UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TAMIRES AMABILE VALIM BRIGANTE

Avaliação de toxicidade de psicofármacos com potencial terapêutico

Ribeirão Preto
2019

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

TAMIRES AMABILE VALIM BRIGANTE

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.

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

Ribeirão Preto
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Brigante, Tamires Amabile Valim

Avaliação de toxicidade de psicofármacos com potencial terapêutico. Ribeirão Preto, 2019.
92 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Oliveira, Danielle Palma.

1. Canabidiol. 2. Ayahuasca. 3. Avaliação de Toxicidade. 3. Zebrafish.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Tamires Amabile Valim Brigante
Título do trabalho: 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.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

À mulher que sempre foi meu exemplo de força e determinação, minha MÃE querida que me ensinou a mais importante das lições, o amor! E ao homem que Deus colocou na minha vida para me ensinar o significado da palavra PAI!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder o privilégio de ter em minha vida pessoas tão especiais. Pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com minha formação profissional e pessoal.

Agradeço à minha orientadora Professora Dra. Danielle Palma de Oliveira pelas discussões que levaram ao desenvolvimento deste trabalho, pela confiança e oportunidades. Sinto-me honrada por ter sido orientada por uma pesquisadora tão competente, com habilidades didáticas excepcionais e que nos inspira a cada dia, nos ajudando a encontrar o que de melhor há em nós.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (ICNT-TM), pela parceria e contribuição que permitiram o desenvolvimento deste projeto.

Ao Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan, por "abrirem as portas" e permitirem a realização de parte do trabalho em suas dependências.

Aos professores da UNIFAL-MG por permitir meu primeiro contato com a Ciência, e incentivarem a continuidade da formação científica de seus alunos.

Ao Professor Dr. Daniel Junqueira Dorta, por me oferecer oportunidades que muito contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - código de financiamento: 001), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo:2016/03281-9), ao Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos-INCT-DATREM (Processo Cnpq: 465571/2014-0; Fapesp: 14/50945-4) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 170700/2017-8) pelo incentivo financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À minha mãe, amiga e professora Solange Aparecida Valim Brigante, que me ensinou as mais valiosas lições: amor, honestidade e compaixão. Foi ela, também, quem me ensinou a sonhar, me incentivou a buscar os meus sonhos e me apoiou e apoia na realização de cada um deles.

Agradeço ao Fernando Brigante Filho (*in memoriam*) por me ensinar o significado da palavra PAI. Por apoiar cada um dos meus sonhos e me incentivar a sonhar cada vez mais. Por todo carinho e amor que a mim dedicou. Por toda sabedoria que comigo compartilhou. E pelo mais belo presente que poderia me dar: seu sobrenome, e tudo o que isso representa.

Ao meu irmão Vinicius Estanislau Valim Brigante pelo incentivo, carinho, e principalmente por “segurar as pontas” e cuidar da casa nos momentos difíceis em que eu não pude estar presente.

Agradeço a todos os meus amigos pelo apoio e carinho que sempre me deram e por sempre estarem comigo quando eu precisei. Em especial, agradeço à Marcia Sette, ao José Carlos de Souza, à Sirlene Reis e Sandra Reis, por serem mais que família e me apoiarem nas mais desafiadoras etapas do meu caminho. Agradeço também à Camila Marchioni, e ao Gabriel Tavares do Vale, pela amizade, sorrisos, companheirismo e pelas proveitosas discussões científicas. À Aline Dragalzew pelo companheirismo, amizade e empatia.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e todos os seus funcionários que possibilitam a realização do doutorado, desde os professores pelas contribuições científica até à equipe de segurança. Em especial, agradeço à Rose Gerolineto, que com sua competência e dedicação, colabora para o melhor andamento possível do doutorado.

Ao laboratório EcoHumanTox, pelo acolhimento que tive desde o primeiro dia. Sou muito grata por fazer parte de um laboratório com pessoas tão companheiras, onde se partilha conhecimento e sorrisos. E que além do desenvolvimento como pesquisadora, contribuiu para meu desenvolvimento pessoal. Aos técnicos do laboratório Klaus e Sônia, pelos incontáveis auxílios no desenvolvimento da pesquisa e pela amizade. Aos colegas de laboratório Flávia, Andréia, Camila, Maíra, Otávio, Taís e Renan pelas formidáveis discussões que muito contribuíram com o desenvolvimento do projeto, além do companheirismo e amizade.

Sou grata por ter convivido e aprendido um pouco (ou muito) com cada pessoa que encontrei pelo caminho. Sou grata por concluir este projeto com o apoio de tantas pessoas admiráveis e inspiradoras.

“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha junto é o começo da realidade”

Miguel de Cervantes,(1547-1616)

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.

ABSTRACT

BRIGANTE, T.A.V. **Toxicity assessment of psychofarmaceutical drugs with therapeutic**. 2019. 92f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Cannabidiol is a compound found in the Cannabis sativa species that has already been recognized for the treatment of severe epilepsy and is currently being studied for the treatment of various diseases of the nervous system. Cannabidiol medicines are already used in several countries. In Brazil, liberation has been discussed and it had important advances since 2014. Ayahuasca is a psychoactive tea originating in the Amazon, widely used by indigenous tribes and religious sects. Ayahuasca has recently been studied for its broad therapeutic potential for treating psychiatric disorders such as anxiety, depression, addiction to drugs of abuse and degenerative diseases. In this context, it is essential for toxicity studies to be carried out to ensure the safety of the population that can use these substances. Neurotoxicity and teratogenicity tests were performed to assess the intrinsic toxicity of the substances. The test organ used for these tests was zebrafish due to several advantages presented by this organism, the main ones being the transparency of the chorion and the larva that allows observation of the internal structures and the similarity of the genetic code with that of mammals. Thus, the present work aims to provide subsidies for the safety assessment of CBD, a synthetic derivative of CBD and ayahuasca, through the evaluation of toxicity using different approaches employing zebrafish embryos. Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme involved in synaptic neurotransmission pathways. Its activity has been widely used as a biomarker in neurotoxicity studies. AChE is expressed early in zebrafish, from the embryonic stage. In this work, the activity of AChE was evaluated by the Ellman's test adapted for microplate. An experimental design was used to optimize sample preparation for this analysis. DanioScope is a software that allows to evaluate early morphological and behavioral changes in zebrafish. The use of this software in the laboratory was implemented and standardized by the development of this work. No malformation was observed in the morphological analysis of embryos exposed to all tested concentrations of CBD and synthetic CBD derivative. However, there was delay in hatching after exposure to high concentrations of CBD (EC50 = 754 µg / L) and after exposure to the synthetic CBD derivative (EC 50 = 776 µg / L). In addition, exposure to these cannabinoids resulted in increased motor activity in 24 hpf with LOEC for exposure to CBD of 20 µg / L and synthetic derivative of CBD (LOEC of 70 µg / L). This difference in motor activity was not observed in the other periods evaluated. Embryos exposed to CBD showed no differences in acetylcholinesterase activity. Exposure to Ayahuasca at the highest concentration tested (1000 ppm) resulted in a reduction in the rate of embryos with inflated swim bladder (<10%). In addition, this concentration of ayahuasca affected the development of the eyes since the measurement of the eye area was reduced in the embryos exposed to this concentration. At lower concentrations, exposure to ayahuasca did not alter the development of the embryos during the tested period.

Key words: Cannabidiol; Ayahuasca; Toxicity Assessment; Zebrafish

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química do canabidiol 2

Figura 2 – Estrutura química das principais β-carbolinas presentes na ayahuasca 4

Figura 3 – Estrutura química da dimetiltriptamina 5

Figura 4 – *Zebrafish* adulto 7

Figura 5 – Aquário de reprodução..... 19

Figura 6 – Embrião de *zebrafish* em estágio de blástula, com 5 horas pós-fertilização 19

Figura 7 – Esquema do desenvolvimento da técnica para avaliação da atividade da enzina acetilcolinesterase..... 21

Figura 8 - *Zebrafish* com 96 horas pós-fertilização analisado quantitativamente pelo software danioscope 28

Figura 9 – Representação esquemática das placas de 96 poços utilizadas no ensaio de atividade locomotora de embriões expostos ao canabidiol e derivado sintético de canabidiol no equipamento zebrabox..... 31

Figura 10 – Representação esquemática das placas de 96 poços utilizadas no ensaio de atividade locomotora de embriões expostos à ayahuasca no equipamento zebrabox 31

Figura 11 – Diagrama de paretto gerada pelo planejamento plakett-burman, após a avaliação das respostas obtidas com diferentes variáveis para o ensaio da atividade de acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish*..... 35

Figura 12 - Superfície de resposta gerada pelo planejamento central composto, após a avaliação das respostas obtidas com diferentes variáveis para o ensaio da atividade de acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish*..... 36

Figura 13 – Comparação da atividade da acetilcolinesterase para embriões de *zebrafish* no grupo controle e nos grupos expostos à cafeína (μg/ml)..... 37

Figura 14 – Gráfico da avaliação da atividade motora do embrião do *zebrafish* realizada no danioscope 38

Figura 15 – Seleção dos parâmetros para análise da morfologia do *zebrafish* pelo danioscope 39

Figura 16 – Representação gráfica da análise da atividade pelo movimento/minuto do embrião de *zebrafish* em 24 horas pós-fertilização, expostos à cafeína..... 40

Figura 18 - Taxa de eclosão de embriões de *zebrafish* expostos ao canabidiol (cbd)..... 43

Figura 19 - Atividade motora de embriões de *zebrafish* em 24 hpf após exposição ao canabidiol (cbd), contados pelo número de movimentos por minuto 44

Figura 20 - Atividade motora de embriões de *zebrafish* em 48 hpf após exposição ao canabidiol (cbd), contados pelo número de movimentos por minuto 45

Figura 21 – Distância total percorrida pela larva de *zebrafish* em 10 minutos de análise no zebrabox após 96h de exposição ao canabidiol..... 46

Figura 22 - Atividade da acetilcolinesterase (ache) de *zebrafish* no estágio embrio-larval expostos ao canabidiol (cbd) até 96 horas pós fertilização 47

Figura 23 – Embriões de *zebrafish* expostos ao controle negativo e ao derivado sintético de canabidiol 300 µg/l..... 48

Figura 24 – Porcentagem de embriões expostos ao derivado sintético do canabidiol (cbds) não eclodidos em 96 horas pós-fertilização 49

Figura 25 – Atividade motora avaliada pelos movimentos por minuto de embriões expostos ao derivado sintético do canabidiol (cbds)..... 50

Figura 26 – Distância total percorrida pela larva de *zebrafish* em 10 minutos de análise no zebrabox® após 96h de exposição ao derivado sintético do canabidiol 51

Figura 27 - Taxa de embriões de *zebrafish* com bexiga natatória inflada após exposição à ayahuasca 56

Figura 28 – Embriões de *zebrafish* expostos ao controle negativo e à ayahuasca 56

Figura 29 – Gráfico da avaliação quantitativa da área dos olhos de embriões expostos à ayahuasca 57

Figura 30 – Atividade motora avaliada pelos movimentos por minuto de embriões expostos à ayahuasca 59

Figura 31 – Distância total percorrida pela larva de *zebrafish* em 10 minutos de análise no zebrabox® após 96h de exposição ao derivado sintético do canabidiol 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento de experimentos pelo método plackett burman - ensaios montados nas diferentes combinações de variáveis geradas pelo software statistica 13 22

Tabela 2 - Condições fixadas para a determinação da atividade da acetilcolinesterase de embriões expostos a cafeína após a padronização do método por planejamento de experimento. 24

Tabela 3 - *Endpoints* avaliados em cada período de desenvolvimento do estágio embrio-larval de *zebrafish* (adaptado de nagel, 2002). 27

Tabela 4 - Condições dos ensaios com *zebrafish* para o planejamento central composto na ordem definida pelo software statistica 13 e seus respectivos resultados. 35

Tabela 5 - Relação da atividade enzimática da acetilcolinesterase de embriões de *zebrafish* expostos à cafeína (caf) comparada ao controle negativo 37

Tabela 6 - Análise quantitativa das alterações morfológicas em embriões de *zebrafish* expostos ao canabidiol (cdb) utilizando o software danioscope (média ± desvio padrão) 43

Tabela 7 - Análise quantitativa das alterações morfológicas em embriões de *zebrafish* expostos ao derivado sintético de canabidiol (cdbs) utilizando o software danioscope (média ± desvio padrão) 49

Tabela 8 - Análise quantitativa das alterações morfológicas em embriões de *zebrafish* expostos à ayahuasca utilizando o software danioscope (média ± desvio padrão) 58

Lista de abreviaturas e siglas

AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AYA	Ayahuasca
CAF	Cafeína
CB	Receptor canabinóide
CBD	Canabidiol
CBDS	Derivado sintético de canabidiol
CBTOX	Congresso Brasileiro de Toxicologia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIFARP	*International Congresso of Pharmaceutical Science*
CN	Controle negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	N,N-dimetiltriptamina
EC50	Effective concentration 50%
FAAH	Enzima hidrolase de amida de ácidos graxos - *fatty acid amide*

	hydrolase
FCFRP	Faculdade de Ciências farmacêticas de Ribeirão Preto
FET	Fish Embryo Acute Toxicity Test
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
hpf	Horas pós fertilização
INCT-TM	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina
LOEC	Lowest observed-effect concentration
MAO	Monoamina-oxidase
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
SNC	Sistema nervosa central
THC	Δ^9-tetra-hidrocanabinol
TNB	5-tio-2-ácido nitrobenzóico

Lista de Símbolos

g	grama
mg	miligramas
mL	mililitro
ºC	grau Celsius
µg	micrograma
L	litro
Ppm	partes por milhão
nm	nanômetro
Abs	absorbância
Δ	variação
ε	coeficiente de extinção molar
M	molar
cm	centímetro
µm	micrômetro

SUMÁRIO

Resumo.....i
Abstract ii
Lista de figuras.....iii
Lista de tabela v
Lista de abreviaturas e siglas vi
Lista de símbolos viii
Sumário.....ix

1 Introdução..... 1

1.1 Substâncias com potencial para uso terapêutico no tratamento de desordens psiquiátricas 2

1.2 Avaliação de toxicidade 6

2 Justificativa..... 11

3 Objetivo 14

3.1 Objetivos gerais 15

3.2 Objetivos específicos..... 15

4 Material e métodos 16

4.1 Amostras..... 17

4.2 Organismo teste: manutenção, aquisição de ovos e eutanásia 18

4.3 Padronização de metodologias 20

4.3.1 Padronização do ensaio de neurotoxicidade pela determinação da atividade da acetilcolinesterase..... 20

4.3.2 Padronização do danioscope 24

4.4 Ensaios de toxicidade 26

4.4.1 Ensaio de toxicidade com estágio embrio-larval de zebrafish - FET test 26

4.4.2 Análise morfológica do estágio embrio-larval de zebrafish expostos ao canabidiol, ao derivado sintético do canabidiol e à ayahuasca..... 28

4.4.3 Análise da atividade motora de embriões de zebrafish expostos ao canabidiol e ao derivado sintético do canabidiol..... 29

4.4.4 Determinação da atividade da acetilcolinesterase em embriões expostos ao canabidiol 29

4.4.5 Avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas ao canabidiol, ao derivado sintético do canabidiol e à ayahuasca 30

4.5 Análise estatística 32

5 Resultados e discussão 33

5.1 Padronização de metodologias 34

5.1.1 Padronização da determinação da atividade da acetilcolinesterase 34

5.1.2 Padronização dos parâmetros do software danioscope 38

5.2 Ensaios de toxicidade induzida pelo canabidiol 41

5.2.1 Avaliação de alterações morfológicas no estágio embrio-larval de zebrafish 41

5.2.2 Avaliação da atividade motora do embrião de zebrafish exposto ao canabidiol 44

5.2.5 Avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas ao canabidiol 45

5.2.4 Determinação da atividade enzimática de larvas expostas ao canabidiol 46

5.3 Ensaios de toxicidade do derivado sintético do canabidiol 47

5.3.1 Avaliação de alterações morfológicas do zebrafish no estágio embrio-larval 47

5.3.2 Avaliação da atividade motora do embrião de zebrafish usando o software danioscope 50

5.3.3 Avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas ao derivado sintético de canabidiol no equipamento zebrabox 51

5.4 Análises de toxicidade da ayahuasca 55

5.4.1 Avaliação de alterações morfológicas do zebrafish no estágio embrio-larval 55

5.4.2 Avaliação da atividade motora dos organismos expostos à ayahuasca 59

6 Conclusão 62

Referências 65

Anexos 71

1 Introdução

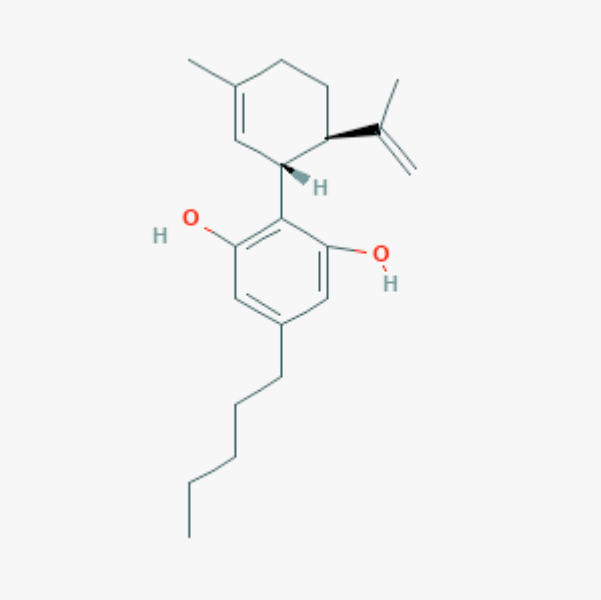
1 INTRODUÇÃO

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).

