

LUCIANA MARANGNI NOLLI

**AYAHUASCA – POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DEPENDÊNCIA AO ÁLCOOL E
ATIVIDADE NEURAL DA PROTEÍNA cFOS EM MODELO EXPERIMENTAL**

BRASÍLIA
2018



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCIANA MARANGNI NOLLI

**AYAHUASCA – POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DEPENDÊNCIA AO ÁLCOOL E
ATIVIDADE NEURAL DA PROTEÍNA cFOS EM MODELO EXPERIMENTAL**

BRASÍLIA
2018

LUCIANA MARANGNI NOLLI

**AYAHUASCA – POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DEPENDÊNCIA AO ÁLCOOL E
ATIVIDADE NEURAL DA PROTEÍNA cFOS EM MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eloisa Dutra Caldas

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Renata Mortari

BRASÍLIA

2018

LUCIANA MARANGNI NOLLI

**AYAHUASCA - POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DEPENDÊNCIA AO ÁLCOOL E
ATIVIDADE NEURAL DA PROTEÍNA cFOS EM MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília.

Brasília, 31 de julho de 2018.

Banca Examinadora:

Prof.^a Eloisa Dutra Caldas

Departamento de Farmácia/Universidade de Brasília – Presidente

Prof. Rafael Souto Maior

Instituto de Biologia/Universidade de Brasília – Membro Efetivo

Prof.^a Roseli Boerngen de Lacerda

Universidade Federal do Paraná – Membro Efetivo

Prof.^a Andréa Barreto Motoyama

Departamento de Farmácia/Universidade de Brasília – Membro Suplente

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela força,

Ao amigo de fé, líder espiritual Antônio Aparecido Ranzani, por me aprofundar no conhecimento religioso e tornar o aprendizado simples em meus primeiros contatos com a ayahuasca.

Aos queridos da igreja do Santo Daime de Ribeirão Preto, SP. “Rainha do Céu”, ao César Pelicano Vilas Boas e Jaci Vilas Boas, pela acolhida, ensinamento da doutrina, parceria, confiança e dedicação em seguir trabalhando numa causa tão nobre.

Ao laboratório de Saúde Mental da USP de Ribeirão Preto, SP, pelo aprendizado científico do potencial terapêutico da ayahuasca e outras plantas psicoativas.

Ao amigo indígena Antônio Ferreira (Tuim Nova Era), do povo Huni Kuin de Tarauaca, AC., pelo incentivo e troca de saberes sobre sua experiência na reabilitação do alcoolismo na sua aldeia através da consagração da ayahuasca.

À querida professora Eloisa Caldas, por abrir as portas da Universidade de Brasília, junto ao Laboratório de Toxicologia e contribuir intensamente com este estudo científico.

Aos membros da União do Vegetal em especial ao Dr. Marcus Vinícius Von Zuben e sua esposa Nágela Von Zuben, por sempre me incentivarem e estarem dispostos a me socorrer nas dificuldades.

À minha Pibic efetiva Stefany Sousa Alves, Camila Colaco e Karina Castro, parceiras de centro cirúrgico experimental. Aos demais alunos estagiários que participaram, e a equipe do alojamento de animais, pelos cuidados diários durante o experimento.

À querida professora Márcia Renata Mortari do Laboratório de Neurofarmacologia, pela imensa contribuição na fase da etapa Neurológica. Ao Danilo Oliveira, pela parceria e paciência para efetuarmos o processamento mais trabalhoso da imuno-histoquímica do cérebro.

Aos professores Rafael Souto Maior, Roseli Boerngen de Lacerda e Andréa Barreto Motoyama, por aceitarem compor a banca e contribuírem com o estudo.

À Universidade de Brasília, pela estrutura, e oportunidades incríveis proporcionadas ao longo desta jornada.

A Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPDF), por disponibilizar o fomento que tornou possível a realização do estudo.

Com muita honra dedico este trabalho aos mestres São João, Salomão, Irineu Serra e Sebastião Motta, aos meus amigos de infância que perderam suas vidas pelo uso abusivo de álcool e outras substâncias químicas.

A ciência é a forma mais organizada e concreta para a evolução da humanidade, deve ser respeitada, valorizada e compreendida pela sociedade.

Luciana Marangni Nolli

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo do álcool.....	7
Figura 2. Regiões do cérebro afetadas pelo álcool, mostrando o sistema dopaminérgico mesolímbico, que inclui a área tegmental ventral (VTA), o núcleo accumbens, e o córtex pré-frontal; a amígdala, o estriado e o hipocampo.....	9
Figura 3. Mecanismo proposto envolvendo os canais de sódio voltagem dependente tipo L (LTTCs) na mediação da resposta neuronal à exposição ao álcool no núcleo central da amígdala (CeAs), que é alterada com a dependência e a resposta comportamental de neuroadaptação. Nos ratos não dependentes (<i>naïve</i>) expostos ao álcool, a atividade no CeA é governada pelos LTTCs, enquanto que nos ratos dependentes, esta ação é mediada pelo receptor tipo 1 do fator liberador de corticotropina (CRF1).....	10
Figura 4. O álcool inibe a transmissão gabaérgica na área ventral tegmental (VTA), ativando a dopamina, e sua liberação no núcleo accumbens, ativando o sistema de recompensa. Ao mesmo tempo, o álcool pode inibir a liberação do glutamato dos terminais nervosos no núcleo accumbens.....	11
Figura 5. Localização dos receptores serotoninérgicos no cérebro.....	12
Figura 6. Projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NDR) e da rafe mediana (MR) para regiões implicadas na dependência ao álcool: hipocampo (HIP), córtex pré-frontal (PFC), núcleo accumbens (ACC), estriado (BNST), hipotálamo (HYP), amígdala (AMYG) e área tegmental ventral (VTA) A: cérebro humano mostrando a localização do núcleo da rafe e as projeções serotoninérgicas.....	13
Figura 7. Estrutura química da naltrexona, seu metabólito 6 β -naltrexol e a morfina, agonista opioide.....	14
Figura 8. <i>Banisteriopsis caapi</i> em floração e colhido para feitiço do chá ayahuasca.....	20
Figura 9. Estrutura química dos alcalóides da ayahuasca: harmina, harmaline e tetrahydroharmina, presentes na <i>Banisteriopsis caapi</i> , e N, N dimetiltryptamina (DMT), presente na <i>Psychotria viridis</i> . Observa-se a semelhança estrutural entre o DMT e o neurotransmissor serotonina (5-HT).....	20
Figura 10. <i>Psychotria viridis</i>	22
Figura 11. Amostra do chá ayahuasca liofilizado, utilizado durante o estudo.....	29

Figura 12. Gaiola contendo dois bebedouros, de água e álcool 20%.....	29
Figura 13. Arena de Campo Aberto.....	32
Figura 14. Labirinto em Cruz Elevado.....	33
Figura 15. Ilustração da técnica fixação de perfusão transcardíaca do rato.....	34
Figura 16. Ilustração da extração do cérebro do animal.....	35
Figura 17. Áreas do cérebro analisadas A: córtex pré-frontal: medial (MO), ventral (VO) e lateral (LO); B: corte do núcleo accumbens (AcbC) e estriado (CPu).....	36
Figura 18. Consumo geral de álcool por semana (N=47 animais). Os valores representam médias \pm EPM (erro padrão da média). Análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc Turkey. Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as semanas. Leituras indica o número de valores de consumo de álcool na semana.....	40
Figura 19. Consumo de álcool na semana de tratamento. Os valores representam médias \pm EPM (erro padrão da média). Basal (7ª semana; 47 animais), H ₂ O (n= 9) animais; NTX (n= 10) animais; AYA 0,5 (n= 9) animais; AYA 1 (n= 9) animais; AYA 2 (n= 10) animais. Análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste Dunnett; * diferença significativa com a linha de base; \neq significância em relação ao grupo H ₂ O.....	41
Figura 20. Bebedouro de álcool roído pelo rato.....	42
Figura 21. Teste de campo aberto. A: atividade de ida ao quadrante central, defecar, urina e autolimpeza; B: atividade de locomoção nos quadrantes e elevação nas patas traseiras. H ₂ O (n=9), NTX (n=10), AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=9), AYA2 (n=10). Os valores correspondem a média \pm erro padrão.....	43
Figura 22. Teste de labirinto em cruz elevada. A: número de vezes que o animal se levantou com apoio nas patas traseiras e entrou nos braços abertos (BA) ou fechados (BF); B: autolimpeza, urina e número de bolos fecais. H ₂ O (n=9), NTX (n=10), AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=9), AYA2 (n=10). Os valores correspondem a média \pm erro padrão.....	44
Figura 23. Teste de labirinto em cruz elevada. Tempo de permanência nos braços abertos (BA) e fechados (BF). H ₂ O (n=9), NTX (n=10), AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=9), AYA2 (n=10). Os valores correspondem a média \pm erro padrão. Análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste Dunnett T3 (variância não homogênea). Letras diferentes indicam significância ($p \leq 0,05$) para cada parâmetro.....	45

Figura 24. A: fígado de animal sadio; B e C: alteração macroscópica causada pelo consumo de álcool durante 8 semanas no protocolo de aceso intermitente ao álcool.....	46
Figura 25. Fotomiografia de marcadores de cFos no córtex medial pré-frontal (MO), córtex orbitoventral (VO) e córtex orbitolateral (LO). A: grupo sadio, B: NTX, C: Aya 0,5, D: Aya 1X, E: Aya 2X; F: H2O. Aumento 40x.....	48
Figura 26. cFos no córtex pré-frontal de ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, Aya 0,5 (n=9), Aya 1 (n=8), Aya2 (n=9). Oito leituras para cada animal para a cada região do córtex medial prefrontal, e duas para o córtex orbitolateral e orbitoventral (Figura 18). Os valores correspondem a média ± erro padrão. * significância em relação ao grupo sadio; ≠ significância em relação ao grupo H2O (Kuskal Wallis).....	49
Figura 27. Cfos nas regiões do núcleo accumbens e estriado. Ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, AYA0,5 (n=9), AYA 1 (n=8), AYA2 (n=9). Duas leituras para cada animal (Figura 18). Os valores correspondem a média ± erro padrão. *significância em relação ao grupo sadio (Kuskal Wallis).....	50
Figura 28. Fotomiografia (A) ampliação 4X, representa local de leitura do córtex pré-frontal áreas (MO, VO e LO), figura (B) ampliação 20X.....	51
Figura 29. Nissl no córtex pré-frontal de ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=8), AYA2 (n=9). Os valores correspondem a média ± erro padrão.....	52
Figura 30. Nissl nas regiões do núcleo accumbens e estriado. Ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=8), AYA2 (n=9). Os valores correspondem a média ± erro padrão.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise estatística do peso corpóreo e peso dos órgãos em g, dos animais dos grupos sadio (sem exposição ao álcool) e tratados com H2O, NTX, e ayahuasca 0,5X, 1X e 2X.....	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRAMD	Associação Brasileira Multidisciplinar de Estudos sobre Drogas
ACC	Núcleo Accumbens
AcbC	Core do Núcleus Accumbens
AMYG	Amígdala
APA	Associação Psiquiátrica Americana
AUD	Alcohol Use Disorder
AYA 0,5	Ayahuasca na dose 0,5X a dose usual
AYA 1	Ayahuasca na dose 1X a dose usual
AYA 2	Ayahuasca na dose 2X a dose usual
BNST	Bed Nucleus of The Stria Terminalis
CA	Campo Aberto
CeA	Núcleo Central da Amígdala
CPu	Caudado-Putamen
CRF1	Corticotropina
DAB	Diaminobenzidina
N, N DMT	N,N Dimetiltriptamina
DSM-I	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EPM	Erro padrão da média
HIPP	Hipocampo
HYP	Hipotálamo
5-HT	Serotonina
IA2BC	Interminant access to 2-bottle choice
IARC	Agência de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde
IDEAA	Instituto de Etnopsicología Amazónica Aplicada
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LGIC	Ligand-Gated Ion Channels
MAO	Monoamina Oxidase
MAO-A	Monoamina Oxidase A
MAO-B	Monoamina Oxidase B

MR	Rafe Mediana
NMDA	N-metil D-aspartato
NDR	Núcleo Dorsal Da Rafe
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NTX	Naltrexona
PA	Pressão arterial
PAP	Peroxidase Antiperoxidase
pc	Peso corpóreo
PFC	Córtex pré-frontal
PH	Potencial Hidrogeniônico
SAF	Síndrome Do Alcoolismo Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
SERT	Transportador de serotonina
SPSS	Statistical Package for The Social Sciences
SSRIs	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
UDV	União do Vegetal
VTA	Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUÇÃO	3
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. ALCOOLISMO	5
2. MECANISMO DE AÇÃO PSICOATIVA DO ÁLCOOL	8
3. PROPOSTAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DO ALCOOLISMO	13
3.1 NALTREXONA	14
4. PROTOCOLOS DE ACESSO LIVRE AO ÁLCOOL	15
5. AYAHUASCA	17
5.1 Contexto religioso da ayahuasca	17
5.2 Botânica e fito química da ayahuasca	19
5.3 Aspectos toxicológicos da ayahuasca	23
5.4 Potencial terapêutico da ayahuasca	24
III. OBJETIVOS	27
GERAL	27
ESPECÍFICOS	27
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	28
1. AYAHUASCA	28
2. ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	29
3. PROTOCOLOS IA2BC (INTERMINENT ACCESS TO 2-BOTTLE CHOICE).	30
3.1 Fase de condicionamento ao consumo de etanol	30
3.3 Fase de tratamento	31
4. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	31
4.1 Campo Aberto	31
4.2 Labirinto em Cruz Elevado	32
5. EUTANÁSIA E PERFUSÃO	33
6. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CFOS	37
7. AVALIAÇÃO DE PERDA NEURONAL PELO MÉTODO DE NISSL/CRESYL	37
8. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	38
V. RESULTADOS	39
1. PROTOCOLOS IA2BC	39
1.1. Consumo de álcool dos animais por 7 semanas	39
1.2. Consumo de álcool dos animais tratados na oitava semana	40
2. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	41
2.1. Campo Aberto	42
2.2. Labirinto em Cruz Elevado	43
3. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E PESO CORPORAL E DE ÓRGÃOS	45
4. EXPRESSÃO DE CFOS	47
5. CORPÚSCULOS DE NISSL	51

VI. DISCUSSÃO	54
VII. CONCLUSÃO	59
VIII. REFERÊNCIAS	60
ANEXO – APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL	70

RESUMO

As opções farmacológicas para o tratamento do alcoolismo possuem limitações, e estudos em humanos têm mostrado ser a ayahuasca, uma bebida psicoativa ancestral de uso religioso/ritualístico com ação serotoninérgica, uma possível opção terapêutica. Os objetivos deste estudo foram avaliar o impacto da ayahuasca no consumo de álcool por ratos Wistar que consumiram álcool durante 8 semanas segundo o protocolo IA2BC (*intermittent access to 2-bottle choice*), avaliar a expressão da proteína cFos e substância Nissl em regiões cerebrais relevantes no processo de dependência e o comportamento dos animais nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Na 8ª semana do protocolo IA2BC, os ratos foram divididos em 5 grupos de 12 animais e tratados por 5 dias com H₂O (controle), naltrexona, um antagonista opioide utilizado no tratamento da dependência, ou com ayahuasca (Aya) nas doses 0,5, 1 e 2 X a dose ritualística. Um grupo sadio (n=4) não exposto ao álcool foi sacrificado na 7ª semana e os outros grupos 18 dias depois do tratamento. O tratamento com naltrexona ou ayahuasca não diminuíram o consumo de álcool com relação à linha de base (7ª. Semana), mas o consumo foi menor no grupo naltrexona em relação ao grupo H₂O. A exposição ao álcool aumentou a expressão da cFos em todas as áreas cerebrais, de maneira significativa principalmente no cortex medial pré-frontal e núcleo accumbens. Com relação ao grupo controle H₂O, a cFos foi significativamente menor no cortex medial pré-frontal para o grupo Aya0,5. O tratamento com naltrexona aumentou significativamente a expressão de cFos no núcleo accumbens e estriado em relação ao grupo controle. A exposição ao álcool aumentou a densidade de corpusculos de Nissl nas regiões neurais investigadas para os grupos H₂O, naltrexona e Aya2, grupos que também apresentaram aumento do peso do cérebro em relação ao grupo sadio. O tratamento com a naltrexona ou ayahuasca não tiveram impacto significativo no comportamento dos ratos expostos ao álcool nos testes comportamentais. O potencial da ayahuasca no tratamento da dependência ao álcool deve ser melhor investigado utilizando outros protocolos de exposição e tratamento. Adicionalmente, o aumento da expressão da cFos no estriado e núcleo accumbens em animais tratados com naltrexona (significativo) e ayahuasca não era esperado, e demanda estudos futuros.

Palavras-chave: Alcoolismo, ayahuasca, proteína cFos, vias dopaminérgicas.

ABSTRACT

Pharmacological options to treat alcohol addiction are limited, and human studies have demonstrated that ayahuasca, an ancestral infusion with serotonergic action used in religious ceremonies, has a potential use in the treatment. The objectives of this studies were to evaluate the effect of ayahuasca treatment on alcohol consumption of Wistar rats exposed to alcohol during 8 weeks according to the IA2BC protocol (intermittent access to 2-bottle choice), evaluate the cFos expression and Nissl substance in neural areas relevant to chemical addiction, and the animal behavior in the open field and elevated plus-maze tests. On the 8th week of the IA2BC protocol, the animals were divided in 5 groups of 12 animals and treated daily for 5 days with H₂O, naltrexone, an opioid antagonist used to treat alcohol addiction, and ayahuasca (Aya) at the 0.5, 1 or 2x the religious doses. A naïve group (n=4) not exposed to alcohol was sacrificed at the end of the 7th week and the other groups 18 hours after the last treatment. Treatment with either naltrexone or ayahuasca did not decrease the alcohol consumption compared to the baseline (7th week), but the consumption in naltrexone treated rats was significantly lower compared to the H₂O group. Exposure to alcohol increase cFos expression in all regions, an increase that was significant mainly in the medial orbital cortex and accumbens nu, core regions. cFos was significantly lower in the Aya0.5 group compared with the H₂O group in the medial orbital cortex. There was a significant increase in the cFos in the accumbens nu core and striatum for the naltrexone group. The exposure to alcohol increased the number of Nissl substance in the H₂O, naltrexone and Aya2 groups, which also showed an increased brain weight compared to the naïve group. Treatment with naltrexone or ayahuasca did not have significant impact on the behavior of the animals in both tests. The potential of ayahuasca treatment on alcohol addiction/consumption needs to be further investigated using other treatment protocols. In addition, the increase of cFos in the accumbens nu core and striatum in rats treated with naltrexone (significant) or ayahuasca was not expected and also requires further investigation.

Key words: Alcoholism, ayahuasca. cFos protein, dopaminergic pathways

I. INTRODUÇÃO

O álcool é uma substância psicoativa com potencial de causar dependência utilizada há séculos. O uso abusivo do álcool é um dos cinco maiores fatores de risco de doença e óbitos no mundo, estando relacionado a mais de 200 doenças, principalmente a dependência, cirrose hepática e câncer (WHO, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 3,3 milhões de mortes ocorreram no mundo em 2012, representando 5,9% de todos os óbitos globalmente (WHO, 2014). O II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, realizado em 2005 constatou que 38% da população brasileira tinha consumido álcool nos últimos 30 dias antes da pesquisa, e 12,3% da população era dependente (CEBRID, 2005). Estudo conduzido em 2010 mostrou que mais de 60% dos universitários brasileiros reportaram o consumo de álcool no último mês, e cerca de 25% deles reportaram episódio de alto consumo (*binge*) (CEBRID, 2010).

O álcool apresenta efeito depressor do sistema nervoso central, provoca uma desorganização na transmissão dos impulsos nervosos nos sistemas gabaérgico, glutamatérgico, serotoninérgico, opioides e dopaminérgico (WONG *et al.*, 2008). As opções farmacológicas para o tratamento do alcoolismo são restritas, sendo a naltrexona, um antagonista opioide, a mais utilizada, principalmente no caso de dependência grave. Porém, nem todos os pacientes respondem ao tratamento, o que exige a investigação de novas opções terapêuticas (STEENSLAND *et al.*, 2007).

A ayahuasca é uma bebida psicoativa originariamente utilizada em rituais de tribos indígenas da região amazônica. Esta bebida é geralmente preparada pela cocção de caules da *Banisteriopsis caapi*, que contém β -carbolicinas inibidoras da monoaminoxidase (MAO), enzima que degrada o neurotransmissor serotonina (5HT), e de folhas da *Psychotria viridis*, que contém N, N-dimetiltriptamina (DMT), um potente agonista do receptor de serotonina 5HT_{2A} (MACKENNA, 2004; SMITH *et al.*, 1998).

No Brasil, a ayahuasca tem sido incorporada em rituais de grupos sincréticos religiosos e seu uso no contexto religioso é considerado seguro e amparado por lei federal a partir de 1985. Atualmente, esses grupos religiosos têm se espalhado na Europa e América do Norte, chamando a atenção de pesquisadores internacionais quanto aos efeitos da ayahuasca. Estudos recentes têm indicado que a ayahuasca pode ter aplicações terapêuticas para vários males, inclusive no tratamento da depressão e dependência química (FRECSKA *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2016).

Existem atualmente várias religiões ayahuasqueiras realizando o trabalho de desintoxicação e tratamento de pessoas dependentes de álcool e outras substâncias químicas. Três centros reconhecidos de tratamento para a dependência que utilizam a ayahuasca, um localizado no Peru e dois no Brasil, apontam resultados positivos para a maioria dos dependentes químicos atendidos (MABIT, 2007; MERCANTE, 2013).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial terapêutico da ayahuasca no tratamento da dependência ao álcool utilizando o modelo rato *Wistar* por meio da medida do consumo de álcool, parâmetros comportamentais, atividade e viabilidade neural pela expressão da proteína cFos e corpúsculo de Nissl, nas regiões relevantes para o processo de dependência ao álcool.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ALCOOLISMO

O álcool etílico ou etanol é a substância psicoativa mais consumida no mundo, encontrado em bebidas alcoólicas fermentadas, como o vinho, cerveja, champanhe, e as destiladas como o uísque, aguardente, conhaque, gim e vodca (FERNANDES & FERNANDES, 2002). Sendo um composto usado para vários fins, o álcool está presente na humanidade desde os seus primórdios e sempre ocupou um local privilegiado em todas as culturas como elemento fundamental nos rituais religiosos, de presença constante nos momentos de comemoração, de confraternização e como fonte de água não contaminada (GIGLIOTTI & BESSA, 2004). Há mais de 7.000 anos a.C. o vinho era fabricado em certas regiões do Oriente Médio e utilizado em rituais de veneração aos deuses da agricultura que duravam dias seguidos. Segundo a mitologia, o deus egípcio Osíris teria ensinado aos homens a cultivar a videira e a cevada para a fabricação de bebidas (vinho e cerveja), que eram capazes de inspirar a alma (FERNANDES & FERNANDES, 2002).

Após o advento da destilação, o consumo de álcool começou a ser mais acessível, e seu uso mais frequente e abusivo, comportamento que foi considerado pela sociedade como fraco e amoral, numa tentativa de diminuir o consumo dessa substância (PETTA & MARQUES, 2001). No século XVIII, qualquer um poderia fabricar e vender o destilado em Londres, sendo comum encontrar pessoas prostradas nas calçadas, inconscientes e inertes pelo consumo excessivo da bebida (ARAUJO, 2012). A partir do século XIX o problema estava afetando a sociedade americana, que começou a se organizar para proibir o consumo de destilados. Criada em 1826, *American Temperance Society* idealizou o movimento “*beba com moderação*”, com o intuito de diminuir o consumo excessivo de álcool. Entre 1920 e 1933, por meio da “*Lei Seca*”, eram proibidos a produção, transporte e consumo de bebidas alcoólicas nos Estados Unidos. Porém, ao invés de diminuir o consumo de álcool, a lei gerou a desmoralização das autoridades, o aumento da corrupção e criminalidade e o enriquecimento das máfias que dominavam o contrabando de bebidas alcoólicas (LEVINE, 1985).

