UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de toxicidade de psicofármacos com potencial terapêutico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado(a): Tamires Amabile Valim Brigante

Orientador(a): Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia em 31/05/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2019

RESUMO

BRIGANTE, T.A.V.. **Avaliação de toxicidade de psicofármacos com potencial terapêutico**. 2019. 92f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O canabidiol (CBD) é um composto encontrado na espécie *Cannabis sativa* que já teve sua eficácia reconhecida para o tratamento de epilepsia grave, além de atualmente ser estudado para o tratamento de diversas doenças do sistema nervoso. Medicamentos à base de canabidiol já são utilizados em diversos países. No Brasil, a liberação tem sido discutida e com importantes avanços desde 2014. A Ayahuasca é um chá psicoativo originário da Amazônia, amplamente utilizado por tribos indígenas e seitas religiosas. A Ayahuasca tem sido recentemente estudada por seu amplo potencial terapêutico para tratar distúrbios psiquiátricos, como ansiedade, depressão, vícios em drogas de abuso e doenças degenerativas. Dentro deste contexto, para garantir a segurança da população que poderá fazer uso dessas substâncias é essencial que estudos de toxicidade sejam realizados. Para avaliar a toxicidade intrínseca das substâncias foram realizados ensaios de neurotoxicidade e teratogenicidade. O organismo-teste utilizado para estes ensaios foi o *zebrafish* devido a diversas vantagens apresentadas por este organismo, sendo as principais delas, a transparência do córion e da larva que permite a observação das estruturas internas, e a semelhança do código genético com de mamíferos. Desta forma, o presente trabalho visa fornecer subsídios para a avaliação da segurança do CBD, de um derivado sintético de CBD e ayahuasca, por meio da avaliação de toxicidade utilizando abordagens diferentes empregando embriões de *zebrafish*. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima envolvida nas vias de neurotransmissão sináptica. Sua atividade tem sido amplamente utilizada como biomarcador em estudos de neurotoxicidade. A AChE é expressa cedo em *zebrafish*, desde o estágio embrionário. Neste trabalho, a atividade da AChE foi avaliada pelo teste de Ellman adaptado para microplaca. Um planejamento experimental foi utilizado para otimizar o preparo de amostra para essa análise. DanioScope é um software que permite avaliar alterações morfológicas e comportamentais precoces no *zebrafish*. O uso deste software no laboratório foi implementado e padronizado pelo desenvolvimento deste trabalho. Nenhuma malformação foi observada na análise morfológica de embriões expostos a todas as concentrações testadas de CBD e derivado sintético de CBD. No entanto, houve atraso na eclosão após exposição ao CBD (EC50 = 754 µg/L) e após a exposição ao derivado sintético do CBD (EC 50 = 776 µg/L). Além disso, a exposição a estes canabinóides resultou em aumento da atividade motora em 24 hpf com LOEC para a exposição ao CBD de 20 µg/L e ao derivado sintético do CBD, LOEC de 70 µg/L). Esta diferença encontrada na atividade motora não se mantes nos demais períodos avaliados. Os embriões expostos ao CBD não apresentaram diferenças na atividade da acetilcolinesterase. A exposição à Ayahuasca na maior concentração testada (1000 ppm) resultou em redução da taxa de embriões com bexiga natatória inflada (<10%). Além disso, esta concentração de ayahuasca afetou o desenvolvimento dos olhos já que a medida da área dos olhos mostrou-se reduzida nos embriões expstos à esta concentração. Em menores concentrações, a exposição à ayahuasca não alterou o desenvolvimento dos embriões no período testado.

Palavras-chave: Canabidiol; Ayahuasca; Avaliação de Toxicidade; Zebrafish.

1 Introdução

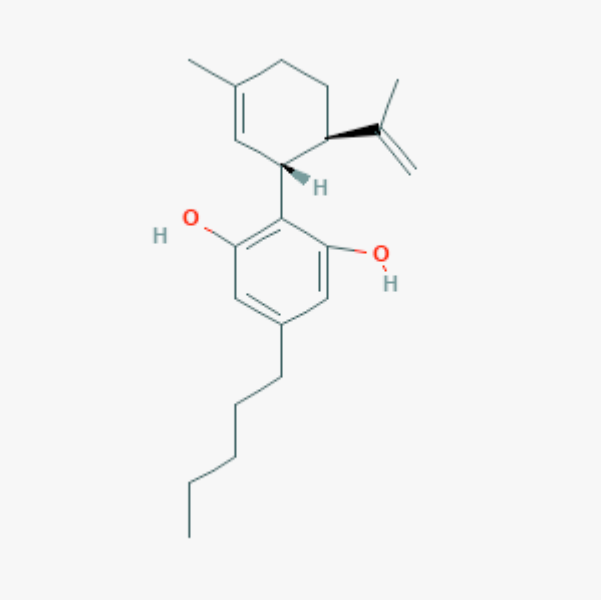
1 INTRODUÇÃO

1.1 Substâncias com potencial para uso terapêutico no tratamento de desordens psiquiátricas

Cannabis sativa é uma planta que tem sido usada com finalidade medicinal por milênios e em diversos países. As primeiras evidências de cultivo da *Cannabis sativa* datam de 4000 anos antes de Cristo (a.C) na China. No Ocidente, há evidências de seu uso medicinal a partir de meados do século XIX, com diminuição do interesse clínico no início do século XX (ZUARDI, 2006).