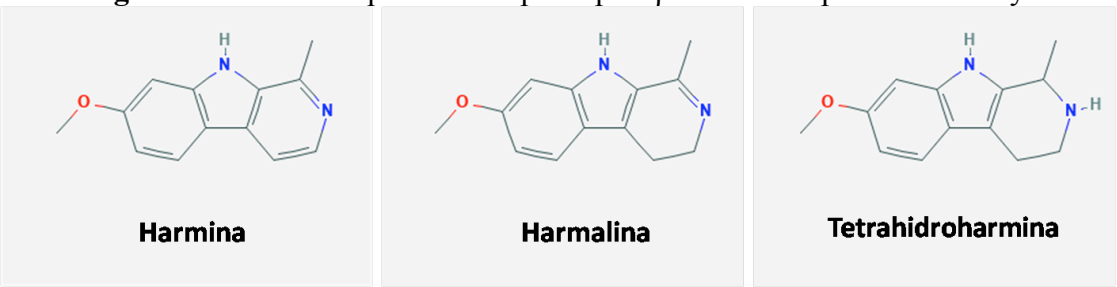
Medicamentos à base de canabidiol já são utilizados em vários países, como Estados Unidos e Canadá. No Brasil, a liberação tem sido discutida e com importantes avanços nos últimos anos. No ano de 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autorizou a prescrição e importação do CBD em mais 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).

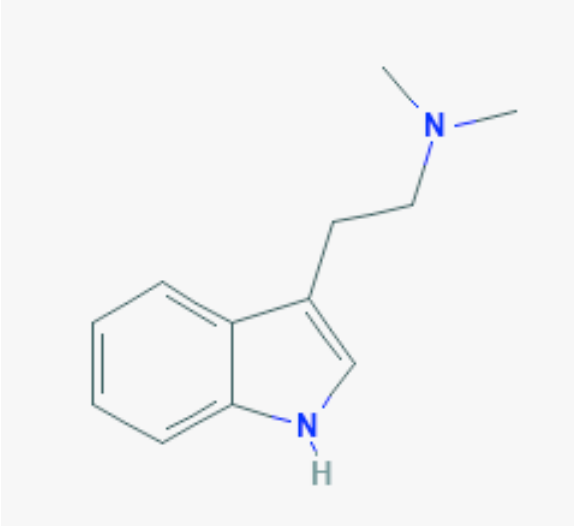
Figura 2 – Estrutura química das principais β-carbolinas presentes na Ayahuasca



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).

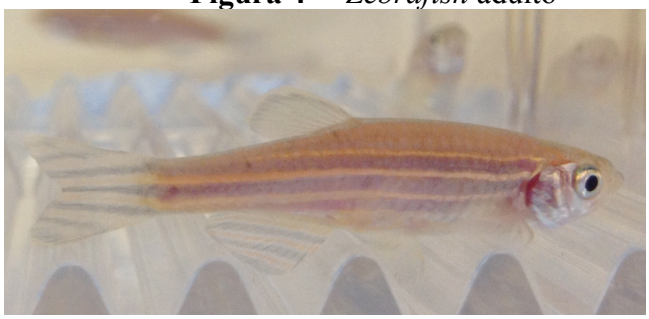
Há esforços da comunidade científica em reduzir o uso de animais na pesquisa desde a década de 1950, quando começaram a surgir as primeiras preocupações com o uso exacerbado de animais (HUME; LOND, 1957). Em 1959, Russel e Burch divulgaram o princípio dos 3R's, que se origina do inglês "*Reduction, Replacement 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.

2 Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Considerando o potencial uso na terapêutica e a extensão do uso pela população, estudos de toxicidade empregando ayahuasca, canabidiol e seus análogos são de grande relevância para conhecer ao máximo os potenciais riscos destes produtos, já que a população alvo para o uso destas substâncias pode possuir características muito diversas, como faixa etária, presença de patologias, gravidez, buscando assim avaliar adequadamente a segurança. A molécula análoga ao canabidiol ainda se encontra protegida por patente solicitada por um grupo de pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP em parceria com uma indústria farmacêutica. Entre os pesquisadores envolvidos estão o Professor Dr. Antônio Waldo Zuardi do departamento de Neurociências e Ciências do comportamento da FMRP, e os Professores Dr. José Alexandre de Souza Crippa e o Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak do mesmo departamento e que são Coordenadores da unidade da USP/Ribeirão Preto do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM).

Frente ao exposto, nossa hipótese é que a ayahuasca, o canabidiol e sua molécula análoga possam causar efeitos deletérios no desenvolvimento, sejam esses neurológicos, comportamentais e/ou teratogênicos. Neste sentido, desenvolvemos um projeto visando elucidar o potencial neurotóxico e teratogênico da ayahuasca, do canabidiol e do derivado sintético de canabidiol. Essas substâncias serão testadas utilizando *zebrafish* como organismo-teste, e utilizando como base concentrações proporcionais às que estão sendo testadas em humanos adultos.

A avaliação de toxicidade inclui ensaios de letalidade, sub-letalidade, teratogenicidade e neurotoxicidade. Assim como citado anteriormente, o *zebrafish* (*Danio rerio*) apresenta diversas características adequadas para tornar a sua utilização como organismo-teste ideal para ensaios de toxicidade aguda. E por esses motivos, o *zebrafish* foi escolhido para o desenvolvimento desse trabalho, uma vez que os ensaios com embriões e larvas de *zebrafish* são de fácil e rápida execução e apresentam uma boa relação custo-benefício para avaliação de toxicidade de compostos químicos.

Como há alta correlação entre os testes com a forma adulta do animal e as formas jovens (FET – *Fish Embryo Acute Toxicity Test*), e as legislações europeias (Directive, 2010/63/EU; SCHOLZ et al., 2008; BEEKHUIJZEN et al., 2015) recomendam o uso dos estágios embrionário e larval, os ensaios realizados neste trabalho utilizam estes estágios do

zebrafish para avaliação da toxicidade (BEEKHUIJZEN et al., 2015; DOMINGUES et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008).

Os testes de toxicidade aguda com FET utilizam *endpoints* que possibilitam a avaliação dos efeitos adversos causados pelos compostos, já que a transparência do ovo e larva de *zebrafish* permite enxergar as estruturas internas (DOMINGUES et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008). Além disso, o *zebrafish* auxilia na elucidação de efeitos deletérios no sistema nervoso central.

Para avaliar a neurotoxicidade, são realizadas a avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), e a avaliação de alteração comportamental do estágio embrio-larval do *zebrafish*. Mudanças comportamentais, como alteração de movimentação espontânea dentro do córion, velocidade, distância e direção do nado da larva, também estão relacionadas com a neurotoxicidade e, por isso, são fatores que devem ser avaliados.

3 Objetivo

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a toxicidade do canabidiol e ayahuasca, além de uma substância química sintética derivada de canabidiol, todas com potencial para serem utilizadas como psicofármacos.

3.2 Objetivos específicos

- Otimização de método para avaliação da atividade da acetilcolinesterase para ser utilizado como biomarcador de neurotoxicidade;

- Otimização de método de análise no software DanioScope para realização de testes de alta performance utilizando embriões de *Zebrafish* como modelo experimental;

- Avaliação da letalidade, subletalidade e teratogenicidade do canabidiol e de seu derivado sintético utilizando estágio embrio-larval de *zebrafish*;

- Avaliação da letalidade, subletalidade e teratogenicidade da ayahuasca utilizando estágio embrio-larval de *zebrafish*;

- Avaliação da neurotoxicidade do canabidiol e do derivado sintético empregando ensaios bioquímicos e ensaios comportamentais em estágio embrio-larval de *zebrafish*;

- Avaliação da neurotoxicidade da ayahuasca empregando ensaios comportamentais em estágio embrio-larval de *zebrafish*.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

O padrão de canabidiol (CAS No. 13956-29-1 MM: 314.46 g/mol, 99,9%) e o padrão do derivado sintético de canabidiol (CBDS) e a amostra de ayahuasca foram obtidos por meio de uma parceria com o grupo de pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), composto por: Professor Dr. Antônio Waldo Zuardi do departamento de Neurociências e Ciências do comportamento da FMRP, e os Professores Dr. José Alexandre de Souza Crippa e o Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak do mesmo departamento e que são Coordenadores da unidade da USP/Ribeirão Preto do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM). Estes pesquisadores são também os responsáveis pelo Centro de Pesquisas em Canabinóides da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que tem inauguração o prevista para este ano. O derivado sintético de canabidiol foi produzido e gentilmente, cedido pela indústria farmacêutica Pratti-Donaduzzi. Estas amostras foram utilizadas para a realização dos testes de toxicidade utilizando o estágio embrio-larval de *zebrafish*.

Água padrão ISO-7346 foi utilizada para o preparo das soluções utilizadas nos testes e como controle negativo. A água padrão ISO-7346 foi preparada dissolvendo, para cada litro de água ultrapura; 294,0 mg de cloreto de cálcio, 123,3 mg de sulfato de magnésio, 63,0 mg de bicarbonato de sódio e 5,5 mg de cloreto de potássio.

A solução estoque de canabidiol foi preparada dissolvendo canabidiol em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final de 3mg/mL. A solução estoque de canabidiol foi armazenada a -20ºC. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo da solução estoque de CBDS e, assim como para a solução estoque de CBD, a concentração final foi de 3 mg/mL. No dia de início de cada teste, as soluções estoque foram utilizadas para preparar as soluções de trabalho, a 12 µg/mL de CBD e de CBDS. A partir das soluções de trabalho, foram preparadas as soluções padrão que foram utilizadas nos testes. A concentração final de DMSO em cada solução padrão de CBD e de CBDS, além dos controles positivo e negativo foi 0,01% v/v em água padrão ISO-7346, seguindo a recomendação do protocolo da OECD nº 236 (OECD, 2013).

As concentrações de 5 µg/L, 20 µg/L, 70 µg/L, 150 µg/L, 300 µg/L e 600 µg/L foram utilizadas para avaliação de toxicidade do CBD e do CBDS. Devido a sensibilidade do

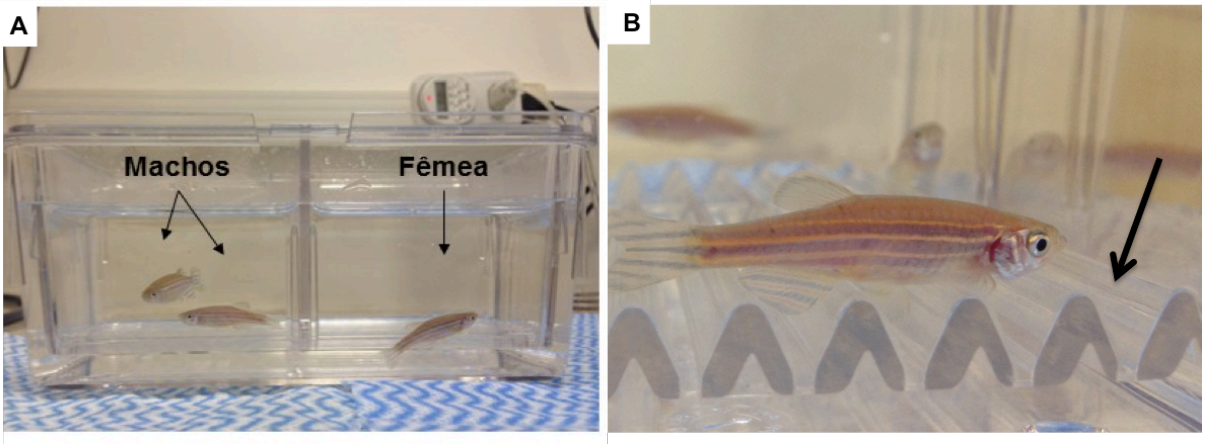
canabidiol e seu derivado à luz, em todos os testes as placas foram cobertas com papel alumínio para evitar a degradação dos compostos.

Para a realização dos testes com a ayahuasca, foi realizada a diluição de uma alíquota da amostra e DMSO foi adicionado até a concentração final de 0,01% em todas as amostras e controles. As concentrações finais de ayahuasca utilizadas nos testes foram 0,001 ppm, 1 ppm e 1000 ppm. As placas foram protegidas da luz para evitar a degradação de componentes da amostra.

4.2 Organismo teste: manutenção, aquisição de ovos e eutanásia

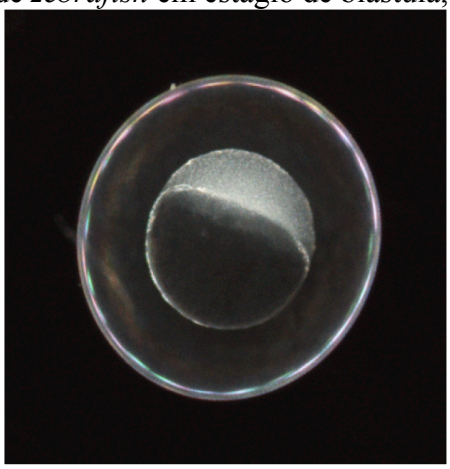
Para a obtenção dos ovos, foram utilizados peixes adultos machos e fêmeas da espécie *Danio rerio*, conhecido como *zebrafish* ou peixe zebra, mantidos por meio do equipamento ZebTech, utilizando água reconstituída e padronizada de acordo com as ISO 7346–1 e 7346–2 (ISO, 1996), à 26±1°C, em ciclo claro:escuro de 14:10h e alimentados com ração comercial e ovos de artêmia. Para aquisição dos ovos, no dia anterior a desova, os peixes machos e fêmeas (proporção de 2:1) foram colocados no aquário de reprodução, que possui um compartimento na região inferior que permite a passagem dos ovos, impedindo que os adultos se alimentem dos ovos fecundados. Na tarde anterior à obtenção dos ovos, em cada aquário de reprodução (Figura 5), foram colocados 2 machos e uma fêmea separados por uma divisória. O acasalamento é iniciado com a iluminação súbita do aquário na manhã seguinte após a retirada da divisória. Cerca de 30 minutos após a desova, os ovos foram coletados e transferidos inicialmente para um béquer contendo água reconstituída (padrão ISO-7346) para serem lavados e em seguida para uma placa Petri com água reconstituída. Todos os ovos foram analisados em estereomicroscópio (Stemi 508, Zeiss) e os não-fertilizados foram descartados. Para a realização dos experimentos, foram selecionados os ovos que alcançam o estágio de blástula (Figura 6).

Figura 5 – Aquário de reprodução



(A) Antes da retirada da divisória, dois machos ao lado esquerdo e uma fêmea ao lado direito. (B) Vista de lado do aquário - divisória inferior (destacada pela seta) que impossibilita os adultos de alcançarem os ovos. Fonte: Próprio autor

Figura 6 – Embrião de *zebrafish* em estágio de blástula, com 5 horas pós-fertilização



Fonte: Próprio autor

A eutanásia dos animais é realizada de acordo com o protocolo *Use of Zebrafish do National Institutes of Health* (2009) e a Resolução Normativa n° 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2018). Para embriões entre 1 e 7 dias pós fertilização (até 200 mg) foi realizada a imobilização por imersão em nitrogênio líquido (hipotermia). Para peixes com mais de 8 dias pós fertilização ou adultos doentes, a eutanásia foi realizada pela overdose de anestésico tricaína metano sulfonato (MS222) na concentração de 300 mg / L por imersão por 10 minutos até paralisação total do movimento opercular. Vale aqui salientar que os peixes adultos somente foram eutanasiados por motivos de doenças, pois os animais saudáveis são mantidos em laboratórios para experimentos futuros.

Os protocolos experimentais do presente projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo número: 16.1.125.60.9 – Anexo 1).

4.3 Padronização de metodologias

4.3.1 Padronização do Ensaio de neurotoxicidade pela determinação da atividade da Acetilcolinesterase

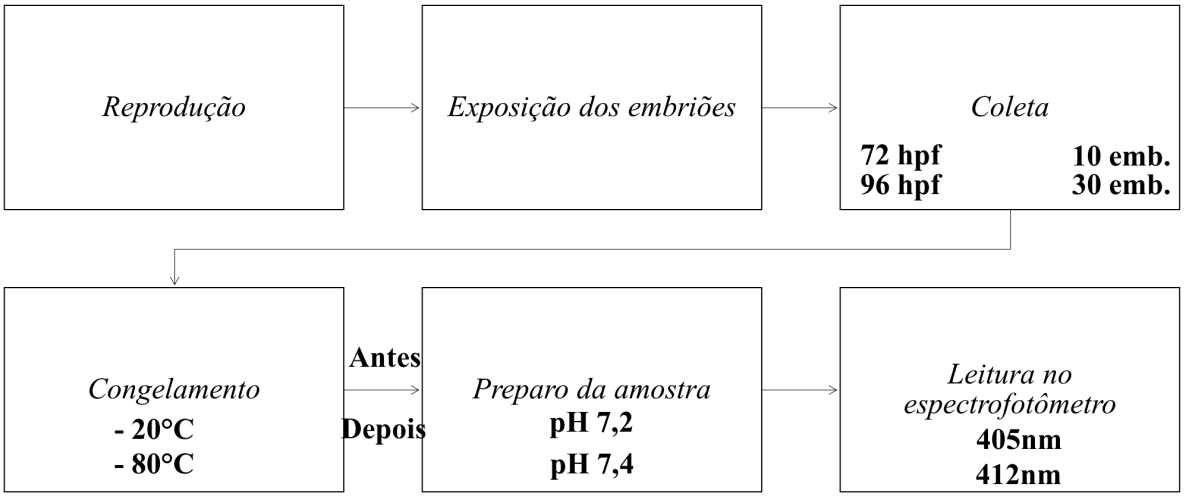
A determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase é utilizada como bioindicador de neurotoxicidade induzida por xenobióticos. Esta análise é amplamente descrita na literatura, inclusive para a análises em *zebrafish* no estágio embrio-larval. O método espectrofotométrico, conhecido como teste de Ellman, utiliza a acetiltiocolina iodada (CAS: 1866-15-5, Sigma-Aldrich) como substrato da enzima avaliada e o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB – CAS: 69-78-3, Sigma-Aldrich) como reagente colorimétrico (ELLMAN et al., 1961). A reação final gera um produto de cor amarela, conforme descrito pelas equações 1 e 2.

$$\text{Acetiltiocolina} \xrightarrow{\text{Acetilcolinesterase}} \text{Acetato + Tiocolina}$$

$$\text{Tiocolina + DTNB} \longrightarrow \text{5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB)}$$
(cor amarela)

O teste de Ellman foi adaptado para microplaca por Guilhermino et al. (GUILHERMINO et al., 1996). O preparo da amostra do *zebrafish* para a realização do teste é descrita na literatura, porém com variações em diversos parâmetros (ELLMAN et al., 1961; FISCHER et al., 2015; KAIS et al., 2015; KÜSTER, 2005; PAMANJI et al., 2015; RODRÍGUEZ-FUENTES et al., 2015; TEIXIDÓ et al., 2013). Frente a essas variações, foi vista a necessidade de otimizar o preparo da amostra e padronizar o teste, utilizando o Planejamento experimental, descrito abaixo. A Figura 7 mostra o procedimento básico para a avaliação da atividade da acetilcolinesterase e os principais parâmetros que tem variação entre os trabalhos publicados.

Figura 7 – Esquema do desenvolvimento da técnica para avaliação da atividade da enzina acetilcolinesterase



Etapas de preparo da amostra de embriões de zebrafish. Em negrito: parâmetros do ensaio que apresentam variação entre as diversas publicações. hpf: horas pós-fertilização; emb.:embriões; nm: nanômetros. Fonte: Autor.

O Planejamento de experimentos permite analisar diversas variáveis simultaneamente, verificando como cada uma delas afeta a metodologia e a influência de uma variável sobre a outra, o que aumenta a confiabilidade da metodologia. Usando o Planejamento, as condições de cada experimento, assim como a sequência em que serão realizados são determinados, de forma a permitir a análise estatística confiável com o menor número de experimentos possível, reduzindo assim, a utilização de reagentes e do número de animais (neste trabalho, embriões de *zebrafish*) necessários para a padronização da metodologia (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Por isso, a otimização do preparo de amostra para determinação da atividade da acetilcolinesterase foi realizada usando a metodologia de Plackett-Burman e Planejamento central composto. As análises estatísticas do Planejamento de experimentos foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Delia Rita Tapia Blácido do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, que possui vasta experiência na área.

Inicialmente, foi realizada a triagem pelo método Plackett-Burman, para selecionar quais as variáveis que poderiam afetar a análise. Nesta etapa, seis variáveis com dois níveis de variação cada foram estudadas. São elas:

- Tempo de coleta de embriões: com 72 hpf e 96 hpf;
- Número de embriões usados para a análise: 10 e 30 embriões;
- pH do tampão usado para congelamento e maceração dos embriões: tampão fosfato em pH 7,2 e 7,4;
- Momento da maceração (Preparo da amostra): antes e depois do congelamento;
- Temperatura de congelamento: -20ºC e -80ºC;
- Comprimento de onda usado para a análise espectrofotométrica: 405nm e 412nm

O software Statistica 13 foi utilizado para realização de todo o planejamento. O número de ensaios e as condições de cada um foram determinadas pelo software conforme mostra a Tabela 1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1 - Planejamento de experimentos pelo método Plackett Burman - Ensaios montados nas diferentes combinações de variáveis geradas pelo software Statistica 13

Ensaio	**pH tampão**	**T(ºC) congelamento**	**nº de embriões**	**Horas pós fertilização**	**Homogeneização**	**Leitura (nm)**
1	7,4	-20	10	72	Depois	405
2	7,4	-20	30	72	Antes	412
3	7,2	-80	30	96	antes	412
4	7,2	-80	10	72	depois	412
5	7,4	-80	30	72	depois	405
6	7,4	-80	30	96	depois	412
7	7,2	-80	30	72	antes	405
8	7,2	-20	10	96	antes	412
9	7,2	-20	30	96	depois	405
10	7,2	-20	30	72	depois	412
11	7,4	-80	10	72	antes	412
12	7,4	-80	10	96	antes	405
13	7,4	-20	30	96	antes	405
14	7,2	-80	10	96	depois	405
15	7,2	-20	10	72	antes	405
16	7,4	-20	10	96	depois	412

Após a reprodução dos peixes, os ovos em estágio de blástula foram separados e 50 ovos foram adicionados em cada placa de Petri contendo 40 mL de água ISO. A coleta dos embriões e preparo das amostras foram realizados de acordo com as condições das variáveis descritas na tabela 1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o máximo de 4 semanas de armazenamento dos testes, as amostras coletadas foram analisadas. Cinquenta microlitros de cada amostra foram transferidos para 3 poços da placa de 96 poços para que a leitura ocorresse em triplicata. O substrato da enzima (acetiltiocolina) e o reagente colorimétrico (DTNB) foram adicionados ao tampão fosfato pH 7,2. Esses reagentes se complexam formando o 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB) e então 250 µL dessa solução foram adicionados a cada poço com auxílio de pipeta multicanal imediatamente antes do início do teste. A análise cinética com duração de 5 minutos foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 405nm ou 412nm a 25ºC utilizando o Leitor de Microplacas Agary da Varian Cary (Agilent, CA, EUA). O resultado da avaliação da atividade da acetilcolinesterase em cada um dos ensaios foi obtido através da relação da leitura de variação média da absorção pela variação do tempo (ΔAbs/Δtempo), e então foi feita a análise estatística.

Em seguida, foi realizado o Planejamento Central Composto para uma análise mais completa com pontos axiais. Este planejamento foi realizado com as variáveis que mostraram ser significantes no planejamento Plackett-Burman. No Planejamento Central Composto, duas variáveis com 5 níveis de variação foram estudadas. Os ensaios foram realizados variando apenas o número de embriões (6, 10, 20, 30 e 36 embriões) e a coleta em diferentes horas pós fertilização (62, 72, 96, 120 e 130 hpf). Assim como no Plackett-Burman, o número de ensaios e as condições de cada um foram definidos pelo software Statistica 13, resultando em 10 diferentes ensaios, que foram realizados em duplicata. A distribuição da amostra na placa de 96 poços e a leitura no espectrofotômetro foram realizadas na ordem randomizada definida pelo software Statistica 13.

Após a determinação das melhores condições de análise, o teste padronizado foi testado frente a um composto reconhecidamente positivo, a cafeína, utilizando as concentrações de 150µg/mL, 300µg/mL e 500µg/mL. A análise foi realizada seguindo o método padronizado e as condições fixadas para cada variável estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições fixadas para a determinação da atividade da acetilcolinesterase de embriões expostos a cafeína após a padronização do método por Planejamento de experimento.

Variável	Condições fixadas
pH tampão	7,2
T(ºC) congelamento	-20ºC
nº de embriões	30
Horas pós fertilização	96
Homogeneização	Depois do congelamento
Leitura (nm)	405nm

O cálculo é realizado utilizando o coeficiente de extinção molar do TNB (ε = 13.600 M^{-1} cm^{-1}) e o resultado da atividade da AChE é dado em nmol/min/mg de proteína, por isso realizou-se a determinação da concentração de proteína presente na amostra pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente de Bradford adaptado para microplacas por Guilhermino et al. (1996). Para a determinação de proteínas, 20 µL de cada amostra foram diluídos na proporção 1:1 e foram transferidos para 3 poços da placa de 96 poços, seguido de 200 µL do reagente de Bradford. A placa foi deixada em repouso por 5 minutos, em seguida realizou-se a leitura no espectrofotômetro em 595 nm a 25ºC utilizando o Leitor de Microplacas Agary da Varian Cary (Agilent, CA, EUA). Para determinar a concentração de proteínas presente na amostra, construiu-se uma curva de calibração com 10 pontos utilizando a proteína γ-globulina bovina na faixa de 100 a 1000 µg/mL.

4.3.2 Padronização do DanioScope

Análises utilizando o software DanioScope (Noldus, Holanda) são consideradas como análises de alto rendimento (*high-throughput screening*). O *software* é uma nova ferramenta que permite investigar parâmetros de embriões e larvas de *zebrafish* como movimentação, frequência cardíaca, fluxo sanguíneo e morfologia do peixe. As medições são baseadas em arquivos de vídeo e imagens, e permitem testar muitos animais simultaneamente, aumentando o rendimento da pesquisa e contribuindo com o princípio dos 3 R's. Além disso, as análises automatizadas eliminam a variabilidade inter e intra-observador.

O software DanioScope foi adquirido com verba do projeto Fapesp 2016/03281-9. Desta forma, a padronização dos parâmetros da ferramenta foi iniciada em 2017, após a

importação. Foi necessário realizar a padronização das condições experimentais, avaliando alguns parâmetros:

- Aumento e a iluminação ideal para a captura da imagem para cada tipo de análise: entre 0,63x a 4x e fundo claro ou escuro;
- Suporte em que a análise seria realizada: placa de cultura, placa de Petri e lâmina com cavidade;
- Quantidade de embriões presentes na captura do vídeo/imagem: entre 1 a 20
- Tempo pós-fertilização ideal para realizar cada análise: 24 a 144hpf.

A coleta dos ovos foi realizada pelo procedimento descrito no item 4.3. E os ovos em estágio de blástula foram selecionados e expostos a água ISO-7346 (controle negativo) e a cafeína, utilizada como padrão de validação, nas concentrações de 1 e 100 µg/mL.

Os vídeos e imagens utilizados para a análise no DanioScope foram obtidos com o auxílio do Estereomicroscópio Zeizz Stemi 508, com objetiva de 1,25x, e com câmera Axio Cam IC integrada, usando o software Zen 2.3 *blue edition*. Para obtenção dos vídeos, os embriões e larvas foram posicionados no campo do estereomicroscópio e a luz e o foco foram ajustados. Realizou-se a climatização por 3 minutos antes de iniciar a gravação do vídeo para evitar alterações nas análises devido a diferenças no ambiente. Vídeos de 3 e 5 minutos no aumento de 0,63x foram obtidos para a realização da análise da atividade do *zebrafish*, enquanto que para avaliar o fluxo e frequência cardíaca, foram obtidos vídeos de 15 segundos no aumento de 1,6 vezes. Para avaliação da morfologia, foram obtidas imagens das larvas de *zebrafish* no aumento de 1x e 1,6 vezes.

Os vídeos e imagens capturados foram transferidos para o software DanioScope e então procedeu-se as análises. Para a avaliação da movimentação, o software reconhece automaticamente os embriões e seleciona cada embrião (no córion) como uma zona de interesse em que a atividade é automaticamente registrada e medida. Porém, também permite que o pesquisador selecione a área de interesse que desejar medir. A seleção automática dos embriões ocorre em menos de 1 minuto, assim como a análise realizada pelo software, que leva menos de um minuto para avaliar um vídeo de 5 minutos. A resposta da atividade é dada por diferentes parâmetros, como porcentagem de tempo que o embrião se move, porcentagem de tempo de inatividade, tempo total gasto em atividade, tempo total gasto inativo, número de vezes que o embrião se moveu, e número de movimentos por minuto.

Para a análise cardíaca, a região do coração é selecionada pelo pesquisador, e o software realiza a análise em segundos, gerando a resposta em batimentos por segundos e

batimentos por minuto. O DanioScope usa análise de vídeo para medir o fluxo em um vaso sanguíneo e também é adequado para medir o fluxo de intestino de forma semelhante. A região do vaso a ser monitorado também é selecionada pelo pesquisador com o auxílio de ferramenta de seleção do software.

O monitoramento da morfologia do *zebrafish* pelo DanioScope é realizado pela análise de imagens inseridas no software. Por meio de ferramentas de desenho intuitivas, é realizada as marcações do tamanho do olho, área de pericárdio, comprimento total do embrião, ou outras regiões de interesse e após calibração, o software faz a medida destes parâmetros, além de permitir inserir informações como o desprendimento da cauda, curvatura da espinha dorsal e número de somitos.

As análises no DanioScope geram tabelas e gráficos que permitem a visualização dos resultados, e o software permite selecionar os grupos a serem estudados e o tempo pós-fertilização do *zebrafish*, dando liberdade para o pesquisador agrupar os dados da forma mais conveniente. Os dados gerados pelo DanioScope podem ser exportados para o Excel e posteriormente para outros programas. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

4.4 Ensaios de Toxicidade

4.4.1 Ensaio de toxicidade com estágio embrio-larval de zebrafish - FET

O método utilizado no presente estudo foi o *Fish Embryo Acute Toxicity Test* (FET) com *zebrafish*, baseado na OECD nº 236 (OECD, 2013) e no trabalho de Nagel (2002) (NAGEL, 2002). O ensaio de toxicidade utilizando embriões e larvas de *zebrafish* teve início com a coleta de ovos fertilizados (em estágio de blástula), que foram distribuídos em placas para cultura com 24 poços. Os ovos foram dispostos individualmente em poços contendo 2,0 mL de cada concentração da solução das substâncias testadas: CBD e CBDS nas concentrações de 5, 20, 70, 150 e 300 µg/L e Ayahuasca nas diluições de 0,001, 1 e 1000 ppm. As soluções usadas nos testes foram preparadas em água padrão ISO-7346 com DMSO na concentração de 0,01%, e 2,0 mL dos controles negativo (água padrão ISO-7346 com DMSO 0,01%) e positivos (3,4 dicloroanilina, 4 mg/L). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada substância testada, e cada réplica foi constituída por 4 embriões para

controle interno da placa e 20 embriões para cada concentração e controles. As placas foram incubadas a 26 ± 1°C e o ciclo claro e escuro foi evitado devido a sensibilidade das moléculas à luz. O desenvolvimento dos embriões e larvas de *zebrafish* foram avaliados em 24, 48, 72, 96, 120 e 144 hpf, utilizando um estereomicroscópio (Stemi 508, Zeiss). Para avaliar a toxicidade dos xenobióticos estudados, foram utilizados indicadores de letalidade, sub-letalidade e teratogenicidade, analisados nos grupos controles e tratamento. A mortalidade foi identificada por coagulação dos embriões, irregularidades na formação dos somitos, problemas na liberação da cauda e perda de batimentos cardíacos. Já os indicadores de sub-letalidade incluíram as malformações de embriões e larvas definidas por alterações no saco vitelínico, defeitos na inflação da bexiga natatória, edemas do pericárdio e do saco vitelínico, deformações esqueléticas e a incapacidade de eclosão. A distinção entre desenvolvimento embrionário normal e anormal foi estabelecida de acordo com a descrição da embriogênese do *zebrafish* publicada por Kimmel et al. (1995) sobre os estágios de desenvolvimento do *zebrafish* (KIMMEL et al., 1995) e os parâmetros analisados em cada período estão descritos na tabela 3. Imagens dos embriões e larvas de *zebrafish* em diferentes tempos de pós-fertilização foram capturados por uma câmera digital acoplada ao estereomicroscópio (AxioCam IC, Zeiss).

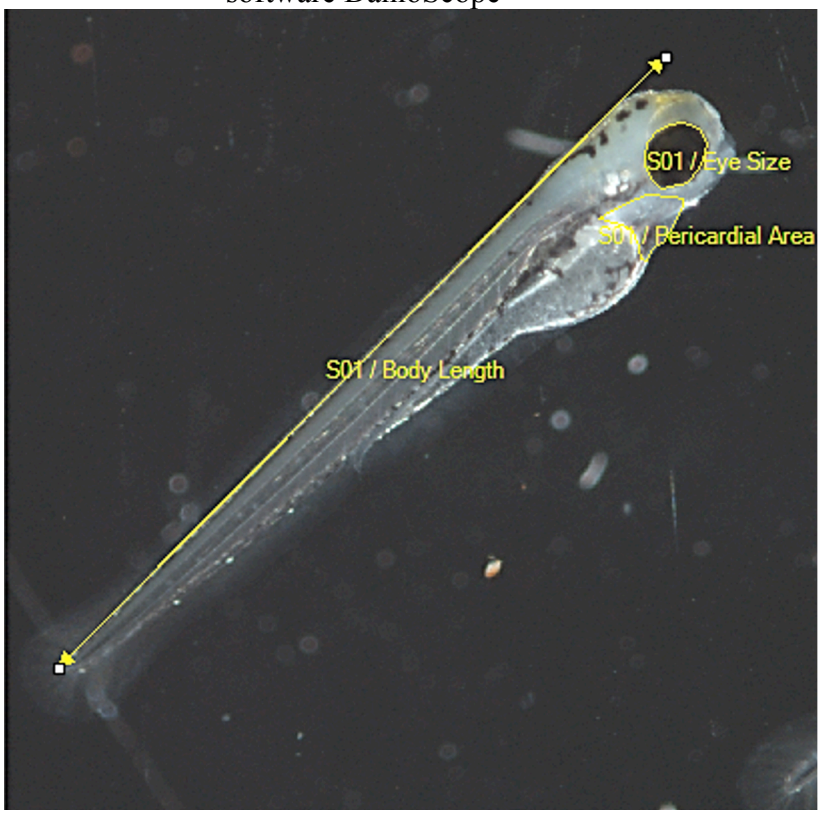
Tabela 3 - *Endpoints* avaliados em cada período de desenvolvimento do estágio embrio-larval de *zebrafish* (Adaptado de NAGEL, 2002).

Endpoints	**Tempo de exposição (hpf)**					
	24	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
Letalidade						
Coagulação	X	X	X	X	X	X
Não desprendimento da cauda	X	X	X	X	X	X
Ausência de somitos	X	X	X	X	X	X
Ausência de batimentos cardíacos		X	X	X	X	X
Subletalidade						
Edema cardíaco ou de saco vitelínico			X	X	X	X
Ausência de pigmentação		X	X	X	X	X
Deformidades esqueléticas			X	X	X	X
Não eclosão			X	X	X	X
Bexiga natatória não inflada					X	X

4.4.2 Análise morfológica do estágio embrio-larval de zebrafish expostos ao Canabidiol, ao Derivado Sintético do Canabidiol e à Ayahuasca

Para análise morfológica, os ovos em estágio de blástula foram colocados em placas de 6 poços (15 ovos por poço) preenchidos com 10 mL da solução padrão das sustâncias testadas, CBD e CBDS nas concentrações de 5, 20, 70, 150 e 300 µg/L; ayahuasca nas diluições de 0,001, 1 e 1000 ppm e controles negativo (Água padrão ISO-7346 com DMSO 0,01%) e positivo (3,4 dicloroanilina, 4 mg/L). As placas foram mantidas a 26 ± 1ºC e protegidas da luz. A 96 hpf, 10 embriões foram selecionados aleatoriamente e transferidos individualmente para lâminas com cavidade. As lâminas foram analisadas em estereomicroscópio (Stemi 508, Zeiss) e fotografados com a câmera acoplada (AxioCam IC Zeiss, Alemanha) para análise de alterações morfológicas usando o software DanioScope. Imagens fenotípicas foram usadas para medir quantitativamente o comprimento dos embriões (da cabeça à cauda), área dos olhos e área pericárdica, como mostrado na Figura 8.

Figura 8 - *Zebrafish* com 96 horas pós-fertilização analisado quantitativamente pelo software DanioScope



Parâmetros analisados: comprimento do corpo, área dos olhos e área pericárdica (n=10x3). Fonte: Próprio autor

4.4.3 Análise da atividade motora de embriões de zebrafish expostos ao Canabidiol, ao Derivado Sintético do Canabidiol e à Ayahuasca

Para o ensaio da atividade motora, os ovos em estágio de blástula foram colocados em placas de 6 poços (15 ovos por poço) preenchidos com 10 mL solução padrão das sustâncias testadas, CBD e CBDS nas concentrações de 5, 20, 70, 150 e 300 µg/L; Ayahuasca nas diluições de 0,001, 1 e 1000 ppm e controles negativo (Água padrão ISO-7346 com DMSO 0,01%) e positivo (3,4 dicloroanilina, 4 mg/L), totalizando 45 ovos por tratamento e controles. Os testes foram realizados em triplicata (n = 45 × 3) a 26 ± 1ºC e as placas foram protegidas da luz. Após 24 hpf, 45 embriões por tratamento e controles foram transferidos para lâminas escavadas com três cavidades (15 ovos por cavidade). Um período de aclimatação de cinco minutos foi usado para minimizar os distúrbios ocorridos durante as transferências dos embriões. Após o período de aclimatação, os embriões foram monitorados e gravações de 3 min foram realizadas usando um estereomicroscópio (Stemi 508, Zeiss) com uma câmera acoplada (AxioCam IC Zeiss, Alemanha). Os vídeos foram salvos em AVI e posteriormente analisados pelo software DanioScope.

4.4.4 Determinação da atividade da acetilcolinesterase em embriões expostos ao Canabidiol

Embriões de *zebrafish* no estágio de blástula foram expostos ao canabidiol nas concentrações de 5, 20, 70, 150 e 300 µg/L, e ao controle negativo (Água padrão ISO-7346 com DMSO 0,01%). As placas foram mantidas a 26ºC ± 1ºC protegidas da luz. Após 96 hpf, 30 embriões de cada concentração foram coletados e transferidos para microtubos que foram armazenados em -20ºC até o momento da análise. O experimento foi realizado em sextuplicata. No dia da análise bioquímica, as amostras foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em 500 µL de tampão K-fosfato (pH 7,2), seguido de centrifugação (SOLAB SL-700) a 3000 rpm por 10 min para isolar o sobrenadante. O homogenato foi separado em alíquotas em microtubos para determinações de proteína e AChE. A atividade da AChE foi realizada de acordo com o método de Ellman adaptado para microplacas por Guilhermino

(1996) e padronizado conforme descrito no item 4.3.1 deste documento. A determinação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford adaptada para microplaca por Guilhermino et al. (1996). A análise espectrofotométrica foi realizada em quadruplicata a 25ºC utilizando o Leitor de Microplacas Agary da Varian Cary (Agilent, CA, EUA).

4.4.5 Avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas ao Canabidiol, ao Derivado Sintético do Canabidiol e à Ayahuasca

A avaliação da atividade locomotora da larva de *zebrafish* foi realizada utilizando o equipamento de monitoramento Viewpoint Zebrabox (ViewPoint Life Sciences, Lyon, France) em parceria com o Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan, sob a supervisão da Dra. Mônica Lopes-Ferreira no período de setembro a novembro de 2018.

Os embriões de *zebrafish* foram expostos às substâncias testadas (canabidiol, derivado sintético de canabidiol e ayahuasca) em placas de 96 poços (1 embrião por poço), com 250 µL de solução no poço. Foram analisadas 24 larvas por concentração e a exposição foi realizada até o estágio de larva, em 96hpf, quando então, os vídeos foram obtidos e analisados no equipamento. As concentrações de CBD e CBDS testadas foram 5, 20, 70, 150, 300 e 600 µg/L e controle negativo. E as diluições de ayahuasca testadas foram 0,001, 1 e 1000 ppm e controle negativo. Para não influenciar o resultado devido a variações no ambiente, a temperatura da sala foi mantida constante, e controle negativo (n=24) foi adicionado em todas as placas do ensaio. A distribuição na placa de 96 poços dos embriões expostos a cada concentração das substâncias, foi realizado conforme o esquema apresentado na Figura 9 (CBD e CBDS) e Figura 10 (Ayahuasca).

Figura 9 – Representação esquemática das placas de 96 poços utilizadas no ensaio de Atividade locomotora de embriões expostos ao canabidiol e derivado sintético de canabidiol no equipamento Zebrabox

Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**
B	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**
C	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**
D	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**
E	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
F	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
G	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**
H	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**	**70**
Placa 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**
B	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**
C	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**
D	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**
E	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**
F	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**	**300**
G	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**
H	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**	**600**

Concentrações das substâncias testadas em cada poço da placa em µg/L. Placas contendo 1 embrião de *zebrafish* por poço. CN: Controle negativo. Fonte: Próprio autor.

Figura 10 – Representação esquemática das placas de 96 poços utilizadas no ensaio de Atividade locomotora de embriões expostos à ayahuasca no equipamento Zebrabox

Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**
B	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**	**CN**
C	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**
D	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**
E	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
F	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
G	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**
H	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**

Concentração da ayahuasca em cada poço da placa em ppm. Placas contendo 1 embrião de *zebrafish* por poço. . CN: Controle negativo. Fonte: Próprio autor.

O Zebrabox monitora movimentos usando a gravação de vídeo automatizada. Os vídeos foram obtidos e analisados no Zebrabox por 10 minutos, iniciados logo após o período de aclimatação de 10 minuto, e a distância total percorrida pelas larvas neste intervalo de tempo foi avaliada e comparada com o controle negativo.

4.5 Análise estatística

O software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas de cada teste. Após a verificação da normalidade e homogeneidade (teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Barlett, respectivamente), foi realizada análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Dunnett para verificar diferenças significativas entre tratamentos e controles. No caso de falha na normalidade e/ou teste de homocedasticidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A menor concentração de efeito observada (LOEC) foi determinada quando diferenças significativas foram encontradas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 0,05. A concentração capaz de causar efeito em 50% dos indivíduos expostos (EC50 - *Effective concentration 50%*) foi calculada utilizando o software Trimmed Spearman-Karber.

5 Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

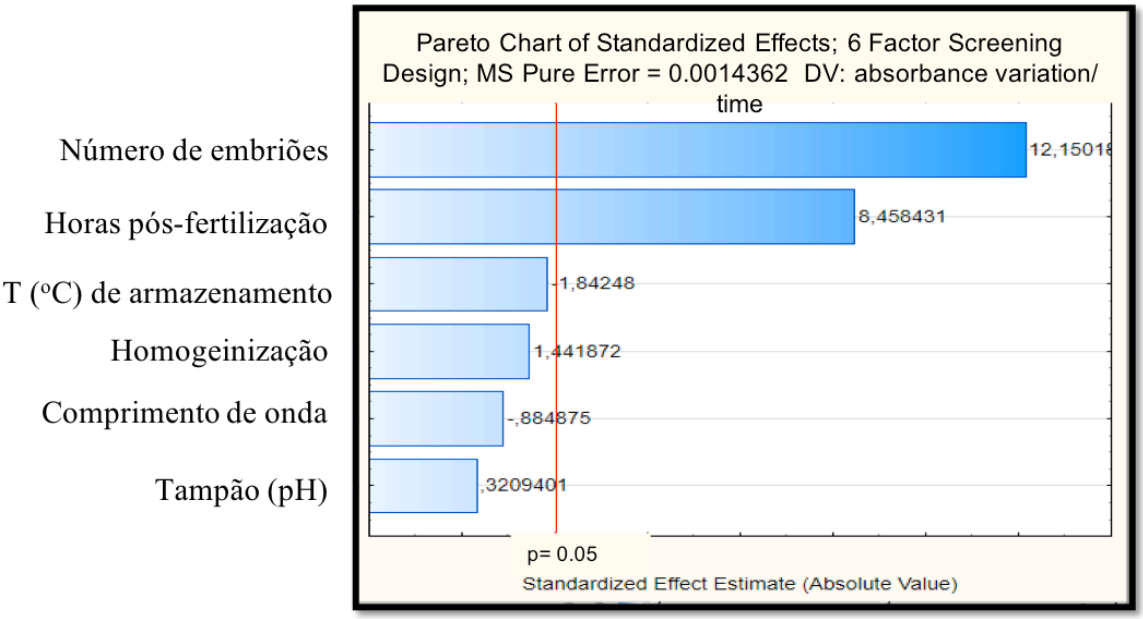
5.1 Padronização de metodologias

5.1.1 Padronização da determinação da atividade da acetilcolinesterase

A padronização das condições de preparo de amostra para a determinação da atividade da acetilcolinesterase foi realizada por meio do delineamento experimental, usando inicialmente a metodologia Plackett-Burman para triar as variáveis independentes significativas, seguido pelo planejamento central composto para definir as condições do experimento. Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, foram apresentados no *57th Annual Meeting of the Society of Toxicology,* que ocorreu na cidade de San Antonio, Texas, Estados Unidos no período de 11 a 15 de março de 2018 e publicados no livro de resumos, *The Toxicologists*.

No planejamento de experimento realizado pelo método Plackett-Burman foram estudadas 6 variáveis independentes, das quais apenas duas foram significativas ($p < 0,05$). Como mostrado no diagrama de Paretto na Figura 11, as variáveis que apresentaram diferença significativas foram o número de embriões utilizados para o ensaio e o tempo pós fertilização em que a coleta dos embriões foi realizada.

Figura 11 – Diagrama de Paretto gerada pelo planejamento Plakett-Burman, após a avaliação das respostas obtidas com diferentes variáveis para o ensaio da atividade de acetilcolinesterase em embriões de *Zebrafish*



As barras que ultrapassam a linha vermelha representam as variáveis significativas na análise. Fonte: Próprio autor.

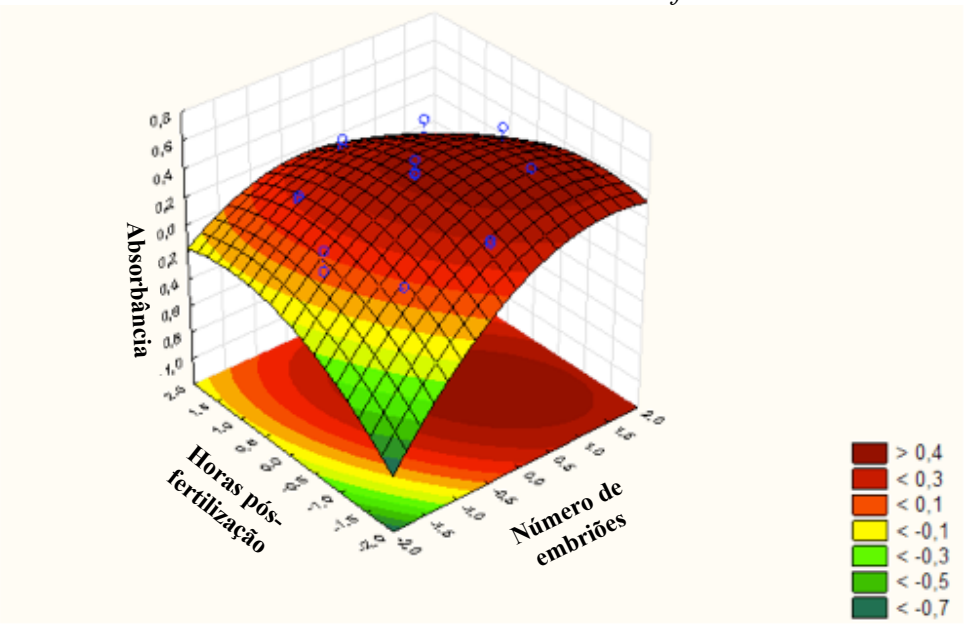
Na etapa seguinte, as variáveis significativas no planejamento Plackett-Burman foram estudadas pelo planejamento Central Composto. As variáveis estudadas pelo método Plackett-Burman que não demonstraram diferenças estatisticamente significativas foram fixadas conforme a praticidade da análise, como descrito a seguir. O pH do tampão usado para o preparo da amostra foi fixado no mesmo valor do tampão usado para dissolução do reagente colorimétrico (pH = 7,2); a temperatura de congelamento foi fixada em -20ºC, foi definida a homogeneização após o congelamento e a leitura no espectrofotômetro foi fixada em 412 nm.

O planejamento central composto gerou um modelo bem ajustado, preditivo e significativo ($p < 0,05$). A partir dos dados obtidos pelo planejamento central composto (Tabela 4), foi possível gerar uma superfície de resposta, como mostrado pela Figura 12, na qual nota-se uma área vermelha, que indica os valores nos quais obteve-se maior variação de absorbância, mostrando a condição ótima para realizar o ensaio (30 embriões coletados em 96 hpf).

Tabela 4 - Condições dos ensaios com *Zebrafish* para o planejamento Central Composto na ordem definida pelo software Statistica 13 e seus respectivos resultados.

Ensaio	Número de embriões	Horas pós fertilização	Resultado ΔAbs/Δtempo
1	20	96	0,5378
2	30	72	0,5161
3	35	96	0,5106
4	20	96	0,4394
5	20	96	0,4520
6	20	63	0,3069
7	6	96	0,1710
8	10	72	0,0831
9	20	63	0,2843
10	30	120	0,4140
11	30	72	0,3541
12	20	96	0,3224
13	10	120	0,2213
14	20	135	0,3669
15	6	96	0,0253
16	10	120	0,2378
17	30	120	0,2915
18	20	135	0,2944
19	35	96	0,3065
20	10	72	0,0733

Figura 12 - Superfície de resposta gerada pelo planejamento central composto, após a avaliação das respostas obtidas com diferentes variáveis para o ensaio da atividade de acetilcolinesterase em embriões de *Zebrafish*



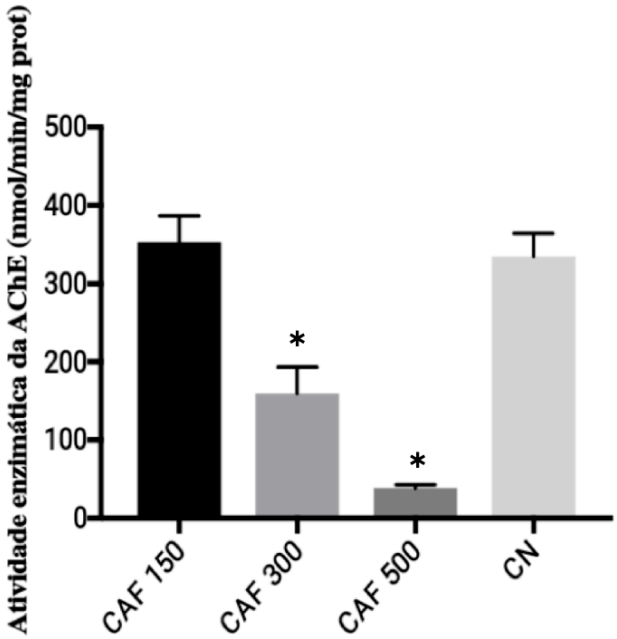
Fonte: Próprio autor

O planejamento de experimento permitiu verificar as variáveis independentes do preparo da amostra que influenciam a determinação da atividade da acetilcolinesterase pelo método de Ellman, e assim foi possível definir as melhores condições de cada variável. Para verificar a eficiência do teste, realizou-se a determinação da atividade da acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish* expostos a cafeína (CAF), nas concentrações de 150µg/mL, 300µg/mL e 500µg/mL. A concentração de 150 µg/mL não alterou de forma estatisticamente significativa a atividade da acetilcolinesterase, enquanto que nas concentrações de 300µg/mL e 500µg/mL, a atividade da acetilcolinesterase foi reduzida de forma dose dependente nos grupos expostos quando comparado ao controle negativo (CN) ($F_{3,20}$ =169,7; $p < 0,0001$), como mostrado pela Tabela 5 e Figura 13.

Tabela 5 - Relação da atividade enzimática da acetilcolinesterase de embriões de *zebrafish* expostos à cafeína (CAF) comparada ao Controle Negativo

Tratamentos	% em relação ao CN	Valor de P	Significativo (P < 0,05)
CAF 150	107,71	0,5499	Não
CAF 300	47,53	0,0001	Sim
CAF 500	11,57	0,0001	Sim
CN	100,00		

Figura 13 – Comparação da atividade da acetilcolinesterase para embriões de *Zebrafish* no grupo controle e nos grupos expostos à cafeína (µg/mL)



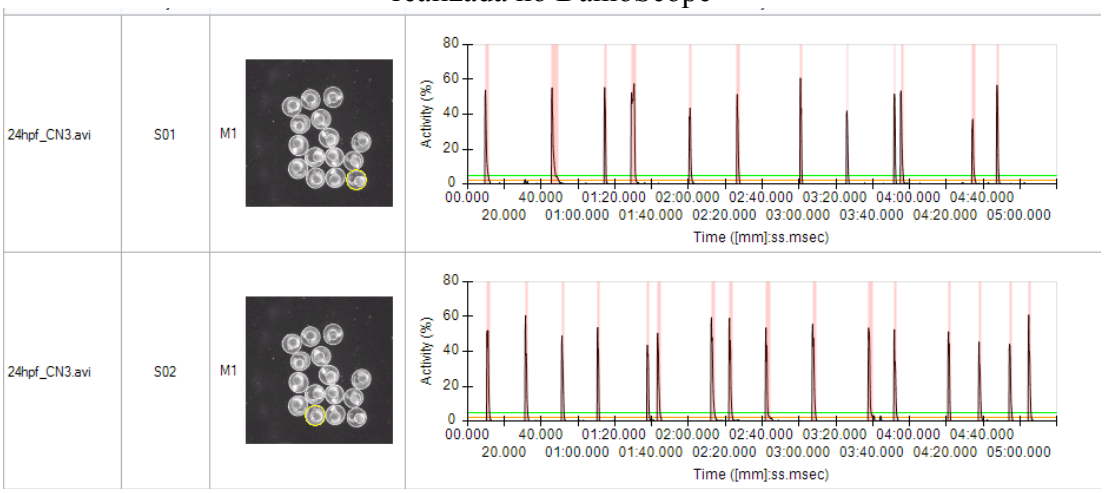
Valores representados por média ± erro padrão da média. * Teste de Kruskal-Wallis, p <0,05, para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor

5.1.2 Padronização dos parâmetros do software DanioScope

Para determinar o melhor suporte para a captura das imagens, foram utilizadas placas de Petri, placas de cultura de 6 poços e lâmina côncava para microscopia. Foi observada maior praticidade e qualidade das imagens quando os embriões foram expostos em placa de cultura de 6 poços durante todo o período de teste e transferidos para a lâmina côncava durante a realização da captura da imagem ou vídeo em todas as análises do DanioScope (morfologia, frequência cardíaca, fluxo e atividade).

Para a avaliação da atividade motora dos embriões de *zebrafish*, a captura das imagens precisa ocorrer enquanto os embriões ainda não eclodiram, por isso as análises foram realizadas entre 24 e 56 hpf, observando-se grande diferença do comportamento do embrião entre os dias, e entre o período em que o vídeo foi obtido (manhã ou tarde), mostrando a importância de realizar as análises dos controles e substância teste em horários próximos. O DanioScope conseguiu selecionar automaticamente os embriões mesmo no menor aumento (0,63x), o que possibilitou monitorar 15 embriões por vídeo. Observou-se que este reconhecimento é mais eficiente quando os vídeos são gravados com o fundo escuro no estereomicroscópio em comparação com o fundo claro, devido ao maior contraste do embrião no período do desenvolvimento em que foi estudado. O software gera uma tabela com os dados de todos os parâmetros, e também um gráfico para cada indivíduo do estudo, como demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Gráfico da avaliação da atividade motora do embrião do *zebrafish* realizada no DanioScope



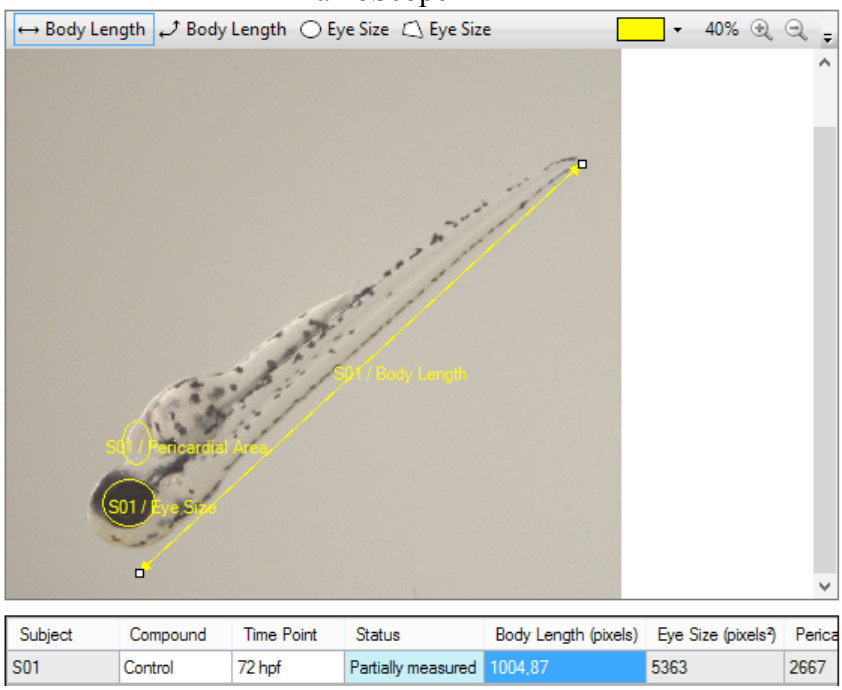
Controle negativo com 24 hpf. Fonte: Próprio autor

O monitoramento da frequência cardíaca e do fluxo sanguíneo podem ser realizados a partir de 48hpf, porém observou-se maior facilidade para posicionar os organismos a partir de 72hpf, após ocorrer a eclosão. O aumento de 1,6x proporcionou melhor visualização da região do pericárdio facilitando a demarcação da área, assim como a demarcação do vaso sanguíneo a ser monitorado para a obtenção do fluxo.

Em relação à avaliação dos batimentos cardíacos, foi observada discrepância entre os dados fornecidos pelo software e a contagem manual do número de batimentos por minuto. Isso indica, que a captura de vídeo para avaliação deste parâmetro ainda precisa ser melhor estudada, e por isso estes parâmetros não foram considerados na avaliação de toxicidade das substâncias estudadas neste projeto.

A morfologia foi estudada a partir da seleção dos olhos, região de pericárdio, e comprimento total da larva do *zebrafish* através das ferramentas de desenho do DanioScope como demonstrado na Figura 15. O aumento de 1x permitiu a captura da imagem com até 5 larvas de 72 a 144hpf, enquanto que o aumento de 1,6x permite avaliar um embrião por imagem no mesmo período. A calibração foi realizada pelo upload de uma imagem obtida de uma régua no mesmo aumento em que as imagens do *zebrafish* foram obtidas. O software gerou uma tabela com os dados das medições em micrômetros.

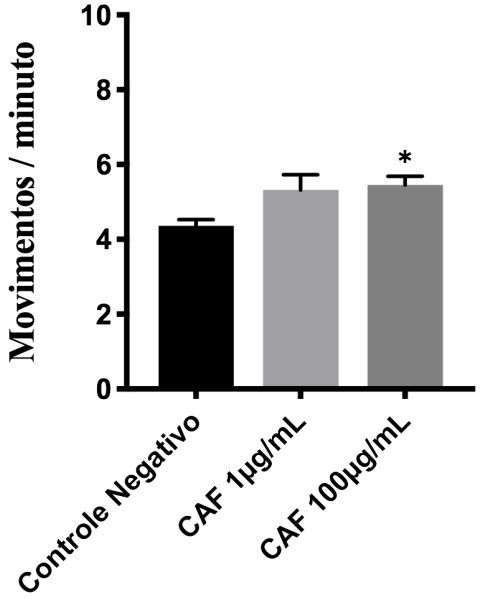
Figura 15 – Seleção dos parâmetros para análise da morfologia do *zebrafish* pelo DanioScope



Controle negativo com 72 hpf. Fonte: Próprio autor

A fim de validar a padronização da análise morfológica e da avaliação da atividade motora do embrião usando o software DanioScope, foi realizada a análise de embriões expostos à cafeína e ao controle negativo. A análise da atividade pelo movimento/minuto do embrião, realizada em 24 hpf usando n = 45 para cada concentração, apresentou resultado significativo ($p < 0,05$) para os embriões expostos a cafeína na concentração de 100µg/mL (H = 10,36; p = 0,0056) e 100µg/mL (p = 0,0171) ($F_{2,132}$=4,231), como demonstrado no gráfico da Figura 16. A média de atividade/minuto para os embriões expostos ao controle negativo foi 4,37, enquanto que para os embriões expostos a cafeína 1µg/mL foi 5,32 e expostos a cafeína 100µg/mL, foi 5,45.

Figura 16 – Representação gráfica da análise da atividade pelo movimento/minuto do embrião de *zebrafish* em 24 horas pós-fertilização, expostos à cafeína



CAF: cafeína. Valores representados por média ± erro padrão da média. * Teste de Kruskal-Wallis, p <0,05, para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor

A análise morfológica realizada em 144 hpf com n=5 mostrou redução significativa ($p < 0,05$) na média do comprimento das larvas expostas a cafeína na concentração de 100µg/mL (p = 0,0170). A média do comprimento das larvas expostas ao controle negativo foi 3885 µm e das larvas expostas a cafeína 100µg/mL foi 2967µm. Apesar de não ser possível a detecção de diferença nas larvas por meio da análise visual em estereomicroscópio, o DanioScope permitiu a quantificação do dano.

Foi observada também redução significativa (p = 0,006) na média da área dos olhos dos organismos expostos a cafeína (100µg/mL), passando de 59082µm^2 (controle negativo) para 39706µm^2 (expostos a cafeína). Este efeito também foi detectado apenas pela análise pelo software, não tendo sido observado pela análise visual em estereomicroscópio, demonstrando o aumento da sensibilidade do método, possibilitando a detecção de efeitos precoces.

A curvatura da larva também apresentou alteração significativa (p = 0,0079), com os embriões expostos à cafeína (100µg/mL) apresentando curvatura dorsal. A medida da região do pericárdio, não demonstrou diferença significativa entre os embriões expostos ao controle negativo e à cafeína, tanto na concentração de 1µg/mL, quanto em 100 µg/mL.

Frente ao exposto, o DanioScope permitiu avaliar os efeitos induzidos pela substância testada (cafeína) de forma prática e rápida. Além disso, permitiu a análise quantitativa das alterações, garantindo maior segurança no teste, já que permite verificar alterações que, sem esta ferramenta, não seriam detectadas principalmente em estágios iniciais.

5.2 Ensaios de Toxicidade induzida pelo Canabidiol

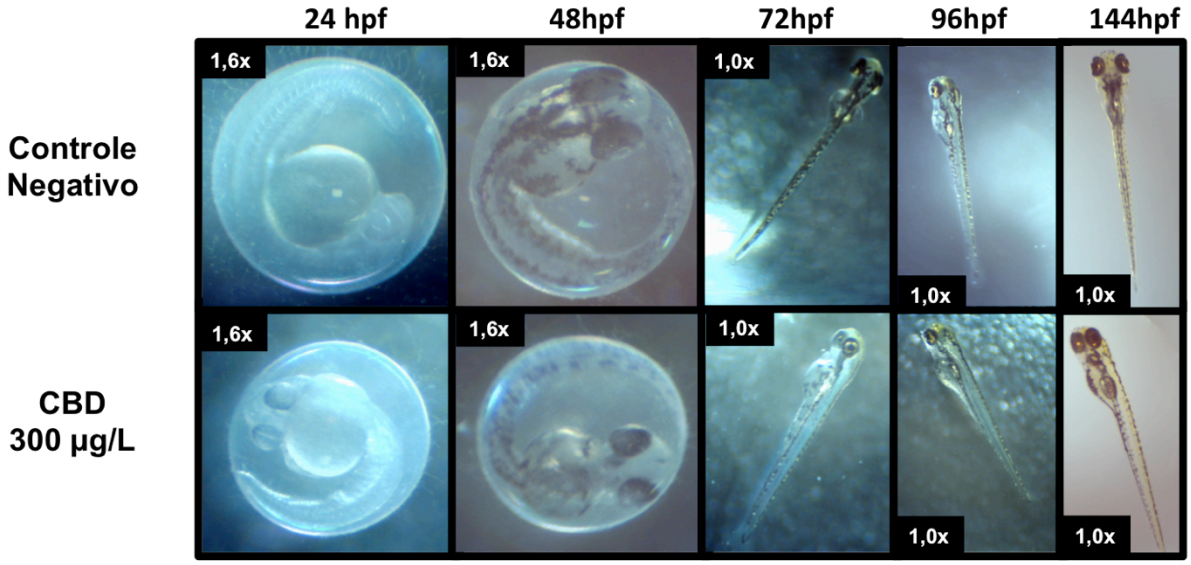
Os resultados do FET com embriões de *zebrafish* expostos ao canabidiol, foram apresentados na forma de pôster e publicados no livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Toxicologia (CBTOX), que ocorreu de 08 a 11 de outubro de 2017 na cidade de Goiânia-GO. Após o congresso, recebemos o convite para submeter o artigo com estes dados na edição especial da revista Chemico-Biological Interactions (fator de impacto: 3,143). O artigo foi publicado em junho de 2018 (Anexo II).

5.2.1 Avaliação de alterações morfológicas no estágio embrio-larval de zebrafish

Embriões de *zebrafish* expostos ao CBD (5-300 µg/L) não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros morfológicos avaliados qualitativamente durante o FET até 96 hpf (coagulação, cauda não destacada, malformação dos somitos, ausência de batimentos cardíacos, desenvolvimento de olhos, movimentação espontânea, pigmentação, edemas, malformação da cabeça, cauda e otólitos, escoliose, deformidade do saco vitelino,

crescimento retardado). O efeito de coagulação foi visto em 1 indivíduo exposto nas concentrações de 20, 150 e 300 µg/L, porém o resultado do teste por ANOVA demonstrou que este efeito não foi estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo. Os demais *endpoints* estudados não resultaram efeito. A Figura 17 mostra embriões expostos ao CBD e ao controle negativo nos diferentes estágios estudados.

Figura 17 – Embriões de *zebrafish* expostos ao controle negativo e ao canabidiol.



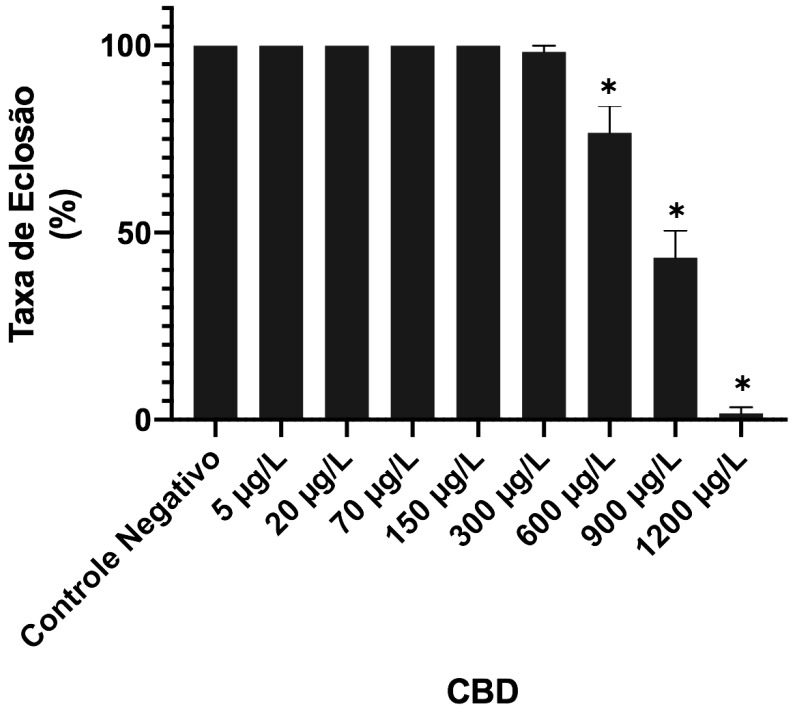
Imagens capturadas nos diferentes tempos em que o embrião foi analisado. hpf: Horas pós-fertilização. Fonte: Próprio autor.

Para verificar alterações quantitativas precoces no desenvolvimento, medimos o comprimento corporal (µm), a área do pericárdio e a área dos olhos (µm^2) de embriões de *zebrafish* com 96 hpf. A exposição ao CBD não induziu diferenças significativas nos parâmetros avaliados quando comparados aos controles ($F_{5;\,172} = 0{,}62$, $p = 0{,}69$; $F_{5;\,177} = 1{,}19$, $p = 0{,}31$; $F_{5;\,175} = 1{,}8$, $p = 0{,}11$, respectivamente) (Tabela 6). Por outro lado, o CBD reduziu a taxa de eclosão em alguns embriões expostos a concentração de 300 µg/L, e então aumentamos as concentrações a serem testadas. Ao aumentar a faixa de concentrações testadas até 1200 µg/L, observamos que a partir de 300 µg/L houve redução da taxa de eclosão sendo significativa a partir de 600 µg/L como mostrado no gráfico da Figura 18 (LOEC = 600 µg/L; H = 514,7 ; p=<0,0001). O EC50 foi calculado obtendo-se o valor de 754 µg/L.

Tabela 6 - Análise quantitativa das alterações morfológicas em embriões de *Zebrafish* expostos ao canabidiol (CDB) utilizando o software DanioScope (média ± desvio padrão)

	Comprimento (µm)	**Área dos olhos (μm^2)**	**Área do pericárdio (μm^2)**
Controle Negativo	3525 ± 79	54097 ± 4438	54100 ± 25562
CBD 05 µg/L	3499 ± 83	53101 ± 5724	49755 ± 18926
CBD 20 µg/L	3528 ± 85	54566 ± 3983	52122 ± 16712
CBD 70 µg/L	3508 ± 112	50357 ± 5768	47387 ± 11380
CBD 150 µg/L	3536 ± 106	52502 ± 6560	56853 ± 14864
CBD 300 µg/L	3522 ± 97	52003 ± 4722	48773 ± 16439

Figura 18 - Taxa de eclosão de embriões de *zebrafish* expostos ao canabidiol (CBD)

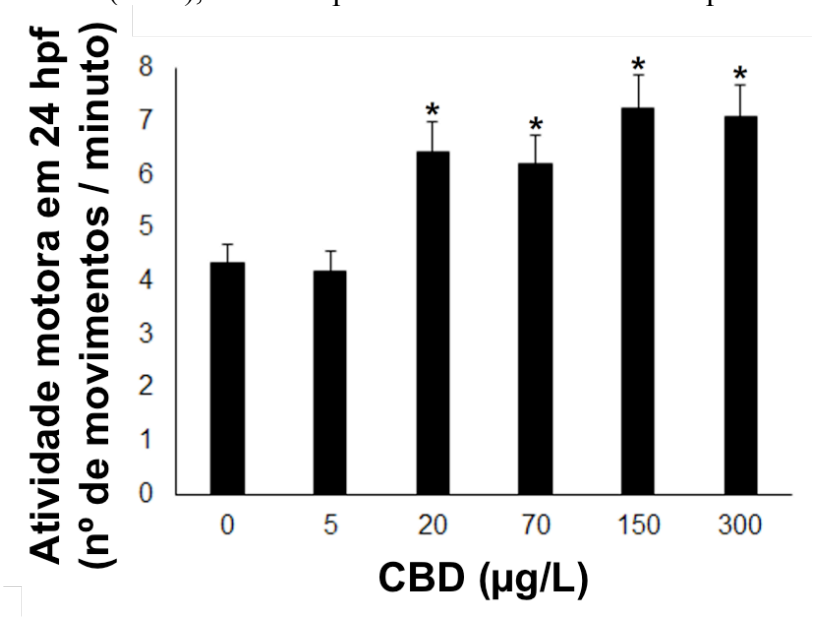


CBD: canabidiol. Valores representados por média ± Erro padrão da média. * Teste de Kruskal-Wallis, p <0,05, para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor

5.2.2 Avaliação da atividade motora dos embriões de zebrafish exposto ao canabidiol

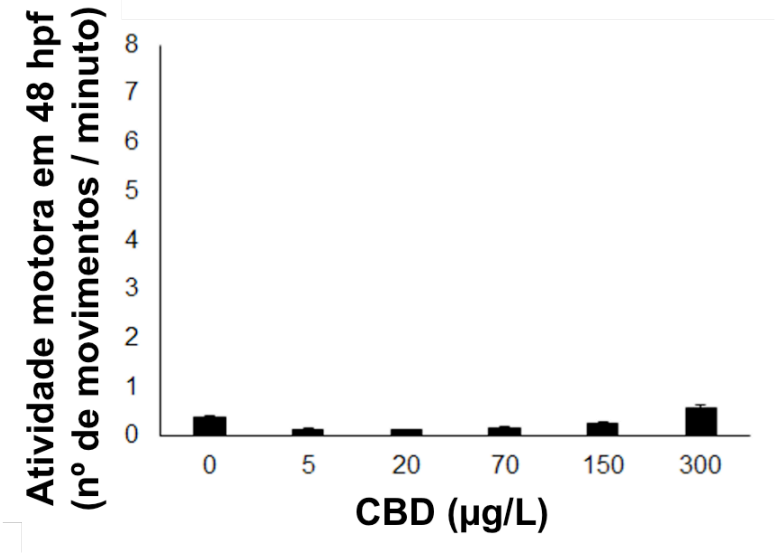
A atividade motora, expressa pelo número de eventos de atividade dos embriões de *zebrafish*, aumentou significativamente após a exposição ao CBD (Figura 19). Após o monitoramento por 3 min, os embriões com 24 hpf exibiram hiperatividade significativa em relação aos controles (LOEC = 20 µg/L, H = 202,9, p <0,0001). Os embriões expostos foram em média 1,5 vezes mais ativos que os embriões do grupo controle após a exposição a 20 µg/L. Esse efeito não foi dose dependente com concentrações crescentes de CBD, indicando que a saturação da resposta subletal foi alcançada. Este efeito, no entanto, não foi observado com 48 hpf, quando a atividade motora foi semelhante ao controle negativo para todas as concentrações testadas (Figura 20).

Figura 19 - Atividade motora de embriões de *zebrafish* em 24 hpf após exposição ao canabidiol (CBD), contados pelo número de movimentos por minuto



Análise de atividade motora realizada no software DanioScope. CBD: canabidiol. Valores representados por média ± erro padrão da média.* Teste de Kruskal-Wallis, p <0,05, para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor

Figura 20 - Atividade motora de embriões de *zebrafish* em 48 hpf após exposição ao canabidiol (CBD), contados pelo número de movimentos por minuto



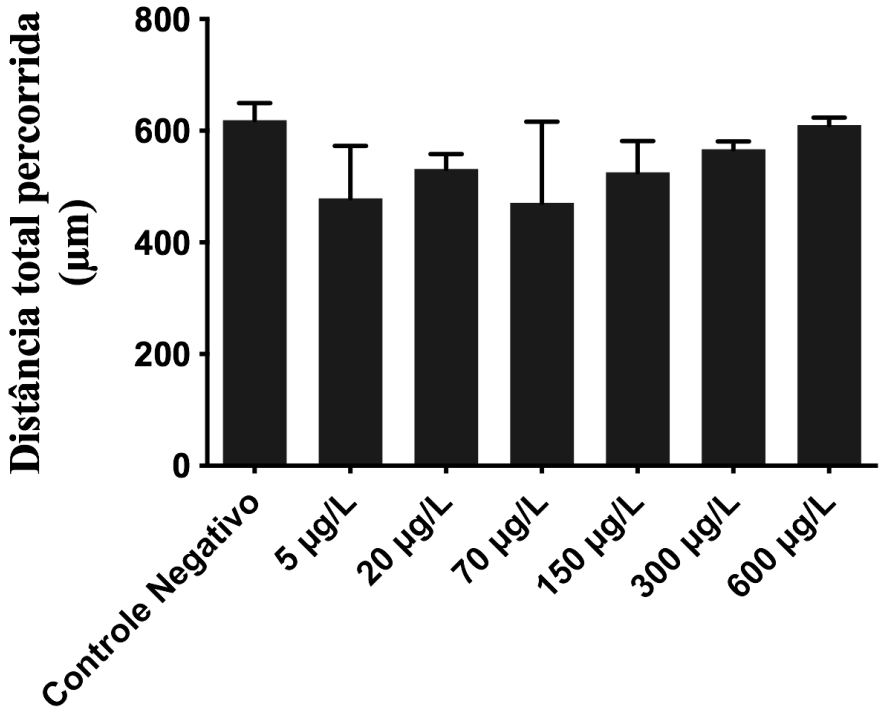
Análise de atividade motora realizada no software DanioScope. CBD: canabidiol. Valores representados por média ± erro padrão da média. * Teste de Kruskal-Wallis, p <0,05, para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor

5.2.3 Avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas ao Canabidiol

Seguindo os resultados encontrados em 48 hpf, não houve alteração na avaliação da atividade motora do *zebrafish*, quando expostos ao canabidiol nas concentrações de 5 a 600 µg/L até 96 hpf. A análise foi realizada no equipamento Zebrabox, e o resultado foi obtido pela distância total percorrida pelas larvas durante os 10 minutos de gravação.

De forma análoga, não foram observadas diferenças significativas na distância total percorrida pelas larvas expostas ao canabidiol nas concentrações estudadas (H = 4,987, p = 0,5455), indicando que o canabidiol não modulou o comportamento de nado dos organismos. A Figura 21 mostra o gráfico obtido pela média das distâncias percorridas por cada grupo.

Figura 21 – Distância total percorrida pela larva de *zebrafish* em 10 minutos de análise no Zebrabox após 96h de exposição ao Canabidiol

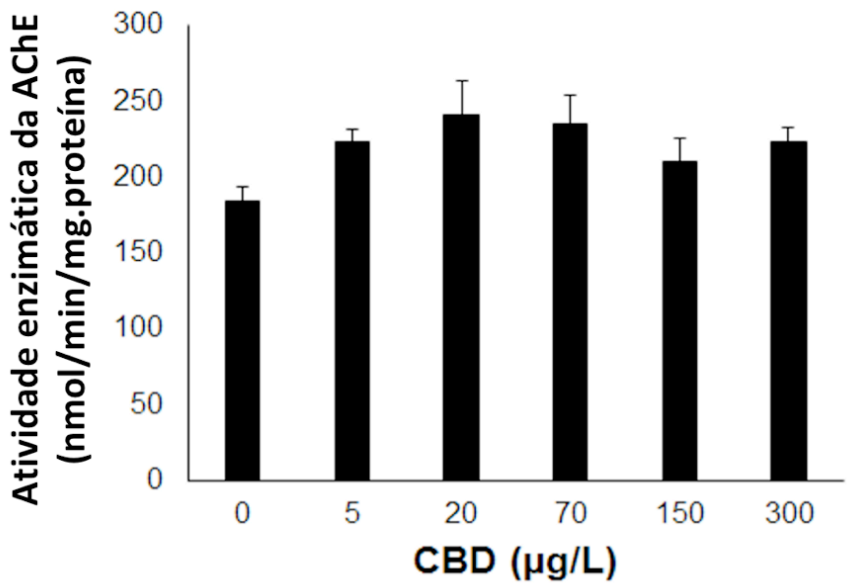


Valores representados por média ± erro padrão da média. * Teste de Dunnett, p <0,05, para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor.

5.2.4 Determinação da atividade enzimática de larvas expostas ao canabidiol

Após 96 hpf, *zebrafish* no estágio embrio-larval expostos ao CBD foram coletados e foi realizada a determinação da atividade da AChE. Após a análise cinética por espectrofotômetro monitorada durante 5 min, alterações significativas em relação aos controles não foram observadas ($F_{5;30}$ = 1,7; p = 0,17) (Figura 22).

Figura 22 - Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) de *zebrafish* no estágio embrio-larval expostos ao canabidiol (CBD) até 96 horas pós fertilização



CBD: canabidiol. Valores representados: média ± erro padrão da média,
* Teste de Dunnett, p <0,05, para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor

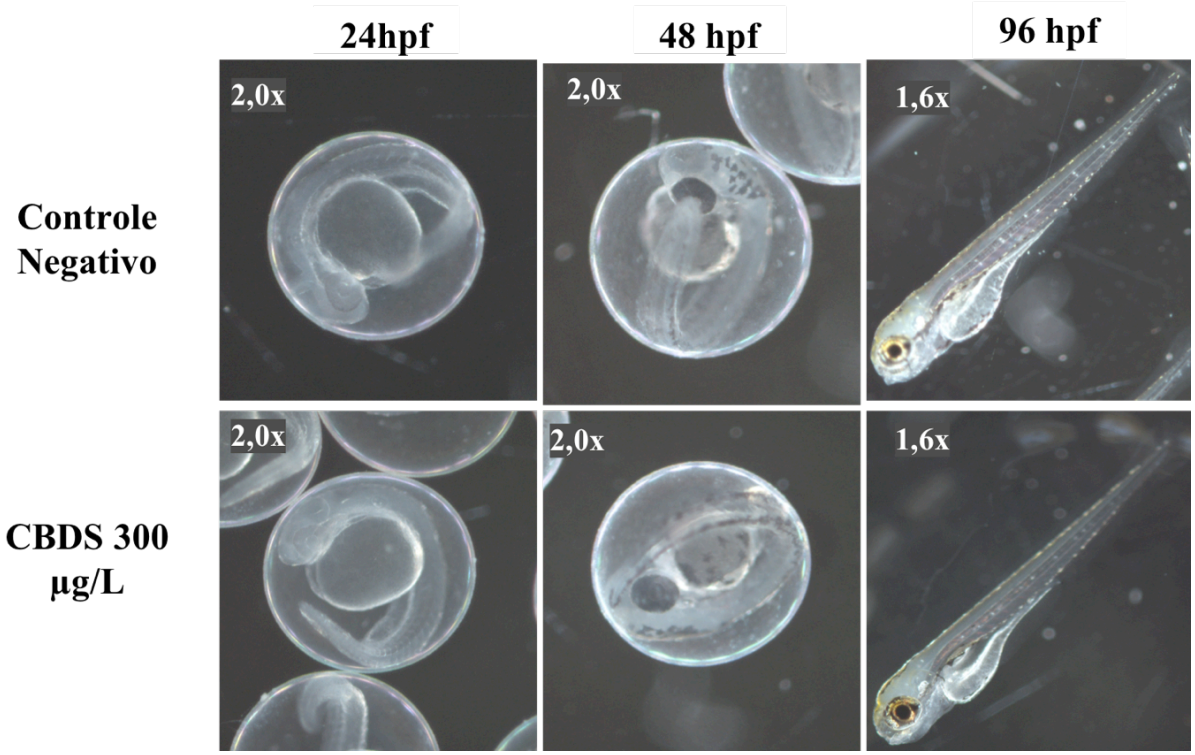
5.3 Ensaios de Toxicidade do derivado sintético do canabidiol

Os mesmos ensaios realizados com o canabidiol foram também utilizados para o derivado sintético do canabidiol (CBDS), visando a comparação da toxicidade para os estágios iniciais do desenvolvimento de *zebrafish*.

5.3.1 Avaliação de alterações morfológicas do zebrafish no estágio embrio-larval

Embriões de *zebrafish* foram expostos ao CBDS nas concentrações de 5 a 300 µg/L, e o desenvolvimento foi observado até 96 horas pós-fertilização. Nenhum dos parâmetros avaliados foi alterado após a exposição ao CBDS em comparação com o controle negativo. A Figura 23 mostra embriões expostos ao CBDS na concentração de 300 µg/L e ao controle negativo em 24, 48 e 96 horas pós-fertilização.

Figura 23 – Embriões de *zebrafish* expostos ao controle negativo e ao derivado sintético de canabidiol 300 µg/L



Imagens capturadas nos diferentes tempos em que o embrião foi analisado. hpf: Horas pós-fertilização. Fonte: Próprio autor.

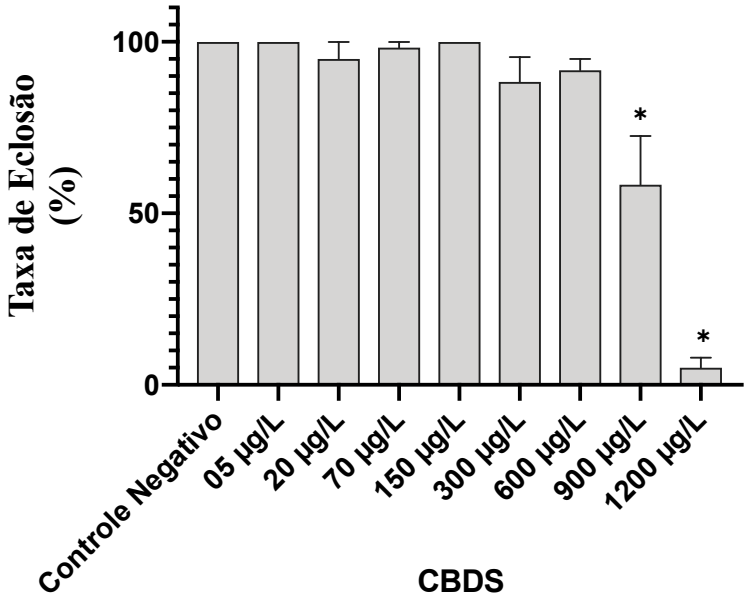
Além dos endpoints observados no FET, possíveis alterações morfológicas foram estudadas por avaliação de alterações quantitativas precoces usando o software DanioScope. O comprimento corporal (µm), área do olho (µm^2) e área do pericárdio (µm^2) foram estudados. Não houve diferença significativa entre as medidas obtidas do controle negativo e dos embriões expostos para os parâmetros de comprimento corporal, área dos olhos e área do pericárdio ($F_{5;173}$=0,7795, p = 0,5657 para o comprimento corporal; $F_{5;172}$ = 1,447, p = 0,2099 para a área dos olhos; $F_{5;167}$ = 0,7612, p = 0,5790). A Tabela 7 mostra os resultados obtidos na análise quantitativa das possíveis alterações induzidas pelo CDBS em larvas de *zebrafish*.

Tabela 7 - Análise quantitativa das alterações morfológicas em embriões de *Zebrafish* expostos ao derivado sintético de canabidiol (CDBS) utilizando o software DanioScope (média ± desvio padrão)

	Comprimento (µm)	**Área do olho (µm^2)**	**Área do pericárdio (µm^2)**
Controle Negativo	3867 ± 146,7	75348 ± 6530	77810 ± 24954
CBDS 05 µg/L	3929 ± 146,3	77242 ± 5157	68998 ± 19461
CBDS 20 µg/L	3933 ± 158,1	78481 ± 4880	76816 ± 18610
CBDS 70 µg/L	3919 ± 186,3	76151 ± 6817	77406 ± 14980
CBDS 150 µg/L	3927 ± 183,5	76701 ± 6616	77964 ± 18960
CBDS 300 µg/L	3890 ± 160,3	74809 ± 5859	77683 ± 22115

Assim como CBD, o derivado sintético também induziu ao atraso na eclosão das larvas de *zebrafish* na concentração de 300 µg/L. Considerando este efeito, aumentamos as concentrações a serem testadas. Ao aumentar a faixa de concentrações testadas até 1200 µg/L, observamos que a partir de 300 µg/L houve redução da taxa de eclosão sendo significativa a partir de 900 µg/L como mostrado no gráfico da Figura 24 (H = 323,3; p = <0,0001). Para este efeito, obtivemos os valores de LOEC e EC50 de 776 µg/L e 848 µg/L, respectivamente.

Figura 24 – Porcentagem de embriões expostos ao derivado sintético do canabidiol (CBDS) não eclodidos em 96 horas pós-fertilização



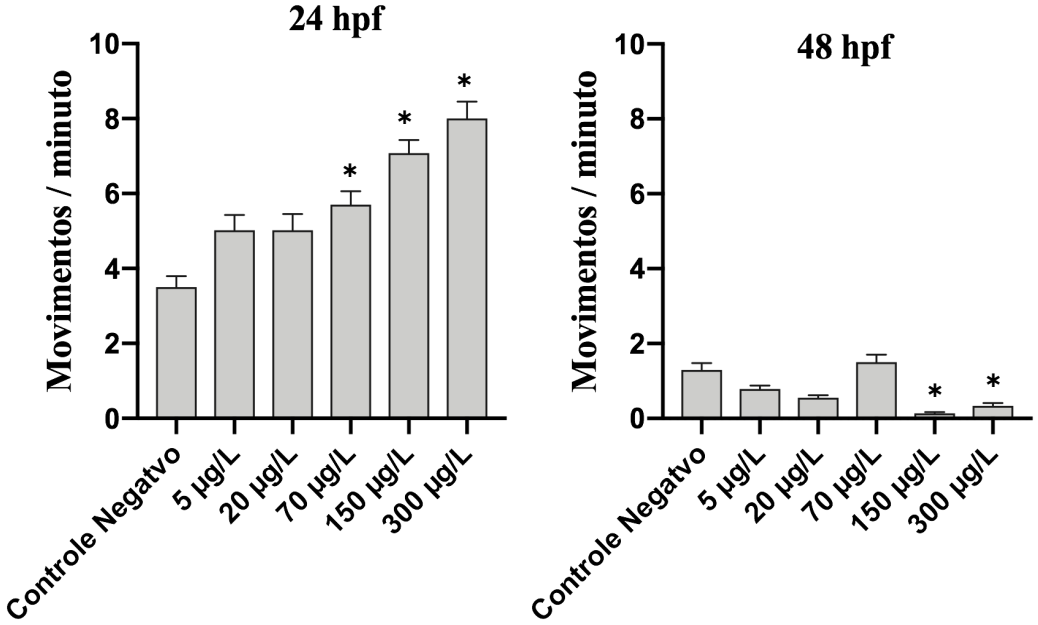
CBDS: derivado sintético de canabidiol. L. Valores representados por média ± erro padrão da média. * Teste de Kruskal-Wallis, p <0,05, para diferenças entre os grupos expostos e controle. Fonte: Próprio autor.

5.3.2 Avaliação da atividade motora do embrião de zebrafish usando o software DanioScope

A atividade motora, expressa pelo número de eventos de atividade (movimento) dos embriões de *zebrafish*, aumentou significativamente após a exposição ao CBDS. Os embriões em 24 hpf foram monitorados por 3 minutos e aumento na quantidade de movimentos por minuto foi observado em todas as concentrações estudadas, porém nas concentrações de 5 e 20µg/L o aumento não foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Nas concentrações de 70, 150 e 300 µg/L o aumento foi significativo quando comparado com o controle negativo (LOEC = 70 µg/L, H = 84,03, $p < 0,0001$) como mostrado na Figura 25. A hiperatividade para os embriões expostos a estas concentrações de CBDS foi crescente nas concentrações estudadas.

Em 48 hpf, houve a redução de movimentação nas concentrações de 150 e 300 µg/L (Figura 25) e as demais concentrações mantiveram-se semelhantes ao controle negativo.

Figura 25 – Atividade motora avaliada pelos movimentos por minuto de embriões expostos ao derivado sintético do canabidiol (CBDS)

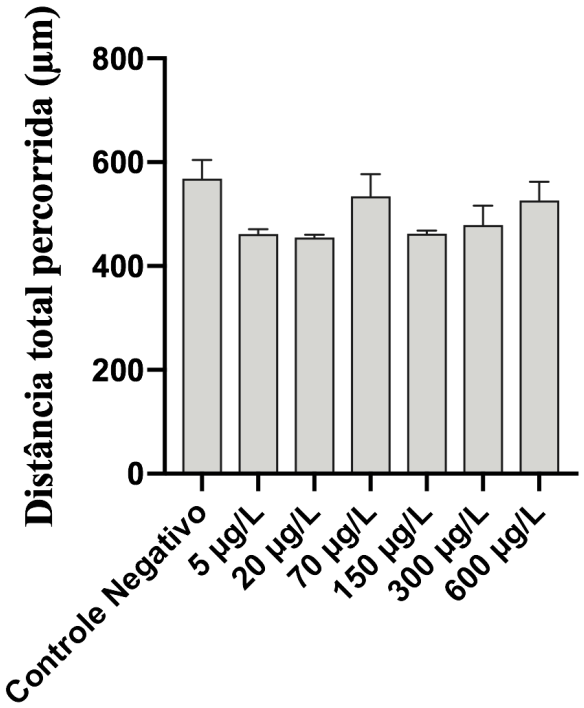


Valores representados por média ± erro padrão da média. *Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. CBDS: Derivado sintético do canabidiol. Concentração em µg/L. Fonte: Próprio autor.

5.3.3 Avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas ao derivado sintético de Canabidiol no equipamento Zebrabox

Não foram observadas diferenças significativas na distância total percorrida pelas larvas expostas ao CBDS por 96h (H = 9,717; p = 0,1371) como pode ser observado no gráfico da Figura 26.

Figura 26 – Distância total percorrida pela larva de *zebrafish* em 10 minutos de análise no Zebrabox® após 96h de exposição ao derivado sintético do canabidiol



Valores representados por média ± erro padrão da média. *Teste de Kruskal-Wallis, p < 0,05. CBDS: Derivado sintético do canabidiol. Concentração em µg/L. Fonte: Próprio autor.

Os dados apresentados mostram que a exposição ao canabidiol e ao derivado sintético do canabidiol nas fases iniciais do *zebrafish* não induziu alterações morfológicas no desenvolvimento, um resultado inesperado em comparação a um trabalho publicado em novembro de 2017, que mostrou que o CBD apresenta efeitos subletais em embriões de *zebrafish*, tais como edemas, malformações dos olhos e mandíbula (CARTY et al., 2017). Essa divergência entre os resultados morfológicos pode ser atribuída aos efeitos dependentes da concentração do CBD (CAPASSO et al., 2011; CARTY et al., 2017; DOMINO, 1981). No

presente trabalho, observamos alguns embriões com falta de pigmentação ocular quando expostos ao CBD, mas esse efeito não foi significativo até a dose máxima testada (300 µg/L).

Receptores canabinóides CB1 foram ligados a funções no processo de eclosão de embriões de *zebrafish*. Migliarini e Carnevali verificaram que o *cb1* RNAm aparece primeiro em 24 hpf nos embriões de *zebrafish*. Este gene foi encontrado em regiões distintas do sistema nervoso central, e as proteínas CB1 apresentaram nível máximo no momento da eclosão, diminuindo nas fases larvais seguintes, indicando um envolvimento no processo de eclosão (MIGLIARINI; CARNEVALI, 2009). Martella e colaboradores fizeram a quantificação de neurotransmissores endocanabinóide como anandamida e 2-AG, ambos agonistas CB1, e verificaram aumento na concentração de 2-AG próximo ao momento da eclosão, enquanto os demais endocanabinóides analisados mantiveram seu nível constantes, sugerindo a participação desde neurotransmissor no processo da eclosão (MARTELLA et al., 2016). Nossas análises, mostraram que a eclosão foi retardada em embriões expostos ao CBD e ao CBDS e, portanto, esses resultados colaboram para a hipótese de que há envolvimento do sistema endocanabinóide nos processos que levam a eclosão, um passo crítico para o desenvolvimento do *zebrafish*, já que o embrião está se preparando para natação livre e alimentação exógena. O EC50 para o retardo da eclosão se deu em concentrações altas tanto para o CBD quanto para o CBDS, porém o EC50 do CBDS foi maior do que o EC50 do CBD, mostrando que o CBDS possui maior segurança do que o CBD em relação a este efeito. Carty et al., (2017) também observaram a presença de embriões não eclodidos em 96 hpf após exposição ao CBD na concentração de 0,6 mg/L e Migliarini e Carnevali encontraram resultados semelhantes relativos à exposição do embrião ao antagonista CB1, AM251, consistindo numa diminuição de 75% na taxa de eclosão (CARTY et al., 2017; MIGLIARINI; CARNEVALI, 2009).

Encorajados pelo envolvimento de canabinóides com a modulação do sistema nervoso, testamos a capacidade do CBD de modular a atividade motora de embriões após exposição aguda, já que processos de movimento estão associados à regulação mediada por receptores canabinóides (CB1) altamente conservada entre mamíferos e *zebrafish*. Além disso, as respostas motoras, são altamente sensíveis a compostos químicos neurotóxicos (CHEN; WANG; WU, 2011; MACPHAIL et al., 2009; PADILLA et al., 2011; SELDERSLAGHS et al., 2010) e poderiam prever efeitos iniciais do CBD que integram respostas bioquímicas e fisiológicas do *zebrafish* no desenvolvimento. Os resultados obtidos mostraram que tanto o CBD quanto o CBDS aumentaram as atividades motoras de embriões

após 24 hpf, sendo que o LOEC encontrado para o CBDS foi maior do que para o CBD. O mecanismo de ação do canabidiol não está completamente elucidado, e diversos estudos mostram que pode haver mais de um mecanismo envolvido na forma como este canabinóide modula o comportamento. Sabe-se que o CBD é um antagonista do receptor CB1, porém os mecanismos para ação direta neste receptor não estão bem elucidadas (CHEN; WANG; WU, 2011 apud PADILLA et al., 2011). Além do antagonismo ao CB1, o canabidiol interfere com o funcionamento do CB1 através da inibição da enzima hidrolase de amida de ácidos graxos (*fatty acid amide hydrolase*, FAAH) que é responsável por degradar a anandamida. A anandamida é o endocanabinóide que atua como agonista de CB1, e está envolvida em diversos processos fisiológicos, pois quando há aumento da anandamida, há ativação do receptor CB1 (CAMPOS et al., 2012, 2016). Akthar et, al, (2013) verificaram que a exposição de larvas de *zebrafish* ao THC e outros agonistas CB1 por até 12 horas resultaram em aumento da atividade locomotora. Quando a exposição foi realizada por 96 horas, a atividade locomotora retornou ao normal quando comparado com o controle negativo, sugerindo um processo de adaptação do organismo após a exposição prolongada (AKHTAR et al., 2013). Martella et al. (2016) verificaram a expressão progressivamente aumentada dos genes referentes a produção da enzima FAAH em *zebrafish* de 12 a 96 hpf, demonstrando que esta enzima está presente nos estágios iniciais de desenvolvimento do *zebrafish* (MARTELLA et al., 2016). Nossos resultados se assemelham com o perfil observado pela análise da atividade locomotora de embriões expostos ao THC e outros agonistas CB1 encontrado por Akhtar et al., (2013) e a presença da enzima FAAH demonstrada por Martella e colaboradores podem indicar que o mecanismo pelo qual o CBD e o CBDS modularam a atividade motora pode ser pela inibição da enzima FAAH, aumentando assim os níveis de anandamida, que é agonista CB1. Tanto em nossos experimentos quanto nos experimentos de Akhtar, a alteração na atividade motora encontrada nas horas iniciais não foi observada nas horas seguintes. Em nossos experimentos houve aumento na atividade motora dos embriões em 24 hpf após exposição ao CBD e ao CBDS com início em 6 hpf, e em 48 hpf, os embriões expostos ao CBD tiveram os valores de movimento por minuto semelhantes aos do controle, enquanto que para o CBDS houve uma redução em 48 hpf, que pode ter ocorrido devido a respostas de compensação do organismo, já que nos ensaios realizados em 96 hpf não houve alterações tanto para os embriões expostos ao CBD, quanto para os embriões expostos ao CBDS. Carty et al., (2019) avaliaram se houve alterações comportamentais em larvas na segunda geração (F1) após exposição ao CBD (F0), e não encontraram diferenças significativas nas larvas

expostas ao CBD, apenas encontraram uma redução na atividade motora das larvas filhas (F1) na concentração de 0,03 mg/L (30 µg/L) (CARTY et al., 2019). Em *zebrafish* adultos, a exposição ao CBD não modulou a atividade locomotora, apesar de ter aumentado o comportamento ansioso na concentração de 0,5 mg/kg, que foi medido pelo tempo de nado na zona superior do aquário. Este efeito não foi observado nas doses menores e nem maiores, gerando uma curva na forma de U invertido (NAZARIO et al., 2015).

Os canabinóides também têm sido associados a modulações do sistema nervoso em mamíferos (ABDEL-SALAM et al., 2016; BALERIO; ASO; MALDONADO, 2006; CAPASSO et al., 2011; DOMINO, 1981), e um dos mecanismos de ação descritos é o envolvimento com modulações do sistema colinérgico mediado pela AChE (ABDEL-SALAM et al., 2016; EUBANKS et al., 2006). Até agora, nenhuma informação está disponível para efeitos específicos do CBD no *zebrafish*. Aqui, pela primeira vez, mostramos que os embriões de *zebrafish* não exibiram alterações significativas de AChE moduladas pelo CBD em concentrações correlacionadas com doses de plasma humano para fins terapêuticos (CAMARGO et al., 2011; ENGLUND et al., 2013; FUSAR-POLI et al., 2009; MANINI et al., 2015). A análise cinética da atividade enzimática da AChE revelou que o CBD causou apenas um aumento pequeno e não significativo na atividade, mas é importante observar que, diferente das alterações de comportamento, as respostas bioquímicas nem sempre refletem as mudanças iniciais na saúde do organismo.

Os canabinóides interagem com muitos sistemas neurológicos e bioquímicos diferentes; no entanto, suas consequências comportamentais e neuronais são pouco conhecidas em modelos animais além dos mamíferos (ABDEL-SALAM et al., 2016; BALERIO; ASO; MALDONADO, 2006; DOMINO, 1981; IZZO et al., 2009; REVUELTA et al., 1978). Este estudo está fornecendo novos conhecimentos integrando os efeitos potenciais do CBD e seu derivado sintético, nos sistemas neurológicos e comportamentais do *zebrafish* e seus impactos durante a embriogênese deste modelo experimental. Mostramos que o CBD e o CBDS modulam a atividade motora de embriões de *zebrafish* ligados a mecanismos envolvendo receptores canabinóides altamente conservados entre mamíferos e *zebrafish* (KRUG; CLARK, 2015; MIGLIARINI; CARNEVALI, 2009). No entanto, o CBD parece não regular a atividade da AChE dos embriões e não interfere na embriogênese.

O derivado sintético do canabidiol é uma molécula com estrutura semelhante ao do canabidiol, e é produzida de forma sintética pela indústria farmacêutica Pratti-Donaduzzi, que ainda mantém as informações sobre características químicas em sigilo. O CBDS parece

apresentar toxicidade ainda menor do que do CBD já que para os efeitos encontrados, o LOEC e EC50 do CBDS foram maiores do que para o CBD.

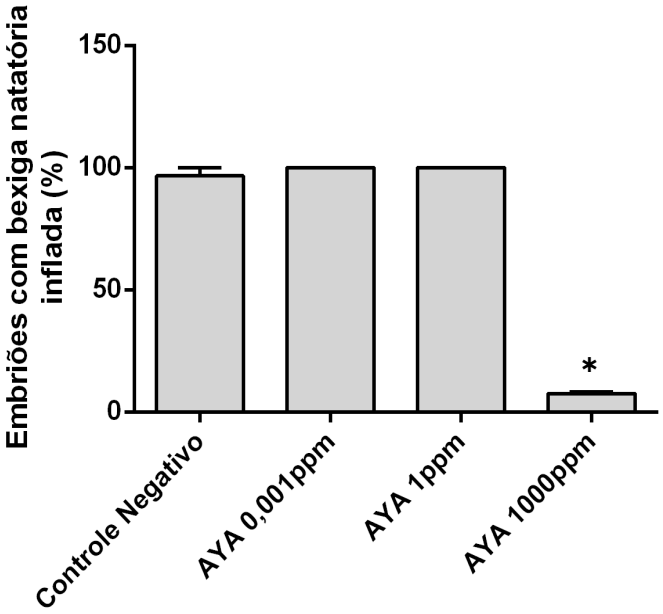
5.4 Análises de toxicidade da Ayahuasca

Os resultados do FET com embriões de *zebrafish* expostos à ayahuasca, foram apresentados como painel e publicados no livro de resumos do *11th International Congresso of Pharmaceutical Science* (CIFARP), que ocorreu de 15 a 18 de novembro de 2017 na cidade de Ribeirão Preto - SP.

5.4.1 Avaliação de alterações morfológicas do zebrafish no estágio embrio-larval

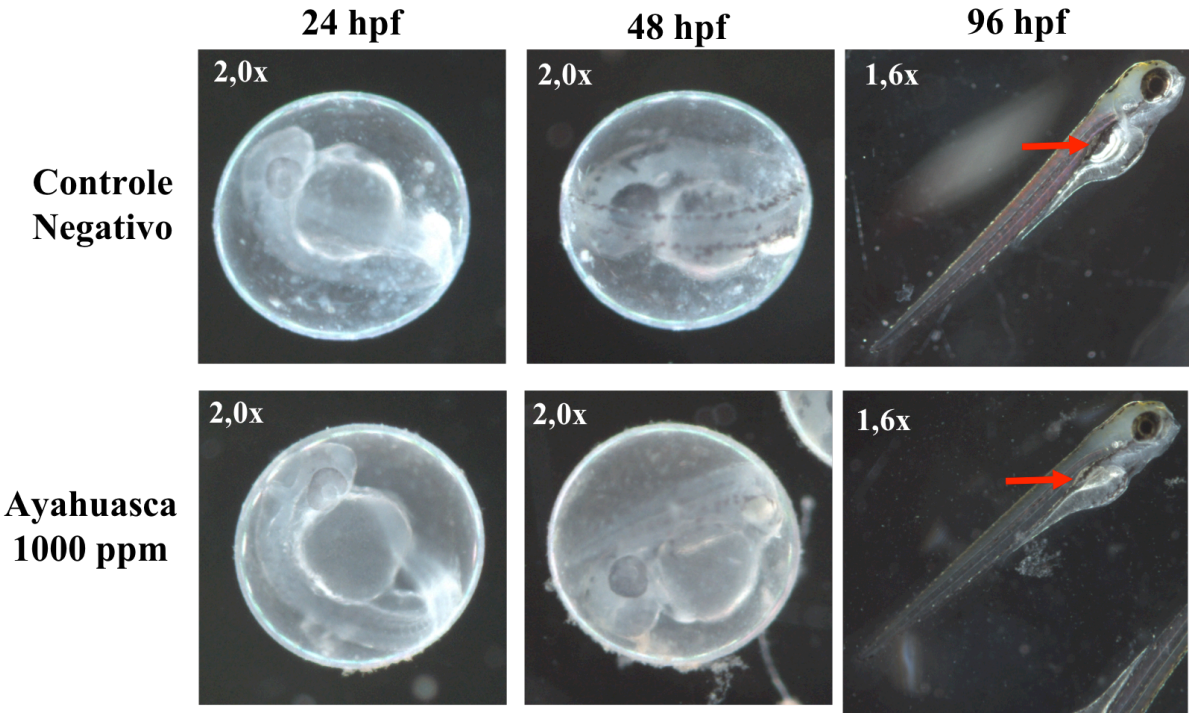
Embriões expostos à ayahuasca na diluição de 1000 ppm apresentaram redução na taxa de inflação da bexiga natatória em 96 hpf. A taxa de embriões com bexiga natatória inflada foi de 7,5% nos embriões expostos à ayahuasca na diluição de 1000 ppm, enquanto que para os embriões expostos ao controle negativo foi de 97% ($H = 98,74$; $p = <0,0001$), conforme mostrado no gráfico da Figura 27. Este efeito não foi observado nas diluições de 0,001 ppm e 1 ppm, que apresentaram taxa de inflação de bexiga semelhante ao controle negativo em 96 hpf. A Figura 28 mostra um embrião exposto à AYA na diluição de 1000 ppm, com destaque para a bexiga natatória não inflada.

Figura 27 - Taxa de embriões de *zebrafish* com bexiga natatória inflada após exposição à ayahuasca



AYA:Ayahuasca. Valores representados por média ± erro padrão da média. * Teste de Kruskal-Wallis, p <0,05, para diferenças entre os grupos expostos e controle. Fonte: Próprio autor.

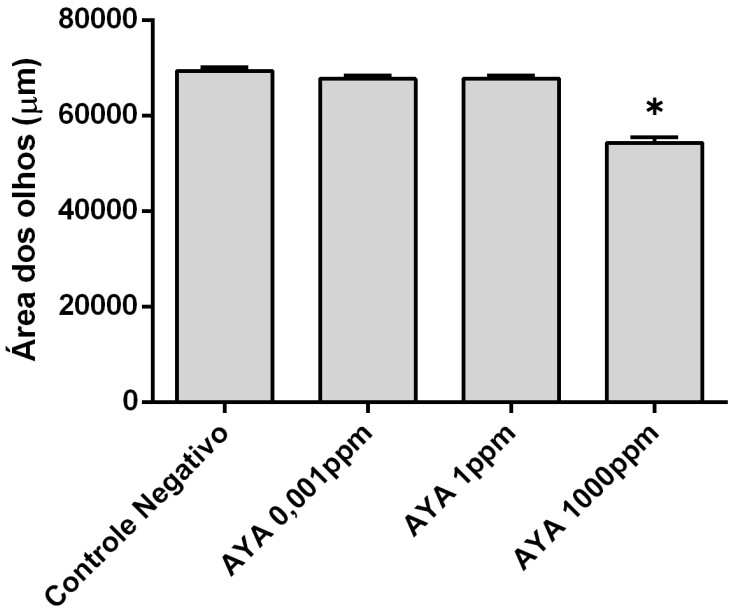
Figura 28 – Embriões de *zebrafish* expostos ao controle negativo e à ayahuasca



Imagens capturadas nos diferentes tempos em que o embrião foi analisado. A seta indica a região da bexiga natatória. Fonte: Próprio autor.

Nos demais parâmetros avaliados pelo FET tradicional não foram observados efeitos significativos, porém, a análise morfológica utilizando o software DanioScope, que permite verificar alterações quantitativas, foi observado que a área dos olhos (μm^2) apresentou-se reduzida em embriões expostos à ayahuasca na diluição de 1000 ppm em relação ao mesmo parâmetro nos embriões expostos ao controle negativo ($F_{3,109} = 65,29$; $p < 0,0001$), como mostrado no gráfico da Figura 29. Essa alteração não foi observada nas demais diluições testadas. Para os demais parâmetros avaliados quantitativamente pelo DanioScope (comprimento do corpo e área do pericárdio) não foram observadas diferenças significativas ($H=4,167$; $p = 0,3238$ e $H = 1,997$; $p = 0,573$, respectivamente). A Tabela 8 mostra os valores encontrados para cada um dos parâmetros avaliados utilizando o software DanioScope.

Figura 29 – Gráfico da avaliação quantitativa da área dos olhos de embriões expostos à ayahuasca



Valores representados por média ± erro padrão da média. *Teste de Dunnett, $p < 0,05$; para diferenças entre os grupos exposto e controle. Fonte: Próprio autor

Tabela 8 - Análise quantitativa das alterações morfológicas em embriões de *Zebrafish* expostos à Ayahuasca utilizando o software DanioScope (média ± desvio padrão)

	Comprimento (µm)	**Área dos olhos (μm^2)**	**Área do pericárdio (μm^2)**
Controle Negativo	3799 ± 15,7	69351 ± 4323	61537 ± 9061
Ayahuasca 0,001 ppm	3832 ± 41,0	67691 ± 3765	61030 ± 8533
Ayahuasca 1 ppm	3828 ± 59,4	67797 ± 3095	59699 ± 11839
Ayahuasca 1000 ppm	3719 ± 75,7	54303 ± 6592	64080 ± 9689

Os resultados da avaliação de alterações morfológicas mostraram que, em alta concentração (1000 ppm), a exposição à ayahuasca interfere no desenvolvimento de larvas de zebrafish, afetando a formação e inflação da bexiga natatória. Além disso, a análise quantitativa utilizando o software DanioScope permitiu verificar uma redução na área dos olhos dos embriões expostos à ayahuasca na concentração de 1000 ppm, mostrando que é capaz de modular a formação dos olhos. Este efeito não foi detectado pelo FET, confirmando a importância do software DanioScope para detecção de efeitos precoces.

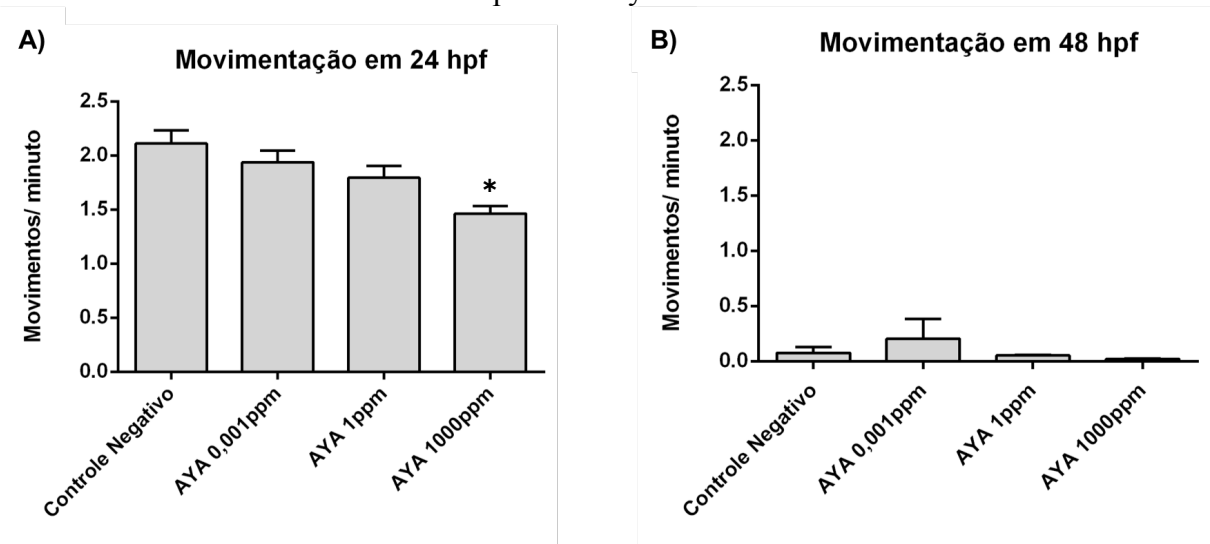
Andrade e colaboradores publicaram em 2018 um estudo sobre os efeitos da exposição à ayahuasca no desenvolvimento de embriões de zebrafish. Os autores verificaram que que a exposição também induziu a alterações no tempo de eclosão e acúmulo de hemácias na região do pericárdio (ANDRADE et al., 2018). Estes efeitos foram encontrados em concentrações mais altas do que as que foram utilizadas em nosso estudo, por essa razão, não encontramos os mesmos efeitos. No estudo realizado por Andrade et.al. (2018) não houve relato da avaliação da inflação da bexiga natatória, porém foi relatado redução de equilíbrio nas larvas expostas a 40 mg/L. A ausência de bexiga natatória inflada detectada em nosso trabalho pode explicar a alteração de equilíbrio observada por Andrade e colaboradores, pois este órgão é crucial para manter a posição dos organismos durante o nado, podendo assim ser a causa da redução de equilíbrio das larvas (EHRLICH; SCHOPPIK, 2017).

5.4.2 Avaliação da atividade motora dos organismos expostos à Ayahuasca

A atividade motora dos embriões foi avaliada pelo número de eventos de atividade por minuto e quantificada pelo software DanioScope. Os resultados mostraram que a atividade dos embriões reduziu significativamente após a exposição à Ayahuasca na diluição de 1000 ppm (Figura 30a). Após monitoramento por 3 min, os embriões com 24 hpf exibiram hipoatividade significativa em relação aos controles (LOEC = 1000 ppm, H = 14,15, p =0,0027).

Os embriões expostos à diluição de 1000 ppm foram aproximadamente 1,4 vezes menos ativos que os embriões do grupo controle. Este efeito, no entanto, não foi observado com 48 hpf, quando a atividade motora foi semelhante ao controle negativo para todas as concentrações testadas (Figura 30b).

Figura 30 – Atividade motora avaliada pelos movimentos por minuto de embriões expostos à Ayahuasca

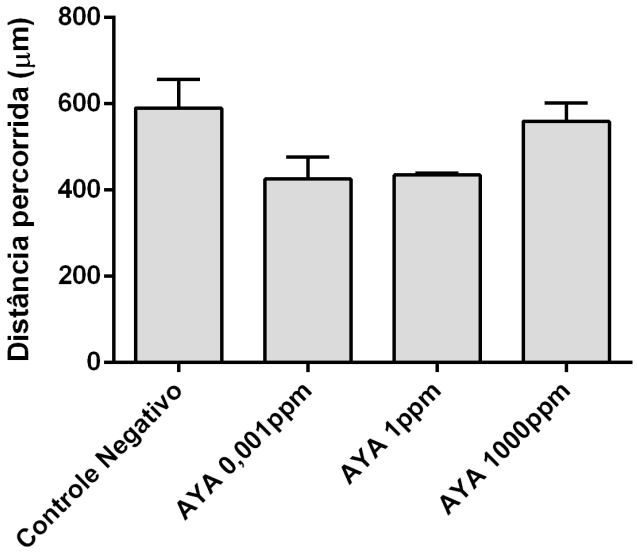


Valores representados por média ± erro padrão da média. *Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. AYA: Ayahuasca. Fonte: Próprio autor.

Já a atividade das larvas de *zebrafish* foi determinada por meio da avaliação da capacidade natatória, utilizando o equipamento Zebrabox. Após 96 horas de exposição dos organismos à ayahuasca, não foram observadas diferenças significativas na distância total

percorrida pelas larvas expostas à ayahuasca e expostas ao controle negativo (H = 5,5; p = 0,1143) como pode ser observado no gráfico da Figura 31.

Figura 31 – Distância total percorrida pela larva de *zebrafish* em 10 minutos de análise no Zebrabox® após 96h de exposição ao derivado sintético do canabidiol



Valores representados por média ± erro padrão da média. *Teste de Kruskal-Wallis, p < 0,05. AYA: Ayahuasca. Fonte: Próprio autor.

Como citado na avaliação pelo DanioScope, a avaliação da atividade motora dos embriões, mostrou uma redução gradativa na movimentação em 24 hpf, sendo significativa apenas na concentração de 1000 ppm. Esta alteração significativa não permaneceu em 48 hpf e, consequentemente, em 96hpf, as larvas mostraram uma movimentação normal.

Savoldi et al. (2017) avaliaram os efeitos da exposição à ayahuasca em zebrafish adulto, e encontraram redução da distância total percorrida e da velocidade de nado a partir de 1 mL/L (1000 ppm), além disso a exposição a esta concentração de ayahuasca aumentou o tempo de paralisação. Estes efeitos foram associados a comportamento depressivo e aumento da ansiedade. Por outro lado, na concentração de 0,1 mL/L (100 ppm), os resultados encontrados sinalizaram redução de ansiedade (SAVOLDI et al., 2017; KALLUEFF et al., 2013). A redução da atividade motora observada em 24 hpf em nossos experimentos, semelhante aos achados de Savoldi et al. (2017) pode estar relacionada ao aumento de ansiedade devido à exposição por 24 h, e o retorno ao comportamento normal pode ser devido à adaptação ocorrida nas horas decorrentes de exposição.

Andrade et al., (2018) encontraram redução da distância total percorrida por larvas expostas à ayahuasca na concentração de 4 mg/L (equivalente a 2470 ppm) até 144 hpf, e em concentrações menores, semelhante aos nossos resultados, não houve alteração na distância total percorrida (ANDRADE et al., 2018).

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.

Anexos

ANEXO I – Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de toxicidade de psicofármacos com potencial terapêutico", registrada sob nº 18.1.323.60.7, sob a responsabilidade de Tamires Amabile Valim Brigante e Danielle Palma de Oliveira, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 25/04/2018 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradores: José Alexandre de Souza Crippa, Antonio Waldo Zuardi, Jaime Eduardo Cecílio Hallak.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	29/05/2018 a 28/10/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe *Danio rerio*
Nº de animais	6300
Sexo	Indiferente
Peso/Idade	Até 144 hrs pós fertilização
Origem	Biotério de Toxicologia Ambiental da FCFRP

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2018.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892

ANEXO II – Primeira página do artigo publicado durante o doutorado

Chemico-Biological Interactions 291 (2018) 81–86

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Cannabidiol did not induce teratogenicity or neurotoxicity in exposed zebrafish embryos

Tamires Amabile Valim Brigante[a,*], Flavia R. Abe[a], Antônio Waldo Zuardi[b,c], Jaime Eduardo Cecílio Hallak[b,c], José Alexandre S. Crippa[b,c], Danielle P. de Oliveira[a,d]

[a] School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[b] Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14048-900, São Paulo, SP, Brazil
[c] National Institute of Science and Technology for Translational Medicine (INCT-TM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (CNPq), Brasília, Brazil
[d] National Institute of Science and Technology for Detection, Toxicological Evaluation and Removal of Emerging and Radioactive Contaminants (INCT-DATREM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (CNPq), Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cannabidiol
Zebrafish
Neurotoxicity
Teratogenicity
Acetylcholinesterase
Motor activity

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is a non-psychotomimetic compound of the *Cannabis sativa* that has been used for the treatment of severe epilepsy as well as other diseases of nervous system. However, toxicity studies of CBD have great relevance to guarantee the patients safety. In this context, morphological analyses of zebrafish can contribute to evaluate the teratogenic potential, as well as evaluation of acetylcholinesterase activity and motor activity of zebrafish are valuable tools to verify the neurotoxicity potential. In the present work, we use this methodology to test the toxicity of CBD to zebrafish embryos. No malformation was observed in morphological analysis of embryos exposed to all tested concentrations of CBD. Although, twenty per cent of embryos exposed to maximal dose of CBD (300 μg/L) hatched after 96hpf, while embryos in control solution had already hatched in this period. Embryos exposed to CBD did not show differences in acetylcholinesterase activity, but embryos exposed to CBD 20–300 μg/L were 1.4 up to 1.7-fold more active when compared to the control. Despite that, at 48 hpf, motor activity returned to control values. Our results suggest that the effects observed after CBD exposure are intimately related to CB1 receptor that is present in zebrafish since early stages of development. The present work showed early light effects induced by CBD exposure in concentrations that did not alter biochemical activity.

1. Introduction

Cannabis sativa has more than 500 compounds, and it has been used not only as a drug of abuse but also with medicinal proposes for millennia [1,2]. The mainly compounds present in *Cannabis Sativa* are Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). While THC has psychoactive effects and it plays an essential role in the abuse, CDB is a non-psychotomimetic compound that has medicinal potential to treat several neuropsychiatric disorders [3]. Cannabidiol was first isolated in 1940 by Adams et al. and its chemical structure was first characterized by Mechoulam and Shvo in 1963 [4,5].

The therapeutic potential is because CBD interacts with the central nervous system (CNS) by several pathways, including interaction with the endocannabinoid system, serotonin receptors and intracellular mechanisms [3,6]. This compound has been recognized as effective to treat severe epilepsy despite its mechanism of action is not entirely elucidated [7]. It also has been studied as antipsychotic, anxiolytic and in the treatment of the psychotic symptoms in Parkinson disease [7–10].

Previous studies reported deleterious effects related to CBD exposure. High concentration of CBD could inhibit respiration of mitochondria isolated from brain's pig [11]; and a CBD exposure could sensitize cells to neurotoxins in a in vitro study [12]. The adverse effects most often observed in a study with 162 epileptic patients treated with CBD, were somnolence, diarrhea, fatigue and decreased appetite [13]. A review published by Wang et al., in 2008, reported that most often adverse events were nervous system disorders, such as relapse of multiple sclerosis and gastrointestinal disorders, such as vomiting and diarrhea. But all described studies were realized with patients using THC and cannabidiol concomitantly [14]. More studies need to be done to better understand the safety in the use of CBD under various conditions, such as pregnancy.

* Corresponding author.
E-mail addresses: tamiresvalim@usp.br, tamiresvalim@gmail.com (T.A. Valim Brigante).

https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.008
Received 15 February 2018; Received in revised form 22 May 2018; Accepted 9 June 2018
Available online 11 June 2018
0009-2797/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.