O conceito de alcoolismo surgiu no final do século XVII com Benjamin Rush e Thomas Trotter, o primeiro, um psiquiatra americano responsável pela célebre frase “*Beber inicia num ato de liberdade, caminha para o hábito e, finalmente, afunda na necessidade*”, e o segundo

foi o primeiro a se referir ao alcoolismo como doença (GIGLIOTTI & BESSA, 2004). Em 1849, o médico sueco Magnus Huss definiu o alcoolismo como conjunto de manifestações patológicas do sistema nervoso nas esferas psíquica, sensitiva e motora” observadas em indivíduos que utilizavam o álcool por prolongados períodos (HECKMANN & SILVEIRA, 2009). Em 1940, Morton Jellinek definiu o alcoolista como todo o indivíduo cujo o consumo de bebidas alcólicas pudesse prejudicar a si mesmo, a sociedade ou ambos, e categorizou o alcoolismo como doença, tendo como base as quantidades de álcool consumida (HECKMANN & SILVEIRA, 2009). Em 1952, a Associação Psiquiátrica Americana (APA), incluiu o alcoolismo no Manual Diagnóstico Estatístico das Desordens Mentais (DSM-I) (NIH, 2016). A classificação da APA de 1994 (DSM-IV) descreveu o abuso e a dependência como desordem relacionada ao uso de álcool, mas sua atualização publicada em 2013 (DSM-V), integrou as duas desordens numa única, denominada desordem do uso do álcool (*alcohol use disorder*, AUD), com subclassificações de leve, moderada e severa (NIH, 2016).

Após a ingestão, o álcool é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, 20% no estômago e 80 % pelo intestino (YIP, 2002). O álcool é então distribuído para os vários órgãos, e sua concentração no sangue é mantida por difusão reversa, que ocorre sempre que os níveis no sangue são menores que a dos tecidos. No fígado, o álcool é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase a acetaldeído, que é convertido a acetato pela enzima aldeído desidrogenase (Figura 1), e de 5-10% é excretado sem alteração pela urina, pulmão e suor (YIP, 2002). Apesar de a taxa de excreção do álcool pelos pulmões ser baixa, a razão alvéolos: sangue (1:2100) é constante e a base para os testes de bafômetros utilizado no mundo todo para estimar a concentração sanguínea do álcool (YIP, 2002).

O consumo de álcool é a causa mais comum das doenças hepáticas crônicas, causando cerca de 500.000 mortes no mundo todo em 2010 (PARKER *et al.*, 2018). Dano hepático pode ser causado pelo efeito direto do álcool no fígado ou indireto, por meio do dano a outros órgãos. A maioria dos indivíduos que consomem cronicamente o álcool desenvolve esteatoses, e um subgrupo desta população irá desenvolver doenças hepáticas crônicas dependendo do comportamento, genética e comorbidades, incluindo a obesidade (PARKER *et al.*, 2018). O consumo de álcool é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, como de ovário, próstata e fígado; o álcool é classificado como carcinogênico ao homem (Grupo 1A) pela Agência de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC) (SCHEIDELER *et al.*, 2018).

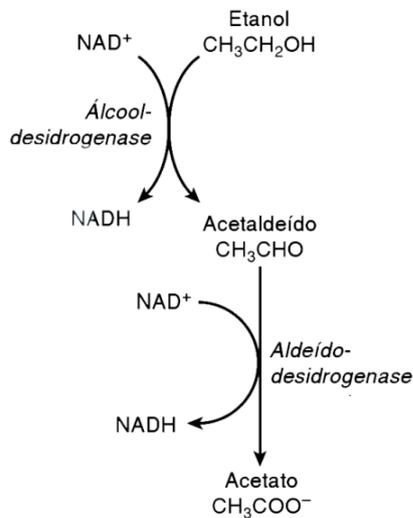


Figura 1. Metabolismo do álcool. Fonte: www.physio4dummies.wordpress.com/2017/06/30/drogas-alcool

O consumo crônico de álcool pode levar a deficiência nutricional e eletrolítica, pode causar encefalopatia de Wernicke e síndrome de Korsakoff, consequências da deficiência de vitamina B1, e síndrome de desmielinização osmótica; perda do volume cerebral é normalmente encontrada em usuários abusivos de álcool (LOGAN *et al.*, 2017). Os efeitos da intoxicação aguda com álcool incluem diaforese, taquicardia, hipotensão, hipotermia, midríase, ataxia, consciência alterada e coma (YIP, 2002). Estudos de imagem mostram que adolescentes e jovens adultos que, de maneira esporádica ou frequente, têm alto consumo de álcool, apresentam menor volume e espessura do córtex pré-frontal e regiões do cerebelo, e comprometimento do desenvolvimento da substância branca do cérebro (CSERVENKA *et al.*, 2017). Estes indivíduos também apresentam maior atividade cerebral nos lobos frontal e parietal envolvidos nos processos de memória, aprendizado e controle inibitório, e nas áreas mesocorticolímbico, incluindo o estriado, núcleo accumbens, hipocampo e amígdala. Anormalidades na atividade cerebral são também observadas em adolescentes com histórico familiar de alcoolismo, que pode significar um risco para o desenvolvimento de distúrbios relacionados ao uso de álcool (JACOBUS & TAPERT, 2013).

A síndrome do alcoolismo fetal (SAF) é o conjunto de sinais e sintomas apresentados pelo feto em decorrência da ingestão de álcool pela mãe durante a gravidez, e incluem déficit de crescimento, alterações em características faciais e atraso no desenvolvimento

neuropsicomotor. Mesmo baixos níveis de exposição pré-natal podem causar efeitos adversos ao feto, e atualmente não é possível se estabelecer um período ou nível de exposição segura que não afetaria o feto (SARMAN, 2018). Estima-se que cerca de 10% das mulheres em todo o mundo consomem álcool durante a gravidez (no Brasil, esta prevalência pode chegar a 25%) e 1,5% delas dão à luz a crianças com SAF (POPOVA *et al.*, 2017).

A tolerância metabólica ao álcool é uma função da regulação positiva de enzimas metabólicas no fígado (Figura 1), sendo necessário o aumento da dose ou o aumento frequente do consumo de etanol para se obter os efeitos farmacológicos psicoativos esperado pelo usuário e, junto com a dependência química, contribui para a manutenção do uso da droga. Em adultos, a taxa metabólica do álcool para consumidores ocasionais é de 100-125 mg/kg pc/hora, mas chega a 175 mg/kg pc/hora para consumidores habituais (YIP, 2002). O consumo crônico de álcool causa diferentes tipos de tolerância, incluindo a comportamental, que se refere à aprendizagem adaptativa, condicionamento operante e aprendizado associativo, podendo desencadear tolerância cruzada a outras drogas (ZALESKI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2001). As modificações sinápticas adaptativas contribuem para o desenvolvimento de tolerância ao álcool e dependência, sendo a resposta da ação do álcool sobre os canais iônicos, que leva a mudanças na função de receptores (YIP, 2002).

2. MECANISMO DE AÇÃO PSICOATIVA DO ÁLCOOL

O álcool é um depressor do sistema nervoso central (SNC) que regula a expressão de receptores de vários neurotransmissores, principalmente o ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do SNC, o glutamato, a dopamina, a serotonina e os opioides (CLAPP *et al.*, 2008; COSTARDI *et al.*, 2015). A Figura 2 mostra as principais regiões do cérebro afetadas pelo consumo do álcool. Os receptores GABA_A (GABA_A R) têm sido há muito implicados na mediação das ações do álcool no cérebro de mamíferos (CHARLTON *et al.*, 2010, COSTARDI *et al.*, 2015).

Mais recentemente, estudos têm sido conduzidos para identificar a proteína-receptor alvo desta ação e os ligantes dos canais iônicos (*ligand-gated ion channels*, LGIC) e voltagem dependentes envolvidos neste processo. Utilizando modelo de roedores expostos cronicamente ao álcool, Olsen & Liang (2017) concluíram que a dependência e o aumento do consumo voluntário do álcool estão ligados às alterações na plasticidade dos GABA_A R, principalmente

no desenvolvimento de sinapses inibitórias mediadas pelo receptor que participa na manutenção de recompensa pelo consumo de álcool. Estes efeitos provavelmente desinibem os terminais nervosos do sistema gabaérgico no circuito dopaminérgico de recompensa e no sistema límbico de modulação da ansiedade no hipocampo e amígdala.

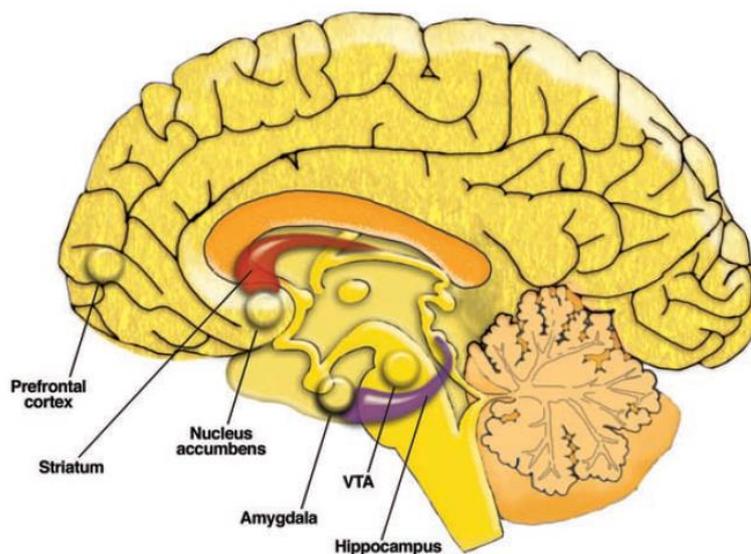


Figura 2. Regiões do cérebro afetadas pelo álcool, mostrando o sistema dopaminérgico mesolímbico, que inclui a área tegmental ventral (VTA), o núcleo accumbens, o córtex pré-frontal; a amígdala, o estriado e o hipocampo (CLAPP, 2008).

O núcleo central da amígdala (CeA) é crítico no processo de dependência ao álcool, e sua desregulação em alcoólatras leva a um estado emocional negativo, aumentando a motivação para beber. Varodayan *et al.* (2017) investigaram o papel dos canais de sódio voltagem dependente tipo L (LTCCs) no CeA a nível molecular, celular, comportamental, e o potencial de neuroadaptação após a ingestão aguda de álcool por ratos dependentes. Os autores propuseram que o álcool aumenta a atividade do CeA por meio do aumento da transmissão neuronal e liberação de GABA de ratos não dependentes (*naïve*) envolvendo os LTCCs, e o bloqueio destes canais reduz a ingestão de álcool nestes animais. Por outro lado, a dependência ao álcool reduz a abundância de LTCC no CeA, alterando os mecanismos moleculares de resposta destes canais ao álcool. Nessa situação, o receptor tipo 1 do fator liberador de

corticotropina (CRF1) medeia os efeitos do álcool na atividade do CeA e determina a escalada de consumo de álcool nos ratos dependentes. Este mecanismo está ilustrado na Figura 3.

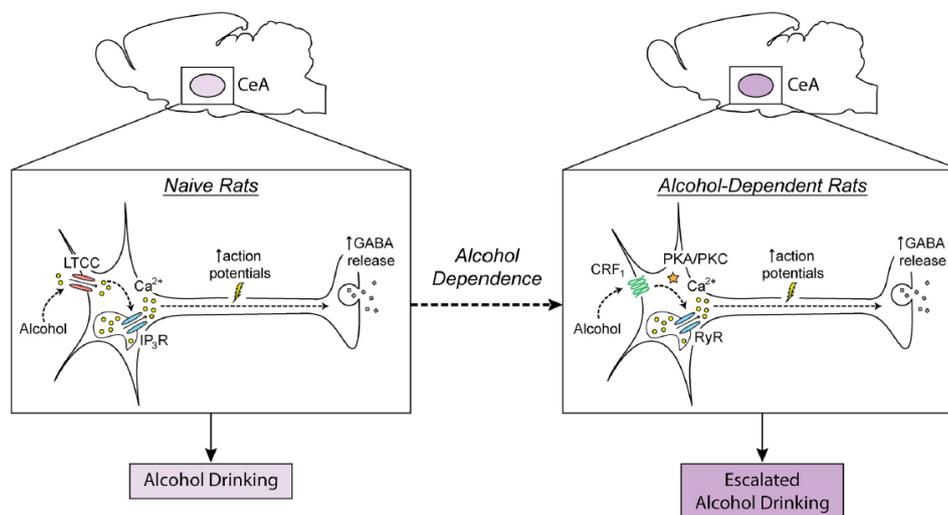


Figura 3. Mecanismo proposto envolvendo os canais de sódio voltagem dependente tipo L (LTCCs) na mediação da resposta neuronal à exposição ao álcool no núcleo central da amígdala (CeAs), que é alterada com a dependência e a resposta comportamental de neuroadaptação. Nos ratos não dependentes (*naive*) expostos ao álcool, a atividade no CeA é governada pelos LTCCs, enquanto que nos ratos dependentes, esta ação é mediada pelo receptor tipo 1 do fator liberador de corticotropina (CRF1) (VARODAYAN *et al.*, 2017).

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, e é liberado na fenda sináptica quando um sinal elétrico chega ao terminal axônio do neurônio pré-sináptico e interage com os receptores na superfície do neurônio pós-sináptico, principalmente o N-metil D-aspartato (NMDA) (CLAPP *et al.*, 2008). Vários estudos demonstram que a exposição aguda ao álcool inibe os receptores de NMDA em várias regiões do SNC, incluindo o hipocampo, córtex cerebral, amígdala e VTA, por meio de um mecanismo não competitivo com o glutamato, isto é, esta ação ocorre mesmo quando o glutamato está ligado ao receptor. Quando os receptores de glutamato são inibidos por um longo período devido à exposição crônica ao álcool, o organismo se adapta a esta situação, produzindo novos receptores para voltar à normalidade, mesmo em presença de álcool. Como consequência, o SNC entra em estado de superexcitação quando o álcool é retirado, característica da crise de abstinência (CLAPP *et al.*, 2008).

O álcool exerce seus efeitos no sistema de recompensa do sistema límbico, mediados pela liberação de dopamina no VTA e no núcleo accumbens, áreas ricas em receptores opioides (COSTARDI *et al.*, 2015). A ativação dos receptores opioides (principalmente os receptores, MOP, mu ou receptores μ) pelo álcool leva a liberação de dopamina, ativando o sistema de recompensa, ao mesmo tempo que bloqueia a ação inibidora do GABA, também aumentando a liberação de dopamina, relacionados com os efeitos positivos do álcool. A Figura 4 mostra os efeitos do álcool no sistema de recompensa.

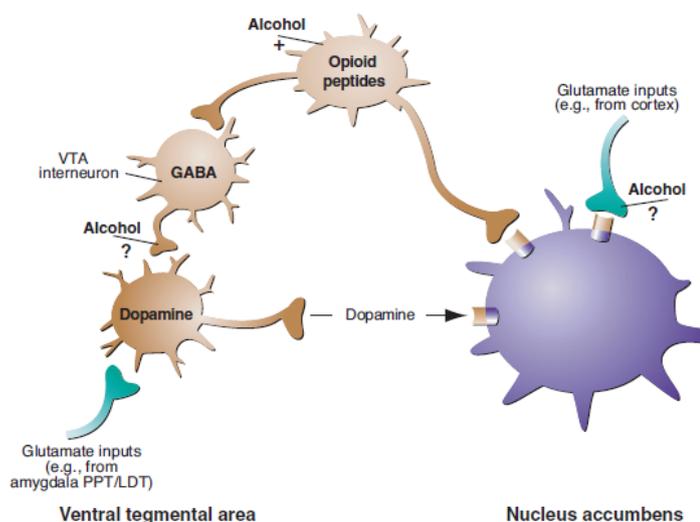


Figura 4. O álcool inibe a transmissão gabaérgica na área ventral tegmental (VTA), ativando a dopamina, e sua liberação no núcleo accumbens, ativando o sistema de recompensa. Ao mesmo tempo, o álcool pode inibir a liberação do glutamato dos terminais nervosos no núcleo accumbens (GILPIN & KOOP, 2008).

O sistema serotoninérgico também está envolvido nos mecanismos de abuso/dependência ao álcool. A baixa atividade de serotonina (5-HT) tem sido associada ao alto consumo de álcool, e alguns estudos mostraram que ratos com alta preferência por álcool apresentam níveis de serotonina menor que aqueles que não tem afinidade pelo álcool (MURPHY *et al.*, 2002; CASU *et al.*, 2004). Agentes antidepressivos da classe dos inibidores seletivos de recaptção de serotonina (SSRIs), que aumentam os níveis de serotonina na sinapse neural inibindo o transporte do neurotransmissor de volta à célula neural, reduzem o consumo de álcool em animais de laboratório, um efeito que varia largamente na espécie humana (NARANJO & KNOKE, 2001).

As ações da serotonina no organismo são mediadas por meio de receptores de membrana, sendo sete famílias já identificadas até o momento (5HT1 a 5HT7), das quais seis são acoplados a proteína G e um ligante de canais iônicos de Na⁺/K⁺ (5HT3), similar aos receptores de GABA e NDMA (KATSUNG, 2001; MOHAMMAD-ZADEH *et al.*, 2008). Os receptores 5-HT1 e 5-HT5 são negativamente acoplados ao adenilato ciclase e sua ativação regula negativamente a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). Os receptores regulam positivamente as vias do inositol trifosfato e diacilglicerol, resultando na liberação de Ca⁺⁺. A ativação do 5-HT₄ e 5-HT₇ aumenta a atividade de cAMP e a do 5-HT₃ leva a uma despolarização da membrana plasmática (MOHAMMAD-ZADEH *et al.*, 2008). Os receptores estão largamente distribuídos no cérebro (Figura 5) e sua função e localização determinam seu papel na modulação do consumo de álcool. Por exemplo, o aumento da ativação dos receptores 5-HT_{2C} ou 5HT_{1A} e a inibição dos receptores 5-HT₃ reduzem o consumo, mas alteração na atividade do receptor 5-HT_{1B} aumenta o consumo de álcool (CLAPP *et al.*, 2008)

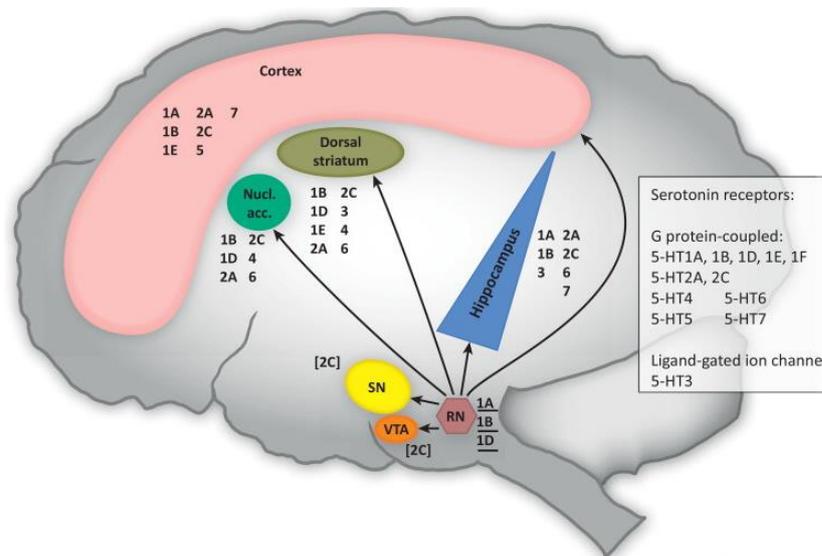


Figura 5. Localização dos receptores serotoninérgicos no cérebro. Fonte: www.flipper.diff.org/app/pathways/1521.

Num estudo de revisão, Marcinkiewicz *et al.* (2016) propuseram que as projeções de serotonina no VTA contribuem para os efeitos de reforço do álcool durante uma exposição aguda. A serotonina regula negativamente a dopamina via receptores 5-HT_{2C} no VTA, ao mesmo tempo que ativa a via dopaminérgica na mesma região via 5-HT₃. A serotonina está

envolvida nos efeitos advindos da abstinência do álcool via receptor 5-HT_{2C} na amígdala, principalmente no estriado e CeA, porém, esta ação tem efeito contrário no receptor 5-HT_{1A}. A projeção da serotonina no córtex pré-frontal tem um papel importante na dependência ao álcool, e o déficit do neurotransmissor nesta região pode contribuir para o uso compulsivo. Segundo os autores, o polimorfismo genético tem um papel importante na expressão dos receptores serotoninérgicos no circuito da recompensa, explicando os diferentes perfis de consumo, dependência e efeitos da abstinência na população humana. A Figura 6 mostra as projeções serotoninérgicas nas regiões cerebrais envolvidas na dependência ao álcool.

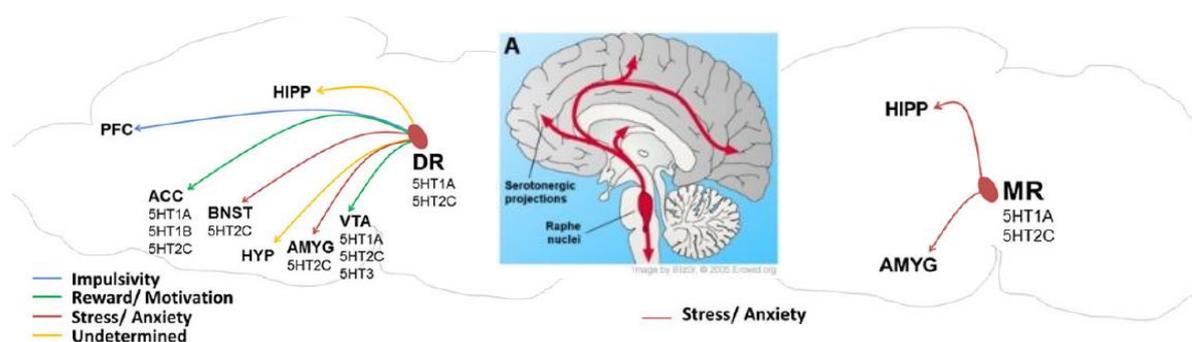


Figura 6. Projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (DR) e da rafe mediana (MR) para regiões implicadas na dependência ao álcool: hipocampo (HIPP), córtex pré-frontal (PFC), núcleo accumbens (ACC), estriado (BNST), hipotálamo (HYP), amígdala (AMYG) e área tegmental ventral (VTA) (MARCINKIEWCZ *et al.*, 2016, modificado). A: cérebro humano mostrando a localização do núcleo da rafe e as projeções serotoninérgicas.

3. PROPOSTAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DO ALCOOLISMO

As opções farmacológicas para tratamento de AUD incluem principalmente o acamprosato, antagonista dos receptores NDMA, naltrexona e nalmefene, antagonistas dos receptores opioides, e o dissulfuram, inibidor da acetaldéido dehidrogenase (Figura 1), todos aprovados também no Brasil, e o oxibato de sódio, agonista dos receptores GABA, registrado na Itália e Áustria (ANTONELLI *et al.*, 2018). O baclofeno, também agonista do receptor GABAB, tem indicação como relaxante muscular em casos de esclerose múltipla e Parkinson, entre outros estados clínicos, inclusive no Brasil, mas recebeu uma recomendação temporária de uso na França para tratamento de AUD (ANTONELLI *et al.*, 2018). O topiramato, indicado

em vários países, inclusive no Brasil, como anticonvulsivante, tem mostrado ser promissor no tratamento de AUD (GUGLIELMO *et al.*, 2015). Em um estudo de metanálise, Palpacuer *et al.*, (2018) concluíram não existir evidências farmacológicas fortes (*high-grade*) que nalmefene, naltrexona, acamprosato, baclofeno ou topiramato sejam eficazes em controlar o consumo de álcool em pacientes com AUD. No melhor cenário, alguns tratamentos mostraram uma eficácia média na redução do consumo, mas nenhum mostrou um benefício claro na saúde dos pacientes. Por outro lado, outros autores reconhecem que o uso destes medicamentos é eficaz, mesmo que moderadamente, e seguro (GOH & MORGAN, 2017).

