; DELL'ISOLA, G. B.; MENCARONI E.; ESPOSITO, S. Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 11, p. 521, 2019.
- FENG, J.; CHEN, W.; LIU, Q.; CHEN, Z.; YANG, J.; YANG, W. Development of abamectin-loaded nanoemulsion and its insecticidal activity and cytotoxicity. **Pest. Manag. Sci.**, v. 76, n. 12, p. 4192-4201, 2020.
- FOLKES, O. M. et al. An endocannabinoid-regulated basolateral amygdala–nucleus accumbens circuit modulates sociability. **J. Clin. Invest.**, v. 130, n. 4, p. 1728-1742, 2020.
- FRANCO, V.; PERUCCA, E. Pharmacological and Therapeutic Properties of Cannabidiol for Epilepsy. **Drugs**, v. 79, n. 13, p. 1435-1454, 2019.
- GAONI, Y.; MECOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, p. 1646-1647, 1964.
- GONG, J.P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Res.**, v. 1071, p. 10-23, 2006.
- GASTON, T. E.; FRIEDMAN D. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. **Epilepsy Behav.**, v. 70, p. 313-318, 2017.

GEURTS, L. et al. Adipose tissue NAPE- PLD controls fat mass development by altering the browning process and gut microbiota. **Nat. Commun.**, v. 6, p. 6495, 2015.

GOINES, P.; VAN DE WATER, J. The immune system's role in the biology of autism. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 23, p. 111-117, 2010.

GOLDMAN, S. E.; SURDYKA, K.; CUEVAS, R.; ADKINS, K.; WANG, L.; MALOW, B. A. Defining the sleep phenotype in children with autism. **Dev. Neuropsychol.**, v. 34, p. 560-573, 2009.

GONÇALVES, E. C. D.; BALDASSO, G. M.; BICCA, M. A.; PAES, R. S.; CAPASSO, R.; DUTRA, R. C. Terpenoids, Cannabimimetic Ligands, beyond the Cannabis Plant. **Molecules**, v. 25, p. 1567, 2020.

GONZALEZ-MARISCAL, I., et al. Human CB1 receptor isoforms, present in hepatocytes and cells, are involved in regulating metabolism. **Sci. Rep.**, v. 6, 2016.

GREISH, K. et al. Synthetic cannabinoids nano-micelles for management of triple-negative breast cancer. **J. Control. Rel.**, v. 291, p. 184-195, 2018.

GREEN, R. M.; TRAVERS, A. M.; HOWE, Y.; MCDOUGLE, C. J. Women and Autism Spectrum Disorder: Diagnosis and Implications for Treatment of Adolescents and Adults. **Current Psychiatry Reports**, v. 21, n. 22, 2019.

GUANG, S. et al. Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 12, n. 470, 2018.

GUIDA, F. et al. Antibiotic- induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. **Brain Behav. Immun.**, v. 67, p. 230-245, 2018.

HERRERO, M. J. et al. Identification of amygdala-expressed genes associated with autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, v. 11, n. 39, 2020.

HOWLETT, A. C., et al. International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, p. 161-202, 2002.

HUGUET, G.; EY, E.; BOURGERON, T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. **Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 14, p. 191-213, 2013.

IVERSEN L. The science of marijuana. New York: **Oxford University Press**, 2000.

IZZO, A. A.; SHARKEY, K. A. Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. **Pharmacol. Ther.**, v. 126, p. 21-38, 2010.

JANAKIRAMAN, M. & KRISHNAMOORTHY, G. Emerging role of diet and microbiota interactions in neuroinflammation. **Front. Immunol.**, v. 9, p. 2067, 2018.

- JARZEBSKI, M. et al. Aesculus hippocastanum L. as a Stabilizer in Hemp Seed Oil Nanoemulsions for Potential Biomedical and Food Applications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 2, p. 887, 2021.
- JAVADI-PAYDAR, M. Effects of Δ^9 -THC and cannabidiol vapor inhalation in male and female rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 235, n. 9, p. 2541-2557, 2018.
- JOENSUU, M.; LANOUE, V.; HOTULAINENA, P. Dendritic spine actin cytoskeleton in autism spectrum disorder. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, n. 84, 362-381, 2018.
- KANO, M.; OHNO-SHOSAKU, T.; HASHIMOTODANI, Y.; UCHIGASHIMA, M.; WATANABE, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 309-380, 2009.
- KATONA, I. et al. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. **J. Neurosci.**, v. 19, 4544-4558, 1999.
- KERR, D. M.; GILMARTINA, A.; ROCHEA, M. Pharmacological inhibition of fatty acid amide hydrolase attenuates social behavioural deficits in male rats prenatally exposed to valproic acid. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 228-235, 2016.
- KIMURA, R. et al. An epigenetic biomarker for adult high-functioning autism spectrum Disorder. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.
- KNAUB, K.; SARTORIUS, T.; DHARSONO, T.; MANFREDWILHELM, A. R. W.; SCHÖN, C. A Novel Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) Based on VESIorb® Formulation Technology Improving the Oral Bioavailability of Cannabidiol in Healthy Subjects. **Molecules**, v. 24, p. 2967, 2019.
- KRISHNAN, A. et al. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. **Nat. Neurosci.**, v. 19, p. 1454-1462, 2016.
- LAFAYE, G.; DESTERKE, C.; MARULAZ, L.; BENYAMINA, A. Cannabidiol affects circadian clock core complex and its regulation in microglia cells., **Addict Biol.**, v. 24, n. 5, p. 921-934, 2019.
- LAFAYE, G.; KARILA, L.; BLECHA, L.; BENYAMINA, A. Cannabis, cannabinoids, and health. **Dialogues Clin. Neurosci.**, v. 19, p. 309-316, 2017.
- LAI, M. C. et al. Imaging Sex/Gender and Autism in the Brain: Etiological Implications. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, p. 380-397, 2017.
- LAMY, M; PEDAPATI, E. V.; DOMINICK, K. L.; WINK, L. K.; ERICKSON, C. A.

Recent Advances in the Pharmacological Management of Behavioral Disturbances Associated with Autism Spectrum Disorder in Children and Adolescents. **Paediatr Drugs**, v. 22, n. 5, p. 473-483, 2020.

LENART, J.; AUGUSTYNIAK, J.; LAZAREWICZ, J. W.; ZIEMINSKA, E. Altered expression of glutamatergic and GABAergic genes in the valproic acid-induced rat model of autism: A screening test. **Toxicology**, v. 440, 2020.

LI, H. L. An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China. **Economic Botany**, v. 28, n. 4, p. 437-448, 1974.

LI, X. et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. **Cell.**, v. 176, n. 3, p. 459-467, 2019.

LIU, C.; QI, X.; YANG, D.; NEELY, A.; ZHOU, Z. The effects of cannabis use on oral health. **Oral Diseases**, v. 00, p. 1-9, 2019.

LIU, Q. R. et al. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): Identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. **Genes Brain Behav.**, v. 8, p. 519-530, 2009.

LIU, X.; BAUTISTA, J.; LIU, E.; ZIKOPOULOS, B. Imbalance of laminar-specific excitatory and inhibitory circuits of the orbitofrontal cortex in autism. **Molecular Autism**, v. 11, p. 83, 2020.

LOOMES, R.; HULL, L.; MANDY, W. P. L. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v. 56, n. 6, p. 466-474, 2017.

LORD, C. et al. Autism spectrum disorder. **Nature reviews Disease primers, Nature Publishing Group**, v. 6, n. 1, p.5, 2020.

LUJÁN, M. Á.; VALVERDE, O. The Pro-neurogenic Effects of Cannabidiol and Its Potential Therapeutic Implications in Psychiatric Disorders. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 14, p. 109, 2020.

MACCARRONE, M. et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after the. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 36, p. 277-296, 2015.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 299-325, 2005.

MAGNUSON, K. M.; CONSTANTINO, J. N. Characterization of depression in children with autism spectrum disorders. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 32, p. 332-340, 2011.

MALHOTRA, P.; CASARI, I.; FALASCA, M. Therapeutic potential of cannabinoids in combination cancer therapy. **Advances in Biological Regulation**, v. 79, 2021.

MANDY, W.; CHILVERS, R.; CHOWDHURY, U.; SALTER, G.; SEIGAL, A.; SKUSE, D. Sex differences in autism spectrum disorder: evidence from a large sample of children and adolescents. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 42, p. 1304-1313, 2012.

MARINELLI, S. et al. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is responsible for the slow self-inhibition in neocortical interneurons. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 13532-13541, 2008.

MARINELLI, S.; PACIONI, S.; CANNICH, A.; MARSICANO, G.; BACCI, A. Self-modulation of neocortical pyramidal neurons by endocannabinoids. **Nat. Neurosci.**, v. 12, p. 1488-1490, 2009.

MAROSO, M. et al. Cannabinoid control of learning and memory through hcn channels. **Neuron.**, v. 89, 1059-1073, 2016.

MATTAA, S. M.; HILL-YARDINB, E. L.; CRACKA, P. J. The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 79, p. 75-90, 2019.

MATOS, R. L. A.; SPINOLA, L. A.; BARBOZA, L. L.; GARCIA, D. R.; FRANÇA, T. C. C.; AFFONSO, R. S. O Uso do Canabidiol no Tratamento da Epilepsia. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n. 2, p. 786-814, 2017.

MATSON, J. L.; SHOEMAKER, M. Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. **Res. Dev. Disabil.**, v. 30, p. 1107-1114, 2009.