Os compostos mais estudados da *Cannabis sativa* são o Δ^9-tetra-hidrocanabinol (THC) e o canabidiol (CBD). O THC tem ação psicoativa, causando alterações de percepção e comportamento, o que estimula o uso recreativo e o abuso da planta. Já o canabidiol (Figura 1) é um componente não psicoativo da *Cannabis sativa*, e tem sido estudado devido a seu potencial terapêutico para o tratamento de inúmeras desordens psiquiátricas (CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010).

Figura 1 – Estrutura química do canabidiol



Fonte: PubChem Database, 2019

O potencial terapêutico do CBD é devido à interação com o sistema nervoso central (SNC) em várias vias, incluindo a interação com o sistema endocanabinóide, receptores de serotonina e mecanismos intracelulares (CAMPOS et al., 2012; IZZO et al., 2009). O CBD já

teve sua eficácia reconhecida para o tratamento de epilepsia grave, apesar do mecanismo de ação e segurança a longo prazo não estarem bem elucidados (DEVINSKY et al., 2014). Além disso, esta substância tem sido estudada para o tratamento de diversas doenças do sistema nervoso, como esclerose múltipla, depressão, ansiedade e no tratamento dos sintomas psicóticos na doença de Parkinson (BRUCKI et al., 2015; CHAGAS et al., 2014; DEVINSKY et al., 2014; WALDO ZUARDI et al., 2012).

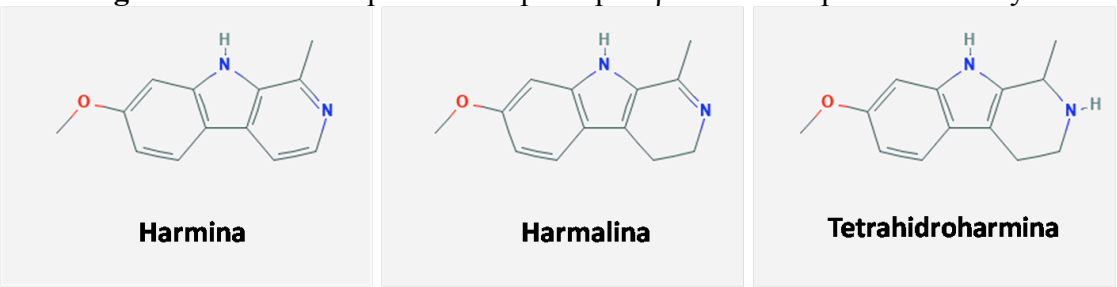
Medicamentos à base de canabidiol já são utilizados em vários países, como Estados Unidos e Canadá. No Brasil, a liberação tem sido discutida e com importantes avanços nos últimos anos. No ano de 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autorizou a prescrição e importação do CBD em mais de 200 casos de pacientes com epilepsia grave (BRUCKI et al., 2015). Em 2015, a Agência retirou o canabidiol da lista de substâncias proibidas, facilitando assim a importação do fármaco pelos pacientes. No final de 2016, o canabidiol passou a integrar a lista de substâncias vendidas no Brasil sob prescrição do tipo A, portanto tendo a tarja preta em sua embalagem. Essa decisão foi importante, pois a partir dela as indústrias farmacêuticas podem pedir o registro de medicamentos à base do CBD. Em janeiro de 2017, a ANVISA aprovou o primeiro medicamento à base de canabinóides, o Mevatyl®, que contém CBD e THC e é indicado como parte do tratamento para esclerose múltipla. E em maio de 2017, a ANVISA incluiu a *Cannabis sativa* na lista de plantas medicinais, passando a integrar agora a lista de Denominações Comuns Brasileiras, medida tomada também como esforço para facilitar o registro de medicamentos pelas indústrias (ANVISA, acesso em abril de 2018). Considerando esses avanços, diversos grupos têm desenvolvido moléculas análogas ao canabidiol para aumentar a eficácia, pureza e melhorar as características farmacodinâmicas e farmacocinéticas do CBD (MORALES; REGGIO; JAGEROVIC, 2017).

Além do CBD, outro derivado de planta amplamente utilizado para outras finalidades tem sido recentemente estudado para uso terapêutico: a Ayahuasca (AYA). A Ayahuasca é um chá psicoativo obtido pela infusão do caule de *Banisteriopsis caapi* e folhas de *Psychotria viridis*, plantas originárias da Amazônia. A AYA é amplamente utilizada por tribos indígenas e grupos religiosos como Santo Daime e União do Vegetal. O interesse por essas religiões se espalhou pelo mundo todo, aumentando o uso deste chá em diversas regiões (DOMÃ-NGUEZ-CLAVÃ© et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016).

