

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAROLINA APARECIDA DE FARIA ALMEIDA

**AYAHUASCA NO TRATAMENTO DA FARMACODEPENDÊNCIA AO
ETANOL EM CAMUNDONGOS: POSSÍVEL INTERVENÇÃO
TERAPÊUTICA?**

Alfenas - MG
2019

CAROLINA APARECIDA DE FARIA ALMEIDA

**AYAHUASCA NO TRATAMENTO DA FARMACODEPENDÊNCIA AO ETANOL EM
CAMUNDONGOS: POSSÍVEL INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA?**

Defesa de Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

Coorientadora: Profa. Dra. Tania Marcourakis

Alfenas - MG
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

A447a Almeida, Carolina Aparecida de Faria.
Ayahuasca no tratamento da farmacodependência ao etanol em
camundongos: possível intervenção terapêutica / Carolina Aparecida de
Faria Almeida. - Alfenas/MG, 2019.
80 f.: il. –

Orientadora: Larissa Helena Torres.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Etanol. 2. Sensibilização do Sistema Nervoso Central. 3.
Banisteriopsis. 4. Ansiedade. I. Torres, Larissa Helena. II. Título.

CDD-615.95131

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

CAROLINA APARECIDA DE FARIA ALMEIDA

“Ayahuasca no tratamento da farmacodependência ao etanol em camundongos: possível intervenção terapêutica?”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 26/02/18

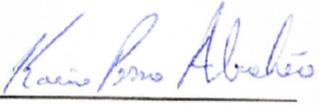
Profa. Dra. Larissa Helena L. T. Pacheco

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

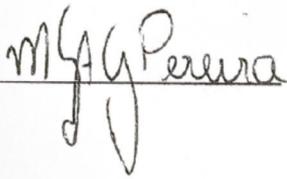
Profa. Dra. Karina Possa Abrahão

Instituição: UNIFESP

Assinatura: 

Profa. Dra. Marília Gabriella A. Goulart Pereira

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho à Deus, pai de toda criatura.
Virgem Maria, mãe e fiel intercessora.
Minha família, meu apoio.
Meus irmãos da Comunidade Mariana Resgate.
Meus amigos.
Professora Larissa Helena Torres.

A todos vocês meu sincero afeto e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus primeiramente pelo dom da vida, e também por permitir que eu vivesse tantas situações sempre me cobrindo com sua ternura e misericórdia. Por realizar tantas e tantas maravilhas neste período. Por todo amor que me sustentou diante a tantos desafios e por colocar pessoas maravilhosas em minha volta, que sempre me ajudam e me fazem ser melhor.

À Virgem Maria, minha fiel intercessora, por todo cuidado comigo e por me ensinar as virtudes necessárias para viver esse tempo. Por se mostrar presente nos chuveiros, marca páginas e tantos outros detalhes do dia a dia.

Aos amigos do céu, Santa Teresinha por me ensinar a viver cada dia e tentar olhar tudo com amor e oferecer sempre o meu hoje à Deus. E São João Paulo II, que sempre intercedendo nos momentos de escrita, me ensinando a buscar a santidade naquilo que Deus me proporciona viver hoje.

À minha família, por todo apoio amor e carinho. Meu pai Argeu e minha mãe Maria Aparecida, por apoiarem minhas escolhas e simplesmente me amarem. Acima de tudo por me ensinarem o significado do amor, do perdão e tantas outras coisas. Meu irmão Thiago, minha cunhada Raquel e meus sobrinhos Arthur e Manuela, por todo carinho e afeto, nas ligações capazes de trazer uma alegria impar. Ao meu irmão Daniel, por dividir tantos momentos comigo, e por me fazer confrontar comigo mesma, me fazendo uma pessoa melhor. Aos meus tios, tias, primos, primas, avô e avô por todo amor, carinho e orações. Amo vocês.

À Professora Larissa Torres, como disse na qualificação, que aceitou o desafio de me orientar, e que com uma sabedoria divina me fez sair de mim e superar muitos obstáculos. Por todo carinho em todas as ocasiões, seja para me corrigir, seja para me parabenizar. Gratidão Professora Larissa, não poderia ter orientadora melhor. Faltam-me palavras para descrever e te agradecer, mas meu coração se enche de alegria e gratidão à Deus por tanto carinho e cuidado em te colocar na minha vida.

À Prof Tânia Marcourakis por tanto cuidado, carinho e preocupação nas tantas idas à São Paulo.

À todos os amigos do LAFEC, Marilene, Antônio, Jessica, Daniela, Bruna, Wilce, Gabriel, Karla e tantos outros, que tanto me ensinaram e fizeram meus dias muito mais divertidos. Esse tempo foi melhor por ter vocês comigo.

Às Professoras Marcinha e Carla, por todo carinho e ensinamento no período do estagio docente e em tantos outros momentos de cafés na farmacologia.

Ao Professor Marcos, que chegou há pouco tempo, mas já tem um lugar especial no meu coração. Obrigada por todo auxílio nos últimos experimentos, pelos cafés e almoços.

Às funcionárias Giselda e Sônia por toda ajudam no laboratório.

À Professora Rosana Camarini por toda colaboração, por permitir analisar os vídeos em seu laboratório e por todo carinho que me recebeu nas tantas idas à São Paulo.

Ao Professor Maurício por toda colaboração na parte analítica do trabalho.

Ao Professor Raphael por toda colaboração e ajuda para executar e escrever esse trabalho.

Aos amigos: Lídia, Vitor, Stephanie, Ana Carolina, Nivea, Gabriel que me receberam no laboratório deles, me ensinaram novas técnicas tudo com tanto carinho e amor.

À Gabriela, por toda colaboração na parte analítica amizade e carinho nas centenas de e-mails.

Ao Laboratório de Fisioterapia experimental, na pessoa do Professor Gionane e seus alunos Yago e Thamyris por me permitir usar os equipamentos e por todo carinho que me receberam.

Aos Laboratórios de Fisiologia na pessoa do Professor Alexandre, na pessoa da Professora Silvia Leitão e todos seus alunos; Laboratório de Biologia Molecular e Parasitologia, na pessoa do Professor Marcos e Professor Fabio; Ao Laboratório de Vacinas na pessoa do Professor Cosme; À Professora Elisangela; Ao Laboratório de Microbiologia na pessoa da Professora Amanda; Ao Laboratório de Bioquímica na pessoa da Professora Fernanda e Professora Maria Rita, por permitirem o uso dos equipamentos e materiais necessários para execução dos meus experimentos.

Ao Laboratório de Genética Humana na pessoa do Professor Angel Maurício Castro e ao Funcionário Rafael Fernandes pelo empréstimo de equipamentos necessários aos experimentos. Rafa, você foi essencial. Gratidão por toda sua ajuda

nos mais diversos problemas relacionados a computadores e afins. Gratidão por sua amizade.

À secretária do programa, Fabiana, por toda ajuda e por todo carinho, amor e alegria de um sorriso em todas as vezes que me recebeu.

À amiga Carla por toda ajuda e amizade nos mais diversos momentos nesses dois anos.

À Comunidade Mariana Resgate, a todos os meus irmãos e irmãs neste carisma. Gratidão. Por toda oração, amizade e por me ensinar a buscar a santidade por meio desse carisma que me resgata todos os dias de mim mesma. Por me mostrar que sou amada por Deus. Pelas adorações, tendas de orações, e tantos outros apostolados que me sustentaram a minha fé até aqui. Amo vocês.

À Danusa por ter respondido sim à Deus , por me formar de maneira geral me ensinando a entrar no mistério, a me fazer desejar a santidade, e por me amar. Te amo Dan.

À Camilinha, minha formadora, amiga e mãe espiritual. Por ouvir meus choros, angustias, alegrias e tantas coisas. Por me ensinar a enxergar a luz em meio à tempestade. A ter calma nos mais diversos momentos. Gratidão Cá, por cada partilha que tanto me fez crescer e a superar tantos limites neste tempo. Te amo Cá.

À amiga Priscila Calori e a toda sua família: Tia Licemar, Tio Enes, Letícia e Dina, por todo amor e carinho, por me adotarem. Amo vocês.

Às amigas: Larissa, Elisabeth, Flaviane, Bruna e Fernada, por toda amizade, partilhas e por me amarem. Amo-vocês.

À todos os amigos do Cenáculo de Música Mariano Resgate e do Cenáculo de Comunicação, por toda amizade e por entenderem minhas faltas. Amo vocês.

Aos mais diversos amigos que Deus colocou na minha vida e que não mediram esforços em me amar.

À Unifal por permitir que este sonho se tornasse realidade dando todo amparo de infraestrutura.

À USP por toda colaboração e auxílio nestes dois anos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas

Gerais (FAPEMIG) e da Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas – Ministério da Justiça e Segurança Pública (SENAD / MJ).

Gratidão oh Deus,
o Teu amor me sustentou,
a Tua Graça me acompanhou
Até aqui!

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde relata que o consumo abusivo de etanol é responsável por cerca de 2 bilhões de mortes por ano, não contabilizando as pessoas que ficam incapacitadas, seja pelos acidentes causados ou pelos danos lesivos do etanol ao organismo. Apesar de diversos fármacos serem utilizados no tratamento do transtorno causado pelo uso de etanol, o tratamento disponível não é eficaz, sendo que cerca de 2/3 dos pacientes tratados voltam a beber em menos de um ano. Ainda, estudos indicam que substâncias com ações psicodélicas, como ayahuasca, têm sido cada vez mais estudadas como possíveis estratégias terapêuticas para reabilitação de usuários de drogas de abuso. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo avaliar possíveis intervenções terapêuticas, como a ayahuasca, no tratamento da farmacodependência ao etanol. Para tanto, camundongos Swiss machos adultos foram submetidos ao ensaio de sensibilização comportamental ao etanol por meio da análise da atividade locomotora em campo aberto. Os animais sensibilizados ao etanol foram tratados com ayahuasca durante oito dias. No sétimo dia de tratamento foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado. Após o tratamento, os animais foram desafiados com uma dose única de etanol e a atividade locomotora foi registrada (expressão da sensibilização). Imediatamente após os ensaios comportamentais os animais foram eutanasiados e o estriado e o hipocampo foram dissecados para futuras análises de *western blot*. Nossos resultados sugerem que 10 dias alternados de administração de etanol é capaz de promover a aquisição e expressão da sensibilização ao etanol, sendo que o tratamento de oito dias de ayahuasca na dose de 1,76 mg de DMT/Kg de animal é eficaz na diminuição da expressão da sensibilização ao etanol. Além disso, sugerimos que a ayahuasca pode apresentar um efeito ansiolítico nesta mesma dose. Nossos resultados mostram que a ayahuasca é capaz de prevenir os efeitos da exposição prévia ao etanol na concentração de dinorfina e de c-fos no estriado e no hipocampo, bem como na concentração dos receptores 5HT1a e 5HT2a no hipocampo.

Palavras chaves: Etanol. Sensibilização do Sistema Nervoso Central. Banisteriopsis. Ansiedade.

ABSTRACT

The treatment of ethanol addiction, a public health concern worldwide, usually is not effective and new substances have been evaluated. Accordingly, the aim of this study was to evaluate the effects of ayahuasca in ethanol-sensitized mice (Ethics Com. 34/2017). Adult male Swiss mice received 2.2 g/kg ethanol or saline i.p. on every other day for 9 days (D1, D3, D5, D7 and D9) and locomotor activity was evaluated. Then, animals were treated with ayahuasca (AYA - equivalent to 1,76 mg/kg of DMT) or water by oral gavage daily for 8 days. In the seventh day, mice were evaluated in the elevated plus maze test. After the treatment, the mice were challenged with a single dose of ethanol to measure the locomotor activity (groups: SAL/SAL/SAL, n=10; SAL/SAL/ET, n=9; SAL/AYA/ET, n=12; ET/SAL/ET, n=18; ET/AYA/ET, n=24). Immediately after that, animals were euthanized and striatum and hippocampus were dissected and stored at -80°C for Western blot analysis of D1, D2, 5HT1a and 5HT2a receptors, dynorphin, pro-dynorphin and c-Fos protein. Our results suggest that 10 alternate days of ethanol administration is able to promote the acquisition and expression of sensitization to ethanol, and eight-days treatment of ayahuasca at the dose of 1.76 mg DMT / kg of animal is effective to block the expression of sensitization to ethanol. We also observed an anxiolytic effect induced by ayahuasca. In addition, ayahuasca is able to prevent the effects of ethanol exposure on the concentration of dynorphin and c-Fos in the striatum and hippocampus, as well as the concentration of 5-HT1a and 5-HT2a receptors in the hippocampus.

Keywords: Ethanol. Central Nervous System sensitization. Banisteriopsis. Anxiety.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Acetaldeído desidrogenase
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ATV	Área tegumental ventral
AYA	Ayahuasca
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DMT	N,N-dimetiltriptamina
DP	Desvio padrão
Dy/ProDy	Razão dinorfina/ pró-dinorfina
EPM	Erro padrão médio
EtOH	Etanol
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama
HRL	Harmalina
HRM	Harmina
LCE	Labirinto em cruz elevado
MAO	Monoamina oxidase
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PKA	Proteína quinase do tipo A
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
SAL	Salina
TBTT	Tampão Tris-Salina com Tween 20
THH	Tetraidro-harmina
5-HT	Serotonina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos alcaloides da ayahuasca e da serotonina.....	28
Figura 2 - Desenho Experimental.....	38
Figura 3 - Distância total percorrida em campo aberto.....	44
Figura 4 - Distância total percorrida em campo aberto no tratamento.....	45
Figura 5 - Distância total percorrida em campo aberto no tratamento - comparação entre o primeiro e último dia.....	46
Figura 6 - Porcentagem de permanência nos braços abertos do LCE.....	47
Figura 7 - Frequência total de <i>grooming</i> no LCE.....	48
Figura 8 - Quantificação das proteínas 5HT1a, 5HT2a, dinorfina, pró-dinorfina, D1, D2 e c-fos no estriado.....	50
Figura 9 - Quantificação das proteínas 5HT1a, 5HT2a, dinorfina, pró-dinorfina, D1,D2 e c-fos no hipocampo.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das concentrações dos alcaloides da ayahuasca encontrados na literatura.....	30
Tabela 2 - Descrição dos íons precursores, íons produto, tempo de retenção, voltagem do cone e energia de colisão no método por UPLC-ESI-MS/MS.....	35
Tabela 3 - Valores das concentrações dos alcaloides presentes na ayahuasca...	36
Tabela 4 - Proteínas e seus anticorpos específicos.....	41
Tabela 5 - Valores da concentração do etanol presente no plasma.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Epidemiologia	19
2.2	Transtorno por uso de substâncias	20
2.3	Sensibilização em roedores	21
2.4	Mecanismos de ação do etanol e mecanismo associados ao transtorno por uso de substâncias	23
2.5	Tratamento do Transtorno pelo uso de substâncias	26
2.6	Ayahuasca	28
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1	Animais	34
5.2	Substâncias	34
5.3	Determinação dos alcaloides da ayahuasca em amostras de chá	34
5.4	Atividade locomotora em campo aberto e labirinto em cruz elevado	36
5.5	Desenho experimental	37
5.6	Determinação do etanol no plasma	39
5.7	Western blot	40
5.8	Análises estatísticas	41
6	RESULTADOS	42
6.2	Sensibilização comportamental pelo etanol e tratamento com ayahuasca	42
6.3	Tratamento com Ayahuasca	45
6.4	Labirinto em cruz elevado: avaliação da ansiedade e padrão <i>grooming</i> associado	46
6.5	Determinação de etanol no plasma	48
6.6	Western blot	49
6.6.1	Estriado.....	49
6.6.2	Hipocampo	50
7	DISCUSSÃO	53

8	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

O etanol é livremente comercializado para maiores de 18 anos, sendo uma droga lícita. Com o uso abusivo dessa bebida, estima-se a ocorrência de mais de 2 milhões de morte ao ano, representando um problema de saúde pública (WHO, 2011). O uso abusivo do etanol ocorre por todo mundo, tanto em países considerados desenvolvidos, como Espanha e Alemanha como em países em desenvolvimento, assim como no Brasil (LARAMÉE et al., 2013; MUNHOZ et al., 2017).

O uso abusivo de etanol pode levar a um transtorno classificado como transtorno causado pelo uso de uma substância, uma doença cíclica e crônica (KOOB; VOLKOW, 2009). Quando o usuário se torna dependente, há uma perda total do controle da quantidade administrada, o que torna a droga mais importante do que até mesmo aspectos básicos como alimentação e higienização (NESTLER; AGHAJANIAN, 1997). Além disso, quando ocorre privação da droga, o usuário entra na fase de abstinência, que é caracterizada por sintomas emocionais negativos, como ansiedade, depressão e irritabilidade. Tais sintomas representam um reforço negativo para o uso da droga, já que o usuário tende a buscar a substância para eliminar esses sintomas (KOOB; VOLKOW, 2009).

O tratamento deste transtorno relacionado ao uso do etanol disponível atualmente envolve ações multiprofissionais como terapia psicológica, grupos de apoio, uso de ansiolíticos e antidepressivos para tratar os sintomas da abstinência e uso de alguns medicamentos que tentam causar uma aversão ao uso do etanol (CFM, 2011). Apesar do tratamento disponível, mais da metade dos indivíduos voltam a ingerir etanol depois de tratados (MERKX et al., 2011).

Neste contexto, substâncias alucinógenas têm sido vastamente estudadas como possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento de usuários dependentes. Ayahuasca, ibogaína e ácido lisérgico são substâncias mais seguras em relação às principais drogas com potencial abusivo, apresentam pouco potencial de indução da farmacodependência e possuem um baixo índice de mortalidade (WINKELMAN, 2014).