MAZUREK, M. O.; SOHL, K. Sleep and behavioral problems in children with autism spectrum disorder. **J. Autism. Dev. Disord.**, v. 46, p. 1906-1915, 2016.

MCELHANON, B. O.; MCCRACKEN, C.; KARPEN, S.; SHARP, W. G. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 133, p. 872-883, 2014.

MCPHEETERS, M. L. et al. A systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v. 127, p. 1312-1321, 2011.

MEHRPOUYA-BAHRAMI, P. et al. Blockade of CB1 cannabinoid receptor alters gut microbiota and attenuates inflammation and diet-induced obesity. **Sci. Rep.**, v. 7, 2017.

MICALE, V.; DRAGO, F. Endocannabinoid system, Stress and HPA axis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 5, n. 834, p. 230-239, 2018.

MILLER, L. K.; DEVI, L. A. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: Mechanisms and their therapeutic implications. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, p. 461-470, 2011.

MILLER, R. J.; MILLER, R. E. Is cannabis an effective treatment for joint pain? **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 35, n. 107, p. 59-67, 2017.

MLOST, J.; BRYK, M.; STAROWICZ, K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 8870, 2020.

MODABBERNIA, A.; VELTHORST, E.; REICHENBERG, A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. **Molecular Autism**, v. 8, n.13, 2017.

MORALES, P.; HURST, D. P.; REGGIO, P. H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids - A Complex Picture. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, v. 103, p. 103-131, 2017.

MOREIRA, F. A; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 512, n. 2-3, p. 199-205, 2005.

MUCCIOLI, G. G. et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. **Mol. Syst. Biol.**, v. 6, n. 392, 2010.

MULLER, C.; MORALES, P.; REGGIO, P. H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. **Front. Mol. Neurosci.**, 2019.

NETO, S. G. B.; BRUNONI, D.; R. M. C. Abordagem psicofarmacológica no transtorno do espectro autista: uma revisão narrativa. **Cad. Pós-Grad. Distúrb. Desenvolv.**, v.19, n. 2, 2019.

NGWA, W.; KUMAR, R.; MOREAU, M.; DABNEY, R.; HERMAN, A.; Nanoparticle to target lung cancer with radiosensitizers and cannabinoids. **Front. Oncol.**, v. 7, p. 208, 2017.

NIKOLOV, R.; JONFER, J.; SCAHILL, L. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 28, p. 39-46, 2006.

ONORE, C.; CAREAGA, M.; ASHWOOD, P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. **Brain Behav Immun.**, v. 26, n. 3, p. 383-392, 2012.

O'ROAK, B. J. et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. **Nature**, v. 485, p. 246-250, 2012.

O'SHAUGHNESSY, W. B. On the preparations of the Indian hemp, or gunjah (*Cannabis indica*): Their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases. **Transactions of the medical and physical society of Bengal**, v. 5, n. 123, p. 363- 369, 1843.

OUSLEY, O.; CERMAK, T. Autism spectrum disorder: defining dimensions and subgroups. **Curr. Dev. Disord. Rep.**, v. 1, p. 20-28, 2014.

PATEL, A. D. Medical Marijuana in Pediatric Neurological Disorders. **Journal of Child Neurology**, p. 1-4, 2015.

PEDRAZZI, J. F. C.; PEREIRA, A. C. C. I.; GOMES, F. V.; BEL, E. D. Perfil antipsicótico do canabidiol. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, v. 47, p. 112, 2014.

PERTWEE, R. G. et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. **Pharmacol. Rev.**, v. 62, p. 588-631, 2010.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: The first 66 years. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. 163-171, 2006.

PIETROPAOLO, S.; BELLOCCHIO, L. C.; BOUZÓN-ARNÁIZ, I.; YEEF, B. K. The role of the endocannabinoid system in autism spectrum disorders: Evidence from mouse studies. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 173, p. 183-208, 2020.

PINTO, D. et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 94, p. 677-694, 2014.

PRATA, J. The Contribution of Inflammation to Autism Spectrum Disorders: Recent Clinical Evidence. **Methods Mol. Biol.**, v. 2011, p. 493-510, 2019.

QUARTIER, A. et al. Novel mutations in NLGN3 causing autism spectrum disorder and cognitive impairment. **Hum. Mutat.**, v. 40, n. 11, p. 2021-2032, 2019.

RANDALL, M. et al. Diagnostic tests for autism spectrum disorder (ASD) in preschool children. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 24, n. 7, 2018.

RANDELL, E. et al. Sensory integration therapy versus usual care for sensory processing difficulties in autism spectrum disorder in children: study protocol for a pragmatic randomised controlled trial. **Trials**, v. 20, p. 113, 2019.

ROJAS, D. C. The role of glutamate and its receptors in autism and the use of glutamate receptors antagonists in treatment. **J. neural transm.**, v. 121, n. 8, p. 891-905, 2014.

ROSSIGNOL, D.A.; FRYE, R. E. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. **Mol. Psychiatry**, v. 17, p. 290-314, 2012.

- ROULLET, F. I.; LAI, J. K. Y.; FOSTER, J. A. In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, p. 47-56, 2013.
- ROUSSEAU, C. et al. Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. **Nat. Med.**, v. 13, p. 35-37, 2007.
- RUGGIERO, R. N.; ROSSIGNOLI, M. T.; DE ROSS, J. B.; HALLAK, J. E. C.; LEITE, J. P.; BUENO-JUNIO, L. S. Cannabinoids and Vanilloids in Schizophrenia: Neurophysiological Evidence and Directions for Basic Research. **Front. Pharmacol.**, v. 8, p. 399, 2017.
- SCHERMA, M.; MASIA, P.; SATTA, V.; FRATTA, W.; FADDA, P.; TANDA, G. Brain activity of anandamide: a rewarding bliss? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, p. 309-323, 2019.
- SCHRECK, K. A.; MULICK, J. A.; SMITH, A. F. Sleep problems as possible predictors of intensified symptoms of autism. **Res. Dev. Disabil.**, v. 25, p. 57-66, 2004.
- SERVADIO, M. et al. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Transl. Psychiatry**, p. 27, v. 6, n. 9, 2016.
- SHANNON, S.; LEWIS, N.; LEE, H.; HUGHES, S. Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. **Perm. J.**, v. 23, p.18-41, 2019.
- SHARKEY, K. A.; WILEY, J. W. The role of the endocannabinoid system in the brain- gut axis. **Gastroenterology**, v. 151, n. 252-266, 2016.
- SHARP, B. M. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. **Transl. Psychiatry**, v. 7, n. 1194, 2017.
- SHIRE, D. et al. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 3726-3731, 1995.
- SILVESTRO, S.; SCHEPICI, G.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Molecular Targets of Cannabidiol in Experimental Models of Neurological Disease. **Molecules**, v. 25, p. 5186, 2020.
- SIMONOFF, E.; PICKLES, A.; CHARMAN, T.; CHANDLER, S.; LOUCAS, T.; BAIRD, G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v. 47, p. 921-929, 2008.
- SIU, M. T.; WEKSBERG, R. Epigenetics of Autism Spectrum Disorder. **Adv. Exp. Med. Biol.**, n. 978, p. 63-90, 2017.

STELLA, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 244-253, 2009.

STRAIKER, A.; WAGER-MILLER, J.; HUTCHENS, J.; MACKIE, K. Differential signalling in human cannabinoid CB1 receptors and their splice variants in autaptic hippocampal neurones. **Br. J. Pharmacol.**, v. 165, 2660-2671, 2012.

SUN, B., et al. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. **Cell stem cell**, v. 5, n. 6, p. 624-633, 2009.

SZATMARI, P. et al. Sex differences in repetitive stereotyped behaviors in autism: implications for genetic liability. **Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.**, v. 159, p. 5-12, 2012.

TACHIBANA, Y. A. et al. A systematic review and meta-analysis of comprehensive interventions for pre-school children with autism spectrum disorder (ASD). **PLoS One**, v. 12, n. 12, 2017.

TAM, J. et al. The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling. **FASEB J.**, 22, p. 285-294, 2008.

TSILIONI, I.; THEOHARIDES, T. C. Extracellular vesicles are increased in the serum of children with autism spectrum disorder, contain mitochondrial DNA, and stimulate human microglia to secrete IL-1 β . **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 239, 2018.

TSOU, K.; BROWN, S.; SANUDO-PENA, M.C.; MACKIE, K.; WALKER, J.M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, p. 393-411, 1998.

TUCHMAN, R.; CUCCARO, M.; ALESSANDRI, M. Autism and epilepsy: historical perspective. **Brain Dev.**, v. 32, p. 709-718, 2010.

TURBÉ, H.; WAECKEL, L.; DECHELOTTE, B. Overview of prospects for inflammation pathways in autism spectrum disorders. **Encephale**, v. 46, n. 5, p. 404-407, 2020.

VAN DER MIESEN, A. I. R.; HURLEY, H.; DE VRIES, A. L.C. Gender dysphoria and autism spectrum disorder: A narrative review. **Int. Rev. Psychiatry**, v. 28, n. 1; p. 70-80, 2016.

VARGAS, D. L.; NASCIMBENE, C.; KRISHNAN, C.; ZIMMERMAN, A. W. PARDO, C. A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Ann. Neurol.**, v. 57, n. 1, p. 67-81, 2005.

VERESS, G. et al. Characterisation of cannabinoid 1 receptor expression in the perikarya, and peripheral and spinal processes of primary sensory neurons. **Brain Struct. Funct.**, v. 218, p. 733-750, 2013.

