



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA  
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

**SÁVIA DA MOTA CARNEIRO**

**PROPRIEDADES CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO EXTRATO  
ORGÂNICO DA *Cannabis sp.* E PROPOSIÇÃO *in silico* DE  
ANÁLOGOS ANTITUMORAIS DO CANABIDIOL**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2020**

SÁVIA DA MOTA CARNEIRO

PROPRIEDADES CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO EXTRATO  
ORGÂNICO DA *Cannabis sp.* E PROPOSIÇÃO *in silico* DE ANÁLOGOS  
ANTITUMORAIS DO CANABIDIOL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof.º Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral  
Coorientador: Prof.º Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas

FORTALEZA – CEARÁ

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

**Universidade Estadual do Ceará**

**Sistema de Bibliotecas**

Carneiro, Savia da Mota.

Propriedades citotóxica e genotóxica do extrato orgânico da Cannabis sp. e proposição in silico de análogos antitumorais do canabidiol [recurso eletrônico] / Savia da Mota Carneiro. - 2020.

88 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Pós-Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral .

1. Cannabis. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade. 4. Modelagem molecular. I.

SÁVIA DA MOTA CARNEIRO

PROPRIEDADES CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO EXTRATO  
ORGÂNICO DA *Cannabis sp.* E PROPOSIÇÃO *in silico* DE ANÁLOGOS  
ANTITUMORAIS DO CANABIDIOL

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado Profissional em  
Biotecnologia em Saúde Humana e  
Animal da Faculdade de Veterinária da  
Universidade Estadual do Ceará, como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
mestre em Biotecnologia. Área de  
concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 26 de junho de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral (Orientador)

Universidade Estadual do Piauí – UESPI



Prof. Dr. Rômulo José Vieira

Universidade Federal do Piauí - UFPI



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Valdiléia Teixeira Uchôa

Universidade Estadual do Piauí - UESPI



Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves

## RESUMO

O uso de extratos orgânicos de *Cannabis sp.* (EOC) para fins medicinais vem chamando a atenção de pesquisadores. Mesmo que estudos mostrem resultados favoráveis sobre sua utilização medicinal, verifica-se que pouco se sabe sobre suas atividades toxicogênicas. Observa-se com isso, a necessidade de estudos, para o desenvolvimento de estratégias que visem a utilização de produtos à base de *Cannabis sp.* de forma mais segura. Para este estudo, realizou-se uma avaliação das propriedades citotóxicas e genotóxicas do EOC, utilizado por pacientes epiléticos farmacorresistentes e a proposição de análogos do canabidiol (CBD) com propriedade antitumoral, por modelagem molecular. O estudo *in vitro* foi realizado por meio do teste do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), onde verificou-se que não houve queda significativa na viabilidade de células de melanoma murino metatático (B16F10) e de células fibroblasto normal murino (L929) na presença do EOC pois, a viabilidade dessas células foram próximas ou superiores a 100%, nas oito concentrações estudadas do EOC (7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/ml). O teste cometa, não detectou danos ao DNA de células do sangue periférico de camundongos *Mus musculus* expostos ao EOC nas doses (2,5; 12,5 e 25 mg/kg). No teste do micronúcleo (MN), avaliado sobre as mesmas condições, não demonstrou efeito mutagênico significativo em células de medula óssea de camundongos, expostas às mesmas doses. Portanto, conclui-se que o EOC estudado nas doses testadas não apresentou citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade podendo ser promissor para a prática clínica. Além disso, verificou-se por meio de um estudo *in silico* que análogos antitumorais do CBD atuam na inibição da topoisomerase II  $\alpha$  humana (TOPOII $\alpha$ ). No entanto, outros estudos devem ser realizados para maiores informações para o uso seguro do produto.

**Palavras-chave:** *Cannabis*. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Modelagem molecular.

## ABSTRACT

The use of organic extracts of *Cannabis sp.* (EOC) for medicinal purposes has been attracting the attention of researchers. Even if the studies show favorable results on its medicinal use, make sure you know little about its toxicogenetic activities. With this, there is a need for studies to develop strategies aimed at the use of products based on *Cannabis sp.* more safely. For this study, an evaluation of the cytotoxic and genotoxic properties of the EOC, used by pharmaco-resistant epileptic patients and a proposal for cannabidiol analogues (CBD) with antitumor property, by molecular modeling, was carried out. The *in vitro* study was performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) bromide test, where it was found that there was not much variation in the viability of murine melanoma cells metastatic (B16F10) and normal murine fibroblast cells (L929) in the presence of EOC because, viability of these cells were close to or greater than 100%, in the first ones studied by the EOC (7.81; 15.62; 31.25; 62.5, 125, 250, 500 and 1000 µg/ml). The comet test does not detect damage to the DNA of peripheral blood cells of *Mus musculus* mice exposed to EOC doses in (2.5, 12.5 and 25 mg/kg). Without micronucleus (MN) testing, evaluated under these conditions, no significant mutagenic effect on the bone marrow cells of mice, exposed to the same doses, was demonstrated. Therefore, we conclude that the EOC studied doses tested that do not exhibit cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity, and may be a promoter of a clinical practice. In addition, it was found through a study *in silico* that CBD antitumor agents act in inhibiting human topoisomerase II (TOPOII $\alpha$ ). However, further studies should be carried out for further information on the safe use of the product.

**Keywords:** Cannabis. Cytotoxicity. Genotoxicity. Molecular modeling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Plantas de <i>Cannabis sp.</i> feminina e masculina.....	14
Figura 2 -	Estrutura química do $\Delta^9$ - tetra-hidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD).....	16
Figura 3 -	Representação esquemática do Sistema Endocanabinóide (SEC).....	18
Figura 4 -	Esquema representativo de redução do Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT).....	22
Figura 5 -	Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio de viabilidade celular.....	30
Figura 6 -	Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio cometa alcalino.....	31
Figura 7 -	Representação esquemática do experimento de micronúcleo (MN) com o extrato orgânico de <i>Cannabis sp.</i> (EOC).....	33
Figura 8 -	Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio de micronúcleo (MN).....	34
Figura 9 -	Viabilidade de células da linhagem melanoma murino metastático (B16F10) expostas ao extrato orgânico de <i>Cannabis sp.</i> (EOC) e a doxorrubicina.....	37
Figura 10 -	Viabilidade de células da linhagem fibroblasto normal murino (L929) expostas ao extrato orgânico de <i>Cannabis sp.</i> (EOC) e a doxorrubicina .....	39
Figura 11	Comprimento da cauda de DNA em camundongos <i>M. musculus</i> tratados com o extrato orgânico de <i>Cannabis sp.</i> (EOC).....	41
Figura 12	Porcentagem de DNA na cauda em camundongos <i>M. musculus</i> tratados com o extrato orgânico de <i>Cannabis sp.</i> (EOC).....	43
Figura 13	Frequência de micronúcleo (MN) em medula óssea de camundongos <i>M. musculus</i> com extrato orgânico de <i>Cannabis sp.</i> (EOC).....	45

	<b>Estrutura tridimensional da topoisomerase II <math>\alpha</math> humana</b>	
<b>Figura 14 -</b>	<b>(TOPOII<math>\alpha</math>) .....</b>	
	<b>Estrutura terciária do molde 1ZXM.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 15 -</b>	<b>Regiões da topoisomerase II <math>\alpha</math> Humana (TOPOII<math>\alpha</math>)</b>	<b>50</b>
<b>Figura 16 -</b>	<b>identificadas pelo átomo prova .....</b>	
	<b>Numeração usada para os metabólitos oxidados do</b>	<b>51</b>
<b>Figura 17 -</b>	<b>canabidiol (MOC) estudados .....</b>	
	<b>Canabidiol (CBD) e seus metabólitos oxidados dentro da</b>	<b>53</b>
<b>Figura 18 -</b>	<b>cavidade C170a da topoisomerase II <math>\alpha</math> Humana (TOPOII<math>\alpha</math>) .....</b>	
	<b>Mapa de interação do MOC 17 (A) e do CBD (B) com a cavidade</b>	<b>54</b>
<b>Figura 19 -</b>	<b>C170a da topoisomerase II <math>\alpha</math> Humana (TOPOII<math>\alpha</math>) .....</b>	
	<b>Sítio de ligação do MOC 17 e distância para C170.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 20 -</b>	<b>Análogos planejados do canabidiol (CBD) e seu metabólito de</b>	<b>55</b>
<b>Figura 21 -</b>	<b>maior interação no sítio C170a da topoisomerase II <math>\alpha</math> Humana</b>	
	<b>(TOPOII<math>\alpha</math>) .....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta$ 9-THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AEA	Anandamida
AM1	Austin model 1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Tripsina versene
B16F10	Linhagem de melanoma murino metastático
BMP	<i>Bitmap</i>
BNL	<i>Brookhaven National Laboratory</i>
CBD	Canabidiol
CB1	Receptores canabinóides do tipo 1
CB2	Receptores canabinóides do tipo 2
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono (gás carbônico)
C392	Cavidade 392
C405	Cavidade 405
C170a	Resíduo de cisteína
CYS	Cisteína
CYS170	Cisteína 170
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CFM	Conselho Federal de Medicina
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EOC	Extrato Orgânico de <i>Cannabis</i>
EOCs	Extratos Orgânicos de <i>Cannabis</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetraacético)

HU-331	Quinona anticarcinogênica sintetizada a partir de canabidiol
IP	Intraperitoneal
LABCANCER	Laboratório de Cancerologia Experimental
LABMINBIO	Laboratório de Biologia Molecular e de Estudos de Injúrias Biológicas
LABMUT	Laboratório de Mutagenicidade
B16F10	Linhagem melanoma murinho metastático
L929	Linhagem fibroblasto normal murino
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
MOC	Metabólitos oxidados do canabidiol
MVD	<i>Molegro Virtua Docker</i>
NH <sub>2</sub>	Grupo amina
NPBio	Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Biodiversidade
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEC	Sistema Endocanabinóide
SFB	Soro fetal bovino
SCGE	<i>Single Cell Gel Ele-trophoresis Assay</i>
TASSER	<i>Iterative Threading ASSEMBly Refinement</i>
TOPOII $\alpha$	Topoisomerase II <i>alfa</i> de humanos
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
UFPI	Universidade Federal do Piauí

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1	CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA <i>Cannabis sp.</i> .....	14
2.2	CANABINÓDES.....	15
2.3	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DOS CANABINÓDES.....	17
2.4	TOXICOLOGIA E A SEGURANÇA DOS FITOMEDICAMENTOS.....	19
2.5	GENOTOXICIDADE.....	20
2.6	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	21
2.7	TESTE COMETA.....	22
2.8	TESTE DE MICRONÚCLEO (MN) .....	23
2.9	ESTUDO <i>in silico</i> .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1	GERAL.....	26
3.2	ESPECÍFICOS.....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>27</b>
4.1	EXTRATO ORGÂNICO DE <i>Cannabis sp.</i> (EOC).....	27
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
4.3	ESTUDO <i>in vitro</i> – TESTE DE CITOTOCIXIDADE.....	28
<b>4.3.1</b>	<b>Teste de viabilidade celular.....</b>	<b>28</b>
4.3.1.1	Cultivo de células.....	29
4.3.1.2	Viabilidade celular.....	29
4.4	ESTUDO <i>in vivo</i> – TESTES DE GENOTOXICIDADE.....	30
<b>4.4.1</b>	<b>Teste cometa.....</b>	<b>30</b>
4.4.1.1	Análise das lâminas do cometa.....	32
<b>4.4.2</b>	<b>Teste de micronúcleo (MN).....</b>	<b>33</b>
4.4.2.1	Análise das lâminas do micronúcleo.....	35
<b>4.4.3</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
4.5	ESTUDO <i>in silico</i> – <i>docking</i> MOLECULAR.....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>

5.1	VIABILIDADE CELULAR .....	37
5.2	TESTE COMETA.....	40
5.3	TESTE DE MICRONÚCLEO.....	44
5.4	ESTUDO <i>in silico</i> - INTERAÇÃO DO canabidiol (CBD) COM A TOPOISOMERASE II $\alpha$ h (TOPOII $\alpha$ h) .....	47
5.4.1	<b>Seleção da estrutura tridimensional molde.....</b>	48
5.4.2	<b>Construção do modelo.....</b>	50
5.4.3	<b>Estudo de <i>docking</i>.....</b>	51
5.4.3.1	Identificação das cavidades e possíveis sítios de ligação.....	51
5.4.3.2	Estudo de <i>docking</i> dos metabólitos oxidados em posições diferentes.....	52
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	57
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	58
	<b>ANEXOS.....</b>	67
	<b>ANEXO A .....</b>	68
	<b>ANEXO B .....</b>	69

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização terapêutica da *Cannabis sp.* e seus derivados para fins medicinais é praticada desde a antiguidade sendo alvo de estudos em todo o mundo. A princípio, plantas do gênero *Cannabis* foram utilizadas para o tratamento da malária, constipação, dores reumáticas, dentre outras. Posteriormente, seu uso se espalhou amplamente e foram utilizadas como medicamento durante o século XIX (CILIO; THIELE; DEVINSKY, 2014; HANUS; MECHOULAM, 2005).

O potencial medicinal da *Cannabis sp.*, deve-se ao grande número de canabinóides encontrados naturalmente nas plantas desse gênero, que apesar da sua ampla utilização, seus efeitos adversos fizeram com que seu uso fosse visto negativamente, o que levou à sua proibição em diversos países, inclusive no Brasil. Isso devido ao desconhecimento dos princípios ativos dessas plantas, que na época, ainda não haviam sido isolados e estudados, e por seus efeitos serem inconsistentes e indesejáveis (CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010).

Após esse período, o aumento do consumo recreativo de plantas do gênero *Cannabis* desencadeou limitações legais e sociais que juntamente com o desconhecimento do seu mecanismo de ação no organismo, fizeram com que sua utilização terapêutica entrasse em declínio e perdesse o apoio de médicos e da sociedade em geral. Somente após a descoberta dos receptores canabinóides endógenos, o interesse por esse gênero de plantas do ponto de vista clínico foi retomado, abrindo espaço para novas possibilidades farmacológicas (RIBEIRO, 2014).

Atualmente uma grande diversidade de compostos canabinóides com potencial terapêutico estão sob investigação e uma série de outros compostos encontram-se em fase de testes clínicos e alguns poucos estão comercialmente disponíveis para uso medicinal (DI MARZO; BIFULCO; PETROCELLIS, 2004; IZZO *et al.*, 2009; PAMPLONA; TAKAHASHI, 2012).

A prática terapêutica com canabinóides é um tema bastante polêmico devido tanto aos efeitos psicotrópicos, quanto aos aspectos culturais, sociais, legais, religiosos e políticos, mas é inegável o seu potencial no tratamento e controle de diversas doenças. Além disso, atualmente pesquisas apontam esses compostos como promissores antitumorais (FREITAS, 2018; PINTO, 2016).

Em geral, para que uma molécula tenha capacidade de promover ações antitumorais é necessário que a mesma atue em algum mecanismo que impeça a proliferação celular ou outro afim (como inibidores da transdução de sinal; drogas que alteram a expressão gênica; inibidores da invasão do tumor e metástases; inibidores de angiogênese entre outros). Apesar das pesquisas investigarem o papel do canabidiol (CBD) no tratamento de pacientes com câncer, promovendo sua recuperação, seu mecanismo de ação ainda precisa ser estabelecido (PISANTINI *et al.*, 2017).

Dito isto, tal situação se torna mais inquietante quando se trata da utilização de extratos de *Cannabis sp.* para fins medicinais, pois a confecção destes é artesanal, não obedecendo padrões químicos e farmacêuticos de qualidade. Embora muitos relatos abordem os benefícios destes extratos, gerando inclusive o surgimento de associações de pacientes para tratamento de diversas patologias, não há evidências científicas, até o momento, que embasem sua utilização.

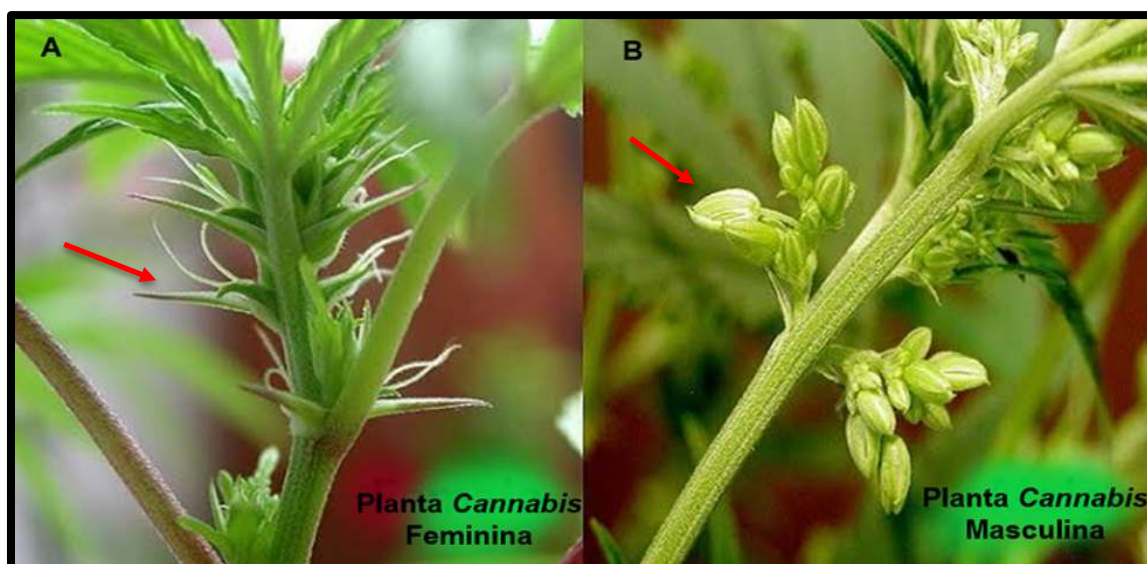
Assim, este trabalho tem como finalidade contribuir com os dados existentes, visto que se propôs, avaliar por meio de ensaios citotóxico *in vitro* e genotóxico/mutagênico *in vivo* as possíveis ações do EOC. Além disso, este estudo também teve como objetivo propor novas moléculas, baseada no CBD, com ação antitumoral por meio de um estudo *in silico*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA *Cannabis sp.*

O gênero *Cannabis* é caracterizado por plantas arbustivas pertencentes à família *Cannabinaceae*, cultivadas em várias partes do mundo, principalmente nas regiões tropicais e temperadas. Neste gênero as plantas são dicotiledóneas dioicas, pois as estruturas reprodutivas masculinas e femininas são formadas em indivíduos distintos (Figura 1). As plantas masculinas apresentam tempo de vida mais curto e geralmente morrem após a liberação do pólen, enquanto as plantas femininas vivem até o amadurecimento de suas sementes (HONÓRIO; ARROIO; FERREIRA DA SILVA, 2006; STAMBOULI *et al.*, 2005).

**Figura 1 – Plantas de *Cannabis sp.* feminina e masculina.**



Fonte: Adaptado de Como identificar e diferenciar plantas fêmeas e machos de maconha. <https://www.growroom.net/identificar-e-plantas-de-maconha-femeas-ou-machos/>, acesso em 14 fev. 2020. Na figura A (esquerda) a seta aponta para os pistilos, presentes apenas em plantas femininas. Na figura B (direita), a seta aponta para os estames que liberam pólen.

Com cheiro forte e desagradável, que pode causar vertigens e cefaleia, o gênero *Cannabis* é formado por espécies que apresentam raízes pivotantes, lenhosas e brancas, caules eretos, rígidos, finos, ligeiramente quadrangulares, ocos, ásperos e cobertos de pelos. Suas folhas são do tipo pecioladas, opostas

inferiores, alternas no ápice, palmatinervadas, compostas de cinco a sete segmentos ovais, lanceoladas, dentadas em serra, com coloração verde-escuras na parte superior e verde-pálido na inferior (PEREIRA, 1958).

As flores das plantas desse gênero são axilares, de cor amarelo-pálido ou esverdeado, dioicas (raramente monoicas), quase sem brácteas foliáceas e dotadas de pelos secretores. As estruturas reprodutivas masculinas são pendentes e dispostas no ápice do caule. Os frutos são do tipo aquênio, pardos ou escuros, indeiscentes, envolvidos nos cálices, contendo uma semente sem albúmen de cor branca-cinzenta com estrias negras e embriões oleaginosos (PEREIRA, 1958).

No gênero *Cannabis* as plantas são anuais, com ciclos vegetativos de três a quatro meses, que podem chegar até cinco metros de altura, quando cultivadas em condições adequadas. São produtoras de resinas, que contém a maior porcentagem das substâncias psicoativas (de 10 a 20%). Entretanto, todas as características dessas plantas podem apresentar variações com relação a fatores genéticos, ecológicos e formas de cultivo, sendo que as regiões quentes ou temperadas, de solo fértil e úmido proporcionam maior produção de resina (COSTA, 1994; HONÓRIO; ARROIO; FERREIRA DA SILVA, 2006; PEREIRA, 1958).

O potencial medicinal da *Cannabis sp.* está associado ao grande número de substâncias químicas encontradas nas espécies dessas plantas, dentre as quais, destacam-se os canabinóides. Os compostos canabinóides são quimicamente classificados como terpenofenóis e não foram isolados de qualquer outra espécie vegetal ou animal (HONÓRIO; ARROIO; FERREIRA DA SILVA, 2006).

## 2.2 CANABINÓIDES

Os canabinóides são substâncias complexas de origem natural ou sintética capazes de ativar receptores endocanabinóides no organismo. Este termo foi atribuído aos compostos com 21 carbonos presentes nas plantas do gênero *Cannabis sp.*, além dos respectivos ácidos carboxílicos e análogos. Os compostos canabinóides podem ser classificados de acordo com a origem, em três grupos principais: os endocanabinóides (produzidos pelo organismo), os fitocanabinóides, (produzidos naturalmente pelas plantas do gênero *Cannabis*) e os canabinóides

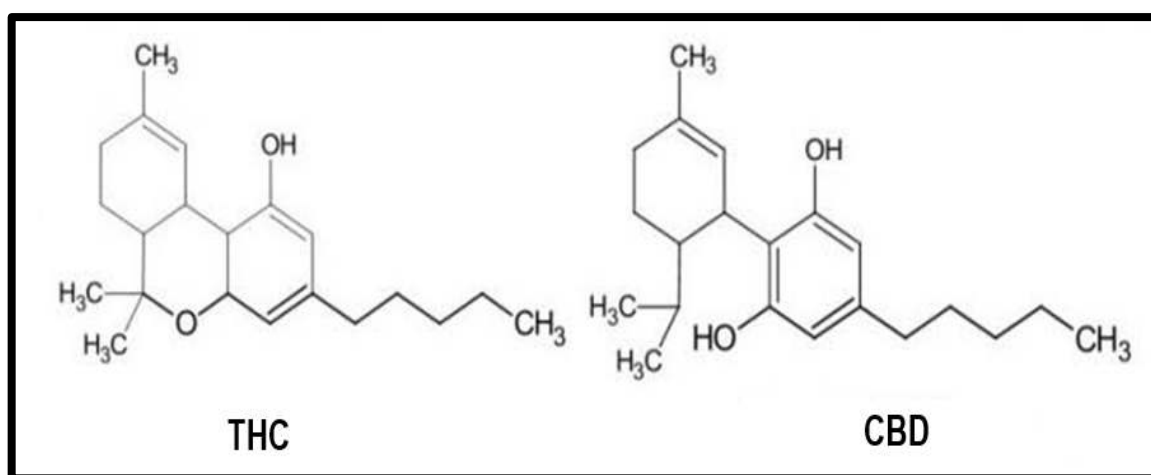


sintéticos (produzidos artificialmente) (HANUS; MECHOULAM, 2005; HONÓRIO *et al.*, 2010; KRAMER, 2015; MATOS *et al.*, 2017).

Os endocanabinóides são substâncias endógenas, produzidas naturalmente pelo organismo, não vegetal, mediante estimulação fisiológica e que interage com os receptores endocanabinóides. Provavelmente, existe um agonista endógeno para cada receptor biológico. O cérebro humano, por exemplo, produz substâncias com ações semelhantes aos fitocanabinóides. Dentre elas, as mais bem descritas são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (PAMPLONA, 2014; PINTO, 2016).

Os fitocanabinóides são compostos produzidos pela planta do gênero *Cannabis*. Dentre eles, os principais são: o  $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol (THC), principal constituinte dessas plantas, responsáveis pela maioria dos seus efeitos psicoativos e o CBD, o segundo constituinte encontrado em maior quantidade nessas plantas, mas, com efeitos não psicoativos. Tanto o THC como o CBD (Figura 2) exercem efeitos terapêuticos por meio dos receptores e parecem atuar em sinergia (DAVIDSON *et al.*, 2017; NIAZ *et al.*, 2017; RAMLUGON; LEVENDAL; FROST, 2018).

**Figura 2 – Estrutura química do  $\Delta^9$ - tetra-hidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD).**



Fonte: Adaptado de Mechoulam; Hanus, (2002).

Os canabinóides sintéticos são grupos artificiais (sintetizados em laboratório) de substâncias capazes de se ligar a receptores canabinóides mimetizando os efeitos do THC. São utilizados para criar uma grande variedade de drogas legais e constituem o maior grupo das novas substâncias psicoativas monitoradas pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT, 2017). Os canabinóides sintéticos, apresentam ainda quatro vezes mais afinidade para o receptor canabinóide 1 (CB1) do que o THC, e dez vezes mais ao receptor canabinóide 2 (CB2), sendo, portanto, os sintéticos mais potentes do que os fitocannabinóides (MINNS, 2013).

Apesar da utilização dos canabinóides para tratamento de doenças ter aumentado nas últimas décadas, faltam dados sobre a segurança e utilidade destes produtos. Diante disso, recomenda-se, portanto, que mais estudos sobre o potencial farmacológico dos canabinóides sejam realizados (KNUPP *et al.*, 2019; TREAT *et al.*, 2017).

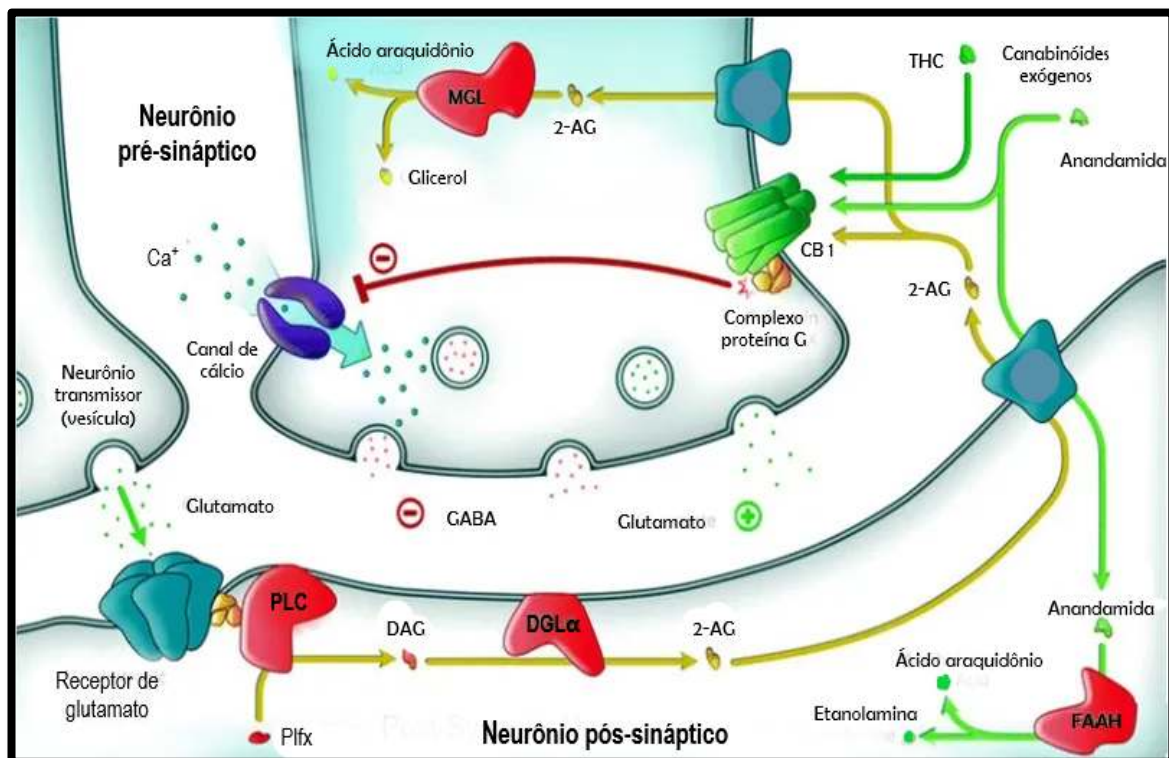
### 2.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DOS CANABINÓIDES

O uso terapêutico dos canabinóides é praticado há milênios, mas somente nas últimas décadas, após a descoberta do sistema endocanabinóide (SEC), o interesse científico foi retomado e avanços significativos nos tratamentos com produtos à base de *Cannabis sp.* foram realizados (FONSECA *et al.*, 2013; PAMPLONA; TAKAHASHI, 2012).