A ayahuasca é preparada por meio da decocção de duas plantas: *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*, sendo uma bebida psicoativa originalmente usada em rituais indígenas da Amazônia. Com a expansão da colonização do Brasil, na época do ciclo da borracha, “os homens brancos” entraram em contato com os costumes e rituais indígenas e começaram a dissipar o uso dessa bebida em ritos religiosos, que deram origem a religiões como Santo Daime, União do Vegetal e Barquinha, sendo que cada religião tem o seu modo de preparo do chá (GOULART, 2004). O caule da *B. caapi* contém alcaloides β -carbolinas como harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH), que são inibidoras da enzima monoaminoxidase (MAO). As folhas da *P. viridis* contém N,N-dimetiltriptamina (DMT) que é um alcaloide alucinógeno.

Existem estudos sobre ações benéficas da ayahuasca em humanos, realizados em usuários em um rito religioso do qual a ayahuasca faz parte. Em um estudo realizado com membros das igrejas Santo Daime e Barquinha, usando a ayahuasca no período de um ano, esses apresentaram uma redução nos sintomas de ansiedade e depressão (BOUSO et al., 2012). Além disso, em outro estudo realizado em membros da igreja Santo Daime com histórico de síndrome do pânico, houve redução dos sintomas de pânico após a ingestão da ayahuasca em duas sessões do ritual, no período de duas semanas, em um estudo duplo cego placebo controle (SANTOS et al., 2007). Entretanto, essas ações da ayahuasca parecem ter um efeito “placebo”, visto que pode estar associado à questão religiosa. Neste contexto, nosso trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da ayahuasca sobre a sensibilização comportamental pelo etanol em camundongos, fenômeno associado à neuroadaptação relacionada ao processo de transtorno relacionado ao uso de substâncias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia

O consumo excessivo do etanol, bebida alcoólica proveniente da fermentação de açúcares, representa um grave problema de saúde pública, além de estar relacionado a problemas sociais e econômicos. O etanol é considerado uma droga lícita, sendo vendido livremente no Brasil para pessoas maiores de 18 anos. A World Health Organization (WHO) relata que o consumo abusivo de etanol é responsável por cerca de 2 bilhões de mortes por ano, não contabilizando as pessoas que ficam incapacitadas pelos acidentes causados ou pelos danos lesivos do etanol ao organismo (WHO, 2011). A Europa apresenta cerca de 15 milhões de usuários de etanol (LARAMÉE et al., 2013). A América é o continente que possui maior consumo médio de etanol no mundo, sendo que em 2015 as taxas de consumo excessivo de etanol aumentaram cerca de 8% entre as mulheres e 11% nos homens (WHO, 2015). O consumo médio se dá pela média de consumo entre a população.

De acordo com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e outras Drogas, em 2012, 66% dos homens e 48% das mulheres beberam em *bingue*, termo usado para o consumo excessivo que ocorre quando uma pessoa bebe o equivalente a cinco doses ou mais, no caso de homens, e quatro doses ou mais, no caso de mulheres, em uma mesma situação num período de tempo de até duas horas (INPAD, 2012). A definição de dose padrão é dada pela quantidade de etanol puro nas bebidas, sendo essa dose diferente entre os países. Segundo a Organização Mundial de Saúde, uma dose contém uma média de 12 g de etanol puro, sendo equivalente a uma dose de destilado (30 ml) uma lata de cerveja ou chope (330 ml) ou uma taça de vinho (100 ml) (CISA, 2019). Cabe destacar que dentre os adultos que mais bebem; 20% deles consomem 56% de todo etanol ingerido, podendo causar problemas de intoxicação aguda (INPAD, 2012).

Segundo Galduróz e Caetano (2004), a prevalência do uso de etanol no Brasil era de 11,2% em 2004, sendo que a farmacodependência pelo etanol era de 17,1% dos homens e 5,7% das mulheres. O autor ainda relata que nos estados

pertencentes às regiões Norte e Nordeste há maior prevalência de usuários dependentes pelo etanol, apresentando porcentagens acima dos 16%, considerando ambos os gêneros (GALDURÓZ; CAETANO, 2004). Já em 2012, a prevalência de dependentes pelo etanol foi de 10,48% para os homens e de 3,63% para as mulheres (INPAD, 2012). Em um estudo feito nas capitais brasileiras entre os anos de 2006 e 2013, constatou-se que a prevalência do uso do etanol é alta nestes locais, principalmente entre pessoas que possuem maior escolaridade, mais jovens e homens, sendo que o consumo abusivo apresenta uma tendência estacionária. Os valores de prevalência para o consumo abusivo de etanol foram de 15,6% em 2006 e 16,4% em 2013 (MUNHOZ et al., 2017). O padrão de consumo do etanol e o volume ingerido, assim como casos de intoxicações e de dependência química influenciam nas consequências de curto e longo prazo à saúde. Entre as patologias atribuídas ao consumo crônico de etanol estão: cirrose hepática, pancreatite crônica, câncer, entre outras. Adicionalmente, também podem ocorrer problemas sociais envolvendo terceiros, como acidentes de trânsito e violência doméstica (WHO, 2004). Dentre os dependentes, são poucos os que recebem o devido tratamento. Na Europa, apenas 10% dos dependentes pelo etanol recebem tratamento; além disso, dos pacientes que recebem, mais de dois-terços voltam a beber nos primeiros 12 meses sendo, portanto, o tratamento ineficaz (KOHN et al., 2004; MERKX et al., 2011).

2.2 Transtorno por uso de substâncias

O transtorno causado por uso de substâncias é uma doença cíclica e crônica que começa com a administração da droga (intoxicação), sendo o comportamento mantido por processos de desejo, compulsão e abstinência. Em outras palavras, o indivíduo apresenta uma busca exacerbada, perdendo o controle da quantidade administrada. Além disso, quando a pessoa é privada da substância, seu estado emocional fica abalado (KOOB; VOLKOW, 2009). A diferença entre um simples usuário para outro que possui o transtorno está em sintomas como a ausência do uso compulsivo, tolerância e a síndrome de abstinência. Entretanto, no processo de transição entre o uso recreativo e o transtorno por uso de substâncias, a

impulsividade é considerada um fator vulnerável, pois se caracteriza por uma resposta breve e sem planejamento a um estímulo que pode ser externo ou interno e ainda sem o conhecimento de sua adversidade (DE WIT, 2009; MOELLER et al., 2001).

Com o desenvolvimento deste transtorno, a droga de abuso passa a ser prioritária na vida do indivíduo, sendo mais importante até mesmo sobre aspectos que antes eram primordiais para o mesmo, como fazer a higiene pessoal e alimentar-se (NESTLER; AGHAJANIAN, 1997). Sem o autocontrole, o indivíduo desenvolve um estado de compulsão, de repetir ou perseverar em um comportamento que antes era recompensador, mas que agora apresenta implicações repulsivas (ERSCHE et al., 2011). Esse estado de compulsão é possivelmente conduzido por *loops* palidal-tálamo-cortical do estriado ventral-dorsal (KOOB; SIMON, 2009). Com isso, o desejo do indivíduo pela droga é aumentado; todavia, o prazer da experiência não (ROBINSON; BERRIDGE, 2008). Portanto, o uso repetitivo, sobretudo em altas doses e/ou em períodos críticos do desenvolvimento, pode levar a um processo de neuroadaptação, o que constitui uma das bases neurobiológicas para o desenvolvimento do transtorno por uso de substâncias (THOMSEN, 2014; VOLKOW et al., 2013).

Quando há privação do acesso à droga, o indivíduo entra em um estado de abstinência, que possui sinais e sintomas desagradáveis, como disforia, irritabilidade, ansiedade e agitação, que são sinais contrários aos produzidos pela droga (MACIEL; KERR-CORRÊA, 2004; LARANJEIRA et al., 2000). Consequentemente, o indivíduo consome a droga para evitar estes sintomas, sendo deste modo, o transtorno guiado por um mecanismo de reforço negativo.

2.3 Sensibilização em roedores

Um importante fenômeno associado à neuroadaptação depois de um uso crônico de drogas é a sensibilização. Em estudos relacionados a drogas de abuso, sensibilização refere-se a um aprimoramento da administração crônica de uma droga, sendo esta uma das teorias do transtorno causado pelo uso de substâncias

(CAMARINI; PAUTASSI, 2016). Mais especificamente, a sensibilização comportamental em roedores está relacionada a um aumento na atividade locomotora do animal resultante de uma administração crônica de uma droga (MASUR; BOERNGEN, 1980; POST, 1980). Assim, a exposição repetida às substâncias psicoestimulantes em um determinado contexto ambiental pode induzir uma sensibilização no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e elevação de corticosterona, além de levar à sensibilização comportamental (ANDERSON; PIERCE, 2005). Quando os processos de atividade locomotora dos efeitos iniciais são aumentados (sensibilizados), ocorre uma neuroadaptação acompanhada por alterações neurobiológicas, como o aumento de dopamina no núcleo de accumbens, que se correlacionam com um estado de incentivo emocional, alterando o circuito neuronal envolvido na motivação. Com isso, há alterações na plasticidade sináptica resultando na intensificação dos processos que levam uma busca mais intensa pela droga, podendo tornar-se compulsiva (WOLF, 2002).

Este fenômeno apresenta dois componentes: a aquisição e a expressão. A aquisição é um termo operacional referente aos efeitos moleculares e celulares imediatos que induzem a sensibilização, ou seja, a aquisição da sensibilização refere-se ao desenvolvimento desta, em que se observam alterações em nível celular e molecular em neurônios de diferentes regiões cerebrais, principalmente no córtex pré-frontal e na área tegumental ventral (STEKETEE; KALIVAS, 2011). Tais alterações são associadas ao aumento da liberação de glutamato e de dopamina, que estão relacionados à ocorrência de uma potenciação de longa duração (UNGLESS et al., 2001). Já a expressão refere-se às consequências prolongadas desses efeitos. Em outras palavras, a expressão é a manifestação da sensibilização que se dá após um período de abstinência. A expressão da sensibilização envolve mudanças na função neuronal responsável pelas respostas comportamentais, principalmente no núcleo *accumbens* (STEKETEE; KALIVAS, 2011).

2.4 Mecanismos de ação do etanol e mecanismo associados ao transtorno por uso de substâncias

O etanol não possui um sítio de ligação específico no sistema nervoso central (SNC), por isso seu efeito ocorre pela ação em numerosos alvos moleculares, que levam à alterações nos sistemas catecolaminérgico, opioide, glutamatérgico, serotoninérgico, GABAérgico e colinérgico (ZALESKI et al., 2004). Seu efeito é dose-dependente, ou seja, em doses baixas há efeito estimulante, enquanto doses elevadas levam a depressão do SNC (TAMBOUR et al., 2006). O efeito estimulante é caracterizado pela desinibição comportamental, com aumento da fala e da afetividade, e diminuição da atenção, da autocrítica e do nível de preocupação (CUI; KOOB, 2017). O efeito depressor é caracterizado por um intenso cansaço e grande debilidade ocasionada por fadiga (FADDA; ROSSETTI, 1998).

A ação inibitória do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) é potencializada pelo etanol, que, assim como os benzodiazepínicos, também atua em receptores GABA_A, porém de forma menos efetiva (BURNETT; CHANDLER; TRANTHAM-DAVIDSON, 2016). A ação do GABA se dá pelo aumento do tempo de abertura dos canais de cloro, permitindo que o íon se desloque em maior quantidade para o meio intracelular. Assim, o meio intracelular fica cada vez mais negativo, promovendo a hiperpolarização neuronal. Entretanto, o uso crônico o etanol pode causar alterações no sistema GABAérgico, como a diminuição da capacidade de estimulação do GABA, diminuição da ação de fármacos benzodiazepínicos e diminuição da densidade de RNAm relacionado a expressão do receptor GABA_A (AGUAYO et al., 2002).

Assim como as outras drogas de abuso, o etanol também leva ao aumento de dopamina no corpo estriado, no entanto, a estimulação da liberação da dopamina ocorre por mecanismos indiretos. Estudos com roedores descrevem que o etanol aumenta a concentração de dopamina extracelular no núcleo *accumbens* e no núcleo caudado, sendo que a liberação de dopamina é predominante no núcleo *accumbens* (MORZORATI; MARUNDE, 2006). Uma explicação para esse fato é que o etanol em baixas doses estimula a síntese, o metabolismo e a taxa de renovação

de dopamina por meio de sua ligação nos receptores pré-sinápticos GABA_A presentes em interneurônios na área tegumental ventral (ATV) (DAVIES, 2003).

O uso crônico de etanol leva a uma inibição dos receptores pós- sinápticos de NMDA (*N-metil D-Aspartato*) (BELL et al., 2016). Ainda, a exposição crônica do etanol leva a um aumento da concentração extracelular de glutamato em uma serie de regiões do encéfalo, induzindo um estado hiperglutamatérgico oque contribui para o transtorno causado por uso de substâncias (GASS; OLIVE, 2008; SPANAGEL, 2009).

O aumento de dopamina no núcleo *accumbens* leva a uma maior ativação dos receptores metabotrópicos D₁, que parece induzir a expressão de genes que são fundamentais para os mecanismos de dependência (DUDMAN et al., 2003). Esses receptores são do tipo acoplado a proteína G estimulatória, que quando ativada, aumenta os níveis intracelulares de AMP cíclico pela estimulação da enzima adenil ciclase. Com o aumento de AMP cíclico, a proteína quinase do tipo A (PKA) é ativada, desencadeando o translocamento de subunidades catalíticas para o núcleo da célula, levando a consequente fosforilação do CREB (*cAMP response element binding protein*). O CREB é uma proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP cíclico, o qual é responsável por modular a transcrição de diversos genes, como o *c-fos* que está relacionado com a modulação dos processos de aprendizado e memória. Tais processos estão envolvidos com a dependência por estarem associados à recompensa (HYMAN et al., 2006). Com isso, dependendo do gene modulado, o efeito da droga pode ser imediato ou duradouro (NESTLER, 2004).

O etanol atua no sistema catecolaminérgico por meio da ativação da via mesolímbica/mesocortical e da via nigroestriatal. Na via mesolímbica/mesocortical os corpos de neurônios estão localizados na ATV e possuem fibras eferentes direcionadas para áreas límbicas (como tálamo, núcleos da base, hipocampo e amígdala) e para o neocórtex (áreas sensoriais e motoras). Na via nigroestriatal, os corpos de neurônios estão localizados na substância negra e as fibras eferentes estão direcionadas para o corpo estriado. O sistema opioide também está envolvido com efeitos como a euforia e a estimulação psicomotora, que se caracterizam como propriedades reforçadoras do etanol (LEE et al., 2005). Estudos mostram que a liberação de β -endorfina e de encefalinas é induzida pela ingestão aguda de etanol (OLIVE et al., 2001). Esses neurotransmissores atuam modulando a transmissão do

sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. A β -endorfina atua por meio de receptores μ presentes em interneurônios GABAérgicos. Tais receptores são acoplados à proteína G inibitória, portanto, a ativação de destes receptores leva a retirada do tônus inibitório na AVT, com conseqüente aumento da liberação de dopamina no núcleo *accumbens* (FROEHLICH; LI, 1994; FONT; LUJÁN; PASTOR, 2013). A dinorfina, que tem como precursor a pró-dinorfina é um potente opioide endógeno que tem ação preferencialmente nos receptores opioides do tipo k. Estudos indicam que a dinorfina e os receptores k estão envolvidos em várias desordens psiquiátricas, incluindo ansiedade, depressão e dependência (HANG et al., 2015; WEE; KOOB, 2010; BUTELMAN et al., 2012; LALANNE et al., 2014). Sabe-se que tanto a exposição crônica, quanto a aguda ao etanol produz adaptações nesse sistema que refletem em uma mudança da expressão e da atividade da dinorfina e do receptor k. A exposição aguda ao etanol aumenta a concentração de dinorfina em locais como o núcleo *accumbens* e a VTA, enquanto a administração repetida de etanol induz aumento de expressão de dinorfina-b (MARINELLI et al., 2006; JARJOUR et al., 2009; LINDHOLM et al., 2000).

Em relação ao sistema colinérgico, os mecanismos de atuação do etanol ainda não estão claros. No entanto, estudos associam a redução na concentração de acetilcolina com a ingestão crônica de etanol, enquanto a baixa ingestão de etanol leva a um aumento na concentração de acetilcolina no córtex pré-frontal de ratos (SASAKI et al., 1995; STANCAMPIANO et al., 2004). Mikki et al. (2014) observaram que ratos intoxicados com etanol apresentaram alterações significativas na razão entre a concentração e a expressão de RNAm de fatores neurotróficos em regiões colinérgicas, porém, tais alterações não foram observadas no córtex encefálico e no hipocampo. Estes resultados sugerem que a distribuição desequilibrada de ligantes e receptores do fator neurotrófico pode ser um fenômeno primário no mecanismo de dependência pelo etanol. De fato, as regiões de projeção colinérgica do prosencéfalo basal estão conectadas neuroanatomicamente, sendo que os fatores neurotróficos são importantes na comunicação retrógrada/ anterógrada. Entretanto, o exato mecanismo subjacente às alterações induzidas pelo etanol nos fatores neurotróficos e seus receptores no sistema colinérgico ainda é desconhecido (MIKKI et al., 2014).

Em concentrações elevadas o etanol parece bloquear a passagem de cálcio por meio de sua ação nos canais de cálcio tipo L (ZALESKI et al., 2004). Como o influxo de íons cálcio para célula é fundamental para a liberação de neurotransmissores, o etanol leva a diminuição da liberação de neurotransmissores, com conseqüente diminuição na atividade dos segundos mensageiros na célula pós-sináptica (ZHANG et al., 2000; ZALESKI et al., 2004). Quando ocorre a abstinência na dependência ao etanol, existe uma elevação do influxo de cálcio por meio desses canais, o que contribui para os sintomas característicos dessa síndrome, como tremores, náuseas e vômitos (LARANJEIRA et al., 2000). Assim, a administração de antagonistas de canal de cálcio pode diminuir esse efeito compensatório (KENNEDY; LUI, 2003).