3.1 Naltrexona

A naltrexona tem sido utilizada no controle da dependência de opioides desde 1984 e foi primeiramente utilizada no tratamento de AUD em 1994 (GOH & MORGAN, 2017). Junto com seu metabólito 6 β -naltrexol, a naltrexona age como antagonista dos receptores opioides, particularmente dos receptores μ , provavelmente reduzindo os efeitos de reforço do álcool nos receptores e modulando o sistema dopaminérgico mesolímbico (LITTLETON & ZIEGLGÄNSBERGER, 2003; ANTON, 2008). A afinidade da naltrexona e seu metabólito pelos receptores opioides é esperada quando se observa a similaridade estrutural destas moléculas com a morfina, agonista clássico desses receptores (Figura 7).

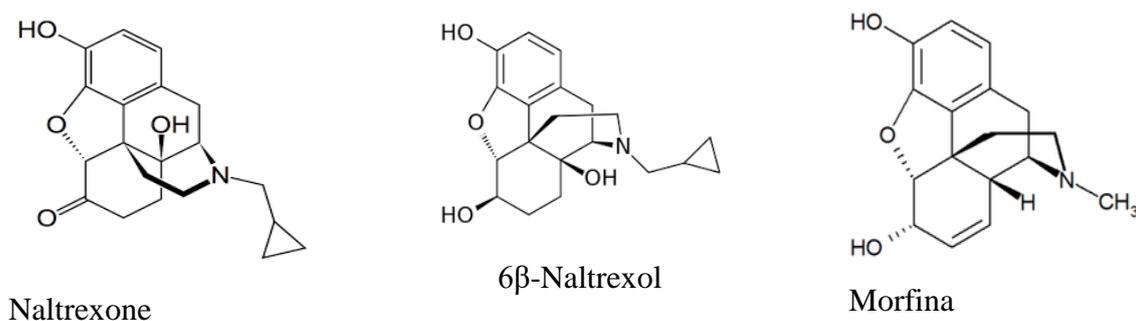


Figura 7. Estrutura química da naltrexona, seu metabólito 6 β -naltrexol e a morfina, agonista opioide.

Vários estudos clínicos demonstraram que naltrexona, combinado com suporte psicossocial, tem efeitos benéficos em indivíduos dependentes na redução do retorno ao alto consumo de álcool, na frequência e no volume de consumo, porém, ela não foi capaz de evitar

totalmente o retorno ao consumo (RÖSNER *et al.*, 2010). Apesar de efeitos adversos serem reportados durante o tratamento, principalmente gastrointestinais, com potencial dano ao fígado (ANTON, 2008), a naltrexona é recomendada como tratamento de primeira escolha em vários países, mas seu uso não pode ser concomitante ao de opioides (GOH & MORGAN, 2017).

4. PROTOCOLOS DE ACESSO LIVRE AO ÁLCOOL

Vários autores têm usado o modelo rato para avaliar os efeitos do álcool e o potencial de algumas drogas na diminuição do consumo (NAVARRO-ZARAGOZA *et al.*, 2015; CARNICELLA *et al.*, 2014). Um dos desafios nestes estudos é obter ratos de laboratório que consumam voluntariamente quantidades elevadas de álcool sem o uso de procedimentos de iniciação, como a inclusão de sacarose, alimentos e privação de água, ou emparelhamento como a estimulação elétrica cerebral (SIMMS *et al.*, 2008). Os procedimentos sem o estágio de iniciação envolvendo o acesso intermitente e voluntário ao álcool foram apresentados pela primeira vez no início de 1970 (WISE, 1973). Este modelo foi revisitado na última década (STEENSLAND *et al.*, 2007; SIMMS *et al.*, 2008), consolidando o protocolo que vem sendo utilizado por vários autores em modelo de roedores (LI *et al.*, 2010, CARNICELLA *et al.*, 2014; CARVAJAL *et al.*, 2017), e primatas (LINDELL *et al.*, 2017).

No protocolo IA2BC (*intermittent access to 2-bottle choice*), os animais têm acesso à solução alcoólica (normalmente 10 ou 20% de etanol) por 24 horas 3 vezes por semana, em dias intermitentes, com abstinência no sábado e domingo. Esse modelo induz um aumento gradual da ingestão voluntária de álcool, eventualmente atingindo os níveis de consumo de 5-6 g/kg/24 h, dependendo da linhagem de ratos, e induzindo concentrações de álcool no sangue farmacologicamente relevantes. Neste protocolo, o acesso intermitente ao álcool aumenta o consumo em até 4 vezes comparado com o acesso contínuo (CARNICELLA *et al.*, 2014; LINDELL *et al.*, 2017). Dependendo dos objetivos do estudo, os animais que não conseguem atingir um critério pré-definido de ingestão de álcool (*light drinkers*) podem ser excluídos do estudo (SIMMS *et al.*, 2008; CARNICELLA *et al.*, 2014).

Li *et al.*, (2010) utilizaram o protocolo IA2BC para avaliar o consumo voluntário de álcool por ratos Sprague-Dawley (solução alcoólica de 20%) e o impacto da administração de naltrexona neste consumo. O consumo de álcool aumentou significativamente até a quarta semana de exposição, quando alcançou níveis estáveis de $5,6 \pm 0,3$ g etanol/kg pc/24 horas. Na sexta semana, os ratos receberam doses diárias de naltrexona (2,0 mg/kg pc, i.p) por 6 dias (30

minutos antes do início da sessão de álcool). Os resultados mostraram que a naltrexona diminuiu significativamente o consumo diário de álcool nas três sessões de exposição, para cerca de 3 g etanol/kg pc/24 horas. Os autores também mostraram um aumento dos níveis das proteínas FosB/ Δ FosB no core do núcleo accumbens, na região dorsolateral do estriado e no córtex orbitofrontal dos animais durante as 5 semanas de exposição ao etanol, efeito que foi revertido pela administração de naltrexona (LI *et al.*, 2010).

A família de proteína Fos têm um papel importante na proliferação e diferenciação celular, está envolvida na resposta ao estresse, dano e morte celular, e no desenvolvimento da oncogênese (TULCHINSKY, 2000). Essa família contém quatro proteínas celulares, cFos, FosB, Fra-I e Fra-2, que, quando ativadas por um estímulo externo, interagem com proteínas Jun para formar dímeros Fos-Jun, que agem como fatores de transcrição (TULCHINSKY, 2000). Adicionalmente, a Δ FosB (ou FosB2) é uma FosB truncada, que não possui os 101 aminoácidos do terminal C, o que inibe a ação de transcrição do dímero (NAKABEPPU e NATHANS, 1991). A cFos tem sido amplamente utilizada para o mapeamento funcional de áreas cerebrais ativadas em processos que afetam o SNC (KOLBERTA *et al.*, 2004; DAY *et al.*, 2008). mRNA de cFos e a proteína têm sido um dos marcadores mais utilizados em eletrofisiologia *in vivo* ou imagem celular para avaliar a atividade neuronal em estudos de dependência de drogas, incluindo cocaína e heroína no córtex, estriado e núcleo accumbens (Cruz *et al.*, 2015).

Boerngen-Lacerda *et al.* (2013) desenvolveram um modelo de livre escolha de álcool com camundongos que envolve quatro fases. O modelo se inicia com a fase de aquisição (AC), onde por um período de 10 semanas os animais têm livre acesso a água, e soluções de etanol a 5% e 10%. Na fase de retirada (W), de duas semanas, apenas água é fornecida aos animais, e na fase de re-exposição (RE), de duas semanas, as soluções de álcool são novamente oferecidas para estabelecer o comportamento de beber de livre escolha. Finalmente, na fase de adulteração (AD), as soluções de álcool são adulteradas com 0,005 g/L de quinino, de sabor amargo, e oferecidas aos animais por um período de 2 semanas. Após esse período, cada camundongo foi classificado em diferentes perfis de acordo com o consumo de álcool: dependente (*addicted*)-preferência significativa por álcool durante todas as fases, consumido pesado (*heavy drinker*) - preferência significativa pelo álcool durante a fase AC e uma diminuição significativa no consumo de álcool durante a fase AD, e consumidor leve (*light drinker*) - preferência significativa por água durante todas as fases. Usando este modelo, os autores mostraram que a

mianserina (agonista inverso não seletivo dos receptores 5-HT₂), administrado antes da exposição, diminuiu o consumo de etanol por camundongos classificados em todos os perfis de consumo (BOERNGEN-LACERDA *et al.*, 2013). Outro estudo usando o mesmo modelo e realizando pelo mesmo grupo de pesquisa, mostrou que o baclofeno, um agonista dos receptores GABAB diminuíram o consumo de álcool somente nos animais com perfil de *light drinkers* (VILLAS BOAS *et al.*, 2012)

5. AYAHUASCA

Povos dos mais variados ecossistemas do planeta utilizam diversas técnicas para atingirem estados de alteração de consciência, incluindo o consumo de plantas ou fungos que contêm substâncias psicoativas. Das variadas plantas psicoativas utilizadas por populações indígenas da Bacia Amazônica, talvez nenhuma seja tão atraente botanicamente, quimicamente e etnograficamente como a bebida conhecida como ayahuasca. Por pelo menos quatro mil anos, povos indígenas utilizam essa bebida para fins curativos e espirituais (NARANJO, 1979). Classificada na língua indígena quéchua da América do Sul, a ayahuasca significa "videira das almas", que é aplicado tanto à própria bebida como às plantas utilizadas em sua preparação. Conhecida popularmente como yagé, oaska, nixi pae, daime, vegetal dentre outras, a ayahuasca é uma bebida preparada a partir da cocção do cipó *Banisteriopsis caapi* juntamente com várias plantas, a mistura mais comum é com o arbusto *Psychotria viridis* (MCKENNA, 1998).

5.1 CONTEXTO RELIGIOSO DA AYAHUASCA

Embora vários países da América do Sul, como Colômbia, Bolívia, Peru, Venezuela e Equador têm tradição do consumo de ayahuasca por xamãs e vegetarianos, o uso desta bebida no contexto religioso por populações não-indígenas surgiu no Brasil. A primeira vertente religiosa foi criada na década de 1930 pelo Cabo da Guarda Territorial Raimundo Irineu Serra, ou Mestre Irineu, que fundou o Santo Daime. Após um período de iniciação e depois de vários anos de contato com o uso da ayahuasca na região fronteira do Brasil, Mestre Irineu iniciou os trabalhos espirituais em Rio Branco, capital do Acre. Pesquisadores antropólogos descrevem a conexão profunda e a disciplina de Mestre Irineu com o sacramento da ayahuasca para receber o *insight* do culto religioso, relatado por MacRae (1992, p.62):

“Suas primeiras experiências teriam incluído a visão de lugares distantes, como o seu Maranhão natal, Belém do Pará e outros locais. Mas a principal seria a aparição repetida de uma entidade feminina, chamada Clara, e que veio a ser identificada com Nossa Senhora da Conceição, ou a Rainha da Floresta. Durante essas aparições, ela teria dado instruções a respeito de uma dieta que ele deveria seguir, preparando-se para o recebimento de uma missão especial e tornar-se um grande curador. Obedecendo a essas recomendações, Raimundo Irineu Serra se embrenhou na mata, onde ficou oito dias tomando ayahuasca, sem conversar com ninguém, evitando especialmente mulheres, pois as instruções eram de que ele não deveria vê-las nem pensar a respeito. Um dos episódios principais do Mestre Irineu a ser relatado sobre seu período de iniciação é a visão que ele teve da lua aproximando-se dele, trazendo em seu Centro uma águia. Era Nossa Senhora da Conceição, ou a Rainha da Floresta, que vinha lhe "entregar os seus ensinamentos". Essa "miração" teve importância fundamental no posterior desenvolvimento do trabalho de Mestre Irineu, passando a constituir o tema do seu primeiro hino, além de fornecer um dos principais símbolos do culto do Santo Daime, onde a lua representa a ideia de essa doutrina ter sido ensinada pela Virgem Mãe e a águia faz alusão ao grande poder de visão que é dado aos seus seguidores.”

Dando sequência aos trabalhos religiosos realizados pelo Mestre Irineu, outras religiões foram criadas, podendo ser encontradas hoje em diversas egrégoras. As principais delas e mais difundidas são a União do Vegetal (UDV) e a Barquinha, que mantêm o formato ritualístico, consagram o chá, e cantam hinos ou ouvem músicas e chamadas. Fundada em Porto Velho em 1961 pelo baiano José Gabriel da Costa (Mestre Gabriel), a UDV é a maior das religiões ayahuasqueiras brasileiras, com sede em Brasília, DF (<http://udv.org.br/>). O uso da ayahuasca no contexto religioso tem suporte legal no Brasil desde 1985 (CONAD, 2010), nos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa (LABATE & JUNGABERLE, 2011; HEALTH CANADA, 2017).

Vários estudos demonstram que o uso do chá nas doses ritualísticas é seguro, com baixo potencial de dependência, e com impacto positivo no perfil neuropsicológico dos usuários. Após a ingestão da ayahuasca nas doses ritualísticas observam-se alguns efeitos autonômicos como aumento do diâmetro pupilar, discreto aumento da frequência respiratória e temperatura oral, e elevação da pressão arterial (PA) sistólica, diastólica e média e da frequência cardíaca (CALLAWAY *et al.*, 1999; RIBA *et al.*, 2001). Os efeitos na área somática podem provocar náuseas, vômitos, tremores, tonturas, debilidade, contratura muscular, hiper-reflexia, e dores generalizadas (CALLAWAY & GROOB, 1998). Grupos de usuários da ayahuasca (urbano e

da floresta) tiveram escores menores no teste de Índice de Severidade de Dependência (ASI, *Addiction Severity Index*) relacionado ao uso de álcool e escalas de status psiquiátrico. Este resultado se manteve significativo depois de um ano de acompanhamento somente no grupo da floresta (FÁBREGAS *et al.*, 2010). Bouso *et al.*, (2012) avaliaram o perfil de usuários da ayahuasca com relação ao perfil psicológico (*Temperament and Character Test*), status psicopatológico (*Symptom Check-List-90-Revised*), performance neuropsicológica e comportamental (incluindo o *Wisconsin Card Sorting Test* e *Frontal Systems Behaviour Scales*) e atitudes subjetivas de vida (incluindo *Spiritual Orientation Inventory* e *Psychosocial Well-Being Test*). Os usuários apresentaram resultados mais positivos em vários testes comparados ao controle, incluindo nas medidas psicopatológicas e no Wisconsin Card Sorting Test, que mede a função executiva, que requer planificação, organização, habilidade de adaptação ao ambiente, objetividade e habilidade de modular respostas impulsivas. Os autores concluíram que não existem evidências de comprometimento psicológico ou cognitivo nos usuários da ayahuasca no contexto ritualístico. Resultados de um estudo internacional realizado no contexto do Global Drug Survey (2016) mostraram que usuários da ayahuasca (n = 527) reportam melhor bem estar que usuários de outras drogas alucinógenas (n = 18,138) e de não usuários dessas drogas (n = 78,236), e menos problemas de alcoolismo que usuários de alucinógenos (LAWN *et al.*, 2017). Os efeitos positivos do uso da ayahuasca na vida dos indivíduos e da comunidade têm sido demonstrado em vários outros estudos (ver revisão em HAMIL *et al.*, 2018).

5.2. Botânica e fito química da ayahuasca

Um dos maiores mistérios que acompanham o uso da ayahuasca é a forma de como as plantas que compõem o chá se encontraram num universo que possui infinitas possibilidades de combinações vegetais (NARANJO, 1979). O estudo sobre *B. caapi* iniciou-se com o botânico inglês Richard Spruce, que viajou entre 1849 e 1864 pela Amazônia brasileira, venezuelana, e equatoriana para inventariar as espécies de plantas destas regiões. A trepadeira utilizada por índios brasileiros da tribo Tukano foi primeiramente classificada por Spruce em 1851 como *Banisteria caapi*, e em 1931 foi reposicionada por Morton como *Banisteriopsis* (SCHULTES, 1986). É uma liana amazônica que pode chegar a 10 metros de altura e que ocorre no Brasil, Peru, Colômbia, Equador e Bolívia (NARANJO 1979). O cipó possui várias denominações vernaculares incluindo Jagube, Mariri, Cabi e Caupurí.

A *B. caapi* (Figura 8) contém os alcalóides β -carbolinas harmina, harmalina e tetrahydroharmina (Figura 9), as duas primeiras são inibidores reversíveis da monoamina oxidase A (MAO-A), e a terceira um inibidor fraco de recaptação da serotonina (CALLAWAY *et al.*, 1999). As concentrações de β -carbolinas encontradas na *B. caapi* variam de 0,05% a 1,95% de peso seco (MCKENNA, 1984; MCKENNA, 2004).



Figura 8. *Banisteriopsis caapi* em floração e colhido para feitiço do chá ayahuasca.

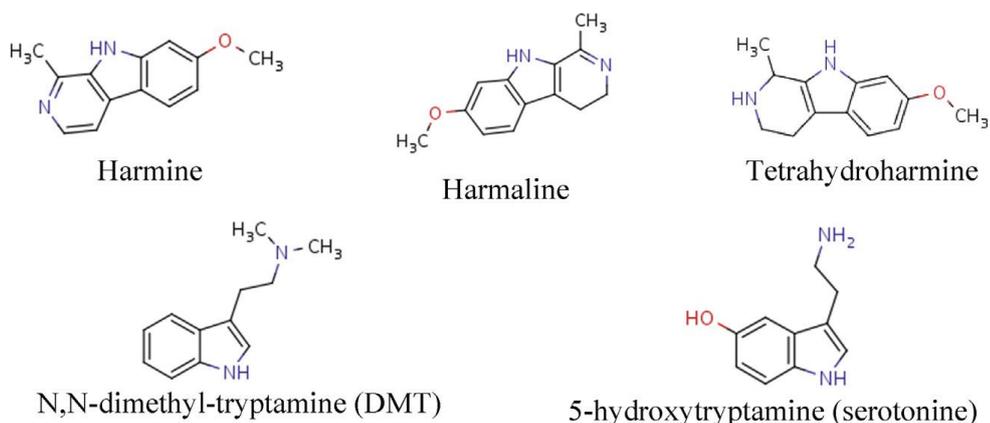


Figura 9. Estrutura química dos alcalóides da ayahuasca: harmina, harmaline e tetrahydroharmina, presentes na *Banisteriopsis caapi*, e N, N dimetiltryptamina (DMT), presente na *Psychotria viridis*. Observa-se a semelhança estrutural entre o DMT e o neurotransmissor serotonina (5-HT) (PIC-TAYLOR *et al.*, 2014).

As MAOs catalisam a desaminação oxidativa de catecolaminas endógenas presentes principalmente no cérebro (MAO-A e MAO-B), fígado e trato gastrintestinal (KOKAN, 2002). No cérebro, a MAO-A metaboliza principalmente dopamina, serotonina e norepinefrina, e a MAO-B metaboliza dopamina. Como a MAO-B representa 75% das MAOs no cérebro, inibidores seletivos dessa enzima (como selegilina) são usados para aumentar os níveis dopaminérgicos em pacientes parkinsonianos, enquanto inibidores seletivos da MAO-A (como isocarboxazida) têm sido prescritos frequentemente para depressão (KOKAN, 2002). Harmina, a principal β -carbolina presente na ayahuasca, é um potente inibidor (reversível) da MAO-A ($IC_{50}=2-5$ nM), facilitando a atividade oral do DMT na bebida atenuando sua desaminação oxidativa no fígado (MCKENNA *et al.*, 1984). Iurlo *et al.* (2001) propuseram que a inibição da MAO-A pela harmina medeia aumento do fluxo de dopamina no estriado, o que pode indicar seu envolvimento na transmissão dopaminérgica (BRIERLEY & DAVIDSON, 2012). Adicionalmente, as β -carbolicas podem também inibir a recaptação de serotonina (CALLAWAY *et al.*, 1999; COZZI *et al.*, 2009).

A *P. viridis* (Figura 10) é uma planta arbórea da família Rubiaceae, conhecida popularmente como chacrona ou rainha. As folhas contêm o *N, N*-dimetiltryptamina (DMT), um agonista dos receptores de serotonina, principalmente 5HT_{2A} (Figura 6). Além de se ligar ao receptor 5-HT_{2A}, o DMT é substrato do transportador de serotonina (SERT), inibindo a recaptação do neurotransmissor, que permanece por mais tempo na fenda sináptica (COZZI *et al.*, 2009). As concentrações de DMT encontradas na *P. viridis* estão na faixa de 0,10 a 0,66% de peso seco (MCKENNA, 1984; MCKENNA, 2004). Além da *P. viridis*, o DMT é encontrado em mais de 100 espécie de plantas, e sua presença no sangue e no cérebro humano foi reportada nas décadas de 1960-1970 (LIESTER & PRICKETT, 2012).

Quando ingerido por via oral, o DMT presente na *P. viridis* é inativado pela MAO no fígado e perde sua ação de agonista serotoninérgico. Sua ingestão conjunta com as β -carbolicas presentes na *B. caapi*, como no chá ayahuasca, inibe sua degradação pela MAO, permitindo sua chegada ao cérebro em concentração suficiente para se ligar aos receptores serotoninérgicos (CALLAWAY *et al.*, 1999, BRIERLEY & DAVIDSON, 2012).



Figura 10. *Psychotria viridis*.

Em um estudo com usuários da UDV há pelo menos 10 anos, Callaway *et al.*, (1994) mostraram que a ayahuasca aumentou a captação de serotonina nas plaquetas, sugerindo uma diminuição da concentração de serotonina extracelular ou a resposta a um aumento da produção e liberação do neurotransmissor. Mais recentemente, Pic-Taylor *et al.*, (2015) mostraram que ratos expostos a alta dose de ayahuasca (30X a dose ritualística; 150 mL por uma pessoa de 70 kg) tinham maior atividade neuronal nas áreas ricas em receptores 5-HT (núcleo dorsal da rafe, amígdala e hipocampo), mas a maior atividade não causou morte neural que resultasse em lesões definitivas nestas regiões. Castro-Neto *et al.*, (2013) encontraram um aumento nos níveis de GABA no hipocampo de ratos tratados com 250, 500 e 800 mg/kg pc de ayahuasca, aumento de serotonina nas duas maiores doses, e uma diminuição na taxa de utilização de serotonina no grupo de maior dose. Os níveis de noradrenalina, dopamina e serotonina foram aumentados na amígdala de ratos tratados nas três doses testadas, que tiveram uma menor taxa de utilização ou degradação dos neurotransmissores, provavelmente consequência da ação inibitória das β -carbolinas na MAO-A (CASTRO-NETO *et al.*, 2013).

5.3 Aspectos toxicológicos da ayahuasca

Estudos para avaliar o potencial toxicológico da ayahuasca foram conduzidos por nosso grupo de pesquisa utilizando ratos Wistar expostos oralmente (gavagem) ao material preparado pela UDV, e considerando uma dose ritualística correspondente a 150mL consumida por um

indivíduo de 70 kg. Uma dose ritual desta infusão corresponde a uma exposição de 3,3 mg/kg pc harmina, 0,3 mg/kg pc de DMT e 0,26 mg/kg pc de harmalina (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015).

A toxicidade aguda (única) da ayahuasca é muito baixa, ultrapassando 50X a dose ritualística em ratos fêmeas (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015). Porém, ratos (fêmeas e machos) expostos diariamente a doses a partir de 4X a doses ritualística foram a óbito após 3-4 dias de exposição (SANTOS *et al.*, 2017; MOTTA *et al.*, 2018). Num estudo de genotoxicidade conduzido com ratos (fêmeas e machos) expostos uma vez a 1, 5 e 15 X a dose ritual utilizando testes de micronúcleo, cometa e citometria de fluxo (Mello Jr. *et al.*, 2016). A infusão mostrou baixa toxicidade genotóxica, com aumento no número de micronúcleos apenas na maior dose, que também mostrou alterar o metabolismo lipídico. Uma dose de efeito adverso não observado (*no-observed-adverse-effect-level*, NOAEL) de 5X a dose ritual, correspondente a 16,5 mg/kg pc harmina e 1,5 mg/kg pc de DMT foi estabelecida para genotoxicidade da ayahuasca em ratos.

Em estudo para avaliar a toxicidade reprodutiva masculina, ratos foram expostos a doses de 1, 2, 4 e 8X a dose ritual por 70 dias intercalados (SANTOS *et al.*, 2017). Houve uma diminuição significativa do consumo de ração nos grupos 4X e 8X e diminuição significativa do peso corpóreo ao final do tratamento nos animais tratados com a maior dose. Animais expostos a dose de 4X mostraram aumento nos níveis sorológicos de testosterona total, diminuição no tempo de trânsito espermático e na reserva espermática na cauda do epidídimo em relação ao grupo controle, não foram observadas alterações nos outros indicadores reprodutivos nas doses testadas. Um NOAEL para efeitos reprodutivos masculino da ayahuasca em ratos Wistar foi estabelecida em 2X a dose ritual (6,6 mg/kg pc harmina e 0,6 mg/kg pc DMT).

Motta *et al.* (2018) avaliaram os efeitos reprodutivos da ayahuasca em ratas fêmeas expostas diariamente às mesmas doses do estudo de Santos *et al.* (2017) do sexto ao vigésimo dia de gestação (GD6-GD20). A ayahuasca mostrou uma toxicidade materna importante, sendo fatal a ratas tratadas nas duas maiores doses (44 e 52%), e ratas que sobreviveram tiveram dano renal. Ratas sobreviventes à maior dose tiveram também perda neural nas regiões do hipocampo e no núcleo da rafe, e ratas do grupo 2X tiveram perda neural na região hipocampal CA1. Ayahuasca causou atraso no crescimento e morte fetal, e anomalias (esqueléticas e viscerais) foram observadas em fetos do grupo 8X. Um NOAEL de toxicidade materna e reprodutiva de 1X a dose ritual foi estabelecida (3,3 mg/kg pc/dia harmina e 0.30 mg /kg pc/dia DMT). Oliveira *et al.*, (2010), utilizando o mesmo protocolo e doses similares de uma outra preparação de

ayahuasca (até 10X da dose ritual), não reportaram fatalidade materna e os comprometimentos no desenvolvimento fetal foram menos severos que os encontrados por Motta *et al.* É importante ressaltar que resultados dos estudos crônicos com a ayahuasca têm significância limitada no contexto religioso, onde o chá é normalmente consumido a cada quinze dias e mulheres grávidas são aconselhadas a tomar doses menores que a usual (MOTTA *et al.*, 2018). Porém, mulheres em idade reprodutiva devem se abster do uso recreativo do chá durante a gestação.

5.4 Potencial terapêutico da ayahuasca

A literatura acumula evidências de estudos com humanos que demonstram que o uso da ayahuasca no contexto religioso pode ter efeitos terapêuticos em usuários com problemas de alcoolismo e outras drogas (FÁBREGAS *et al.*, 2010; BOUSO *et al.*, 2012; LAWN *et al.*, 2017; CRUZ & NAPPO, 2018). Porém, a influência do contexto religioso nestes estudos não pode ser descartada, sendo necessários estudos farmacológicos utilizando modelos animais para investigar melhor esse efeito.

Oliveira-Lima *et al.* (2015) avaliaram os efeitos da ayahuasca (administração intraperitoneal, i.p) no comportamento locomotivo de camundongos tratados com álcool (i.p). O uso prévio da ayahuasca foi eficiente para prevenir o comportamento de hiperlocomoção característico da exposição ao álcool, em todas as doses testadas (30-500 mg/kg pc) e a bebida foi capaz de reverter este comportamento em animais expostos previamente ao álcool (1,8 g/kg pc por 14 dias).

Um estudo realizado em humanos mostrou que o grupo que recebeu terapia assistida com ayahuasca reduziu significativamente o consumo de cocaína (THOMAS *et al.*, 2013). Centros terapêuticos que combinam elementos da medicina moderna ao uso cerimonial da ayahuasca, como o Takiwasi (no Peru) e o IDEAA (no Brasil), e as religiões ayahuasqueiras no Brasil, trazem evidências na perspectiva de modelos teóricos interdisciplinares, considerando sobretudo, as abordagens da antropologia e da psicologia transpessoal. O Takiwasi, um centro de reabilitação referência, foi co-fundado por Jacques Mabit, um médico francês naturalizado peruano, no ano 1992. Ali, curandeiros locais, médicos, psicólogos e terapeutas exploram os potenciais curativos das terapias ocidentais juntamente com técnicas terapêuticas tradicionais amazônicas. Eles desenvolveram um protocolo de tratamento utilizando ayahuasca, plantas

eméticas (que provocam vômito), dietas (isolamento na floresta com jejum especial e ingestão de plantas medicinais), “sopladas” (rapé), vida comunitária, atividades manuais, artísticas e psicoterapia. Uma proposta do tratamento da dependência química com o uso ritual da ayahuasca”, foi apresentada no “1º Congresso sobre Drogas e Dependência”, organizado pela Associação Brasileira Multidisciplinar de Estudos sobre Drogas (ABRAMD) em 2008.

Liester & Prickett. (2012) apresentam três hipóteses que explicariam a ação da ayahuasca no tratamento da dependência química: 1) redução dos níveis de dopamina na via mesolímbica devido à ativação dos receptores serotoninérgicos resultante da ingestão da ayahuasca; 2) esta redução interfere na plasticidade sináptica associada ao desenvolvimento e manutenção da adicção; e 3) a ayahuasca auxilia na resolução de traumas, encoraja a compreensão das escolhas individuais e a capacidade de decisão.

A redução da liberação de dopamina nas vias mesolímbicas, nigrostriatal e mesocortical resultante da estimulação dos receptores 5-HT_{2A} envolve duas vias: o agonismo dos receptores pós-sinápticos por neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos leva a uma ação inibitória indireta na liberação de dopamina, e o agonismo nos receptores pós-sinápticos ativa o GABA interneuronal, que inibe a liberação de dopamina. A redução da liberação de dopamina como consequência da ativação dos receptores 5-HT_{2A} tem suporte em estudos de imagem, que também mostram que o antagonismo desses receptores leva a um aumento da liberação de dopamina (STAHL, 2008). Adicionalmente, como a dopamina tem uma ação inibitória na liberação da prolactina, e o agonismo de 5-HT_{2A} promove a liberação do hormônio na glândula pituitária (STAHL, 2008), o aumento nos níveis de prolactina observado em usuários da ayahuasca (MCKENNA *et al.*, 1998; dos SANTOS *et al.*, 2012) pode ser indicativo da diminuição dos níveis dopaminérgicos causados pelo agonismo no 5-HT_{2A} (LIESTER & PRICKETT, 2012). Desta maneira, a ação terapêutica da ayahuasca é resultado da diminuição da dopamina nas regiões de recompensa do cérebro.

A liberação de dopamina na via mesolímbica afeta a plasticidade sináptica, que tem sido associada ao desenvolvimento e manutenção da adicção (SAAL *et al.*, 2003). O uso continuado de alguma droga psicoativa aumenta o fluxo de dopamina do VTA para a amígdala na via mesolímbica (Figura 4), resultando em mudanças adaptativas estruturais na arquitetura neural (plasticidade), que levam ao reforço do comportamento aditivo (STAHL, 2008). Segundo Liester & Prickett. (2012), similar ao que ocorre na via estriatal depois do bloqueio dos

receptores D2 (TOST *et al.*, 2010), uma reversão desta plasticidade pode ocorrer quando os níveis dopaminérgicos caem em função da ativação dos receptores 5HT2A pela ayahuasca.

Além do potencial terapêutico da ayahuasca na dependência química, outros estudos avaliaram este potencial no tratamento da depressão, Parkinson e câncer (DOMINGUEZ-CLAVÉ *et al.*, 2016; SANCHES *et al.*, 2016; FRECSKA *et al.*, 2016). Recentemente, Palhano-Fontes *et al.*, (2018) conduziram um estudo duplo cego placebo-controle com 29 pacientes com depressão resistentes à depressão, que receberam dose de 1 mL/kg placebo ou de ayahuasca (contendo 0.36 mg/kg N, N-DMT), o que corresponde a um pouco mais de 1X usual utilizada nos estudos realizados no nosso grupo de pesquisa (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015; MOTTA *et al.*, 2018). Os autores observaram efeitos antidepressivos significantes da ayahuasca comparado com o controle utilizando escalas de depressão Hamilton (HAM-D) e Montgomery-Åsberg (MADRS), confirmando outros estudos realizados anteriormente com usuários da ayahuasca (OSORIO *et al.*, 2015; SANCHES *et al.*, 2016). O potencial antidepressivo da ayahuasca foi demonstrado também por Pic-Taylor *et al.*, (2015) em ratas Wistar tratadas com 30X a dose usual. Schennberg *et al.*, (2015) avaliaram nove estudos de caso (oral ou escrito) em humanos que reportam o uso da ayahuasca no tratamento de câncer, incluindo de próstata, ovário e cérebro. Segundo Schennberg *et al.*, e outros autores (FRECSKA *et al.*, 2013), a ação antitumorogênica da ayahuasca está provavelmente relacionada à interação do DMT com os receptores sigma-1, recentemente descrita por Fontanilla *et al.*, (2009). Sig-1Rs são moduladores intracelulares dos sistemas de transdução de sinal que influenciam a transferência de cálcio no retículo mitocondrial e regulam o sistema bionérgico celular, particularmente sob condições de estresse (FRECSKA *et al.*, 2013). Adicionalmente, é sabido que harmina ativa a via de apoptose de células de melanoma, inibe a formação de novos vasos específicos de tumores e reduz a proliferação de células de leucemia (SCHENNBERG *et al.*, 2015).

III. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o impacto do uso da ayahuasca no consumo crônico intermitente de álcool por ratos Wistar e a atividade neuronal dos animais em áreas importantes para a dependência ao álcool.

ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a mudança no perfil de consumo de álcool de ratos Wistar no modelo IA2BC (*interminent access to 2-bottle choice*) após exposição diária da ayahuasca nas doses 0,5, 1 e 2 X a dose ritualística.
- ✓ Avaliar o comportamento de ratos expostos ao álcool e em tratamento por meio dos testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.
- ✓ Determinar a atividade neural dos animais pela expressão da proteína cFos nas regiões relevantes para o processo de dependência ao álcool: córtex medial prefrontal, córtex orbitoventral e córtex orbitolateral, estriado e *core* do núcleo accumbens.
- ✓ Analisar a quantificação da densidade neuronal por técnica de Nissl nas mesmas áreas.

IV. MATERIAS E MÉTODOS

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes recomendadas pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e pelo *Guideline for the Testing of Chemicals*, e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do ICB/UnB (UnBDoc 73276/2014; Anexo).

1. AYAHUASCA

A ayahuasca utilizada no estudo foi cedida pelo Núcleo Luz do Oriente da União do Vegetal (UDV), com sede na cidade de Braslândia - DF. O chá foi preparado num feitio em 2011, sendo feito a partir da decocção do *B. caapi* colhido em águas lindas de Goiás (Azevedo EP149880 BRAHMS), e das folhas da *P. viridis* colhidas na cidade de Sobradinho-DF (Trieto B149879 BRAHMS). O chá foi congelado a -20°C e liofilizado para a realização do estudo. A densidade do chá foi determinada a partir da pesagem de dez amostras de 10 mL liofilizadas separadamente, e sua densidade média foi estimada em 0,1615 g/mL.

Para a caracterização química e quantificação dos componentes do chá foram utilizados padrões de β -carbolinas harmina e harmalina, 99,2% e 98% de pureza, respectivamente (Sigma Aldrich). O DMT foi sintetizado seguindo a metodologia descrita por Qu *et al.* (2011), e a tetrahydroharmina sintetizada a partir da harmalina, segundo Callaway *et al.* (1996). A identidade e pureza da DMT e da tetrahydroharmina foram determinadas por LC-MS/MS (Shimadzu LC sistema acoplado a um espectrofotômetro de massas 4000 QTRAP, Applied Biosystem), ^1H and ^{13}C - NMR (Varian Mercury Plus spectrometer 7.05 operating at 300 MHz for ^1H and at 75.46 MHz for ^{13}C) e LC-MSD TOF (Agilent 1100 Series). Os níveis de DMT, harmina, harmalina e tetrahydroharmina presentes no chá foram determinados por CG-MS/MS (Trace Ultra coupled with a TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole; Thermo Scientific): 0.12 mg/mL de DMT, 1,12 mg/mL de harmina e 0,08 mg/mL de harmaline e 0,15 mg/mL tetrahydroharmina

O material liofilizado (Figura 11), foi solubilizado em água nos dias de tratamento, e a dose calculada proporcionalmente ao peso de cada animal foi relacionada à dose usual durante um ritual da UDV (150 mL de chá por um indivíduo de 70 kg) nas concentrações de 0,5X, 1X e 2X a dose usual.



Figura 11. Amostra do chá ayahuasca liofilizado, utilizado durante o estudo.

2. ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizados no estudo 64 ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos adultos com idade de sete semanas, pesando em torno de 250 g, com variação máxima de 20% entre os animais, originários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sendo acomodados individualmente em gaiolas de polipropileno de grade zincada com disposição para dois bebedouros de água (Figura 12). As caixas foram alojadas em estante ventilada da Alesco®, mantendo o controle de temperatura (20 ± 2 °C) e 12 horas ciclo luz/escuro (05:00/17:00 hs). Ração Purina® e água estavam disponíveis *ad libitum*, antes do início do experimento os animais passaram por um período de aclimação de sete dias.



Figura 12. Gaiola contendo dois bebedouros, de água e álcool 20%.

3. PROTOCOLO IA2BC (INTERMINENT ACCESS TO 2-BOTTLE CHOICE).

3.1 Fase de condicionamento ao consumo de álcool

Primeiramente, foi realizado um pré-teste para a otimização e ajustes do protocolo IA2BC utilizando 10 animais (Souza, 2017). No ensaio foi demonstrado que o controle positivo (naltrexona) diminuiu significativamente o consumo de álcool dos animais expostos durante a 8ª semana de exposição, segundo previsto por Li *et al.* (2010).

Neste estudo, 60 animais foram expostos ao álcool (etanol), e 4 animais foram usados como controle sadio (Grupo sadio), sem exposição ao álcool durante todo o período do estudo. Durante um período de 7 semanas, todas as segundas, quartas e sextas-feiras, os 60 animais eram pesados e tinham acesso simultâneo a partir das 17:00 h a dois bebedouros de acrílico ou plástico de 250 mL com bicos de entrada de aço inoxidável, um com etanol 20% (álcool etílico absoluto PA, 99,8%, Dinâmica®) e outro com água filtrada (Figura 12). A hora da disponibilidade do álcool etanol corresponde com o início do ciclo escuro, que estimula o consumo de álcool pelo animal (CARNICELLA *et al.*, 2014). Os bebedouros foram inseridos em 2 depositórios na frente da gaiola, 15 minutos antes que as luzes apagassem. O bebedouro com álcool foi pesado antes de ser posicionado na gaiola, e após 24 horas, foi novamente pesado para estimar o volume de solução de etanol 20% consumido nas 24 horas, e expresso em g de álcool por quilograma de peso corporal do animal. Este bebedouro foi então substituído por uma segunda garrafa de água que ficou disponível nas próximas 24 horas. Em cada sessão de acesso, a posição da garrafa de álcool foi alternada para não influenciar a preferência do animal. Durante o pré-teste e contato com o Prof. Sebastien Carnicella, da Universidade da Califórnia, São Francisco (USA), indicaram a necessidade de preencher quase todo o volume do bebedouro com a solução alcóolica para evitar vazamentos na hora de posicioná-lo na caixa e durante as 24 horas de exposição. Adicionalmente, a cada sessão, um bebedouro contendo a solução alcóolica foi colocado em uma gaiola sem ratos para avaliar o derrame potencial durante as sessões de teste. O grupo sadio (n=4) foi exposto a água *ad libitum* ao longo das 7 semanas, quando foram submetidos ao procedimento de eutanásia (ver posteriormente).

3.2 Fase de tratamento (oitava semana)

O protocolo IA2BC foi repetido durante a oitava semana, quando os 60 animais expostos foram divididos em 5 grupos, com 12 animais cada: grupo H2O: sem exposição a ayahuasca (controle negativo; água); grupo NTX: exposição a naltrexona (controle positivo), grupo AYA 0,5: tratado com ayahuasca na dose 0,5X a dose usual; grupo AYA 1: tratado com a ayahuasca na dose 1X a dose usual, e grupo AYA 2: tratado com a ayahuasca na dose 2X a dose usual. Água, naltrexona ou ayahuasca foram administrados durante 5 dias consecutivos, iniciando na segunda-feira, juntamente com a primeira sessão de álcool. Água e ayahuasca foram administrados por gavagem (2 mL), e naltrexona pela via intraperitoneal (2 mg/kg pc). A naltrexona utilizada no estudo foi preparada a partir do medicamento disponível comercialmente (Uninaltrex® 50 mg/drágeas, comprimidos revestidos, laboratório GENOM®). O comprimido foi macerado e solubilizado em solução de cloreto de sódio 0,9%, com o auxílio de um ultrassom, para uma concentração final 1 mg/mL.

Entre 18 e 20 horas após a última oferta de álcool e tratamento (na sexta-feira), os animais passaram pela avaliação comportamental (campo aberto e labirinto em cruz elevada), e em seguida foram eutanasiados para a coleta de amostras biológicas.

4. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

4.1 Campo aberto

O teste de campo aberto (CA) foi desenvolvido por Hall (1934) como ferramenta para avaliar a emocionalidade de ratos, e tem sido utilizado como parâmetro de locomoção e de ansiedade animal. Este modelo é baseado na aversão do roedor a espaços abertos e uma tendência a permanecer perto das paredes, um comportamento conhecido como tigmotaxia (LAMPREA *et al.*, 2008). Um aumento na ambulação do animal e maior permanência na região central do CA seriam indicativos de uma redução da ansiedade (PRUT & BELZUNG, 2003).

O aparato de campo aberto utilizado neste estudo consiste de uma arena circular de madeira 96 cm de diâmetro e 34 cm de altura, sendo o chão dividido em 18 quadrantes e um círculo central (Figura 13). Os animais foram colocados no centro na arena e filmados durante 5 minutos, durante os quais foram contados o número de quadrantes atravessados, número de vezes em que o animal se colocou sobre suas patas traseiras em elevação (*rearing*), vezes que o animal executou autolimpeza com as patas anteriores (*grooming*), número de vezes que

defecou e urinou. Ao final da sessão com cada animal, a arena foi limpa com álcool etílico 70% (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015).



Figura 13. Arena de Campo Aberto.

4.2 Labirinto em Cruz Elevado

Imediatamente após a finalização do teste de CA, o animal foi colocado no Labirinto em Cruz Elevado (LCE), um modelo utilizado na pesquisa pré-clínica para avaliar medo e ansiedade (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985). Este modelo é baseado no medo inato de animais roedores por espaços abertos e elevados, onde drogas ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (PELLOW *et al.*, 1985).

O aparato de LCE (Figura 14) foi feito de madeira com dois braços fechados e dois braços abertos de 50 cm de comprimento cada, pintado de preto internamente, com uma elevação de 38 cm da superfície e uma plataforma central de 10 x 10 cm. Os animais foram colocados no centro do LCE adaptado com equipamento de filmagem, por 5 minutos para avaliação do número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, o número total de elevações e de autolimpeza, e número de vezes que o animal defecou e urinou.



Figura 14. Labirinto em Cruz Elevado.

5. EUTANÁSIA E PERFUSÃO

Todos os animais foram submetidos a uma alta dose de tiopental (100 mg/kg i.p) no quadrante inferior direito com o animal em decúbito dorsal, e foram observadas a diminuição da postura e da movimentação, as reações táteis e perda dos reflexos das extremidades. Com o animal profundamente anestesiado, foi realizada uma abertura na cavidade torácica para a coleta de 5 mL de sangue por pulsão cardíaca para realização de hemograma: leucócitos ($1E9/L$), eritrócitos ($10E12/L$), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg e g/dL), plaquetas ($10E9/L$), volume plaquetário médio (fL), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (%), linfócitos (% e $10E9/L$), monócitos (% e $10E9/L$) e glanulócitos (% e $10E9/L$).

Em seguida, o animal foi submetido a uma perfusão transcardíaca com o auxílio de bomba peristáltica (Figura 15), que foi introduzida no ventrículo esquerdo bombeando uma solução salina tamponada de fosfato de sódio pH 7,4 (PBS) que circulou por dez minutos; o átrio direito foi perfurado para o extravasamento sanguíneo. Ao término, a solução salina foi

trocada por paraformaldeído 4% em PBS, que circulou por mais 7 minutos no animal para a fixação das células (Gage, et al., 2012).

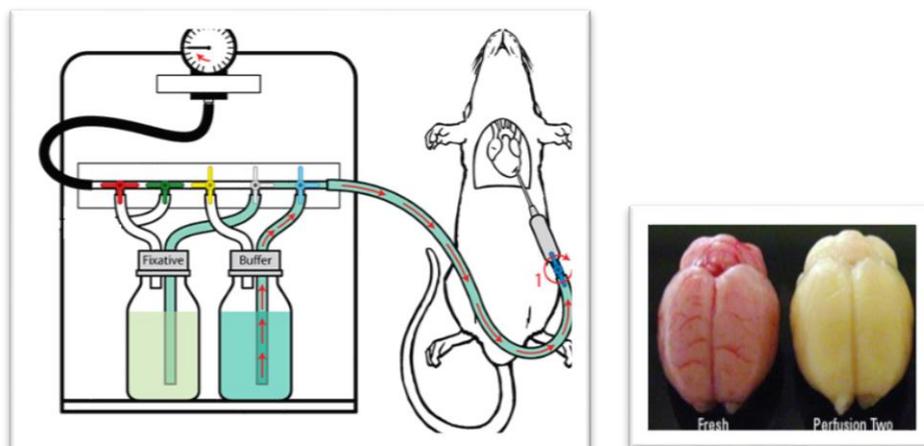


Figura 15. Ilustração da técnica de perfusão transcárdica do rato. Fonte: (adaptado, Gage, et al., 2012). A figura da esquerda mostra um cérebro fresco e um perfundido.

A cabeça foi separada do resto do corpo do animal com o auxílio da guilhotina, e com um alicate de ponta fina, fez-se cuidadosamente um pequeno corte na região de inserção da coluna vertebral em direção à parte superior do crânio (Figura 16). A pele que reveste o cérebro (dura-máter) foi removida com cuidado com o auxílio de uma tesoura de ponta fina, rompeu-se os nervos e ligamentos com uma espátula, e o cérebro foi colocado em placa de Petri limpa e esterilizada. O cérebro foi pesado, transferido para tubo falcon contendo solução de fixação (formalina 4% tamponada) durante 24 horas para subsequente armazenamento em solução de sacarose 30% e paraformaldeído 4%, para a crioproteção. O cérebro foi mantido em refrigerador por no mínimo 72 horas antes do processamento. Adicionalmente, foram coletados do animal o coração, pulmão, fígado, rins, estômago e intestino, que foram lavados em solução salina (0,9% NaCl), pesados e submetidos a uma avaliação macroscópica quanto ao aspecto, coloração, tamanho e consistência.

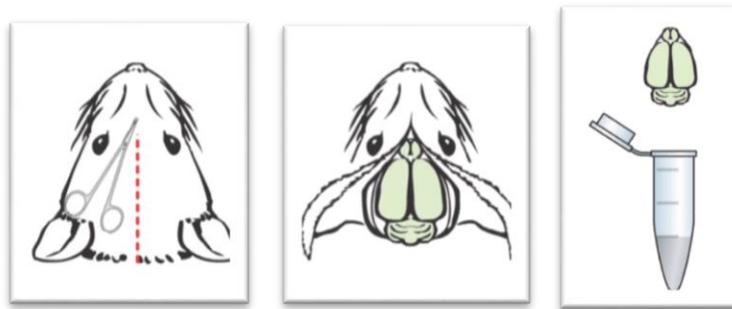


Figura 16. Ilustração da extração do cérebro do animal (Gage, et al., 2012)

Os cérebros foram cortados em secções de 30 μm de espessura no vibrátomo elétrico KD-400 (velocidade de 0,15 mm/min e frequência máxima de 100Hz), os cortes foram colocados em placas de 24 poços contendo solução antifreezing (glicerina, etilenoglicol e H₂O) e mantidos na geladeira até os testes de imuno-histoquímica (cFos) e de Nissl. Foram utilizados três cortes seriados de cada região do cérebro para cada animal para cada teste. As regiões investigadas foram o córtex medial préfrontal, córtex orbitoventral, córtex orbitolateral, o *core* do núcleo accumbens e estriado (Figura 17).

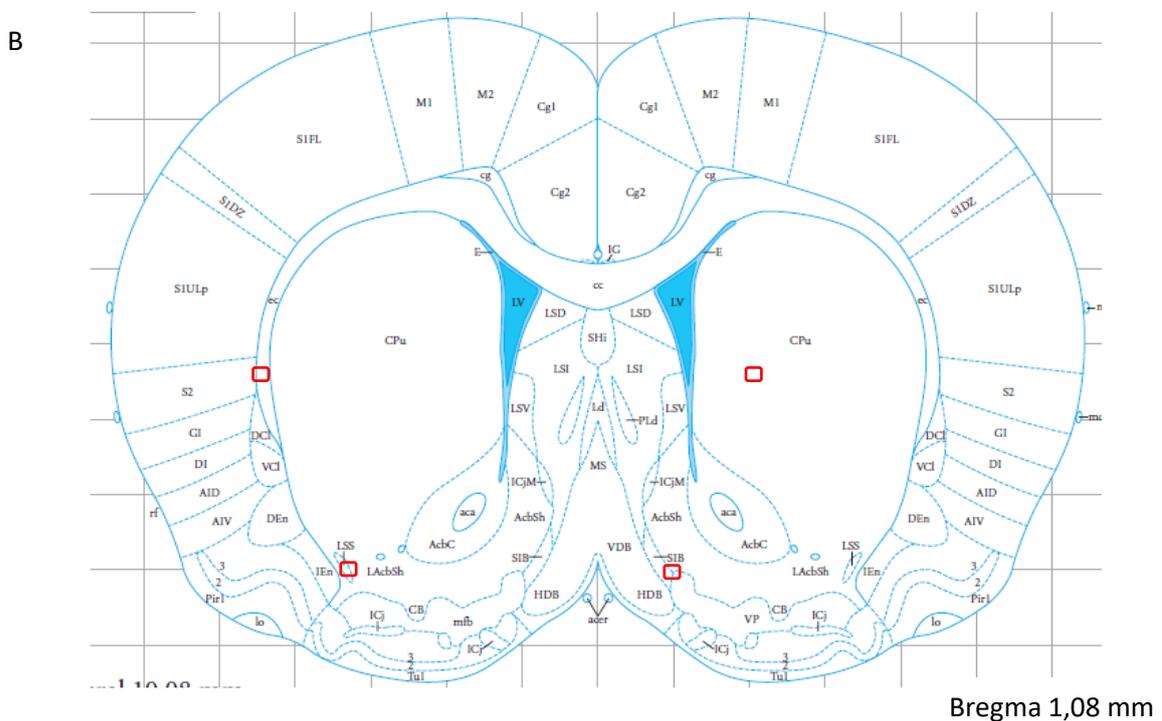
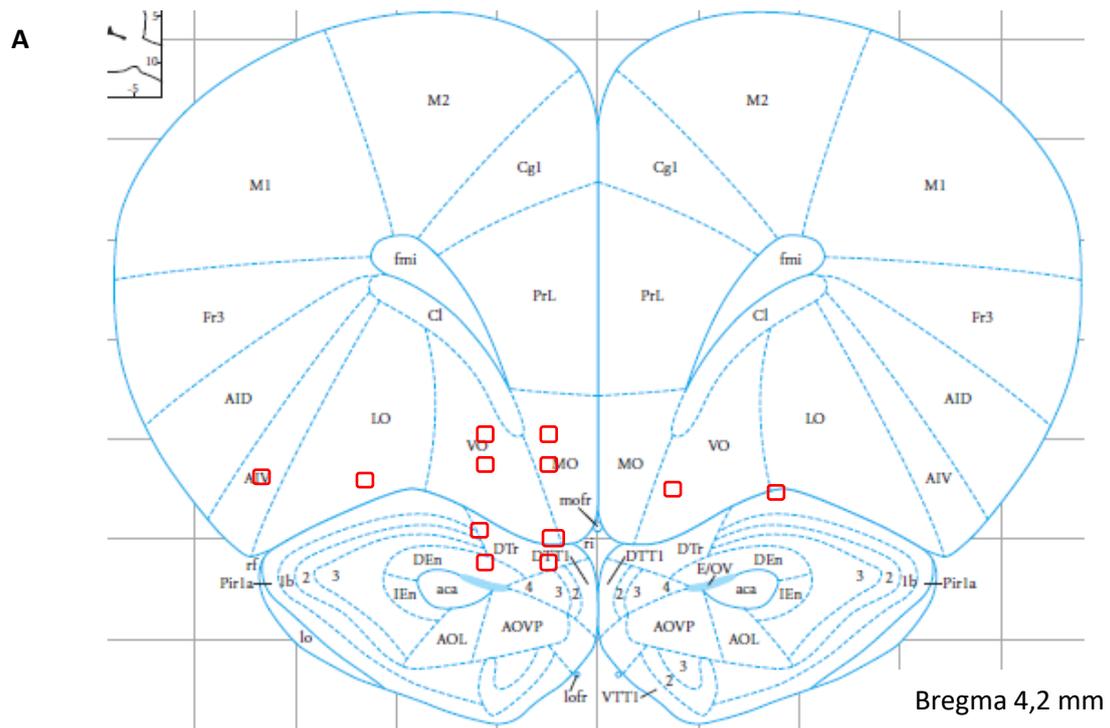


Figura 17. Áreas do cérebro analisadas A: córtex medial préfrontal (MO), córtex orbitoventral (VO) e córtex orbitolateral (LO); B: *core* do núcleo accumbens (AcbC) e estriado (CPu) Fonte: (Paxinos e Watson, 2007).

6. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CFOS

Neste estudo, a atividade neuronal devido ao consumo crônico de álcool, antes e durante o tratamento com ayahuasca foi avaliada por meio da expressão de cFos nas regiões investigadas. Os cortes cerebrais foram lavados duas vezes com tampão fosfato (PBS), tratados com H₂O₂:metanol (3%) por 30 minutos em temperatura ambiente em agitação constante e lavados por duas vezes por 15 minutos com agitação com solução Triton X-100 (0,3%) para permeabilizar a membrana celular. Seguiu-se com uma pré-incubação em 10% de solução soro normal de cabra (Normal Goat Serum, Sigma-Aldrich) por 30 minutos e incubação com anticorpo primário anti-cfos (Sigma-Aldrich F7799- 1:5000) a 4°C em agitação constante por 48 horas.

No terceiro dia, os cortes foram lavados duas vezes com PBS por 15 min. e incubados com anticorpo secundário (Anti-Rabbit IgG; Sigma-Aldrich B8895; diluição 1:8000) por duas horas em temperatura ambiente e agitação constante. Em seguida, os cortes foram lavados novamente duas vezes em PBS por 15 min., incubados na solução peroxidase antiperoxidase (PAP; Sigma-Aldrich) por 1:30h em temperatura ambiente e agitação constante, lavados duas vezes com PBS, incubados por 10 min. com 3,3' - diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich) e 0,03% de H₂O₂ (solução reveladora), e lavados novamente três vezes com PBS.

Os cortes revelados foram colocados em lâminas gelatinizadas, depois de aderidos foram desidratados com álcool e xilol, em seguida cobertos com uma gota de Enthelan (Merck) e protegidos por lamínula. O número de cFos-neurônios positivos foi contado em microscópio de marca LEICA DM 2000, aumento 40x, com auxílio do software Leica Application Suite (LAS) V4.1 Core. Lâminas de quatro animais foram perdidas durante o procedimento de preparo e não geraram resultados. Para cada animal, cada região de leitura mostrada na Figura 17 (marcada com um □) gerou um dado de cFos.

7. AVALIAÇÃO DE PERDA NEURONAL PELO MÉTODO DE NISSL/CRESYL

Os corpúsculos ou (grânulos) de Nissl ou substância cromófila, são acumulações basófilas que se encontram no citoplasma de células nervosas que são evidenciados pelo cresil violeta, um corante básico, e serve como indicador da viabilidade neuronal. Quando há lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer, fenômeno conhecido por cromatólise (CRAGG, 1970).

Os cortes do cérebro foram retirados da solução antifreezing, transferidos para um recipiente com solução de PBS e transferidos para lâminas gelatinizadas onde permaneceram durante 20 minutos para aderência e secagem. As lâminas foram coradas em solução de cresil violeta (Sigma-Aldrich) por 7 minutos e o excesso do corante foi retirado por mergulhos em água destilada. A desidratação dos cortes consistiu em 5 mergulhos das lâminas em álcool 50% seguidos de 5 mergulhos em álcool 70%. Para melhor fixação da coloração, foi realizada uma imersão rápida em solução diferenciador de ácido acético:álcool (1:100). A lâmina foi submetida a sucessivos banhos de álcool em concentração crescente: um banho em álcool 70%, três banhos em álcool 96% seguidos de três banhos de álcool 100% com duração um minuto cada, e então diafanizado novamente, com dois banhos de xilol (2 minutos). Colocou-se finalmente uma gota de Enthelan (Merck) sobre cada lâmina e aderiu-se a lâmina com lamínula.

A avaliação do grau de perda neuronal foi feita com a utilização de um microscópio de marca LEICA DM 2000, aumento de 20x, com auxílio do software Leica Application Suite (LAS) V4.1 Core. Os achados referentes aos animais do grupo sadio foram utilizados para a caracterização do padrão de 100% de neurônios viáveis e saudáveis.

8. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) ou GraphPad Prism 7.04. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados comportamentais foram submetidos à análise de variância Anova seguido do *post hoc* Tukey ou Dunnet, ou análise não paramétrica (Kruskal-Wallis). A significância foi estabelecida no nível de 95% ($p \leq 0.05$).

V. RESULTADOS

1. PROTOCOLO IA2BC (INTERMINENT ACCESS TO 2-BOTTLE CHOICE).

Durante o estudo, o bebedouro controle para avaliar o derrame da solução alcóolica não mostrou perda maior que 1 mL, indicando que o sistema funcionou satisfatoriamente (LI *et al.*, 2010). Porém, em alguns casos o consumo de solução alcóolica foi muito acima do usual, principalmente devido a danos no bebedouro provocado pelo comportamento dos roedores, que pode ser constatado visualmente no fundo do bebedouro, Isto ocorreu em 15 casos/leitura, correspondendo a ~ 1% das 1440 leituras previstas ao longo do estudo (60 animais, 3 leituras/semanas/8 semanas).

De acordo com Carnicella *et al.*, (2014), quando o protocol IA2BC é utilizado para avaliar a diminuição do consumo de álcool, somente aqueles animais com alto consumo (*excessive drinkers*) devem ser considerados no estudo. Nesse caso, animais consumindo menos que 3,5 a 4 g etanol/kg pc/24 h devem ser excluídos do estudo.

Ao final do experimento, foi feita uma avaliação do consumo de álcool pelos animais durante as 7 primeiras semanas de exposição para identificar os *light drinkers*, que nesse estudo foi considerado como aqueles que tiveram consumo médio abaixo de 3,5 g etanol/kg pc/24 h. Foram identificados 13 animais (21.6 % dos 60 ratos), cujo consumo médio nas 7 semanas variou de 1.1 a 3.3 g etanol/kg pc/24 h. Desta maneira, o número total de animais de cada grupo passou a ser Grupo H2O = 9 animais; Grupo NTX = 10 animais; Grupo AYA 0.5 = 9 animais, Grupo AYA 1 = 9 animais e Grupo AYA 2 = 10 animais.

1.1 Consumo de álcool dos animais por 7 semanas

A Figura 18 mostra o consumo médio dos 47 animais do estudo durante as primeiras 7 semanas de exposição. Observa-se um aumento gradativo do consumo médio durante as 4 primeiras semanas, mas sem significância estatística. A partir da 5ª semana, este aumento foi significativo, permanecendo estável até a 7ª semana, com média de 6,4 g etanol/kg pc/24 h.

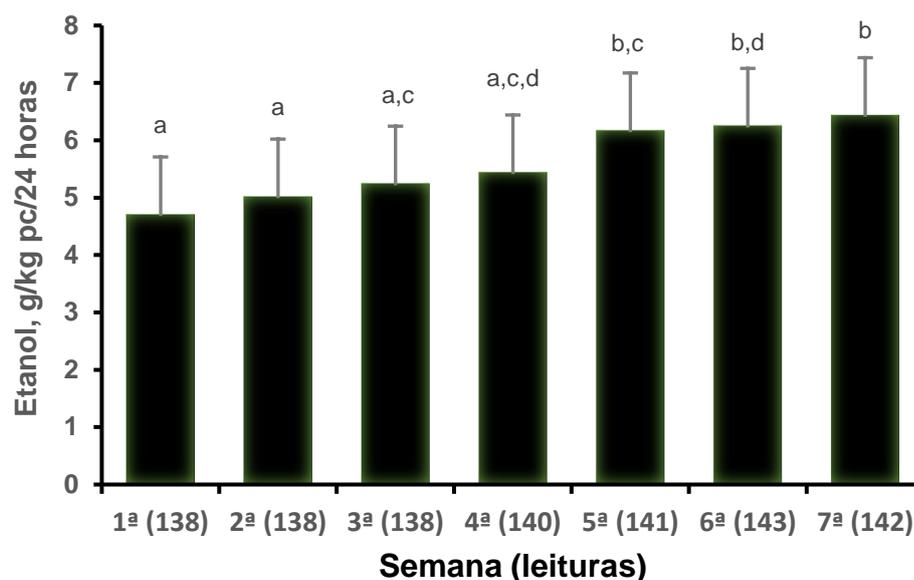


Figura 18. Consumo geral de álcool por semana (N=47 animais). Os valores representam médias \pm EPM (erro padrão da média). Análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc Turkey. Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as semanas. Leituras indica o número de valores de consumo de álcool na semana.

1.2 Consumo de álcool dos animais tratados na oitava semana

A Figura 19 apresenta o consumo de etanol pelos animais expostos na 8ª semana quando foram submetidos ao tratamento com água (H₂O), naltrexona (NTX), e os grupos de ayahuasca, além do consumo basal (7ª semana). Os resultados demonstraram que houve uma diminuição significativa entre o consumo de álcool pelo grupo NTX em relação ao consumo da linha de base. Não houve diferença significativa no consumo dos grupos ayahuasca em nenhuma dose testada com relação ao consumo da linha de base e ao grupo H₂O. Resultados similares foram encontrados quando o consumo basal foi estimado a partir do consumo médio da 5ª, 6ª e 7ª semanas (426 leituras) (dados não mostrados).

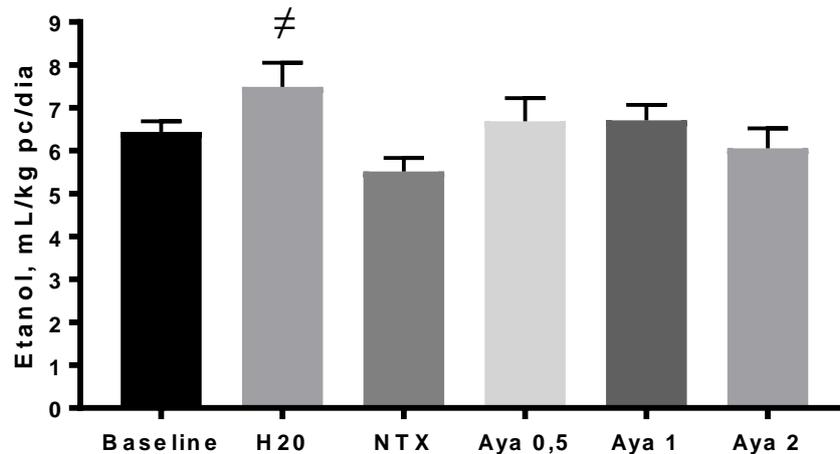


Figura 19. Consumo de álcool na semana de tratamento. Os valores representam médias \pm EPM (erro padrão da média). Basal (7^o semana; 47 animais), H2O (n= 9) animais; NTX (n= 10) animais; AYA 0,5 (n= 9) animais; AYA 1 (n= 9) animais; AYA 2 (n= 10) animais. \neq diferença significativa com o grupo H2O (ANOVA seguido de Dunnet).

2. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Durante o experimento observou-se um comportamento de estresse entre os animais que consumiram doses elevadas de álcool. Esses animais apresentaram comportamento agressivo no momento em que o pesquisador realizava a pesagem e as trocas de bebedouros. Pode ser observado uma agitação, e o chiar, dois animais tentavam levantar a grade da caixa para escapar, e alguns bebedouros de álcool foram roídos derramando todo o álcool (Figura 20). Por serem animais roedores, o comportamento de roer a borracha dos bebedouros é considerado normal em animais de cativeiro. Pensando nesta possibilidade, as borrachas dos bebedouros eram protegidas por alumínio, mas alguns animais conseguiram roer até furar a parte plástica do fundo do bebedouro (Figura 20).



Figura 20. Bebedouro de álcool e bebedouro roído pelo rato (direito).

2.1 Campo Aberto

Após a fase de tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, que foram realizados quinze horas após a última oferta de álcool e tratamento. Os seguintes parâmetros foram analisados: entrada no quadrante central, fezes, urina, autolimpeza, locomoção nos quadrantes e apoio nas patas traseiras.

As Figuras 21A e B mostram que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre os grupos do estudo, porém observa-se uma tendência de diminuição da atividade de ida ao quadrante central, número de bolos fecais e autolimpeza com o aumento da dose de ayahuasca (Figura 21).

2.2 Labirinto em cruz elevado

A Figura 22 mostra os resultados do teste do labirinto em cruz elevada em relação aos parâmetros de número de vezes que o animal se levantou com apoio nas patas traseiras e entradas e saídas nos braços abertos ou fechados (Figura 22A), exibiu o comportamento de autolimpeza, urinou ou defecou (número de bolos fecais) (Figura 22B). Não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre os grupos do estudo. Porém, observa-se uma tendência de os ratos urinarem com mais frequência em doses mais elevadas de ayahuasca.

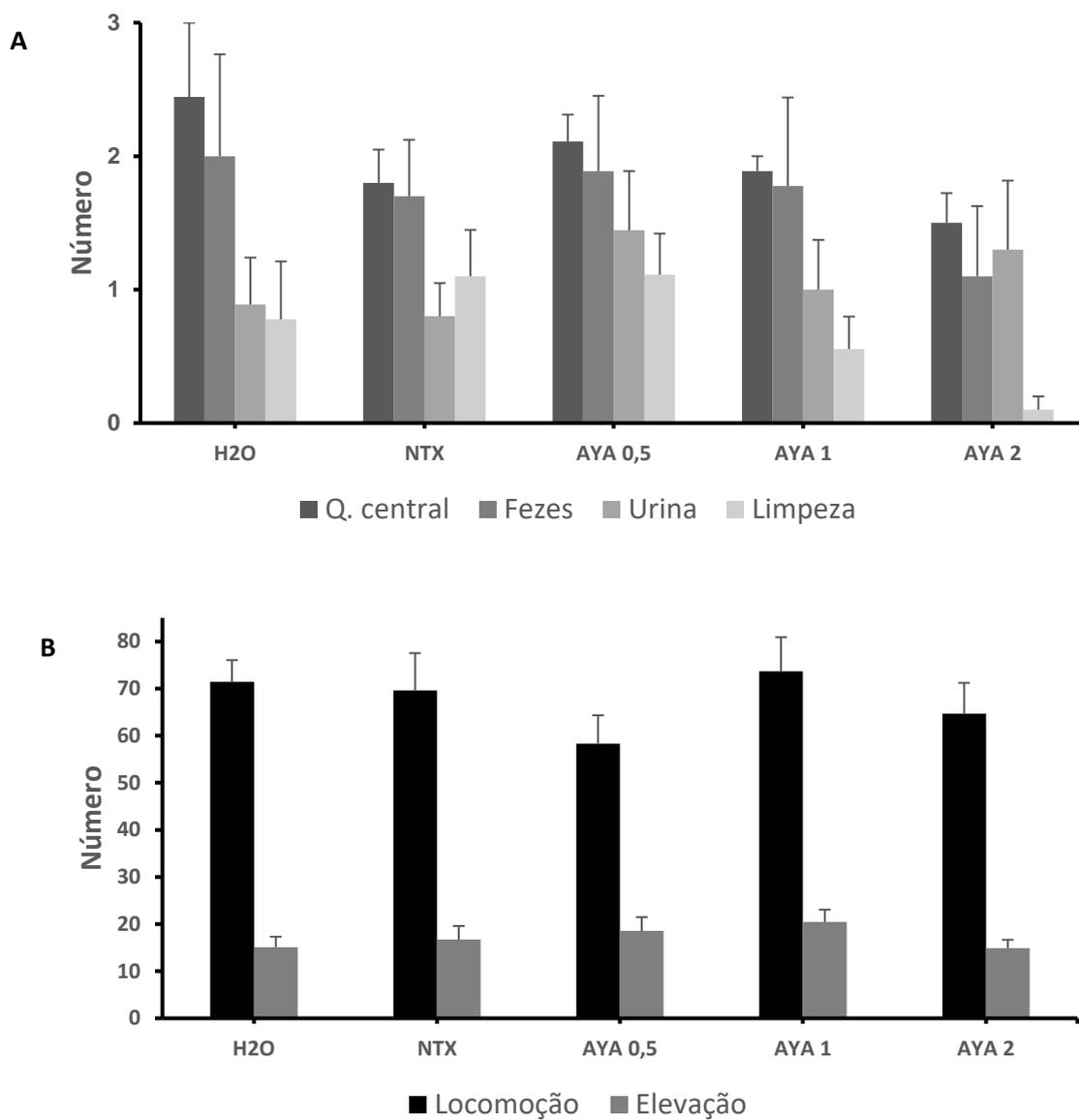


Figura 21. Teste de campo aberto. A: atividade de ida ao quadrante central, defecar, urina e autolimpeza; B: atividade de locomoção nos quadrantes e elevação nas patas traseiras. H2O (n=9), NTX (n=10), AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=9), AYA2 (n=10). Os valores correspondem a média \pm erro padrão