XIAO, J.C.; JEWELL, J.P.; LIN, L.S.; HAGMANN, W.K.; FONG, T.M.; SHEN, C.P. Similar *in vitro* pharmacology of human cannabinoid CB1 receptor variants expressed in CHO cells. **Brain Res.**, v. 1238, p. 36-43, 2008.

XIAOLI, L. A.; JIAXIN, Y. A.; HUAQIN, W. B.; YAMIN, L. Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 130, p. 167-176, 2020.

XU, Z. X. Elevated protein synthesis in microglia causes autism-like synaptic and behavioral aberrations. **Nature communications**, v. 11, n. 1797, 2020.

WEI, D. et al. Enhancement of Anandamide-Mediated Endocannabinoid Signaling Corrects Autism-Related Social Impairment. **Cannabis Cannabinoid Res.**, v. 1, n. 1, p. 81-89, 2016.

WEI, H.; ALBERTS, I.; LI, X. Brain IL-6 and autism. **Neuroscience**, v. 232, p. 320-325, 2013.

WHITE, S. W.; OSWALD, D.; OLLENDICK, T.; SCAHILL, L. Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders. **Clin. Psychol. Rev.**; v. 29, p. 216-229, 2009.

WILSON, B.; SELVAM, J.; MUKUNDAN, G. K.; PREMAKUMARI, K. B.; JENITA, J. L. Albumin nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of antiepileptic drug levetiracetam into the brain. **Drug Deliv. Transl. Res.**, v. 10, n. 6, p. 1853-1861, 2020.

WRIGHT-JIN, E. C.; GUTMANN, D. H. Microglia as dynamic cellular mediators of brain function. **Trends Mol. Med.**, v. 25, n. 11, p. 967-979, 2019.

YIN, J.; XIANG, C.; WANG, P.; YIN, Y.; HOU, Y. Biocompatible nanoemulsions based on hemp oil and less surfactants for oral delivery of baicalein with enhanced bioavailability. **Int. J. Nanomedicine**, v. 12, p. 2923-2931, 2017.

YOON, S. H.; CHOI, J.; LEE, W. J.; DO, J. T. Genetic and Epigenetic Etiology Underlying Autism Spectrum Disorder. **J. Clin. Med.**, v. 9, p. 966, 2020.

ZHANG, H. Y. et al. Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, p. 1037-1051, 2015.

ZOU, M. et al. Iterations of the endocannabinoid system and its therapeutic potential in autism spectrum disorder. **Open Biol.**, v. 11, n. 2, 2021.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 026830 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO ÓLEO RICO EM CANABIDIOL

Resumo: COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO ÓLEO RICO EM CANABIDIOL. A presente patente de invenção descreve um processo de obtenção de uma nanoemulsão O/A obtida a partir de um óleo rico em canabidiol. A nanoemulsão é incorporada a um xarope simples para a produção de um xarope nanotecnológico com alta palatabilidade. Esse xarope pode ser utilizado para o tratamento do transtorno do espectro do autismo e suas comorbidades, pois se mostrou efetivo na reversão de comportamentos característicos da doença em modelo murino, após caracterização prévia da dita nanoemulsão, o que pode possibilitar a melhoria na qualidade de vida de indivíduos autistas.

**COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE
NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO
DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA
CONTENDO ÓLEO RICO EM CANABIDIOL**

Campo da invenção

[001] A presente patente de invenção descreve um processo de produção de uma nanoemulsão óleo/água obtida a partir de óleo rico em canabidiol (CBD). Sua eficácia contra o autismo foi avaliada em modelo murino. A partir da obtenção da nanoemulsão foi formulado um xarope nanotecnológico a base de sacarose altamente palatável para o tratamento do autismo. Esta invenção situa-se no campo da biotecnologia aplicada ao tratamento de doenças neurológicas.

Fundamentos da invenção

[002] O transtorno do espectro do autismo (TEA) inclui desordens do neurodesenvolvimento caracterizadas por prejuízos na comunicação e interação social, associados à interesses restritivos e condutas estereotipadas, que afetam aproximadamente 1 entre 58 crianças (ARBERAS; KUGGIERI, *Medicina*, 79, 16-21, 2019). As manifestações comportamentais no autismo tem diversos graus de severidade e estão associadas a um número crescente de co-morbidades como ansiedade, déficit de atenção, epilepsia, desordens do sono, desabilidade intelectual e alterações motoras (SANCHACK; THOMAS, *Am Fam Physician*, 94 (12), 972-979, 2016).

[003] O processamento sensorial atípico é frequentemente encontrado em indivíduos autistas (OSÓRIO et al., *Molecular Autism*, 12:8, 1-14, 2021). Isto gera comportamentos alimentares anormais, sendo a seletividade alimentar o problema mais frequente. Várias hipóteses já foram levantadas para explicar esta seletividade no autismo e os fatores que influenciam a recusa alimentar estão relacionados principalmente às características dos

alimentos, como o sabor, o cheiro, a textura, a aparência e a temperatura (MARI-BAUSET et al., *Journal of Child Neurology*, 29(11), 1554-1561, 2014; RICCIO et al., *International Society for autism research*, 11(3), 531-538, 2017). Sendo assim, existe uma ligação entre a sensibilidade sensorial e os problemas alimentares (LANE et al., *Autism Res.*, 7(3), 322-333, 2014), e as variações na percepção do gosto influenciam a preferência alimentar (COOKE, *Journal of Human Nutrition & Dietetics*, 20, 294-301, 2007). Crianças autistas recusam mais frequentemente frutas e vegetais, e aceitam uma variedade menor de alimentos, além disso, a recusa alimentar nestas crianças é mediada pelo sabor amargo (RICCIO et al., *International Society for autism research*, 11(3), 531-538, 2017).

[004] O autismo é uma doença poligênica e de origem multifatorial. Mutações em vários genes que regulam a sinaptogênese e vias de sinalização são os principais fatores envolvidos na patogênese do autismo. Modificações epigenéticas afetando a transcrição do DNA e a exposição pré-natal e pós-natal a uma variedade de fatores ambientais também contribuem para a ocorrência da doença (BHANDARI et al., *Adv. Neurobiol.*, 24, 97-141, 2020). A função cerebral normal depende de um equilíbrio entre a excitação e a inibição neuronal, e alterações entre sinapses excitatórias e inibitórias no cérebro causa uma ampla gama de distúrbios neurológicos e mentais, incluindo o autismo (NAAIJEN et al., *Transl Psychiatry*, 7, 999, 2017). Tais alterações ocorrem como resultado do aumento e da diminuição da expressão de genes glutamatérgicos e GABAérgicos no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (LENART et al., *Toxicology*, 440, 2020). Essa desregulação sináptica e desequilíbrio na atividade neuronal está entre as alterações celulares mais comum encontradas no autismo (GILBERT et al., *The Journal of Neuroscience*, 40(1), 237-254, 2020).

[005] Esta patologia também tem sido ligada a um aumento do estresse oxidativo e redução da capacidade antioxidante, o que gera dano e toxicidade neuronal (MANIVASAGAM et al., *Adv Neurobiol*, 24, 193-206, 2020), além de estar relacionada a disfunção mitocondrial e do sistema imune (PRATA, et al., *Psychiatric Disorders: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 2011, p. 493, 2019). A

disfunção imune está associada a uma superestimulação da atividade da micróglia, célula que representa 80% da população de células imunes do cérebro e que é essencial no gerenciamento de lesões e infecções do sistema nervoso central (SNC), e dos astrócitos. A ativação aberrante da atividade microglial resulta no aumento da expressão e da liberação de citocinas pró-inflamatórias que contribuem diretamente para o processo de neurodegeneração (MACHADO et al., *Revista Brasileira Militar de Ciências*, v. 6, n. 14, 2020). O aumento de citocinas inflamatórias favorece para o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que facilita o progresso da neuroinflamação, gerando degeneração e morte neuronal (PANGRAZZI, et al., *Int. J. Mol. Sci*, 21, 3288, 2020). Citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, Th1 e Th2 têm sido detectadas em grande quantidade no plasma, no líquido cérebro espinhal e no cérebro de crianças autistas (SINISCALCO et al., *Pharmaceuticals*, 11, 56, 2018).

[006] As plantas do gênero *Cannabis* têm sido utilizadas por muitos anos como agentes medicinais e a primeira evidência histórica do seu uso na medicina tradicional foi documentada na farmacopeia chinesa no primeiro século antes de cristo (PISANTI; BIFULCO, *J Cell Physiol*, 234, 8342-8351, 2018). Estas plantas são as mais comumente utilizadas no mundo e contém mais de 500 componentes químicos, dos quais mais de 100 são conhecidos como fitocanabinóides (HILL; PALASTRO, *Polish Archives of Internal Medicine*, 2017). Dentre os fitocanabinóides descritos os mais estudados são o tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) e o CBD. O CBD é o principal e mais estudado componente não psicotrópico da *Cannabis*, principalmente devido à sua ação analgésica, anti-inflamatória e antiepiléptica (AMIN; ALI, *Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1162, 151-165, 2019). O mecanismo de ação do CBD envolve a interação do mesmo com diversos receptores, assim como a modulação da ação de várias substâncias que pertencem a um sistema de sinalização endógeno conhecido como sistema endocanabinóide (BLAKE et al., *Ann Palliat Med*, 6 (2), 215-222, 2017).