Ainda, o etanol é capaz de influenciar o sistema serotoninérgico, sendo que o aumento ou diminuição nas concentrações de serotonina (5-HT) estão relacionados com a frequência do uso do etanol. Quando o etanol é usado de forma crônica, evidencia-se uma diminuição na concentração de serotonina e um aumento do número de receptores serotoninérgicos expressos na membrana celular. Por outro lado, se o consumo de etanol for agudo, há aumento na concentração de serotonina na fenda sináptica (JAIN; KANNAMWAR; VERMA, 2016). Além disso, as vias serotoninérgicas parecem ser ativadas indiretamente pelo sistema dopaminérgico quando este sofre ação do etanol, uma vez que a concentração de dopamina pode ser reduzida com o uso de antagonistas do receptor 5-HT₃ (CARBONI et al., 1989; ALDERAZI; BRETT, 2007). Segundo Barcker et al. (2014), o uso de antagonistas de 5-HT₃ diminui os efeitos comportamentais relacionados a dependência em ratos.

2.5 Tratamento do Transtorno pelo uso de substâncias

O transtorno pelo uso de substâncias é tido como um fenômeno biopsicossocial, incluindo vários aspectos sociais, políticos e econômicos que gera polêmicas em relação à prevenção e ao tratamento. Com isso, o tratamento envolve abordagens multidisciplinares com acompanhamento psicológico e familiar, grupo de autoajuda, reabilitação neuropsicológica e psicossocial, ações preventivas e redução

de danos (CFM, 2011). Segundo os critérios do DSM-V, pessoas com transtornos pelo uso de etanol e outras substâncias são diagnosticados com problema psiquiátrico adicional, como por exemplo, esquizofrenia, transtorno de humor, transtorno de ansiedade, distúrbios de personalidade, além de depressão maior (GRANT et al., 2004; HASIN et al., 2007; DI NICOLA et al., 2015).

Didaticamente, a terapia usada com os pacientes com este transtorno pode ser dividida em etapas: desintoxicação e manutenção da abstinência, farmacoterapia, além da psicoterapia. Na psicoterapia são realizadas terapias individuais, a qual tem como foco a reestruturação da personalidade do paciente; em grupos para uma discussão dos aspectos da dependência; e familiar para melhorar a relação entre os membros e o paciente (ANTONIASSI; LEAL; TEDESCO, 2008). A terapia medicamentosa se inicia com a desintoxicação, período em que o tratamento é feito para amenizar o desconforto sintomático da retirada da substância e prevenir as recaídas. Portanto, é feito o uso de antidepressivos, anticonvulsivantes, estabilizadores de humor, antipsicóticos e benzodiazepínicos (CFM, 2011). Na farmacoterapia podem ocorrer várias modalidades nos tratamentos. O dissulfiram é um medicamento que age como inibidor irreversível da enzima acetaldéido-desidrogenase (ALDH), que causa um acúmulo de acetaldéido no organismo. Tal efeito resulta em uma série de efeitos adversos, como cefaleia, hepatite, erupções cutâneas. Conseqüentemente, o paciente associa esses efeitos ao consumo da droga podendo gerar uma aversão à mesma (CASTROA; BALTIERI, 2004). A naltrexona age antagonizando os efeitos das encefalinas e endorfinas, as quais são liberadas no consumo de etanol nas vias mesolímbicas (CASTROA; BALTIERI, 2004). O nalmefene, derivado da naltrexona, é um modulador do sistema opioide de dupla ação, sendo um antagonista nos receptores opioide μ e δ e agonista parcial no receptor opioide κ (BIGGIO, 2015; ROSE et al., 2016). Ambos os fármacos têm mostrado redução no consumo total de etanol (GUAL et al., 2013; MANN et al., 2013). No entanto, o tratamento disponível atualmente não é efetivo, pois como mencionado, mais de 60% dos indivíduos tratados voltam a beber nos primeiros 12 meses (MERKX et al., 2011).

2.6 Ayahuasca

Ayahuasca é uma palavra de língua indígena que traduzida significa “vinho das almas” ou “vinho dos mortos” (GOULART, 2004). Feita através da decocção de duas plantas: *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*, é uma bebida psicoativa originalmente usada em rituais indígenas da Amazônia. Com a expansão da colonização do Brasil, na época do ciclo da borracha, “os homens brancos” entraram em contato com os costumes e rituais indígenas e começaram a dissipar o uso dessa bebida em ritos religiosos, que deram origem a religiões como Santo Daime, União do Vegetal e Barquinha (GOULART, 2004). O caule da *B. caapi* contém alcaloides β -carbolinas como harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH), que são inibidoras da enzima monoaminoxidase (MAO). As folhas da *P. viridis* contém N,N-dimetiltriptamina (DMT) que é um alcaloide alucinógeno. A Figura 1 demonstra as estruturas químicas dos alcaloides presentes na ayahuasca e da serotonina.

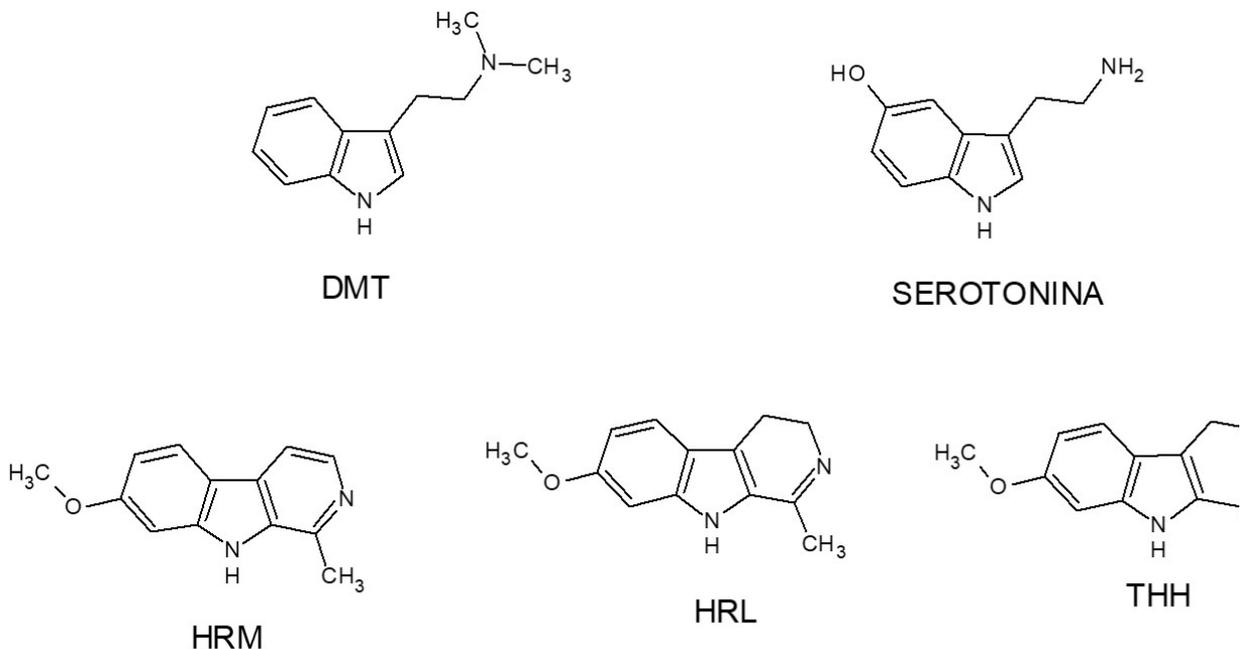


Figura 1 - Estruturas químicas dos alcaloides da ayahuasca e da serotonina
 Fonte: Da Autora

A combinação das duas plantas forma uma associação sinérgica, já que as β -carbolinas inibem as enzimas MAO que metabolizam o DMT, e assim esse potente alucinógeno consegue ser absorvido e ter a sua ação após administração por via oral (PIRES et al., 2010; CALLAWAY; GROB,1998). Como pode se observar na Figura 1, o DMT é estruturalmente parecido com o neurotransmissor serotonina, agindo, portanto como um agonista serotoninérgico, principalmente nos receptores 5-HT_{1a} , 5HT_{1b} , 5-HT_{2a} e 5HT_{2c} (FRECSKA, 2008). Os neurônios serotoninérgicos estão envolvidos em funções relacionadas ao sono, humor e em condições patológicas, como ansiedade e depressão (MCCORVY; ROTH, 2015; YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017). As β -carbolinas, como já descrito, são inibidoras da MAO, e por consequência inibem a degradação do DMT. Entretanto, THH também age como inibidora da recaptção da serotonina, aumentando assim ainda mais os níveis de serotonina no encéfalo (FRECSKA, 2008; MCKENNA, 1998).

Castro-Neto et al. (2013) avaliaram as mudanças nos neurotransmissores do hipocampo após a ingestão de diferentes concentrações de ayahuasca em ratos. A concentração de glutamato não mudou, no entanto houve aumento nas concentrações de GABA nas diferentes doses administradas. Em relação à serotonina, houve aumento na sua concentração nos animais que receberam as doses de 500 e 800 mg/kg de ayahuasca.

Os níveis destes alcaloides presentes na ayahuasca variam dependendo da origem da planta utilizada e do modo de preparo da bebida, que não é padronizado. As diferentes concentrações dos alcaloides nas plantas se devem a inúmeros fatores, como diferentes tipos de solo da área da plantação, humidade do local, luminosidade, dentre outros (CALLAWAY, 2005). Na literatura podem ser encontrados diversos valores para as concentrações, a Tabela 1 apresenta alguns valores encontrados.

Tabela 1 - Valores das concentrações dos alcaloides da ayahuasca encontrados na literatura.

Fonte	Via de administração	Dose	Concentração (mg/ml)			
			HRL	HRM	THH	DMT
MICKENNA et al. (1984)	-	-	0,04	0,47	0,16	0,60
CALLAWAY et al. (1996)	-	-	0,20	1,70	1,07	0,24
YRITIA et al. (2002)	Oral (humanos)	0,6 e 0,85 mg de DMT/Kg	0,04	0,90	0,72	0,53
PIRES et al. (2009)	-	-	1,01	0,54	0,36	0,53
OLIVEIRA-LIMA et al. (2015)	i.p	100 ou 300 mg Aya/Kg	0,15	3,39	2,70	35

Fonte: Mickenna et al. (1984); Callaway et al. (1996); Yritia et al. (2002); Pires et al. (2009) Oliveira-Lima et al. (2015).

Entre as aplicações terapêuticas possíveis da ayahuasca está o tratamento da farmacodependência. Em um estudo realizado no Canadá, pesquisadores realizaram colaboração com um grupo de “guias espirituais” (*retreat team’s work*) para avaliar o efeito do uso da ayahuasca em duas cerimônias religiosas em pessoas de uma comunidade arborígena que possuíam fatores psicológicos e comportamentais relacionados ao uso de drogas de abuso (THOMAS et al., 2013). Thomas et al. (2013) observaram que após essa terapia houve uma redução no consumo de cocaína, etanol e tabaco, porém, não houve diferença no uso de *Cannabis* e de opioides. Além de estudos realizados em humanos, existem também estudos em roedores. Oliveira-lima et al. (2015) demonstraram que a ayahuasca foi eficaz na prevenção do desenvolvimento da sensibilização ao etanol e também se mostrou eficaz no bloqueio da sensibilização ao etanol na dose de 100 a 300 mg de ayahuasca/kg de animal via intraperitoneal (i.p).

O tratamento do transtorno causado pelo uso de drogas de abuso com o uso de substâncias alucinógenas como ayahuasca, ibogaína e ácido lisérgico tem sido vastamente estudado, uma vez que essas substâncias apresentam um perfil de segurança maior em relação às principais drogas com potencial abusivo, pouco

potencial de indução de transtornos e possuem baixo índice de mortalidade (WINKELMAN, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

A OMS (2014) mostra que o uso abusivo de etanol representa um problema de saúde pública, sendo considerada uma das principais doenças do século. De acordo com a OMS, 5,9% de todas as mortes do mundo são devido ao consumo de etanol, sendo que seu uso está entre os líderes de fator de risco de morbidade, incapacidade e mortalidade (WHO, 2014). Apesar de diversos fármacos serem utilizados no tratamento do transtorno causado pelo uso de substâncias, o tratamento não é efetivo (MERKX et al., 2011). O tratamento farmacológico é basicamente sintomático, com o objetivo de tratar as comorbidades e prevenir as recaídas.

Estudos indicam que a ayahuasca pode ter aplicações terapêuticas, como no tratamento de transtorno causado pelo uso de substâncias (WINKELMAN, 2014; OLIVEIRA-LIMA et al., 2015). De fato, substâncias como os alcaloides presentes na ayahuasca apresentam baixos índices de mortalidade e não possuem potencial para induzir dependência, sendo, portanto, alvos interessantes para o tratamento da farmacodependência. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo avaliar possíveis intervenções terapêuticas (ayahuasca) no tratamento do transtorno causado pelo uso de etanol por meio de um estudo pré-clínico que avalia os efeitos da ayahuasca na sensibilização comportamental pelo etanol. Espera-se produzir aporte científico para ampliar os índices de tratamento e recuperação dos pacientes. A hipótese do nosso estudo é de que a ayahuasca bloqueie a expressão da sensibilização comportamental pelo etanol.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é investigar o efeito da ayahuasca na sensibilização comportamental pelo etanol, além de avaliar os mecanismos envolvidos neste processo por meio da quantificação de biomarcadores dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico.

Estratégias experimentais:

- a) avaliar a sensibilização comportamental pelo etanol em camundongos adultos;
- b) avaliar o tratamento com ayahuasca durante o período de abstinência, anterior a um novo desafio com o etanol (expressão da sensibilização);
- c) quantificar os receptores D1, D2, 5-HT1a e 5-HT2a e as proteínas pró-dinorfina, dinorfina e c-Fos no estriado e hipocampo dos animais por meio de *Western blot*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com livre acesso à água e comida (ração para roedores Nuvilab CR1®), temperatura controlada ($21\pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de doze horas (luz ligada às 7:00 h). Todos os experimentos foram realizados no período claro. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética desta Instituição (34/2017).

5.2 Substâncias

A ayahuasca foi obtida por meio de doação, foi liofilizada e os alcaloides presentes foram quantificados. Ela foi diluída em água filtrada para que fosse possível a administração por via gavagem na dose de 1,76 mg de DMT/Kg de animal. O etanol (ET) (Merck do Brasil, S.A.) foi administrado em uma solução de 15% (v/v), preparada com solução salina (NaCl 0,9%) na dose de 2,2 g/Kg. A solução salina foi utilizada como solução controle (SAL). As injeções de ET e salina foram administradas por via intraperitoneal (i.p.).

5.3 Determinação dos alcaloides da ayahuasca em amostras de chá

As análises foram realizadas em modo positivo (ESI+, $[M+H]^+$) para todos os analitos. Foram utilizados os seguintes parâmetros otimizados: *cone gas flow*, 2 L/min; *desolvation gas flow*, 10 L/min; *source temperature*, 100 °C; *desolvation temperature*, 350 °C. O seguinte sistema cromatográfico foi utilizado: Coluna *Acquity*

UPLC BEH C18 2,1 mm x 100 mm, ID 1,7 μm (Waters Corporation, Milford, MA) eluída com um gradiente de tampão formiato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico (Solução A) e metanol 0,1% ácido fórmico (Solução B), a um fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, 40 $^{\circ}\text{C}$, nas seguintes condições: 0 – 7 min, 90 – 50 % A; 7,1 – 8 min, 50 – 90 % B. O tempo total de corrida foi de 8 minutos. As fragmentações utilizadas no MRM e os tempos de retenção de cada analito estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos íons precursores, íons produto, tempo de retenção, voltagem do cone e energia de colisão no método por UPLC-ESI-MS/MS.

Analito	Tempo de Retenção (min.)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Voltagem do cone	Energia de colisão
DMT-d6 (PI)	2,87	195,1	63,9	15	14
		195,1	114,9	15	36
		195,1	143,8*	15	22
		188,9	57,8	25	11
DMT	2,88	188,9	116,7	25	29
		188,9	143,8*	25	17
		217,1	172,8	25	29
THH	4,37	217,1	187,9	25	17
		217,1	200,0*	25	13
		215,2	130,4	50	41
HRL	5,27	215,2	171,7	50	33
		215,2	199,9*	50	25
		213,2	143,8	50	41
HRM	5,56	213,2	169,8	50	33
		213,2	198,0*	50	25

* Transição utilizada para quantificação dos analitos. PI - padrão interno. m/z - razão massa/carga.
Fonte: Da autora

O preparo da amostra consistiu em diluir a amostra de chá para uma proporção final de 1:5000 por meio de diluição seriada em três etapas (1:10 x 1:10 x 1:50). Primeiro diluiu-se 100 μL da alíquota de chá em 900 μL de fase móvel A (tampão formiato de amônio com 0,1% ácido fórmico). Desta, foram retirados mais 100 μL e diluídos com 900 μL de fase móvel A e, finalmente, 100 μL da última foi diluído em 4900 μL da solução de fase móvel A. A cada etapa de diluição a solução era submetida à agitação em vórtex para melhor homogeneização. Em 90 μL da

solução final adicionaram-se 10 μL do padrão interno (DMT- d_6 1 $\mu\text{g/mL}$) para concentração final de 100 ng/mL . Por fim, 5 μL desta solução foram injetados no sistema de UPLC-ESI-MS/MS.

Após quantificação, o valor obtido com a equação da reta foi multiplicado por 5000 para correção da diluição. Este ensaio foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em colaboração com o Prof. Maurício Yonamine. Dentre os alcaloides presentes no chá da ayahuasca, foram determinados o N,N-6 dimetiltryptamina (DMT) e as β -carbolinas harmalina (HRL), harmina (HRM) e tetraidro-harmina (THH). Na Tabela 3 estão descritos os valores correspondentes de cada alcaloide determinado.

Tabela 3 - Valores das concentrações dos alcaloides presentes na ayahuasca.