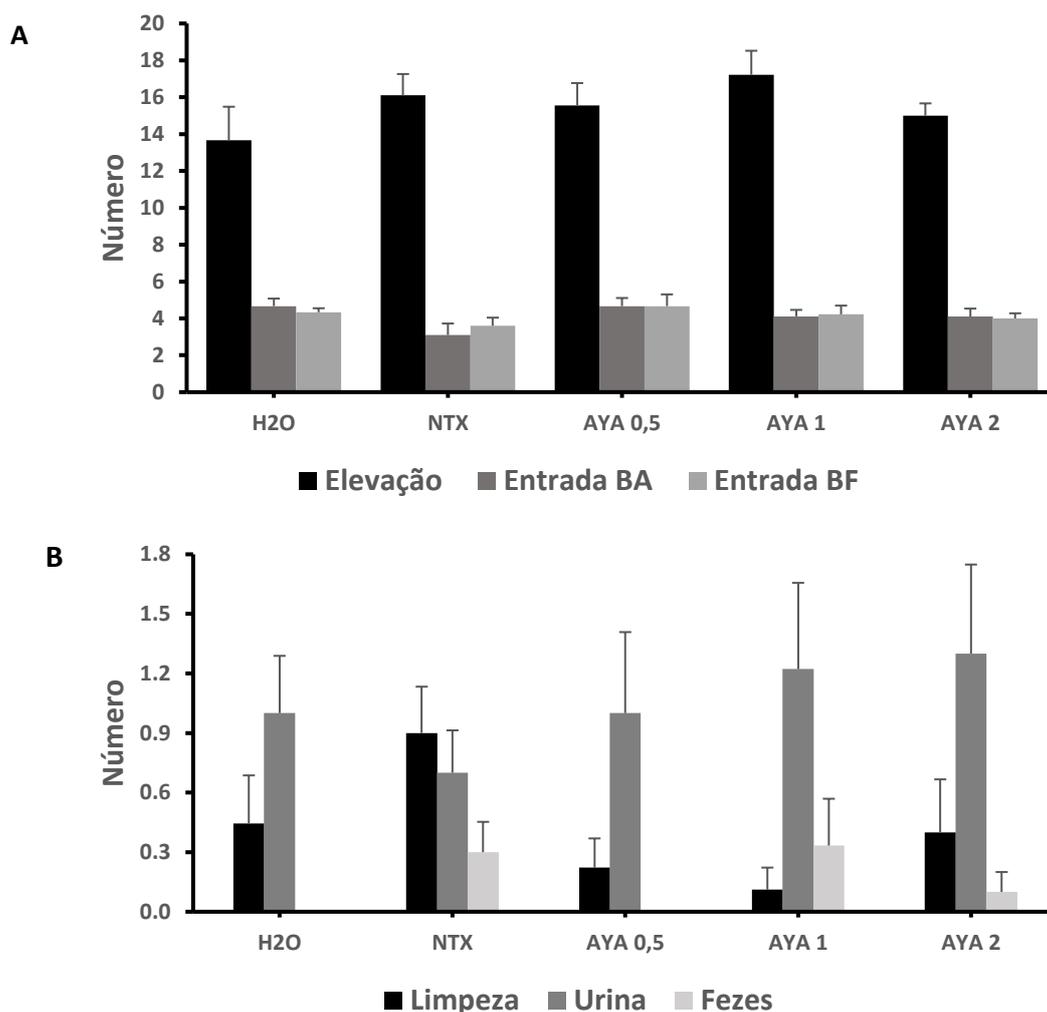


Figura 22. Teste de labirinto em cruz elevado. A: número de vezes que o animal se levantou com apoio nas patas traseiras e entrou nos braços abertos (BA) ou fechados (BF); B: autolimpeza, urina e número de bolos fecais. H2O (n=9), NTX (n=10), AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=9), AYA2 (n=10). Os valores correspondem a média \pm erro padrão.

A Figura 23 mostra os resultados no teste do labirinto em cruz elevado em relação ao tempo de permanência nos braços abertos e fechados. Não houve diferença significativa entre os grupos do estudo com relação ao tempo de permanência nos braços abertos, mas animais que ingeriram ayahuasca nas doses mais baixas (0,5 e 1X) ficaram mais tempo nos braços abertos que os animais do grupo naltrexona, com uma tendência de diminuição deste tempo com o aumento da dose. Somente o grupo da naltrexona mostrou uma diferença significativa em relação ao controle H2O no tempo de permanência no braço fechado. Ratos tratados com a

ayahuasca ficaram significativamente menos tempo no braço fechado que o grupo naltrexona, com uma tendência de aumento do tempo com a dose.

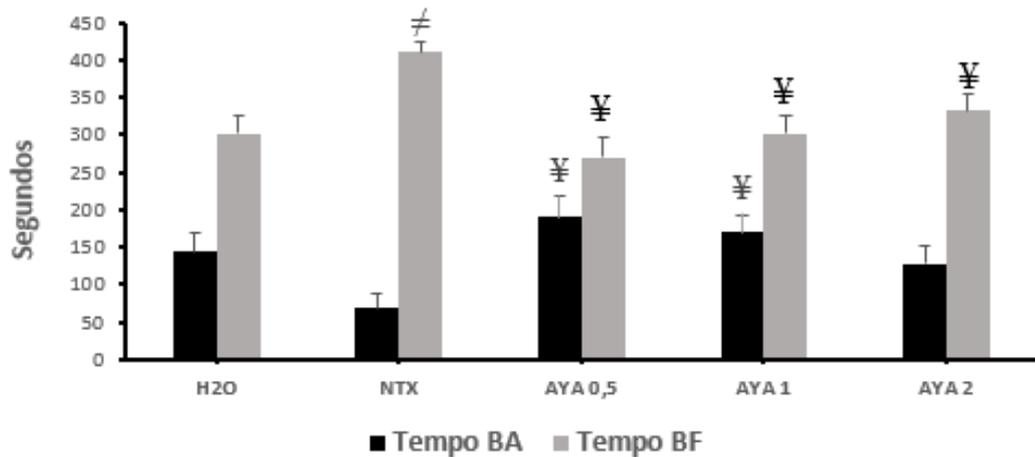


Figura 23. Teste de labirinto em cruz elevada. Tempo de permanência nos braços abertos (BA) e fechados (BF). H2O (n=9), NTX (n=10), Aya 0,5 (n=9), Aya 1 (n=9), Aya2 (n=10). ≠ diferença em relação ao grupo H2O; ¥ diferença com relação ao grupo NTX.

3. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E PESO CORPORAL E DE ÓRGÃOS

Nenhum óbito ocorreu durante o experimento. A análise macroscópica dos órgãos após laparotomia mostrou alterações nos fígados de alguns animais que consumiram álcool durante as 8 semanas do estudo (Figura 24 B e C) indicando lesões, comparado com o grupo sadio, que não foi exposto ao álcool e foram sacrificados na 7ª semana do estudo (Figura 24 A). Nenhum outro órgão apresentou alteração macroscópica.

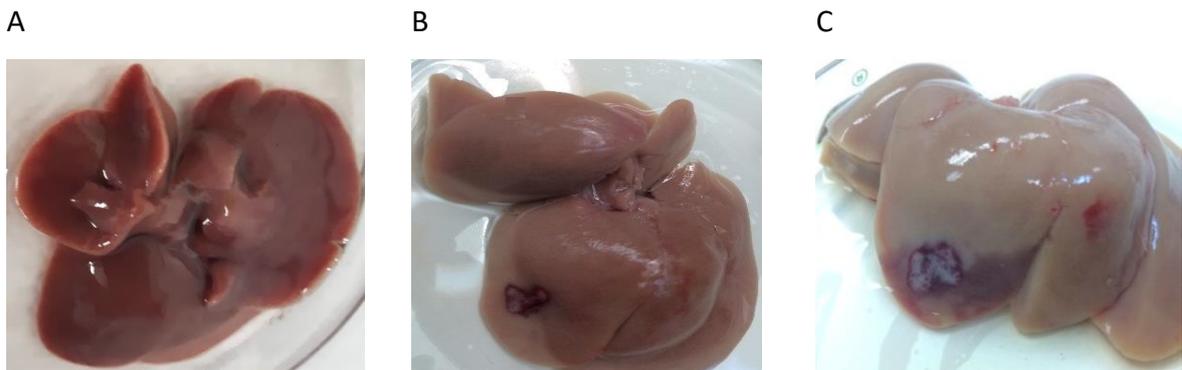


Figura 24. A: fígado de animal sadio; B e C: alteração macroscópica causada pelo consumo de álcool durante 8 semanas no protocolo de aceso intermitente ao álcool.

Cinco animais (dois do grupo água, dois do grupo NTX e um do grupo Aya 2) desenvolveram esteatose hepática (Figuras 24B e C). O fígado (A), de animal sadio que não consumiu álcool, apresenta cor vermelha escura brilhante. Os demais animais que consumiram álcool não apresentaram alterações.

A Tabela 1 mostra o peso médio dos animais de cada grupo do estudo no final do experimento e dos órgãos avaliados. Houve um aumento significativo do peso do cérebro dos animais dos grupos H₂O, NTX e ayahuasca 2X comparados ao grupo sadio.

Resultados do hemograma mostrou um aumento significativo do hematócrito (%) e da hemoglobina (g/dL) no grupo naltrexona em relação ao grupo H₂O, e um aumento da hemoglobina corpuscular média (pg) do grupo sadio em relação ao grupo H₂O.

Tabela 1. Análise estatística do peso corpóreo e peso dos órgãos em g, dos animais dos grupos controle (sem exposição ao álcool) e tratados com H2O, NTX, e ayahuasca 0,5X, 1X e 2X a dose usual.

Órgãos	Sadio N=4	H2O N=9	Naltrexona N= 10	Aya 0,5 N=9	Aya 1 N=9	Aya 2 N=10
P.corpóreo	370,8±15,7	421,6±13,3	418,5±19,6	412,6±16,2	412,9±14,3	437,0±10,4
Cérebro	1,98±0,10	2,26±0,04*	2,20±0,04*	2,20±0,05	2,17±0,03	2,24±0,04*
Fígado	14,2±0,70	16,7±0,80	16,4±0,85	16,9±0,87	16,7±0,67	17,7±0,83
Baço	0,84±0,05	0,87±0,01	0,98±0,04	0,89±0,05	0,87± 0,05	0,93±0,04
Coração	1,46±0,10	1,64±0,10	1,56±0,06	1,63±0,07	1,39±0,05	1,59±0,04
Rim D	1,82±0,12	1,74±0,13	1,77±0,07	1,83±0,14	1,74±0,08	1,95±0,13
Rim E	1,72±0,12	1,80±0,12	1,87±0,12	1,85±0,10	1,75±0,13	1,96±0,12
Estômago	4,68±1,2	3,71±0,26	3,80±0,26	4,67±0,51	3,89±0,35	4,15±0,18

Sadio: animais não expostos ao álcool; * significativamente diferente do sadio ($p \leq 0,05$)

4. EXPRESSÃO DE cFOS

Foram analisadas a expressão da proteína cFos nas regiões relevantes do processo de dependência ao álcool - o córtex medial pré-frontal (MO), ventral (VO) e lateral (LO), core do núcleo accumbens (AcbC) e estriado (CPu). A cFos é uma proteína utilizada como marcador da atividade neural codificada pelo proto-oncogene cFos, que pertence aos genes de ativação imediata. Os animais do grupo sadio que não consumiram álcool apresentaram pouca ou nenhuma marcação (Figura 25A). No córtex medial pré-frontal ocorreu um aumento significativo de expressão de cFos para os grupos tratados com H2O, naltrexona e ayahuasca em relação ao grupo sadio, e uma diminuição significativa do grupo Aya0,5 em relação ao grupo NTX (Figura 26). Nas regiões do córtex orbitolateral o grupo Aya 2 apresentou aumento significativo de cFos comparado ao grupo sadio e na região orbitoventral, somente o grupo Aya 1 teve este efeito (Figura 26).

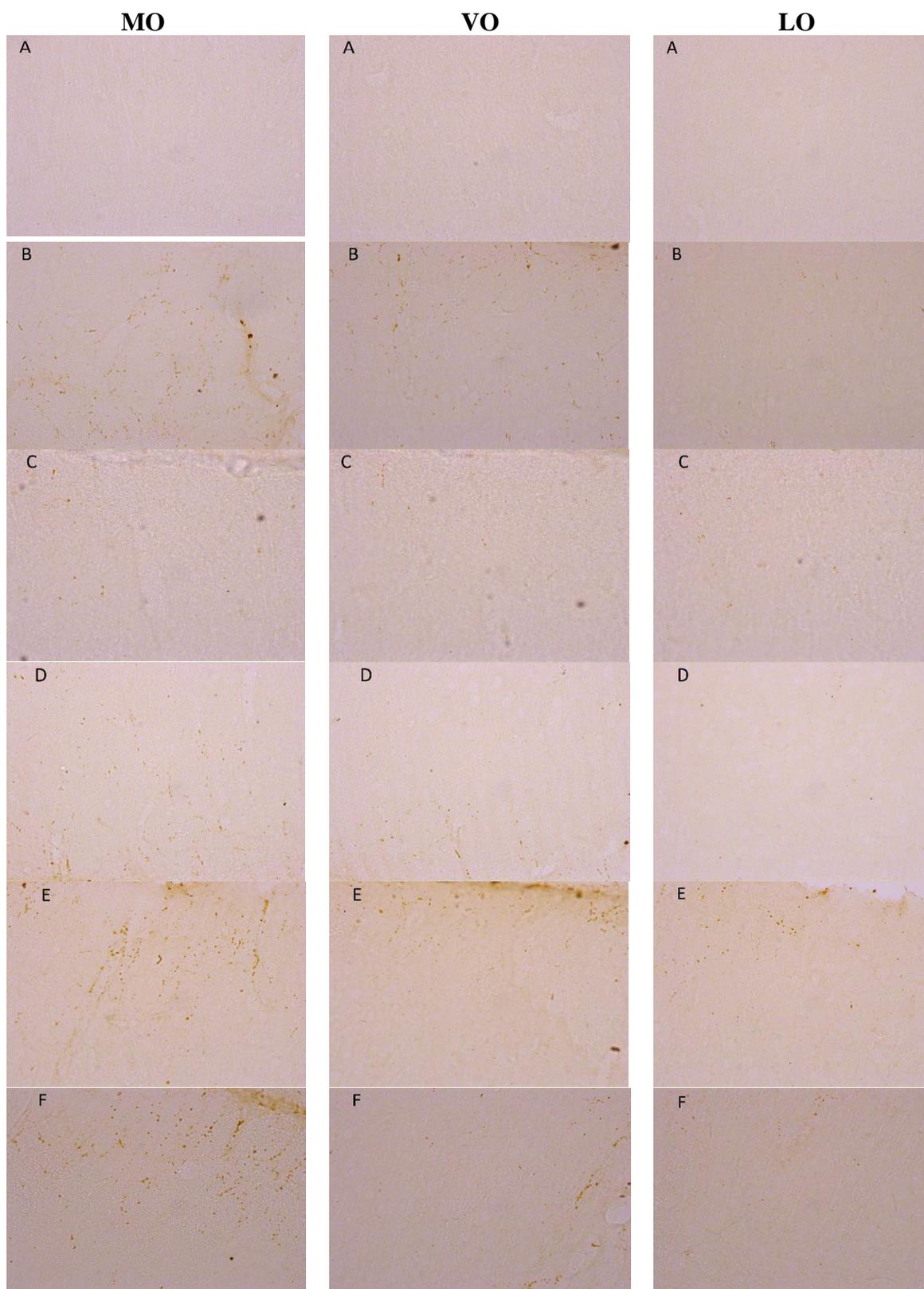


Figura 25. Fotomicrografia de marcadores de cFos no córtex medial pré-frontal (MO), córtex orbitoventral (VO) e córtex orbitolateral (LO). A: grupo sadio, B: NTX, C: Aya 0,5, D: Aya 1X, E: Aya 2X; F: H2O. Aumento 40x

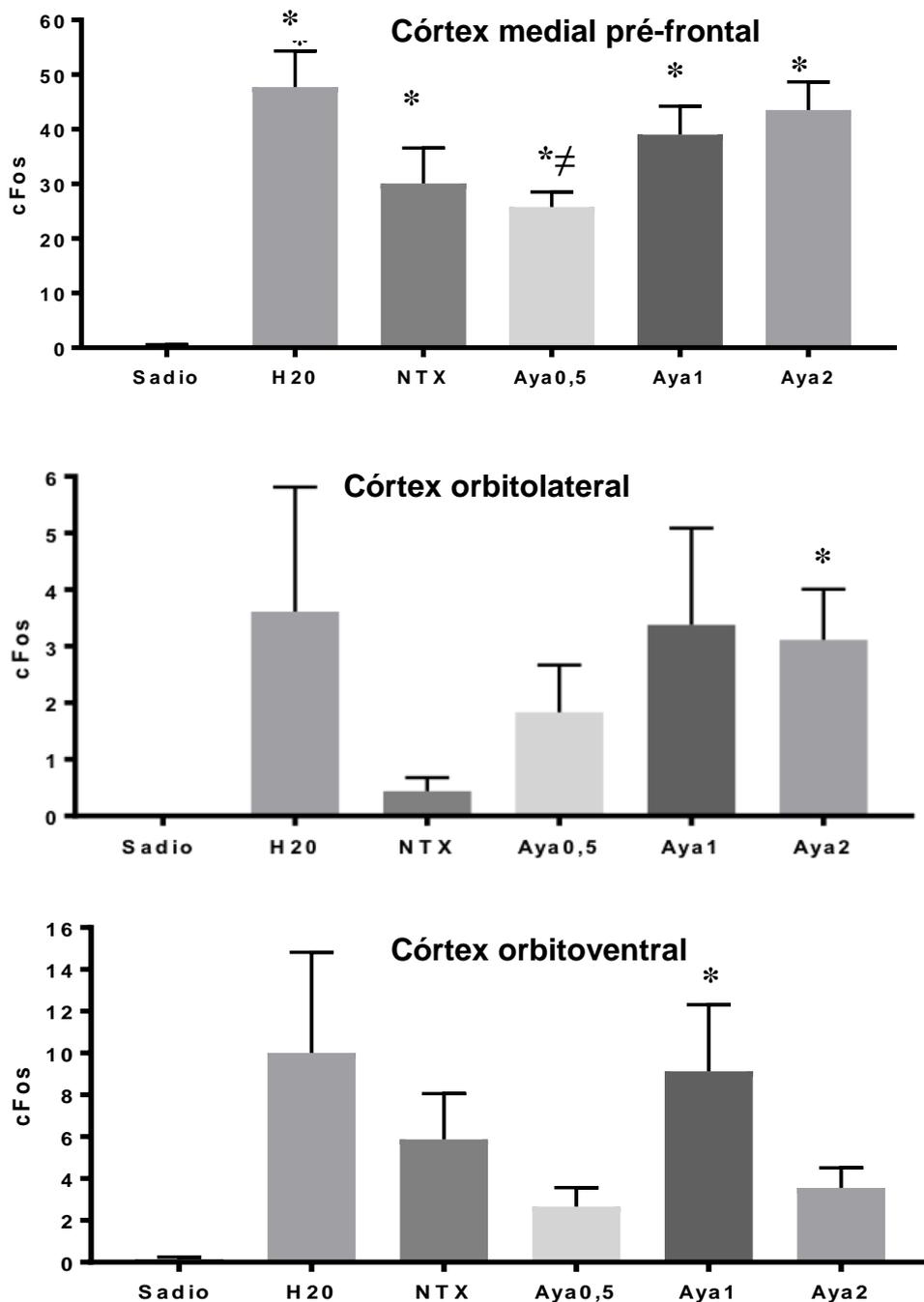


Figura 26. cFos no córtex pré-frontal de ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, Aya 0,5 (n=9), Aya 1 (n=8), Aya2 (n=9). Oito leituras para cada animal para a cada região do córtex medial prefrontal, e duas para o córtex orbitolateral e orbitoventral (Figura 18). Os valores correspondem a média ± erro padrão. * significância em relação ao grupo sadio; ≠ significância em relação ao grupo H2O (Kuskal Wallis).

Nas áreas do núcleo accumbens e estriado, houve um aumento significativo da expressão da cFos no grupo da naltrexona e nas maiores doses em relação ao grupo sadio, e um aumento no grupo naltrexona em relação ao grupo H2O (Figura 27).

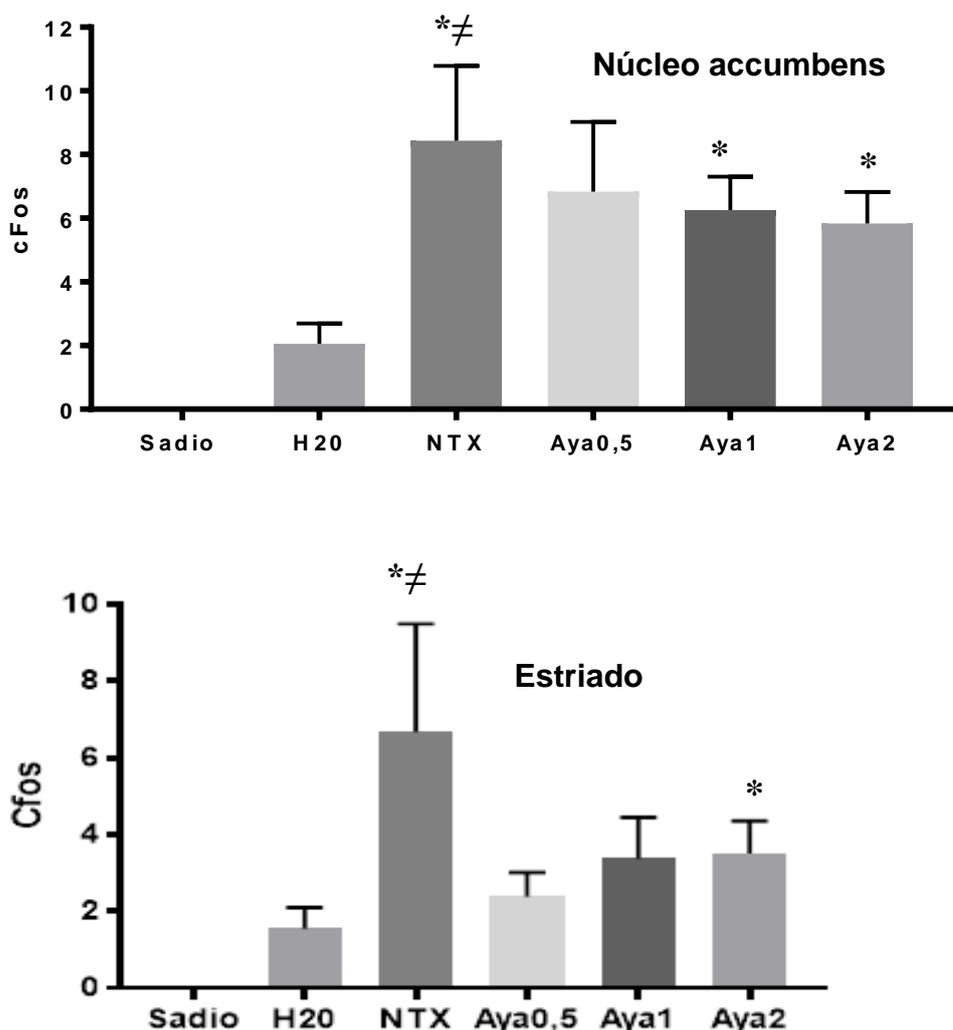


Figura 27. cFos nas regiões do núcleo accumbens e estriado. Ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, Aya 0,5 (n=9), Aya 1 (n=8), Aya2 (n=9). Duas leituras para cada animal (Figura 18). Os valores correspondem a média \pm erro padrão. * significância em relação ao grupo sadio \neq significância em relação ao grupo H2O (Kuskal Wallis).

5. CORPÚSCULOS DE NISSL

A viabilidade neuronal das regiões de interesse neste estudo foi avaliada pela contagem dos corpúsculos de Nissl que são as acumulações basófilas que se encontram no citoplasma de células nervosas. As Figuras 29 e 30 mostram as contagens de Nills nas áreas neurais investigadas neste estudo. Houve um aumento na contagem dos corpúsculos em todos os grupos que foram expostos ao álcool com relação ao grupo sadio, que foi significativo para o grupo H2O, naltrexona (com exceção do córtex orbitoventral e estriado) e Aya 2. As contagens nos grupos Aya 0,5 e Aya 1 foram significativamente menores que o grupo H20 em todas as regiões.

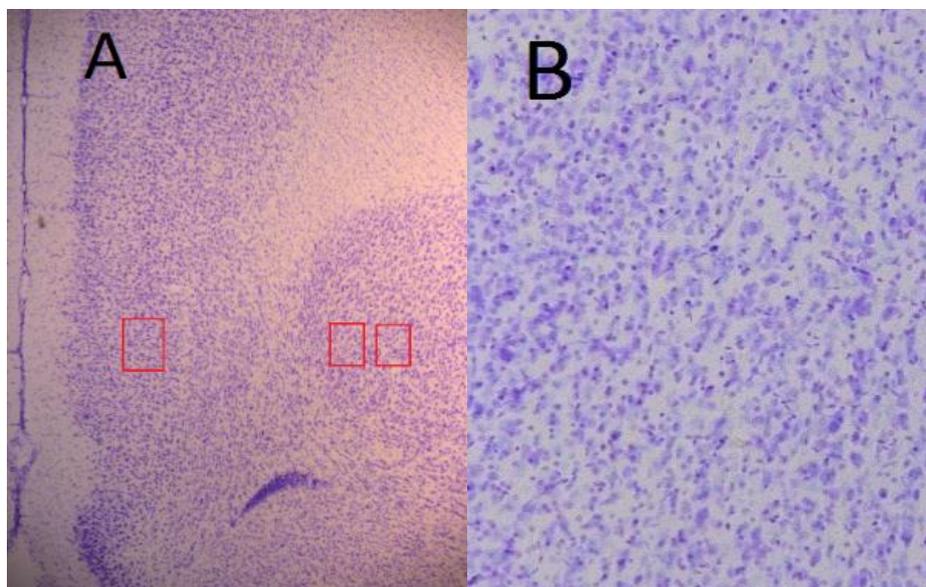


Figura 28. Fotomiografia de Nissl/cresil. A: representa local de leitura do córtex medial pré-frontal, orbitoventral e orbitolateral (ampliação 4). B: ampliação 20X.

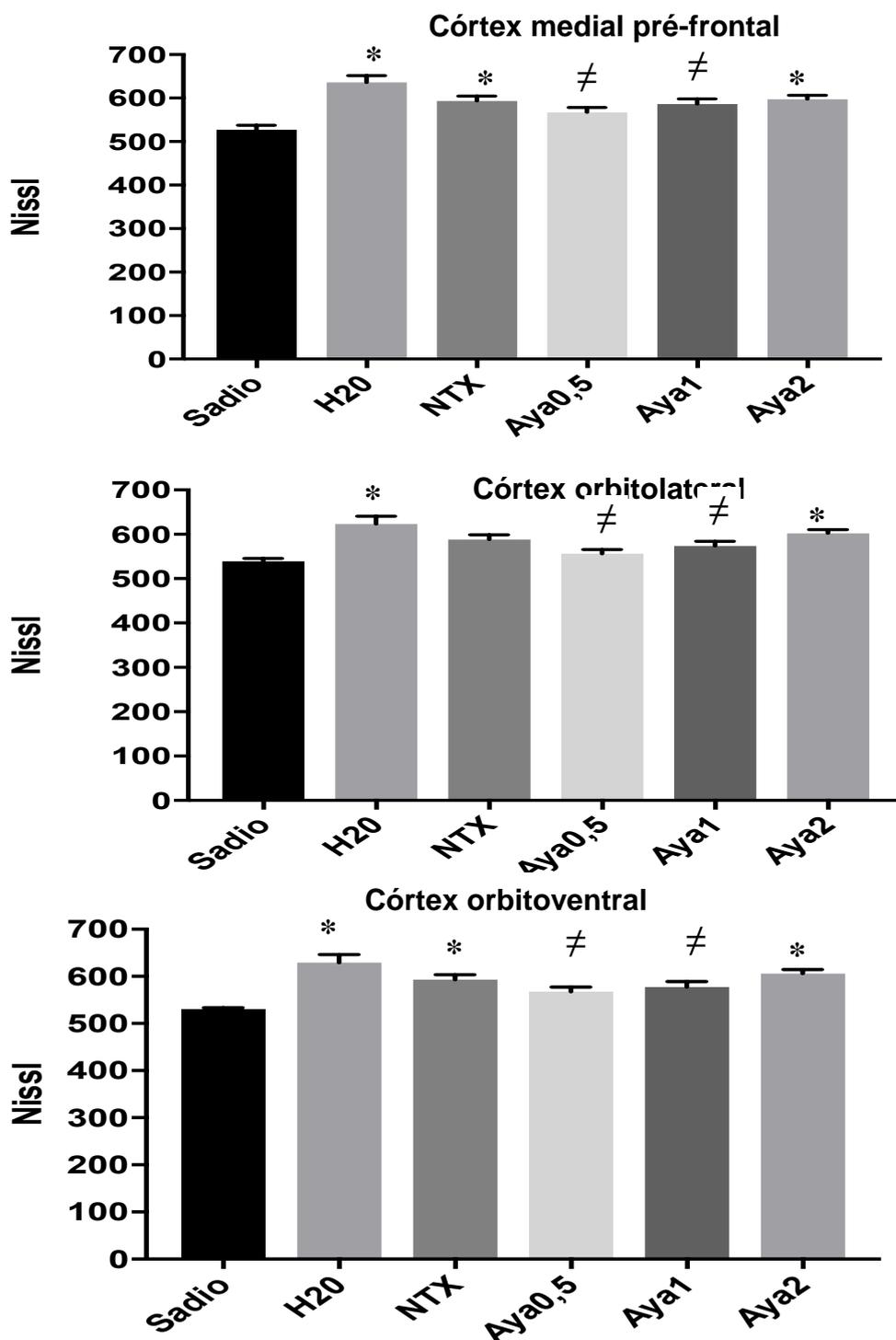


Figura 29. Nissl no córtex pré-frontal de ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, AYA 0,5 (n=9), AYA 1 (n=8), AYA2 (n=9). Os valores correspondem a média \pm erro padrão. * significância em relação ao grupo sadio; \neq significância em relação ao grupo H2O (ANOVA seguido de Turkey).

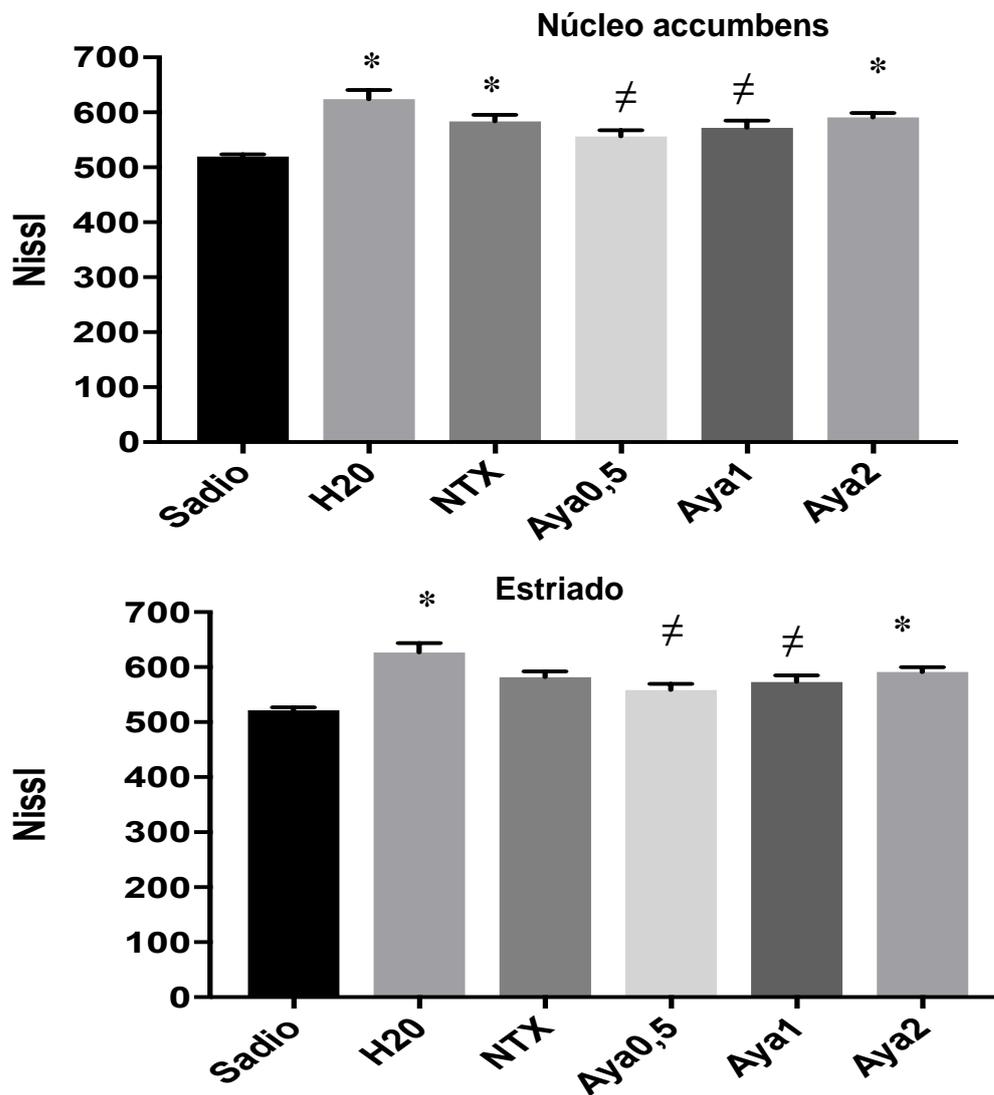


Figura 30. Nissl nas regiões do núcleo accumbens e estriado. Ratos não expostos a álcool (sadio, n=4), controle negativo H2O (n=9), controle positivo NTX (n=8), e tratados com ayahuasca, Aya 0,5 (n=9), Aya 1 (n=8), Aya 2 (n=9). Os valores correspondem a média ± erro padrão. * significância em relação ao grupo sadio; ≠ significância em relação ao grupo H2O (ANOVA seguido de Turkey).

VI. DISCUSSÃO

No presente estudo ratos Wistar machos em idade adulta foram expostos ao álcool 20% por meio do protocolo IA2BC (*interminant access to 2-bottle choice*) por sete semanas. Foi observado um aumento gradativo do consumo de álcool pelos animais durante as quatro primeiras semanas, com aumento significativo e estabilização do consumo a partir da quinta semana. O consumo médio nas semanas de 5 a 7 foi de $6,4 \pm 0,25$ g etanol/kg pc/24 h, maior que o encontrado no estudo de Li *et al.* (2010), também com ratos Wistar, que alcançou níveis estáveis de $5,6 \pm 0,3$ g etanol/kg peso corpóreo/24 horas a partir da quarta semana de exposição.

Na oitava semana do estudo, os animais foram tratados por 5 dias com H₂O, naltrexona, um antagonista opioide utilizado no controle da dependência ao álcool, e com ayahuasca, que contém DMT, um agonista dos receptores 5HT_{2A}, nas doses 0,5, 1 e 2 vezes a dose usual de um ritual religioso (150 mL para um indivíduo de 70kg). O tratamento com a naltrexona não diminuiu significativamente o consumo de etanol em relação ao consumo na 7^o semana, ao contrário do que foi reportado por Li *et al.* (2010). O tratamento com ayahuasca também não teve efeito neste consumo. No entanto, observou-se uma redução significativa do consumo de álcool no grupo naltrexona comparado ao grupo tratado com H₂O.

Evidências de estudos com humanos demonstram que o uso ayahuasca no contexto religioso pode ter efeitos terapêuticos em usuários com problemas de alcoolismo e outras drogas (FÁBREGAS *et al.*, 2010; BOUSO *et al.*, 2012; THOMAS *et al.*, 2013; LAWN *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2018). Assim como outras drogas de abuso, o álcool aumenta a liberação de dopamina no sistema mesolímbico, como consequência da sua interação com outros sistemas de sinalização, incluindo os sistemas gabaérgico, opioide e serotoninérgico (CLAPP *et al.*, 2008). Liester & Prickett (2012) propuseram que a ação da ayahuasca no tratamento da dependência química envolve a redução dos níveis de dopamina na via mesolímbica como consequência da ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} resultante da ingestão da ayahuasca. O agonismo de receptores opioides μ inibem a transmissão do GABA, levando a um aumento na liberação da dopamina, e a ação antagonista da naltrexona nos receptores é a base farmacológica deste fármaco no tratamento da dependência do álcool e outras drogas de abuso (CLAPP *et al.*, 2008; LITTLETON & ZIEGLGÄNSBERGER, 2003). Porém, apesar de vários estudos relataram vários estudos que correlacionam a deficiência de ativação no sistema serotoninérgico com o aumento do consumo do álcool (BOERNGEN-LACERDA *et al.*, 2013), outros mostram resultados conflitantes. Por exemplo, Lankford & Myers (1996) mostraram que

a amperozida, um antagonista dos receptores 5-HT_{2A}, e a naltrexona, reduziram o consumo de álcool em ratos, e Boerngen-Lacerda *et al.* (2013) mostraram que a mianserina, um antagonista/agonista inverso do receptor 5-HT_{2A}, a buspirona, um agonista parcial dos receptores HT1a, que bloqueia a liberação de serotonina, e a kentanserina, um antagonista do receptor 5-HT_{2A} bloqueiam o desenvolvimento da sensibilidade induzida pelo álcool em modelo de camundongo. Desta maneira, a ação da ayahuasca como agonista dos receptores de 5-HT_{2A} e a consequente efeito na liberação de dopamina no sistema mesolímbico precisa ser melhor investigada.

A exposição crônica a substâncias psicoativas que causam dependência desencadeia uma série de respostas adaptativas no sistema mesolímbico dopaminérgico, que incluem alterações de fatores de transcrição e consequente expressão genica (CLAPP *et al.*, 2008). Em particular, as proteínas Fos, incluindo Δ FosB e cFos, têm sido descritas como fatores de transcrição importantes na plasticidade neural relacionada à dependência química (CRUZ *et al.*, 2015; NESTLER, 2012). A exposição repetida ao álcool e outras drogas altera os níveis de Δ FosB em várias regiões cerebrais (Li *et al.*, 2010; PERROTI *et al.*, 2008), mas estudos com a cFos são limitados.

Li *et al.* (2010) mostraram que a ingestão crônica intermitente de álcool por ratos Wistar aumentou significativamente a expressão da Δ FosB no core do núcleo accumbens, estriado, e córtex orbitofrontal, mas não no córtex medial prefrontal. Perroti *et al.* (2008) demonstraram que a exposição ao álcool e outras drogas (morfina, cocaína e THC) também aumentou de maneira significativa a expressão de Δ FosB no núcleo accumbens e estriado. Foi observado um aumento importante da cFos nos grupos expostos ao álcool comparado ao grupo sadio em todas as regiões, mas com significância principalmente no córtex medial pré-frontal e no núcleo accumbens. Sharma *et al.* (2014) também mostraram um aumento significativo na expressão de cFos no núcleo accumbens de ratos expostos ao álcool, à nicotina e à ambas drogas por infusão direta na região basal anterior do cérebro. Por outro lado, Jaramillo *et al.* (2016) mostraram uma diminuição significativa da cFos no core do núcleo accumbens e no córtex medial pré-frontal, entre outras áreas, após a exposição de ratos treinados a receber preferencialmente o álcool e que receberam uma dose única de 1 g/kg pc por gavagem e foram sacrificados 90 minutos depois da exposição.

No estudo de Li *et al.* (2010), o tratamento dos animais expostos ao álcool com naltrexona diminuiu a Δ FosB no núcleo accumbens, estriado, e córtex orbitofrontal, indicando

que a naltrexona bloqueia a expressão Δ FosB induzida pelo etanol nessas regiões. No presente estudo, este efeito também foi observado em relação à cFos com o tratamento com ayahuasca na menor dose (0,5x a dose usual) no córtex medial pré-frontal, com uma redução não significativa com o tratamento com a naltrexona. Diminuição não significativa também foi observada nas regiões do córtex orbitofrontal e orbitolateral para os animais tratados com naltrexona e Aya 0,5. Porém, nas regiões do núcleo accumbens e estriado, o tratamento com a naltrexona aumentou a expressão da cFos quando comparado ao grupo controle. No estudo de Pic-Taylor *et al.* (2015), ratas tratadas com ayahuasca uma única vez com 30x a dose usual teve um aumento significativo da expressão da cFos em relação ao controle nas regiões dos núcleos dorsal da rafe, núcleo amigdalóide basolateral posterior e regiões de formação do hipocampo.

A diminuição da cFos observada em regiões do córtex no grupo tratado com a naltrexona e com ayahuasca, que foi significativa na menor dose na região medial, é coerente com a hipótese de que a diminuição de dopamina causada pelo antagonista opioide (naltrexona) e o agonista serotoninérgico (ayahuasca) leva a uma diminuição da cFos nestas regiões. Porém, o aumento da cFos como consequência do tratamento com naltrexona (ou ayahuasca) no núcleo accumbens e estriado precisa ser melhor estudado. Young *et al.* (1991) demonstraram que uma dose única de cocaína, um agonista dopaminérgico, aumentou a expressão da cFos na região do estriado.

Os animais do presente estudo foram submetidos a testes comportamentais, que foram realizados 18 horas após a última oferta de álcool e tratamento. Os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado são utilizados em estudos pré-clínicos para avaliar o comportamento exploratório e a aversão natural dos roedores aos espaços abertos causados por medo e ansiedade (LAMPREA *et al.*, 2008; PELLOW *et al.*, 1985). Os resultados dos testes do campo aberto mostraram que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre os grupos do estudo. No teste do labirinto em cruz elevado, o tratamento com naltrexona aumentou significativamente o tempo dos animais nos braços fechados com relação ao grupo H₂O e em relação aos grupos tratados com a ayahuasca. No estudo conduzido por Pic-Taylor *et al.* (2015), ratos Wistar fêmeas tratadas com ayahuasca com dose única de 15 ou 30X mostraram menos mobilidade e menor intenção de explorar que os controles nos testes de campo aberto e labirinto realizados uma hora após a exposição.

O tratamento com a ayahuasca não parece afetar de maneira significativa o comportamento dos animais resultado da exposição ao álcool, ao contrário do estudo de

Oliveira-Lima *et al.* (2015). Os autores mostraram que o tratamento com ayahuasca (ip) foi eficiente para prevenir o comportamento de hiperlocomoção no campo aberto característico da exposição ao álcool, em todas as doses testadas (30-500 mg/kg pc) e a bebida foi capaz de reverter este comportamento em animais expostos previamente ao álcool (1,8 g/kg pc). Por outro lado, Boerngen-Lacerda *et al.* (2013) mostraram que antagonistas dos receptores 5-HT_{2A}, como a kanteserina, diminuíram a locomoção de camundongos expostos ao álcool.

Cinco animais que consumiram quantidades excessivas de álcool desenvolveram esteatose hepática no lobo direito, uma patologia habitualmente causada pela ingestão excessiva de álcool que pode evoluir para cirrose hepática (PARKER *et al.*, 2018). O estudo não apontou nenhuma alteração macroscópica em outros órgãos dos animais, apenas um aumento significativo no peso do cérebro de animais expostos ao álcool dos grupos H₂O, naltrexona e Aya2 em relação ao grupo de animais saudáveis. A contagem de corpúsculos de Nissl nesses mesmos grupos também foi maior em relação ao grupo saudável em todas as regiões cerebrais investigadas. É possível que estes resultados quando vistos em conjunto indiquem uma vaso dilatação e dilatação dos ventrículos cerebrais. Nos grupos de tratamento com a ayahuasca nas menores doses (0,5 e 1X a dose usual), não houve alteração no peso do cérebro nem na contagem de Nissl, o que pode indicar uma ação de diminuição dos efeitos no cérebro provocados pelo álcool.

Os corpúsculos de Nissl são acumulações basófilas que se encontram no citoplasma de células nervosas, no pericárdio e na primeira porção dos dendritos, e representam agregações do retículo endoplasmático e locais de síntese proteica (DZIEWUSKA *et al.*, 2013). Perda de corpúsculo de Nissl está envolvido no processo de cromatólise e morte celular, e aumento da densidade de Nissl foi observado em algumas espécies depois da axotomia, que é a transecção ou rompimento do axônio, evento que precede a morte celular (CRAGG., 1970). Perda neural, indicada pela Fox-3, uma proteína nuclear, e de Nissl foi observada por Reynolds *et al.* (2015) em células primárias da formação hipocampal expostas ao etanol de maneira crônica e intermitente. A ingestão de ayahuasca na dose única de 30X por ratas Wistar não levou a alteração neste parâmetro no núcleo da rafe, amígdala e hipocampo no estudo conduzido por Pic-Taylor *et al.* (2015). Nesse estudo, o aumento da atividade neural indicada pelo aumento da cFos levou a alguma neurodegeneração, indicada pelo Fluoro-Jade B, porém, nenhum dano permanente que pudesse levar a alterações da morfologia e número de células neurais foi detectado.

O presente estudo tem algumas limitações que precisam ser ressaltadas. A primeira se refere ao uso de naltrexona na forma de drágea, indicada para uso oral, que foi dissolvida em água para administração intraperitoneal nos animais. É provável que a absorção do medicamento por esta via não tenha sido completa. Neste estudo não foi feita a dosagem dos níveis de álcool nos animais durante o período de exposição. Porém, vários estudos mostram que aproximadamente um terço do consumo de álcool no protocolo IA2BC ocorre nos 30 primeiros minutos da exposição de cada seção de 24 horas, levando a um nível de álcool no sangue de mais de 80 mg/100 mL, que atende ao critério de exposição aguda (*bing drinking*) em humanos (CARNICELLA *et al.*, 2014). Uma outra limitação que pode ser mencionada se refere ao tempo após a última oferta de álcool e tratamento em que os animais foram eutanasiados para remoção do cérebro e avaliação da expressão da cFos. Este tempo, 18 horas, foi selecionado seguindo o estudo de Li *et al.* (2010) que avaliou a expressão da proteína Δ FosB, em ratos expostos no âmbito do protocolo IA2BC. Segundo os autores, 18 a 24 horas depois do estímulo, a proteína FosB é degradada deixando a forma estável Δ FosB como o único produto da expressão genica da proteína. Este tempo é conveniente no âmbito do protocolo IA2BC, onde a última oferta de álcool acontece no início do período escuro do animal. Porém, é possível que este tempo não seja o ideal para avaliação da cFos. Realmente, alguns estudos mostram que a expressão desta proteína ocorre principalmente nas primeiras horas após o estímulo (Dyrvig *et al.*, 2014; Bojovic *et al.*, 2015). No estudo conduzido anteriormente pelo nosso grupo, a cFos foi avaliada em áreas cerebrais relevantes para a transmissão serotoninérgica 3 horas depois da exposição à ayahuasca em dose única (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015).

VII. CONCLUSÃO

- ✓ Nesse estudo, a ayahuasca e a naltrexona não diminuíram significativamente o consumo de álcool de ratos Wistar após exposição crônica intermitente em relação à linha de base, mas a naltrexona diminuiu significativamente o consumo de álcool com relação ao controle H₂O
- ✓ A exposição ao álcool aumentou a expressão da proteína cFos nas regiões cerebrais investigadas, que foi significativo principalmente no córtex medial pré-frontal e núcleo accumbens.
- ✓ Houve uma diminuição significativa da expressão da cFos no córtex medial pré-frontal em ratos tratados com ayahuasca na menor dose (0,5X a dose usual) em relação ao grupo água. De uma maneira geral, a cFos aumentou no estriado e núcleo accumbens nos grupos tratados com naltrexona ou ayahuasca em relação ao grupo H₂O, aumento que foi significativo para o grupo naltrexona
- ✓ A exposição ao álcool aumentou a densidade dos corpúsculos de Nissl nos grupos H₂O, naltrexona e Aya 2 comparado com o grupo sadio, grupos que também apresentaram um peso do cérebro significativamente maior. É possível que estes indicadores sejam resultados de uma vaso dilatação e dilatação dos ventrículos cerebrais causada pelo álcool, e que o tratamento com a ayahuasca nas menores doses (0,5 e 1X) tenha tido um efeito de diminuir esses efeitos.
- ✓ O tratamento com naltrexona ou ayahuasca não impactaram de maneira significativa o comportamento dos animais nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada, com exceção de um maior tempo nos braços fechados.
- ✓ O potencial da ayahuasca no tratamento da dependência ao álcool no modelo animal deve ser melhor investigado utilizando outros protocolos de tratamento, inclusive com exposição prolongada e intermitente em doses baixas.
- ✓ É necessário investigar melhor a expressão da cFos no estriado e núcleo accumbens em animais tratados com naltrexona e ayahuasca e correlacionar com o tipo de atividade (excitatória ou inibitória) acionada por estas substâncias nestas regiões.

VIII. REFERÊNCIAS

- Anton RF. Naltrexone for the management of alcohol dependence. *N Engl J Med.* 2008; 14:359(7):715-21. Antonelli M, Ferrulli A, Sestito L, Vassallo GA, Tarli C, Mosoni C, Rando MM, Mirijello A, Gasbarrini A, Addolorato G. Alcohol addiction - the safety of available approved treatment options. *Expert Opin Drug Saf.* 2018;17(2):169-177.
- Araujo T. *Almanaque das drogas*, São Paulo: Ed. Leya; 2012.
- Boerngen-Lacerda R, Jamal Y, Correia D, Goeldner FO. Contribution of serotonin 5-HT₂ receptor to ethanol-induced sensitization and ethanol consumption in mice. *In Serotonin: biosynthesis, regulation and health implications.* Chapter XI. Ed. Frank Scott Hall. 2013. Nova Science Publishers, Inc.
- Bojovic O, Panja D, Bittins M, Bramham CR, Tjølsen A. Time course of immediate early gene protein expression in the spinal cord following conditioning stimulation of the sciatic nerve in rats. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123604.
- Bouso JC, González D, Fondevila S, Cutchet M, Fernández X, Ribeiro Barbosa PC, Alcázar-Córcoles MÁ, Araújo WS, Barbanoj MJ, Fábregas JM, Riba J. Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of ayahuasca: a longitudinal study. *PLoS One.* 2012; 7(8):e42421.
- Brierley DI, Davidson C. Developments in harmine pharmacology-implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012; 39(2):263-72.
- Callaway JC, Airaksinen MM, McKenna DJ, Brito GS, Grob CS. Platelet serotonin uptake sites increase in drinkers of ayahuasca, *Psychopharmacology.* 1994; 116:385-7.
- Callaway JC, Grob CS. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse interactions. *Journal of Psychoactive Drugs.* 1998; 30(4): 367-369.
- Callaway JC, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, Raymon LP, Poland RE, Andrade EN, Andrade EO, Mash DC. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *J Ethnopharmacology.* 1999; 65:243-56.
- Callaway JC, Raymon LP, Hearn WL, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, Mash DC. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J Anal Toxicol.* 1996; 20(6):492-7.

- Carvajal F, Lerma-Cabrera JM, Alcaraz-Iborra M, Navarro M, Thiele TE, Cubero I. Nucleus Accumbens MC4-R Stimulation Reduces Food and Ethanol Intake in Adult Rats Regardless of Binge-Like Ethanol Exposure during Adolescence. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2017; 11:167.
- Carnicella S, Ron D, Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*. 2014; 48(3):243-52.
- Castro-Neto EF, da Cunha RH, da Silveira DX, Yonamine M, Gouveia TL, Cavalheiro EA, Amado D, Naffah-Mazzacoratti Mda G. Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. *World J Biol Chem*. 2013;4(4):141-7.
- Casu MA, Pisu C, Lobina C, Pani L. Immunocytochemical study of the forebrain serotonergic innervation in Sardinian alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology*, 2004; 172:341–351.
- CEBRID. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil. 2005.
- CEBRID. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil. 2010.
- Chandrasekar A, Aksan B, Heuvel FO, Förstner P, Sinske D, Rehman R, Palmer A, Ludolph A, Huber-Lang M, Böckers T, Mauceri D, Knöll B, Roselli F. Neuroprotective effect of acute ethanol intoxication in TBI is associated to the hierarchical modulation of early transcriptional responses. *Exp Neurol*. 2018; 302:34-45.
- Charlton ME, Sweetnam PM, Fitzgerald TW, Terwilliger RZ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic ethanol administration regulates the expression of GABA A receptor $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. 2010; 68:121-127 .
- Clapp P, Sanjiv V. Bhave, Hoffman PL. How adaptation of the brain to alcohol leads to dependence. A pharmacological perspective on the adaptation of the brain to alcohol *Alcohol Res Health*. 2008;31(4):310-39.
- Cragg BG. What is the signal for chromatolysis? *Brain Res*. 1970; 23(1):1-21.
- Day HE, Kryskow EM, Nyhuis TJ, Herlihy L, Campeau S. Conditioned fear inhibits c-fos mRNA expression in the central extended amygdala. *Brain Res*. 2008; 1229:137-46.
- Dyrvig M, Christiansen SH, Woldbye DP, Lichota J. Temporal **gene expression** profile after acute electroconvulsive stimulation in the rat. *Gene*. 2014;539(1):8-14.

- Cruz FC, Rubio FJ, Hope BT. Using *c-fos* to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. Behavioral Neuroscience Branch, IRP/NIDA/NIH/DHHS, 251; 2015.
- Cservenka A, Brumback T. The Burden of Binge and Heavy Drinking on the Brain: Effects on Adolescent and Young Adult Neural Structure and Function. Front Psychol. 2017; 30;8:1111.
- CONAD. Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas. Resolução n° 1 de 25 de janeiro de 2010. Diário Oficial da União; 2010.
- Cozzi NV, Gopalakrishnan A, Anderson LL, Feih JT, Shulgin AT, Daley PF, Ruoho AE. Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter. J. Neural. Transm. 2009; 116:1591–1599.
- Costardi JV, Nampo RA, Silva GL, Ribeiro MA, Stella HJ, Stella MB, Malheiros SV. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. Rev Assoc Med Bras. 2015; 61(4):381-7.
- Dos Santos RG, Grasa E, Valle M, Ballester MR, Bouso JC, Nomdedéu JF, Homs R, Barbanoj MJ, Riba J. Pharmacology of ayahuasca administered in two repeated doses. Psychopharmacology (Berl). 2012; 219(4):1039-53.
- Domínguez-Clavé E, Soler J, Elices M, Pascual JC, Álvarez E, de la Fuente Revenga M, Friedlander P, Feilding A, Riba J. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. Brain Res Bull. 2016;126(Pt 1):89-101.
- Dziewulska D, Gogol A, Gogol P, Rafalowska J. Enlargement of the Nissl substance as a manifestation of early damage to spinal cord motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis. Clin Neuropathol. 2013;32(6):480-5.
- Fábregas JM, González D, Fondevila S, Cutchet M, Fernández X, Barbosa PC, Alcázar-Córcoles MÁ, Barbanoj MJ, Riba J, Bouso JC. Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. Drug Alcohol Depend. 2010; 111(3):257-61.
- Fernandes, N.; Fernandes, V. Criminologia Integrada. *Revista dos Tribunais*. 2ªed; São Paulo. Toxicomanias, 2002; p.679-729.
- Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. Science. 2009; 323(5916):934-7.

- Frecka E, Szabo A, Winkelman MJ, Luna LE, McKenna DJ. A possibly sigma-1 receptor mediated role of dimethyltryptamine in tissue protection, regeneration, and immunity. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(9):1295-303.
- Frecka E, Bokor P, Winkelman M. The therapeutic potentials of ayahuasca: possible effects against various diseases of civilization. *Front Pharmacol*. 2016; 7:35.
- Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J. Vis. Exp.* 2012; (65), e3564.
- Gigliotti A, Bessab MA. Diagnósticos Alcohol Dependence Syndrome: diagnostic criteria. *Rev Bras Psiquiatr* 2004; 26(Supl I):11-13.
- Gilpin NW, Koob GF. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res Health*. 2008; 31(3):185-95.
- Goh ET, Morgan MY. Review article: pharmacotherapy for alcohol dependence - the why, the what and the wherefore. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;45(7):865-882.
- Guglielmo R, Martinotti G, Quatralo M, Iome L, Kadilli I, Di Nicola M, Janiri L. Topiramate in Alcohol Use Disorders: Review and Update. *CNS Drugs*. 2015; 29(5):383-95.
- Hamill J, Hallak J, Dursun SM, Baker G. Ayahuasca: psychological and physiologic effects, pharmacology and potential uses in addiction and mental illness. *Curr Neuropharmacol*. 2018; 24.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1984; 327, 1-5.
- Heckmann W, Silveira CM. Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos: Minha Editora. 2009; p. 67-87.
- Iurlo M, Leone G, Schilstrom B, Linner L, Nomikos G, Hertel P. Effects of harmine on dopamine output and metabolism in rat striatum: role of monoamine oxidase-A inhibition. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;159(1):98-104.
- Jacobus J, Tapert SF. Neurotoxic Effects of Alcohol in Adolescence. *Annu. Rev. Clin. Psychol*. 2013; 9:703-721.
- Jaramillo AA, Randall PA, Frisbee S, Besheer J. Modulation of sensitivity to alcohol by cortical and thalamic brain regions. *Eur J Neurosci*. 2016;44(8):2569-2580.

- Kobelta P, Tebbeb JJ, Tjandraa I, Baec HG, Ru"terd J. Klappd BF, Wiedenmanna B, Mo"nnikesa H. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Research Protocols* 2004; 13:45– 52.
- Katzung, B. *Basic and Clinical Pharmacology*, 8th ed. McGraw-Hill, San Francisco. 2001.
- Kokan L. Monoamine Oxidative Inhibitors. *In: Goldfrank's Toxicology Emergencies*. Chapter 60. 7th Ed. Edited by Lewis R. McGraw-Hill, 2002.
- Labate, B. C., & Jungaberle, H. *The internationalization of ayahuasca*. Zurich: Lit Verlag. Eds; 2011.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J., Morato, S. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2008; 41(2), 135-40.
- Lankford MF, Myers RD. Opiate and 5-HT_{2A} receptors in alcohol drinking: preference in HAD rats is inhibited by combination treatment with naltrexone and amperozide. *Alcohol*. 1996;13(1):53-7
- Lawn W, Hallak JE, Crippa JA, Dos Santos R, Porffy L, Barratt MJ, Ferris JA, Winstock AR, Morgan CJA. Well-being, problematic alcohol consumption and acute subjective drug effects in past-year ayahuasca users: a large, international, self-selecting online survey. *Sci Rep*. 2017; 7(1):15201.
- Levine HG. "The Birth of American Alcohol Control: Prohibition, the Power Elite and the Problem of Lawlessness" *Contemporary Drug Problems*, Spring. 1985; pp. 63-115.
- Li J, Cheng Y, Bian W, Liu X, Zhang C, Ye JH. Region-Specific Induction of FosB/DFosB by Voluntary Alcohol Intake: Effects of Naltrexone. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34(10):1742-50. Liester MB, Prickett JJ. Hypotheses regarding the mechanisms of ayahuasca in the treatment of addictions. *J Psychoactive Drugs*. 2012;44(3):200-8.
- Lindell SG, Schwandt ML, Suomi SJ, Rice KC, Heilig M, Barr CS. Intermittent Access to Ethanol Induces Escalated Alcohol Consumption in Primates. *J Addict Behav Ther Rehabil*. 2017; 6(1): pii: 163.
- Littleton J, Zieglg"nsberger W. Pharmacological mechanisms of naltrexone and acamprosate in the prevention of relapse in alcohol dependence. *Am J Addict*. 2003;12 Suppl 1:S3-11.
- Logan C, Asadi H, Kok HK, Looby ST, Brennan P, O'Hare A, Thornton J. Neuroimaging of chronic alcohol misuse. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2017; 61(4):435-440.

- Mabit J. “ Ayahuasca in the treatment of Addictions”, In: *Psychedelic Medicine (Vol. 2): New Evidence for Hallucinogenic Substances as Treatments* , by Thomas B. Robert, Michael J. Winkelman, pp. 87-103, Praeger Ed. USA, 2007.
- Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Kash TL. Serotonin’s Complex Role in Alcoholism: Implications for Treatment and Future Research. *Alcoholism: Clinical and experimental Research*. 2016; Vol. 40(6):1196-201.
- McKenna, D. J. T. G. H. N. and A. F. Monoamine oxidase inhibitors in south American hallucinogenic plants: tryptamine and β -carboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*, 1984; 10:195–223.
- Mckenna DJ. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacol Ther*. 2004; 102(1):111-29.
- McKenna DJ, Callaway JC, Grob CS. The scientific investigation of Ayahuasca: a review of past and current research. *The Heffter Review of Psychedelic Research*. 1998; 1:65–77.
- MacRae E. *Guiado pela Lua. Xamanismo e uso ritual da ayahuasca no culto do Santo Daime*. Editora Brasiliense São Paulo, 1992.
- Melo WJr, Souza Filho J, Grisolia CK, Caldas ED, Pic-Taylor A. Genotoxic evaluations in wistar rats of the hallucinogenic plant extract Ayahuasca. *International Journal of Phytomedicine* 2016; 8:249-256.
- Mercante M. Ayahuasca e o tratamento da dependência. *MANA*. 2013; 19(3):529-558.
- Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther*. 2008; 31(3):187-99.
- Motta LG, Morais JA, Tavares ACAM , Vianna LMS, Mortari MR, Amorim RFB, Carvalho RR, Paumgarten FJR, Pic-Taylor A, Caldas ED. Maternal and developmental toxicity of the hallucinogenic plant-based beverage ayahuasca in rats. *Reproductive Toxicology* 2018; 77:143–153.
- Murphy JM, Stewart RB, Bell RL, Badia-Elder NE, Carr LG, 2,5 McBride WJ, Lumeng L, Li Ting-Kai. Phenotypic and genotypic characterization of the Indiana University rat lines selectively bred for high and low alcohol preference. *Behavior Genetics*. 2002; 32(5):363-88.
- Naranjo CA, Knoke DM. The role of selective serotonin reuptake inhibitors in reducing alcohol consumption. *J Clin Psychiatry*. 2001; 62 Suppl 20:18-25.

- Naranjo P. Hallucinogenic plant use and related indigenous belief systems in the Ecuadorian Amazon. *J. of Ethnopharmacology*. 1979; 1:121-145.
- Navarro-Zaragoza J, Ros-Simó C, Milanés MV, Valverde O, Laorden ML. Binge Ethanol and MDMA Combination Exacerbates Toxic Cardiac Effects by Inducing Cellular Stress. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141502.
- NIH. Alcohol Use Disorder: A Comparison Between DSM–IV and DSM–5. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. 2016.
- Nunes AA, dos Santos RG, Osório FL, Sanches RF, Crippa JA, Hallak JEC. Effects of ayahuasca and its alkaloids on drug dependence: A systematic literature review of quantitative studies in animals and humans. *J. Psychoact, Drugs*. 2016; 48(3), 195-20.
- Oliveira-Lima A, Santos R, Hollais A, Gerardi-Junior C, Baldaia M, Wuo-Silva R. Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. *Physiol Behav*. 2015; 142: 28–36.
- Olsen RW, Liang J. Role of GABA receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model. *Mol Brain*. 2017; 20-10(1):45.
- Palhano-Fontes F, Barreto D, Onias H, Andrade KC, Novaes MM, Pessoa JA, Mota-Rolim SA, Osório FL, Sanches R, Dos Santos RG, Tófoli LF, de Oliveira Silveira G, Yonamine M, Riba J, Santos FR, Silva-Junior AA, Alchieri JC, Galvão-Coelho NL, Lobão-Soares B, Hallak JEC, Arcoverde E, Maia-de-Oliveira JP, Araújo DB. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. *Psychol Med*. 2018;15:1-9.
- Palpacuer C, Duprez R, Huneau A, Locher C, Boussageon R, Laviolle B, Naudet F. Pharmacologically controlled drinking in the treatment of alcohol dependence or alcohol use disorders: a systematic review with direct and network meta-analyses on nalmefene, naltrexone, acamprosate, baclofen and topiramate. *Addiction*. 2018;113(2):220-237.
- Parker R, Kim SJ, Gao B. Alcohol, adipose tissue and liver disease: mechanistic links and clinical considerations. *Nature Review Gastroenterology and Hepatology* 2018; 15:50-59.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985; 14:149-167.

- Petta, AC; Marques, R. O uso do álcool e a evolução do conceito de dependência de álcool e outras drogas e tratamento. *Revista Imesc*. 2001; 3:73-86.
- Pic-Taylor A, Motta LG, Morais JA, Melo JW, Santos AFA, Campos LA, Mortari MR, Zuben MVV, Caldas ED. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rat. *Behavioural Processes*, 2015;118:102 - 110.
- Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5(3):e290-e299.
- Prut, L., Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 2003; 463(1-3), 3–33.
- Qu, S. J., Wang, G. F., Duan, W. H., Yau, S. Y., Zuo, J. P., Tan, C. H., Zhu, D. Tryptamine derivatives as novel non-nucleosidic inhibitors *Bioorg Med Chem*. 2011;19(10):3120-7.
- Riba J, Rodríguez-Fornells A, Urbano G, Morte A, Antonijoan R, Montero M, Callaway JC, Barbanoj MJ. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;154(1):85-95.
- Reynolds AR, Berry JN, Sharrett-Field L, Prendergast MA. Ethanol withdrawal is required to produce persisting N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hippocampal cytotoxicity during chronic intermittent ethanol exposure. *Alcohol*. 2015;49(3):219-27.
- Rosner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S. Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst. Rev* 2010; 12:CD001867.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*. 2003;37(4):577-82.
- Sharma R, Dumontier S, DeRoode D, Sahota P, Thakkar MM. Nicotine infusion in the wake-promoting basal forebrain enhances alcohol-induced activation of nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(10):2590-6.
- Sanches RF, de Lima Osório F, Dos Santos RG, Macedo LR, Maia-de-Oliveira JP, Wichert-Ana L, de Araujo DB, Riba J, Crippa JA, Hallak JE. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: A SPECT study. *J Clin Psychopharmacol*. 2016;36(1):77-81.

- Santos AFA, Vieira ALS, Pic-Taylor A, Caldas ED. Reproductive effects of the psychoactive beverage ayahuasca in male Wistar rats after chronic exposure. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27-2017; 353–360
- Sarman I. Review shows that early foetal alcohol exposure may cause adverse effects even when the mother consumes low levels. *Acta Paediatr.* 2018;107(6):938-941.
- Seibel, SD. *Dependência de drogas*. 2ed, Atheneu- 411-4. São Paulo, 2010.
- Simms JA, Steensland P, Medina B, Kenneth E, Abernathy L, Chandler J, Wise R, Selena E. Bartlett Intermittent Access to 20% Ethanol Induces High Ethanol Consumption in Long-Evans and Wistar Rats. *Alcohol Clin Exp Res*, Vol 32,pp 1816–1823; 2008.
- Schenberg EE, Alexandre JF, Filev R, Cravo AM, Sato JR, Muthukumaraswamy SD, Yonamine M, Waguespack M, Lomnicka I, Barker SA, da Silveira DX. Acute biphasic effects of ayahuasca. *Plos ONE*. 2015; 10 (9):e0137202.
- Scheideler JK, Klein WMP. Awareness of the Link between Alcohol Consumption and Cancer across the World: A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(4):429-437.
- Schultes RE. The identity of the malpighiaceae narcotics of South America. *Botanical Museum Leaflets Harvard University*. 1957; 18:1 – 56.
- Smith RL, Canton H, Barret RJ, Sanders-Bush E. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1998; 61 (3): 323-330.
- Souza EA. Avaliação do potencial terapêutico da ayahuasca na diminuição de consumo de álcool utilizando o procedimento IA2BC (*intermittent access to 2 bottle choice*) em ratos Wistar. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia. Universidade de Brasília. 2017.
- Stahl SM. *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*. Cambridge, NY: Cambridge University Press, 2008.
- Steensland P, Simms JA, Holgate J, Richards JK, Bartlett SE, Varenicline F. An alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, selectively decreases ethanol consumption and seeking, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(30):12518-23.
- Thomas G, Lucas P, Capler NR, Tupper KW, Martin G. Ayahuasca-assisted therapy for addiction: results from a preliminary observational study in Canada. *Current drug abuse reviews*. 2013; 6(1): 30-42.

- Tost H, Braus DF, Hakimi S, Ruf M, Vollmert C, Hohn F, Meyer-Lindenberg A. Acute D2 receptor blockade induces rapid, reversible remodeling in human cortical-striatal circuits. *Nat Neurosci.* 2010;13(8):920-2.
- Tulchinsky E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol Histopathol.* 2000; 15(3):921-8.
- Varodayan FP, Guglielmo G, G Logrip ML, George O, Roberto M. Alcohol dependence disrupts amygdalar L-Type voltage-gated calcium channel mechanisms. *J Neurosci.* 2017;37(17):4593-4603.
- Villas Boas GR, Zamboni CG, Peretti MC, Correia D, Rueda AV, Camarini R, Brunialti-Godard AL, Boerngen-Lacerda R. GABA(B) receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 102(2):233-40.
- Zangrossi Jr., H.; Graeff, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Research Bulletin*, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.
- WHO. Global status report on alcohol and health. World Health Organization, 2014.
- Wise RA. Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia* 1973; 29:203–210.
- Wong DVT, Ferreira JRO, Fonteles MMF, Viana GSB, Souza FCF, Vasconcelos Zaleski M, Morato GS, Silva VA, Lemos T. Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal syndrome. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004; 26 (Supl I):40-42
- Wong, DVT, Jose R. de O. Ferreira, Marta MF Fonteles, Glauce SB. Viana, Francisca CF. de Souza, Silvânia MM. Vasconcelos. *Alcohol and Neurodevelopment: pharmacologics and genetics aspects.* Revista Eletrônica de Farmácia. 2008; 5(1):16-31.
- Yip L. Ethanol. *In: Goldfrank's Toxicology Emergencies.* Chapter 64. 7th Ed. Edited by Lewis R. Goldfrank et al. McGraw-Hill, 2002.
- Zaleski, M; Morato, GS; Silva, VA; Lemos, T. Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal syndrome. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26 (Supl I):40-42

ANEXO - APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO ANIMAL


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 14 de agosto de 2014.


DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DO CHÁ AYAHUASCA E DE SEUS COMPONENTES BIOATIVOS EM RATOS DEPENDENTES DE ÁLCOOL**", UnBDoC n.º 73276/2014, sob responsabilidade da Professora Eloisa Dutra Caldas foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


MsC. MV. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Vice Coordenador da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.