[007] O sistema endocanabinóide é composto por endocanabinóides derivados de lipídeos, por enzimas responsáveis por sintetizar e degradar os endocanabinóides e por

receptores metabotrópicos que reconhecem essas substâncias. Os mais conhecidos endocanabinóides do SNC são a N-araquidonoiletanolamina (AEA ou anandamida) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), ambos derivados do ácido araquidônico (BASAVARAJAPPA, et al., *J Neurochem*, 142 (5), 624-648, 2017). Os dois principais receptores para os endocanabinóides descritos são o receptor canabinóide tipo 1 (CB1), encontrado principalmente em neurônios, e tipo 2 (CB2) expresso principalmente no sistema imune (CRISTINO et al., *Nat Rev Neurol*, 16 (1), 9-29, 2019).

[008] Os endocanabinóides são sintetizados por demanda em resposta ao aumento do cálcio intracitoplasmático a partir de fosfolípidos de membrana do neurônio pós-sináptico, e se ligam em receptores CB1 localizados na membrana pré-sináptica inibindo a liberação do neurotransmissor (ALMOGI-HAZAN; OR, *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 4448, 2020). A síntese da AEA e do 2-AG é mediada pelas enzimas N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipase (DAGL), respectivamente. Após a ativação do receptor CB1 os endocanabinóides são removidos através de transporte celular seguido de hidrólise. A hidrólise da AEA é mediada pela ácido graxo amida hidrolase (FAAH), enquanto o 2-AG é hidrolisado pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (ARAÚJO et al., *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 424, 2019). O sistema endocanabinóide desempenha um papel importante no processamento social e emocional. O aumento da AEA endógena decorrente do bloqueio da sua recaptação e hidrólise, resulta em um comportamento social aprimorado (KERR et al., *Pharmacological Research*, 113, 228-235, 2016). Além disso, a inibição da MAGL e consequente aumento da disponibilidade do 2-AG, bloqueia o déficit na interação social (FOLKES et al., *J Clin Invest.*, 130 (4), 1728-1742, 2020).

[009] Os endocanabinóides também atuam em outros alvos além dos receptores CB1 e CB2. A AEA, por exemplo, ativa o receptor vanilóide 1 (TRPV1) e o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), enquanto o 2-AG ativa TRPV1 e o receptor GABA $_A$. O TRPV1 é um receptor ionotrópico que tem ampla expressão no sistema imune, sendo funcionalmente expresso em células gliais, especialmente na micróglia e astrócitos (KONG et al., *Modulation of neuroinflammation: Role and*

therapeutic potential of TRPV1 in the neuro-immune axis, 64, 354-366, 2017). O TRPV1 também é encontrado em terminais glutamatérgicos e GABAérgicos. O aumento da neurotransmissão glutamatérgica mediada pelo TRPV1 em condições neuroinflamatórias inibe a liberação de citocinas pela micróglia (SHEAHAM et al., *eNeuro*, 5 (2), 412-417, 2018).

[0010] O CBD tem diversos efeitos farmacológicos benéficos, incluindo propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Sabe-se que o aumento do estresse oxidativo e a disfunção imune são descritos no autismo (HUGHES et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 12, 405, 2018). A ação antioxidante do CBD inclui a redução da produção de espécies reativas ao oxigênio, redução dos níveis de óxido nítrico e prevenção da formação de radicais superóxido. Já a sua ação anti-inflamatória envolve a ativação do receptor PPAR γ , que por sua vez participa da modulação da inflamação inibindo a expressão de genes pró-inflamatórios (ATALAY et al., *Antioxidants*, 9, 21, 2019). Além disso, o CBD também atua na modulação da inflamação e do estresse oxidativo por meio da ativação de receptores TRP. Todos esses efeitos são mediados por alvos moleculares que incluem os receptores canabinóides e outros componentes do sistema endocanabinóide (Almeida; Devi, *Pharmacol Res Perspect.*, 8 (6), 682, 2020). O CBD tem baixa afinidade e é descrito como antagonista dos receptores CB1 e CB2, e seu mecanismo de ação está associado principalmente ao aumento dos níveis da AEA, uma vez que inibe a FAAH, aumentando sua biodisponibilidade (GASTON; SZAFIARSKI, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18:73, 2018). Sendo assim, a ativação dos receptores PPAR γ e TRP pelo CBD pode ser direta ou indireta via AEA, uma vez que esse endocanabinóide é agonista de ambos os receptores.

[0011] Atualmente o sistema endocanabinóide tem atraído um interesse considerável como potencial alvo terapêutico para numerosas condições patológicas, especialmente para a doenças do sistema nervoso central como o autismo (FRAGUAS-SÁNCHEZ; TORRES SUÁREZ, *Drugs*, 78, 1665-1703, 2018). É descrito que alterações no sistema endocanabinóide podem contribuir para a patogênese do autismo, uma vez que este sistema está envolvido na modulação da função sócio emocional e equilíbrio entre

excitação/inibição sináptica (ZOU et al., *International Journal of Developmental Neuroscience*, 76, 95-102, 2019; WU et al., *Neuropharmacology*, 162, 107736, 2020; WEI et al., *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1 (1), 81-89, 2016). Sendo assim, os fitocanabinóides podem apresentar um grande potencial farmacológico no tratamento do autismo devido a capacidade de atuar direta ou indiretamente em componentes do sistema endocanabinóide e modular as funções do sistema imunológico (ZAMBERLETTI et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 13, 367, 2019).

[0012] As barreiras biológicas limitam a biodisponibilidade em cerca de 90% dos agentes terapêuticos (CABRERA-PÉREZ; PHAM-THE, *Expert Opin. Drug Discov.*, 13 (6), 509-521, 2018). A capacidade de absorção intestinal das drogas é influenciada pelas propriedades físico-químicas da mesmas, capacidade de absorção das células epiteliais e a permeabilidade intestinal (LUNDQUIST et al., *Adv Drug Deliv Rev.*, 106, 256-276, 2016). Os canabinóides são moléculas altamente lipofílicas com solubilidade aquosa e biodisponibilidade oral muito baixa (BRUNI et al., *Molecules*, 23 (10), 2478, 2018). A baixa solubilidade em água gera uma fraca absorção e baixa biodisponibilidade intestinal, sendo assim, é importante utilizar mecanismos que melhorem a capacidade de absorção intestinal de fármacos lipofílicos. O uso da nanotecnologia tem sido uma estratégia promissora nesse sentido, uma vez que favorece mudança das propriedades físico-químicas e permite a formação de sistemas nanométricos que otimizam a absorção de fármacos (CHOUDHURY et al., *Int. J. Pharm.*, 565, 509-522, 2019; LAI et al., *Biomaterials.*, 211, 48-56, 2019; BOSE, *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.*, 10, 1-6, 2015).

[0013] A baixa biodisponibilidade oral dos canabinóides trouxe outros métodos viáveis de administração, como a via transdérmica descrita nos documentos WO2021023351A1, US10716766; intranasal presente em WO2020232379A1, WO2007032962A2; e, transmucosa como descrito em US2019000794A1, CA3060927A1. A administração de medicamentos através dessas vias permite o desvio do trato gastrointestinal e impede o metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado. No entanto, a via transdérmica e transmucosa tem mais efetividade local, apresentando uma baixa absorção sistêmica (HANNON, *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 43 (5), 508-511, 2020; ITIN et al.,

Expert. Opin. Drug Deliv., 16 (10), 1031-1035, 2019) e isso interfere na possível aplicação dos canabinóides contra o autismo. Além disso, a absorção transmucosa é questionável uma vez que a maior parte do fármaco administrado é lavado pelo fluxo de saliva e posteriormente ingerido (ITIN et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 581, 119276, 2020). Esse perfil de absorção indica que diferentes estratégias devem ser utilizadas para melhorar a absorção sistêmica dos canabinóides e abre novas possibilidades sob o ponto de vista industrial para o desenvolvimento de produtos nanotecnológicos.

[0014] As nanoemulsões são dispersões coloidais formuladas a partir de dois fluidos que são imissíveis entre si, estabilizados por um surfactante anfifílico, que apresentam um vesículas com tamanho médio de 100 nm (SINGH et al., *J. Control. Release*, 252, 28-49, 2017; ANTON; BENOIT; SAULNIER, *J. Control. Release*, 128, 185-199, 2008). O tamanho reduzido das vesículas presentes nas nanomeulsões aumentam a área de superfície e permitem uma estabilidade física de longo prazo, uma vez que o tamanho pequeno da gota evita fenômenos de desestabilização como coalescência e sedimentação. As nanoemulsões podem ser de duas categorias: água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) (BANKS, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 15, 275-292, 2016). Nanomulsões de água em óleo consistem em gotículas de água dispersas em uma fase oleosa, enquanto as emulsões de óleo em água contêm gotículas de óleo dispersas em uma fase aquosa (JAFARI; McCLEMENTS, *Academic Press: Cambridge, MA, USA*, 2018). Porém, aplicando um procedimento de duas etapas é possível obter múltiplas nanoemulsões, especificamente água em óleo em água (A/O/A) e óleo em água em óleo (O/A/O) (DELFANIAN et al., *Food Res. Int.*, 108, 136-143, 2018). Nanoemulsões de óleo em água são empregadas principalmente para estabilizar, proteger e distribuir os compostos bioativos lipofílicos devido ao seu encapsulamento na fase de óleo (ÖZTÜRK, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 119, 1500-539, 2017). Sendo assim, podem ser utilizadas para melhorar a solubilidade e/ou estabilidade das drogas. Isso por que as drogas hidrofóbicas se dissolvem na fase oleosa das nanoemulsões (SINGH et al., *J. Control. Release*, 252, 28-49, 2017).

[0015] As nanoemulsões podem ser elaboradas por meio de diferentes técnicas que podem ser classificadas em duas categorias, os métodos de alta energia e os métodos de baixa energia. Os métodos de alta energia incluem o ultrassom e a homogeneização de alta pressão, sendo caracterizados por forças disruptivas que quebram as fases oleosa e aquosa para produzir pequenas gotas de óleo, um processo que consome energia significativa. Os dispositivos utilizados são homogeneizadores microfluídicos, de ultrassom ou de alta pressão (ABBAS et al., *Food Eng. Rev.*, 2, 39-50, 2009; SANGUANSRI; AUGUSTIN, *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 547-556, 2006).

[0016] Os métodos de baixa energia envolvem processos físico-químicos específicos para produzir pequenas gotículas sem consumir energia. Nesses métodos as gotículas em nanoemulsões são formadas espontaneamente como resultado de transição de fase, quando a composição, as condições de operação e a temperatura são favoráveis (QIAN; McCLEMENTS, *Food Hydrocoll.*, 25, 1000-1008, 2011; GUPTA et al., *Soft Matter*, 12, 2826-2841, 2016). Os métodos de baixa energia mais comuns são: Emulsificação espontânea, na qual a fase aquosa que contém água e um surfactante hidrofílico é misturada com uma fase oleosa que consiste em óleo, solvente miscível em água e surfactante, a emulsificação ocorre quando ambas as fases estão em contato e não em estado de equilíbrio (BOUCHEMAL et al., *Int. J. Pharm.*, 280, 241-251, 2004); Emulsificação de membrana, na qual as gotículas são formadas através de uma membrana em uma fase contínua, é um método que requer menos surfactante em comparação aos métodos de alta energia; Deslocamento do solvente, na qual a fase orgânica consiste em compostos lipofílicos que são misturados em uma fase aquosa contendo surfactante. A formação da nanoemulsão ocorre devido à difusão rápida da fase orgânica para a fase aquosa (YIN et al., *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6754-6760, 2007); Ponto de inversão de fase, no qual a composição do sistema permanece o mesmo, mas a temperatura é variada a fim de alterar a afinidade de um surfactante para a fase de óleo ou água (SHINODA; SAITO, *J. Colloid Interface Sci.*, 26, 70-74, 1968; SHINODA; SAITO, *J. Colloid Interface Sci.*, 30, 258-263, 1969). Um resfriamento rápido é aplicado para quebrar as emulsões retidas no ponto de inversão de fase (ANTON et al., *Int. J.*

Pharm., 344, 44-52, 2007; IZQUIERDO et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 285, 388-394, 2005).

[0017] Emulsões de óleo em água são constituintes importantes de muitos produtos comerciais, incluindo alimentos (CA2788939A1; WO2020163138A2), suplementos (CN102512442A; US10722465B1), produtos farmacêuticos (WO2005027872A2; WO2016191700A1), cosméticos (WO2007014908A1; CA2644449A1), produtos de higiene pessoal (US10182980B2) e agroquímicos (CN105052902A; WO2008032328A2). Esse tipo de dispersão coloidal consiste em pequenas gotículas de óleo dispersas dentro de uma fase aquosa contínua (McCLEMENTS; JAVARI, *Advances in colloid and Interface*, 251, 55-79, 2017), e apresentam um tamanho de vesícula entre 1 e 200 nm (THAKKAR, et al., *J. Microencapsul.*, 32 (6), 559-69, 2015). O tamanho pequeno das vesículas aumenta a penetrabilidade nas membranas.

[0018] Diante do exposto, a formulação de uma nanoemulsão produzida a partir de óleo de milho rico em CBD traz uma nova perspectiva para o tratamento do autismo, uma vez que o CBD tem ações diretas sobre as alterações fisiopatológicas da doença e não há tratamento específico para a mesma. Além disso, por apresentar um tamanho de vesícula reduzido, a nanoemulsão pode permitir uma maior biodisponibilidade e proteção do CBD. A obtenção de um xarope nanotecnológico produzido a partir dessa nanoemulsão permite uma maior palatabilidade, deleta qualquer sabor amargo associado e reduz o grau de rejeição, considerando o processamento sensorial deficiente dos indivíduos autistas.

[0019] A patente US11154515B2 descreve composições farmacêuticas como formulações líquidas, cremes, pomadas, adesivos transdérmicos e sprays que contém CBD. As formulações são para uso oral, parenteral, sublingual, retal, transdérmico, transmucoso e via inalação. Aquelas para uso oral incluem emulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires cujos agentes solubilizantes e emulsificantes utilizados foram o álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, dimetilformamida, glicerol, álcool tetrahidrofurfuril, óleos (caroço de algodão, milho, amendoim, oliva, rícino,

gergelim ou outros óleos vegetais), polietilenoglicol, ésteres de sorbitano e suas combinações. O documento difere em composição e método da presente invenção por apresentar além de CBD, 10% de beta-cariofileno, 10% de THC e não se caracterizar como uma nanoemulsão.

[0020] A patente US10568848B2 descreve um método para tratamento de alterações comportamentais do autismo através da administração transdérmica de uma quantidade efetiva de CBD. As formas farmacêuticas descritas no documento incluem creme, pomada, óleo e gel para uso transdérmico. Adicionalmente, apresenta excipientes como diluentes, umectantes, agentes de suspensão, agentes de dispersão, agentes de volume, agentes espessantes, antioxidantes e modificadores de pH. O documento descrito difere da presente invenção em método, uma vez que não é uma nanoemulsão incorporada a um xarope para uso oral.

[0021] A patente BR102020004629 descreve um processo de produção de uma nanoemulsão O/A utilizada como agente encapsulante para testosterona, com a finalidade de incorporação a rações comerciais de peixe para promover reversão sexual, cujo material lipídico utilizado na fase oleosa foi óleo de milho. Difere da presente invenção em sua composição, uma vez que, apesar de ser uma nanoemulsão, a mesma foi incorporada com propionato de testosterona como agente indutor da reversão sexual, além disso, o óleo de milho utilizado não contém CBD. Adicionalmente, o produto descrito no documento tem aplicação na aquicultura, não sendo aplicável ao tratamento de doenças neurológicas como o autismo.

[0022] A patente WO2019153064A1 descreve uma composição terapêutica em excipiente a base de óleo vegetal, animal, mineral ou suas combinações, contendo CBD sintético ou natural para uso oral, sendo o óleo de milho o principal solvente oleoso utilizado. As formas farmacêuticas descritas nesse documento incluem cápsula de gelatina, cápsula mole, comprimido, comprimido revestido, comprimido orodispersível, comprimido efervescente, pastilha, xarope, suspensão e/ou solução. Como agentes adoçantes foram selecionados sucralose, sacarina, ciclamato de sódio, aspartame, sorbitol, xilitol, sucrose, sacarose, glicerol, neohesperidina e suas combinações. Os

conservantes utilizados foram o benzoato de sódio, sorbato de potássio, álcool benzílico e parabenos. Apresenta também excipientes como agentes antioxidantes, opacificadores, lubrificantes, desintegrantes e diluentes. Esse documento difere da presente invenção em sua composição e método, pois além do CBD apresenta outros canabinóides como o delta-9-tetrahydrocannabinol (0,06%), o delta-8-tetrahydrocannabinol (0,06%), o ácido canabidiólico metil éster (0,06%), o mentadienol (0,06%) e o olivetolato de metila (0,06%). Também não faz uso de nanotecnologia em seu processo de produção.

[0023] A patente WO2019207319A1 descreve preparações farmacêuticas isoladas da *Cannabis* sp. contendo cerca de 98% de CBD natural ou sintético e até 2% de outros canabinóides como THC, canabidivarin, canabidiol-C1 e canabidiol-C4 para tratamento de distúrbios neurodegenerativos e epilepsia. Essa preparação pode apresentar excipientes como amido, glicose, sacarose, lactose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno, glicol, óleo, água, etanol e semelhantes. Neste documento a formulação pode ser administrada na forma sólida ou líquida para administração oral, incluindo soluções ou suspensões aquosas ou não aquosas, tabletes para absorção lingual, sublingual ou sistêmica, bolos, pós, grânulos, pastas; administração parenteral por via subcutânea, intramuscular, intravenosa ou epidural; aplicação tópica como cremes, pomadas, adesivos ou sprays de liberação controlada para pele, pulmões ou cavidade oral; intravaginal ou intrarectal como pessário, creme ou espuma; ocular; transdérmica e nasal. O documento supracitado difere da presente invenção quanto ao método, pois a preparação farmacêutica é um extrato purificado de CBD, não constituindo uma nanoemulsão, conseqüentemente não foi aplicada nanotecnologia. Difere também quanto a composição, uma vez que apresenta uma pequena quantidade de outros canabinóides e é desprovida de agentes surfactantes e flavorizantes.

[0024] A patente WO2019135224A1 descreve a formulação de um xarope produzido a partir de uma emulsão O/A estável composta por canabinóides, óleo, agentes

emulsificantes, água e um excipiente intensificador de sabor. Os canabinóides descritos na formulação incluem CBD, ácido canabidiólico, THC, ácido tetrahydrocannabinólico, cannabigerol, canabicromene, canabinol, canabidielson, isotetrahydrocannabinol, canabicyclol, canabicitrano, cannabivarina, tetrahydrocannabivarina, canabidivarin, canabicromevarina, canabigerovarina e canabigerol éter monometílico, podendo estar isolados ou associados. Além dos canabinóides, a formulação descrita no documento inclui pelo menos um terpeno ou terpenóide essencialmente puro isolado de espécies de *Cannabis* sp., ou um óleo essencial. Os óleos utilizados na formulação são de origem vegetal e abrange óleo de milho, óleo de hortelã-pimenta, óleo de canola, óleo de semente de papoula, óleo de palma, óleo de soja, óleo de soja hidrogenado, óleo de gergelim, óleo de colza, óleo de semente de girassol, óleo de amendoim, óleo de rícino, óleo de rícino hidrogenado, óleo de semente de algodão, óleo de palmiste, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de borragem e combinações dos mesmos. Adicionalmente, a formulação apresenta pelo menos um emulsificante hidrofílico como ésteres de sacarose, polissorbato, óleo de rícino polioxil hidrogenado, tocoferol polietileno glicol succinato, glicerídeos de polioxil, poligliceril éster de ácido graxo e polímero cruzado de acrilato de alquila e suas combinações; e pelo menos dois emulsificantes hidrofóbicos como ésteres de ácido graxo de sacarose, estearato de sacarose, sacarose diestearato, palmitato de sacarose, poliestearato de sacarose, laurato de sacarose, ésteres de ácido graxo de sorbitano, ésteres de ácidos graxos poliglicerílicos e ésteres graxos de polioxietileno. A composição descrita apresenta também modificadores de viscosidade, agentes de suspensão, corantes, agentes mascaradores de sabor e antioxidantes. Açúcares, polímeros açúcar ou polímeros crioprotetores, como sacarose, lactose, manitol, xarope de sacarose, polivinilpirrolidona, copolímero cruzado de alquil acrilato, acrilato polímero e polissacarídeo também são descritos na formulação. O documento difere da presente invenção quanto a composição pois esta formulação contém terpenos ou terpenóides ou óleo essencial além de canabinóides. Difere quanto ao método, uma vez que, apesar de ser uma emulsão estável que pode ser produzida a partir de CBD e óleo de milho, e que pode constituir um xarope, a mistura canabinóide, óleo, emulsificante e terpeno foi submetida à aquecimento a uma temperatura de 75 °C antes de ser adicionada aos

outros excipientes. Os canabinóides são compostos termolábeis e podem degradar, evaporar ou se converter a outros metabólitos quando submetidos a altas temperaturas (OLEJAR; KINNEY, *Journal of Cannabis Research*, 3 (1), 40, 2021; DYBOWSKI et al., *Talanta*, 220, 121390, 2020). Finalmente, não contém em seu processo de produção etapas para a obtenção de nanoemulsão.

[0025] A patente WO2015068052A2 descreve formulações lipossomais de óleo de cannabis constituídas por um ou mais terpenos primários, secundários ou terciários, em combinação com um ou mais canabinóides ou análogos. A formulação apresentada possuem estabilizadores como goma guar, goma xantana, celulose, ácido hialurônico, polivinilpirrolidona, alginato, sulfato de condroitina, ácido poli-gama-glutâmico, gelatina, amido de milho ou farinha de trigo. O documento difere da presente invenção em composição e método, pois contém terpenos e outros canabinóides naturais ou sintéticos, além do CBD, a saber Δ 9-THC, Δ 8-THC, 11-hidroxi-THC, 11-hidroxi- Δ 9-THC, Δ -11-THC, levonantradol, tetrahydrocannabinol, dronabinol, anandamida e nabilone. Ainda, o documento descreve a utilização de lipossomas para incorporação dos terpenos e canabinóides. Lipossomas são sistemas vesiculares constituídos por uma ou mais bicamadas de fosfolídeos orientados concentricamente em torno de um meio hidrofílico aquoso (SHAH et al., *Adv. Drug Deliv. Ver.*, 154-155:102-122, 2020) e difere das nanoemulsões que são dispersões bifásicas entre dois líquido imissíveis estabilizadas por um surfactante anfifílico, conseqüentemente o método difere da presente invenção (SINGH et al., *J. Control. Release*, 252, 28-49, 2017).

[0026] Já a patente US20150343071A1 descreve o processo de obtenção de uma formulação farmacêutica líquida estável para administração oral contendo adoçantes, agentes flavorizantes conservantes e água, podendo ser alcoólica ou não, essencialmente a base de CBD (0,1 - 40%) associado à lipídeos (10 – 90%) para tratamento de doenças neurológicas, incluindo o autismo. Os lipídeos utilizados foram óleo de gergelim, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de milho, uma mistura de glicerídeos de decanoila e glicerídeos de octanoila, e suas combinações. Além disso é adicionada de de antioxidantes como hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, alfa tocoferol,

ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, ascorbato de sódio, ácido etilenodiamino tetraacético, hidrocloreto de cisteína, ácido cítrico, citrato de sódio, bissulfato de sódio, sulfato de sódio, metabissulfato de sódio, lecitina, propil galato e combinações; modificadores de pH como o ácido clorídrico, ácido ascórbico, ácido cítrico, citrato de sódio, ácido fumárico, hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio carbonato de sódio, carbonato de amônio e combinações; polietileno glicol; polipropileno glicol; e potenciadores de sabor como o ácido glicirretínico, além do CBD. Este documento difere da presente invenção quanto ao método por não se tratar de uma nanoemulsão.

[0027] A patente AU2012314129A1 descreve um processo de produção de uma composição farmacêutica para administração oral que contém CBD em sua formulação. O documento difere em composição e método da presente invenção por apresentar outros fitocannabinóides além do CBD, como o canabidivarin, o canabícromene e terpenos. Além disso, trata-se de um extrato não oleoso, não se caracteriza como uma nanoemulsão, não é um xarope e foi formulada para o tratamento de alterações neurológicas caracterizadas pela hiperexcitabilidade, como a epilepsia.

[0028] A patente WO2009020666 descreve uma formulação farmacêutica líquida de cannabinóides para uso oral que utiliza água como solvente, podendo ser utilizada para administração intrapulmonar, oral, sublingual, transdérmica, intravenosa e oftálmica. O documento difere da presente invenção em composição e método, pois utiliza solventes orgânicos como etanol, glicol, propileno glicol, polietileno glicol ou suas combinações e utiliza como princípio ativo o dronabinol ou Δ^9 -THC. Além disso, não se caracteriza como uma nanoemulsão e a formulação para uso oral não é um xarope.

[0029] A patente US2008057117A1 descreve uma composição farmacêutica compreendendo cápsulas de gelatina para uso oral em dose única produzida a partir de extrato de *Cannabis sativa* que contém CBD. No entanto, o documento difere em composição da presente invenção, uma vez que contém pelo menos 80% de THC associado ao CBD (relação THC:CBD = 2:1), e 20% de outros cannabinóides. Difere também da presente invenção quanto ao método, pois trata-se de um extrato, não se caracterizando como uma nanoemulsão, e não é um xarope.

[0030] A patente US7025992B2 descreve uma formulação farmacêutica contendo canabinóides para uso transmucoso (sublingual). Trata-se de um agente auto emulsificante que forma uma emulsão ao entrar em contato com a saliva. Para elaboração da formulação utilizou-se um agente lipofílico (canabinóides); agentes auto emulsificantes como surfactantes não-iônicos ou compostos quaternários, especificamente o monooleato de glicerila e o monoestearato de glicerila; agentes espessantes como o amido, carboximetil celulose, acácia, polidextrose, gelatina ou glicogelatina; anti-oxidantes como o alfa tocoferol, palmitato de ascorbila ou hidróxido butirato anisol. Os canabinóides foram dissolvidos em etanol e, para evitar a sensação picante promovida pelo excesso de etanol, foi utilizado em associação um co-solvente, especificamente o óleo de rícino etoxilado. As formas farmacêuticas descritas na patente citada inclui gel sólido, pastilha, comprimido, cápsula e gel em spray. O documento difere da presente invenção quanto a composição uma vez que foi utilizado uma combinação de dois ou mais canabinóides, entre eles o Δ 9-THC e seu análogo, o CBD e seu análogo, o canabicromene e seu análogo, o canabinol e o canabigerol. O documento difere também quanto ao método, pois não utilizou nanotecnologia e não é um xarope.

[0031] A partir da avaliação do estado da técnica, não foram encontrados documentos que divulguem elementos da invenção descrita, sendo a mesma caracterizada como nova.

Descrição da invenção

[0032] O óleo de milho rico em CBD foi produzido a partir de um extrato etanólico obtido a partir da flor da *Cannabis* sp. O CBD foi purificado através de cromatografia por partição centrífuga (CFC) e em seguida incorporado em óleo de milho. Nesta formulação, o óleo de milho com CBD foi utilizado na fase oleosa no processo de produção. Outros óleos fixos podem ser utilizados no processo de produção da nanoemulsão como canola, algodão e soja.

[0033] Como agentes conservantes do produto foram empregados parabenos que podem ser incorporados no processo de produção da nanoemulsão para evitar a

proliferação de microrganismos e prolongar a vida útil do produto. Foi utilizado, preferencialmente, solução alcoólica de propilparabeno a 0,04%. Outros conservantes podem ser utilizados.

[0034] A nanoemulsão foi elaborada a partir de uma fase aquosa e oleosa. A fase aquosa foi composta por 60 – 80% de água preferencialmente 70% e por 5 – 20% de polissorbato 80 (Tween 80) preferencialmente 10%, submetida a agitação lenta e constante. A fase oleosa foi composta por 5 – 20% de óleo de milho rico em CBD preferencialmente 10%, nas concentrações de 0,5, 1 e 2% ou 5 – 20% de óleo de milho (nanoemulsão branca), e por 5 – 20% de monooleato de sorbitano 80 (Span 80), preferencialmente 10%, submetida a homogeneização sob agitação lenta e constante. No processo de preparação da nanoemulsão as fases oleosa e aquosa foram preparadas separadamente antes de se iniciar a mistura.

[0035] Após a homogeneização da fase aquosa, foi adicionado nesta fase, ainda sob agitação, a solução alcoólica de conservante, permanecendo em agitação constante para a completa evaporação do álcool. Em seguida, a fase oleosa foi vertida suavemente na fase aquosa que permaneceu sob vigorosa agitação até a obtenção do tamanho nanométrico. O tempo e velocidade de agitação devem ser ajustados de acordo com o processo industrial utilizado para a obtenção de vesículas entre 80 – 120 nm. O método aqui descrito se baseou no uso de agitação mecânica por ser simples de ser implantado em escala industrial, mas outros métodos de agitação para a produção de nanoemulsões também podem ser utilizados como a agitação em *ultraturrax*.

[0036] Para formulação do xarope nanotecnológico, primeiramente foi produzido um xarope simples como veículo, contendo preferencialmente 85% de açúcar como frutose, glicose e maltose, mas preferencialmente sacarose. Para elaboração desse veículo, o açúcar foi dissolvido em água purificada mantida em banho-maria, com temperatura entre 50 e 70 °C, mas preferencialmente 60 °C, sob agitação constante. Após a completa dissolução do açúcar, a solução foi mantida em temperatura ambiente e após o resfriamento, o volume foi ajustado com água purificada.

[0037] Após o preparo do xarope simples foi adicionado um agente antimicrobiano do tipo sal de sódio orgânico, como o benzoato de sódio, ou do grupo dos parabenos, preferencialmente o propilparabeno. Porém, outros agentes antimicrobianos comerciais podem ser adicionados a essa formulação. Um agente flavorizante também pode ser incorporado ao xarope a fim de se conferir sabor característico, como preferencialmente menta, framboesa, morango, pêssego, laranja e cereja.

[0038] Para finalização do xarope nanotecnológico, a nanoemulsão foi misturada ao xarope simples e submetida a agitação leve e constante. Adicionalmente, xaropes comerciais disponíveis podem ser utilizados para incorporar a nanoemulsão desde que mantenha a concentrações de CBD em valores compatíveis com os descritos nos exemplos em modelo murino que tiveram atividade biológica contra autismo. Para melhor compreensão dos métodos de produção e testes biológicos, apresentamos os exemplos a seguir do potencial biotecnológico da nanoemulsão e do xarope em modelo murino conforme protocolo aprovado pela CEUA-UFRPE nº 2881210120 (ID000084).

Exemplo 1: Método de produção da nanoemulsão em escala de bancada.

[0039] As nanoemulsões O/A foram produzidas a partir de uma fase oleosa constituída por um homogenato de 5 – 20% de óleo de milho rico em CBD nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL ou 5 – 20% de óleo de milho (nanoemulsão branca), e 5 – 20% de Span 80. Esta fase foi homogeneizada em temperatura ambiente com o auxílio de um agitador magnético por um período de 5 min a 500 RPM. A fase aquosa foi produzida separadamente e preparada com 60 – 80% de água e 5 – 20% de Tween 80, sendo em seguida homogeneizada por 5 min a 500 RPM. Em seguida foi preparada uma solução contendo 40 mg de propilparabeno em 1 mL de álcool absoluto, com finalidade conservante. A solução alcoólica foi adicionada a fase aquosa e, para evaporação completa do álcool, esta fase permaneceu sob agitação por mais 5 min. Posteriormente a fase oleosa foi vertida na fase aquosa por gotejamento, que permaneceu sob agitação por um período de 20 horas a 1500 RPM para obtenção do tamanho nanométrico.

Exemplo 2: Estabilidade da nanoemulsão segundo protocolo da ANVISA

[0040] As características organolépticas das nanoemulsões foram avaliadas segundo protocolo da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004) quanto ao seu aspecto visual, cor e odor, sendo classificadas pelos seguintes parâmetros: Fase da dispersão: Homogênea ou Heterogênea; Aspecto (grumos): Presentes ou Ausentes; Consistência: Fluída, Pouco Espessa, Espessa ou Muito Espessa; Opacidade: Translúcido, Pouco Opaco ou Opaco; Odor: Presente ou Ausente; Cor: Presente ou Ausente.

[0041] A Todas as nanoemulsões se mostraram homogêneas, com ausência de grumos e ausência de odor. As formulações tiveram uma consistência fluida, porém a nanoemulsão produzida com óleo de milho rico em CBD na concentração de 2% se mostrou levemente espessa. Com relação a opacidade, todas as nanoemulsões se apresentaram opacas devido à adição do conservante propilparabeno. Quanto a cor, as formulações mostraram um tom levemente amarelado conforme o aumento da concentração do óleo rico em CBD.

[0042] Para avaliar a estabilidade das nanoemulsões, após o preparo a mesmas foram submetidas à centrifugação a 1210 g por 30 min (Centrífuga Kacil CE-01). Em seguida avaliou-se a fase de dispersão: homogênea ou heterogênea. As nanoemulsões também foram submetidas ao estresse térmico, permanecendo 24 horas sob resfriamento (5 ± 2 °C), congelamento (-20 ± 2 °C) e aquecimento (40 e 50 ± 2 °C). Posteriormente as formulações permaneceram em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por aproximadamente 1 h e as características organolépticas foram novamente avaliadas e verificou-se os seguintes fatores: Fase da dispersão: Homogênea ou Heterogênea; Aspecto (grumos): Presentes ou Ausentes; Consistência: Fluída, Pouco Espessa, Espessa ou Muito Espessa; Opacidade: Translúcido, Pouco Opaco ou Opaco; Odor: Presente ou Ausente; Cor: Presente ou Ausente. As nanoemulsões submetidas ao resfriamento, congelamento e aquecimento não apresentaram alterações físicas macroscópicas após retornarem à temperatura ambiente indicando boa estabilidade.

Exemplo 3: Análise das características físico-químicas da nanoemulsão

[0043] Para avaliar o tamanho médio, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta da nanoemulsão, as amostras de nanoemulsão branca (óleo de milho) e com óleo de milho rico em CBD nas concentrações de 5 (CBD0,5%), 10 (CBD1,0%) e 20 (CBD2,0%) mg/mL foram analisadas mediante o uso de um Zetasizer Nano ZS (Marvern). Para redução da turbidez das nanoemulsões, as mesmas foram diluídas em água ultrapura tipo 1 antes de serem submetidas a análise. A avaliação do tamanho médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ - mV) das vesículas foi feita através da técnica de espectroscopia de correlação de prótons padrão (PCS) fixado 90° a 25° C utilizando um Zetasizer Nano ZS (Marvern) (CADENA et al., BBA, 1828:309-316, 2013). As análises foram feitas em triplicata.

[0044] A nanoemulsão contendo óleo de milho sem CBD apresentou um tamanho médio de $87,5 \pm 1,0$ nm, enquanto a nanoemulsão contendo óleo de milho rico em CBD nas concentrações 0,5%, 1% e 2% apresentaram um tamanho médio de $107,6 \pm 1,1$ nm, $90,4 \pm 1,3$ nm e $72,6 \pm 0,4$ nm, respectivamente. Todas as formulações de CBD se caracterizaram como nanoemulsão, pois possuem vesículas com tamanho médio inferior a 200 nm. Entretanto, observou-se que a nanoemulsão de óleo de CBD a 2% mostrou um tamanho de vesícula mais reduzido em relação à nanoemulsão de óleo de CBD a 1%. Já a nanoemulsão de óleo de CBD a 0,5%, apresentou tamanho médio de vesícula maior que a nanoemulsão de óleo de CBD a 1%. Isso mostra que a presença do CBD modifica o tamanho da nanoemulsão e que o aumento da concentração de CBD diminui o tamanho da vesícula.

[0045] O PDI é utilizado para descrever o grau de uniformidade de distribuição do tamanho das vesículas, sendo também conhecido como índice de heterogeneidade. Um PDI com valor menor que 0,05 indica um padrão altamente monodisperso, ou seja, homogêneo, enquanto um valor maior que 0,7 indica que a amostra tem uma distribuição de tamanho de partícula muito ampla, heterogênea (DANAELI et al., *Pharmaceutics*, 10, 57, 2018). Os valores de PDI das nanoemulsões de óleo de milho rico em CBD nas concentrações 0,5%, 1% e 2% foram de 0,432, 0,360 e 0,290, respectivamente,

enquanto a nanoemulsão contendo óleo de milho sem CBD apresentou um PDI de 0,327. Esses valores indicam que as formulações são homogêneas, pois apresentam um PDI inferior à 0,7. Além disso, o valor do PDI se mostrou inversamente proporcional a concentração de CBD.

[0046] O potencial zeta é frequentemente usado para determinar a carga superficial de uma vesícula, podendo a mesma ser catiônica, aniônica ou de caráter neutro. Valores negativos indicam uma maior interação das forças de repulsão entre as vesículas, o que assegura uma estabilidade (SMITH et al., Anal Bioanal. Chem., 409 (24), 5779-5787, 2020). A nanoemulsão contendo apenas óleo de milho mostrou um potencial de zeta de $-40,6 \pm 0,1$ mv. Já as nanoemulsões contendo óleo de milho rico em CBD nas concentrações 0,5%, 1% e 2% apresentaram um potencial zeta de $-30,2 \pm 1,3$ mv, $-26,0 \pm 3,6$ mv e $-24,9 \pm 0,1$, respectivamente. O potencial zeta obtido em todas as formulações apresentaram valores negativos, indicando uma boa estabilidade. Além disso, foi observado que a presença do CBD alterou o potencial zeta da nanoemulsão, de forma que quanto maior a concentração de CBD menor o potencial zeta.

Exemplo 4: Produção do xarope nanotecnológico em escala de bancada

[0047] Para compor o xarope nanotecnológico foi produzido um xarope simples contendo 85 gramas de sacarose. A sacarose foi dissolvida em 50 mL de água purificada e mantida em banho-maria sob uma temperatura entre 50 e 70 °C e agitação constante. Após a dissolução do açúcar, a solução foi mantida em temperatura ambiente e após o resfriamento, o volume foi completado com água purificada para um volume final de 100 mL.

[0048] Após o preparo do xarope simples foi adicionado um agente antimicrobiano do grupo dos parabenos e um agente flavorizante. Para finalizar o xarope nanotecnológico, 100 mL da nanoemulsão foi misturada ao xarope simples na proporção 1:1 e submetida a agitação leve e constante para manter a concentração de CBD em 1%. O xarope produzido se mostrou homogêneo sem separação de fases.

Exemplo 5: Teste do labirinto em cruz elevado em modelo murino

[0049] Para avaliação do comportamento de ansiedade dos animais foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado. A ansiedade dos animais é avaliada pelo tempo de permanência e número de entradas no braço fechado, de forma que quanto maior o tempo de permanência e o número de entradas neste braço, maior o nível de ansiedade dos animais. A permanência no braço aberto é considerada um comportamento normal. O labirinto foi feito com acrílico branco com dois braços abertos e dois braços fechados cruzados perpendicularmente formando uma cruz com uma área central de 10 x 10 cm. O labirinto foi montado sobre uma plataforma elevada a 50 cm do chão. No sexagésimo primeiro dia pós nascimento, cada animal foi colocado individualmente no quadrado central com a cabeça voltada para o braço fechado. Cada rato explorou o labirinto livremente por um período de 5 minutos. As sessões foram filmadas e foram avaliados o número de entradas e o tempo de permanência em cada braço. A avaliação foi feita manualmente por meio das análises posteriores dos vídeos. Verificou-se que os animais autistas permaneceram mais tempo no braço fechado, sugerindo um comportamento de ansiedade que frequentemente ocorre em indivíduos autistas, assim como em ratos com autismo induzido por ácido valpróico. Por sua vez, os animais controle mostraram uma porcentagem maior de tempo no braço aberto, comportamento considerado normal nesse teste. O tratamento com a nanoemulsão O/A contendo óleo de milho rico em CBD na concentração de 10 mg/mL reduziu o tempo de permanência dos animais autistas no braço fechado e atenuou a redução no tempo de permanência no braço aberto, sugerindo uma diminuição da ansiedade observada nesses animais. Os animais autistas também mostraram uma redução do número de entradas no braço aberto e um aumento no número de entradas no braço fechado em relação aos animais controle. No entanto, o tratamento com a nanoemulsão O/A contendo óleo de milho rico em CBD na concentração de 10 mg/mL reverteu esse efeito, aumentando o número de entradas no braço aberto e atenuando o número de entradas no braço fechado.

Exemplo 6: Teste de campo aberto em modelo murino

[0050] O teste de campo aberto avaliou a atividade locomotora e exploratória dos animais (ratos), ou seja, o desempenho motor e a capacidade de exploração de um novo ambiente. O teste foi realizado em uma arena quadrangular de madeira (66 x 57 x 40 cm³) com o assoalho preto. Para estimular a exploração dos animais as paredes maiores da caixa apresentavam 6 orifícios e as menores 4 orifícios de 2 cm de diâmetro igualmente distribuídas. No sexagésimo segundo dia pós nascimento, os animais foram colocados individualmente na caixa e deixados explorar livremente o ambiente por 5 minutos. As sessões foram filmadas e os comportamentos de locomoção (movimentação pela arena), farejamento (inserção do focinho nos orifícios presentes na parede da arena) e levantamento (levantar-se sobre as patas posteriores) foram analisados manualmente. Os animais autistas mostraram uma redução na distância total percorrida quando comparado aos animais controle, e o tratamento com a nanoemulsão O/A contendo óleo de milho rico em CBD na concentração de 10 mg/mL e 20 mg/mL atenuou esta redução da atividade locomotora dos autistas. Ainda, os animais autistas tratados mostraram um aumento no número de levantamentos tanto em relação aos animais controle quanto em relação aos autistas não tratados, inferindo que o tratamento com a nanoemulsão O/A contendo óleo de milho rico em CBD induz esse comportamento nos animais.

Exemplo 7: Teste de interação social em modelo murino

[0051] O teste de interação social avaliou a preferência do animal em explorar um objeto a interagir socialmente com outro animal (sociabilidade), e a preferência entre interagir com um indivíduo familiar e um desconhecido (preferência social). O teste foi realizado em uma caixa de madeira (105 x 60 x 35 cm³) dividida internamente em três compartimentos semelhantes (35 x 60 x 35 cm³). Antes do início do teste, os animais foram habituados a caixa explorando livremente o ambiente por 10 minutos. Para avaliar a sociabilidade (primeira fase) foram utilizadas duas gaiolas de metal, uma vazia e outra com um rato desconhecido, que foram colocadas nos compartimentos das extremidades da caixa. Para avaliar a preferência social (segunda fase), um novo rato (desconhecido) foi colocado na gaiola que estava previamente vazia. O compartimento central ficou livre

nas duas fases do teste. No sexagésimo quarto dia pós nascimento, os animais foram colocados individualmente no compartimento central da caixa, onde os mesmos permaneceram por 10 minutos explorando livremente todos os compartimentos. No teste foram avaliados o tempo de permanência com o objeto e com o rato não familiar, assim como o tempo de permanência com o rato familiar e o desconhecido. Foram também avaliados o índice de sociabilidade e o índice de preferência social, que consiste na razão entre o tempo de permanência com o rato não familiar (sociabilidade) ou rato desconhecido (preferência social) e o tempo total de exploração x 100. Cada sessão foi filmada e analisada manualmente. No teste de sociabilidade os animais do grupo controle exibiram preferência pelo indivíduo (rato não familiar), comportamento esperado, enquanto os autistas passaram mais tempo com o objeto (gaiola vazia), mostrando uma sociabilidade reduzida. Com relação a preferência social os autistas passaram menos tempo com o rato desconhecido e mais tempo com o familiar, comportamento considerado comum em autistas. O tratamento com a nanoemulsão O/A contendo óleo de milho rico em CBD em ambas as concentrações atenuou a redução no tempo de permanência dos animais autistas com o rato não familiar e reduziu o tempo de permanência com o objeto, inferindo uma melhora na sociabilidade dos animais, o que foi reproduzido no índice de sociabilidade.

REIVINDICAÇÕES

1. “COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO ÓLEO RICO EM CANABIDIOL” **caracterizada por** um processo de produção de uma nanoemulsão a partir de uma fase oleosa composta por óleo rico em CBD e surfactante compreendendo o monooleato de sorbitan 80 vertida suavemente em uma fase aquosa composta por surfactante compreendendo polissorbato 80, água e conservantes, sendo a dita nanoemulsão incorporada a um xarope com conservantes para uso na terapêutica do autismo.

2. “COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO ÓLEO RICO EM CANABIDIOL”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** presença de um fitocanabinóide, o canabidiol, isolado a partir de extrato de *Cannabis* sp. e incorporado em óleo de milho compreendendo concentrações entre 0,5 e 2%.

3. “COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO ÓLEO DE MILHO RICO EM CANABIDIOL” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelos** conservantes utilizados na fase aquosa da dita nanoemulsão e no xarope serem do grupo dos parabenos.

4. “COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO ÓLEO DE MILHO RICO EM CANABIDIOL” de acordo com a reivindicação

1, **caracterizada pelo** xarope nanotecnológico ser produzido a partir de um xarope simples composto por 85% de sacarose, água, um agente conservante e um flavorizante.

5. “COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO ÓLEO DE MILHO RICO EM CANABIDIOL” **caracterizada por** um produto que consiste em um xarope nanotecnológico composto por nanoemulsão rica em canabidiol para o tratamento do transtorno do espectro do autismo.

RESUMO

**“COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÃO FARMACEUTICA, XAROPE
NANOTECNOLÓGICO PARA A TERAPEUTICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO
DO AUTISMO PRODUZIDA A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA
CONTENDO ÓLEO RICO EM CANABIDIOL”**

A presente patente de invenção descreve um processo de obtenção de uma nanoemulsão O/A obtida a partir de um óleo rico em canabidiol. A nanoemulsão é incorporada a um xarope simples para a produção de um xarope nanotecnológico com alta palatabilidade. Esse xarope pode ser utilizado para o tratamento do transtorno do espectro do autismo e suas comorbidades, pois se mostrou efetivo na reversão de comportamentos característicos da doença em modelo murino, após caracterização prévia da dita nanoemulsão, o que pode possibilitar a melhoria na qualidade de vida de indivíduos autistas.