Alcaloide	Concentração (mg/ml)	DP
HRL	0,15	$\pm 0,01$
HRM	1,13	$\pm 0,27$
THH	1,18	$\pm 0,09$
DMT	1,62	$\pm 0,04$

Fonte: Da autora

5.4 Atividade locomotora em campo aberto e labirinto em cruz elevado

A atividade locomotora dos animais foi avaliada por meio de campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 40 cm de altura) (BROADHURST, 1960). Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto e observado por um período de 10 minutos. Após cada observação, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool-água 5%, antes da introdução do próximo animal, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos camundongos, as observações de todos os animais foram realizadas sempre em um horário específico, sendo o horário da manhã o escolhido (7h30min às 11h30min). O

registro da atividade foi realizado com uma câmara digital. O software *EthoVision*[®] (Noldus, The Netherlands) foi utilizado para quantificar a distância percorrida por cada animal.

O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho com paredes de 20 cm de altura, elevado a 60 cm do chão. Os braços similares são cruzados em ângulo reto e ligados através de uma área central. Observou-se, manualmente, o tempo gasto na exploração dos braços abertos e dos braços fechados em um período de 5 minutos (PELLOW et al., 1985). Ainda, foi observado o comportamento relacionado ao *grooming* de cada animal neste mesmo tempo (REEVES, 2016).

5.5 Desenho experimental

Como mencionado, a sensibilização comportamental é um processo induzido por algumas drogas de abuso, como o etanol, sendo caracterizado pelo aumento progressivo da atividade locomotora. O ensaio de sensibilização comportamental consiste em duas fases: aquisição e expressão da sensibilização. Para que ocorra o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, nos três primeiros dias do experimento os animais foram expostos durante 10 minutos ao campo aberto 5 minutos após a injeção de salina. Este procedimento permitiu a habituação dos animais ao aparelho de observação. No quarto dia, os animais receberam uma injeção de salina ou etanol na dose de 2,2 g/Kg de animal, de acordo com o grupo experimental, e após 5 minutos da aplicação a atividade locomotora foi quantificada durante 10 minutos em campo aberto. Este procedimento foi repetido cinco vezes em dias alternados, conforme descrito por Abrahão et al. (2011).

O tratamento com ayahuasca foi realizado durante oito dias, após a aquisição da sensibilização, da seguinte forma: os animais receberam água filtrada ou ayahuasca por gavagem na dose de 1,76 mg de DMT/Kg de animal, sendo realizada a correção da dose diariamente pela massa corporal. Após a ingestão da ayahuasca os animais foram colocados novamente nas caixas e depois de 40 minutos foram colocados em campo aberto por 10 minutos. No sétimo dia de tratamento, foi

realizado o teste de labirinto em cruz elevado. Após o período de tratamento, foi realizada a análise da expressão da sensibilização (desafio), quando os animais receberam uma injeção de etanol e após o período de 5 minutos foram expostos ao campo aberto para análise da atividade locomotora durante 10 minutos. A Figura 2 ilustra o desenho experimental.

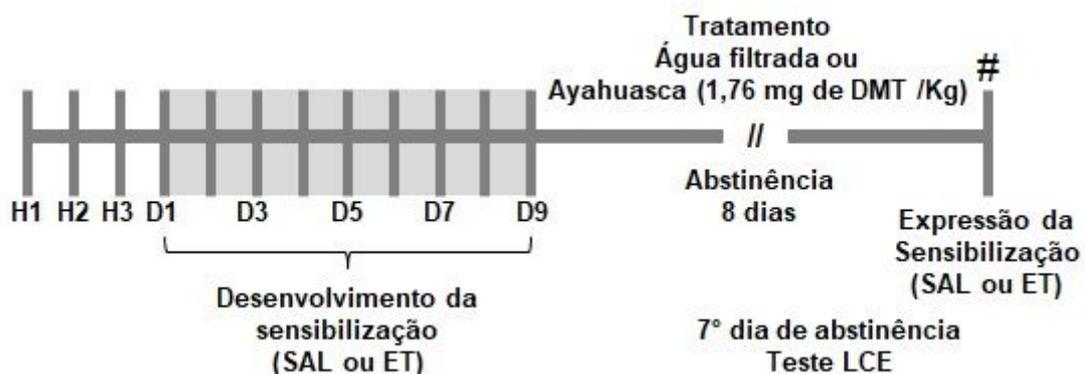


Figura 2 - Desenho experimental do presente estudo. O desenvolvimento da sensibilização comportamental foi avaliado por meio de ensaio em campo aberto. Para habituação no equipamento os animais receberam injeção salina i.p. durante três dias (H1 a H3) e após 5 minutos foram avaliados no campo aberto durante 10 minutos. Em D1, D3, D5, D7 e D9 os animais receberam uma injeção de salina ou etanol, de acordo com o grupo experimental. Durante os 8 dias de tratamento, os animais receberam salina ou ayahuasca de acordo com o grupo experimental, via gavagem. No sétimo dia de tratamento (T7) os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado (LCE). Após este período, foi realizada a expressão da sensibilização comportamental, em que os animais receberam uma injeção de salina ou etanol, de acordo com o grupo experimental, e foram avaliados em campo aberto durante 10 minutos. Os animais foram eutanasiados (#) imediatamente após o ensaio da expressão da sensibilização comportamental.

Fonte: Da autora

Assim, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

- a) grupo SAL/SAL/SAL (n=10): animais que receberam salina durante a aquisição da sensibilização comportamental, salina durante o período de abstinência e salina para avaliar a expressão da sensibilização;
- b) grupo SAL/SAL/ET (n=10): animais que receberam salina durante a aquisição da sensibilização comportamental, salina durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização;

- c) grupo SAL/AYA/ET (n=9): animais que receberam salina durante a aquisição da sensibilização comportamental, ayahuasca durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização. Cabe destacar que, originalmente, este grupo tinha n=10, no entanto, um animal morreu durante o experimento;
- d) grupo ET/SAL/ET (n=18): animais que receberam etanol durante a aquisição da sensibilização comportamental, salina durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização;
- e) grupo ET/AYA/ET (n=24): animais que receberam etanol durante a aquisição da sensibilização comportamental, ayahuasca durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

Imediatamente após o ensaio que avaliou a expressão da sensibilização, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O encéfalo foi rapidamente retirado e mergulhado em solução fria de tampão salina-fosfato. O estriado e o hipocampo foram dissecados sobre uma placa de petri gelada coberta por papel de filtro embebido em solução salina gelada e congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para os futuros ensaios de *western blot*. As amostras de sangue dos animais foram colhidas em tubos heparinizados (1UI/mL) para futura dosagens de etanol. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm durante 5 minutos; o plasma foi coletado em microtubos e armazenado a -20°C .

5.6 Determinação do etanol no plasma

As amostras de sangue foram coletadas em microtubos heparinizados (1 UI/mL), centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos para retirada do plasma que foi então congelado em freezer -20°C . A determinação de etanol no plasma foi realizada por meio da técnica de *headspace* com detecção por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID). Uma alíquota de 100 μL de plasma e 900 μL de água destilada foi adicionada a um frasco de *headspace*. Após adição de 1000 μL de solução padrão de n-butanol $0,6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ o frasco foi lacrado com lacre prata e septo de borracha. Este sistema foi incubado em estufa a 70°C por 30

minutos e, após esse período, recolheu-se 500 μL do vapor do *headspace* com auxílio de uma seringa *gastight* para posterior injeção no GC-FID. Os dados do método cromatográfico são: temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 280°C; temperatura do forno: 150°C/ 15 minutos; fluxo de gás: 1,8 mL.min⁻¹; modo de injeção: *Split*. Tempos de retenção etanol e n-butanol foram 0,85 e 3,1 minutos, respectivamente.

5.7 Western blot

Os receptores D1, D2, 5-HT1a e 5-HT2a e as proteínas pró-dinorfina, dinorfina e c-fos foram quantificados no estriado e no hipocampo por meio de *Western blot*. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um sonicador com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 contendo 1,0 mM de PMSF e coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma)) na diluição 1:5(g/ml) e ajustadas para a mesma concentração proteica pelo método de Bradford. Em seguida, 130 μL da amostra foram diluídos com 30 μL de tampão de Laemmli. Padronizou-se a concentração proteica para 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As amostras foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15%, onde as proteínas migraram durante 180 minutos, sob diferença de potencial elétrico de 90 V nos primeiros 10 minutos, e 100V no restante do tempo. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (Millipore, 0,2 μm de diâmetro) sob amperagem constante de 0,4 durante 90 minutos. A transferência foi confirmada pela coloração das membranas com o corante vermelho de *Ponceau* e as membranas lavadas com TBST (Tampão Tris-Salina com Tween 20). Após a confirmação, houve o bloqueio com leite desnatado 5% em tampão Tris-Salina por 90 minutos a fim de saturar os sítios de ligações inespecíficas. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos diluídos em TBST e em concentrações previamente padronizadas. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com um anticorpo secundário marcado com peroxidase (anti-*rabbit*, 1:3000 – Santa Cruz *Biotechnology*). O excesso de conjugado foi removido com mais um ciclo de lavagens e as bandas imunorreativas foram reveladas por

incubação com substratos específicos para as enzimas conjugados aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. As imagens foram detectadas (*ImageQuant LAS 500*, GE *Healthcare*) e digitalizadas (*IQuantCapture 400*, v.1.0.0, GE *Healthcare*) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas pelo programa *ImageQuant* (GE *Healthcare*) e expressas em unidades arbitrárias. A β -actina (controle interno; 1:10000) foi utilizada como fator normalizador.

Tabela 4 - Proteínas e seus anticorpos específicos.

Proteína	Anticorpo	Fabricante	Peso Molecular	Diluição	Quantidade de proteína aplicada
Receptor de D1	<i>rabbit polyclonal</i>	Abcam	48 kDa	1:500	75 μ g
Receptor de D2	<i>rabbit polyclonal</i>	Abcam	49 kDa	1:1000	75 μ g
Receptor de 5HT1a	<i>rabbit polyclonal</i>	Abcam	46 kDa	1:000	75 μ g
Receptor de 5HT2a	<i>rabbit polyclonal</i>	Abcam	53 kDa	1:500	75 μ g
c-Fos	<i>rabbit monoclonal</i>	Abcam	62 kDa	1:2000	75 μ g
Dinorfina	<i>rabbit polyclonal</i>	Abcam	28 kDa	1:500	200 μ g
Pró Dinorfina	<i>rabbit polyclonal</i>	Abcam	28 kDa	1:500	200 μ g

Fonte: Da autora

5.8 Análises estatísticas

Nas análises da atividade locomotora, os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls. Nas análises de labirinto em cruz elevado e *grooming* os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) uma via seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls. As análises de *Western blot* foram feitas por ANOVA uma via, seguido do teste *post-hoc* Tukey. Os dados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média) e considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Sensibilização comportamental pelo etanol e tratamento com ayahuasca

Em relação à atividade locomotora total dos animais, avaliada em campo aberto durante o período da aquisição da sensibilização (dia 1 ao dia 9), observa-se um aumento na distância percorrida pelos animais que receberam etanol em relação ao grupo que recebeu salina, como mostra a Figura 3A, sendo que a ANOVA para medidas repetidas mostrou efeito de tempo ($F_{5,340} = 11,61$; $p < 0,001$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{20,340} = 9,93$; $p < 0,001$). A Figura 3B mostra a comparação entre os dias 1 e 9 da aquisição da sensibilização. Os resultados mostram que os grupos ET-SAL-ET ($p < 0,001$) e ET-AYA-ET ($p < 0,05$) apresentaram aumento estatisticamente significativo da atividade locomotora entre o dia 9 e o dia 1, enquanto nenhuma diferença estatística foi observada para os grupos SAL-SAL-SAL, SAL-SAL-ET e SAL-AYA-ET, confirmando que houve sensibilização comportamental pelo etanol nos animais tratados inicialmente com esta substância.

Para avaliar o efeito da ayahuasca na sensibilização comportamental pelo etanol, o dia do desafio foi comparado aos dias 1 e 9 da aquisição, conforme observado nas Figuras 3C e 3D. A ANOVA para medidas repetidas mostrou efeito significativo de tempo entre o dia 1 e o dia do desafio ($F_{1,68} = 27,44$; $p < 0,01$), além de interação estatística entre o tempo e o tratamento ($F_{4,68} = 11,43$; $p < 0,01$). Quando se comparou o dia 9 com o dia do desafio a estatística se repetiu, mostrando efeito de tempo ($F_{1,68} = 8,57$; $p < 0,01$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{4,68} = 16,76$; $p < 0,01$).

Na comparação entre o dia do desafio e o dia 1, pode-se observar que os animais dos grupos SAL-SAL-ET ($p < 0,001$), SAL-AYA-ET ($p < 0,001$) e ET-SAL-ET ($p < 0,05$) apresentaram aumento estatisticamente significativo na atividade locomotora, enquanto não houve diferença estatística entre os dias para os animais do grupo ET-AYA-ET. Ainda, os animais do grupo ET-AYA-ET apresentaram menor atividade locomotora no dia do desafio quando comparados aos animais do grupo

ET-SAL-ET ($p < 0,01$). Tais resultados sugerem que a ayahuasca é capaz de bloquear a sensibilização comportamental pelo etanol.

A comparação entre o dia do desafio e o dia 9, confirma os resultados obtidos na comparação com o dia 1. Pode-se observar que os animais do grupo SAL-SAL-ET ($p < 0,01$) e SAL-AYA-ET ($p < 0,01$) apresentaram aumento estatisticamente significativo na atividade locomotora, enquanto o grupo ET-AYA-ET apresentou diminuição da atividade locomotora ($p < 0,01$). Os resultados também mostram que os animais do grupo ET-AYA-ET apresentaram menor atividade locomotora no dia do desafio quando comparados aos animais do grupo ET-SAL-ET ($p < 0,01$).

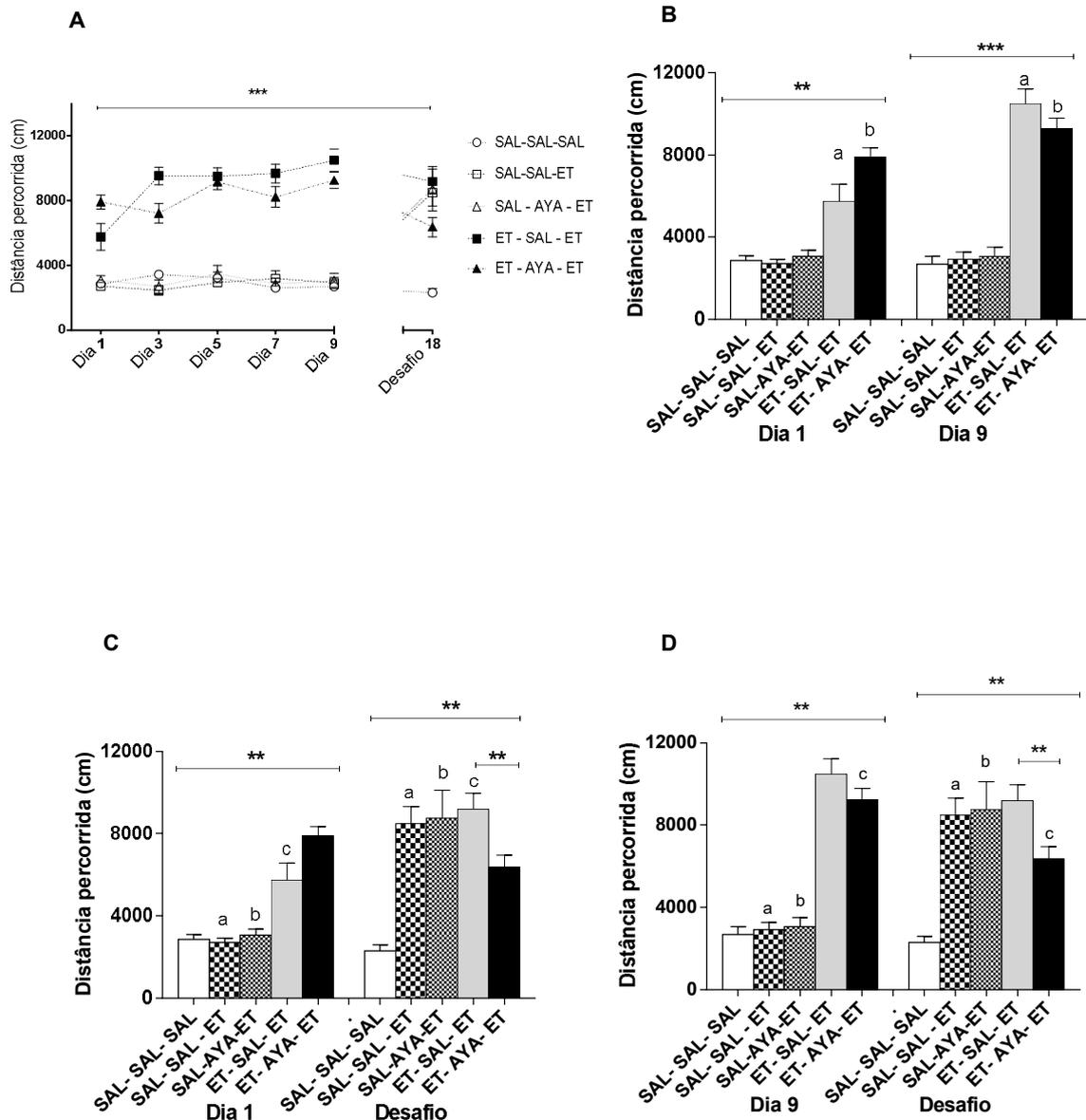


Figura 3 - Distância total percorrida em campo aberto nos diferentes dias da sensibilização e do desafio. Dados expressos em cm (média \pm EPM). Os animais foram submetidos a injeção (i.p) de etanol (15%) na dose 2,2 g/Kg ou salina e depois de 5 minutos foram colocados em campo aberto por 10 minutos. (A) curva temporal comparando os grupos: SAL-SAL-SAL (n=10), SAL-AYA-ET (n=9), SAL-SAL-ET (n=10), ET-SAL-ET (n=18) e ET-AYA-ET (n=24) nos 5 dias de sensibilização (D1, D3, D5, D7, D9) e no desafio; (B) comparação entre os grupos nos dias 1 e 9, (a) D1 ET-SAL-ET vs D9 ET-SAL-ET, $p < 0,001$; (b) D1 ET-AYA-ET vs D9 ET-AYA-ET, $p < 0,01$; (C) comparação entre os grupos no dia 1 e desafio, (a) D1 SAL-SAL-ET vs Desafio SAL-SAL-ET, $p < 0,001$; (b) D1 SAL-AYA-ET vs Desafio SAL-AYA-ET, $p < 0,001$; (c) D1 ET-SAL-ET vs Desafio ET-SAL-ET, $p < 0,05$; (d) comparação entre os grupos ET-SAL-ET e ET-AYA-ET no dia do desafio, $p < 0,01$; (D) comparação entre os grupos nos dias 9 e desafio, (a) D9 SAL-SAL-ET vs Desafio SAL-SAL-ET, $p < 0,01$; (b) D9 SAL-AYA-ET vs Desafio SAL-AYA-ET, $p < 0,01$; (c) D9 ET-AYA-ET vs Desafio ET-AYA-ET, $p < 0,01$; (d) comparação entre os grupos ET-SAL-ET e ET-AYA-ET no dia do desafio, $p < 0,01$. ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste Newman-Keuls. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Fonte: Da autora.