A *Banisteriopsis caapi* contém os alcalóides harmina, harmalina e tetrahidroharmina (Figura 2), que também são conhecidos como beta-carbolinas, devido a presença da estrutura

tricíclica beta-carbolina nesses alcalóides. As beta-carbolinas agem bloqueando, de forma reversível, a atividade da enzima monoamina-oxidase (MAO). A MAO é responsável pela metabolização de neurotransmissores endógenos, assim como pela metabolização de aminas exógenas. O bloqueio da atividade da MAO é um reconhecido mecanismo antidepressivo, já que aumenta os níveis de neurotransmissores como a serotonina, dopamina e noradrenalina (DOMÃ-NGUEZ-CLAVÃ© et al., 2016).

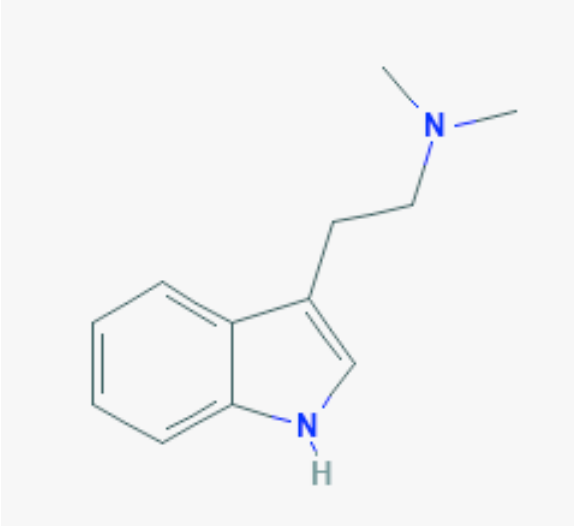
Figura 2 – Estrutura química das principais β-carbolinas presentes na Ayahuasca



Fonte: PubChem Database, 2019

O principal componente da *Psychotria viridis* é a N, N-dimetiltriptamina (DMT), que é uma amina psicodélica metabolizada pela MAO. A estrutura química do DMT é mostrada na Figura 3. O DMT interage com diversos receptores do sistema nervoso central e pode causar efeitos sensoriais, como alucinações e alterações fisiológicas. A interação do DMT com as beta-carbolinas resulta em efeitos específicos já que as beta-carbolinas inibem a metabolização do DMT, permitindo a circulação sistêmica dessa substância e possibilitando que alcance o sistema nervoso central e desenvolva sua ação. Um dos mais importantes mecanismos do DMT é o agonismo aos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{1C} da serotonina (DOMÃ-NGUEZ-CLAVÃ© et al., 2016). O agonismo ao receptor 5-HT_{2A} tem sido descrito para diversas substâncias alucinógenas, porém o agonismo ao receptor 5-HT_{1A} tem sido associado a efeitos antidepressivos e ansiolíticos. Além disso, o DMT também interage com receptores envolvidos no combate ao estresse oxidativo, atuando como antioxidante indireto (DOMÃ-NGUEZ-CLAVÃ© et al., 2016; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016).

Figura 3 – Estrutura química da dimetiltriptamina



Fonte: PubChem Database, 2019

Nos últimos anos, a AYA tem sido amplamente estudada devido a seu potencial para uso terapêutico no tratamento de distúrbios psiquiátricos. Santos et.al. em estudo realizado em 2007, associaram o uso da AYA com redução significativa da desesperança e dos sintomas de pânico (SANTOS et al., 2007). Barbosa et. al. em 2005, associaram a ingestão de AYA à redução da intensidade de sintomas psiquiátricos menores após uma semana do uso da AYA durante cerimônia religiosa (BARBOSA et al., 2005 apud SANTOS et al., 2016). Moraléz-García et. al. demostraram em 2017, em estudo realizado *in vitro*, que as beta-carbolinas promovem neurogênese de células de adultos, que contribui para efeitos antidepressivos (MORALES-GARCÍA et al., 2017). A AYA tem sido estudada também para o tratamento de doenças neuro-degenerativas, como a doença de Alzheimer e Parkinson, e no combate ao abuso de drogas (DOS SANTOS et al., 2016; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016).

Para compreender o potencial do Canabidiol e da Ayahuasca de causar danos à saúde nas condições em que estão sendo estudadas para uso terapêutico é importante que se faça a avaliação de toxicidade dessas substâncias. Assim, neste trabalho realizamos diversos ensaios com diferentes abordagens visando contribuir para a avaliação da segurança do uso destes compostos em doses terapêuticas.

1.2 Avaliação de toxicidade

Para que uma substância seja utilizada como medicamento de forma segura, seja ela de origem natural ou sintética, é importante que sua eficácia e segurança sejam garantidas. Por isso, além das pesquisas relacionadas ao mecanismo e doses de ação das substâncias, ensaios de avaliação de toxicidade são imprescindíveis. A aprovação de um novo medicamento passa pelos estudos pré-clínicos e pelos estudos clínicos. Os estudos pré-clínicos correspondem à avaliação da eficácia e avaliação de toxicidade, e são realizados por ensaios *in vitro* e testes em animais; e os estudos clínicos envolvem os testes em humanos, aumentando o número de paciente em cada fase do estudo (KATZUNG; TREVOR, 2017; – livro; FDA, 2019).

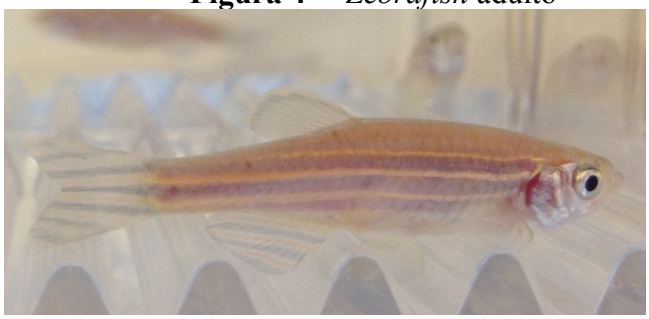
Há esforços da comunidade científica em reduzir o uso de animais na pesquisa desde a década de 1950, quando começaram a surgir as primeiras preocupações com o uso exacerbado de animais (HUME; LOND, 1957). Em 1959, Russel e Burch divulgaram o princípio dos 3R's, que se origina do inglês "*Reduction, Replacement and Refinement*" e trata da redução da quantidade de animais utilizados (*Reduction*), da substituição de testes (*Replacement*) e da redução do sofrimento dos animais (*Refinament*) (RUSSEL and BURCH, 1959). Desde então, houve um avanço significativo no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais, e atualmente há uma variedade de técnicas que incluem ensaios *in vitro*, como cultura de células, ensaios *ex vivo*, como o usando tecidos de animais recém abatidos para outra finalidade e ensaios *in silico*, que são baseados em simulações computacionais. (TAYLOR, 2019).

Zebrafish têm sido aceito como um modelo alternativo que preenche as características do princípio dos 3 R's e o interesse por sua utilização como organismo modelo para pesquisas biomédicas, ambientais e toxicológicas tem aumentado nos últimos anos devido às implicações éticas. A atual legislação da União Europeia (EU Directive 2010/63/EU) sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos considera que os estágios iniciais do desenvolvimento do *zebrafish* não precisam de proteção, uma vez que embriões e larvas não alcançaram a alimentação exógena e, portanto, não exigem regulamentação (Directive, 2010/63/EU; SCHOLZ et al., 2008; BEEKHUIJZEN et al., 2015), embora no Brasil seja obrigatória a aprovação dos protocolos pelas Comissões de Ética no Uso de Animais. Os testes com embriões de *zebrafish* têm sido propostos como uma alternativa para a substituição dos experimentos com animais adultos não só devido às implicações éticas, mas também

devido a vantagens experimentais (BEEKHUIJZEN et al., 2015; SCHOLZ et al., 2008). A transparência no estágio-larval, além da fecundação e desenvolvimento externo colaboram para que os ensaios sejam realizados sem a necessidade de sacrificar o animal progenitor, o que condiz com o refinamento. E a redução, está na economia de animais de ordem superior utilizados para a aprovação de novos medicamentos, já que o *zebrafish* permite triar as substâncias e descartar as candidatas que apresentarem toxicidade. Além disso, por sofrer os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção, o uso do *zebrafish* reduz a diferença de resultados obtidos entre os ensaios *in vitro* e os ensaios *in vivo* (BHUSNURE; MANE; GHOLVE, 2015).

O *zebrafish* (*Danio rerio*) (Figura 4), popularmente conhecido como paulistinha ou peixe-zebra, é um teleósteo de pequeno porte (3-4 cm), nativo de rios do Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão), pertencente à família dos *Cyprinidae*, à ordem dos *Cypriniformes* e à espécie *Danio rerio*. A denominação de peixe-zebra se deve ao padrão de pigmentação, caracterizado pela presença de 5 listras longitudinais preto-azuladas alternadas com listras branco-prateadas que se estendem pelo corpo e pela nadadeira anal e caudal (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ et al., 2008).

Figura 4 – *Zebrafish* adulto



Fonte: Próprio autor

Devido às similaridades anatômicas e genéticas com outros vertebrados, inclusive humanos, o *zebrafish* tem sido amplamente utilizado em diversos estudos, com destaque para estudos genéticos e neurológicos. Cerca de 70% dos genes humanos possuem gene ortólogo de *zebrafish* (HOWE et al., 2013). Além disso, esse organismo apresenta barreira hemato-encefálica similar à de vertebrados superiores, e como o desenvolvimento embrionário e larval ocorre externamente ao corpo da progenitora, o acesso para estudo do SNC é facilitado (MUSSULINI et al., 2013; SCHMIDT; STRÄHLE; SCHOLPP, 2013).

A estrutura básica do SNC em peixes apresenta semelhanças com o de mamíferos e os mesmos neurotransmissores e receptores são encontrados, inclusive receptores do sistema

endocanabinóide já foram identificados em *zebrafish* (MIGLIARINI; CARNEVALI, 2009; PANULA et al., 2010; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018). Além disso, muitos dos genes envolvidos nas alterações neuronais humanas foram identificados nesta espécie de peixe e o padrão de expressão pode ser facilmente estudado, o que torna este organismo uma alternativa vantajosa para ensaios de neurotoxicidade (PANULA et al., 2010). Para a elucidação de efeitos tóxicos no sistema neurológico, utilizam-se testes que permitem a avaliação das funções motoras, sensoriais, autonômicas e cognitivas, pois alterações comportamentais são correlacionadas com a identificação de lesões neurotóxicas. A importância destes estudos é que muitas das alterações comportamentais dos organismos-teste têm correlação com alterações em humanos (KLAASSEN, 2013).

A fertilização gera grande número de ovos (cerca de 100 a 200 por dia, por fêmea), e estes ovos são transparentes, o que possibilita a observação das estruturas. O desenvolvimento ocorre rapidamente, pois de 2 a 3 dias após fertilização ocorre a eclosão e inicia-se o estágio larval, e 5 dias após a fertilização, a organogênese dos principais órgãos é concluída. A maturidade sexual é atingida em cerca de 3 meses. Além disso, os ovos apresentam cerca de 0,7 mm de diâmetro, sendo portanto, relativamente grande quando comparado ao de outras espécies (SCHOLZ et al., 2008; SPENCE et al., 2007). O ciclo de reprodução curto e com estágios bem definidos, e outras características como a fácil manutenção em laboratório, fazem do *zebrafish* uma interessante alternativa de organismo modelo para avaliação da toxicidade de componentes químicos, tanto para o meio ambiente quanto para humanos (SCHOLZ et al., 2008).

O teste de toxicidade de embrião de peixe utilizando estágios embrio-larvais de *zebrafish* ou Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET) avalia a toxicidade de medicamentos, produtos químicos ou de efluentes nos estágios de vida de embriões e larvas (EMBRY et al., 2010; LOMBA et al., 2019). Com esses testes, é possível avaliar a cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade do desenvolvimento, além da neurotoxicidade (MCGRATH; LI, 2008; PARNG et al., 2007).

Este projeto, avaliamos os efeitos teratogênicos e neurotóxicos de substâncias com potencial terapêutico, por isso maior ênfase será dada a estes efeitos. Vários parâmetros são utilizados para o estudo de neurotoxicidade em embriões e larvas de *zebrafish*. A acetilcolinesterase, que pode clivar rapidamente a acetilcolina em colina e acetato, é uma enzima crítica para a transmissão sináptica entre neurônios tanto em sinapses colinérgicas quanto entre junções neuromusculares. Estas atividades configuram a base de muitas das

funções biológicas essenciais, tais como o batimento cardíaco, respiração, digestão, e a atividade cerebral (FISCHER et al., 2015). Um dos efeitos causados por xenobióticos consiste em mudanças na sinalização colinérgica que conduzem a um desequilíbrio nos níveis de acetilcolina extracelular. A inibição da acetilcolinesterase resulta na hiperestimulação dos receptores de acetilcolina pós-sinápticos, o que leva a aberrações fisiológicas que vão desde a disfunção comportamental à morte (HAVERROTH et al., 2015) Assim, a acetilcolinesterase foi descrita como um biomarcador bem estabelecido para vários contaminantes ambientais. Praguicidas organofosforados e carbamatos são exemplos de moléculas que modulam a atividade dessa enzima (FISCHER et al., 2015).

Além da atividade de colinesterase, a atividade locomotora do *zebrafish* é uma análise complementar e pode ser avaliada visualmente ou por aquisição de imagem contínua, usando uma câmera infravermelha. O número de movimentos, a duração e a distância percorrida em um determinado período de tempo podem ser avaliados (MCGRATH; LI, 2008).

Nesse contexto, existe a abordagem de triagem de alto rendimento (*High Throughput Screening*), que se tornou possível devido a uma combinação de um rápido aumento do poder de processamento dos computadores com as ferramentas de gravação de vídeo sensíveis que geram dados fenotípicos automatizados com alta resolução espacial e temporal. Um sistema automatizado não-invasivo, que pode analisar mais animais em menos tempo, e pode avaliar muitos processos simultaneamente, proporciona uma eficiência que não só traz um aumento significativo no rendimento, mas também uma diminuição da implicação ética da utilização de animais (BRUNNER; NESTLER; LEAHY, 2002). Triagens de alto rendimento, além de testar peixes individuais com vários *endpoints* para gerar um grande número de dados, podem usar o vídeo-monitoramento simultâneo de múltiplos peixes nadando em grupos (STEWART; GERLAI; KALUEFF, 2015).

Uma vez que a produção de estímulo, quantificação comportamental e reconhecimento e interpretação fenotípicos são agora cada vez mais informatizados, a triagem usando embriões e larvas de *zebrafish* está se tornando cada vez mais automatizada e com maior rendimento (STEWART; GERLAI; KALUEFF, 2015).

Para um teste ser aceito como uma alternativa a um teste convencional, além de parâmetros como a adequação, confiabilidade e reprodutibilidade, tanto a partir de um ponto de vista científico quanto regulatório, uma das características mais importantes é a correlação entre os resultados obtidos com o potencial alternativo e o teste a ser substituído. Uma revisão detalhada publicada por Lammer et al. (2009), não só mostrou dados sobre a toxicidade em

embriões e larvas de peixe para cerca de 150 compostos, mas também os comparou com dados existentes de toxicidade aguda de 81 destes compostos em cinco espécies de peixe diferentes comumente testados usando o protocolo da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) nº 203 (OECD 203, 1992). Lammer e colaboradores concluíram que o teste de toxicidade em embriões forneceu dados de toxicidade aquática de qualidade semelhante quando comparados os dados gerados em adultos, realizados em 5 espécies comumente testadas (*Lepomis macrochirus*, *Oncorhynchus mykiss,, Oryzias latipes, Pimephales promelas,* e *Danio rerio*) (EMBRY et al., 2010; LAMMER et al., 2009).

Dentro deste contexto, este trabalho visou avaliar a toxicidade à exposição ao canabidiol e ayahuasca por meio de estudos de seus efeitos tóxicos em concentrações proporcionais as esperadas em exposições humanas, pois, estas substâncias têm potencial para serem utilizadas como fármacos psiquiátricos. Além disso, testamos também a toxicidade de um produto a base de CBD, obtido de forma sintética para comparação.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho colaboram para a demonstração de segurança dos compostos estudados, colaborando com a confirmação do potencial terapêutico destes compostos.

As metodologias otimizadas durante este trabalho se mostraram viáveis para contribuir com a avaliação de toxicidade de substâncias que poderão ser utilizadas no tratamento de diversos distúrbios psíquicos. O planejamento fatorial realizado para a otimização dos parâmetros da avaliação da atividade da acetilcolinesterase permitiu que o método fosse otimizado em poucas etapas, seguindo o princípio dos 3R's já que o número de embriões utilizados para otimização foi menor do que se fosse realizado pela otimização univariada, além da redução de descarte de reagentes.

A implementação do software DanioScope permitiu avaliar efeitos precoces causados pela exposição a substâncias químicas. Por gerar dados quantitativos, os ensaios realizados utilizando o software demonstram maior precisão e sensibilidade nos resultados, possibilitando encontrar efeitos precoces que não seriam possíveis sem o auxílio do software, além de descartar diferenças entre observadores que poderia levar a resultados inconclusivos.

Em relação a avaliação de letalidade e subletalidade dos canabinóides, a letalidade não foi observada após a exposição às concentrações estudadas dos canabinóides e da ayahuasca. Os canabinóides levaram ao efeito subletal de atraso na eclosão, sendo que a EC50 do CBDS foi bem próxima e ainda maior do que a EC50 do CBD, indicando que o CBDS seria menos tóxico do que o CBD. Para ambas as moléculas, o atraso na eclosão ocorreu apenas em altas concentrações. Já os embriões expostos à ayahuasca na concentração de 1000 ppm apresentaram o efeito subletal de redução na taxa de embriões com bexiga natatória inflada, o que também ocorreu apenas em concentração elevada.

A exposição dos embriões de zebrafish aos canabinóides não causou alterações morfológicas durante seu desenvolvimento no período e nas concentrações estudadas. Enquanto que a exposição à Ayahuasca levou a uma discreta redução na área dos olhos.

Os ensaios de avaliação de alteração comportamental demonstraram que a exposição aos canabinóides testados modularam alterações na movimentação em curto período de exposição (24 hpf), com o LOEC do CBDS maior que do CBD. Estes efeitos foram revertidos nas etapas seguintes do desenvolvimento dos embriões. E em 24hpf, a exposição à ayahuasca levou a redução na movimentação dos embriões na maior concentração testada. A alteração

na movimentação é um efeito precoce que demonstra o potencial das substâncias em causar neurotoxicidade, porém as substâncias testadas apenas demonstraram modular o comportamento em concentrações muito elevadas, indicando o baixo potencial de toxicidade destas substâncias.

Ensaios bioquímicos auxiliam na elucidação da avaliação de neurotoxicidade. Este trabalho utilizou o ensaio de avaliação da atividade da acetilcolinesterase, e a exposição ao CBD não foi capaz de alterar este parâmetro bioquímico, reforçando seu baixo potencial de causar neurotoxicidade.

Portanto, este trabalho gerou dados científicos importantes que contribuem para a elucidação do potencial tóxico do canabidiol, derivado sintético de canabidiol e ayahuasca, colaborando então para a avaliação de segurança destas substâncias, já que todas elas possuem potencial para tratar distúrbios psíquicos, e podem vir a ser usadas por pessoas de características variadas. No caso do canabidiol e ayahuasca a população já tem contato com estas substâncias devido ao uso recreativo ou religioso, porém é importante que estudos de toxicidade sejam realizados para dar embasamento a regulamentação.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M. E. et al. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 activities in rats treated with cannabis, tramadol or both. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 11, p. 1089–1094, 2016.

AKHTAR, M. T. et al. Developmental Effects of Cannabinoids on Zebrafish Larvae. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 283–293, set. 2013.

ANDRADE, T. S. et al. Exposure to ayahuasca induces developmental and behavioral alterations on early life stages of zebrafish. **Chemico-Biological Interactions**, v. 293, p. 133–140, 25 set. 2018.

BALERIO, G. N.; ASO, E.; MALDONADO, R. Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. **Psychopharmacology**, v. 184, n. 3–4, p. 504–513, 2006.

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 56, p. 64–76, 15 ago. 2015.

BRUCKI, S. M. D. et al. Cannabinoids in neurology – Brazilian Academy of Neurology. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 4, p. 371–374, abr. 2015.

BRUNNER, D.; NESTLER, E.; LEAHY, E. In need of high-throughput behavioral systems. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 18, p. S107–S112, set. 2002.

CAMARGO, S. P. S. et al. Development and Validation of a Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Methodology for Cannabidiol Analysis in Human Plasma. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 4, p. 228–234, 1 nov. 2011.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3364–3378, 5 dez. 2012.

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

CAPASSO, R. et al. Inhibitory Effect of Standardized Cannabis sativa Extract and Its Ingredient Cannabidiol on Rat and Human Bladder Contractility. **Urology**, v. 77, n. 4, p. 1006.e9-1006.e15, 1 abr. 2011.

CARTY, D. R. et al. Developmental Effects of Cannabidiol and Δ9-Tetrahydrocannabinol in Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 0, n. January, p. 1–9, 2 nov. 2017.

CARTY, D. R. et al. Multigenerational consequences of early-life cannabinoid exposure in zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 364, p. 133–143, 1 fev. 2019.

CHAGAS, M. H. N. et al. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: An exploratory double-blind trial. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 11, p. 1088–1098, 18 nov. 2014.

CHEN, T.-H.; WANG, Y.-H.; WU, Y.-H. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. **Aquatic Toxicology**, v. 102, n. 3–4, p. 162–166, 1 abr. 2011.

CRIPPA, J. A. S.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E. C. Uso terapêutico dos canabinoides em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. suppl 1, p. 556–566, maio 2010.

DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 791–802, jun. 2014.

DOMÃ-NGUEZ-CLAVÃ©, E. et al. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. **Brain Research Bulletin**, v. 126, p. 89–101, 2016.

DOMINGUES, I. et al. Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults. **Environmental Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 155–163, mar. 2013.

DOMINO, E. F. Cannabinoids And The Cholinergic System. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, n. S1, p. 249S-255S, 9 ago. 1981.

DOS SANTOS, R. G. et al. The current state of research on ayahuasca: A systematic review of human studies assessing psychiatric symptoms, neuropsychological functioning, and neuroimaging. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 12, p. 1230–1247, 10 dez. 2016.

EHRLICH, D. E.; SCHOPPIK, D. Control of Movement Initiation Underlies the Development of Balance. **Current Biology**, v. 27, n. 3, p. 334–344, fev. 2017.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 97, n. 2, p. 79–87, 15 abr. 2010.

ENGLUND, A. et al. Cannabidiol inhibits THC-elicited paranoid symptoms and hippocampal-dependent memory impairment. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 19–27, 5 jan. 2013.

EUBANKS, L. M. et al. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. **Molecular Pharmaceutics**, 2006.

FISCHER, A. et al. Carbamate nerve agent prophylatics exhibit distinct toxicological effects in the zebrafish embryo model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 50, p. 1–10, 2015.

FRECSKA, E.; BOKOR, P.; WINKELMAN, M. The therapeutic potentials of ayahuasca: Possible effects against various diseases of civilization. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. MAR, p. 1–17, 2016.

FUSAR-POLI, P. et al. Distinct effects of δ9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 1, p. 95–105, 1 jan. 2009.

GUILHERMINO, L. et al. Acetylcholinesterase activity in juveniles of Daphnia magna Straus. **Bulletin of environmentall contamination and techonology**, v. 57, p. 979–985, 1996.

HAVERROTH, G. M. B. et al. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (Danio rerio). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 122, p. 440–7, dez. 2015.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 17 abr. 2013.

IZZO, A. A. et al. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 10, p. 515–527, 2009.

KAIS, B. et al. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16329–16339, 2015.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, jul. 1995.

KLAASSEN, C. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7th. ed. EUA: [s.n.].

KRUG, R. G.; CLARK, K. J. Elucidating cannabinoid biology in zebrafish (Danio rerio). **Gene**, v. 570, n. 2, p. 168–179, 10 out. 2015.

KÜSTER, E. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (Danio rerio) and their potential use for insecticide hazard assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 76–85, 2005.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 149, n. 2, p. 196–209, mar. 2009.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, set. 2007.

LOMBA, L. et al. Acute and subacute effects of drugs in embryos of Danio rerio. QSAR grouping and modelling. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 232–239, 15 maio 2019.

MACPHAIL, R. C. et al. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. **NeuroToxicology**, 2009.

MANINI, A. F. et al. Safety and pharmacokinetics of oral Cannabidiol when administered concomitantly with intravenous Fentanyl in humans. **Journal of Addiction Medicine**, 2015.

MARTELLA, A. et al. Important role of endocannabinoid signaling in the development of functional vision and locomotion in zebrafish. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 12, p. 4275–4288, 13 dez. 2016.

MCGRATH, P.; LI, C.-Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug discovery today**, v. 13, n. 9–10, p. 394–401, maio 2008.

MIGLIARINI, B.; CARNEVALI, O. A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, n. 2, p. 172–177, 2009.

MORALES-GARCÍA, J. A. et al. The alkaloids of Banisteriopsis caapi, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis in vitro. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5309, 2017.

MORALES, P.; REGGIO, P. H.; JAGEROVIC, N. An Overview on Medicinal Chemistry of Synthetic and Natural Derivatives of Cannabidiol. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–18, 28 jun. 2017.

MUSSULINI, B. H. M. et al. Seizures Induced by Pentylenetetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54515, 21 jan. 2013.

NAGEL, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish Danio rerio--a general model in ecotoxicology and toxicology. **ALTEX : Alternativen zu Tierexperimenten**, v. 19 Suppl 1, p. 38–48, 2002.

NAZARIO, L. R. et al. Caffeine protects against memory loss induced by high and non-anxiolytic dose of cannabidiol in adult zebrafish (Danio rerio). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 210–216, ago. 2015.

OECD, O. FOR E. C. AND D. **Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test**. [s.l.] OECD, 1992.

OECD, O. FOR E. C. AND D. **GUIDELINES No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.OECD Publishing, , 26 jul. 2013. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-210-fish-early-life-stage-toxicity-test_9789264203785-en>

PADILLA, S. et al. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. **Neurotoxicology and Teratology**, 2011.

PAMANJI, R. et al. Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (Danio rerio) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7744–7753, 22 maio 2015.

PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, out. 2010.

PARNG, C. et al. Neurotoxicity assessment using zebrafish. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 55, n. 1, p. 103–12, jan. 2007.

REVUELTA, A. V. et al. Effect of cannabinoids on the turnover rate of acetylcholine in rat

hippocampus, striatum and cortex. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 1978.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3ª edição ed. Campinas, SP: Cárita Editora, 2014.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G. et al. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (Danio rerio) following Chlorpyrifos exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 172–173, p. 19–25, jun. 2015.

SANTOS, R. G. et al. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety , panic-like and hopelessness in Santo Daime members. v. 112, p. 507–513, 2007.

SAVOLDI, R. et al. Behavioral Changes Over Time Following Ayahuasca Exposure in Zebrafish. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, n. July, p. 1–9, 28 jul. 2017.

SCHMIDT, R.; STRÄHLE, U.; SCHOLPP, S. Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. **Neural development**, v. 8, p. 3, 2013.

SCHOLZ, S. et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. **Environmental science and pollution research international**, v. 15, n. 5, p. 394–404, 2008.

SELDERSLAGHS, I. W. T. et al. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, 2010.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 17 dez. 2007.

STEWART, A. M.; GERLAI, R.; KALUEFF, A. V. Developing highER-throughput zebrafish screens for in-vivo CNS drug discovery. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 9, p. 14, 12 jan. 2015.

TEIXIDÓ, E. et al. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 469–478, fev. 2013.

VAZ, R. L.; OUTEIRO, T. F.; FERREIRA, J. J. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p. 347, 1 jun. 2018.

WALDO ZUARDI, A. et al. A Critical Review of the Antipsychotic Effects of Cannabidiol: 30 Years of a Translational Investigation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 32, p. 5131–5140, 12 set. 2012.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: A review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 2, p. 153–157, 2006.