O SEC é um sistema complexo formado pelos receptores CB1 e CB2, seus respectivos ligantes endógenos e por um complexo enzimático que está envolvido em diversas respostas biológicas. Os receptores CB1 são encontrados principalmente nos neurônios centrais e periféricos, enquanto os receptores CB2 são frequentemente encontrados nas células imunológicas. A descoberta desse sistema possibilitou a compreensão de diversos processos fisiológicos psiquiátricos proporcionando mais opções de tratamentos para distúrbios neurológicos (COSTA *et al.*, 2016; KRAMER, 2015; MATOS *et al.*, 2017; RUSSO; HOHMANN, 2013).

O principal receptor canabinóide no sistema nervoso central é o CB1, um receptor pré-sináptico, acoplado à proteína G, que quando ativada, promove a inibição dos canais de cálcio dependentes e aumenta a condução do canal de potássio em terminais pré-sinápticos (figura 3).

**Figura 3 - Representação esquemática do Sistema Endocanabinóide (SEC)**



Fonte: Adaptado de Russo; Hohmann, 2013.

A descoberta de dois ligantes endógenos 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e anandamida que se ligam a CB1 estimulou investigações destinadas a elucidar o papel dos endocanabinóides tanto em funções cerebrais normais quanto condições patológicas (LONGO; FRIEDMAN; DEVINSKY, 2015).

Estudos do SEC possibilitaram uma nova abordagem na compreensão terapêutica de medicamentos à base de *Cannabis sp.*, despertando o interesse médico/científico para o estudo farmacológico dos canabinóides contra múltiplas patologias (BLÜMCKE *et al.*, 2016; FONSECA, 2013).

Atualmente, muitas são as doenças tratáveis com extratos orgânicos de do gênero *Cannabis*, incluindo: epilepsia e convulsões, glaucoma, diabetes, ansiedade, depressão, estresse pós-traumático, artrite reumatoide, dores neuropáticas, tratamento contra os sintomas do câncer e efeito antitumoral, dentre muitas outras doenças (PINTO, 2016).

Apesar dessa ampla utilização dos canabinóides, e de estudos indicarem sua eficácia no tratamento dessas e outras doenças, as informações obtidas ainda

são insuficientes tanto para a determinação de doses adequadas, quanto para o conhecimento de sua genotoxicidade e possíveis interações medicamentosas. O mecanismo de ação desses produtos e as consequências de seu uso a longo prazo ainda não estão totalmente esclarecidos sendo necessários estudos mais aprofundados pois, muito ainda há para se investigar (FRANCO, VIEGAS JR., 2017; MALCHER-LOPES, 2014).

Nesse sentido, o grande desafio é sem dúvida, encontrar o equilíbrio entre os efeitos benéficos e adversos dos extratos do gênero *Cannabis*, que podem ocorrer durante o uso crônico e em altas doses no tratamento de doenças. Portanto, para obtenção de dados iniciais sobre a segurança desses extratos, recomenda-se uma análise toxicológica por meio de modelos *in vitro* e *in vivo* para que estes forneçam comprovações científicas sobre os riscos ou benefícios que o uso desses produtos possa trazer a saúde humana (BRITCH *et al.*, 2017).

#### 2.4 TOXICOLOGIA E A SEGURANÇA DOS FITOMEDICAMENTOS

A intoxicação é um problema de Saúde Pública de importância global. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2012, foi estimado que 193.460 pessoas morreram em todo mundo devido a intoxicações não intencionais. Nesse sentido, a toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos dos diversos agentes químicos, físicos e biológicos que interagem com o organismo e que resultam em intoxicação (RUPPENTHAL, 2013).

Para que um fármaco seja considerado eficaz, seguro, e com o poucos efeitos colaterais é necessário que sejam desenvolvidas, uma série de etapas que iniciam-se com descoberta do potencial farmacológico de determinada substância, seguida de pesquisa, planejamento, identificação dos compostos do candidato a fármaco e ensaios pré-clínicos e clínicos (HORNBERG *et al.*, 2014).

Nesse contexto, para avaliar a biocompatibilidade de qualquer produto para o uso humano, principalmente aqueles de aplicação clínica, que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente, o *Órgão International Standard Organization* recomenda a utilização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos. Isso porque, os testes *in vitro* oferecem informações preliminares dos possíveis efeitos

tóxicos de candidatos a fármacos, permitem reduzir o número de animais utilizados na experimentação *in vivo*, além de serem rápidos, sensíveis e de baixo custo.

Somente depois de comprovada a não toxicidade *in vitro* é que o estudo de biocompatibilidade de um produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. Nesse contexto, os testes de genotoxicidade são utilizados para fornecer dados sobre a segurança ou não da substância testada. Tratam-se de ensaios pré-clínicos *in vivo* aprovados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que permitem avaliar a potencialidade de determinado composto de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas fornecendo informações mais detalhadas de segurança nas avaliações de risco humano do que os estudos *in vitro* (ANVISA, 2013; KANG *et al.*, 2013; OECD, 2017).

Além disso, nos últimos anos as atenções voltaram-se para o efeito antitumoral dos canabinóides que, talvez seja, o mecanismo fundamental de atuação desses compostos. Em especial, o HU-331, uma quinona canabinóide (sintetizada a partir do CBD) mostrou ter capacidade de inibir a atividade de relaxamento da topoisomerase II- $\alpha$  sem intoxicar a clivagem do DNA. O grande diferencial do HU-331 consiste na especificidade do mesmo para a topoisomerase II- $\alpha$ . Esse potencial terapêutico pode ser explorado para o desenvolvimento de novos fármacos com mais eficiência (KOGAN *et al.*, 2007; PINTO, 2016; REGAL; MERCER; DEWEESE, 2014).

## 2.5 GENOTOXICIDADE

A instabilidade genética tem sua origem a partir de uma cascata de mutações que ocasionam numerosas modificações na estrutura do DNA, tais como quebras simples ou duplas, deleções ou modificações de bases, pontes de DNA-DNA ou DNA-proteínas e pontes intercadeias (VIJG; SUH, 2013). Esses são alguns eventos iniciais pelos quais os agentes genotóxicos químicos e físicos ocasionam doenças hereditárias, cânceres e letalidades (SARIGIANNIS; HANSEN, 2012).

Estudos epidemiológicos relatam que, em sua maioria, os cânceres são originados pela exposição contínua a agentes mutagênicos e carcinogênicos, sendo que a susceptibilidade individual pode depender da predisposição genética,

de diferenças no hábito nutricional e no estilo de vida (STEINEMANN; GÖHRING; SCHLEGELBERGER, 2013). No decorrer da vida, o DNA sofre alterações, que podem ser causadas por erros durante a replicação do DNA, na divisão celular. No entanto, a exposição a agentes químicos ambientais representa um aumento na carga mutagênica (HENG *et al.*, 2013).

A genotoxicidade de uma determinada substância se dá pela sua capacidade de induzir danos na molécula de DNA, mesmo que esses danos sejam passíveis de reparo pelo sistema celular. Para avaliar tais danos são realizados estudos de genotoxicidade por meio de testes pré-clínicos para obtenção de dados iniciais sobre de segurança de substâncias que podem trazer riscos à saúde humana (ANVISA, 2013; KANG *et al.*, 2013; OECD, 2017).

Portanto, para estudos de genotoxicidade *in vivo*, destacam-se os ensaios cometa e de micronúcleo (MN) que devido a rapidez, confiabilidade e baixo custo são utilizados para avaliar possíveis danos no material genético. Além disso, para uma investigação genotóxica mais abrangente em modelos animais, a Conferência Internacional de Harmonização recomenda a realização combinada desses ensaios *in vivo*, devido a complementariedade de seus resultados. Esse uso combinado de testes mostrou-se como um método eficaz nos processos de avaliação de riscos (VALENTE *et al.*, 2017).

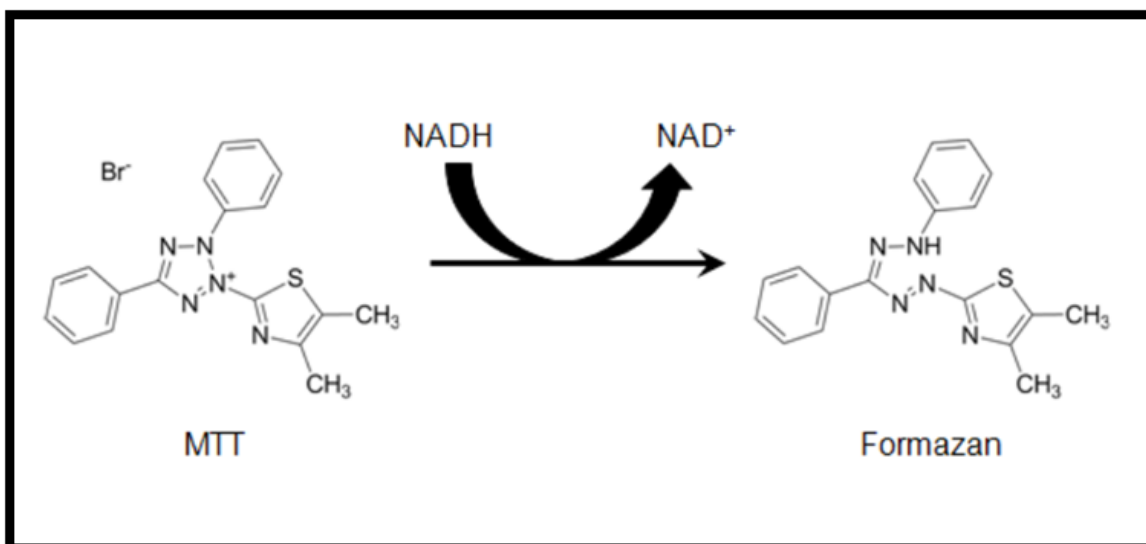
## 2.6 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de redução do MTT é um método colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular. Basicamente, células viáveis com metabolismo ativo possuem a capacidade de converter o reagente MTT em um produto de coloração roxa, enquanto células mortas perdem a capacidade de realizar essa conversão. Dessa forma, a coloração roxa é utilizada como um quantificador de viabilidade das células testadas (GALDINO *et al.*, 2014).

Um dos mecanismos dessa conversão ocorrem em mitocôndrias de células vivas através das suas desidrogenases que participam do processo, reduzindo o MTT, de cor amarela, em um corante artificial cor púrpura, que se precipita em forma de cristais de formazan (Figura 4). A concentração destes cristais é estimada por espectrofotometria e a porcentagem dos cristais produzidos

é diretamente proporcional à viabilidade celular (MARSHALL; GOODWIN; HOLT, 1995).

**Figura 4 - Esquema representativo de redução do Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT)**



Fonte: Adaptado de Riss *et al.* (2016)

Esse ensaio é utilizado para triagem de proliferação de células viáveis, com o objetivo de verificar os efeitos citotóxicos de compostos por meio da quantificação de células testadas. No entanto, uma desvantagem desse ensaio seria dependência do acúmulo de produtos coloridos ao longo do tempo, sendo necessário a adição de um reagente solubilizante antes do registro das leituras de absorvâncias.

## 2.7 TESTE COMETA

O Teste Cometa ou *Single Cell Gel Ele-trophoresis Assay* (SCGE) é um método de genotoxicidade, utilizado para a avaliação de danos e reparos de DNA em células individuais. Fundamenta-se basicamente na lise de membranas celulares inseridas em gel de agarose, seguida pela migração eletroforética do material proveniente do DNA (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

A migração dos fragmentos de DNA danificados para o polo positivo, ocorre devido sua carga negativa. Nesta etapa, o material proveniente da quebra do DNA adquire forma semelhante a um cometa, com cabeça e cauda. Por intermédio da análise da extensão da cauda do cometa, é possível identificar danos existente no DNA. Dessa forma, quanto maior for a migração dos fragmentos de DNA, maior é o dano no material genético da célula observada (LUCIO *et al.*, 2018).

intensidade da lesão no DNA é determinado por meio da análise microscópica criteriosa das células estudadas, evidenciando desde células sem alteração morfológica, até células com DNA completamente fragmentado (VERRI; MOURA; MOURA, 2017).

O teste cometa é um bom instrumento para avaliar danos no DNA por ser um método sensível, rápido, simples, de fácil compreensão e baixo custo. Por isso, este teste vem sendo utilizado para avaliar o potencial genotóxico de vários fármacos (AZQUETA *et al.*, 2014; AZQUETA; COLLINS, 2013; SINGH *et al.*, 1988).

Entretanto, para uma investigação genotóxica mais abrangente em modelos animais, a Conferência Internacional de Harmonização recomenda a realização combinada dos ensaios cometa e MN devido a complementariedade de seus resultados, mostrando-se dessa forma, como ferramenta importante nos processos de avaliação de riscos de determinadas substâncias ao organismo (KANG *et al.*, 2013).

## 2.8 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN)

O teste de MN é um bioensaio citogenético, que tem sido amplamente utilizado para detectar possíveis aberrações cromossômicas, por meio da análise da frequência de eritrócitos de células da medula óssea ou sangue periférico, de mamíferos previamente expostas a agentes químicos. Esse teste foi descrito pela primeira vez por Schimidt em 1975, é considerado um teste padrão ouro de metodologia simples, rápido e confiável para a identificação de danos no material genético (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Relatado, pela primeira vez, pelo pesquisador Howell (1891) a partir de estudos com células vermelhas de sangue de gatos com anemia, o MN é um pequeno núcleo, envolvido por membrana, encontrado próximo do núcleo principal. É formado quando a célula entra em mitose e a lesão genética não reparada, cria



uma instabilidade na estrutura mitótica, ocorrendo perda do cromossomo (aneugênese) ou fragmento deste (clastogênese). O MN pode ser visto ao microscópio óptico com a mesma coloração do núcleo principal (BHATIA; KUMAR, 2013; CARDINALE; BRUZZI; BOLOGNESI, 2012; SAMANTA; DEY, 2012). (VERRI; MOURA A.; MOURA V., 2017).

Portanto, o aumento da incidência de MN serve como um biomarcador para danos genotóxicos utilizado para fins de biomonitoramento. Para isto, podem ser utilizadas amostras de sangue periférico e mucosa, embora existam estudos abordando vários tecidos como matéria prima (FENECH *et al.*, 2011; HOLLAND *et al.*, 2008; REDDY, 2017). A contagem do número de MN e o estabelecimento de sua frequência (comparado a um controle) é um bom parâmetro de danos ao DNA não reparados, sendo útil para prevenção de cânceres (SAMANTA; DEY, 2012).

Entretanto, o teste de MN em roedores apesar de ser um dos ensaios mais estabelecidos no campo da genética toxicológica, assim como outros ensaios de genotoxicidade, tem suas limitações pois não pode ser usado eficientemente em populações de células que não estejam em divisão (HAYASHI *et al.*, 2011).

Atualmente, o teste de MN, é utilizado para detectar possíveis alterações cromossômicas por meio da presença de MN encontrado em células submetidas a exposição de gentes genotóxicos pois, é crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas a agentes químicos de uso crônico, como por exemplo os fármacos (MENDES *et al.*, 2011; PAVANELLO; LOTTI, 2012; SUSPIRO; PRISTA, 2011;)

## 2.9 ESTUDO *in silico*

A bioinformática teve início a partir dos avanços da biologia molecular tornando-se uma peça essencial aos estudos na área da biologia e afins. Por isso, surge como uma ferramenta indispensável na ordenação de quantidade cada vez maior de dados biológicos, na interpretação e elucidação de eventos biológicos gerados a partir do sequenciamento de genes e proteínas (ARAÚJO *et al.*, 2008).

O estudo *in silico* é uma simulação computacional que permite realizar deduções sobre processos biológicos relevantes. É utilizado como uma ótima estratégia na descoberta de possíveis fármacos e sua vantagem deve-se a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em

ensaios de toxicidade (MACEDO; DE MELO FILHO; ANDRADE, 2013; MARTINS *et al.*, 2014; PEREIRA, 2007).

Portanto, é cada vez mais comum, a utilização de métodos computacionais como instrumento de pesquisa para o planejamento racional de bioativos por meio de programas que possibilitam o uso da modelagem molecular (SANT'ANNA, 2009).

Tendo por base a informação de que a literatura científica ainda não compreende totalmente os efeitos biológicos e a interação dos compostos presentes nos extratos de *Cannabis sp.* e que na última década, estudos *in vitro* e *in vivo* indicaram possíveis propriedades antitumorais nos fitocanabinóides (BARAM *et al.*, 2019), o presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do EOC e propor *in silico* análogos antitumorais do CBD.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar as propriedades citotóxica e genotóxica do extrato orgânico da *Cannabis sp.* e propor um análogo do CBD com propriedade antitumoral.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a citotoxicidade do EOC *in vitro* por meio do teste do MTT.
- Analisar a genotoxicidade do EOC *in vivo* por meio dos testes cometa e teste de MN.
- Avaliar *in silico* a interação do CBD com a enzima topoisomerase II.
- Propor *in silico* análogos antitumorais do CBD.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) com o número de protocolo 08059/2018, em conformidade com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo animais não-humanos.

O teste de citotoxicidade para avaliação da viabilidade celular com MTT, foi realizado no Laboratório de Cancerologia Experimental (LABCANCER) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). As análises genotóxicas por meio do ensaio cometa foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e de Estudos de Injúrias Biológicas (LABMINBIO) e as do ensaio de MN foram realizadas no Laboratório de Mutagenicidade (LABMUT) ambos pertencentes ao Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Biodiversidade da (NPBio) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI). O estudo *in silico* foi realizado no departamento de Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

### 4.1 EXTRATO ORGÂNICO DE *Cannabis* (EOC)

O EOC estudado foi produzido com plantas do gênero *Cannabis* de forma artesanal, sem controle de qualidade farmacológico, para fins medicinais. Trata-se de um extrato de aspecto oleoso, viscoso, de coloração amarelo-esverdeado diluído em óleo de coco para facilitar o consumo.

Para preparo do EOC foram utilizados 1/4 de Cannabis para 1/1 de óleo de coco (10g de Cannabis para 40g de óleo de coco). Em uma panela cheia de água, foi fervido durante duas horas e trinta minutos. Depois de esfriar, a mistura foi coada e o líquido adquirido foi colocado em um recipiente e conservado em geladeira.

O EOC utilizado neste estudo foi cedido por uma Associação Brasileira de Apoio *Cannabis sp.* sem fins lucrativos que apoia famílias que necessitam do tratamento com produtos à base de plantas do gênero *Cannabis*. Localizada no estado da Paraíba, esta associação além da produção também realiza pesquisas com pacientes que utilizam o EOC como tratamento alternativo.

## 4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo foram utilizados 36 camundongos da espécie *Mus musculus* (linhagem *Swiss*) albinos, de ambos os sexos, adultos com seis a dez semanas de vida e peso aproximado de 20 a 25 g, provenientes do Biotério do NPBio/UESPI. Neste local, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno e em condições adequadas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com 40 – 60% de umidade, em ciclos de claro e escuro de 12 h, recebendo água e comida, *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais foram adotados de acordo com as recomendações do Guia de cuidados e utilização de animais de laboratório (THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, 2011), em cumprimento as determinações para o uso científico de animais da legislação brasileira (Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008 - Lei Arouca) e observando os princípios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A escolha da dose foi baseada no protocolo de utilização do CBD descrito na Resolução nº 2.113/2014 do Conselho Federal de Medicina (CFM), que determina que o tratamento de produtos à base de *Cannabis* devem iniciar com doses de 2,5 mg/kg/dia, por administração por via oral, com aumento gradual da dose em 5 mg/kg/dia a cada sete dias, até a dose máxima de 25 mg/kg/dia com o intuito de determinar a dose ideal com garantia de segurança e tolerabilidade do extrato administrado. As mesmas doses também foram utilizadas em um estudo realizado pelo Centro de Epilepsia da Universidade de Nova York (BRASIL, 2014; DEVINSKY *et al.*, 2016).

Portanto, em nosso estudo foram testadas as doses: inicial (2,5 mg/kg/dia), intermediária (12,5 mg/kg/dia) e máxima (25 mg/kg/dia) em camundongos *M. musculus*.

## 4.3 ESTUDO *in vitro* – TESTE DE CITOTOXICIDADE

### 4.3.1 Teste de Viabilidade Celular

Para a realização do teste de viabilidade celular com o MTT foi utilizado o procedimento descrito por Denizot e Lang (1986) e Riss *et al.* (2016), observando as recomendações da OECD 491 (2020) para este protocolo experimental.

#### 4.3.1.1 Cultivo de células

A linhagem B16F10 e L929 foram cultivadas em meios de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) e *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), ambos a 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Todas as linhagens foram mantidas em frascos apropriados para cultivo em estufa incubadora em condições de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> e em temperatura de 37°C.

Ao atingirem aproximadamente 95% de confluência, procedeu-se à tripsinização das linhagens quando o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas com 2,0 mL de *Phosphate-buffered saline* (PBS) e *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) pH 7,4, aspirando-o logo em seguida. Colocou-se 0,5 mL de solução de tripsina versene (ATV) solução 0,2%. A tripsina foi inativada após completo desprendimento das células com 1,5 mL do respectivo meio de cultura a 10% (v/v) de SFB. Obteve-se, então, uma suspensão celular que, após contagem, foi ajustada à densidade celular apropriada para a realização do experimento.

#### 4.3.1.2 Viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade celular do OEC foram utilizadas as linhagens B16F10 e L929 devido a disponibilidade laboratorial. Foram semeadas  $5 \times 10^3$  células/100 µL/cavidade em placas de poliestireno de 96 cavidades. As culturas celulares foram mantidas em estufa por 24 h, garantido a adesão celular à superfície das cavidades. As células foram expostas por 72 h a concentrações crescentes (7,8 a 1000 µg/mL) do EOC e em outro momento a concentrações crescentes de doxorrubicina (0,39 a 100 µg/mL), esta última como controle positivo.

Foram realizadas diluições seriadas na proporção de 1:1, a partir da concentração de 1000 µg/mL do EOC e de 100 µg/mL de doxorrubicina. Tendo em vista que estudos anteriores relatam que extratos vegetais não purificados são considerados ativos em concentrações menores que 4 µg/mL, No presente estudo foram avaliadas concentrações bem superiores (até 1000 µg/mL) para verificar se de fato, o EOC não seria citotóxico nas linhagens avaliadas.

A viabilidade celular máxima foi determinada em células expostas apenas a meio RPMI 1640 a 10% (v/v) de SFB. Após esse período, foram adicionados 10,0 µL de uma solução de sal de tetrazólio (5 mg/mL) em cada

cavidade, quatro horas antes de se realizar a leitura espectrofotométrica, a 540 nm. Previamente à leitura, os cristais de sal de tetrazólio foram dissolvidos em 100,0  $\mu\text{L}$  de solvente dimetilsulfóxido (DMSO), como mostra o esquema representado pela (Figura 5).

**Figura 5 - Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio de viabilidade celular**



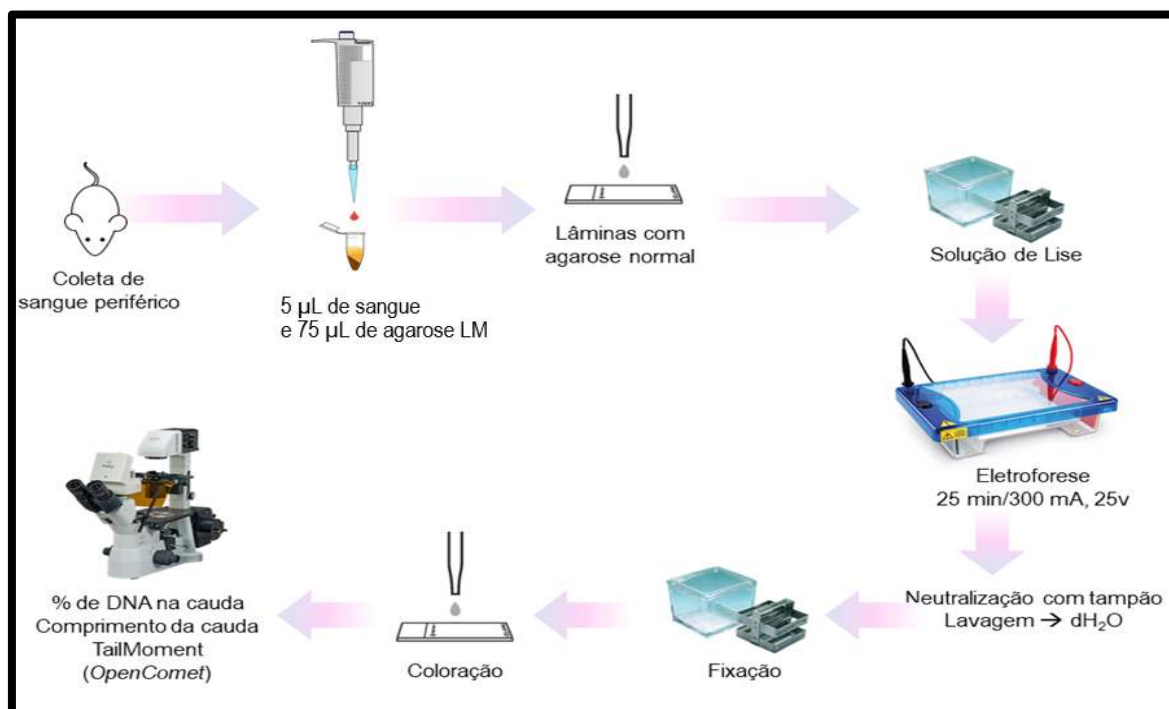
Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.4 ESTUDO *in vivo* – TESTES DE GENOTOXICIDADE

##### 4.4.1 Teste cometa

Para realização do ensaio cometa, foi usado o procedimento padrão alcalino descrito por Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (2000), conforme esquema apresentado na (Figura 6). O protocolo utilizado neste teste baseia-se ainda em publicações e nas recomendações da OECD 489 (AZQUETA *et al.*, 2014; AZQUETA; COLLINS, 2013; BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005; COLLINS *et al.*, 2008; OECD, 2016).

**Figura 6 - Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio cometa alcalino**



Fonte: Adaptado de Tice *et al.* (2000)

Neste ensaio, foram utilizados 36 camundongos de ambos os sexos da espécie *Mus musculus* divididos em seis grupos heterogêneos de seis animais. Um grupo para controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg), um para controle negativo (água destilada), um para óleo de coco (veículo 25 mg/kg) e um para cada dose do EOC (2,5; 12,5 e 25 mg/kg). As doses testadas (4 e 24 horas após exposição ao EOC) foram selecionadas com base no tratamento prescrito para pacientes com epilepsia refratária, descritas no protocolo de utilização de medicamentos à base de *Cannabis sp.* da Resolução nº 2.113/2014 do CRM (BRASIL, 2014).

Inicialmente foi realizada a colheita de sangue periférico de cada animal, 5 µL de células sanguíneas (sangue total com EDTA) foram pipetados e transferidos para Eppendorfs contendo 75 µL de agarose *Low Melting* (0,75%) a 37°C. Depois de homogeneizada, a mistura foi espalhada sobre lâminas pré-cobertas com gel de agarose normal (1,5%), cobertas com lamínulas e levada ao freezer durante 15 minutos para solidificar. Após esse tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA,



10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% dimetilsulfóxido (DMSO); pH 10) que ficou armazenada previamente na geladeira por 24 horas em solução de lise. Após esse período as lâminas foram retiradas da solução de lise e imersas em tampão de pH alcalino (>13), durante 25 minutos e em seguida foram organizadas horizontalmente em cuba de eletroforese.

A cuba ficou previamente em “banho de gelo” para que a temperatura permanecesse constante em torno de 4°C. Ela foi preenchida com solução de eletroforese (300 mM de NaOH/1mM de EDTA pH>13) até cobrir as lâminas as quais ficaram em repouso durante 20 minutos. Após esse período foram submetidas a uma corrente elétrica em cuba de eletroforese, que induziu a migração dos fragmentos de DNA no sentido do ânodo, durante 25 minutos, a 25 volts e 300 mA.

Depois desta etapa as lâminas foram neutralizadas com solução de neutralização (0,4 mM Tris, pH 7,5) durante três ciclos de três minutos cada e lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, as lâminas foram secas a temperatura ambiente e posteriormente foram coradas com o corante fluorescente *GelRed* (2:1.000 µL). Todo o procedimento foi realizado com interferência mínima de luz, para evitar danos adicionais ao DNA e devido à fotosensibilidade dos reagentes utilizados nesse experimento.

#### 4.4.1.1 Análise das lâminas do cometa

As lâminas foram analisadas por microscopia de imunofluorescência (NIKON LABPHOT 2) com aumento de 40X, equipado com um filtro de excitação de 420 nm – 490 nm e um filtro de barreira de 520 nm. As imagens dos cometas no formato *Bitmap* (BMP) foram captadas por meio de uma câmera de microscopia (*Eurekam* 16.0 plus). As imagens capturadas foram analisadas pelo *software OpenComet* versão 1.3.1, de forma semiautomática para avaliar cometas produzidos no processo de eletroforese em gel de células individualizadas.

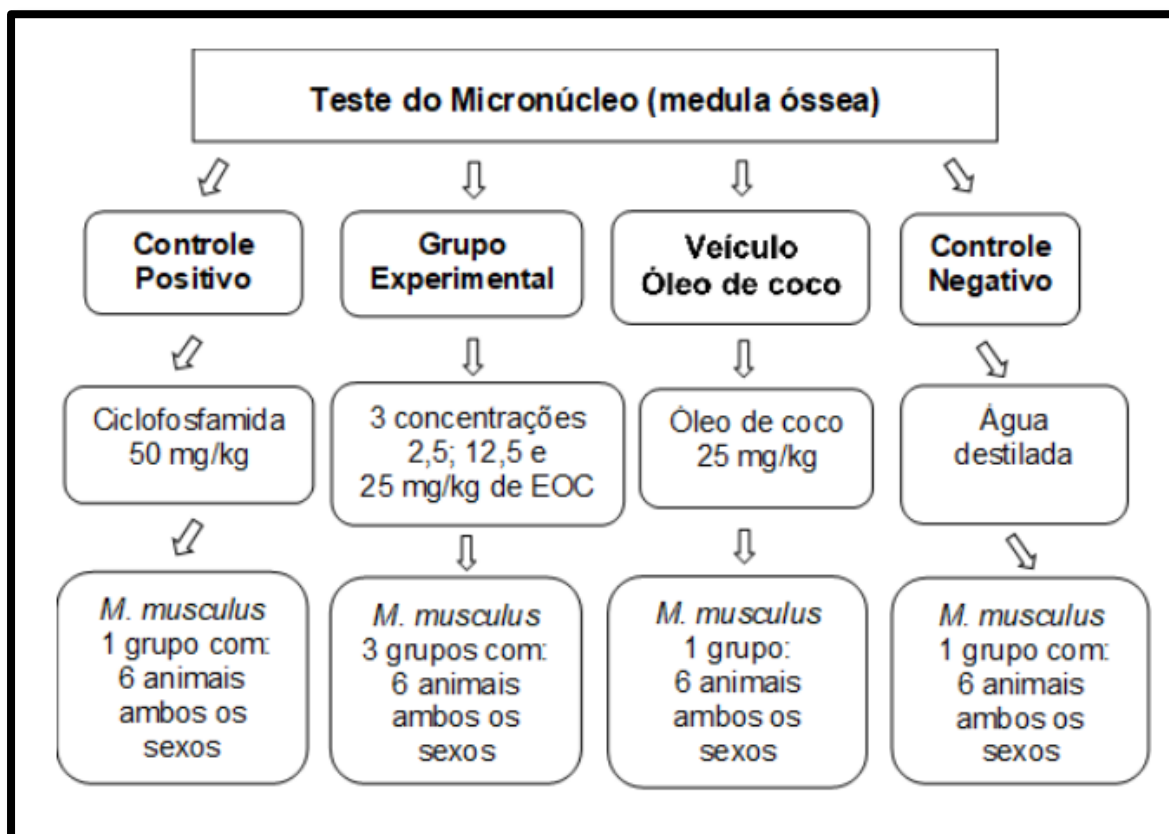
Os parâmetros utilizados para avaliar o dano ao DNA foram: comprimento da cauda do cometa (uma distância entre o centro da massa da cabeça e o centro da massa da cauda) e porcentagem de DNA na cauda do cometa. Foram analisados 50 nucleóides por indivíduo de cada tratamento (KANG *et al.*, 2013; LOVELL; OMORI, 2008).

#### 4.4.2 Teste de micronúcleo (MN)

Para realização do ensaio do MN, foi usado o procedimento descrito por Fenech (2000) e baseado nas recomendações estabelecidas previamente pela OECD 474 (2016). As doses testadas foram selecionadas com base no tratamento prescrito para pacientes com epilepsia refratária no protocolo de utilização de medicamentos à base de *Cannabis* do CFM (BRASIL, 2014).

Neste ensaio, foram utilizados 36 camundongos de ambos os sexos da espécie *M. musculus* divididos em seis grupos heterogêneos constituído por seis animais: três grupos experimentais, um grupo controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg), um grupo controle negativo (água destilada) e outro para veículo (óleo de coco). Os grupos experimentais foram tratados com três doses do EOC (2,5; 12,5 e 25 mg/kg) administradas por via oral como mostra o esquema na (Figura 7).

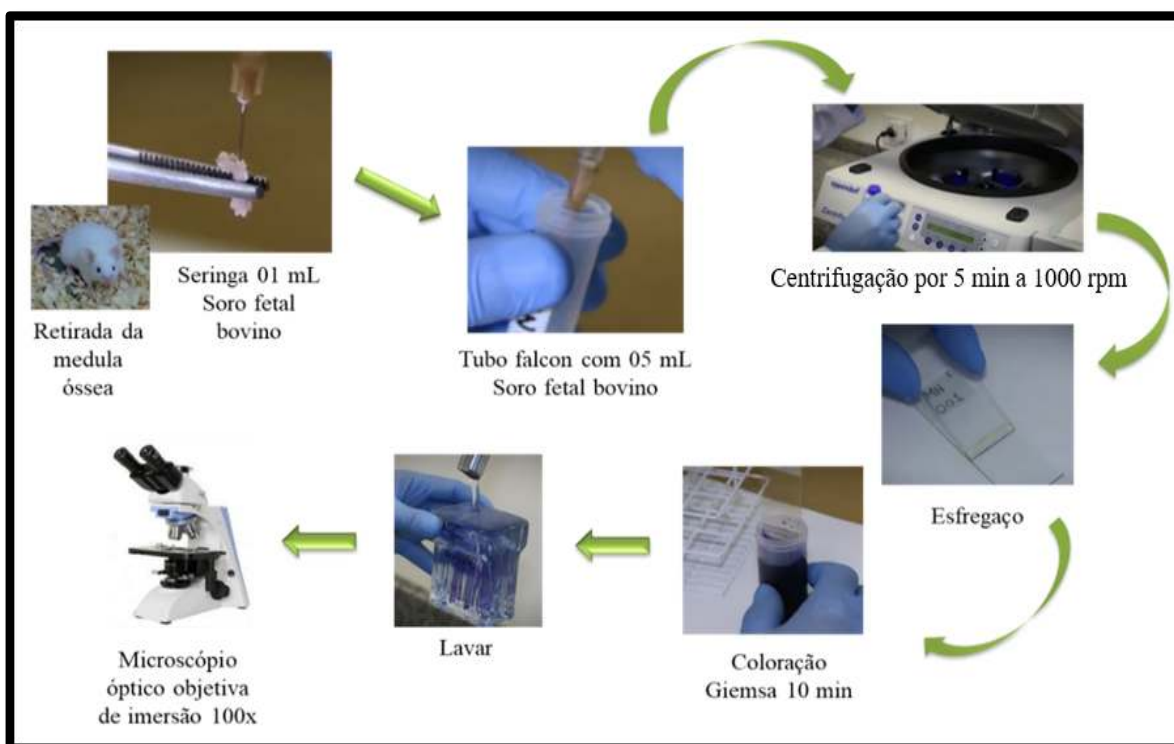
**Figura 7 - Representação esquemática do experimento de micronúcleo (MN) com o extrato orgânico de *Cannabis sp.* (EOC)**



Após o período de 48 horas (exposição aguda) e 72 horas (exposição crônica) da administração do EOC, foram colhidas células da medula óssea. Para a coleta destas células, utilizou-se uma seringa de 0,1 mL previamente preenchida com SFB, que foi introduzida na abertura da extremidade do fêmur permitindo que o soro fetal fosse derramado no canal, empurrando o componente medular em direção à outra extremidade contida em um tubo Falcon, previamente marcado com o código do animal. A amostra foi completada com 0,5 mL de SFB e depois foi feita a suspensão até a homogeneização.

A suspensão foi centrifugada por cinco minutos, após esse tempo o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e descartado no fim do procedimento. Para cada animal foram confeccionadas duas lâminas previamente marcadas com o código do animal. Em cada lâmina adicionou-se duas gotas da suspensão e, com auxílio de outra lâmina inclinada em um ângulo de 45° foi feito o esfregaço. (Figura 8).

**Figura 8 - Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio de micronúcleo (MN)**



Após a confecção do esfregaço as lâminas foram deixadas para secar ao ar livre “*overnight*”. A coloração foi realizada 24 horas após a confecção das lâminas em *Giemsa* por 10 minutos e após esse tempo, foram lavadas em água corrente para retirar o excesso da corante

#### 4.4.2.1 Análise das lâminas do micronúcleo (MN)

A análise das lâminas foi realizada utilizando microscópio óptico com aumento de 100X com objetiva de imersão, pelo mesmo observador. Os resultados foram expressos em frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em 2.000 células por animal (HAYASHI *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2013; KISSLING *et al.*, 2007).

#### 4.4.3 Análise estatística

A análise estatística para o teste de citotoxicidade foi realizada usando o *software GraphPad Prism* versão 8.0 com significância  $p < 0,0001$  e pós teste de *Dunnet*. Para os testes genotóxico e mutagênico foi usado o *software GraphPad Prism* versão 8.0, ANOVA *OneWay* e pós-teste de *Tukey* com nível de significância de ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 ESTUDO *in silico* - *docking* MOLECULAR

Neste estudo, foram utilizadas inicialmente para simulações de *docking*, cinco estruturas (códigos de acesso: 5GWK, 4R1F, 4FM9, 1ZXM e 1ZXX) da TOPOIla, provenientes do *Protein Data Bank* (PDB) que é um banco de dados que serve de repositório especializado em informações sobre a estrutura e função de proteínas (MENCK; SLUYS, 2017).

O PDB foi criado no *Brookhaven National Laboratory* (BNL) em 1971 como um arquivo para estruturas biológicas de cristais macromoleculares. Com vários prêmios Nobel, é utilizado como ponto de partida para estudos em bioinformática estrutural. Inicialmente seu uso era limitado a um grupo pequeno de especialistas, mas no decorrer do tempo, passou a ser utilizado grupos

diversificados de pesquisadores em biologia e química, bem como educadores e estudantes de todos os níveis (BERNSTEIN *et al.*, 1977).

Esse banco de dados está disponível em domínio público, sendo o único arquivo mundial de dados estruturais primários de macromoléculas biológicas. Os dados depositados neste servidor geralmente foram obtidos através da difração de raios X, ressonância magnética nuclear e crio-microscopia eletrônica depositados por pesquisadores de todo o mundo (BERMAN *et al.*, 2002)

A sequência primária da TOPOIIah utilizada nesse estudo, foi obtida no servidor *UniProt (Universal Protein)* que é uma base de dados gratuita, de alta qualidade que contém informações de sequências de proteínas e suas funções, provenientes de projetos de sequenciamento de genomas. No *UniProt* pode-se encontrar uma grande quantidade de informação sobre as funções biológicas de proteínas da literatura científica (INSTITUTE OF BIOINFORMATICS AND PROTEIN INFORMATION RESOURCE, 2019).

Após a análise e preparação da estrutura modelo da TOPOIIah (1ZXM), os *gaps* na estrutura da proteína citada foram construídos utilizando o servidor *TASSER (Terative Threading Assembly Refinement)* com técnicas de *threading*. Este servidor é um recurso *on-line* utilizado para previsão de modelos tridimensionais de estruturas de moléculas de proteína a partir de sequências de aminoácidos. No *TASSER*, os modelos estruturais são reconhecidos primeiro pelo PDB usando várias abordagens de alinhamento de encadeamento e o comprimento total do modelo estrutural é construído por simulações interativas de montagem de fragmentos (YANG J.; YANG Z., 2015).

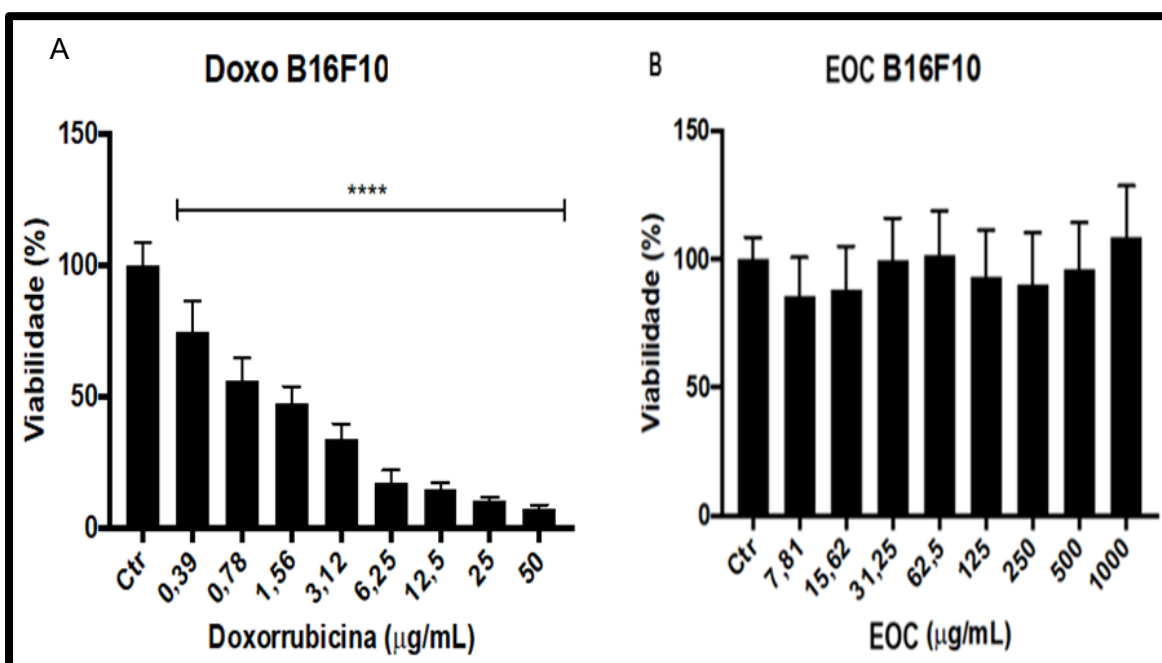
Para o estudo de *docking* da TOPOIIah com os ligantes CBD e seus metabólitos oxidados, foi utilizado o *Molegro Virtual Docker (MVD) 5.5* que é uma plataforma integrada que atua prevendo interações entre proteína/ligante e oferece *docking* de alta qualidade com base em técnica de otimização. O *Molegro Virtual Docker* lida com todos os aspectos do processo de acoplamento, desde a preparação das moléculas até a determinação dos possíveis locais de ligação da proteína alvo e a previsão dos modos de ligação dos ligantes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VIABILIDADE CELULAR

Os resultados obtidos nesse ensaio de viabilidade celular com método do MTT frente a células da linhagem B16F10 expostas ao EOC, mostraram que não houve queda significativa na viabilidade celular em comparação ao controle negativo (CN). Ao observar os dados, verifica-se que a porcentagem de células viáveis se manteve superior a 90% em todas as concentrações testadas (7,8 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) do EOC. Por outro lado, a exposição dessa linhagem celular à doxorrubicina mostrou redução significativa ( $p < 0,0001$ ) do crescimento celular de forma dose-dependente como mostra a (Figura 9).

**Figura 9 - Viabilidade de células da linhagem melanoma murino metastático (B16F10) expostas ao extrato orgânico de *Cannabis sp.* (EOC) e a doxorrubicina**



Fonte: Elaborada pelo autor. Dados representativos de viabilidade celular da linhagem melanoma murino metastático (B16F10), em concentrações crescentes de doxorrubicina (Doxo B16F10) em A e do Extrato Orgânico de *Cannabis sp.* (EOC B16F10) em B após 72 h de exposição. Para dados estatísticos foi utilizada a análise de variância ANOVA com pós-teste de *Dunnet*, sendo considerado significativo  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Para controle positivo foi utilizada a doxorrubicina ( $C_{27}H_{29}NO_{11}HCl$ ) que é uma droga citotóxica amplamente utilizada na prática oncológica humana desde a década de 1960, atuando especificamente na inibição da topoisomerase II (NITISS, 2009; YANG *et al.*, 2014).

Em estudos anteriores de viabilidade celular, Lukhele e Motadi (2016) avaliaram os efeitos antiproliferativos de extratos de *C. sativa* (50, 100, 150  $\mu g/mL$ ) e do CBD (0,8; 1,5 e 3,2  $\mu g/mL$ ) frente as linhagens celulares de câncer do colo do útero (SiHa, HeLa e ME-180). Em seu estudo os pesquisadores mostraram que extratos de *C. sativa* e de CBD possuíam atividade antiproliferativa nas concentrações testadas mas, que a inibição do crescimento celular observada nos extratos de *C. sativa*, poderia ter ocorrido devido à presença do CBD em sua composição, pois este, mostrou-se eficaz na redução do crescimento celular em todas as linhagens testadas em concentrações inferiores as utilizadas com os extratos de *C. sativa*.

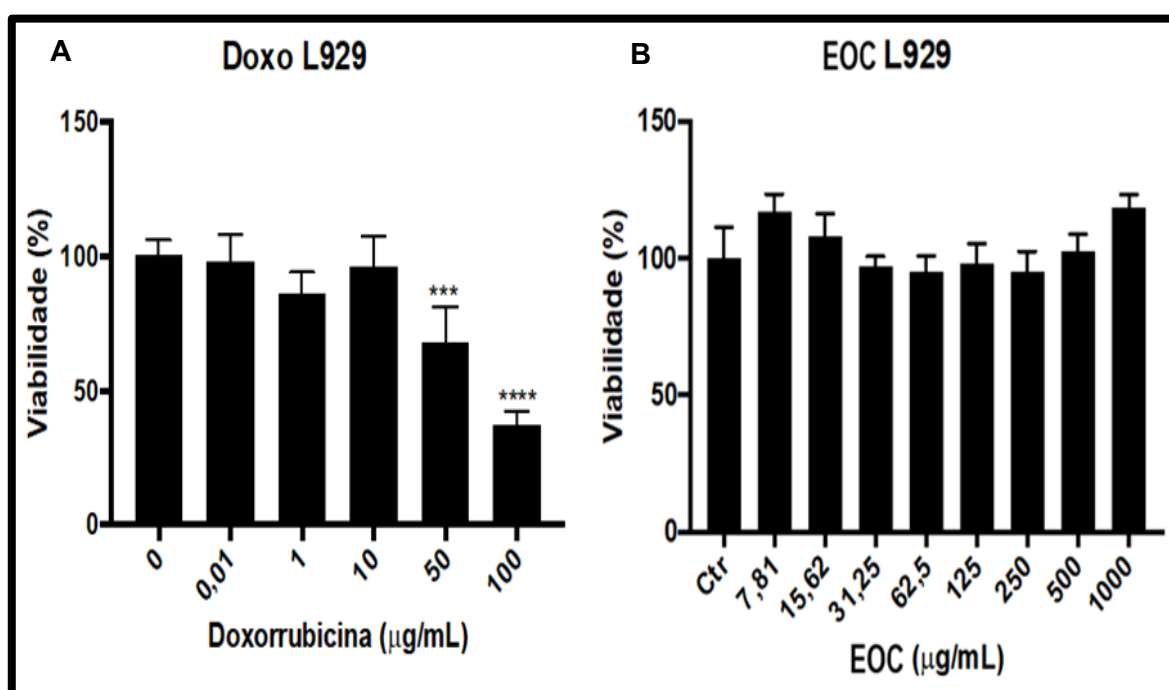
Entretanto, mesmo que os resultados mostrados acima e outros descritos na literatura mostrem redução da viabilidade celular de diversos tipos de cânceres (inclusive melanomas) em células de camundongos, ratos e humanos, tratadas com extratos *C. sativa*, em nossa investigação, o EOC não se mostrou capaz de reduzir o crescimento de células da linhagem B16F10 nas doses testadas.

Essa divergência nos resultados pode estar relacionada com os diferentes tipos de protocolos, células e extratos utilizados pelos pesquisadores (ROMANO *et al.*, 2014; SARFARAZ *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2014; ZIMMERMAN S.; ZIMMERMAN A., 1990). Isto posto, acredita-se que a ausência de citotoxicidade do OEC pode está relacionada possivelmente, com as concentrações de CBD presentes em nosso extrato, não investigadas nesta pesquisa. Por conseguinte, estudos complementares devem ser realizados para melhor compreensão da citotoxicidade do EOC, dos seus possíveis mecanismos de ação e da caracterização quantitativa dos componentes da amostra.

Com relação ao resultado da exposição das células da linhagem B16F10 a doxorrubicina observou-se redução significativa ( $p < 0,0001$ ) do crescimento celular de acordo com o aumento das concentrações (0,39 a 100  $\mu g/mL$ ). Os resultados citotóxicos da doxorrubicina já são bem descritos na literatura e esta foi utilizada nesse estudo para fins comparativos (NITISS, 2009).

No que concerne ao resultado obtido em células da linhagem L929 expostas ao EOC, observou-se que este extrato não promoveu regressão significativa ( $p < 0,0001$ ) da viabilidade celular pois, se manteve próximo ou superior a 100%. Por outro lado, a doxorrubicina obteve redução da porcentagem de viabilidade celular nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 10).

**Figura 10 - Viabilidade de células da linhagem fibroblasto normal murino (L929) expostas ao extrato orgânico de *Cannabis sp.* (EOC) e a doxorrubicina**



Fonte: Elaborada pelo autor. Dados representativos de viabilidade celular da linhagem fibroblasto normal murino (L929), em concentrações crescentes de doxorrubicina (Doxo L929) em A e do Extrato Orgânico de *Cannabis sp.* (EOC L929) em B após 72 h de exposição. Para dados estatísticos foi utilizada a análise de variância ANOVA com pós-teste de *Dunnet*, sendo considerado significativo  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Resultados semelhantes com relação a linhagem de células normais foram obtidos por Romano, *et al.* (2014). Em seus estudos de viabilidade celular com MTT, investigaram o efeito de um extrato padronizado de *C. sativa* com alto teor de CBD e não observaram citotoxicidade em colônias de células saudáveis. Em nosso estudo, observou-se que o EOC também não demonstrou redução da viabilidade das células de fibroblastos normais nem mesmo na dose mais elevada (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) testada.



## 5.2 TESTE COMETA

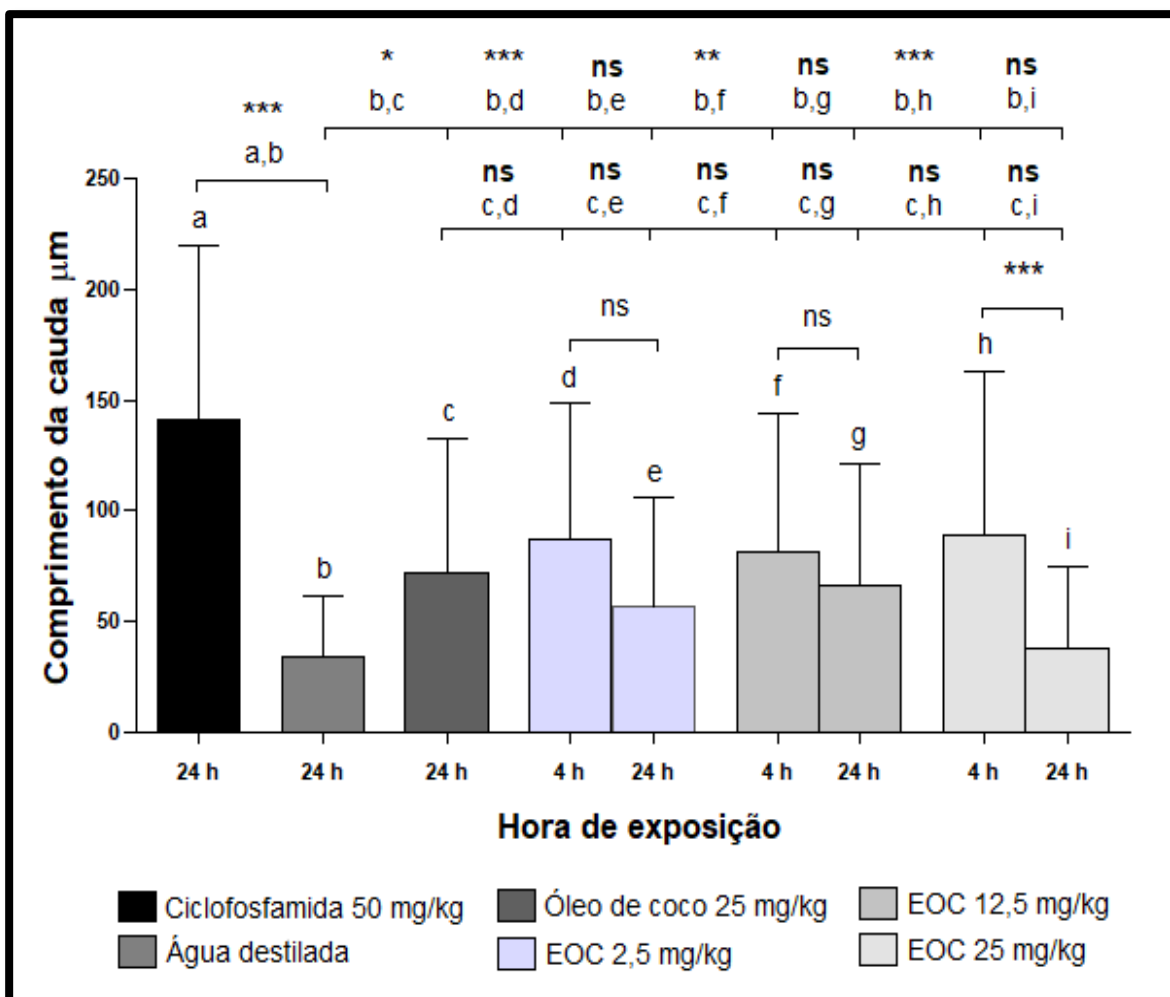
O teste cometa foi utilizado para avaliar possíveis danos ao material genético identificados pelos resultados do comprimento da cauda (*Tail Length*) e porcentagem de DNA na cauda (*Tail DNA Percent*) (KUMARAVEL, 2009). As análises dos grupos testados foram realizadas observando as primeiras 4 e 24 horas após a administração do EOC e dos controles (positivo, negativo e veículo), por serem parâmetros de comparação, foram considerados apenas os resultados de 24 horas, período em que ocorrem os reparos.

O aumento da cauda do cometa, medida pela distância entre o centro da massa da cabeça e o centro da massa da cauda, é a primeira fase do estabelecimento do dano devido a quebras no DNA e a migração de fragmentos de DNA durante a eletroforese por isso, a análise do comprimento da cauda fornece apenas as medições iniciais do cometa quantificando a extensão do dano nessa fase (COLLINS, 2013; KANG *et al.*, 2013; KUMARAVEL, 2009).

Com base no exposto, a avaliação do comprimento da cauda de DNA mostrou que o óleo de coco (veículo) apresentou aumento significativo deste indicador ( $p < 0,05$ ) mesmo após 24 horas de exposição ao EOC em comparação com o controle negativo. Todavia, o dano observado pode estar associado à toxicidade já descrita deste veículo utilizado na produção do EOC. Este achado corrobora com o estudo de Oliveira *et al.* que analisaram larvas de microcrustáceo *Artemia salina* Leach e verificaram toxicidade em concentrações inferiores a 120 µg/mL. Os pesquisadores relacionaram tal efeito possivelmente à presença do complexo de ácidos graxos saturados de cadeia média e longa presentes na composição do óleo de coco (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Com relação ao comprimento da cauda do DNA dos grupos tratados com o EOC, observou-se diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) para as doses 2,5 e 25 mg/kg e ( $p < 0,001$ ) para a dose 12,5 mg/kg nas primeiras 4 horas de exposição quando comparadas ao controle negativo indicando dano genotóxico agudo. Este dano pode estar associado ao veículo utilizado na produção deste EOC que, como já descrito, causou genotoxicidade significativa. Entretanto, verificou-se que houve redução no comprimento da cauda de DNA em todas as doses testadas com o EOC após 24 horas de exposição quando comparadas ao controle negativo o que evidencia regressão do dano genotóxico (Figura 11).

Figura 11 – Comprimento da cauda do cometa (DNA) em camundongos *M. musculus* tratados com o extrato orgânico de *Cannabis sp.* (EOC)



Fonte: Elaborada pelo autor. A figura mostra média  $\pm$  desvio-padrão. Os valores mostram o comprimento da cauda do cometa em células de sangue periférico de camundongos e tempo de exposição ao EOC durante as primeiras 4 e 24 horas. Foram analisados 50 nucleóides por tratamento no *software OpenComet*. As letras **a**, **b** e **c** representam: CP (ciclofosfamida), CN (água destilada) e Veículo (óleo de coco), respectivamente. As letras **d**, **e** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 2,5 mg/kg; **f**, **g** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 12,5 mg/kg e **h**, **i** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 25 mg/kg. Para dados estatísticos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com *Tukey*. Significância em \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  e não significativo (ns).

Observou-se ainda, que a análise comparativa entre os grupos experimentais nas primeiras 4 e 24 horas após a indução com o EOC, demonstrou ausência de reparo estatisticamente expressivo nas concentrações de 2,5 e 12,5 mg/kg, contudo, mostra reparo na dose de 25 mg/kg.

Não foram encontrados resultados na literatura sobre a genotoxicidade de EOC utilizando o parâmetro comprimento da cauda de DNA para fins comparativos com este estudo. No entanto, outras avaliações genotóxicas com extratos de *Cannabis sp.* foram encontradas, a qual pode-se destacar o teste de Ames realizado por Dziwenka *et al.* (2020) que mostraram em seus estudos não mutagenicidade do extrato de *Cannabis*.

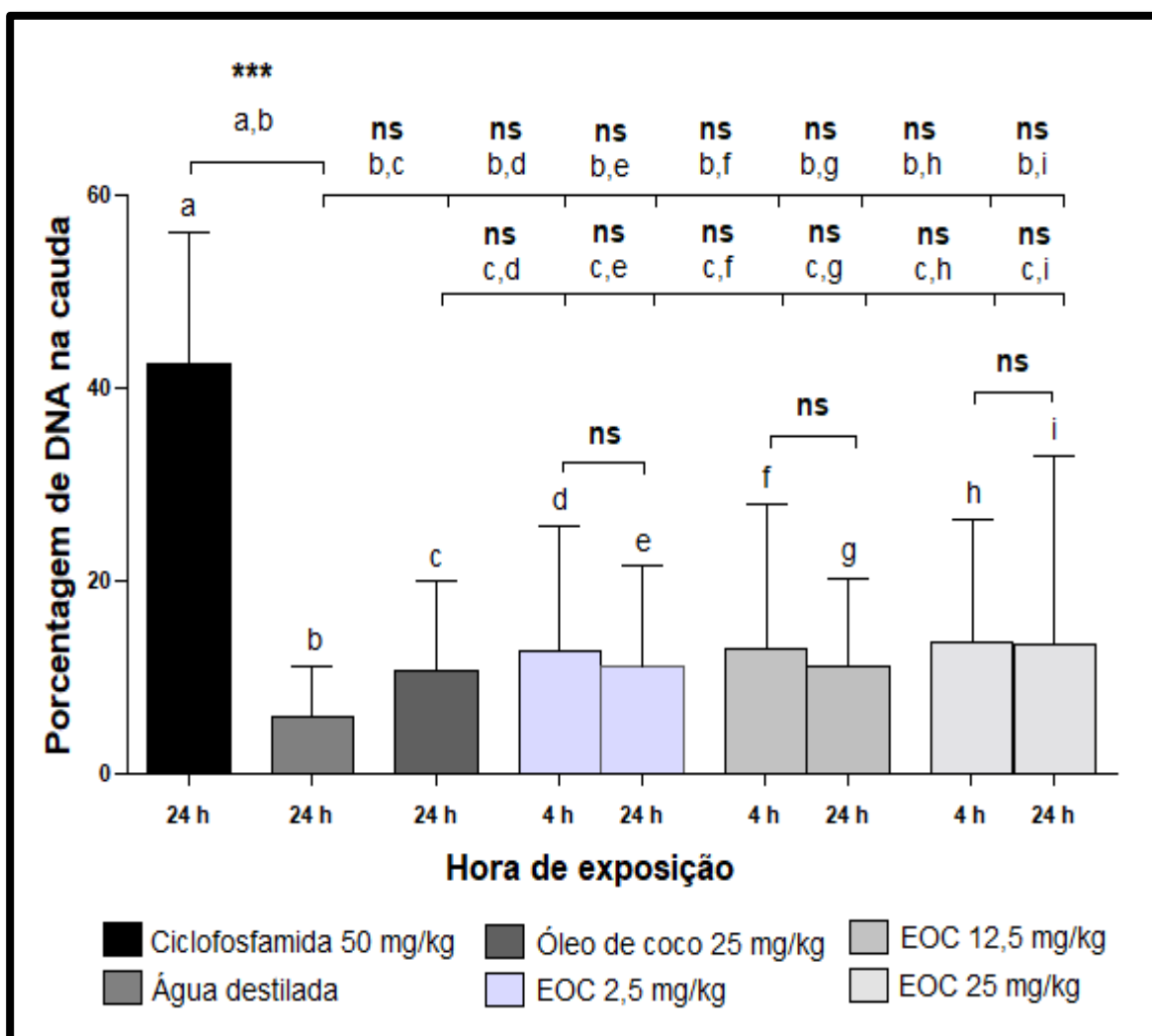
A porcentagem de DNA na cauda é um parâmetro mais preciso para a determinação de lesões ao material pois abrange uma maior variedade de danos e apresenta variação linear com relação a frequência de rupturas no DNA. É indicado para medir a distribuição do DNA na cauda do cometa, sendo padronizado tanto para fins regulatórios como para comparações interlaboratoriais (COLLINS *et al.*, 2008; KUMARAVEL, 2009).

De acordo com essa abordagem, foi possível verificar que o percentual de DNA migrado para a cauda do cometa em células de sangue periférico de camundongos tratados com o EOC, não foi significativo para controle negativo, veículo e nenhuma das doses testadas (2,5; 12,5 e 25 mg/kg). Com bases nesses dados, a porcentagem de DNA migrado indicou que o EOC não causou danos expressivos ao DNA em comparação com o controle negativo neste estudo.

Com base no exposto, verifica-se também achados não genotóxicos no estudo de Aviello *et al.* (2012) que, realizaram experimentos utilizando ensaio cometa em células derivadas de cólon humano da linhagem (Caco-2). Em suas investigações, não observaram indução de danos ao DNA em células tratadas com 10  $\mu$ M de CBD por 24 h, sugerindo ausência de efeito genotóxico em comparação com peróxido de hidrogênio utilizado como controle positivo em seus experimentos.

Com relação a avaliação do reparo em nosso estudo, pela análise da porcentagem de DNA entre as primeiras 4 e 24 horas após a exposição com o EOC, não foi verificado, diminuição relevante do percentual de DNA migrado, o que indica ausência de reparo para todos os grupos experimentais testados. Vale ressaltar, que estes dados já eram esperados pois, nenhuma das doses analisadas apresentaram anteriormente dano estatisticamente considerável com relação a esse parâmetro (Figura 12).

Figura 12 – Porcentagem de DNA na cauda do cometa em camundongos *M. musculus* tratados com o extrato orgânico de *Cannabis sp.* (EOC)



Fonte: Elaborada pelo autor. A figura mostra média  $\pm$  desvio-padrão. Os valores mostram a porcentagem de DNA na cauda do cometa em células de sangue periférico de camundongos e tempo de exposição ao EOC durante as primeiras 4 e 24 horas. As letras **a**, **b** e **c** representam: CP (ciclofosfamida), CN (água destilada) e Veículo (óleo de coco), respectivamente. As letras **d**, **e** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 2,5 mg/kg; **f**, **g** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 12,5 mg/kg e **h**, **i** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 25 mg/kg. Foram analisados 50 nucleóides por tratamento no *software OpenComet*. Para dados estatísticos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com *Tukey*. Significância em \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  e não significativo (ns).

Por outro lado, em um estudo recente Russo *et al.* (2019) por meio do teste cometa, testaram canabinóides naturais de extratos de *Cannabis*, CBD e cannabidivarina (CBDV) e demonstraram que todos provocaram lesões, em níveis baixos ( $>0,2 \mu\text{M}$ ), no DNA de linhagens de células do fígado humano (HepG2) e da

cavidade bucal (TR146). Entretanto, nesse mesmo estudo Russo *et al.* (2019), demonstraram com experimentos adicionais que os efeitos genotóxicos dos extratos foram causados por metabólitos tóxicos do CBD e CBDV produzidos por enzimas hepáticas e que sem tais metabólitos o CBD não foi capaz de induzir dano ao DNA. Os pesquisadores relataram ainda que seus extratos exerceram efeitos protetores ao material genético das células tratadas com peróxido de hidrogênio.

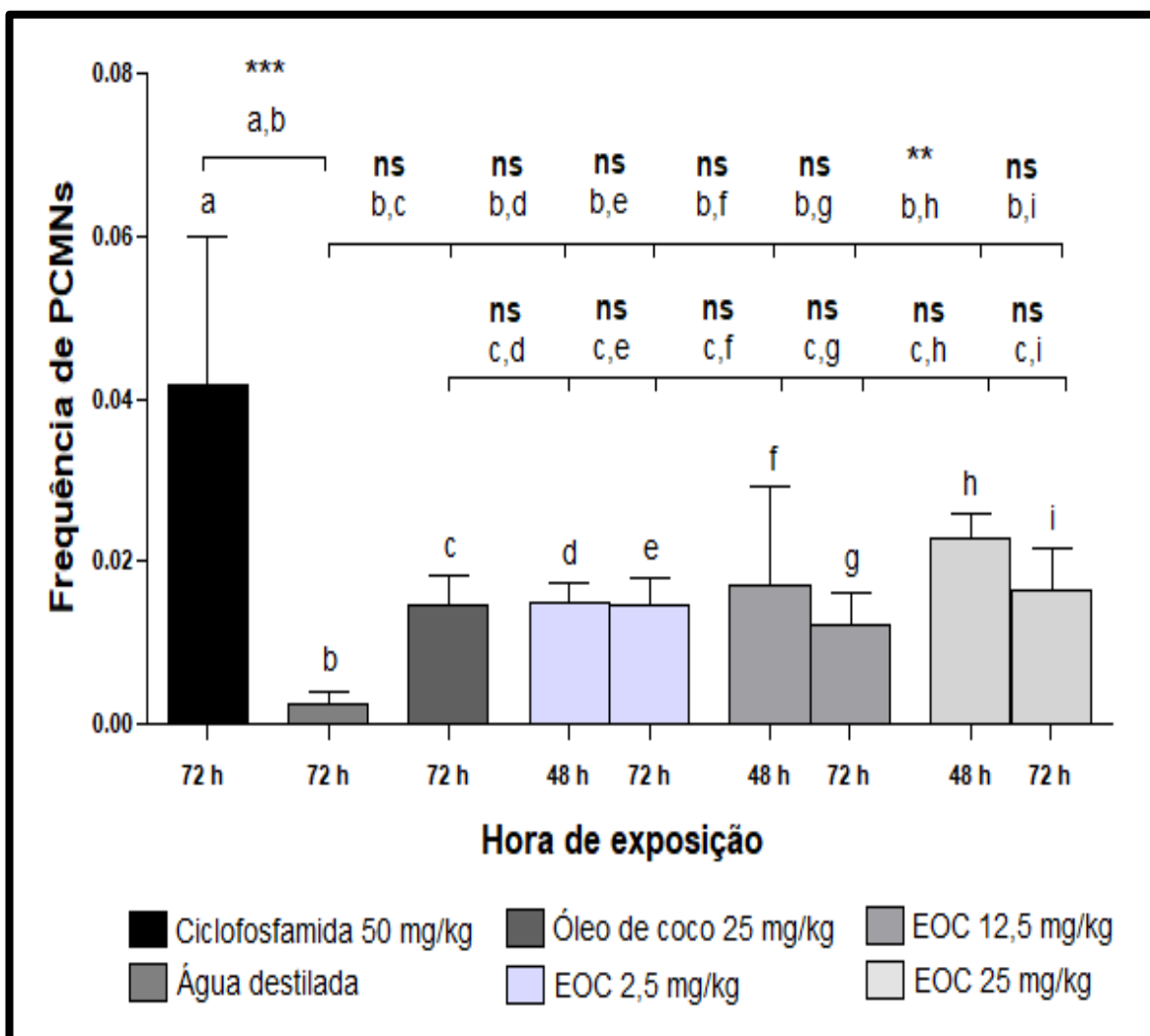
Embora o OEC e outros extratos a base de *Cannabis* já citados não tenham demonstrado efeitos genotóxicos significativos, não se pode ainda garantir de forma geral a segurança de seu uso, tendo em vista que, os resultados sobre a genotoxicidade dos canabinóides ainda não são conclusivos pois, observou-se variações significativas nos resultados de extratos de *Cannabis sp.* relatados na literatura científica, devendo ser preocupante o consumo de extratos artesanais a base de plantas desse gênero.

### 5.3 TESTE DE MICRONUCLEO

O resultado da avaliação mutagênica por meio do teste de MN mostrou que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na incidência de MN em células de medula óssea de camundongos tratados com EOC comparado com o veículo e com as doses 2,5 e 12,5 mg/kg (48 e 72 horas) e 25 mg/kg (72 horas), em relação ao controle negativo. Observou-se ainda, que o grupo tratado com 25 mg/kg de EOC demonstrou relevante formação de MN durante as primeiras 48 horas de exposição ( $p < 0,001$ ), o que pode estar relacionado com outros fatores de indução de mutagenicidade que não foram analisados em nossa investigação.

Por conseguinte, foi possível verificar que após as 72 h de exposição ao EOC as células demonstraram reparo. Com base nestas observações, fica evidenciando que o EOC testado não apresentou efeito mutagênico nas avaliações analisadas nestes intervalos de tempo e doses utilizadas (Figura 13).

**Figura 13 - Frequência de micronúcleo (MN) em células de medula óssea de camundongos *M. musculus* expostos ao extrato orgânico de *Cannabis sp.* (EOC)**



Fonte: Elaborada pelo autor. A figura mostra média  $\pm$  desvio-padrão. Os valores mostram a incidência de MN em células de medula óssea de camundongos e tempo de exposição ao EOC durante as primeiras 48 e 72 horas. Foram analisadas 2.000 células por tratamento em microscópio óptico com objetiva de imersão de 100x. As letras **a**, **b** e **c** representam: CP (ciclofosfamida), CN (água destilada) e Veículo (óleo de coco), respectivamente. As letras **d**, **e** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 2,5 mg/kg; **f**, **g** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 12,5mg/kg e **h**, **i** (4 e 24h, respectivamente) de EOC na concentração 25 mg/kg. Para dados estatísticos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com *Tukey*. Significância em \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  e não significativo (ns).

Entretanto, resultado controverso foi observado por Zimmerman e Yesoda Raj (1980) em um estudo cromossômico e de aberrações nucleares realizado em células da medula óssea de ratos híbridos tratados com dose de 10 mg/kg de canabinóides específicos (THC, CBD ou canabinol). Em suas

investigações, Zimmerman e Yesoda Raj (1980) verificaram que após cinco dias consecutivos de indução, a porcentagem de MN em células de camundongos tratados com canabinóides foi de três a cinco vezes maior comparado com dimetilsulfóxido utilizado como controle no experimento.

Em outro estudo, utilizando análise de MN em linhagens de células humanas do fígado (HepG2) previamente tratadas com canabinóides (CBD e a CBDV), Russo *et al.* (2019) constataram que ambos os compostos propiciaram a formação de MN em baixas concentrações ( $> 0,22 \mu\text{M}$ ), ocasionaram o aumento de outras anomalias nucleares (botões nucleares e pontes nucleoplasmáticas) e induziram morte celular por necrose e apoptose após o tratamento.

Diante do exposto, observou-se ainda que os resultados encontrados na literatura com relação aos efeitos citogenéticos dos canabinóides são divergentes. Tais resultados, podem estar relacionados com o uso de diferentes protocolos, tipos de células, animais e com os diferentes tipos extratos usados pelos pesquisadores. Dito isso, sabe-se ainda que os efeitos da *Cannabis sp.* e de seus derivados podem envolver vários alvos celulares potenciais na expressão gênica e que a mutagenicidade da *Cannabis sp.* permanece não esclarecida (ZIMMERMAN S.; ZIMMERMAN A., 1990).

Vale ressaltar, que os resultados de ambos os ensaios (cometa e MN) realizados em nossa investigação, demonstraram que o EOC não promoveu danos genotóxicos e mutagênicos estatisticamente expressivos, em células de sangue periférico e de medula óssea de camundongos nas doses testadas, o que corrobora com outros relatos da literatura como por exemplo o estudo de Nikan, Nabavi e Manayi (2016) que observaram em seu estudo, efeito protetor dos canabinóides ao material genético, embora os mecanismos desse processo ainda não estejam bem esclarecidos.

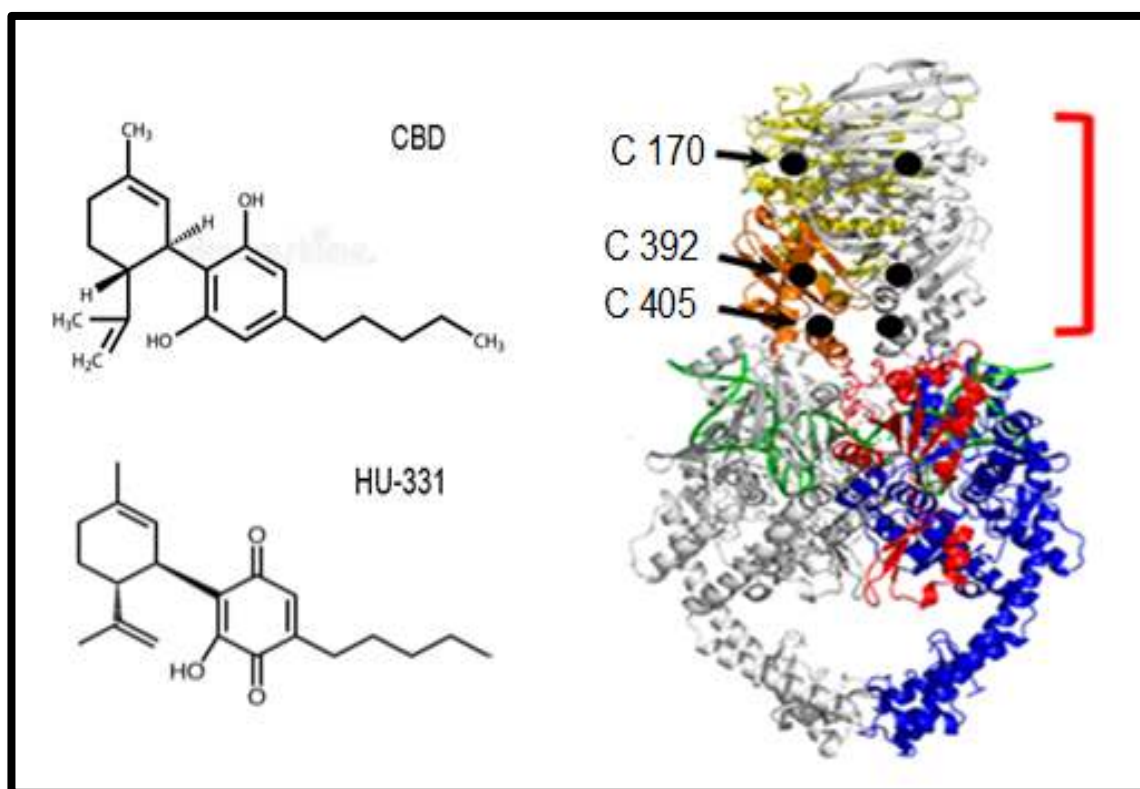
Com base nas informações expostas sobre a ausência de citotoxicidade e genotoxicidade do EOC, características desejáveis para atuar como antitumoral, pois minimizam efeitos desfavoráveis ao organismo, a próxima etapa de nosso estudo foi propor análogos antitumorais do CBD. Para tanto, tomou-se por base estudos anteriores que apontaram interação do CBD e de seus metabólitos oxidados com a TOPOII $\alpha$ , que está sendo considerada um importante alvo anticâncer.

Devido a ausência de estudos que sinalizem o sítio de interação entre os ligantes do CBD e a TOPOII $\alpha$ , foi realizada uma avaliação *in silico* por meio de estudo de *docking* e QSAR do CBD e seus metabólitos oxidados sobre a TOPOII $\alpha$ .

#### 5.4 ESTUDO *IN SILICO* – INTERAÇÃO DO canabidiol (CBD) COM A TOPOISOMERASE II $\alpha$ humana (TOPOII $\alpha$ )

Estudos indicam que os ligantes quinonas, HU-331, CBD e, estruturas análogas e derivadas devem se ligar na mesma região da TOPOII $\alpha$  (Figura 14). Duas regiões foram propostas para a ligação, próximo ao DNA-*gate* ou da subunidade catalítica (ATPase). Os resíduos de cisteína 170, 392 e 405, principalmente os dois últimos, foram apontados por estudos de mutagênese como essenciais para afinidade da quinona e importantes para interação do HU-331 (WILSON *et al.*, 2018).

**Figura 14 - Estrutura tridimensional da topoisomerase II  $\alpha$  humana (TOPOII $\alpha$ )**



Fonte: Adaptado de Wilson, (2018). Estrutura tridimensional do dímero topoisomerase II  $\alpha$  Humana (TOPOII $\alpha$ ) com destaque para os resíduos de cisteínas importantes para interação da quinona, HU-331 e, possivelmente CBD.



Pela similaridade estrutural entre o CBD e HU-331, conseguinte, é possível que a interação do CBD também seja afetada caso estes resíduos sejam substituídos ou sofram impedimentos estéricos. Isso logicamente não significa que estas substâncias interajam diretamente com as cisteínas (C170, 392 e 405), mas que elas modulam o sítio de interação por estarem dentro do sítio ou em local próximo (WILSON *et al.*, 2018).

#### 5.4.1 Seleção da estrutura tridimensional molde

A princípio foram identificadas e avaliadas cinco estruturas tridimensionais de TOPOII $\alpha$  provenientes do *Protein Data Bank* (PDB), como mostra a (Tabela 2).

**Tabela 2 - Estruturas TOPOII $\alpha$  depositadas no PDB**

Código do PDB	Resolução (Å)	Quantidade de aminoácidos
5GWK	3,15	1600
4R1F	2,5	1600
4FM9	2,9	793
1ZXM	1,87	800
1ZXN	2,51	1600

Fonte: Elaborada pelo autor

Todas as sequências dessas estruturas descritas foram avaliadas utilizando o *software Molegro Virtual Docker* (MVD) 5.5, a fim de identificar os resíduos de cisteínas, se certificar de que se tratam da representação do domínio catalítico e verificar a integridade da estrutura da ATPase.

As sequências das estruturas provenientes do PDB foram alinhadas com a sequência primária da TOPOII $\alpha$  obtida no servidor *Uniprot* (código P11388),

(Quadro 1). Em vermelho negrito estão as cisteínas nas posições 170, 392 e 405. O texto realçado em itálico representa o *gate*-DNA, enquanto os resíduos sublinhados a subunidade catalítica, responsável pelo sítio de ligação dos ligantes avaliados.

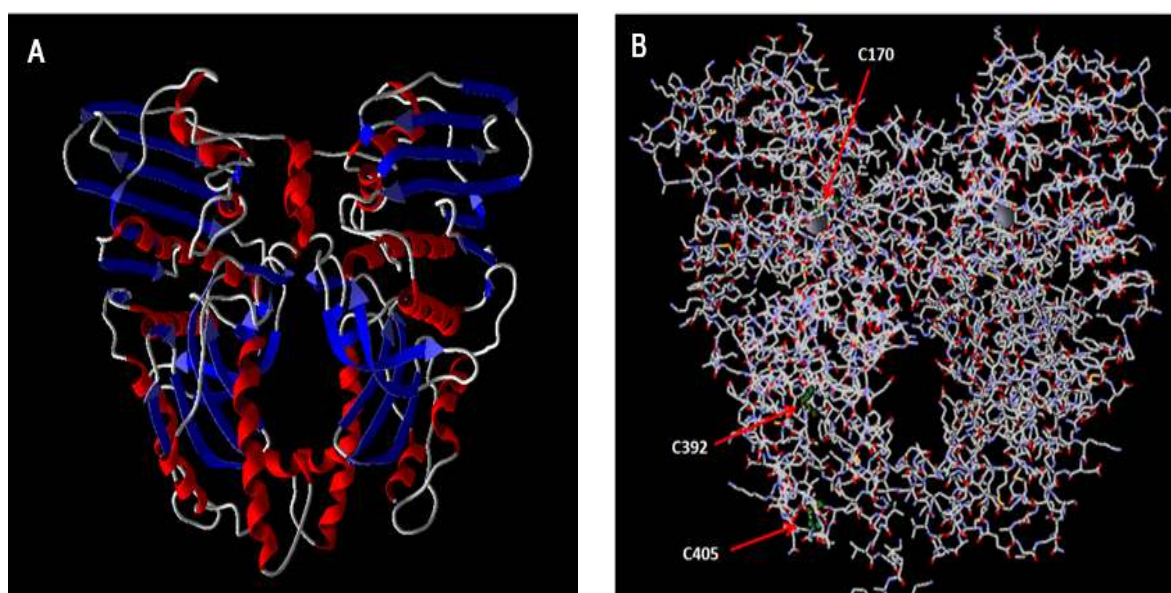
**Quadro 1 - Subunidades catalítica e *gate*-DNA da sequência primária da TOPOII $\alpha$ h.**

MEVSPLQPVNENMQVNKIKKNEDAKKRLSVERIYQKKTQLEHILLRPDTYIGSVELVTQQMW  
VYDEDVGINYREVTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRDPKMSCIRVTIDPENNLISIWNNKGKIP  
VVEHKVEKMYVPALIFGQLTSSNYDDDEKKVTGGRNGYGAKL **C**NIFSTKFTVETASREYKKM  
FKQTWMDNMGRAGEMELKPFNGEDYTCITFQPDLSKFKMQSLDKDIVALMVERRAYDIAGS  
TKDVKVFLNGNKL PVKGRSYVDMYLKDKLDETGNSLKVIEHQVNRWEVCLTMSEKGFQQ  
ISFVNSIATSKGGRHVDYVADQIVTKLVDVVKKKNKGGVAVKAHQVKNHMWIFVNALIENPT  
FDSQTKENMTLQPKSFGST **C**QLSEKFIKAAIG **C**GIVESILNWVKFKAQVQLNKKCSAVKHNRK  
GIPKLDANDAGGRNSTECLILTEGDSAKTLAVSGLGVVGRDKYGVFPLRGKILNVREASHK  
QIMENAEINNIKIVGLQYKKNYEDEDSLKTLRYGKIMIMTDQDQDGSNIKGLLINFHHNWPS  
LLRHRFLEEFITPIVKVSKNKQEMAFYSLPEFEEWKSSTPNHKKWKVKYKGLGTSTSKEAKEYF  
ADMKRHRIQFKYSGPEDDAAISLAFSKQIDDRKEWLTNFMEDRRQRKLLGLPEDYLYGQTTT  
YLTYNDFINKELILFSNSDERSIPSMVDGLKPGQRKVLFTCFKRNDKREVKVAQLAGSVAEMS  
SYHHGEMSLMMTIINLAQNFVGSNNLNLQPIGQFTRLHGGKDSASPRYIFTMLSSLARLLF  
PPKDDHTLKFLYDDNQRVEPEWYIIPMVLINGAEGIGTGWSKIPNFDVREIVNNIRRLMD  
GEEPLPMLPSYKNFKGTIEELAPNQYVISGEVAILNSTTIEISELPVRTWTQTYKEQVLEPMLNG  
TEKTPPLITDYREYHTD TTVKFVVKMTEEKLAEAERVGLHKVFKLQTSLTCNSMVLFDHVGCLK  
KYD TVLDILRDF FELRLKYYGLRKEWLLGMLGAESAKLNNQARFILEKIDGKIIENPKKELIKVL  
IQRGYSDP VKAWKEAQKVPDEEENEESDNEKETEKSDSVTDSGPTFNYLLDMPLWYLTK  
KKDELCLRNEKEQELDTLKRKPSDLWKEDLATFIEELEAVEAKEKQDEQVGLPGKGGKAKG  
KKTQMAEVLPSRGRVIPRITIEMKAEAEKKNKKIKNENTEGSPQEDGVELEGLKQRLEKK  
QKREPGTKTKKQTTLAFKPIKKGKRNPWSDSESDRSSDESDFVPPRETEPRRAATKTKFTM  
DLSDDED FSD FDEKTDDEDFVPSDASPPKTKTSPKLSNELKPKQSVVSDLEADDVKGSVPLSS  
SPPATHFPDETEITNPVPKKNVTVKKTAAKSQSSTTTGAKKRAAPKGTKRDPALNSGVSQKP  
DPAKTKNRRRKRKPSDSDSDSNFEKIVSKAVTSKSKGESDDFHMDFDSAVAPRAKSVRAKKP  
IKYLEESDEDDL

Fonte: Elaborada pelo autor. Sequência primária da TOPOII $\alpha$ h (Uniprot P11388) com destaque para C170, 392 e 405 (vermelho), *gate*-DNA (itálico) e subunidade catalítica (sublinhado).

Ao avaliar as sequências foi possível perceber que as estruturas 1ZXM, 1ZXN e 4R1F possuem o domínio ATPase, por outro lado, os complexos 4FM9 e 5GWK a parte do *gate*-DNA. Portanto, a seleção da estrutura molde ficou restrita entre as 3 primeiras (1ZXM, 1ZXN e 4R1F) e, decidiu-se por 1ZXM por apresentar melhor resolução entre as opções e possuir todos os resíduos de cisteínas avaliados (Figura 15).

**Figura 15 - Estrutura terciária do molde 1ZXM**



Fonte: Elaborada pelo autor. A - Representação da estrutura terciária da estrutura molde (1ZXM) e B - Representação das posições das cisteínas na proteína.

#### 5.4.2 Construção do modelo

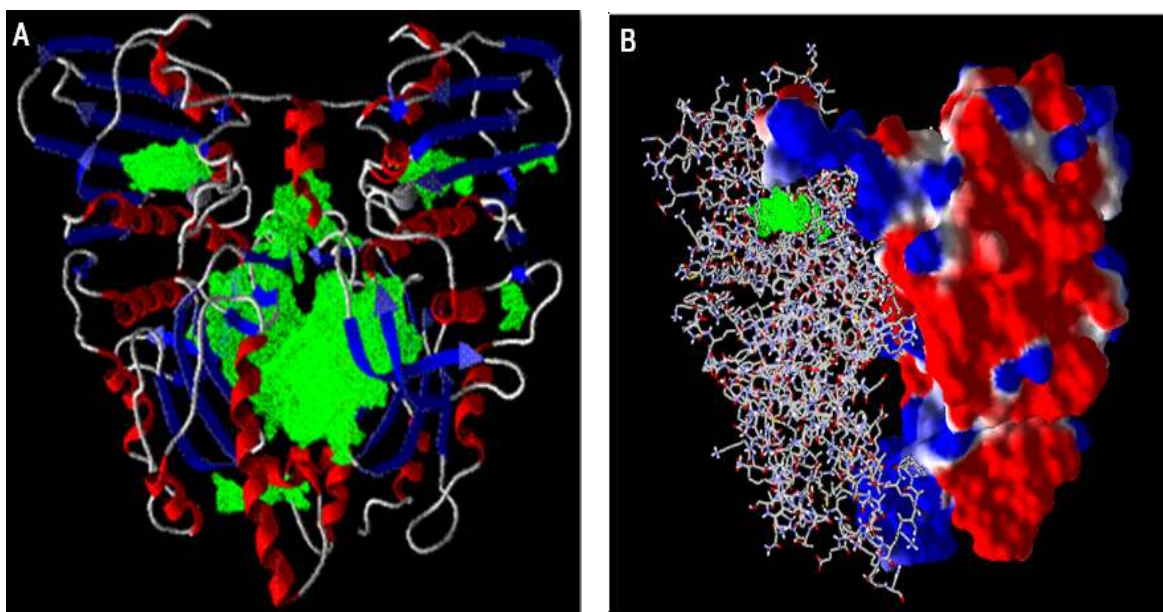
A estrutura da enzima foi analisada e preparada pelo *software* MVD, onde cargas dos resíduos da proteína e de superfície foram adicionadas e calculadas. Os *gaps* na estrutura foram construídos pelo servidor TASSER utilizando técnicas de *threading*. A estrutura final da subunidade catalítica é composta de um homodímero validado pelo gráfico de Ramachandran.

### 5.4.3 Estudo de *docking*

#### 5.4.3.1 Identificação das cavidades e possíveis sítios de ligação

Para identificar as cavidades na estrutura da TOPOLLah foi utilizado um átomo prova de 1.2 Å e um *cutoff* de tamanho mínimo da área da cavidade de 10 Å e máximo de 10.000 Å. Foram identificadas cavidades de tamanhos variados (Figura 16), sendo a maior delas localizada entre os dois monômeros e próximas as três cisteínas, principalmente 405 e 170. Quatro cavidades mereceram destaque e foram nomeadas devido a proximidade das cisteínas (CYS), tais como a cavidade 405 (C405), com 21,50 Å de área; cavidade 392 (C392), com volume de 2520 Å e a presença da CYS392 próximo a entrada; cavidade 170a e 170b, as quais possuíam volume de 180 Å e 39,93 Å, respectivamente, as quais se localizavam ao lado do resíduo CYS170.

**Figura 16 - Regiões da topoisomerase II  $\alpha$  Humana (TOPOLLah) identificadas pelo átomo prova**



As regiões destacadas em verde (A, e B) representam as cavidades identificadas pelo átomo prova. A superfície eletrostática da proteína é representada pelas cores vermelha (alta densidade eletrônica), azul (baixa densidade) e branca (resíduos apolares).

Para saber qual, dentre essas cavidades, representavam o real sítio de ligação do CBD e seus derivados oxidados realizou-se um estudo de *docking* em cada uma das quatro cavidades.

#### 5.4.3.2. Estudo de *docking* dos metabólitos oxidados em posições diferentes

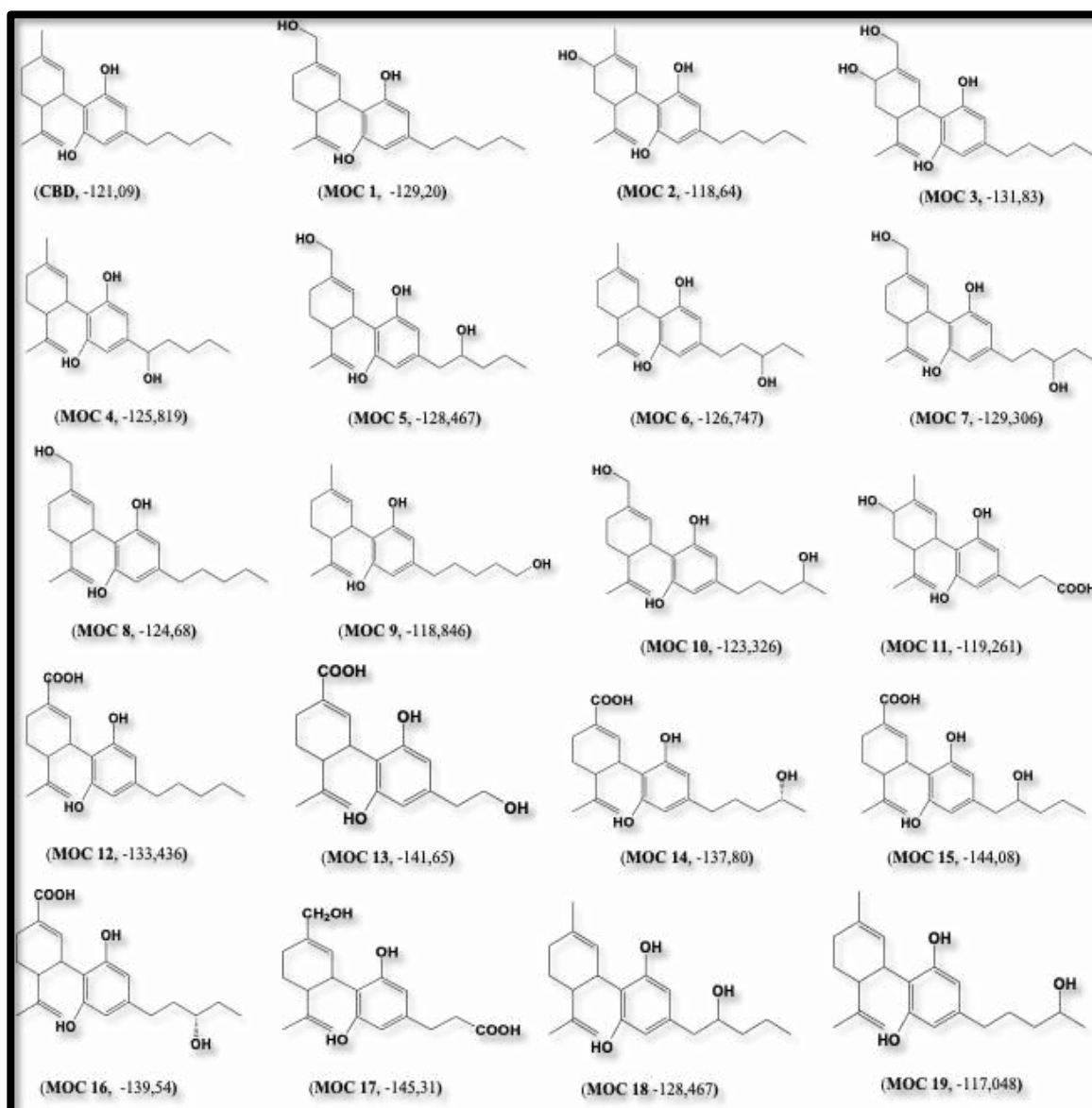
Inicialmente o *docking* foi realizado primeiramente com a molécula do CBD. Esta molécula foi construída no *software* Spartan®, onde teve sua estrutura otimizada por minimização de energia e adição de cargas atômicas e mapas superficiais pelo método semi-empírico AM1.

As quatro cavidades identificadas próximas as três cisteínas foram utilizadas como alvo para direcionar o *docking* (uma avaliada de cada vez) deixando um raio de 15 Å para verificar resíduos na vizinhança do sítio ativo.

Foi utilizado o *MolDock Score* [Grid] como *scoring function*, 20 corridas com população máxima de 100 e número máximo de interação de 3.000. Os resultados demonstraram que a cavidade C170a, localizada próximo aos resíduos de interação do ATP, apresentavam maior afinidade (representada pelo valor negativo das interações) pelo CBD quando comparada as demais, como por exemplo, -121,098 (C170a); -22,06 (C170b); -88,818 (C405); -78,74 (C392).

No entanto, como alguns estudos citavam que os metabólitos oxidados do CBD (Figura 17) eram os responsáveis pela inibição da TOPOII $\alpha$  foi necessário avaliá-los também em todas as cavidades previamente analisadas para o CBD. Utilizou-se ainda como base para este estudo, a hipótese de que a forma oxidada teria maior afinidade de interação. O metabolismo do CBD foi bem estabelecido e vários metabólitos foram identificados após oxidação enzimática (WILSON *et al.*, 2018).

**Figura 17 - Numeração usada para os metabólitos oxidados do canabidiol (MOC) estudados**



Fonte: Adaptado de Mechoulam; Hanus (2002).

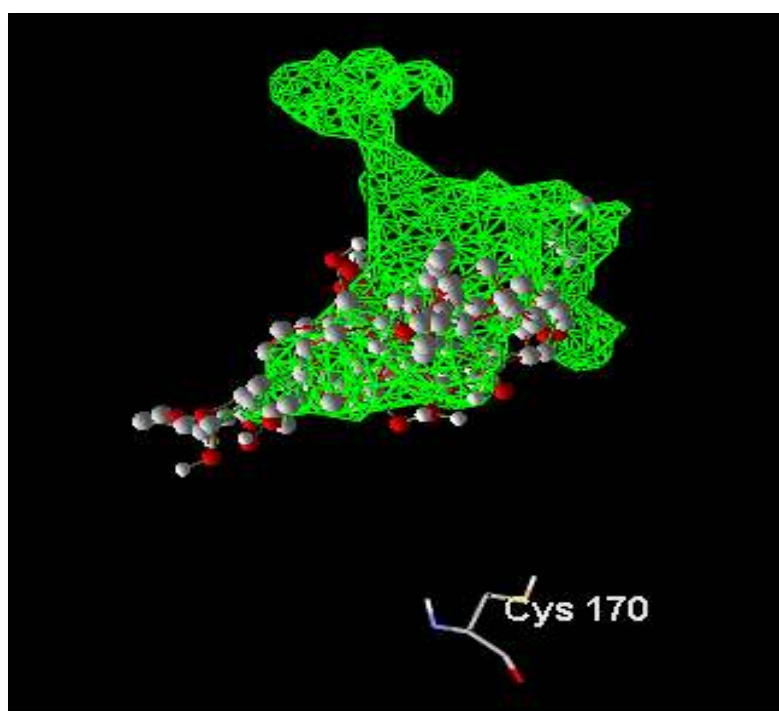
Os melhores resultados de energia de interação (quanto mais negativo, mais estável a interação no sítio) para todos os metabólitos continuaram sendo na cavidade C170a, assim como ocorreu com o CBD. Portanto, os indícios apontaram para este local como o provável sítio de interação.

Os metabólitos que apresentaram melhor energia de interação foram: MOC17 (-145,31), MOC15 (-144,08), MOC13 (-141,65); MOC16 (-139,54).

Entretanto, todos apresentaram boa afinidade de interação com mínimo de -118,54 do metabólito 5-OH-CBD.

Ao observar o modelo de interação das moléculas ficou evidente que todas se ligaram na posição da cavidade, próximos a C170, sem impedimento estéricos e com boa interação com os resíduos do sítio (Figura 18).

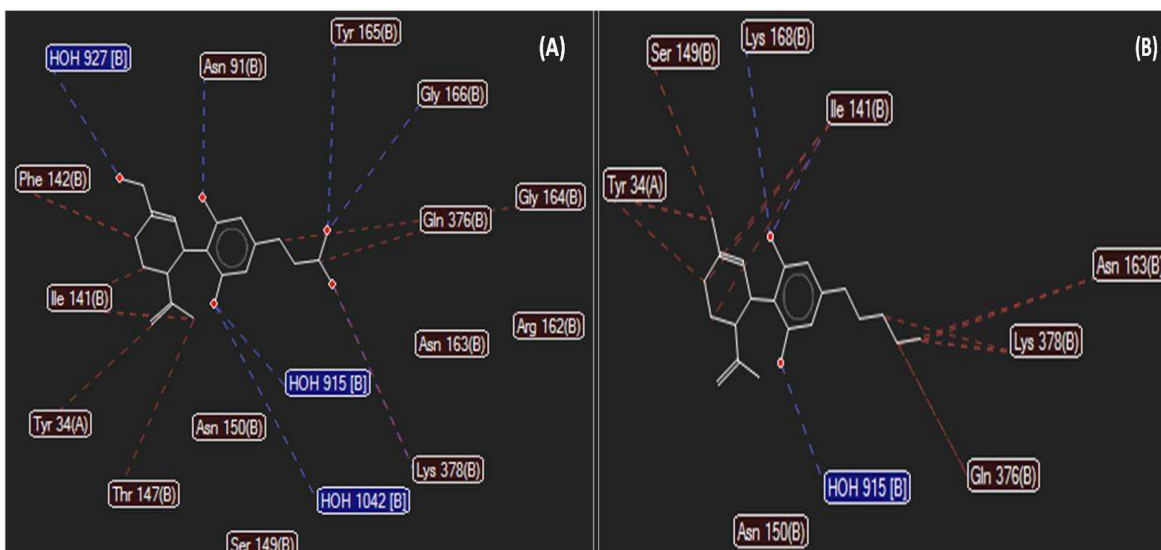
**Figura 18 – Canabidiol (CBD) e seus metabólitos oxidados dentro da cavidade C170a da topoisomerase II  $\alpha$  Humana (TOP2II $\alpha$ )**



Fonte: Elaborada pelo autor. Cavidade com maior interação (170a) do CBD e de seus metabólitos oxidados.

No entanto, o modo de ligação do MOC 17 quando comparado ao CBD (Figura 19), demonstrou muito mais pontos de interação devido a presença da hidroxila ligado a metila no hexeno e do grupo carboxi na extensão da cadeia lateral, antes apenas carbônica. Portanto, esse metabólito se estabilizou melhor dentro do sítio, o que reflete nos valores de energia mais negativos.

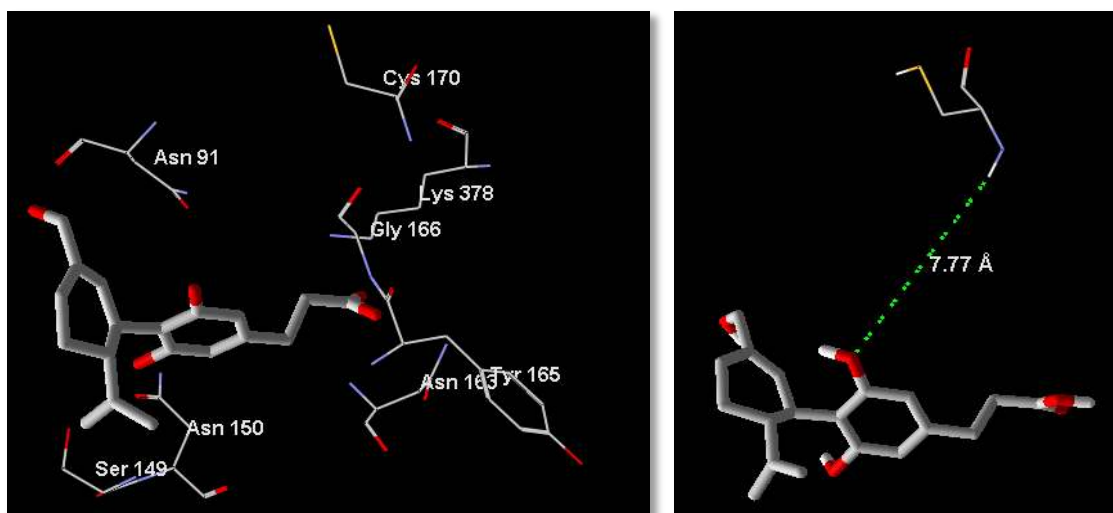
**Figura 19 - Mapa de interação do MOC 17 (A) e do CBD (B) com a cavidade C170a da topoisomerase II  $\alpha$  Humana (TOPOIIah)**



Fonte: Elaborada pelo autor. A - Mapa de interação do metabólito MOC 17 e (B) do canabidiol (CBD) com a cavidade C170a da TOPOIIah, respectivamente. Os resíduos de aminoácidos estão representados pelos seus números na sequência primária do alvo biológico.

Ao observar a interação do metabólito dentro do sítio e a distância para a cisteína (Figura 20) foi possível compreender que esse resíduo se encontra bloqueado pelo metabólito, o qual se estabilizou cercado de resíduos polares (lisina, asparagina, serina, tirosina, dentre outros).

**Figura 20 - Sítio de ligação do MOC 17 e distância para C170**



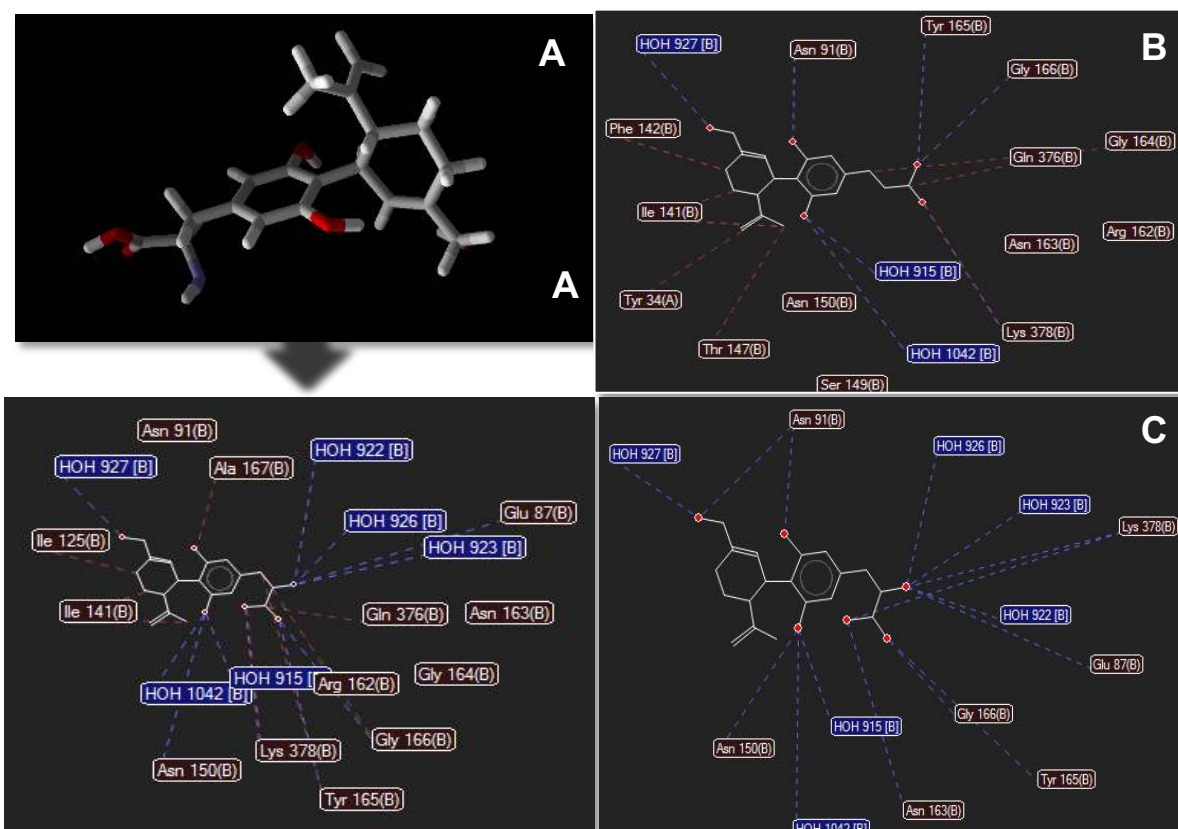
Fonte: Elaborada pelo autor. Sítio de ligação do MOC 17 e distância para C170.



Ao analisar os resíduos de interação com CBD e do MOC 17 (Figura 17) observou-se que a oxidação da cadeia lateral aumentou as interações dentro do sítio de ligação, por conseguinte, a energia de interação se tornou melhor. A partir dessa observação novos ligantes foram propostos com inserção de pequenos grupos hidrofílicos ( $\text{NH}_2$  e  $\text{OH}$ ), além da introdução de uma restrição conformacional e homologação junto ao anel hexeno.

Com essas modificações os novos análogos propostos tiveram uma melhora da energia de interação quando comparados aos MOC 17 (Figura 21 B). A melhor molécula foi a com substituição de grupo 2-amino (Figura 21 A) na cadeia lateral (-156,61), seguida da 2-OH na mesma posição (-149,02,) (Figura 21 C). Observou-se o maior número de interação do análogo 2-amino com águas estruturais e a atração do glutamato 87.

**Figura 21 – Análogos planejados do canabidiol (CBD) e seu metabólito de maior interação no sítio C170a da topoisomerase II  $\alpha$  Humana (TOPOIIah)**



Fonte: Elaborada pelo autor. A - Análogo de CBD planejado que apresentou melhor interação com o sítio C170a da TOPOIIah; B - interação do MOC 17 com os resíduos da cavidade C170a; C - Interação do segundo análogo de melhor interação, o 2-OH substituído.

A relação estrutura atividade dos análogos demonstram que a substituição de grupos polares que fazem ligação de hidrogênio na posição 2-OH da cadeia lateral alifática é importante para interação com uma porção com alta densidade eletrônica dentro do sítio, composto por aminoácidos como glutamato, lisina, tirosina, asparagina e sustentada pela cisteína 170, a qual pode coordenar a movimentação dessa cavidade.

Com o estudo *in silico* foi possível concluir que alguns metabólitos oxidados e o próprio CBD realmente apresentaram afinidade pelo sítio da TOPOII $\alpha$ , o que pode acarretar danos ao DNA induzidos pela inibição da enzima. O estudo *in silico* da relação estrutura atividade e *docking* dos metabólitos permitiu o desenvolvimento de novos análogos com melhor energia interação pela topoisomerase humana comparada ao CBD e seus metabólitos, portanto, sendo um importante análogo com potencial atividade antitumoral.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo, ao analisar *in vitro* e *in vivo* o EOC foi possível concluir que seu uso como fitoterápico pode ser promissor, pois demonstrou experimentalmente, ausência de citotoxicidade e genotoxicidade.

Foi proposto ainda neste estudo, o desenvolvimento de novos análogos canabidióis, com melhor energia interação pela topoisomerase II  $\alpha$  humana, que poderão ser uma alternativa promissora para a terapêutica antitumoral.

No entanto, muito ainda há para se entender sobre o mecanismo de ação dos canabinóides portanto, o desenvolvimento de novas investigações científicas sobre o tema fazem-se necessárias para fornecer maiores informações sobre o uso seguro destes produtos.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2 ed. Brasília, DF. 2013.
- ARAÚJO, N. D. *et al.*, A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. *Estudos Biológicos*, v. 30, p. 143-148, 2008. Doi: <http://dx.doi.org/10.7213/reb.v30i70/72.22819>
- AZQUETA, A. *et al.*, Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. **Frontiers in genetics**, v. 5, p.1-8, 2014. Doi:[org/10.3389/fgene.2014.00288](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00288)
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of toxicology**, v. 87, p. 949-968, 2013. doi: 10.1007/s00204-013-1070-0.
- BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 121, p. 569-81, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1111/apm.12033>
- BLÜMCKE, I. *et al.* International recommendation for a comprehensive neuropathologic workup of epilepsy surgery brain tissue: a consensus Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. **Epilepsia**, v. 57, p. 348-358, 2016. Doi: 10.1111 / epi.13319
- BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Biological Crystallography**. v. 58, p. 899-907, 2002. Doi: <https://doi.org/10.1107/S0907444902003451>
- BERNSTEIN, F. C. *et al.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, p. 535-542, 1977. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11885.x>.
- BRENDLER-SCHWAAB, S. *et al.* The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-54, 2005. Doi:<https://doi.org/10.1093/mutage/gei033>
- BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L.V.; MIOT, H.A. Development and validation of a quantitative image analysis method to evaluate comet assay (silver staining). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 325-334, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442009000400010>
- BRITCH, S.C. *et al.* Cannabidiol- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol interactions on acute pain and locomotor activity. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 175, p. 187-197, 2017. Doi:10.1016/j.drugalcdep.2017.01.046

CARDINALE, F.; BRUZZI, P.; BOLOGNESI, C. Role of micronucleus test in predicting breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 106, p. 780-90, 2012. Doi:10.1038/bjc.2011.567

CILIO, M. R.; THIELE, E.; DEVINSKY, O. The case for assessing cannabidiol in epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, p. 787-790, 2014. Doi: 10.1111 / epi.12635

CRIPPA, J. A.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. Uso terapêutico dos canabinoides em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, p. 56-65, 2010. Doi: 10.1590/S1516-44462010000500009

COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-51, 2008. Doi: 10.1093/mutage/gem051

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **Resolução nº 2.113 de 2014.** O uso compassivo do cannabidiol para o tratamento de epilepsias da criança e do adolescente refratárias aos tratamentos convencionais. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil. Brasília, DF. 2014.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 1994.

COSTA, L. *et al.* Cannabinoid-induced autophagy: protective or death role? **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 122, p. 54-63, 2016. Doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.12.006

DAVIDSON, C. *et al.* Spicing up pharmacology: a review of synthetic cannabinoids from structure to adverse events. **Advances in Pharmacology**, v. 80, p. 135-168, 2017. Doi: 10.1016/bs.apha.2017.05.001.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival-modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986. Doi: 10.1016 / 0022-1759 (86) 90368-6

DEVINSKY, O. *et al.* Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open. **The Lancet Neurology**, v.15, p. 270-278, 2016. Doi: 10.1016/S1474-4422(15)00379-8

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 771-784, 2004. Doi: 10.1038/nrd1495

DZIWENKA, M. *et al.* Safety Assessment of a Hemp Extract using Genotoxicity and Oral Repeat- T Dose Toxicity Studies in Sprague-Dawley Rats. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 376-385, 2020. Doi: 10.1016 / j.toxrep.2020.02.014

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000. Doi: 10.1016/S0027-5107(00)00065-8

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125-32, 2011. Doi:10.1093/mutage/geq052

FONSECA, B. M. *et al.* O Sistema Endocanabinóide: uma perspectiva terapêutica. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 2, p. 97-104, 2013. ISSN: 2182-3340

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, p. 337-340, 2008. ISSN 1983-1870

FRANCO, G.R.R.; VIEGAS JÚNIOR, C. A Contribuição de estudos do canabidiol e análogos sintéticos no desenho de novos candidatos a fármacos contra transtornos neuropsiquiátricos e doenças neurodegenerativas. **Revista Virtual Química**, v. 9, p.1773-1798, 2017. ISSN 1984-6835

FREITAS, F. de S. C. **O potencial uso terapêutico da Cannabis e seus componentes ativos**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Graduação em Medicina do Centro de Ciências Biológicas da Saúde. Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2018.

GALDINO, A.G.S. *et al.* Análise de ensaios *in vitro* do compósito de 50% HA-50% TiO<sub>2</sub> fabricados pelo método da esponja polimérica. **Cerâmica**, v. 60, p. 586-593, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0366-69132014000400019>

HAYASHI, M. *et al.* Compilation and use of genetic toxicity historical control data. **Mutation Research**, v. 723, p. 87-90, 2011. Doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007

HENG, H. H. *et al.* Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to cancer evolution. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 32, p. 325-340, 2013. Doi: 10.1007 / s10555-013-9427-7

HANUS, L. MECHOULAM, R. Cannabinoid chemistry: an overview. **Cannabinoids as therapeutics**, p. 23-46, 2005. Doi:10.1007/3-7643-7358-X\_2

HOLLAND, N. *et al.* The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation research**, v. 659, p. 93-108, 2008. Doi: 10.1016 / j.mrrev.2008.03.007

HONORIO, K. M. *et al.* Artificial Neural Networks and the Study of the Psychoactivity of cannabinoid compounds. **Chemical Biology & Drug Design**, v.75, p. 632-640, 2010. Doi: 10.1111/j.1747-0285.2010.00966.x

HONÓRIO K. M, ARROIO A, FERREIRA DA SILVA, A. B. Aspectos terapêuticos de compostos da planta Cannabis sativa. **Química Nova**, v. 29, p. 318-325, 2006. Doi: 10.1590/S0100-40422006000200024

HORNBERG, J. J. *et al.* Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 1131-1136, 2014. Doi: 10.1016 / j.drudis.2013.12.008

IZZO A. A. *et al.* Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, p. 515-527, 2009. Doi:10.1016/j.tips.2009.07.006

KANG, S. H. *et al.* Recent advances in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p. 277-288, 2013. Doi: 10.15430 / JCP.2013.18.4.277

KISSLING, G. E. *et al.* Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability. **Mutation Research**, v. 634, p. 235-240, 2007. Doi: 10.1016 / j.mrgentox.2007.07.010

KOGAN, N. *et al.* A Cannabinoid anticancer quinone, HU-331, is more potent and less cardiotoxic than doxorubicin: a comparative in vivo study. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.322, p. 646-653, 2007. Doi: 10.1124 / jpet.107.120865

KUMARAVEL, T. S. V. *et al.* Comet assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 53-64, 2009. Doi: 10.1007 / s10565-007-9043-9

KNUPP, K.G. *et al.* Prospective evaluation of oral cannabis extracts in children with epilepsy. **Seizure**, v. 72, p. 23-27, 2019. Doi: 10.1016/j.seizure.2019.09.007

KRAMER, J. Medical marijuana for cancer. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, 2, p. 109-122, 2015. Doi:10.3322/caac.21260

LONGO, D. L.; FRIEDMAN, D.; DEVINSKY, O. Cannabinoids in the treatment of epilepsy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1048-1058, 2015. Doi: 10.1056 / NEJMra1407304

LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, p. 171-82, 2008. Doi: 10.1093/mutage/gen015

LUCIO, L. M. C. *et al.* Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 68, p.33-41, 2018. Doi:10.1016/j.bjan.2017.05.001

LUKHELE, S. T.; MOTADI, L. R. Cannabidiol rather than *Cannabis sativa* extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. **BMC Complement Alternative Medicine**, v. 16, p. 1-16, 2016. Doi: 10.1186 / s12906-016-1280-0

MACEDO, K. G.; DE MELO FILHO, C. C.; ANDRADE, C. H. **Avaliação *in silico*** da toxicidade de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, p. 1, 2013.

MAHAVORASIRIKUL, W. *et al.* Cytotoxic activity of thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. **BMC Complement Altern Med**, v.10, p. 55, 2010. Doi: 10.1186 / 1472-6882-10-55

MALCHER-LOPES, R. Canabinoides ajudam a desvendar aspectos etiológicos em comum e trazem esperança para o tratamento de autismo e epilepsia. **Revista da Biologia**, v. 13, p. 43-59, 2014. Doi: 10.7594/revbio.13.01.07

MARSHALL, N. J.; GOODWIN, C. J.; HOLT, S. J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. **Growth Regulation**, v. 5, p. 69-84, 1995.

MARTINS, A. C. *et al.* Estudo *in silico* de potenciais compostos anticâncer derivados de biflorina. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 37., Natal, RN, 2014. **Anais [...]** Natal, RN: SBQ, 2014. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/37ra/cdrom/resumos/T0243-1.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2020.

MATOS, R. L. A. *et al.* O Uso do canabidiol no tratamento da epilepsia. **Revista Virtual Química**, v. 9, p. 786-814, 2017. Doi: 10.21577/1984-6835.20170049

MECHOULAM, R.; HANUS, L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. **Chemistry and physics of lipids**, v.121, p.35-43, 2002. Doi: 10.1016/S0009-3084(02)00144-5

MENDES, C. F. *et al.* Micronúcleos em células do colo uterino em mulheres HIV+ segundo sua condição de imunidade. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, p. 9-305, 2011. Doi: 10.1590/S0100-72032011001000006

MENCK, C. F. M.; SLUYS, M. V. **Genética molecular básica: dos genes aos genomas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MINNS, Alicia. Synthetic cannabinoids. **CPCS**, California, 1º, July. 2013. Disponível em: <https://calpoison.org/news/synthetic-cannabinoids>, 2013. Acesso em: 25 fev. 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8. ed. Washington. DC: National Academy Press, 2011.

NIAZ, K. *et al.* Endocannabinoids system and the toxicity of cannabinoids with a biotechnological approach. **Excli Journal**, v.16, p. 688-711, 2017. Doi: 10.17179 / excli2017-257

NIKAN, M.; NABAVI, A.; M. MANAYI, A. Ligands for cannabinoid receptors, promising anticancer agents. **Life Sciences**, v.146, p. 124-130, 2016. Doi: 10.1016 / j.lfs.2015.12.053

NITISS, J. L. Targeting DNA Topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 338-350, 2009. Doi:10.1038/nrc2607

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (2016), Test No. 489: **In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, Doi:10.1787/9789264264885-en.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (2017), **Overview on genetic toxicology TGs**, OECD Series on Testing and Assessment, No. 238, OECD Publishing, Paris, Doi: 10.1787/9789264274761-en.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (2016), Test No. 474: **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, Doi:10.1787/9789264264762-en.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (2020), Test No. 491: **Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, Doi: 10.1787/9789264242432-en.

OBSERVATÓRIO EUROPEU DA DROGA E DA TOXICODPENDÊNCIA. **Canabinóides sintéticos na Europa (Perspectivas sobre drogas, 2017)**. Disponível em: <https://www.emcdda.europa.eu/publications/pods/synthetic-cannabinoids-en>. Acesso em: 07 jun. 2020.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Avaliação da toxicidade do óleo de *Cocos nucifera L.* frente a *Artemia salina Leach.* de uma amostra natural e outra industrializada na cidade de Sousa-PB. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 1, p. 291-304, 2014.

PAMPLONA, F.A. Quais são e pra que servem os medicamentos à base de *Cannabis*? **Revista da Biologia**, v.13, p. 28-35, 2014. Doi:10.7594/revbio.13.01.05

PAMPLONA, F. A, TAKAHASHI, R. N. Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, p. 7-22, 2012. Doi: 10.1177 / 0269881111405357

PAVANELLO, S.; LOTTI, M. Biological monitoring of carcinogens: current status and perspectives. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 535-41, 2012. Doi:10.1007/s00204-011-0793-z

PISANTINI, S. *et al.* Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & therapeutics**, v.175, p.1-18, 2017. Doi: 10.1016 / j.pharmthera.2017.02.041



PEREIRA, M. S. **Estudo *in silico* da proteína ALKB e prospecção de bactérias alcanotróficas em solos da bacia petrolífera potiguar.** 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Programa de Pós-graduação em Genética e biologia molécula, Universidade Federal do Rio grande do Norte, Natal, 2007.

PEREIRA, A. P. L. **Em Maconha (Coletânea de Trabalhos Brasileiros). Cap. 5. Ministério da Saúde.** Serviço Nacional de Educação Sanitária: Brasília, 1958. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/maconha\\_coletania\\_trabalhos\\_brasileiros\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/maconha_coletania_trabalhos_brasileiros_2ed.pdf). Acesso em: 29 de ago. 2020.

PINTO, A.C.V. ***Cannabis sativa* L. e as suas aplicações em oncologia – Que futuro?** Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/47266>. Acesso em: 25 fev. 2020.

RAMLUGON, S. LEVENDAL, R. FROST, C. Time-dependent effect of phytocannabinoid treatments in fat cells. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 1080-1089, 2018. Doi: 10.1002 / ptr.6047

REDDY, D. S. The utility of cannabidiol in the treatment of refractory epilepsy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 101, p. 182-184, 2017. Doi: 10.1002/cpt.441

REGAL, K.; MERCER, S.; DEWEESE, J. HU-331 is a catalytic inhibitor of topoisomerase II. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 2044-2051, 2014. Doi: 10.1021/tx500245m

RIBEIRO, J. A.C. **A *Cannabis* e suas aplicações terapêuticas.** 2014. 51 f. Dissertação (Mestrado em ciência farmacêutica) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

RISS, *et al.* Cell Viability Assays. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, *et al.*, eds. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the **National Center for Advancing Translational Sciences**; May 1, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23805433/>. Acesso em: 29 de ago. 2020.

ROMANO, B. *et al.* Inhibition of colon carcinogenesis by a standardized Cannabis sativa extract with high content of cannabidiol. **Phytomedicine**, v. 21, p. 631-639, 2014. Doi: 10.1016 / j.phymed.2013.11.006

RUSSO, C. *et al.* Low doses of widely consumed cannabinoids (cannabidiol and cannabidivarin) cause DNA damage and chromosomal aberrations in human-derived cells. **Arch Toxicol**, v. 93, p.179-188, 2019. Doi: 10.1007 / s00204-018-2322-9

- RUSSO, E.; HOHMANN, A. Role of Cannabinoids in Pain Management. **Researchgate**, v. 1, p. 181-197, 2013. Doi: 10.1007/978-1-4614-1560-2\_18
- SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 49-57, 2009. Doi:10.5935/1984-6835.20090007
- SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and Its Applications. **Diagnostic Cytopathology**, v. 40, p. 84-90, 2012. Doi: 10.1002/dc.21592
- SARIGIANNIS, D. A.; HANSEN, U. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals - a challenge for policy makers. **Environmental health: a global access science source**, v. 11, p. 18, 2012. Doi: 10.1186 / 1476-069X-11-S1-S18
- SARFARAZ, S. *et al.* Canabinóides para tratamento do câncer: progresso e promessa. **American Association for Cancer**, v. 68, p.339-344, 2008. Doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-04-3410
- SHARMA, M. *et al.* Atividade anticancerígena in vitro do canabidiol derivado de plantas na linha celular de câncer de próstata. **Pharmacol Pharm**, v. 5, p. 806-820, 2014. Doi:10.4236/pp.2014.58091
- SINGH, N. P. *et al.* Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988. Doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- STAMBOULI, H. *et al.* Cultivation of *Cannabis sativa* L. in northern Morocco. **Bulletin on Narcotics**, v. 57, p. 79-118, 2005. PMID: 21338017
- STEINEMANN, D.; GÖHRING, G.; SCHLEGELBERGER, B. Genetic instability of modified stem cells - a first step towards malignant transformation? **American Journal of Stem Cells**, v. 2, p. 39-51, 2013. PMID: 23671815
- SUSPIRO, A; PRISTA, J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. **Toxicology Letters**, v. 207, p. 42-52, 2011. Doi:10.1016/j.toxlet.2011.08.022
- TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–21, 2000. DOI: 10.1002 / (sici) 1098-2280 (2000) 35: 3 <206 :: aid-em8> 3.0.co; 2-j
- TREAT, L. *et al.* Duração do uso de extrato de *cannabis* por via oral em uma coorte de pacientes pediátricos com epilepsia. **Epilepsia**, v. 58, p.123-127, 2017. Doi: 10.1111/epi.13617
- VALENTE, D. *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.42, p.1-21, 2017. Doi: 10.1590/2317-6369000124415.

VERRI, A. M.; MOURA A. DE A.; MOURA, V. M. DE. Citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista Uningá Review**, v. 30, p.55-61, 2017. Disponível em:<<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1997>>. Acesso em: 29 ago. 2020.

VIJG, J.; SUH, Y. Genome instability and aging. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 645-68, 2013. Doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183715

INSTITUTE OF BIOINFORMATICS AND PROTEIN INFORMATION RESOURCE. **Universal protein**. Disponível em: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). Acesso em: 13 de fev. 2020.

WILSON, J. T., FIEF, C. A., JACKSON, K. D. MERCER, S. L. DEWEESE, J. E. HU-331 and Oxidized Cannabidiol Act as Inhibitors of Human Topoisomerase II $\alpha$  and  $\beta$ . **Chemical Research in Toxicology**, v. 31, p.137-144, 2018. Doi: 10.1021 / acs.chemrestox.7b00302

YANG, F.*et al.* Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1845, p. 84-89, 2014. Doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.002

YANG, J. E.; YANG, Z. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p.174-181, 2015. Doi:10.1093/nar/gkv342

ZIMMERMAN A. M.; YESODA RAJ, A. Influence of cannabinoids on somatic cells *in vivo*. **Pharmacology**, v. 21, p. 277-287, 1980. Doi: 10.1159 / 000137442

ZIMMERMAN, S.; ZIMMERMAN, A. M. Genetic effects of marijuana. **The International Journal of the Addictions**, v. 25, p.19-33,1990. Doi:10.3109/10826089009067003

## **ANEXOS**

## ANEXO A – Protocolo de autorização para utilização de animais experimentais



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE EXTRATOS CONTENDO CANABIDIOL EM CAMUNDONGOS MUS MUSCULUS”. Protocolo número 08059/2018, sob responsabilidade de *Fabrcio Pires de Moura do Amaral*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11,794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6,899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
CAMUNDONGO HETEROGÊNICO	X	MACHO+FÊME A	6-10 SEMANAS	20- 25G	01 ANO	80

TERESINA, 09 DE AGOSTO DE 2018

*Antônio Luiz Martins Maia Filho*

MÉDICO VETERINÁRIO -CRMV 648

Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho

Coordenador CEUA-UESPI

port. 1347

ANEXO B – Artigo submetido à revista Phytochemistry

## **Cytotoxic and genotoxic properties of the organic extract of *Cannabis sp.* and *in silico* proposition of antitumor analogs of cannabidiol**

**Sávia da Mota Carneiro<sup>a,d</sup>, Dalton Dittz<sup>c</sup>, Aracelli de Sousa Leite<sup>d</sup>, Rômulo José Vieira<sup>a,b</sup>, Dannel Cabral Leão Ferreira<sup>b</sup>, Laryssa Roque da Silva<sup>b</sup>, Guilherme Barroso Langoni de Freitas<sup>c,\*</sup>, Fabrício Pires de Moura do Amaral<sup>a,b</sup>**

a Veterinary Department - State University of Ceará - [savia@ifpi.edu.br](mailto:savia@ifpi.edu.br)

b Department of Pharmacology CCS Facime - Piauí State University - [fabricao34amaral@gmail.com](mailto:fabricao34amaral@gmail.com)

b Department of Pharmacology and Physiotherapy CCS Facime - State University of Piauí - [rvieirasb@yahoo.com.br](mailto:rvieirasb@yahoo.com.br)

b Department of Pharmacology CCS Facime - Piauí State University - [danielclf@hotmail.com](mailto:danielclf@hotmail.com)

b Department of Pharmacology CCS Facime - Piauí State University - [laryssaroqueds@gmail.com](mailto:laryssaroqueds@gmail.com)

c Department of Pharmacology and Biochemistry - Federal University of Piauí - [daltondittz@gmail.com](mailto:daltondittz@gmail.com)

c Department of Pharmacology and Biochemistry - Federal University of Piauí - [prof.gbarroso@gmail.com](mailto:prof.gbarroso@gmail.com)

d Piauí Federal Institute of Education, Science and Technology - [aracellileite@ifpi.edu.br](mailto:aracellileite@ifpi.edu.br)

### **ABSTRACT**

Clinical studies have observed therapeutic efficacy with the use of organic extracts of *Cannabis sp.* (OEC), however, little is known about its toxicogenic effects. Recent research indicates that oxidized metabolites of cannabidiol (OMC) can inhibit topoisomerase-*alpha*, a mechanism that can lead to problems in DNA replication and cell death. The present study evaluated OEC by an *in vitro* cytotoxicity test in murine metastatic melanoma (B16F10) and normal fibroblast (L929) cells and by means of genotoxicity and mutagenicity *in vivo* tests in *Mus musculus* mice. In order to evaluate the interaction of cannabidiol (CBD) and its oxidized metabolites with human topoisomerase II *alpha* (hTOPO-II $\alpha$ ), an *in silico* study was carried out to understand the mode of binding and to propose new derivatives with binding affinity on hTOPO-II $\alpha$ . No significant results were found for cytotoxicity ( $p > 0.05$ ) in a cell viability test, at concentrations of 7.81; 15.62; 31.25; 62.5; 125; 250; 500 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ . The comet test did not detect damage to the DNA of peripheral blood cells exposed to OEC at those doses (2.5, 12.5 and 25 mg/kg). The micronucleus (MN) test, evaluated at the same concentrations, did not demonstrate a significant

mutagenic effect in mouse bone marrow cells. On the other hand, docking *in silico* studies have found greater interaction energy of OMCs compared to CBD. By applying studies of direct structure-activity relationship at the binding site, it was possible to propose derivatives with an even better interaction energy over hTOPO-II $\alpha$ . Finally, it is concluded that the OEC did not show significant cytotoxic and genotoxic activities, but it is possible that OMC inhibit the function of hTOPO-II $\alpha$ . Therefore, a new analogue has been proposed as a possible enzyme inhibitor with antitumor activity.

Keywords: Cytotoxicity. Genotoxicity. Molecular modeling.

## 1. Introduction

The therapeutic use of *Cannabis* and its derivatives for medicinal purposes has been practiced since antiquity and has been the subject of studies worldwide. Currently, it is used as an antiepileptic, anxiolytic, sedative, appetite modulator, antidepressant and with antitumor potential (Pinto, 2016; Freitas, 2018). However, there are still controversies and unanswered questions about these therapeutic applications, dosage and adverse effects, which hampers the medium-long-term analysis of clinical effects.

Medicinal versatility of *Cannabis* is related to the numerous secondary metabolites found in the plant. They have varied mechanisms of action and biological effects, both of which are not yet fully understood. As a result, interest in the class has rekindled in recent years. This resulted in many cannabinoid compounds under investigation, some in clinical trials, few commercially available for medicinal use and many extracts being used by hand, venturing into the longing of refractory patients for inefficient pharmacological protocols (Pamplona; Takahashi, 2012; Rea *et al.*, 2019).

In the last decade, research has turned to the antitumor potential of cannabinoids, due to their ability to induce autophagy, apoptosis, inhibition of the cell cycle, in addition to affecting angiogenesis and metastasis even if through still poorly elucidated molecular mechanisms. Thus, it is believed that such an anti-tumor effect is related to the interaction of cannabinoids with their receptors, as they are overexpressed in tumor cells, being associated with the most aggressive form of cancer (Sarfaraz, *et al.*, 2005; Pinto, 2016; Baram, 2019; Kisková *et al.*, 2019).

Therefore, recent studies indicate that OMC bind to the hTOPO-II $\alpha$  enzyme, an antitumor target, causing destabilization in DNA. The interaction between these oxidants with the N-terminal ATPase domain of the enzyme decreases their ability to bind with DNA, which consequently leads to cell apoptosis. However, there is no knowledge of the amino acid residues involved in this interaction and neither its mechanism of action (Wilson, 2018).

Thus, the present study aimed to evaluate the *in vitro* cytotoxic potential, *in vivo* genotoxic and mutagenic potentials, in addition to understanding the interaction of CBD with hTOPO-II $\alpha$  in order to plan cannabinoid analogues with antitumor potential.

## 2. Results and discussion

### 2.1 Cell viability

The results obtained with OEC demonstrated that there was no significant decrease in the viability of metastatic melanoma cells (B16F10), since the percentage of viable cells remained above 90% in all tested concentrations (Fig. 1B). On the other hand, the exposure of this cell line to doxorubicin showed a significant reduction ( $p < 0.0001$ ) of cell growth in a dose-dependent manner (Fig. 1A).

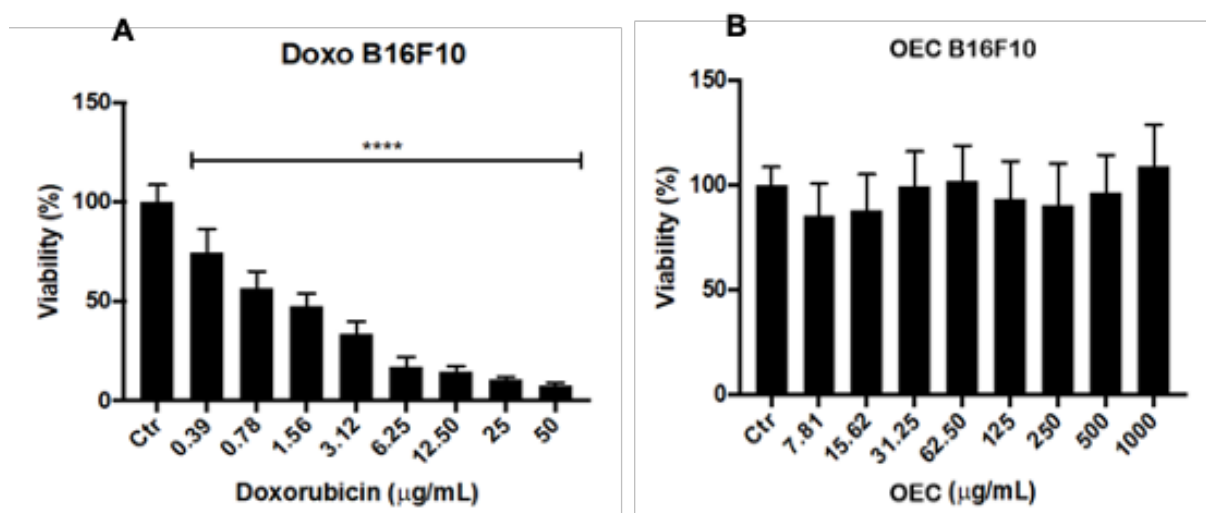


Fig. 1. Viability of metastatic murine melanoma cell line (B16F10) exposed to doxorubicin (A) and Organic Extract of Cannabis (B) for 72h.  $****$   $p < 0.0001$ , ANOVA, Dunnet posttest.

Previous studies (Zimmerman S.; Zimmerman A., 1990; Sarfaraz, *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014; Lukhele; Motadi, 2016) demonstrate that *C. sativa* extracts reduced the viability of tumor cells. Both *Cannabis* extracts (50, 100, 150  $\mu\text{g/mL}$ ) and CBD (0.8, 1.5 and 3.2  $\mu\text{g/mL}$ ) were cytotoxic against cervical cancer cell lines (SiHa, HeLa and ME-180), and the inhibition of cell growth observed was related to the concentration of CBD, which was effective in all tested cell lines. With regard to OEC, it is believed that the absence of cytotoxicity may possibly be related, due to low concentrations of CBD as well as cell line characteristics such as species, embryonic origin and malignance that differentiates it from that cells described by other authors.

The disagreements between the results of previous studies and those observed in our study may also be related to the type of protocol, cells and extract used. Therefore, further studies should be carried out to better understand the cytotoxicity of this OEC, possible mechanisms of action and quantitative characterization of the sample components.

Regarding the result obtained in normal fibroblast cells (L929) exposed to OEC, it was observed that it did not promote significant reduction ( $p < 0.0001$ ) of cell viability, as it remained close to or above 100%. On the other hand, doxorubicin



achieved a reduction in the % of cell viability at concentrations of 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 2).

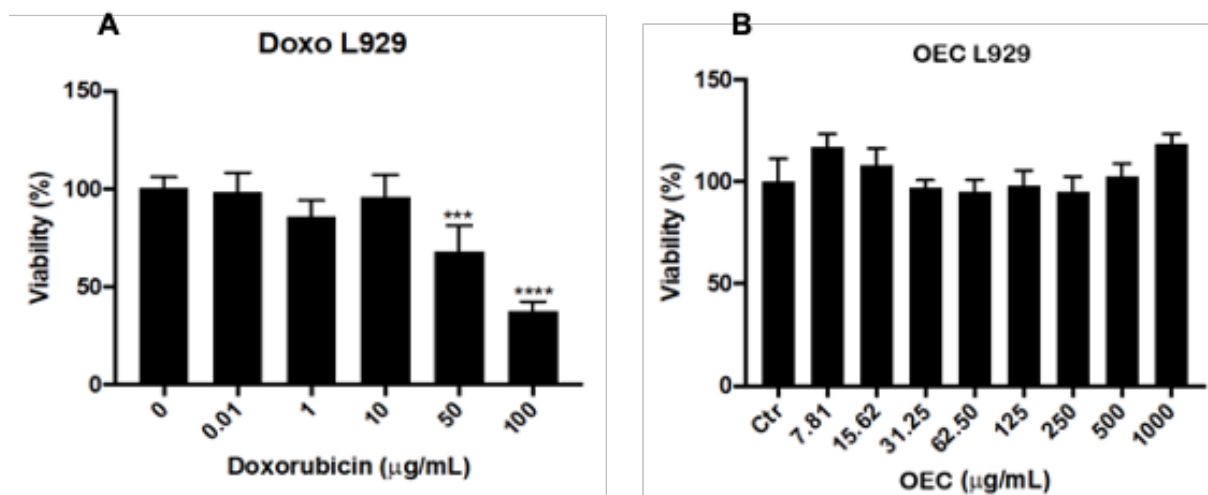


Fig. 2. Viability of normal fibroblast cell (L929) exposed to doxorubicin (A) and Organic Extract of Cannabis (B) for 72h. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ANOVA, Dunnet posttest.

Similar results regarding the normal cell line were obtained by Romano, *et al.* (2014) in a cell viability study with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), in which after investigating the effect of a standardized extract of *C. sativa* with a high content of CBD they did not observe cytotoxicity in normal murine fibroblast lineage. In our investigation, there was also no reduction in the viability of normal fibroblast cells, which may possibly be related to low levels of CBD present in the studied OEC.

Therefore, it was also observed that the OEC did not show cytotoxic activity even at the highest concentration (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) in that study. Thus, it is possible to affirm that the OEC used in this investigation is not promising as anti-tumor, in view of the low toxicity presented, possibly because it is a poor extract in CBD.

## 2.2 Comet test

The comet test assesses the percentage of DNA in the tail and the length of the tail of the comet to identify possible damage to the genetic material (Kumaravel, 2009). The evaluation of the tail of comet length showed that coconut oil (vehicle) showed a significant increase in this indicator ( $p < 0.05$ ) after 24h compared to the negative control (distilled water). However, the damage observed may be associated with the toxicity of the vehicle used in the production of the OEC. This finding is corroborated by previous evidence such as studies in microcrustacean larvae *Artemia salina* Leach, where concentrations below 120  $\mu\text{g/mL}$  were investigated. This effect is believed to be related to the presence of the medium and

long chain saturated fatty acid complex present in the composition of coconut oil (Oliveira *et al.*, 2014).

The groups treated with the OEC showed a significant difference for the 2.5 and 25 mg/kg ( $p < 0.0001$ ) and 12.5 mg/kg ( $p < 0.001$ ) doses in the first 4h of exposure when compared to the negative control, indicating acute genotoxic damage. This damage can be associated with the vehicle used to produce the OEC extract. It was also observed that the comparative analysis between the experimental groups in the first 4 and 24h after induction with the OEC showed absence of statistically significant repair in the concentrations 2.5 and 12.5 mg/kg; however, it shows repair in the 25 mg/kg dose (Fig. 3).

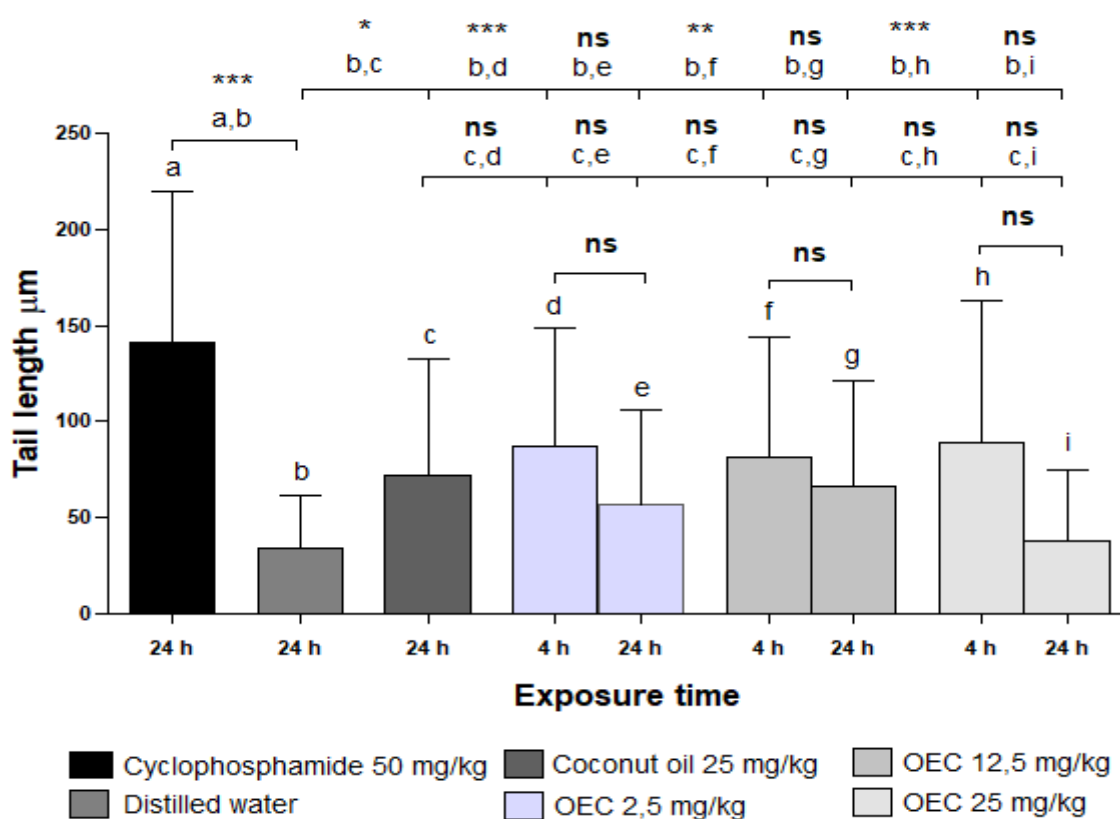


Fig. 3. Tail length of comet obtained through the comet assay in *M. musculus* mice treated with organic extract of *Cannabis* (OEC). The image shows mean  $\pm$  standard deviation. The values show the length of the tail of comet in mice peripheral blood cells and time of exposure to OEC during the first 4 and 24 hours. 50 nucleoids were analyzed per treatment in the OpenComet software. The letters a, b and c represent: PC (cyclophosphamide), NP (distilled water) and Vehicle (coconut oil), respectively. The letters d, e (4 and 24h, respectively) represent OEC at a concentration of 2.5 mg/kg; f, g (4 and 24h, respectively) represent OEC at 12.5 mg/kg and h, i (4 and 24h, respectively) represent OEC at 25 mg/kg. For statistical data, analysis of variance (ANOVA) with Tukey was used. Significance at \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$  and not significant (ns).

No results were found in the literature on the genotoxicity of OEC using the DNA tail length parameter for comparative purposes with this study. However, other genotoxic assessments have been carried out with *Cannabis* extracts. It is important to highlight the Ames test performed by Dziwenka *et al.* (2020) which showed non-mutagenicity of *Cannabis* extract for that study.

The percentage of DNA in the tail of comet is a more precise parameter for the determination of lesions to the material, since it covers a greater variety of damages and presents linear variation in relation to the frequency of DNA breaks (Collins *et al.*, 2008; Kumaravel, 2009).

In this study, it was found that the percentage of DNA migrated to the tail of comet in peripheral blood cells of mice treated with OEC was not significant in any of the tested doses, vehicle and NC during 4 and 24h after induction and, therefore, it did not characterize significant DNA damage (Fig. 4).

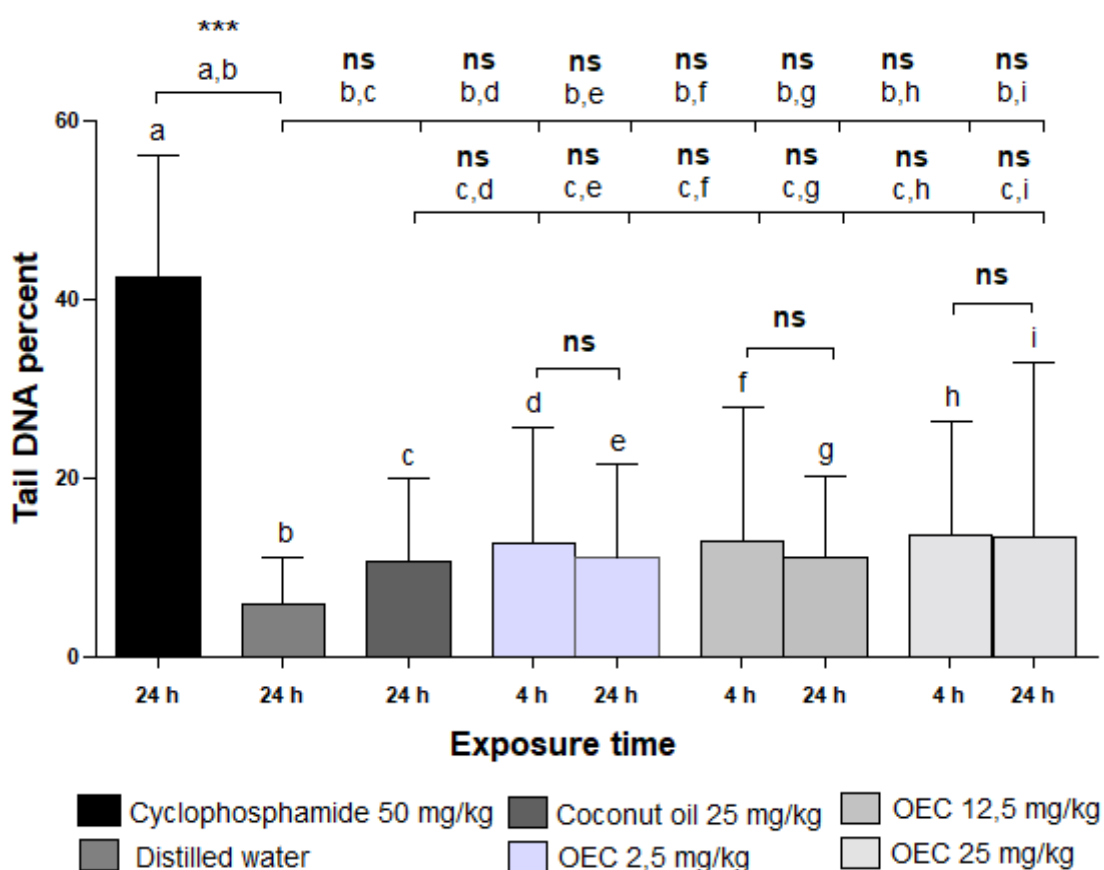


Fig. 4. Percentage of DNA in the tail of comet in *M. musculus* mice treated with organic extract of *Cannabis* (OEC). The image shows mean  $\pm$  standard deviation. The values show the percentage of DNA in the tail of comet in mice peripheral blood cells and time of exposure to OEC during the first 4 and 24 hours. The letters **a**, **b** and **c** represent: PC (cyclophosphamide), NC (distilled water) and Vehicle (coconut oil), respectively. The letters **d**, **e** (4 and 24h, respectively) represent OEC at a concentration of 2.5 mg/kg; **f**, **g** (4 and 24h, respectively) represent OEC at 12.5 mg/kg and **h**, **i** (4 and 24h, respectively) represent OEC at 25 mg/kg. 50 nucleoids were analyzed per treatment in the OpenComet software. For statistical data, analysis of variance (ANOVA) with Tukey was used. Significance at \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$  and not significant (ns).

The evaluation carried out between 4 and 24 h after exposure to OEC did not show a relevant decrease in the percentage of migrated DNA, indicating absence of repair in all experimental groups tested. However, none of the doses previously showed statistically significant damage for this parameter (Fig. 4).

In a comet assay study that used cells derived from human colon (Caco-2), Aviello *et al.* (2012) did not observe DNA damage in cells treated with 10  $\mu$ M of CBD

for 24 h, suggesting the absence of a genotoxic effect compared to hydrogen peroxide (PC). On the other hand, in a recent study also using a comet test, in this case using natural cannabinoids from *Cannabis*, CBD and cannabidiol (CBDV) extracts, it was demonstrated that both caused lesions, in low levels ( $>0.2 \mu\text{M}$ ), in the DNA of strains of human liver cells (HepG2) and oral cavity (TR146) (Russo *et al.*, 2019). However, in that same study, additional experiments indicated that the genotoxic effects of the extracts were caused by toxic metabolites of CBD and CBDV produced by liver enzymes. Without this metabolism, CBD was unable to induce DNA damage and still had protective effects on the genetic material of cells treated with PC.

The results of cannabinoid genotoxicity are not yet conclusive, as there are significant variations in the results of *Cannabis* extracts reported in the scientific literature, and the consumption of artisanal extracts should be a concern.

### 2.3 Micronucleus test

The result of the mutagenic evaluation using the micronucleus test (MN) showed that there was no significant difference ( $p>0.05$ ) in the incidence in bone marrow cells of mice treated with OEC compared to the vehicle during 48 and 72 h after induction. Therefore, it was evidenced that the studied OEC did not present a mutagenic effect in the evaluations performed (Fig. 5).

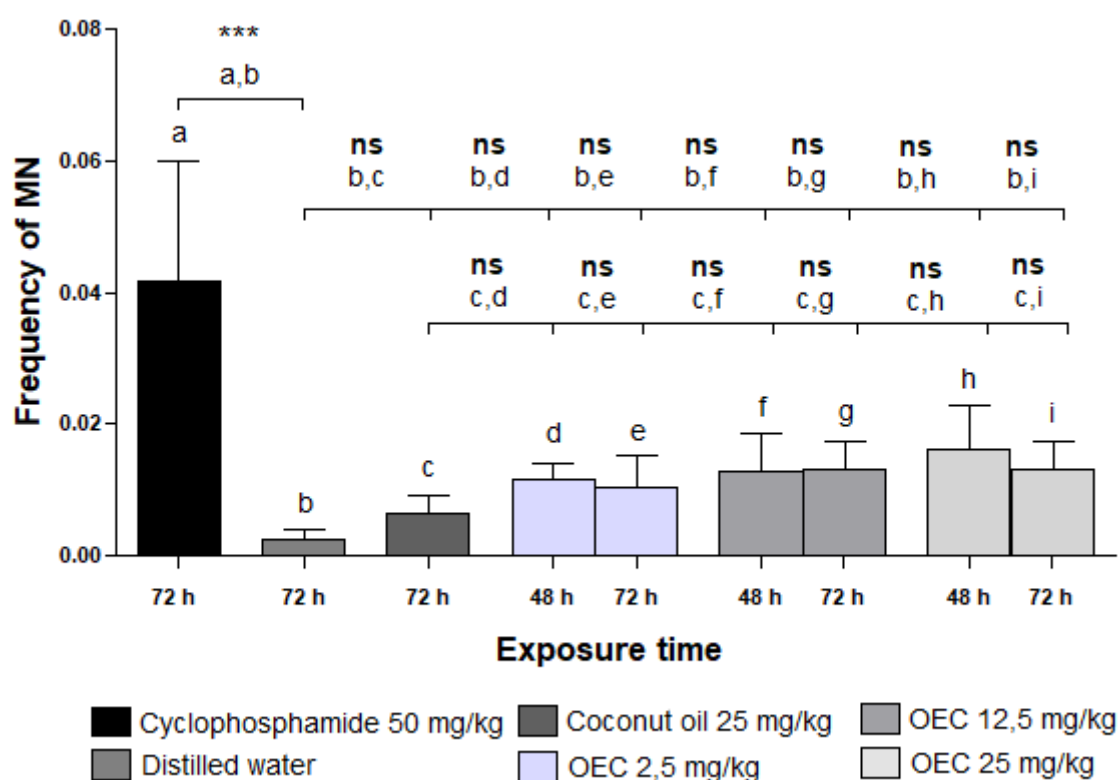


Fig. 5. Frequency of micronucleus (MN) of bone marrow cells from *M. musculus* mice exposed to organic extract of *Cannabis* (OEC). The image shows mean  $\pm$  standard deviation. The values show

the incidence of MN in mice bone marrow cells and time of exposure to OEC during the first 48 and 72 hours. 2,000 cells were analyzed per treatment under an optical microscope with a 100x immersion objective. The letters **a**, **b** and **c** represent: PC (cyclophosphamide), NC (distilled water) and Vehicle (coconut oil), respectively. The letters **d**, **e** (4 and 24h, respectively) represent OEC at a concentration of 2.5 mg/kg; **f**, **g** (4 and 24h, respectively) represent OEC at 12.5 mg/kg and **h**, **i** (4 and 24h, respectively) represent OEC at 25 mg/kg. For statistical data, analysis of variance (ANOVA) with Tukey was used. Significance at \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$  and not significant (ns).

However, a controversial result was observed in a chromosomal and nuclear aberration study carried out on bone marrow cells of hybrid rats treated with a 10 mg/kg dose of specific cannabinoids (tetrahydrocannabinol, CBD or cannabidiol), where it was found that after five consecutive days of induction, the MN percentage in treated mice cells was three to five times higher compared with dimethyl sulfoxide used as a positive control in the experiment (Zimmerman; Yesoda Raj, 1980).

In another study that used MN analysis in human liver cell lines (HepG2) previously treated with cannabinoids (CBD and CBDV), it was found that both compounds provided the formation of MN in low concentrations ( $>0.22 \mu\text{M}$ ). In addition, they caused an increase in other nuclear anomalies (nuclear buttons and nucleoplasmic bridges) and induced cell death due to necrosis and apoptosis after treatment (Russo *et al.*, 2019).

Given the aforementioned, it was also observed that the results found in the literature regarding the cytogenetic effects of cannabinoids are divergent. Such results may be related to the lack of standardization of the experiments. With that said, it is also known that the effects of *Cannabis* and its derivatives can involve several potential cellular targets in gene expression and that the mutagenicity of *Cannabis* remains unclear (Zimmerman S.; Zimmerman A., 1990).

It is worth mentioning that the results of the comet and MN tests demonstrated that the OEC did not promote statistically significant genotoxic and mutagenic damage in mice peripheral blood and bone marrow cells at the studied doses. It was also observed that the non-cytotoxic and genotoxic results evaluated in this study corroborate with other reports in the literature on the protective effect of genetic material by cannabinoids, although the mechanisms of this process are not yet fully elucidated (Nikan, Nabavi, Manayi, 2016).

Based on the information exposed and the result of this investigation, it is suggested that the studied OEC is not promising for the treatment of cancer. However, previous studies indicate that CBD and its oxidized metabolites interact with hTOPO-II $\alpha$ , which consequently could generate cell death and antitumor effect, as occurs with etoposide, a hTOPO-II $\alpha$  inhibitor. Despite this, there is no study that signals the site of interaction between the ligands and hTOPO-II $\alpha$ . Thus, the next stage of our study was characterized as *in silico* evaluation by a docking and QSAR study of CBD and its oxidized metabolites on hTOPO-II $\alpha$ .

#### 2.4 *In silico* evaluation

Due to the structural similarity observed between CBD and HU-331, it is expected that their interaction with hTOPO-II $\alpha$  will occur at the same site and that it

will also be affected by point mutations in the cysteine residues (C170, 392 and 405), as reported in previous studies with HU-331. Note that this logically does not mean that these substances interact directly with cysteines, but that these residues modulate the interaction site because they are within or close to the site (Wilson *et al.*, 2018).

Cavities of varying sizes were identified (Fig. 6A), highlighted in fluorescent green), the largest of which is located between the two monomers and close to two cysteines, C405 and C170. Four cavities are noteworthy and were named due to the proximity of cysteines; for example, cavity 405 (C405), with an area of 21.50 Å; cavity 392 (C392), which has a volume of 2520 Å; cavities 170a and 170b, which have a volume of 180 Å and 39.93 Å, respectively, and are located next to the cysteine residue 170.

To find out which one represents the real binding site of the CBD and its oxidized derivatives, a docking study was carried out in each of the 4 cavities. The results showed that the C170a cavity, located near the ATPase site, had better binding affinity energy estimated by the CBD (most negative value obtained by the MolDock Score). That is, cavities C170a, C170b, C405 and C392 obtained the energies -121.09; -22.06; -88.81; -78.74, respectively.

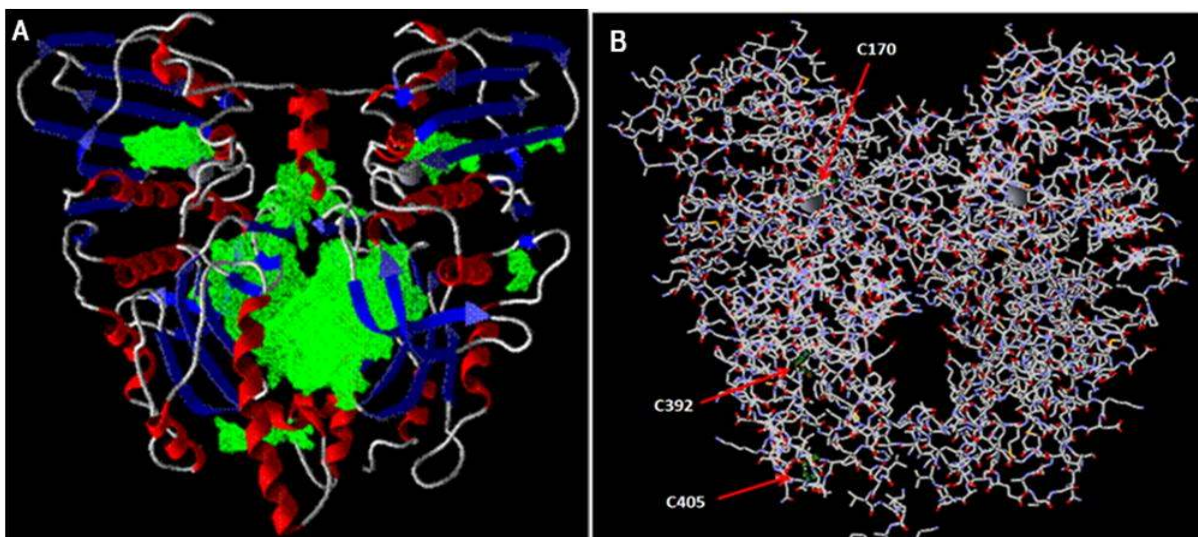


Fig. 6 - Tertiary structure of the 1ZXm mold with regions highlighted in green (A) representing the cavities identified by the test atom and (B) representing the position (red arrow) of the three cysteines that are important for the interaction of HU-331 and analogous molecules.

Despite the low affinity of CBD binding to hTOPO-II $\alpha$ , showing itself as a weak inhibitor, some studies cite that its oxidized metabolites are responsible for inhibiting hTOPO-II $\alpha$  (Mechoulam; Hanus, 2003; Wilson *et al.*, 2018). Therefore, it was necessary to evaluate them in all cavities that were previously analyzed for CBD in order to confirm whether C170a would be the best site.

The results obtained confirmed the C170a cavity as the one with the best affinity energy for all the tested metabolites and the probable interaction site. All OMCs showed good interaction affinity with minimum energy equal to -118.54 (5-

OH-CBD ligand). The best results were obtained by the metabolites OMC17 (-145.31), OMC15 (-144.08), OMC13 (-141.65); OMC16 (-139.54) (Fig. 7).

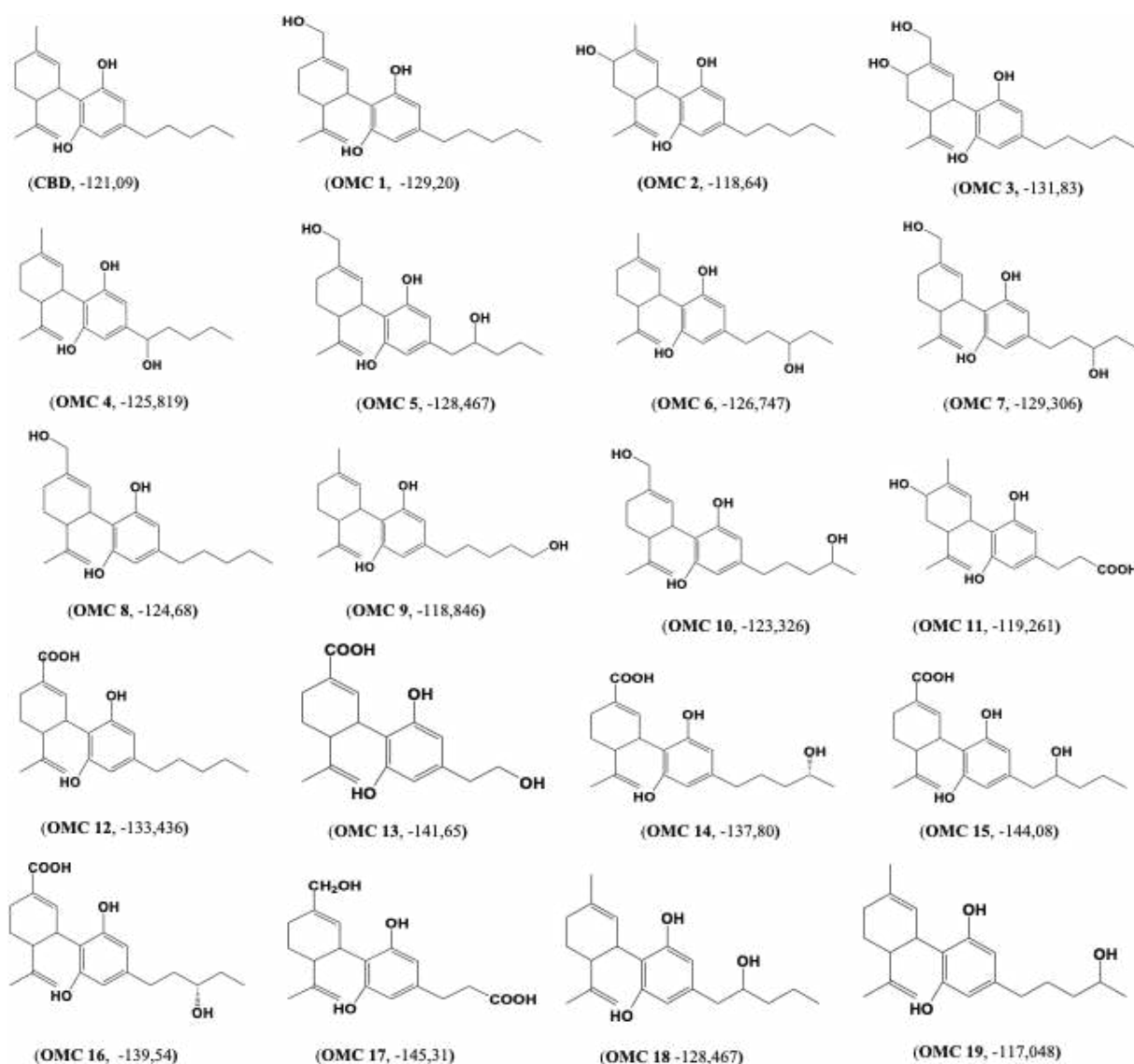


Fig. 7. Oxidized metabolites of cannabidiol (OMC). Source: Adapted from Mechoulam; Hanus (2003).

When observing the interaction model of the molecules, it was evident that they all joined in the same position of the cavity with a radius of 7.7 Å for C170 (not shown in the image), without steric impediment and with good interaction with the residues of the site. However, the mode of attachment of OMC 17 (Fig. 8A) when compared to CBD (Fig. 8B) demonstrates much more points of interaction, due to the presence of methylated hydroxyl in the hexene and the carboxy group in the extension of the side chain, previously just carbonic. Therefore, this metabolite stabilizes better within the site, which is reflected in the most negative energy values.

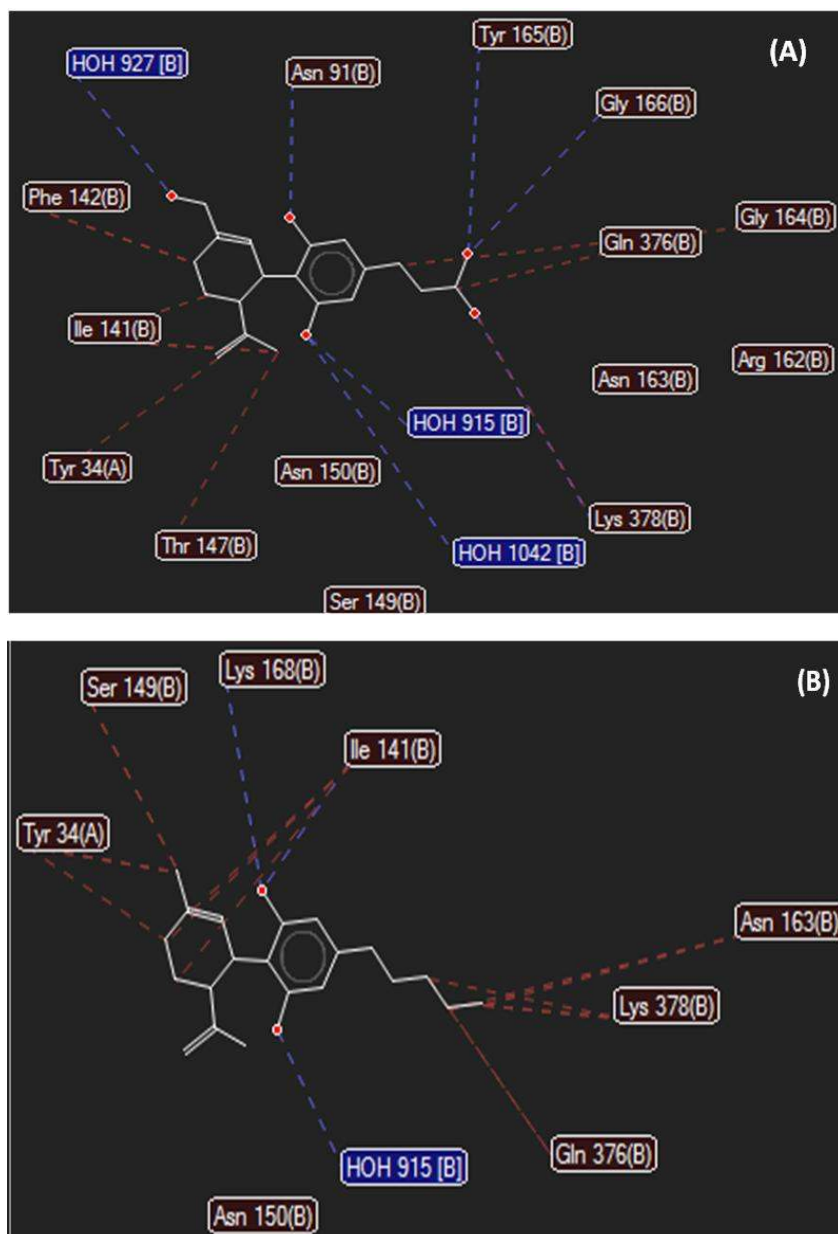


Fig. 8. Two-dimensional interaction maps of the OMC17 ligand (A) and cannabidiol (B) within the C170a cavity of hTOPO-II $\alpha$ . The amino acid residues are represented by their numbers in the primary sequence of the biological target; in blue, the structural waters present in the structure obtained by the Protein Data Bank (PDB code = 1ZXM) are represented.

When observing the interaction of the metabolite within the site and the distance to the cysteine, it is possible to understand that this residue is blocked by the metabolite, which has stabilized when surrounded by polar residues (for example, lysine, asparagine, serine, tyrosine) (Fig. 9).



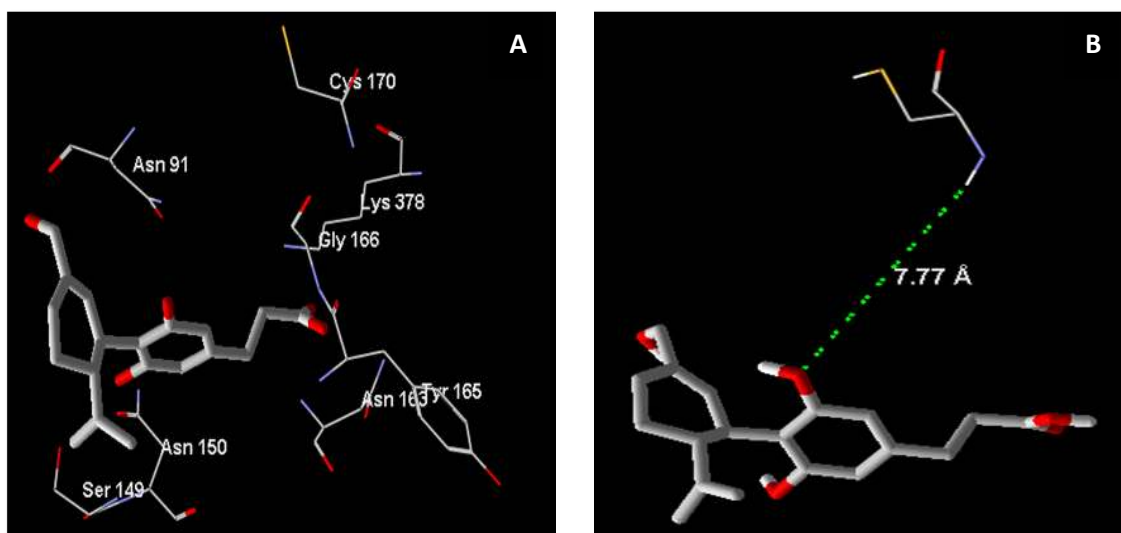


Fig. 9. OMC 17 connection site (A) and distance to C170 (B)

When analyzing the residues of interaction with CBD and residues of OMC 17 (Fig. 10), it is observed that the oxidation of the side chain increases the interactions within the binding site; therefore, the energy of interaction becomes better. From this observation, new ligands were proposed with the insertion of light bulky and hydrophilic groups (NH<sub>2</sub> and OH), in addition to the introduction of a conformational restriction and homologation next to the hexene ring.

With these modifications, the proposed new analogs had an improvement in energy and interactions within the interaction site when compared to OMC 17 (Fig. 10A). The best molecule was the 2-amino group substitution (Fig. 10B) in the side chain (-156.61), followed by 2-OH in the same position (-149.02,) (Fig. 10C). The greatest number of interactions of the 2-amino analog with structural waters is observed, as well as the attraction of glutamate 87.

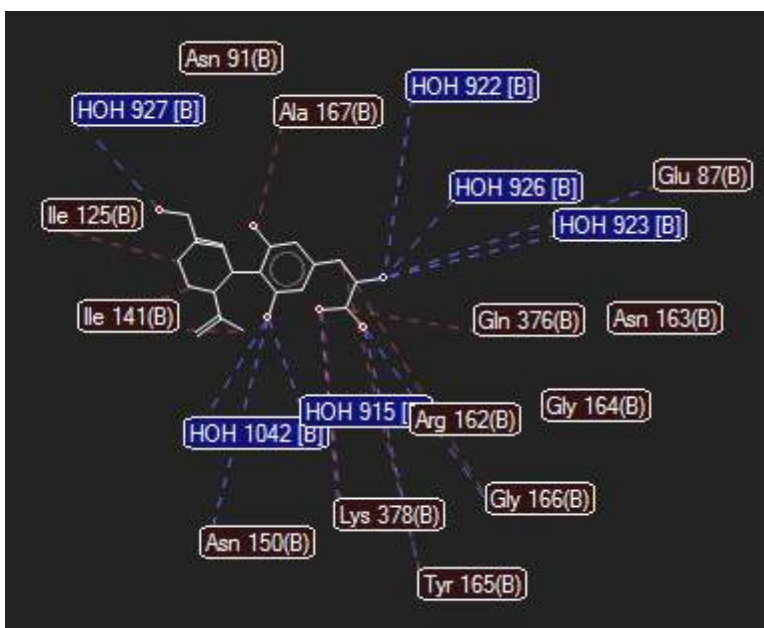
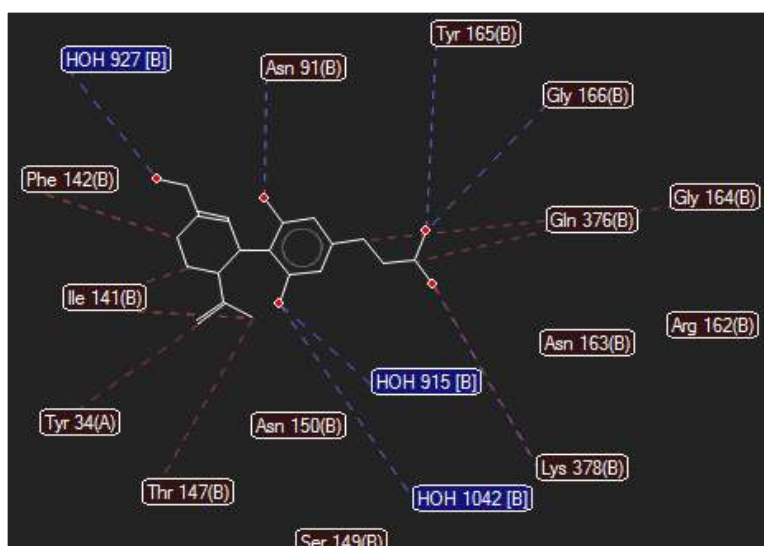
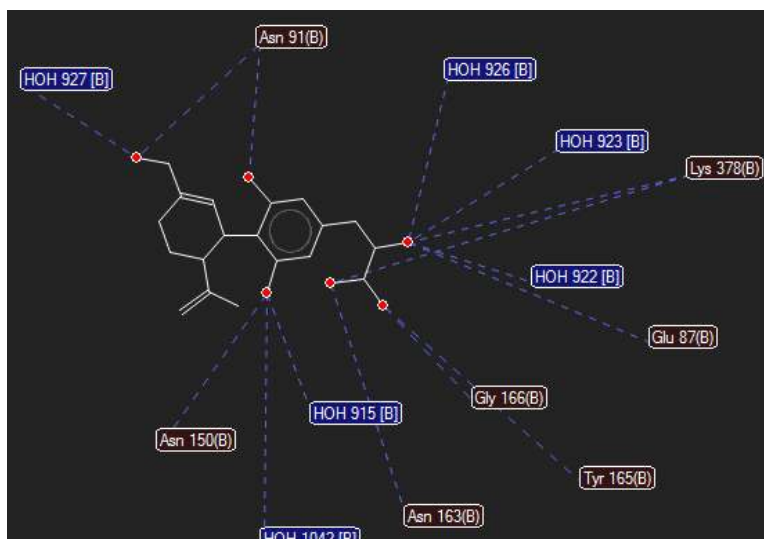


Fig. 10. Planned analogs of CBD and its most interacting metabolite at the C170a site of hTOPO-II $\alpha$ . (A) interaction of OMC 17 with residues in cavity C170a; (B) Planned CBD analogue that showed better interaction with the site C170a of hTOPO-II $\alpha$ ; (C) Interaction of the second analogue with the best interaction, the substituted 2-OH.

The structure-activity relationship of the analogs demonstrates that the substitution of polar groups that make hydrogen bonding at the 2-OH position of the aliphatic side chain is important for interaction with a portion with high electronic density within the site, composed of amino acids such as glutamate, lysine, tyrosine, asparagine and supported by cysteine 170, which can coordinate the movement of this cavity.

With the *in silico* study it was possible to conclude that some oxidized metabolites and CBD itself actually show affinity for the hTOPO-II $\alpha$  site, which can cause DNA damage induced by the enzyme inhibition. The *in silico* study of the structure-activity relationship and docking of the metabolites allowed the development of new analogs with better energy interaction by human topoisomerase compared to CBD and its metabolites, therefore, being an important analogue with potential antitumor activity.

### 3. Conclusion

In this study, when analyzed *in vitro* and *in vivo*, the OEC did not show cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects and, therefore, it is not promising as an antitumor in the studied concentrations. With this, new cannabidiol analogs were developed, demonstrating better interaction energy by TOPO-II $\alpha$ , which, because it is overexpressed in tumor cells, is a promising antitumor therapeutic target.

According to this investigation, it is believed that the developed cannabinoid analogs may act as drugs with better therapeutic action and less undesirable side effects, being a new alternative in the treatment of oncogenesis. However, it is important to develop more studies that can provide more information for the safe use of this product.

## 4. Methodology

### 4.1 Characterization of organic extracts of Cannabis (OEC)

OEC is an oily extract produced with the plant of the genus *Cannabis* in a handmade way for medicinal purposes. It is a viscous oil, dark green/black in color, but in general, it is diluted in other oils such as: coconut oil, olive oil, grape oil, etc. to facilitate consumption. *Cannabis* oil has lipophilic characteristics, has high affinity for binding to fat and low affinity for binding to water.

The OEC used as a sample in this study was provided by a non-profit *Cannabis* Support Brazilian Association that supports families in need of treatment with

*Cannabis*-based products. It is located in Paraíba, where researches are carried out with patients using *Cannabis* as an alternative treatment.

#### 4.2 Experimental animals

36 mice (*M. musculus*) of both sexes with 20 to 25g of body weight, obtained at the Bioterium of the Nucleus of Biotechnology and Biodiversity Research (NPBio) of the State University of Piauí (UESPI), Teresina, PI, Brazil, were used. The animals were housed in polypropylene cages with no food restrictions (*ad libitum*) and liquid intake during the experiment was ensured at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and at 40-60% humidity with a 12-hour light/dark cycle. The experimental procedures were approved by the ethics committee on the use of animals (CEUA) of UESPI under protocol number 08059/2018, in accordance with the current bioethical standards and guidelines for tests involving non-human animals, according to the recommendations of the Guide for care and use of laboratory animals (THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, 2011), obeying the determinations for the scientific use of animals of the Brazilian legislation (Law 11794, of October 8, 2008 - Arouca Law) and the principles established by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

#### 4.3 Treatments

The animals were divided into six groups: (1) negative control (NC) - distilled water; (2) vehicle - coconut oil (25 mg/kg); (3-5) OEC (2.5, 12.5 and 25 mg/kg) and (6) positive control (PC) - cyclophosphamide (50 mg/kg). The administration of the OEC was performed in a single dose for each tested concentration (2.5, 12.5 and 25 mg/kg) orally. The choice of dose was based on the protocol of the Federal Council of Medicine of Brazil (CFM) for patients with refractory epilepsy (initial dose of 2.5 mg/kg/day and maximum of 25 mg/kg/day). The same doses were also used in a study with severe epileptic patients carried out by the New York University Epilepsy Center (CFM, 2014; Devinsky *et al.*, 2016).

#### 4.4 Cell viability

Cell viability was assessed by MTT test as previously described by Denizot and Lange (1986) and Riss *et al.* (2016), observing the recommendations of OECD 491 (2018). B16F10 (murine metastatic melanoma) and L929 (normal fibroblast) cell lines were seeded ( $2 \times 10^3$  cell/well) in polystyrene 96-well plates and incubated for 24 h. After this period, the cells were exposed to doxorubicin (0.01 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ) and OEC (7.81 to 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) for 72h. Then, 10.0  $\mu\text{L}$  of MTT (5 mg/mL) were added in each well and formazan crystals were dissolved in 100.0  $\mu\text{L}$  of dimethylsulfoxide (DMSO) 4h later. The absorbance of violet product was quantified in a plate reader at 540 nm.

#### 4.5 Comet test

Peripheral blood cell samples were collected at 4 and 24 hours after exposure to OEC and they were used to perform the alkaline comet test, as described by Tice *et al.* (2000). The slides were analyzed by immunofluorescence microscopy (NIKON LABPHOT 2) with 40X magnification, equipped with a 420 nm - 490 nm excitation filter and a 520 nm barrier filter. The images of comets in Bitmap (BMP) format were captured using a microscopy camera (Eurekam16.0 plus). The captured images were analyzed using OpenComet software version 1.3.1, in a semi-automatic way to evaluate comets produced in the gel electrophoresis process of individual cells. The parameters used to assess DNA damage were: length of the tail of comet (a distance between the center of the head mass and the center of the tail mass) and percentage of DNA in the tail. 50 nucleoids were analyzed per individual of each treatment (Lovell; Omori 2008; Kang *et al.*, 2013) where the checks of the tested groups were carried out observing the 4 (damage) and 24 (repair) hours after the administration of the OEC and controls (positive, negative and vehicle). A 24-hour period was established as comparison parameters for DNA repair.

#### 4.6 MN test

The micronucleus (MN) test was performed using bone marrow cells from mice 48 hours (acute exposure) and 72 hours (chronic exposure) after OEC administration. The animals were sacrificed by cervical dislocation for bone marrow collection, according to Fenech (2000), with a protocol based on the recommendations previously established by OECD 474 (2016). The cells were mixed with 0.5 mL of fetal bovine serum, homogenized and centrifuged for 5 minutes. Two slides were made and left to dry overnight. After 24h, the slides were stained with Giemsa. The photomicrographic analysis was performed at 100X, with the objective of immersion. The results were expressed in frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in 2,000 cells per animal (Kissling *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013).

#### 4.7 Statistical analysis

The statistical analysis for the cytotoxicity test was performed using the GraphPadPrism software version 8.0 with significance  $p < 0.0001$  and Dunnet post-test. For the genotoxic and mutagenic tests, the GraphPadPrism software version 8.0 and ANOVA OneWay software with Tukey post-test were used with a significance level of  $p < 0.05$ .

#### 4.8 *In silico* study

##### 4.8.1 Selection of Model Structure

Before the docking study, a selection of the three-dimensional structure of hTOPO-II $\alpha$  present in Protein Data Bank (PDB) was carried out. It should present the residues of cytoins 170, 392 and 405 present in the catalytic subunit ATPase (indicated by mutagenesis studies as important for the interaction of ligands with structural similarity to CBD, ie quinones and HU-331), primary structure as complete as possible and good resolution in angstrom (<2.5 Å) (Wilson *et al.*, 2018). The checking of the primary structure occurred when comparing the sequence referring to each structure present in the PDB with the total hTOPO-II $\alpha$  sequence available in Uniprot (Uniprot code: P11388). The selected structure (PDB code: 1ZXM) has a resolution of 1.87 Å, 800 amino acid residues and the presence of the cysteines of interest.

#### 4.8.2 Building of Model

The enzyme structure was analyzed and prepared by the Molecular Virtual Docker (MVD) 5.5 software. The loads were calculated and marked by the MVD and the force field used was Tripos with explicit hydrogens and ligand flexibility. The structural waters were maintained throughout the enzyme structure and this was validated as a homodimer by the Ramachandran graph.

#### 4.8.3 Docking study

To identify the cavities in the hTOPO-II $\alpha$  structure, a 1.2 Å test atom and a cutoff with a minimum size of the cavity area of 10 Å and a maximum of 10,000 Å were used. After the cavities are identified, the docking calculations were performed in a 15 Å radius over each identified cavity, with a resolution grid of 0.3 Å, 10 consecutive runs and a maximum population of 50.

The interaction energy of the CBD by the model cavities was evaluated by the MVD software to define the most likely location for interaction and to verify the proximity by the cysteines (C170, 392 and 405). The CBD interactions and their metabolites oxidized with hTOPO-II $\alpha$  were studied to understand the binding mode. Using medicinal chemistry techniques, molecular modifications to increase the affinity of hits to hTOPO-II $\alpha$  were proposed.

#### 4.8.4 Preparation of binder structure and evaluation of planned binders

The CBD molecules, their analogues and the planned molecules were built by the Spartan®14' software, where the structures were parameterized with the semi-empirical AM1 method; then, they went through energy minimization, addition of atomic charges and were carried to the MVD platform in PDB format.

All the molecules were directed to the same connection radius defined within the cavity that presented the most stable interaction energy to the CBD (initial hit).

## References

- Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, V. di M., Izzo, A. A., 2012. Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. **Journal of Molecular Medicine**. 90, 925-934.
- Baram, L., Peled, E., Berman, P., Yellin, B., Besser, E., Benami, M., Louria-Hayon, I., Lewitus, G. M., Meiri, D., 2019. The heterogeneity and complexity of *Cannabis* extracts as antitumor agents. **Oncotarget**. 10, 4091- 4106.
- CFM. Conselho Federal de Medicina. 2014. Resolução cfm no 2.113/2014. Diário Oficial da União. 243,183-184.
- Collins, A. R., Osoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smich, C.C., Stetina, R., I. 2008. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**. 23,143-51.
- Denizot, F., Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival-modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**. 89, 271-277.
- Devinsky, O., Marsh, E., Friedman, D., Thiele, E., Laux, L., Sullivan, J., Miller, I., Flamini, R., Wilfong, A., Filloux, F., Wong, M., Tlyon, N., Bruno, P., Bluvstein, J., Hedlund, J., Kamens, R., Maclean, J., Nangia, S., Singhal, N. S., Wilson, C. A., Patel, A., Cilio, M. R., 2016. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open. **Lancet Neurol**. 15, 270-278.
- Dziwenka, M., Coppockb, R., McCorklec, A., Palumboc, E., Ramirezc, C., Lermers, S., 2020. Safety Assessment of a Hemp Extract using Genotoxicity and Oral Repeat- T Dose Toxicity Studies in Sprague-Dawley Rats. **Toxicology Reports**. 7, 376-385.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. 455, 81-95.
- Freitas, F. de S. C. 2018. **O potencial uso terapêutico da *Cannabis* e seus componentes ativos**. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Graduação em Medicina do Centro de Ciências Biológicas da Saúde. Universidade Federal do Maranhão. São Luís.
- Froelich-Ammon, S. J., Osheroff, Neil., 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. **Journal of Biological Chemistry**. 270, 21429-21432.
- Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.J., Thybaud, V., 2011. Compilation and use of genetic toxicity historical control data. **Mutation Research**. 723, 87-90.

- Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K., Seo, Y. R., 2013. Recent advances in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of Cancer Prevention**. 18, 277-288.
- Kisková, T., Mungenast, F., Suváková, M., Jaeger, W., Thalhammer, T., 2019. Future aspects for cannabinoids in breast cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. 20, 1-21.
- Kissling, G. E., Dertinger, S. D., Hayashi, M., MacGregor, J. T., 2007. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability. **Mutation Research**. 634, 235-240.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., Jha, A. N., 2009. Comet assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**. 25, 53-64.
- Lovell, D.P., Omori, T., 2008. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**. 23, 171-82.
- Lukhele, S.T., Motadi, L.R., 2016. Cannabidiol rather than *Cannabis sativa* extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. **BMC Complement Alternative Medicine**. 16, 1-16.
- Mechoulam, R., Hanus, L., 2003. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. **Chemistry and physics of lipids**. 121, 35-43.
- Nikan, M. Nabavi, A. M. Manayi, A., 2016. Ligands for cannabinoid receptors, promising anticancer agents. **Life Sciences**. 146, 24-130.
- Oliveira, M. A., Bezerra, P. R. P., Nóbrega, P. F., Medeiros, R. M de., Matias, W. N., Medeiros, V. M de., 2014. Evaluation of toxicity oil cocos nucifera l. *Front of artemia salina leach*. A sample of natural and other industrialized city of Sousa – PB. 1, 291-304.
- Pamplona, F. A., Takahashi, R.N., 2012. Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. **Journal of Psychopharmacology**. 26, 7-22.
- Pinto, A.C.V. 2016. *Cannabis sativa* L. e as suas aplicações em oncologia - Que futuro? Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.1-29.
- Rea, K. A., Casaretto, J. A., Al-Abdul-Wahid, M. S., Sukumaran, A., Geddes-McAlister, J., Rothstein, S. J., Akhtar, T. A., 2019. *Biosynthesis of cannflavins A and B from Cannabis sativa L.* **Phytochemistry**.164, 162-171.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L., 2016. **Cell viability assays**. Assay Guidance Manual. 1-31.



Romano, B., Borrelli, F., Pagano, E., Cascio, M.G., Pertwee, R.G., Izzo, A. A., 2014. Inhibition of colon carcinogenesis by a standardized Cannabis sativa extract with high content of cannabidiol. **Phytomedicine**. 21, 631-639.

RUPPENTHAL, J. E. Toxicologia. Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria. Rede e-Tec Brasil, 2013.

Russo, C., Ferk, F., Misik, M., Ropek, N., Nersesyan, A., Mejri, D., Holzmann, K., Lavorgna, M., Isidori, M., Knasmüller, S., 2019. Low doses of widely consumed cannabinoids (cannabidiol and cannabidivarin) cause DNA damage and chromosomal aberrations in human-derived cells. **Arch Toxicol**. 93, 179-188.

Sarfaraz, S. Adhami, V. M., Syed, D. N., Afaq, F., Mukhtar, H., 2005. Cannabinoid Receptor as a Novel Target for the Treatment of Prostate Cancer. **American Association for Cancer**. 68, 339-342.

Sharma, M., Hudson, J. B., Adomat, H., Guns, E., Cox, M.E., 2014. In Vitro Anticancer Activity of Plant-Derived Cannabidiol on Prostate Cancer Cell Lines. **Pharmacol Pharm**. 5, 806-820.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y. F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 35, 206-21.

Wilson, J. T. et al. 2018. HU-331 and Oxidized Cannabidiol Act as Inhibitors of Human Topoisomerase II $\alpha$  and  $\beta$ . **Chemical Research in Toxicology**. 31, 137-144.

Zimmerman A. M, Yesoda Raj A. 1980. Influence of cannabinoids on somatic cells *in vivo*. **Pharmacology**. 21, 277-287.

Zimmerman, S., Zimmerman, A. M. 1990. Genetic Effects of Marijuana. **The International Journal of the Addictions**. 25, 19-33.