6.2 Tratamento com Ayahuasca

Em relação aos dias do tratamento com a ayahuasca, a Figura 4 representa a distância percorrida pelos animais em campo aberto para todos os grupos: SAL-SAL-SAL (n=10), SAL-AYA-ET (n=9), SAL-SAL-ET (n=10), ET-SAL-ET (n=18) e ET-AYA-ET (n=24). ANOVA com medidas repetidas mostrou interação entre tempo e tratamento ($F_{12,204} = 2,19$; $p < 0,05$). Na análise estatística de *post-hoc*, não houve nenhuma diferença estatística.

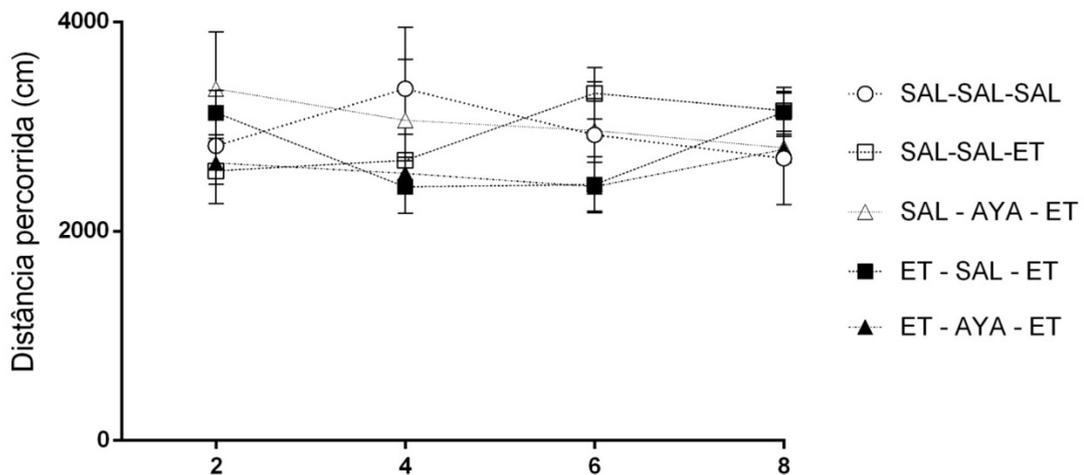


Figura 4 - Distância total percorrida em campo aberto nos diferentes dias do tratamento com a ayahuasca. Dados expressos em cm (média \pm EPM). Os animais foram submetidos a gavagem de ayahuasca na dose 1,76 mg de DMT/Kg de animal ou água filtrada e depois de 30 minutos foram colocados em campo aberto por 10 minutos. Curva temporal comparando os grupos: SAL-SAL-SAL (n=10), SAL-AYA-ET (n=9), SAL-SAL-ET (n=10), ET-SAL-ET (n=18) e ET-AYA-ET (n=24) nos 8 dias de tratamento (T2, T4, T6, T8). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste Newman-Keuls. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Fonte: Da autora

A Figura 5 representa a comparação da distância percorrida pelos animais em campo aberto para todos os grupos nos dias 1 e no dia 8 do tratamento: SAL-SAL-SAL (n=10), SAL-AYA-ET (n=9), SAL-SAL-ET (n=10), ET-SAL-ET (n=18) e ET-AYA-ET (n=24). ANOVA para com medidas repetidas mostrou efeito de tempo ($F_{1,66} = 4,25$; $p < 0,05$). No entanto, não houve nenhuma diferença estatística na análise *post-hoc*.

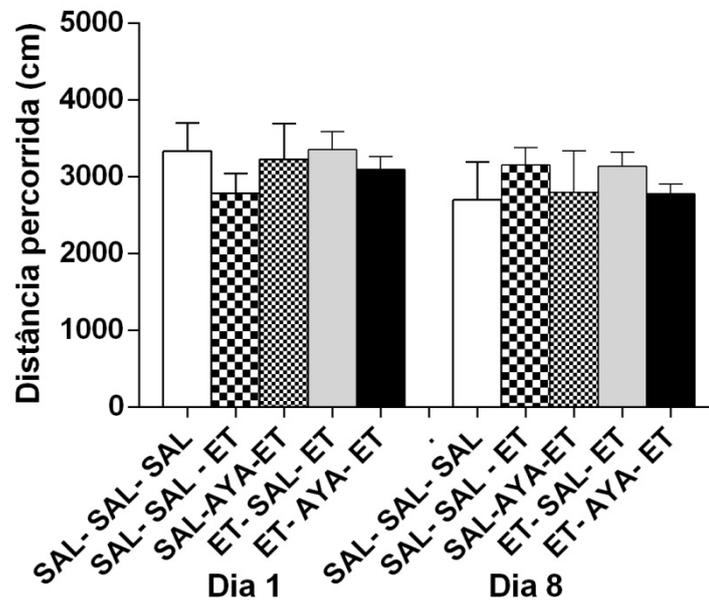


Figura 5 - Distância total percorrida em campo aberto nos diferentes dias do tratamento com a ayahuasca. Dados expressos em cm (média \pm EPM). Os animais foram submetidos a gavagem de ayahuasca na dose 1,76 mg de DMT/Kg de animal ou água filtrada e depois de 30 minutos foram colocados em campo aberto por 10 minutos. Comparação entre grupos: SAL-SAL-SAL (n=10), SAL-AYA-ET (n=9), SAL-SAL-ET (n=12), ET-SAL-ET (n=18) e ET-AYA-ET (n=24) entre o dia 1 e dia 8 do tratamento. ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste Newman-Keuls. ***p<0,001; ** p<0,01; *p<0,05. Fonte: Da autora.

6.3 Labirinto em cruz elevado: avaliação da ansiedade e padrão *grooming* associado

A Figura 6 apresenta a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado dos animais no sétimo dia de tratamento em relação ao tempo total do teste (5 minutos) para os animais tratados ou não com ayahuasca. Cabe ressaltar que o ensaio em labirinto em cruz elevado foi realizado antes do desafio final, assim, os grupos representam as duas etapas iniciais do protocolo (aquisição da sensibilização e tratamento), sendo então os grupos: SAL-SAL (n=20), SAL-AYA (n=9), ET-SAL (n= 18) e ET-AYA (n=24). É possível observar que os animais tratados com ayahuasca apresentaram um maior tempo de permanência nos braços abertos em comparação aos grupos não tratados (p<0,001). Os animais

do grupo SAL-AYA permaneceram por mais tempo nos braços abertos em comparação com todos os outros animais (SAL-SAL, ET-SAL, ET-AYA; $p < 0,001$). Já os animais do grupo ET-AYA, tiveram um maior tempo de permanência nos braços abertos quando comparados aos animais do grupo ET-SAL ($p < 0,001$). Tais resultados sugerem que a ayahuasca pode ter um efeito ansiolítico. Outro fato é que os grupos que receberam etanol na aquisição da sensibilização apresentaram um menor tempo de permanência nos braços abertos em comparação com os animais grupos salina: os animais do grupo ET-SAL permaneceram por menos tempo nos braços abertos que os outros animais dos demais grupos (SAL-SAL, SAL-AYA, ET-AYA; $p < 0,001$), enquanto os animais do ET-AYA apresentaram menor tempo de permanência nos braços abertos quando comparados aos animais do grupo SAL-AYA ($p < 0,001$). Com isso, os resultados sugerem que os animais que estão em abstinência ao etanol estão mais ansiosos.

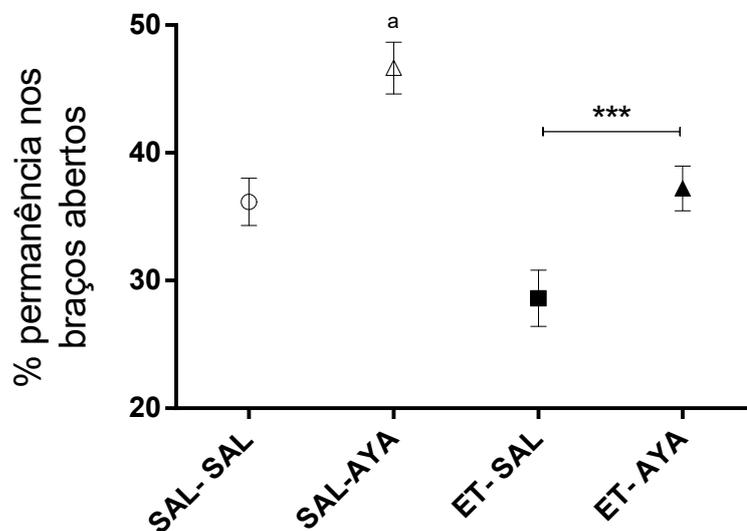


Figura 6 - Porcentagem da permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência no labirinto em cruz elevado no sétimo dia do tratamento com a ayahuasca ou salina. Dados expressos % de permanência nos braços abertos \pm EPM. Grupos: SAL-SAL (n=20), SAL-AYA (n=9), ET-SAL (n= 18) e ET-AYA (n=24). (a) comparação do grupo SAL-AYA com os grupos SAL-SAL, ET-SAL, ET-AYA; $p < 0,001$. ANOVA uma via, seguido do teste Newman-Keuls. *** $p < 0,001$
Fonte: Da autora.

Na análise do comportamento relacionado ao *grooming*, a Figura 7 demonstra a porcentagem de *grooming* nos animais durante o ensaio em labirinto em cruz elevado. É possível observar que os animais do grupo ET-SAL tiveram uma frequência maior de *grooming* quando comparados aos demais grupos ($p < 0,001$). Tais resultados corroboram os dados da porcentagem de permanência nos braços abertos, e sugerem que os animais que estão em abstinência ao etanol estão mais ansiosos.

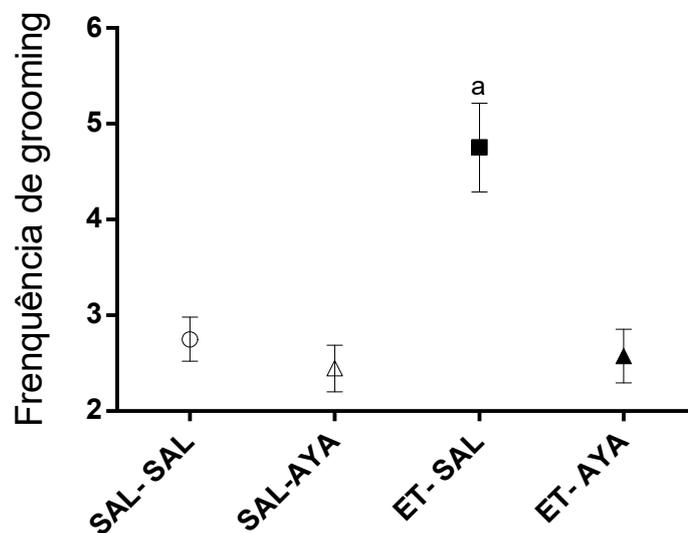


Figura 7 - Frequência total de *grooming* no labirinto em cruz elevado no sétimo dia do tratamento com a ayahuasca. Dados expressos números absolutos, como média da frequência de *grooming* \pm EPM. Grupos SAL-SAL (n=20), SAL-AYA (n=9), ET-SAL (n= 18) e ET-AYA (n=24). (a) comparação do grupo ET-SAL com os grupos SAL-SAL, SAL-AYA e ET-AYA; $p < 0,001$. ANOVA uma via, seguido do teste Newman-Keuls.
Fonte: Da autora.

6.4 Determinação de etanol no plasma

A concentração de etanol presente no plasma após 15 minutos da administração por via i.p. no dia do desafio pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores da concentração do etanol presente no plasma.

Grupo	Concentração (g/L)	DP
SAL-SAL-SAL	Não Detectado	-
SAL-SAL-ET	3,10	± 0,52
SAL-AYA-ET	2,55	± 1,43
ET-SAL-ET	2,89	± 0,23
ET-AYA-ET	3,00	± 0,70

Fonte: Da autora.

6.5 Western blot

6.5.1 Estriado

A Figura 8 apresenta a quantificação dos receptores serotoninérgicos, das proteínas dinorfina, pró-dinorfina e razão entre ambas, dos receptores dopaminérgicos e da proteína c-fos no estriado. Observa-se que em relação aos receptores serotoninérgicos 5HT1a e 5HT2a (Figuras 8A e 8B) não houve diferença estatística entre os grupos.

Em relação à dinorfina (Figura 8C), os animais dos grupos SAL-AYA-ET, ET-SAL-ET e ET-AYA-ET apresentaram uma diminuição em sua concentração quando comparados ao grupo SAL-SAL-SAL ($p < 0,01$). Ainda, os animais do grupo ET-SAL-ET apresentaram diminuição estatística na razão dinorfina/pró-dinorfina (Dy/ProDy) em relação ao grupo SAL-SAL-ET ($p < 0,05$; Figura 8E).

Na quantificação dos receptores dopaminérgicos (Figura 8F e Figura 8G), observa-se que os animais dos grupos SAL-SAL-ET, SAL-AYA-ET, ET-SAL-ET e ET-AYA-ET apresentaram diminuição na concentração do receptor de D1 em relação aos animais do grupo SAL-SAL-SAL ($p < 0,05$). Já em relação à proteína c-fos (Figura 8H), os animais dos grupos SAL-SAL-ET, ET-SAL-ET e ET-AYA-ET apresentaram diminuição estatística em sua concentração em relação ao grupo SAL-SAL-SAL ($p < 0,01$).

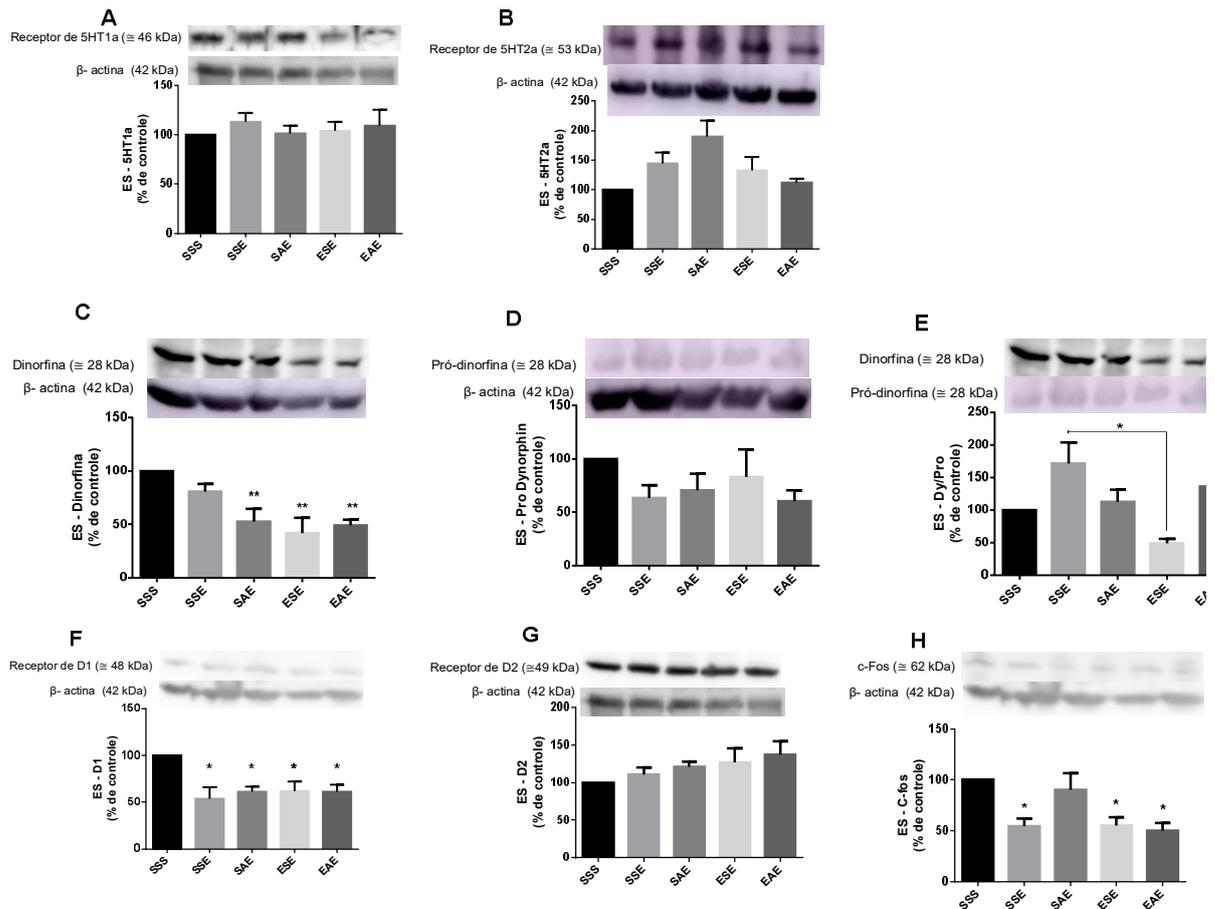


Figura 8 - Quantificação das proteínas 5HT1a, 5HT2a, dinorfina, pró-dinorfina, D1, D2 e c-fos no estriado (ES) de camundongo Swiss adulto nos grupos SAL-SAL-SAL, SAL-AYA-ET, SAL-SAL-ET, ET-SAL-ET e ET-AYA-ET (n=5). Dados expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). (A) Receptor 5HT1a; (B) Receptor 5HT2a; (C) Dinorfina; (D) Pró-dinorfina; (E) Razão entre dinorfina e pró-dinorfina; (F) Receptor D2; (G) c-Fos. ANOVA uma via, seguido do teste Tukey. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Fonte: Da autora.

6.5.2 Hipocampo

A Figura 9 apresenta a quantificação dos receptores serotoninérgicos, das proteínas dinorfina, pró-dinorfina e razão entre ambas, dos receptores dopaminérgicos e da proteína c-fos no hipocampo. Nossos resultados mostram que houve aumento estatístico na concentração do receptor 5HT1a no grupo ET-SAL-ET em relação aos grupos SAL-SAL-SAL, SAL-AYA-ET e ET-AYA-ET (p<0,01; Figura 9A), bem como aumento na concentração do receptor de 5HT2a no grupo SAL-SAL-

ET em relação aos grupos SAL-AYA-ET, ET-SAL-ET e ET-AYA-ET ($p < 0,05$; Figura 9B).

Ainda, os animais do grupo ET-AYA-ET apresentaram aumento na concentração de dinorfina em relação ao grupo ET-SAL-ET ($p < 0,05$; Figura 9C), enquanto houve aumento na concentração de pró-dinorfina no grupo ET-SAL-ET em relação ao grupo SAL-SAL-SAL ($p < 0,01$; Figura 9D) e aumento na razão Dy/ProDy no grupo ET-AYA-ET em relação ao grupo ET-SAL-ET ($p < 0,05$; Figura 9E). Em relação à quantificação da proteína c-Fos, observamos aumento em sua concentração no grupo SAL-SAL-ET em relação ao grupo SAL-SAL-SAL ($p < 0,05$; Figura 9H). Não houve nenhuma diferença estatística na quantificação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no hipocampo (Figura 9F e Figura 9G).

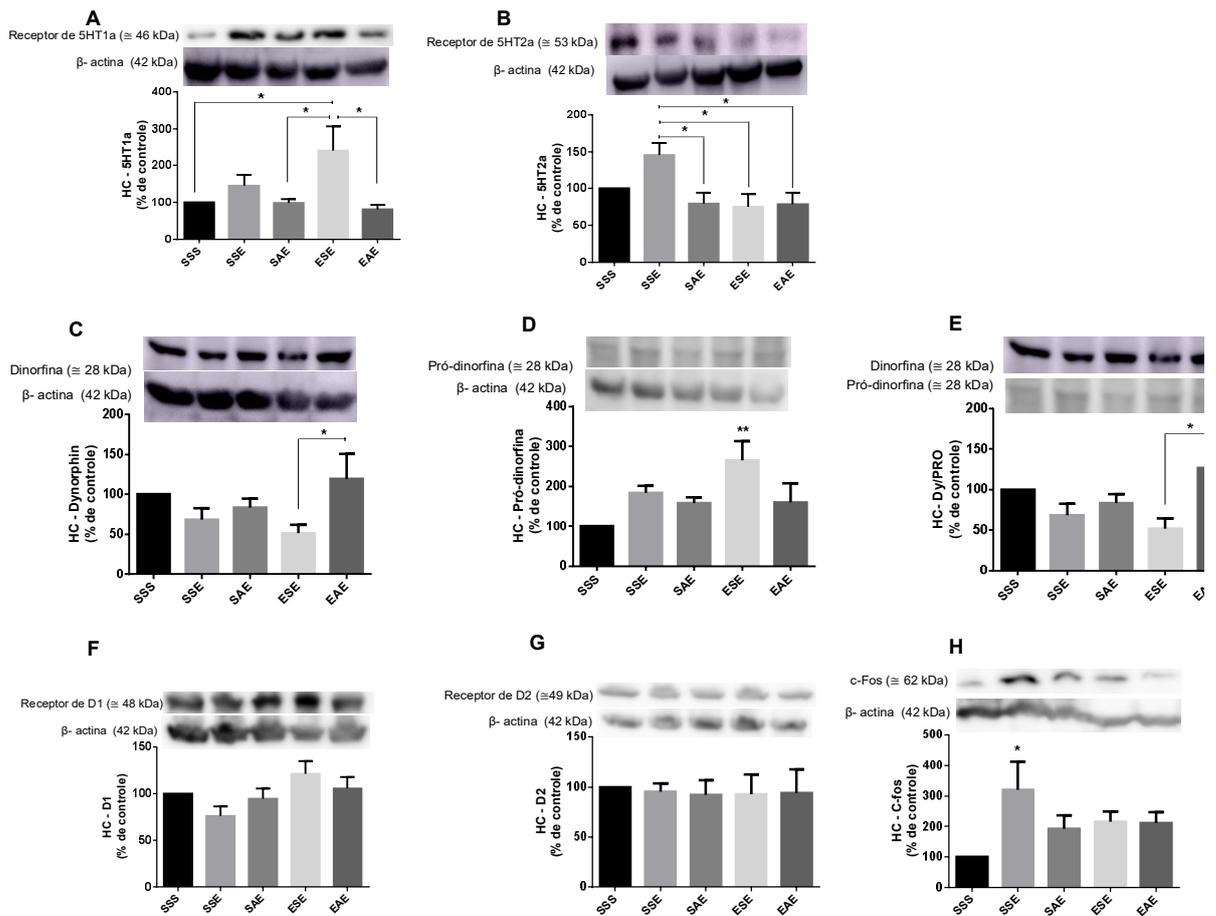


Figura 9 - Quantificação das proteínas 5HT1a, 5HT2a, dinorfina, pró-dinorfina, D1, D2 e c-fos no Hipocampo (HC) de camundongo *Swiss* adulto nos grupos (n=5) SAL-SAL-SAL, SAL-AYA-ET, SAL-SAL-ET, ET-SAL-ET e ET-AYA-ET. Dados expressos como % de controle (média ± EPM). (A) Receptor 5HT1a; (B) Receptor 5HT2a; (C) Dinorfina; (D) Pró-dinorfina; (E) Razão entre dinorfina e pró-dinorfina; (F) Receptor D1; (G) Receptor D2; (H) c-Fos. ANOVA uma via, seguido do teste Tukey. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Fonte: Da autora.

7 DISCUSSÃO

O uso abusivo de etanol representa um problema de saúde pública e apesar de diversos fármacos serem utilizados para o transtorno pelo uso do etanol, o tratamento não é efetivo (MERKX et al., 2011). Estudos indicam que o uso de ayahuasca em um contexto religioso tem sido eficaz no tratamento do transtorno por uso de substâncias (THOMAS et al., 2013). Neste contexto, estudos pré-clínicos são importantes ferramentas para avaliar a efetividade e os mecanismos pelos quais a ayahuasca atua. Nossos resultados mostram que a ayahuasca foi capaz de diminuir a expressão da sensibilização pelo etanol em camundongos, além de possuir efeito ansiolítico nos animais. Os resultados do presente estudo também mostram que a ayahuasca foi capaz de prevenir os efeitos da exposição prévia ao etanol na concentração de dinorfina e de c-fos no estriado e no hipocampo, bem como na concentração dos receptores 5HT1a e 5HT2a no hipocampo.

Tais dados são coerentes com os observados por Oliveira-Lima et al. (2015). Os autores observaram que a ayahuasca bloqueou a expressão da sensibilização pelo etanol após oito dias de tratamento assim como observado no presente estudo. Apesar de nossos dados serem coerentes com os apresentados por Oliveira-Lima et al. (2015), a via de administração e a dose de ayahuasca utilizada foi diferente. Enquanto Oliveira-Lima et al. (2015) administraram a ayahuasca nos animais por via i.p., nosso grupo optou por administrar a ayahuasca por gavagem, já que a via oral é a utilizada pelos indivíduos que consomem esta bebida. O DMT é uma amina indólica que é degradada pela enzima MAO, enzima que está amplamente distribuída no sistema gastrointestinal. Portanto, o DMT é rapidamente degradado após ingestão oral. Porém, no chá de ayahuasca também estão presentes as β -carbolinas, que são potentes inibidores da MAO. Consequentemente, o DMT consegue ser absorvido antes de ser degradado. Entretanto, se a ayahuasca não passa pelo sistema gastrointestinal esta interação não ocorre na mesma proporção, podendo potencializar a ação do DMT.

Com relação a dose, Oliveira-Lima et al. (2015) utilizaram a dose de 100 mg e 300 mg de ayahuasca/Kg de animal, enquanto em nosso estudo optamos pela dose de 1,76 mg de DMT/Kg de animal. A padronização da dose ayahuasca de acordo

com a concentração de DMT é importante para a reprodutibilidade dos resultados. A concentração dos alcaloides presentes na ayahuasca não é homogênea e depende de vários fatores, como a composição da planta, que depende da região e do tipo de solo, e o preparo da bebida, que não é padronizado. A dose utilizada em nosso estudo foi baseada no estudo de Sanches et al. (2016), que observou que esta dose é efetiva para o tratamento clínico de pacientes com depressão. Ainda, outros estudos clínicos mostram que doses equivalentes são efetivas no tratamento de ansiedade e síndrome do pânico (DOS SANTOS et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2016). Nossos resultados indicam que a dose de escolha foi efetiva para diminuir a expressão da sensibilização pelo etanol em camundongos.

Além do efeito de bloqueio da expressão da sensibilização da ayahuasca, nossos resultados mostraram que os animais tratados com a ayahuasca apresentaram-se menos ansiosos que os demais. Estudos comportamentais com fármacos ansiolíticos demonstram que animais tratados com esses fármacos apresentam uma maior porcentagem de permanência nos braços abertos (PELLOW et al., 1985). Portanto, em nosso estudo a ayahuasca apresentou um efeito ansiolítico. Carmeron et al. (2018) mostraram em seu estudo que o DMT na dose de 10 mg/kg produz um efeito antidepressivo e ansiolítico em ratos. Nosso resultado é condizente com esse trabalho, apesar da dose utilizada por Carmeron et al. (2018) ser bem maior que a dose utilizada no presente estudo.

Este efeito ansiolítico da ayahuasca ainda pode ser observado em estudos clínicos com humanos. Vários estudos envolvendo consumidores do chá da ayahuasca mostram uma melhora na ansiedade nos mesmos (DOS SANTOS et al., 2016). Por exemplo, em um estudo que avaliou sintomas psiquiátricos em 40 membros da igreja União do Vegetal, que consumiram ayahuasca no mínimo de 24 vezes nos últimos dois anos, o grupo que usou ayahuasca teve uma redução na incidência dos sintomas de ansiedade quando comparado com o grupo controle de não usuários de ayahuasca (DA SILVEIRA et al., 2005). Além disso, a ansiedade é um dos sintomas mais comuns na fase de abstinência dos dependentes, o que poderia justificar o uso da ayahuasca no tratamento da farmacodependência (SHARMA et al. 2007).

Para complementar o efeito ansiolítico da ayahuasca, temos o resultado relacionado ao *grooming*. Um dos fatores que estão relacionados com o aumento

desse padrão comportamental em roedores é o estresse psicológico, gerando a ansiedade (KALUEFF et al., 2005). Sharma et al. (2015), em um experimento usando ratos *Wistar*, verificou um aumento de ansiedade no período de abstinência ao etanol, o qual é condizente ao nosso resultado em que os animais em abstinência apresentaram um aumento no número de *grooming*. Entretanto, esse aumento no número de *grooming* não é verificado nos animais que estavam em abstinência ao etanol e que foram tratados com a ayahuasca, o que confirma o efeito ansiolítico da ayahuasca.

Diversos estudos avaliam fármacos e outras substâncias com ações psicoativas que influenciam nas etapas de aquisição e expressão da sensibilização pelo etanol, com foco em diferentes sistemas de neurotransmissores. Em um estudo sobre os efeitos dos principais fitocannabinóides presentes no *Cannabis sp*, canabidiol (CBD) e delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) na sensibilização pelo etanol foi evidenciado que o THC sozinho, ou em associação com CBD, foi capaz de inibir a expressão da sensibilização induzida pelo etanol em camundongos DBA/2 após tratamento de quatro dias (FILEV et al., 2017). Outro estudo demonstrou que a administração de CBD foi capaz de reduzir o consumo, a motivação e as recaídas ao etanol em camundongos (VIUDEZ-MARTÍNES et al., 2017). Na ação de antagonistas opioides, como o naloxona e naltrexona, evidencia-se somente bloqueio da aquisição da sensibilização em camundongos *Swiss*, sendo a expressão não bloqueada (CAMARINI et al., 2000; PASTOR; ARGON, 2006). Entre os fármacos capazes de bloquear a expressão da sensibilização pelo etanol estão o SB-242084, um antagonista de receptores 5HT_{2C}, o cilnidipine, um bloqueador do canal de cálcio administrados via intracranial no núcleo *accumbens* e o SCH-233890, um antagonista de receptores D1 administrado via i.p. (ANDRADE et al., 2011; BHUTADA et al., 2012; ABRAHAO; QUADROS; SOUZA-FORMIGONI, 2011). De fato, diversos estudos mostram que o receptor D1 é importante no processo de sensibilização pelo etanol. Camarini et al. (2011) avaliaram os efeitos de antagonistas de receptores D1 e D2 na sensibilização ao etanol, utilizando camundongos *Swiss*. Os autores verificaram que a sensibilização depende preferencialmente dos receptores D1 ao invés de receptor D2, já que somente o antagonista de receptor D1 foi capaz de bloquear a expressão da sensibilização ao etanol. Tal resultado corrobora nossos resultados, visto que observamos apenas

diminuição na concentração de D1 no estriado enquanto nenhuma diferença significativa ocorreu entre os grupos em relação à concentração de receptor D2. Abrahao, Goeldner e Souza-Formigoni (2014) propuseram que um aumento na sensibilidade de D1 representa uma relação neurobiológica associada com o desenvolvimento da sensibilização ao etanol, visto que a ativação do receptor de D1 nos animais sensibilizados promoveu um aumento da proteína *phospho-DARPP-32*, uma proteína regulatória, no núcleo *accumbens*. Nossos resultados mostram que tanto a administração aguda, como a repetida de etanol diminuiu a concentração de D1 no estriado, sendo que o tratamento da ayahuasca não foi capaz de prevenir esse efeito, sugerindo que o bloqueio induzido pela ayahuasca na expressão da sensibilização comportamental pelo etanol não ocorre por meio do receptor D1.

Lister e Prickett (2012) postularam hipóteses sobre a ação da ayahuasca na dependência química. Segundo os autores, como o DMT é um agonista serotoninérgico, a ação da ayahuasca envolveria uma diminuição nos níveis de dopamina na via mesolímbica, através de dois mecanismos. O primeiro envolvendo uma conexão direta entre os neurônios serotoninérgicos e os dopaminérgicos, sendo que agonistas pós- sinápticos dos receptores de 5HT_{2a} apresentam uma direta ação inibitória na liberação de dopamina (LISTER; PRICKETT, 2012). O segundo mecanismo envolve conexões indiretas entre neurônios serotoninérgico, dopaminérgico e via interneurônios GABAérgicos (STAHL, 2008). O agonismo nos receptores serotoninérgicos ativa interneurônios GABAérgicos, que por sua vez inibem a liberação de dopamina (LISTER; PRICKETT, 2012). Além disso, em outro estudo feito com usuários de ayahuasca foi evidenciado um aumento de prolactina (MCKENNA; CALLAWAY; GROB, 1998). Sabe-se que a dopamina é um dos reguladores da liberação de prolactina, sendo que o aumento na concentração de dopamina leva a diminuição de prolactina, como no estudo de MCKENNA, CALLAWAY e GROB (1998) os níveis de prolactina estão aumentados, entende-se que o de dopamina está baixo.

Segundo Marcinkiewicz et al. (2016), os níveis dos receptores de serotonina apresentam uma ligação com a dependência ao etanol. Em um estudo *post mortem* feito com indivíduos suicidas que foram confirmados com depressão e dependência ao etanol, constatou-se por meio de imuno radiografia um aumento de serotonina verificador a partir de um aumento da enzima triptofano hidrogenase, o qual é um

substrato deste neurotransmissor na região dorsal raphe, a qual é uma região que contém neurônios serotoninérgicos que inervam todo o cérebro (BONKALE et al., 2006). Outro estudo mostra um aumento da sensibilidade dos receptores 5HT1a em camundongos C57BL/6J machos após exposição crônica ao etanol (KELAI et al., 2008). De fato, a serotonina está envolvida nos processos de neuroadaptação induzidos pelo uso crônico de etanol. O receptor de 5-HT2c parece modular a severidade da abstinência ao etanol, visto que o agonista (mCPP) desse receptor diminui a severidade da abstinência, enquanto o antagonista (SB 242084) exacerba a severidade da mesma (BUCK et al., 2004). Ainda, estudos apontam que os receptores serotoninérgicos estão ligados à ansiedade, um dos principais sintomas observados durante a abstinência (MARCINKIEWCZ et al., 2016). O DMT, principal componente ativo da ayahuasca, possui estrutura química bastante similar à da serotonina e atua como agonista serotoninérgico, especialmente em receptores 5HT1a (HEISE; BROOKS, 2017). No presente estudo, observamos efeitos do etanol nos receptores serotoninérgicos apenas no hipocampo, já que a administração repetida de etanol induziu aumento nas concentrações do receptor 5HT1a, enquanto a administração aguda levou ao aumento do 5HT2a. Em ambos os casos a ayahuasca foi capaz de prevenir o efeito do etanol nos receptores serotoninérgicos, tanto na exposição repetida como na exposição aguda ao etanol.

A dinorfina é um potente opioide endógeno que se liga preferencialmente aos receptores opioides do tipo κ (ANDERSON; MOORMAN; BECKER, 2018). O seu precursor pró-dinorfina pode ser clivado por uma série de peptídeos como dinorfina A, dinorfina B, α e β neendorfinas dentre outras (CHAVKIN, 2013). Como já descrito, a dinorfina está envolvida na neuroadaptação que ocorre após exposição ao etanol. Entretanto, sua expressão e atividade em decorrência do uso do etanol parecem estar ligadas a fatores biológicos e variáveis experimentais, que incluem fatores genéticos, a dose e a forma de exposição, bem como a região do cérebro analisada. Estudos demonstram que a administração aguda de etanol leva a aumento da expressão de pró-dinorfina e de dinorfina na amígdala e no córtex pré-frontal (D'ADDARIO et al., 2013; CHANG et al., 2007). Outros estudos demonstram que a administração crônica de etanol induz aumento na concentração e expressão de dinorfina no núcleo paraventricular do hipotálamo e de pró-dinorfina no núcleo *accumbens* (CHANG et al., 2007; PRZEWLOCKA et al., 1997). Ainda, adaptações

no sistema dinorfina/ receptor opioide tipo k também ocorrem no período de abstinência ao etanol, com um *upregulated* da sinalização do receptor opioide tipo k e expressão de dinorfina observado no núcleo central da amígdala (KISSLER et al., 2014). Em nosso estudo observamos que no estriado a administração repetida de etanol levou a uma diminuição de dinorfina, sendo que a ayahuasca não foi capaz de prevenir este efeito. Entretanto, a ayahuasca contribuiu para uma diminuição de dinorfina após uma administração aguda de etanol. A diminuição da razão Dy/ProDy na administração aguda versus administração repetida de etanol, sugere que a administração repetida de etanol leva a um aumento de pró-dinorfina. No hipocampo, nossos resultados mostram que a administração repetida de etanol mais o tratamento de ayahuasca leva a um aumento de dinorfina, sendo que o aumento da razão Dy/ProDy no grupo que recebeu etanol de maneira repetida e foi tratado com ayahuasca em comparação com o grupo que recebeu etanol de maneira aguda e também foi tratado com ayahuasca comprova esse efeito. Além disso, o aumento de pró-dinorfina no grupo ET-SAL-ET sugere que a ayahuasca acelera o processo de conversão de pró-dinorfina em dinorfina.

É interessante notar que ratos *alcohol-preferring* (AA), ratos Lewis, camundongos DBA/2 e outros animais geneticamente modificados que possuem preferência ao etanol mostram uma diminuição dos peptídeos dinorfina em relação aos animais que geneticamente não preferem o etanol, como ratos *alcohol-avoiding* ANA, ratos Fischer 344 *inbred* e camundongos C57BL/6 (TERENIUS; 1994; NYLANDER et al., 1995; JAMENSKY; GIANOULAKIS, 1997; PLOJ et al., 2000). No entanto, diferente do observado em nosso estudo, Chang et al. (2007), observaram que a exposição intragástrica de etanol na dose de 4,3 g/kg/dia durante seis dias resultou em aumento de dinorfina-A e dinorfina-B no hipocampo de ratos *Wistar* três ou sete dias depois da última exposição. Apesar dos estudos mostrarem diferentes resultados, é importante considerar as diferenças nos protocolos, como via de administração, dose e o dia em que o tecido foi coletado.

A proteína c-Fos, juntamente com as outras proteínas da família Fos, é importante na diferenciação e na proliferação celular, na resposta ao estresse e no desenvolvimento da oncogênese, sendo que quando um neurônio é ativado de uma forma intensa segue a ativação de genes de expressão imediata como o c-fos. Com isso, a c-Fos e outras proteínas da sua família têm sido amplamente utilizadas no

mapeamento funcional de áreas do encéfalo que podem ser ativadas por diversos processos que afetam o SNC, como por exemplo, marcador da atividade neuronal em estudos sobre dependência de drogas, como cocaína e heroína, em diferentes regiões do encéfalo (TULCHINSKY, 2000; KOBERTA et al., 2004; CRUZ; RUBIO; HOPE, 2015). Em um estudo com ratos *Sprague-Dawley* que foram tratados com etanol, nicotina e com ambas a drogas por infusão direta na região basal anterior do encéfalo, observou-se um aumento na expressão de c-Fos no núcleo *accumbens* (SHARMA et al., 2014). Pic-Taylor et al. (2015) observaram aumento na concentração de c-Fos em ratas *Wistar* tratadas com dose única de ayahuasca, em dose equivalente a 30x a dose usual (3,3 mg/kg de harmina, 0,3 mg/kg de DMT e 0,26 mg/kg de harmalina), no núcleo dorsal da rafe, núcleo amigdalóide basolateral posterior e regiões de formação do hipocampo. Noli (2018) avaliou a concentração de c-Fos no consumo crônico de etanol em ratos *Wistar* tratados via gavagem com diferentes concentrações de ayahuasca. Neste estudo os animais recebiam livre acesso ao etanol três vezes na semana por um período de sete semanas; na oitava e última semana os animais foram tratados com ayahuasca nos dias que eram expostos ao etanol, sendo eutanasiados no último dia de tratamento e exposição ao etanol. Seus resultados mostraram que o consumo crônico de etanol induziu diminuição na concentração de c-Fos no córtex pré-frontal. No presente estudo observamos que a exposição ao etanol induziu alterações na concentração de c-Fos, sendo que o efeito foi diferente no estriado e no hipocampo. No estriado, tanto a exposição aguda quanto a repetida de etanol levou a diminuição na concentração de c-Fos, sendo que a ayahuasca foi capaz de prevenir o efeito da administração aguda de etanol, mas não da administração repetida. Já no hipocampo, observamos apenas aumento na concentração de c-Fos após administração aguda de etanol, sendo que a ayahuasca preveniu este efeito.

Nosso trabalho apresenta como limitações o fato da sensibilização comportamental não representar o transtorno pelo uso abusivo substâncias como um todo. A sensibilização é um importante fenômeno associado à neuroadaptação, referindo-se a um aprimoramento da administração crônica de uma droga. Outro fato é o modelo experimental ser heterogêneo, fazendo com que nem todos os animais sejam sensibilizados e aumentando assim o *n* experimental. Com isso, os grupos experimentais foram decididos, visando o princípio dos 3 R's (*reduction*,

replacement, refinement). Portanto, foram levados em conta os grupos que responderiam as duas principais questões de nosso trabalho: um tratamento prévio de ayahuasca diminui ou bloqueia uma resposta aguda do etanol? O tratamento da ayahuasca durante um período de abstinência diminui ou bloqueia a expressão da sensibilização (resposta repetida ao etanol)?

Em resumo, nossos resultados sugerem que 10 dias alternados de aplicação do etanol é capaz de promover a aquisição e expressão da sensibilização ao etanol, sendo que o tratamento de oito dias de ayahuasca na dose de 1,76 mg de DMT/Kg de animal é eficaz no bloqueio da expressão da sensibilização ao etanol. Além disso, sugerimos que a ayahuasca pode apresentar um efeito ansiolítico nesta mesma dose, o que pode estar relacionado ao seu efeito no bloqueio da expressão da sensibilização. Sugerimos ainda que a ayahuasca é capaz de prevenir os efeitos da exposição prévia ao etanol na concentração dos receptores de 5HT1a e 5HT2a no hipocampo e na concentração de c-Fos no estriado e no hipocampo, bem como contribuir para a diminuição de dinorfina após uma administração aguda no estriado e também acelerar o processo de conversão de pró-dinorfina em dinorfina no hipocampo.

8 CONCLUSÕES

1. Os 10 dias alternados de tratamento com o etanol foram capazes de sensibilizar a maioria dos animais tratados com etanol.
2. A ayahuasca na dose de 1,76 mg de DMT/kg de animal se mostra eficaz no bloqueio da expressão da sensibilização.
3. A ayahuasca na dose de 1,76 mg de DMT/Kg de animal apresenta um efeito ansiolítico em camundongos.
4. O etanol leva a diminuição na concentração de receptores de D1 no estriado sendo que a ayahuasca não foi capaz prevenir este efeito.
5. A administração repetida de etanol aumentou a concentração do receptor 5HT1a, enquanto a administração aguda induziu aumento de 5HT2a no hipocampo. A ayahuasca foi capaz de prevenir esses aumentos respectivamente.
6. O etanol administrado de maneira repetida diminuiu a concentração de dinorfina e a razão Dy/ProDy no estriado e no hipocampo. Tanto no hipocampo quanto no estriado a ayahuasca foi capaz de prevenir esse efeito, sendo que no estriado a ayahuasca também contribuiu para a redução na concentração de dinorfina após administração aguda de etanol.
7. A administração aguda e repetida de etanol levou a diminuição de c-Fos no estriado, enquanto no hipocampo houve aumento de c-Fos após administração aguda. A ayahuasca foi capaz de prevenir o efeito da administração aguda de etanol, tanto no estriado quanto no hipocampo.

REFERÊNCIAS

ABRAHAO, K. P.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Behavioral sensitization to ethanol results in cross-sensitization to MK-801 but not to NMDA administered intra-accumbens. **Behavioral Brain Research**, v. 235, p. 218-224, 2012.

ABRAHAO, K. P.; QUADROS, I. M.H.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Nucleus accumbens dopamine D1 receptors regulate the expression of ethanol-induced behavioural sensitization. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 175-185, 2011.

ABRAHAO, K. P.; QUADROS, I. M.H.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Accumbal dopamine D2 receptor function is associated with individual variability in ethanol behavioural sensitization. **Neuropsychopharmacology**, v. 62, p. 882-889, 2012.

ABRAHAO, K. P.; GOELDNER, F.O.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Individual Differences in Ethanol Locomotor Sensitization are associated with Dopamine D1 receptor intra-cellular signalling of DARPP – 32 in the nucleus accumbens. **Plos One**, v. 9, n.6, p. 1-9, 2014.

AGUAYO, L. G. et al. GABA(A) receptor as molecular sites action. Direct or indirect actions? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 869-885, 2002.

ALDERAZI, Y.; BRETT, F. Alcohol and the nervous system. **Current Diagnostic Pathology**, v.13, p.203-2006, 2007.

ANDERSON, R. I.; MOORMAN, D. E.; BECKER, H. C. Contribution of dynorphin and orexin neuropeptide systems to the motivational effects of alcohol. **Springer International Publishing**, p. 01-31, 2018.

ANDERSON, S. M.; PIERCE, R. C. Cocaine-induced alterations in dopamine receptorsignaling: implications for reinforcement and reinstatement. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, pp. 389-403, 2005.

ANDRADE, A.L. et al. Administration of the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 into the nucleus accumbens blocks the expression of ethanol-induced behavioral sensitization in Albino Swiss mice. **Neuroscience**, v. 189, p. 178–186, 2011.

ANTONIASSI, D. C.; LEAL, J. A.; TEDESCO, S. A. Terapia ocupacional e farmacodependência: categorização e atualizações das publicações nacionais. **O mundo da Saúde**, v. 32, p. 221-228, 2008.

BACKER, M. J. et al. Epigenetic and pharmacological regulation of 5-HT₃ receptors controls compulsive ethanol seeking in mice. **European Journal of Neuroscience**. v. 39, p. 999-1008, 2014.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**. v.38, p.1083- 1152, 1998.

BELL, R. L. et al. Ethanol-associated changes in glutamate reward neurocircuitry: a minireview of clinical and preclinical genetic findings. **Prog. Mol. Bio. Transl. Sci.**, v. 137, p. 41-85, 2016.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Research Reviews**, v. 28, pp. 309–369, 1998.

BHUTADA, P.S. et al. Cilnidipine, an L/N-type calcium channel blocker prevents acquisition and expression of ethanol-induced locomotor sensitization in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 514, p. 91–95, 2012.

BIGGIO, G. Neurobiology of alcohol and pharmacological aspects of nalmefene. **Riv Psichiatr.**, v. 50, p. 19–27, 2015.

BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res.** v. 58, n. 1-2, p. 155-165, 1993, Review.

BONKALE, W. L.; TURECKI, G.; AUSTIN M.C. Increased tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus of alcohol-dependent, depressed suicide subjects is restricted to the dorsal subnucleus. **Synapse**, v. 60, p. 81-85, 2006.

BOUSO, J. C. et al. Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of Ayahuasca: a longitudinal study. **Plos One**, 2012.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr. Psychosom. Med.**, v.1,p.63-69,1960.

BUCK, K. J. et al. Serotonin 5-HT₂ receptors and alcohol: reward, withdrawal and discrimination. **Alcoholism: Clinical and experimental research.** v. 28, n. 2, p. 211-216, 2004.

BURNETT, E. J.; CHANDLER, L. J.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Glutamatergic plasticity and alcohol dependence-induced alterations in reward, affect and cognition. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 65, n. 4, p.309-320, 2016.

CALLAWAY, J. C.; GROB, C. S. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse interactions. **J Psychoactive Drugs**, v. 30, n. 4, p. 367-369, 1998.

CALLAWAY, J. C. et al. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **J Psychoactive Drugs.**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2005.

CALLAWAY, J. C., BRITO, G. S., NEVES, E. S.. Phytochemical Analyses of *Banisteriopsis Caapi* and *Psychotria Viridis*. **J Anal. Toxicol.**, v. 20, p. 492-497, 1996.

CAMARINI, R. et al. Ethanol-induced sensitization depends preferentially on D1 rather than D2 dopamine receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 98, p. 173–180, 2011.

CAMARINI, R., NOGUEIRA PIRES, M.L., CALIL, H.M. Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 3, p. 303–309, 2000.

CAMARINI, R.; PAUTASSI, R. M. Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influence its acquisition and expression. **Brain Research Bulletin**. v. 125, p. 53-78, 2016.

CAMERON, L. P. et al. Effects of N,N-Dimethyltryptamine on rat behaviors relevant to anxiety and depression. **ACS Chemical Neuroscience**, p. A-I, 2018.

CARBONI, E. et al. Differential inhibitory effects of a 5-HT₃ antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. **European Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 515-9, 1989.

CASTROA, L. A.; BALTIERI, D. A. The pharmacologic treatment of the alcohol dependence. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p.43-46, 2004.

CASTRO-NETO, E. F. et al. Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 4, p. 141-147, 2013.

CENTRO DE INFORMAÇÃO SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (CISA). Definição de dose padrão. [s.l.], 2019. Disponível em: < <http://www.cisa.org.br/artigo/4503/definicao-dose-padrao.php>>. Acesso em: 15 dez. 2019.

CHANG, G. Q. et al. Effect of ethanol on hypothalamic opioid peptides enkephalin, and dynorphin: relationship with circulating triglycerides. **Alcoholism, clinical and experimental research.**, v. 31, p. 249-259, 2007.

CHAVKIN, C. Dynorphin- still an extraordinarily potent opioid peptide. **Mol. Pharmacol.**, v. 83, p. 729-736, 2013.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (CFM). DIRETRIZES GERAIS MÉDICAS Para Assistência Integral ao Dependente do Uso do Crack. [s.l.], 2011. Disponível em: <<http://www.sbp.com.br/pdfs/diretrizes-medicas-integral-crack-cfm.pdf>>. Acesso em: 15 dez 2019.

CRUZ, F. C.; RUBIO, F. J.; HOPE, B. T. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Brain Research.**, v. 1628, p. 157-173, 2015.

CUI, C., KOOB, G. F. Titrating tipsy targets: the neurobiology of low dose alcohol. **Trends Pharmacological Sciences.** v. 38, p. 556-568, 2017.

D'ADDARIO, C., CAPUTI, F. F., RIMONDINI, R., GANDOLFI, O., DEL BORRELLO, E., CANDELETTI, S., ROMUALDI, P. Different alcohol exposures induce selective alternations on the expression of dynorphin and nociception systems related genes in rats brain. **Addiction biology.** v. 18, p. 425-433, 2013.

DA SILVEIRA, D. X.; GROB, C. S.; DE RIOS, M.D.; LOPES, E.; ALONSO, L. K.; TACLA, C. Ayahuasca in adolescence: a preliminary psychiatric assessment. **J Psychoactive Drug.** n. 37, p. 129-133, 2005.

DAVIES, M. The role of GABA_A receptor in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. **J Psychiatry Neurosci.** v. 28, p. 263-274, 2003.

DE WIT, H. Impulsivity as a determinant and consequence of drug use: a review of underlying processes. **Addiction Biology**, v. 14, p. 22–31, 2009.

DI CHIARA, G., IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Sci.** v. 85, p. 5274-5278, 1988.

DI NICOLA, M., TEDESCHI, D., DE RISIO, L., PETTORRUSO, M., MARTINOTTI, G., RUGGERI, F., SWIERKOSZ-LENART, K., GUGLIELMO, R., CALLEA, A., RUGGERI, G., POZZI, G., DI GIANNANTONIO, M., JANIRI, L. Co-occurrence of alcohol use disorder and behavioral addictions: relevance of impulsivity and craving. *Drug Alcohol Depend.* v. 148, p. 118–125, 2015.

DOS SANTOS, R., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., STRASSMAN, R., MOTTA, V. AND CRUZ, A. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. **J Ethnopharmacology** v. 112, p. 507–513, 2007.

DOS SANTOS, R., OSÓRIO, F., CRIPPA, J. AND HALLAK, J. Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies. **Rev Bras Psiquiatr**, n. 38, p. 65-72, 2016.

DUDMAN, J. T.; EATON, M. E. RAJADHYAKSHA, A.; MACÍAS, W.; TAHER, M.; BARCZAK, A. KAMEYAMA, K.; HUGANIR, R.; KONRADI, C. Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1. **J. Neurochem.** v. 87, p. 922-934, 2003.

ERSCHE, K. D.; BARNES, A.; JONES, P. S.; MOREIN-ZAMIR, S.; ROBBINS, T. W.; BULLMORE, E. T. Abnormal structures of frontostriatal brain systems is associated with aspects of impulsivity compulsivity in cocaine dependence. **Brain**, v. 134, p. 2013-2024, 2011.

CRUZ, F. C., RUBIO, F. J., HOPE, B. T. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Behavioral Neuroscience Branch.**, v. 251, 2015.

EVERITT B. J. et al. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, v. 363, p. 3125-3135, 2008.

EVERITT B.J.; ROBBINS T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**, v. 9, p.1481-1489, 2005.

EVERITT, B. J.; WOLF, M. E. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 3312–3320, 2002.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, p. 385-431, 1998.

FERREIRA, S. E.; ABRAHAO, K. P.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Expression of behavioral sensitization to ethanol is increased by energy drink administration. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.**, v. 110, p. 245-248, 2013.

FILEV, R. et al. THC inhibits the expression of ethanol- induced locomotor sensitization in mice. **Alcohol.**, v. 65, p. 31-35, 2017.

FROELICH, J. C.; LI, T. K. Opioid involvement in alcohol drinking. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 739, p. 156-167, 1994.

FONT, L.; LUJÁN, M. A.; PASTOR, R. Involvement of the endogenous opioid system in the psychopharmacological action of ethanol: the role of acetaldehyde. **Frontiers in behavioural neuroscience**, v. 7, 2013.

GALDURÓS, J. C. F.; CAETANO, R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 26, p. 3-6, 2004.

GASS, J. T., OLIVE, M. F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, p. 218-265, 2008.

GRANT, B. F. et al. Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Arch Gen Psychiatry.**, v. 61, p. 807–816, 2004.

GOULART, S. L. O context de surgimento do culto do Santo Daime: formação da comunidade e do calendário ritual. In: LABACATE, B.C. O uso ritual da Ayahuasca. Campinas: Mercado de Letras, 2004. p. 277-301.

GUAL, A. et al. randomised, double-blind, placebo controlled, efficacy study of nalmefene, as needed use, in patients with alcohol dependence. **Eur Neuropsychopharm.**, v.23 , p.1432-1442, 2013.

HASIN, D. S. et al. Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Arch Gen Psychiatry**, v. 64, p. 830–842, 2007.

HEISE, C. W.; BROOKS, D. E. Ayahuasca exposure: descriptive Analysis of calls to US Poison Control Centers from 2005 to 2015. **J. Med. Toxicol.** v. 13, p. 245-248, 2017.

HERSH, D. F.; MODESTO-LOWE, V. Drug abuse and mood disorders. In: HENRY, B. K.; BRUCE, J.; ROUNSAVILLE, M.D. (Ed.). Dual diagnosis and treatment: substance abuse and comorbid medical and psychiatric disorders. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 177-201.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 29, p. 565–598, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DO ÁLCOOL E OUTRAS DROGRAS (INPAD). **Segundo levantamento nacional de álcool e drogas**. Relatório de 2012. São Paulo. 2012.

JAIN, N. S.; KANNAMWAR, U.; VERMA, L. Ethanol induced antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test: modulation by serotonergic system. **Psychopharmacology**. p. 1-13, 2016.

JAMENSKY, N. T., GIANOULAKIS, C. Content of dynorphins and kappa-opioid receptors in distinct brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice. **Alcoholism, clinical and experimental research**., v. 21, p. 1455-1464, 1997.

JUNG, E. S. et al. Cocaine-induced behavioral sensitization in mice: effects of microinjection of dopamine d2 receptor antagonist into the nucleus accumbens. **Exp. Neurobiol.**, v. 3, p. 224-231, 2013.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioral stress research. **J. Neurosci. Methods**., v. 143, p. 169-177, 2005.

KELAI S. et al. Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. **J Neurochem.**, v. 107, p. 1660-1670, 2008.

KENNEDY, R. H.; LIU, S. J. Sex differences in L-type calcium current after chronic ethanol consumption in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 196-203, 2003.

KISSLER, J. L. et al. The one-two punch of alcoholism: role of central amygdala dynorphins/kappa-opioid receptors. **Biological psychiatry**., v. 75, p. 774-782, 2014.

KOBELTA, P. et al. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-fos positive neurons in the rat brain. **Brain Research Protocols.**, v. 13, p. 45-52, 2004.

KOHN, R. et al. The treatment gap in mental health care. **Bull World Health Organ.**, v. 82, p. 858-866, 2004.

KOOB, G. F. Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. **Neuron.**, v. 16, p. 893-896, 1996.

KOOB, G.; KREEK, M. J. Stress, Dysregulation of Drug Reward Pathways, and the Transition to Drug Dependence. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p.1149-1159, 2007.

KOOB, G. F.; SIMON, E. J. The Neurobiology of Addiction: Where We Have Been and Where We Are Going. **The Journal of Drug Issues**, v. 39, p. 115-132, 2009.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of adicton. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v. 35, p. 217-238, 2009.

LARAMÉE, P. et al. The economic burden of alcohol dependence in Europe. **Alcohol Alcohol**, v. 48, p. 259-269, 2013.

LARANJEIRA, R. et al. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 22, n. 2, p. 62-71, 2000.

LECCA, D. et al. Differential neurochemical and behavioral adaptation to cocaine after response contingent and noncontingent exposure in the rat. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 653–667, 2007.

LEE, Y. K. et al. Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. **Alcohol**, v. 40, p. 297-301, 2005.

LIESTER, M. B.; PRICKETT, J. I. Hypotheses regarding the mechanisms of ayahuasca in the treatment of addictions. **J Psychoactive Drugs**, v. 44, n. 3, p. 200-208, 2012.

MACIEL, C.; KERR-CORRÊA, F. Complicações psiquiátricas do uso crônico do álcool: síndrome de abstinência e outras doenças psiquiátricas. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 26, p. 47-50, 2004.

MACHU, T. K.; HARRIS, R. A. Alcohols and anesthetics enhance the function of 5 hydroxytryptamine₃ receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 271, p. 898-905, 1994.

MANN, K. et al. Extending the treatment options in alcohol dependence: a randomized controlled study of as-needed nalmefene. **Biol Psychiatry**, v. 73, p.706–713, 2013.

MARCINKIEWCS, C. A.; LOWERY-GIONTA, E. G.; KASH, T. L. Serotonin's Complex Role in Alcoholism: Implications for treatment and future research. **Alcoholism: Clinical and experimental research**, v. 40, n. 6, p. 1192-1201, 2016.

MARINKOVIC, K.; HALGREN, E.; MALTZMAN, I. Effects of alcohol on verbal processing: an event-related potential study. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 28, n. 3, p.415-423, 2004.

MASUR, J., BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. **Pharmacol. Biochem. Behave.**, v. 13, p. 777-780, 1980.

MASUR, J., SOUZA, M. L. O., ZWICKER, A. P. The excitatory effect of ethanol: absence in rats, no tolerance and increased sensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 24, p. 1225-1228, 1986.

MATSUZAWA, S. et al. Roles of 5-HT₃ and opioid receptors in the ethanol-induced place preference in rats exposed to conditioned fear stress. **Life Sciences**, v.64, p.241-9, 1999.

MCCORVY, J. D.; ROTH, B. L. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. **Pharmacol. Ther.**, v. 150, p. 1-35, 2015.

MCKENNA, D. J.; CALLAWAY, J. C.; GROB, C. S. The scientific investigation of Ayahuasca: a review of past and current research. **The Heffter Review of Psychedelic Research**, v. 1, p. 65-77, 1998.

MCKENNA, D.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamino oxidase inhibitors in South American Hallucinogenic Plants: Tryptamine and b-carboline constituents of Ayahuasca. **J. Ethnopharmacol.**, v. 10, p. 195-223,1984.

MERKX, M. J.; SCHIPPERS, G. M.; KOETER, M. W. Guidelines for allocating outpatient alcohol abusers to level of care: predictive validity. **Addict Behav.**, v. 36, p. 570-575, 2011.

MIKKI, T. et al. Short-term ethanol exposure causes imbalanced neurotrophic factor allocation in the basal forebrain cholinergic system: a novel insight into understanding the initial processes of alcohol addiction. **Psychiatry and preclinical psychiatric studies**, v. 121, p. 201-210, 2014.

MYERS, R. D.; VEALE, W. L. Alcohol preference in the rat: reduction following depletion of brain serotonin. **Science**, v.160, p.1469-1471, 1968.

MOELLER, F. G. Psychiatric aspects of impulsivity. **The American Journal of Psychiatry**, v. 158, p. 1783–1793, 2001.

MOZORATI, S. L.; MARUNDE, R. L. Comparison of VTA dopamine neuron activity in lines of rats selectively bred to prefer or avoid alcohol, **Alcohol Clin Exp Res.**, v.30, n.6, p. 991-997, 2006.

MUNHOZ, T. N. et al. Tendências de consumo abusivo de álcool nas capitais brasileiras entre os anos de 2006 a 2013: análise das informações do VIGITEL. **Cad. Saúde Pública**, v. 33, n. 7, p. 1-11, 2017.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, p. 58-63, 1997.

NESTLER, E. J. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. **Neurobiology Learn Memory**, v. 78, p.637-647, 2002.

NESTLER, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 1, p. 24-32, 2004.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Natura Neuroscience**, v. 8, n. 11, p.1445-1449, 2005.

NOLI, L. M. Ayahuasca- Potencial terapêutico na dependência ao álcool e atividade neural da proteína cFos em Modelo experimental. 2018. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós Graduação em Ciência da Saúde, UnB, Brasília, 2018.

NYLANDER, I. et al. Differences between alcohol-prefferring (AA) and alcohol-avoiding (ANA) rats in the prodynorphin and proenkephalin system. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 18, p. 1272-1279, 1994.

OLIVE, M. F. et al. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. **J Neurosci.**, v. 23, p. 1-5, 2001.

OLIVEIRA-LIMA, A. J. et al. Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. **Physiol Behav.**, v. 1, n.142, p. 28-36, 2015.

PASTOR, R.; ARAGON, C. M. The role of opioid receptor subtypes in the development of behavioral sensitization to ethanol. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 1489–1499, 2006.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 13, n. 3, p. 149-167, 1985.

PIC-TAYLOR, A. et al. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rat. **Behavioural Processes**, v. 118, p. 102-110, 2015.

PIRES, A. P. S.; OLIVEIRA, C. D. R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Rev Ciênc Farm Básica**, v. 31, n.1, p. 15-23, 2010.

PIRES, A. P. S. et al. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and b-carboline alkaloids in Ayahuasca, an Amazonian Psychoactive plant beverage. **J. Phytochem. Anal.**, v. 20, n. 2, p.149-153, 2009.

PLOJ, K. et al. Basal levels and alcohol-induced changes in nociception/orphanin FQ, and enkephalin levels in C5BL/6J mice. **Brain research bulletin.**, v. 53, p. 219-226, 2000.

PRZEWLOCKA, B. et al. Ethanol withdrawal enhances the prodynorphin system activity in the rat nucleus accumbens. **Neuroscience letters**, v. 238, p. 13-16, 1997.

POST, R. M. Intermittent versus continuous stimulation: effect of time interval on the development of sensitization and kindling. **Res. Monogr.**, v. 88, p. 217-238, 1980.

POST, R. M.; CONTEL, N. R. Human and Animal Studies of Cocaine: Implications of Development of Behavioral Pathology. In: CREESE, I. (Ed.). Stimulants:

neurochemical, behavioral and clinical perspectives. New York: Raven Press, 1983. p.169-203.

QUADROS, I. M. et al. Resistance to ethanol is associated with increased NMDA receptor binding in specific brain areas. **European Journal of Pharmacology**, v.442, p. 55-61, 2002.

QUADROS, I. M. et al. Increase brain dopamine D4-like binding after chronic ethanol is not associated with behavioral sensitization in mice. **Alcohol**, v. 37, p. 99-104, 2005.

REHM, J. et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol- use disorders. **Lancet.**, v. 373, p. 2223-2233, 2009.

REEVES, S.L. M-Track: A New Software for Automated Detection of Grooming Trajectories in Mice. **PLOS Comput. Biol.**, 2016.

RIPLEY, T. L.; LITTLE, H. G. Effects on ethanol withdrawal hyperexcitability of chronic treatment with competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, v. 272, p. 112-118, 1995.

ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring Changes in Brain and Behavior Produced by Chronic Amphetamine Administration: A Review and Evaluation of Animal Models of Amphetamine Psychosis. **Brain Res Rev.**, v. 396, p.157-198, 1986.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The Neural Basis of Drug Craving: an Incentive-Sensitization Theory of Addiction. **Brain Res Rev.**, v.18, n.3, p.247-291, 1993.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 363, p. 3137-3146, 2008.

ROSE, J.H. et al. Distinct Effects of nalmefene on dopamine uptake rates and kappa opioid receptor activity in the nucleus accumbens following chronic intermittent ethanol exposure. **Int J Mol Sci.**, v. 17, p. E 1216 , 2016.

SANCHES, R. F. et al. Antidepressant effects of a single dose of Ayahuasca in patients with recurrent depression. **Brief Report.**, v. 36, n. 1, p. 77-81, 2016.

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

SASAKI, H. et al.. Cognitive function in rats with alcohol ingestion. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.52, n.4, p.845-8, 1995.

SHABANI, S. et al. Muscarinic type 2 receptors in the lateral dorsal tegmental area modulate cocaine and food seeking behaviour in rats. **Neuroscience**, v. 170, p. 559-569, 2010.

SHARMA, A. N. et al. Chronic progesterone treatment augments while dihydroprogesterone sulfate prevents tolerance to ethanol anxiolysis and withdrawal anxiety in rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 567, p. 211-222, 2007.

SHARMA, R. et al. Nicotine infusion in the Wake-promoting basal forebrain enhances alcohol-induced activation of nucleus accumbens. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 38, n. 10, p. 2590-2600, 2014.

SHARMA, A. N. et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist prevents development of tolerance to anti-anxiety effect of ethanol and withdrawal-induced anxiety in rats. **Metab Brain Dis.**, v. 30, p. 719-730, 2015.

SOUZA- FORMIGONI, M. L. et al. Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region- specific increased in brain D2 receptor binding. **Psychopharmacology**, v. 146, p 262-267.

SPANAGEL, R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behaviour. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 649-705, 2009.

STAHL, S. M. *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*. Cambridge, NY: Cambridge University Press, 2008.

STANCAMPIANO, R. et al. Biphasic effects of ethanol on acetylcholine release in the rat prefrontal cortex. **Brain research**, p. 128-132, 2004.

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. Drug wanting: behavioural sensitization and relapse to drug-seeking behaviour. **Pharmacol Rev.**, v. 63, p. 348-365, 2011.

TAMBOUR, S. et al. Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. **Behav Brain Res.**, v. 172, n. 1, p 145-154, 2006.

TERENIUS, L. Reward and its control by dynorphin peptides. **Exs.**, v. 71, p. 9-17, 1994.

THOMAS, G. et al. Ayahuasca-assisted therapy for addiction: results from a preliminary observational study in Canada. **Curr Drug Abuse Rev.**, v. 6, n. 1, p. 30-42, 2013.

THOMSEN, K. R. Applying incentive sensitization models to behavioural addiction. **Neuroscience and Behavioural Reviews**, v. 45, p. 343-349, 2014.

TICKU, M. K.; RANI, C. S. S. Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABA_A and NMDA receptor subunits. **Alcohol**, v. 38, p. 89-97, 2006.

TÓFOLI, L. F.; ARAUJO, D. B. Treating addiction: perspectives from EEG and imaging studies on psychedelics. **Internatonal Review of Neurobiology**, p. 157-185, 2016.

TULCHINSKY, E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. **Histol Histopathol**, v. 15, n. 3, p. 921-928, 2000.

UNGLESS, M. A. et al. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. **Nature**, v. 411, 583-587, 2001.

VANDERSCHUREN, L. J.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavior sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology**, v. 151, p. 99-120, 2000.

VIUDEZ-MARTÍNEZ, A. et al. Cannabidiol reduces etanol consumption, motivation and relapse in mice. **Addiction Biology**, v. 23, p. 154-164, 2017.

VOLKOW, N. D. et al. Unbalanced neuronal circuits in addiction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, p. 639-648, 2013.

YRITIA, M. et al. Determination of N,N-dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 779, p. 271-281, 2002.

WINKELMAN, M. Psychedelics as medicines for substance abuse rehabilitation: evaluating treatments with LSD, Peyote, Ibogaine and Ayahuasca. **Curr Drug Abuse Rev.**, v. 7, n. 2, p. 101-116, 2014.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. **Psychol Rev.**, v. 94, p.469-492, 1987.

WOLF, M. E. Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. **Molecular Interventions**, v.2, p. 146–157, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol and health 2004**. Geneva. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol and health 2014**. Luxembourg. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Regional Status Report on Alcohol and Health in the Americas**. Washington. 2015.

YOHAN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression. **Molecular Brain**, v. 10, p. 1-12, 2017.

ZALESKI, M. et al. Aspectos Neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p.40-42, 2004.

ZHANG, X. et al. Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. **Epilepsia**, v. 41, p. 52-60, 2000.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

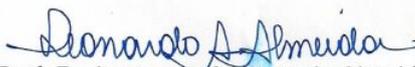


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Ayahuasca no tratamento da farmacodependência ao etanol em camundongos: possível intervenção terapêutica?", registrada com o nº 34/2017, sob a responsabilidade de Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 12/06/2017 a 31/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	224
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 12 de Junho de 2017.


 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL