



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

STEFANY SOUSA ALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA AYAHUASCA NA
DIMINUIÇÃO DO CONSUMO DE ÁLCOOL UTILIZANDO O PROCEDIMENTO
IA2BC (*INTERMITTENT ACCESS TO 2 BOTTLE CHOICE*) EM RATOS WISTAR**

BRASÍLIA

2016

STEFANY SOUSA ALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA AYAHUASCA NA
DIMINUIÇÃO DO CONSUMO DE ÁLCOOL UTILIZANDO O PROCEDIMENTO
IA2BC (*INTERMITTENT ACCESS TO 2 BOTTLE CHOICE*) EM RATOS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

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

BRASÍLIA

2016

STEFANY SOUSA ALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA AYAHUASCA NA
DIMINUIÇÃO DO CONSUMO DE ÁLCOOL UTILIZANDO O PROCEDIMENTO
IA2BC (INTERMITTENT ACCESS TO 2 BOTTLE CHOICE) EM RATOS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso
de graduação apresentado à Faculdade
de Saúde da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para obtenção
do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 28 de novembro de 2016

BANCA EXAMINADORA



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



Examinador: Prof.^a Aline Pic-Taylor

À minha família, com o máximo do meu amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Eloisa Dutra Caldas, obrigada pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao grupo de pesquisa pela contribuição nos estudos anteriores, o que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

À toda equipe que trabalhou arduamente: Nágela, Karina e Camila, obrigada pelo tempo investido para que o projeto pudesse caminhar. Em especial, à Luciana, obrigada pelo acolhimento e por abrir espaço em seu mestrado.

Aos servidores e técnicos da Faculdade de Saúde que trabalharam para nos ajudar no manejo e cuidado com os animais.

A todos que cederam seu espaço, nos laboratórios de pesquisa parceiros.

À União do Vegetal por disponibilizar o chá, sem o qual o estudo seria impossível.

À FAP e à CAPES pelo fomento aos estudos e bolsas.

Ao meus pais, Edson e Lucineide, meus avós, Pedro e Nalva, meus lindos irmãos, sem o apoio de vocês eu não seria capaz.

À minha família, pelo amor e carinho, obrigada por me ajudarem a desenvolver tudo o que sou hoje.

Aos meus amigos maravilhosos que me acompanharam durante toda a minha caminhada e ao meu querido Robson. Vocês tornaram os momentos bons, incríveis e os momentos ruins, suportáveis.

Muito mais pra mim, várias famílias
Quero ver a mãe tranquila sabendo que o filho fritá
Um inocente goró, depois um doce, uma balinha
O perréco atiçando com as mina de sainha
Amanhece tubarão e vai dormir sardinha
Tira sarro dos irmão que só colam com tubaína
Cheio das graça com um copo de caipirinha
Saber quem é mais macho no jogo do vira-vira!
Disse pra mim que desce macio e reanima
Depois é só o rastro do blááá lá na vila
Digo sim, já me acabei no carotim
Mas eu nunca mais quero essa vida pra mim
Eu ouvi falar que os maluco quer entornar
Enxugar o caneco pra depois úh úh ahh
O universo tá aí, ohh
Alguém vai se iludir

Eu ouvi falar os cara quer chapar se pá
Beber até inchar, aaah será triste o fim
Álcool destrói o fígado e o rim

Vasilhame – Criolo

RESUMO

O alcoolismo é uma desordem fisiológica e psicológica derivada do consumo abusivo de álcool, estando associado ao desenvolvimento de várias doenças graves, além de causar prejuízos sociais e econômicos. O tratamento de alcoólatras é difícil, com abordagens diversas, envolvendo psicoterapia e terapia farmacológica. Porém, o tratamento muitas vezes não é efetivo, evidenciando a necessidade de novos medicamentos. Tem sido investigado o potencial terapêutico da ayahuasca no tratamento de dependentes de drogas de abuso, incluindo o álcool. Esse trabalho tem como objetivos otimizar e validar o procedimento IA2BC (*interminant access to 2-bottle choice*) em ratos *Wistar* e avaliar o potencial terapêutico da ayahuasca na diminuição do consumo voluntário de álcool. O procedimento envolve a exposição de ratos ao acesso livre à etanol 20% ou água, com duração de 24 horas, durante 8 semanas, em 3 sessões por semana (segundas, quartas e sextas-feiras). Ao final das sessões, os bebedouros com etanol são pesados para avaliar o consumo e na oitava semana, os ratos expostos são separados em 4 grupos para tratamento com ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual da ayahuasca) e naltrexona (controle positivo) e um grupo sem tratamento. A primeira fase do trabalho foi conduzida com 20 animais condicionados em caixas individuais, distribuídos aleatoriamente entre os grupos. Porém, resultados preliminares mostraram que o consumo de etanol variou muito dentro de cada grupo (coeficiente de variação de até 92,9%) e ao longo do estudo, não se observando padrão de consumo em nenhum dos grupos. O estudo foi interrompido, e suspeitando-se vazamento de etanol nos frascos, estes foram substituídos por um de menor volume, contendo cerca de 90% do volume de etanol, e um segundo teste somente com 10 animais expostos a naltrexona foi conduzido. Neste teste, o consumo de etanol das 3 primeiras semanas foi significativamente menor que o consumo da 4ª semana, que se manteve constante até a 7ª semana. Na 8ª semana, com o tratamento com naltrexona, o consumo diminuiu significativamente, voltando a ser semelhante às três primeiras semanas, confirmando a ação terapêutica do fármaco e a validação do protocolo IA2BC. Na terceira fase, o protocolo foi conduzido novamente com 20 animais (ayahuasca e naltrexona), e resultados preliminares são apresentados.

Palavras-chave: alcoolismo, protocolo IA2BC, ratos, ayahuasca, naltrexona.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula molecular do etanol	4
Figura 2: Ilustração dos possíveis efeitos do álcool e mecanismos de ação pelos quais sua ação poderia aumentar aporte de dopamina na via mesolímbica.	7
Figura 3: Esquema do mecanismo de ação proposto para naltrexona. A seta indica local de ação da naltrexona e consequente bloqueio dos receptores e da via de sinalização que leva ao aumento da dopamina.	10
Figura 4: <i>Banisteriopsis caapi</i> , Fonte: https://ayahuascatreatment.wordpress.com/2015/05/08/ayahuasca-medicina-etnobotanica-para-um-potencial-tratamento-de-esclerose-lateral-amiotrofica/	13
Figura 5: Estrutura dos componentes da ayahuasca e da serotonina. Detalhe para a semelhança estrutural entre o DMT e a serotonina	13
Figura 6: <i>Psychotria viridis</i> . Fonte: https://revolucaodosindigos.wordpress.com/category/medicina-alternativa/	14
Figura 7: Ilustração da hipótese do mecanismo de ação da ayahuasca para tratar dependência	18
Figura 8: Diagrama da primeira fase do estudo.	22
Figura 9: Diagrama da segunda fase do estudo.....	23
Figura 10: Diagrama da terceira fase do estudo.....	24
Figura 11: Resultado da primeira fase do estudo, médias do consumo geral de etanol por semana. Letras diferentes marcam diferenças estatísticas. As barras representam o erro padrão.	26
Figura 12: Resultado da primeira fase. Linha de base (média do consumo das semanas 5, 6 e 7) e média de consumo da 8ª semana, separada por grupos (Sem tratamento, naltrexona, Ayahuasca 0,5 X, Ayahuasca 1X e Ayahuasca 2X). Letras iguais demonstrando que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados na última semana. $p > 0,05$. As barras representam o erro padrão.	27
Figura 13: Bebedouros utilizados no estudo. À esquerda, o bebedouro utilizado na primeira fase e à direita o bebedouro utilizado na segunda e terceira fase.	28
Figura 14: Resultado da segunda fase do estudo, com animais tratados com naltrexona na oitava semana. Média \pm erro padrão (n=30). Letras diferentes indicam diferença significativa	29
Figura 15: Comparação da linha de base (média do consumo da 3ª a 7ª semana) com a média de consumo da última semana, dos animais tratados com naltrexona. Letras diferentes marcam diferenças estatísticas, considerando $p \leq 0,05$. As barras representam o erro padrão.	30
Figura 16: Resultado da terceira fase do estudo. * indica diferença significativa com a semana 1; letras diferentes indicam diferença significativa. Média \pm erro padrão	32
Figura 17: Resultado da terceira fase do estudo. Comparação da linha de base (consumo médio das semanas 6 e 7) e médias da 8ª semana separadas por grupo de tratamento. *diferença significativa em relação à linha de base. Letras diferentes representam diferenças estatísticas considerando $p \leq 0,05$. As barras representam erro padrão. N= 3 vezes o número de animais em cada grupo	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da primeira fase do estudo, consumo médio de etanol.....	25
Tabela 2: Resultados da segunda fase do estudo, consumo médio de etanol.....	28
Tabela 3: Resultados da terceira fase do estudo, média do consumo de etanol	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
3.1 O álcool e o alcoolismo.....	4
3.1.1. Efeitos comportamentais	6
3.1.2. Mecanismo de ação	6
3.1.3. Tolerância e abstinência	8
3.1.4. Tratamento farmacológico.....	9
3.2. Procedimento IA2BC (<i>intermittent access to 2 bottle choice</i>)	10
3.3. Ayahuasca e potencial terapêutico	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Animais	20
4.2. Chá ayahuasca.....	20
4.3. Naltrexona	21
4.4. Protocolo experimental IA2BC.....	21
4.5. Análise estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Primeira fase do estudo	25
5.2. Segunda fase do estudo.....	28
5.3. Terceira fase do estudo.....	30
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS	34
ANEXO – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	40

1. INTRODUÇÃO

O consumo abusivo de drogas em geral é uma preocupação de ordem global, afetando economicamente e socialmente os países e contribuindo para instalação de diversas moléstias graves (GROBIN *et al.*, 1998). Cerca de 10% da população de grandes centros urbanos por todo o mundo fazem uso abusivo de substâncias psicoativas, incluindo o álcool, independente de situação social, poder aquisitivo, sexo, idade e nível de instrução, causando prejuízos nos mais diversos ramos sociais (BRASIL, 2003).

O álcool é uma droga com potencial de causar dependência, consumida por grande parcela da população em diversas culturas (WHO, 2014). O seu uso crônico pode interferir na homeostase do organismo, causando problemas de ordem cardiovascular, gastrintestinal, endócrina, interfere no estado nutricional de altos consumidores, e está associado à cirrose hepática e câncer (BRUTON, *et al.*, 2012). Além disso, muitas desordens neurológicas, como depressão, já foram também associadas ao uso de álcool (CASTRO & BALTIERI, 2004). Várias alternativas de tratamento farmacológico ao alcoolismo estão disponíveis, incluindo a naltrexona, acamprosato, onadestrona e topiramato (SHULTE, *et al.*, 2012). Porém, há casos em que o tratamento não é efetivo, evidenciado a necessidade de pesquisas na busca por novos fármacos.

A ayahuasca é um chá preparado geralmente pela decocção de duas plantas nativas das regiões amazônica e andina: a *Banisteriopsis caapi*, pertencente à família *Malpighiaceae*, também chamada de mariri ou cipó, e a *Psycotria viridis*, um arbusto da família *Rubiaceae*, conhecida como chacrona ou rainha (MCKENNA *et al.*, 1998, CALLAWAY *et al.*, 1999). Alguns estudos realizados com humanos têm destacado o potencial terapêutico da ayahuasca em tratar dependentes de drogas (DOS SANTOS *et al.*, 2016; FÁBREGAS *et al.*, 2010; LIESTER & PRICKET, 2012) e estudos farmacológicos em modelos animais podem dar sua contribuição sobre os mecanismos neurobiológicos da

ayahuasca no comportamento relacionado ao álcool (OLIVEIRA-LIMA *et al*, 2015)

Neste contexto, esse trabalho se propõe a validar e aplicar o protocolo IA2BC (*interminant access to 2-bottle choice*) para avaliar o potencial da ayahuasca no tratamento do alcoolismo usando o modelo animal. O procedimento mimetiza aspectos do consumo de álcool, como a progressão do consumo (de baixa a altas dosagens), aumento de ingestão voluntária e preferência por álcool, e têm se tornado popular pela simplicidade, validade e resultados confiáveis (CARNICELLA *et al*, 2014).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Aplicar o protocolo IA2BC (*interminant access to 2-bottle choice*) para avaliar a ação terapêutica da ayahuasca no controle de uso de álcool em ratos *Wistar*.

Objetivos específicos:

- Validar o protocolo IA2BC utilizando naltrexona como controle positivo
- Aplicar o protocolo IA2BC em ratos *Wistar* expostos a ayahuasca

3. REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 3,3 milhões de mortes, ou 5,9% de todas as mortes ocorridas no mundo em 2012 foram associadas totalmente ou de modo parcial ao consumo de álcool, representando 7,6% das mortes de homens e 4,0% das mortes de mulheres em todo o mundo. No Brasil, 63% dos casos de cirrose hepática em homens e 60% em mulheres estão associados ao álcool, além de danos relacionados a acidente de trânsito com motoristas dirigindo sobre efeito alcoólico (WHO, 2014). Nesse contexto, são associados ao álcool mais de 200 problemas de saúde, incluindo doenças infecciosas como HIV/AIDS (KALICHMAN *et al.*, 2007) e pneumonia (DE ROUX, *et al.*, 2006). A menos que políticas efetivas de prevenção sejam implementadas, a alta no consumo de álcool e os problemas de saúde, com grande impacto na sociedade e economia é esperada (WHO, 2014). No âmbito dos países em desenvolvimento, os riscos de morbimortalidade associados ao álcool são maiores, comparando com países de elevado rendimento econômico (REHM, *et al.*, 2009).

3.1 O álcool e o alcoolismo

O álcool (etanol, figura 1) é uma substância psicoativa capaz de produzir dependência e utilizada por várias culturas desde os primórdios da civilização humana (JACOBS & FEHR, 1987).

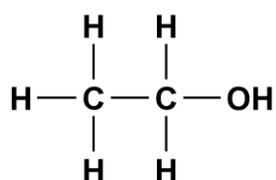


Figura 1: Fórmula molecular do etanol

Consumido principalmente por via oral, o etanol é absorvido rapidamente pelo estômago e intestino delgado e atinge a corrente sanguínea. Alguma diminuição na velocidade de absorção pode ocorrer devido à presença de alimentos que atrasam o esvaziamento gástrico (DIEHL *et al.*, 2009). É eliminado em pequenas quantidades pela urina, suor e respiração, porém a maior parte é metabolizada em acetaldeído pela álcool-desidrogenase, catalases e enzimas microssomais do citocromo P450, no fígado. Em sequência, o acetaldeído é convertido em acetato pela aldeído-desidrogenase hepática (DIEHL *et al.*, 2009). Variações no metabolismo ocorrem de acordo com gênero e características genéticas individuais, interferindo diretamente na concentração de álcool no sangue de cada consumidor (BATISTA & REIS, 2010).

O alcoolismo é definido, pela Sociedade Americana de Psiquiatria, como uma desordem psicológica e fisiológica em indivíduos que consomem grandes quantidades de etanol. O consumo abusivo de álcool está relacionado a uma série de fatores sociais, culturais, ambientais, biológicos, inclusive genéticos, que podem estar relacionados a predisposição a essa doença (KNOPIK, *et al.*, 2004). Os efeitos advindos desse consumo abusivo estão relacionados à quantidade ingerida, ao padrão de consumo e, em algumas ocasiões, à qualidade das bebidas ingeridas (WHO, 2004).

O histórico familiar é considerado o maior determinante da vulnerabilidade para problemas relacionados ao álcool, e um fator de risco para o desenvolvimento de desordens derivadas do consumo de álcool, a *alcohol use disorders* (AUD), que compreende o uso nocivo de álcool e a dependência. O uso nocivo do álcool é definido como o comportamento de uso que causa problemas de saúde, físicos ou mentais (SCHUCKIT, 2009). A dependência ao álcool é definida como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e psicológicos, desenvolvido após consumo repetido e tipicamente incluindo desejo forte de ingerir álcool, dificuldade em controlar o uso, a pesar

as consequências nocivas, alta prioridade para o uso do álcool em detrimento de outras atividades e obrigações, aumento da tolerância e, às vezes, aparecimento de abstinência fisiológica (SCHUCKIT, 2009).

3.1.1. Efeitos comportamentais

Os efeitos comportamentais agudos do uso de etanol varia entre os indivíduos de acordo com uma série de fatores como gênero, peso corporal, nível de álcool na corrente sanguínea, taxa de consumo e tempo desde a ingestão da última dose. O etanol tem duas fazes de efeitos: em baixas doses, os efeitos observados são aumento da atividade e desinibição, em dosagens mais altas ocorrem alterações comportamentais, motoras, cognitivas e da percepção. Também são observados efeitos no humor e nas emoções, geralmente variáveis entre os indivíduos (DIEHL, *et al.*, 2009).

3.1.2. Mecanismo de ação

O etanol aumenta o efeito inibitório mediado por receptores GABA_A, (ativados pelo ácido gama-aminobutírico) diminui a atividade excitatória mediada por receptores de glutamato, especialmente os receptores NDMA (ativados por aspartato e glutamato). Esses dois mecanismos de ação são relacionados aos efeitos sedativos do álcool e ao prejuízo na memória durante os períodos de intoxicação (TSAI, *et al.*, 1998; ZALESKI *et al.*, 2004). Os receptores GABA_A são sensíveis ao etanol em regiões distintas do cérebro e estão claramente envolvidos nos mecanismos de ação aguda, tolerância, dependência e autoadministração de álcool (SAMSON, *et al.*, 2001). A ativação dos receptores GABA_A intermedeia vários efeitos comportamentais, incluindo efeitos sobre a coordenação motora, efeito ansiolítico e sedação (SWIFT & LEWIS, 2009).

O mecanismo de ação do álcool no sistema nervoso não é totalmente

conhecido, mas sabe-se que envolve vários sistemas de neurotransmissão (STAHAL, 2000). Os efeitos reforçadores do etanol estão provavelmente ligados ao aumento da sinalização dos neurônios dopaminérgicos em regiões importantes do cérebro. A dopamina é um neurotransmissor monoaminérgico da família das catecolaminas, e seu aporte na área tegumental ventral (VTA) e descarga no núcleo accumbens são provavelmente uma consequência secundária da ativação do sistema GABA ou estímulo de opióides endógenos (HAES *et al.*, 2010). O aumento na atividade da dopamina na via mesolímbica enquanto a concentração sanguínea de etanol se eleva é crucial para os efeitos reforçadores desta substância (DA SILVA *et al.*, 2010). A Figura 2 mostra alguns dos efeitos do álcool e mecanismos pelos quais ele poderia influenciar no aporte de dopamina na via mesolímbica (STAHAL, 2000; DA SILVA *et al.*, 2010).

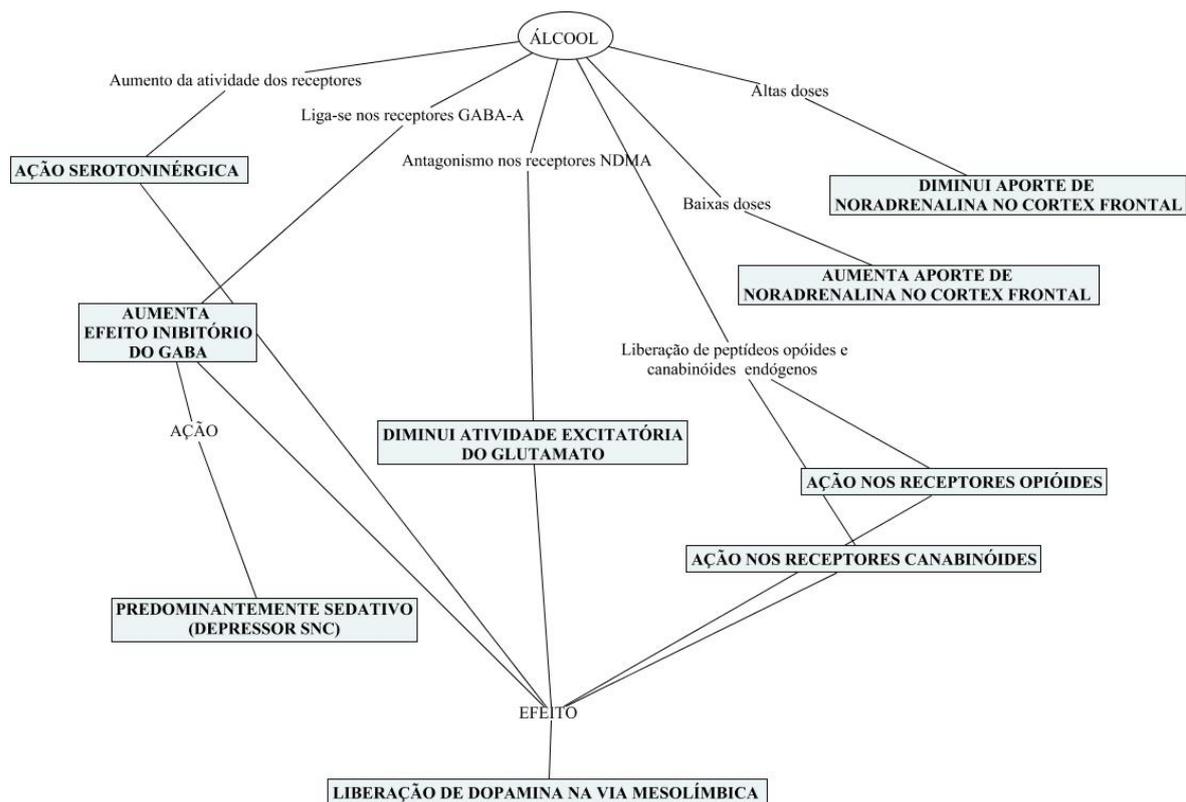


Figura 2: Ilustração dos possíveis efeitos do álcool e mecanismos de ação pelos quais sua ação poderia aumentar aporte de dopamina na via mesolímbica.

3.1.3. Tolerância e abstinência

O etanol induz diversos tipos de tolerância, incluindo a comportamental, que se refere à aprendizagem adaptativa. Condicionamento operante e aprendizado associativo podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de tolerância ao álcool e, ainda, tolerância cruzada a outras drogas (SILVA *et al.*, 2001). Tolerância metabólica também ocorre, e é uma função da regulação positiva de enzimas metabólicas no fígado, sendo necessário um aumento da dose ou a utilização mais frequente de álcool para se obter os efeitos farmacológicos desejados (WONG *et al.*, 2008).

As modificações sinápticas adaptativas são de particular importância clínica, e contribuem para desenvolvimento de tolerância ao etanol e dependência, sendo uma resposta à ação do etanol sobre os canais iônicos, e por mudanças na função de receptores GABA_A. A tolerância cruzada e sensibilização também foram intensamente pesquisados durante os últimos anos. A sensibilização à esteroides neuroativos endógenos, que são moduladores dos receptores GABA_A, influencia na dependência ao álcool e sintomas de abstinência, e pode explicar diferenças nos efeitos do etanol (GROBIN *et al.*, 1998).

A síndrome de abstinência, caracterizada pela retirada do álcool, pode ser grave o suficiente para ser fatal. A gravidade é maior ou menor em função da quantidade de etanol consumido, a frequência de utilização, e a duração do histórico de consumo. Os primeiros sinais de retirada são tremores, sudorese, fraqueza, agitação, dor de cabeça, náuseas e vômitos e aumento da frequência cardíaca. Dentro de 24 horas depois de parar de beber, convulsões podem começar a aparecer. A retirada do álcool pode ser complicada pelo estado conhecido como *delirium tremens*, que é caracterizado por agitação intensa, hiperatividade autonômica, alucinações e delírios (HAES *et al.*, 2010). Se não tratada, a síndrome de abstinência dura de 5 a 7 dias, e benzodiazepínicos são normalmente utilizados para diminuir a gravidade da síndrome. Esses fármacos são uma opção para tratamento por

agirem em receptores GABA_A (MARCIEL & KERR-CORREA, 2004).

Devido aos danos causados pelo uso e abuso de álcool, ocorre uma mobilização para auxílio e tratamento de dependentes, além de propostas de redução de danos e campanhas educativas (BRASIL, 2003). O tratamento para dependentes de álcool pode ser muito difícil e ser agravado por estado de saúde e transtorno de ordem psicológica do indivíduo, como a depressão. Além de abordagens psicoterapêuticas com modalidade psicossocial, diversos tratamentos são complementados com terapia farmacológica, utilizado, muitas vezes, para diminuir as recaídas (CASTRO & BALTIERI, 2004).

3.1.4. Tratamento farmacológico

O acamprosato é uma droga sintética com estrutura similar a um aminoácido que ocorre naturalmente. Ela age centralmente e parece restaurar a atividade normal de neurônios glutamatérgicos superexcitados pela exposição crônica ao álcool (SUYAMA & BALTIERI, 2004) Em geral, os pacientes tratados com acamprosato concluem melhor o tratamento, aumenta o tempo para a primeira bebida pós-tratamento, e têm maior taxa de abstinência e/ou maior duração acumulada de abstinência que os pacientes tratados com placebo (MASON, 2001).

O antagonista opióide naltrexona também é eficaz na redução da recaída e ajuda pessoas a permanecerem abstinentes ou diminuam o consumo de álcool. O álcool estimula a ação de opióides endógenos, o bloqueio da naltrexona nos receptores opióides seria o possível mecanismo pelo qual esse fármaco diminui o consumo de álcool (KRISTAL *et al.*, 2001). O dissulfiram é conhecido como um medicamento de "impedimento" porque torna a ingestão de álcool desagradável, alterando o metabolismo normal do álcool no organismo, inibindo a aldeído-desidrogenase, a enzima que converte acetaldeído a acetato. Altos níveis de acetaldeído produzem uma reação desagradável, que torna o consumo de álcool aversivo (KRANZLER & KIRK, 2001). A eficácia do dissulfiram não é clara, e é

dificultado pela a necessidade de controle cuidadoso da dosagem, e pela necessidade de um elevado grau de adesão ao tratamento (KRANZLER & KIRK, 2001).

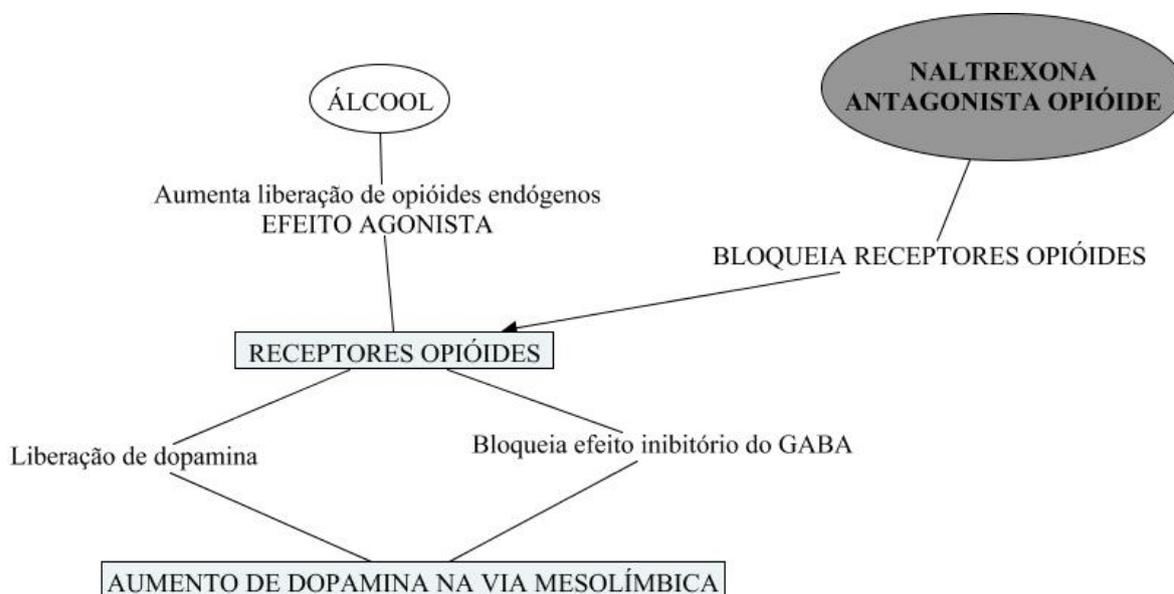


Figura 3: Esquema do mecanismo de ação proposto para naltrexona. A seta indica local de ação da naltrexona e consequente bloqueio dos receptores e da via de sinalização que leva ao aumento da dopamina.

3.2. Procedimento IA2BC (*intermittent access to 2 bottle choice*)

O protocolo do procedimento IA2BC (*intermittent-access to 2 bottle choice*) como modelo pré-clínico de ingestão voluntária de álcool utilizando linhagens de ratos adultos (*Wistar, Long-Evans e P- rats*) foi adaptado por Simms *et al.* (2008) com base no procedimento descrito por Wise (1973). Nesse protocolo, os animais são acomodados em caixas individuais e expostos ao etanol em três sessões de 24 horas por semana. O experimento começa em uma segunda-feira, quando duas garrafas são disponibilizadas, uma contendo etanol 20% (v/v) e uma contendo água. Depois do período de 24 horas a garrafa contendo álcool é substituída por outra garrafa com água que fica disponível pelas próximas 24 horas. O acesso ao álcool é repetido nas quartas-feiras e sextas-feiras. Os ratos têm acesso

livre a água durante os outros dias, a partir da troca das garrafas de álcool por água. O lado em que as garrafas são dispostas é trocado a cada sessão para evitar preferências colaterais.

Simms *et al.* (2008) compararam o protocolo IA2BC com outros procedimentos de exposição voluntária de álcool, e testaram a exposição contínua de etanol 20% ou 10%, e dois fármacos utilizados no tratamento de alcoolismo o acamprosato e a naltrexona. A naltrexona diminuiu consumo de álcool em todas as doses testadas (0,3 mg/kg; 1 mg/kg e 3 mg/kg) comparando com a administração de veículo. A naltrexona também foi testada posteriormente por Czachowski & Delory (2009) e Li *et al.* (2010).

Em geral, o consumo de álcool se estabiliza a partir da terceira ou quarta semana de exposição e é recomendado que ratos com consumo de etanol considerado baixo sejam retirados do estudo para obtenção de um grupo exclusivo de ratos com alto nível de consumo de etanol (CARNICELLA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2012).

A combinação da ingestão oral de etanol voluntariamente e períodos de abstinência utilizada no protocolo IA2BC estabelece uma oportunidade de investigar modificações neuroquímicas e comportamentais promovidas pelo alto consumo de etanol no decorrer do tempo (CARNICELLA *et al.*, 2014). Investigações posteriores demonstram que o procedimento tem contribuído para estudo de efeitos reforçadores do álcool e do papel de genes específicos e áreas cerebrais no comportamento de ingestão voluntária, em comparação com processos de ingestão forçada (BARSON *et al.*, 2015; HWA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010; FU, *et al.*, 2015). Adaptações do protocolo tem sido realizadas por alguns autores, como o escalonamento das concentrações de álcool apresentadas ao longo do tempo e monitoramento do consumo com maior frequência (HWA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010, CARNICELLA *et al.*, 2014).

3.3. Ayahuasca e potencial terapêutico

A utilização de plantas na medicina data da antiguidade, e é base do tratamento de doentes em muitas civilizações. No Brasil, com o advento das Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, seguindo diretrizes da OMS, a utilização de plantas medicinais e aproveitamento da medicina tradicional ganhou força, inclusive com incentivo à pesquisa e incorporação dessas práticas na atenção primária a saúde, evidenciando seu valor (BRASIL, 2006). A bioprospecção farmacêutica utiliza vários mecanismos e áreas do conhecimento para tirar proveito de forma adequada e consciente da biodiversidade e do conhecimento tradicional (BRASIL, 2000).

A ayahuasca, também denominada de santo daime, hoaska, oasca, ou vegetal, é uma bebida de uso ancestral por tribos da região amazônica, e mais recentemente por religiões cristãs, como o Santo Daime e a União do Vegetal (CALLAWAY & GROB, 1998; LIESTE & PRICKETT, 2012; SCHENBERG *et al.*, 2015).

A ayahuasca é geralmente preparada pela decoção de duas plantas. O *Banisteriopsis caapi*, pertencente à família *Malpighiaceae*, também chamado de mariri ou cipó, é nativo da região amazônica e andina (Figura 2). Esse componente contém as β -carbolinas harmina, harmalina, e tetra-hidroharmalina (Figura 3), inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO), responsável pela degradação de neurotransmissores importantes para o funcionamento e manutenção da homeostase cerebral, como a serotonina e dopamina (MCKENNA *et al.*, 1998).



Figura 4: *Banisteriopsis caapi*, Fonte:

<https://ayahuascatreatment.wordpress.com/2015/05/08/ayahuasca-medicina-etnobotanica-para-um-potencial-tratamento-de-esclerose-lateral-amiotrofica/>

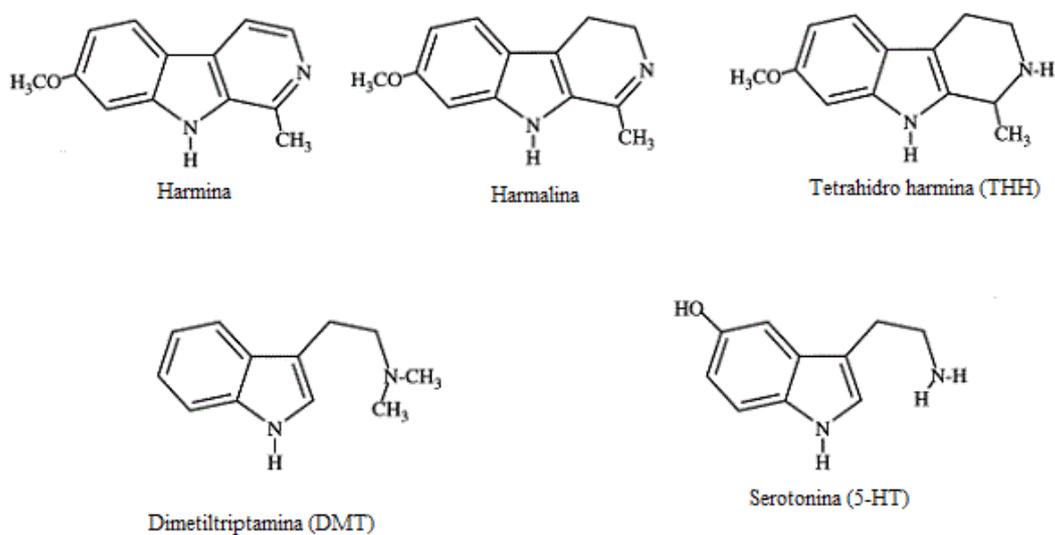


Figura 5: Estrutura dos componentes da ayahuasca e da serotonina. Detalhe para a semelhança estrutural entre o DMT e a serotonina

A *Psychotria viridis*, planta da família *Rubiaceae*, conhecida como charona ou rainha, é um arbusto (Figura 4) que possui o alcaloide indólico N,N dimetilriptamina (DMT,

Figura 3), composto de ação fortemente alucinógena, agonista dos receptores de serotonina (Figura 3). Quando ingerido por via oral, o DMT é inativado pela MAO no intestino e no fígado, e perde sua ação pelo metabolismo entérico. Na ingestão conjunta de β -carbolinas com o DMT, o que ocorre com chá ayahuasca, o DMT não sofre degradação pela enzima MAO e pode atingir concentração suficiente no cérebro, se ligando aos receptores serotoninérgicos, com conseqüente efeito alucinógeno (CALLAWAY *et al.*, 1999). Além de impedir a inativação do DMT pela MAO, as β -carbolinas também têm efeito alucinógeno inerente, já que corroboram para o aumento dos níveis cerebrais de neurotransmissores endógenos dopamina, serotonina, norepinefrina e epinefrina, pelo mesmo mecanismo. (CALLAWAY *et al.*, 1999; SCHENBERG *et al.*, 2015).

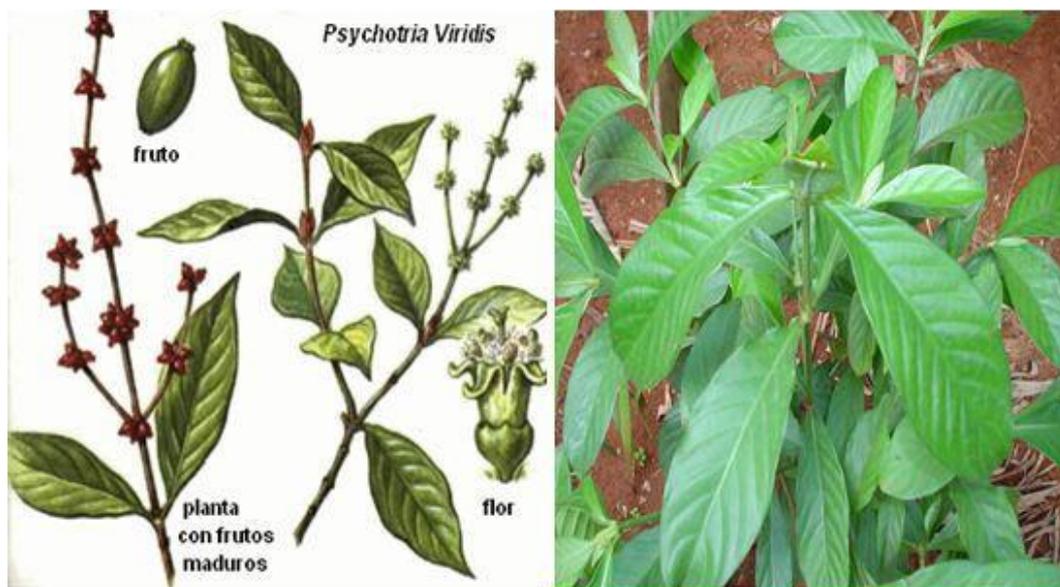


Figura 6: *Psychotria viridis*. Fonte: <https://revolucaodosindigos.wordpress.com/category/medicina-alternativa/>

Estudos epidemiológicos e observacionais têm demonstrado que a ayahuasca não parece estar associada a problemas psicossociais como outras drogas quando utilizada no contexto ritualístico ou religioso, e alguns estudos relatam que participantes das religiões que utilizam o chá diminuem o consumo de drogas (FÁBREGAS *et al.*, 2010,

SCHENNBERG *et al.*, 2015. Um estudo baseado em entrevista com norte-americanos membros da igreja do Santo Daime relatou que de 24 indivíduos que possuíam histórico de abuso de álcool e outras drogas, 22 estavam em remissão no momento da entrevista (HALPERN *et al.*, 2008).

Schenberg *et al.* (2015) compararam a atividade cerebral de usuários da ayahuasca por eletroencefalograma e quantificaram os compostos encontrados na ayahuasca e seus metabólitos na circulação sistêmica. Os resultados obtidos correlacionam atividades cerebrais modificadas, em grandes áreas de ação e circulação dos compostos da ayahuasca, em função da biodisponibilidade dos compostos dos seus compostos e metabólitos, principalmente o DMT, harmina, harmalina e tetrahydroharmina. A elucidação desses efeitos no cérebro humano é essencial para estudos sobre potencial terapêutico do chá, incluindo o tratamento da depressão, ansiedade, transtorno de estresse pós-traumático e dependência de drogas (SCHENNBERG *et al.*, 2015).

Trazendo mais evidências para a hipótese de que ayahuasca teria efeitos ansiolíticos e antidepressivos, dos Santos *et al.* (2016) publicaram uma revisão sistemática, de 21 artigos, contendo estudos observacionais em humanos, voluntários e em pacientes depressivos e, também, utilizando modelos de ansiedade e depressão em roedores. Dados avaliados nesta revisão mostraram aumento dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo de animais tratados com ayahuasca. O BDNF influencia sobrevivência neuronal e sua diminuição está relacionada com estado depressivo. Os autores sugerem que a ayahuasca e seus alcalóides têm propriedades ansiolíticas e antidepressivas e que esses efeitos devem ser melhor investigados (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Baseada em estudo recentes publicados, revisão realizada por Domínguez-Clavé *et al.* (2016) sugere que o estado mental promovido com o uso de ayahuasca pode ser útil no tratamento de outras desordens psiquiátricas, como traumas, dependência química,

transtornos impulsivos de comportamento e transtorno de personalidade limítrofe (DOMINGUES-CLAVÉ *et al.*, 2016).

KYUPERS *et al.* (2016) avaliaram pensamentos criativos divergente e convergente antes da ingestão do chá e durante seu efeito agudo, sugerindo que ayahuasca aprimora o pensamento criativo divergente, que pode ser fundamental para o crescimento e fortalecimento da flexibilidade psicológica, facilitando intervenções psicoterapêuticas. A flexibilidade psicológica ajuda o indivíduo a gerar estratégias cognitivas, emocionais e comportamentais individuais para resoluções de problemas diários (KYUPERS *et al.*, 2016). Ainda em relação as capacidades cognitivas, SOLER *et al.* (2016) mostraram que usuários da ayahuasca mostraram um aumento de parâmetros relacionados à atenção plena, testada por meio da meditação.

O cipó, *Banisteriopsis caapi*, apresenta atividade inibidora de MAO, promovida por meio das β -carbolinas, essa atividade responsável por seu possível efeito antidepressivo também promove proteção contra neurodegeneração, importante processo em doenças como o mal de Parkinson. Além disso, o estresse oxidativo promovido por espécies reativas de oxigênio (ROS) está fortemente associado a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer. A presença de componentes antioxidantes, epicatequina e procianidina B12 no extrato de *B. caapi*, adicionam valor para proteção dos neurônios por danos relacionados a radicais livres. A utilidade dos compostos epicatequina e procianidina B12 também foi descrita para doença amiloide. Em conjunto, esses resultados reforçam o possível papel de extratos da *B. caapi* no tratamento do mal de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas (WANG *et al.*, 2010).

DOS SANTOS *et al.* (2011) avaliaram o efeito imunomodulador, endócrino e autonômico da ayahuasca em humanos, comparando com a anfetamina. A ayahuasca apresentou menor efeito de dilatação pupilar, e um aumento nos níveis de prolactina não

observado na anfetamina; os níveis de cortisol foram aumentados por ambas as drogas, mas com pico mais elevado da ayahuasca. A ayahuasca também induziu modificações em subpopulações de linfócitos, com diminuição de células CD4 e CD3 e aumento de células *natural-killer*. A ayahuasca apresentou efeitos simpatomiméticos, estimulação neuroendócrina significativa e um efeito modulador tempo-dependente de imunidade mediada por células (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

Em ensaio com base na avaliação de neuroimagem por eletroencefalograma, Valle et al. (2016) sugeriram que a ativação dos receptores 5-HT_{2A} tem papel fundamental nos efeitos neurofisiológicos e visuais da ayahuasca em humanos. O DMT age como agonista em receptores serotoninérgicos, incluindo receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, que influenciam de maneira significativa as vias dopaminérgicas, diminuindo os níveis de dopamina nas regiões das vias dopaminérgicas mesolímbica, nigroestriatal e mesocortical (STAHAL, 2000).

Segundo Liester e Prickett (2012), um dos mecanismos pelos quais a ayahuasca poderia auxiliar no tratamento da dependência química está no seu efeito agonista serotoninérgico. Na região mesolímbica, o efeito de serotonina é de balanço de excitação-inibição dos neurônios dopaminérgicos, sendo que a serotonina pode ser responsável pela descarga de dopamina na fenda sináptica, porém com um efeito menor que impediria a hiperexcitação dos neurônios dopaminérgicos. O agonismo nos receptores serotoninérgicos pós-sinápticos excitariam interneurônios GABA, que por sua vez exercem efeitos inibitórios na descarga de dopamina (STAHAL, 2000). A ação desse equilíbrio excitação-inibição está associada a vários dos receptores serotoninérgicos (MOREAU *et al.*, 2010). Um segundo mecanismo corrobora com a hipótese dos possíveis efeitos da ayahuasca em diminuir ação da dopamina. A liberação de prolactina é mediada por dopamina que exerce efeito inibitório, a ayahuasca promove o aumento dos níveis de prolactina (DOS SANTOS *et al.*, 2011), efeito

relacionado a diminuição da ação de dopamina (LIESTER & PRICKETT, 2012).

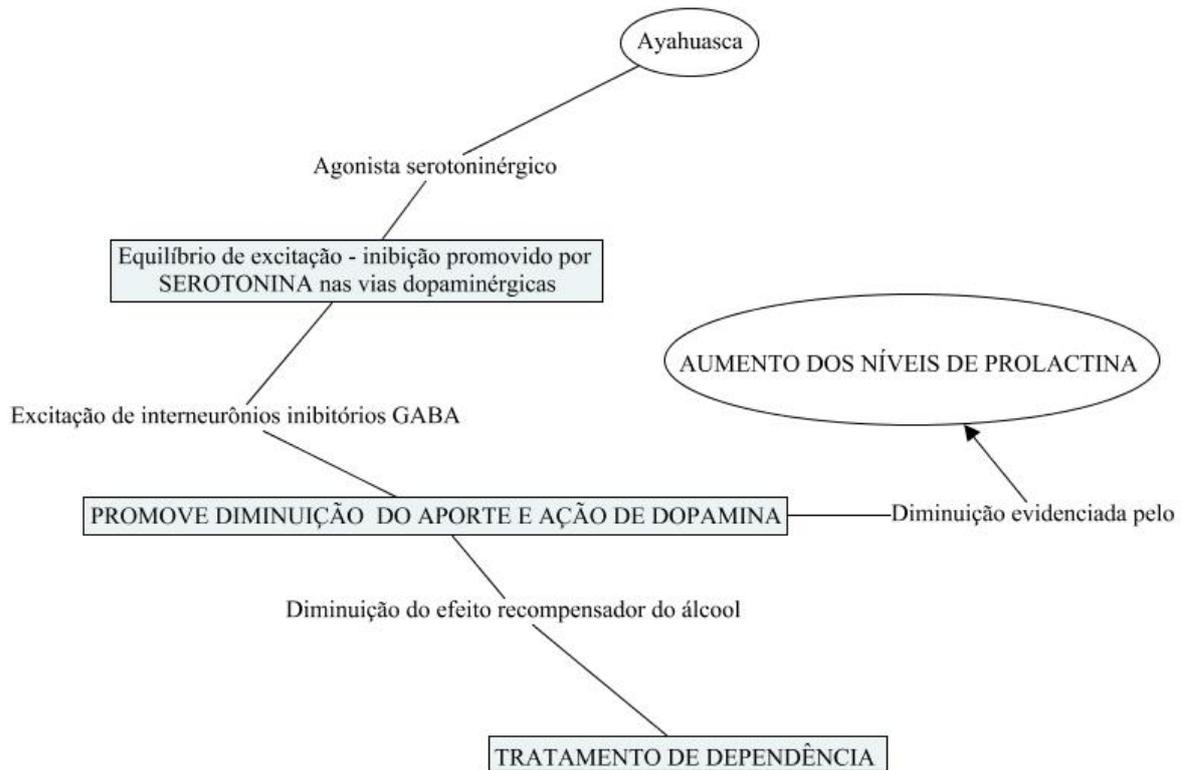


Figura 7: Ilustração da hipótese do mecanismo de ação da ayahuasca para tratar dependência

Alguns estudos para avaliar os efeitos da ayahuasca em roedores têm conduzidos. Oliveira-Lima et al. (2015) avaliaram a sensibilização comportamental relacionada ao álcool e os efeitos da ayahuasca sobre essa sensibilização utilizando modelo comportamental de roedores. Os autores concluíram que a ayahuasca inibiu iniciação do processo de sensibilização sem exercer potencial viciante adicional (OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2015). FAVARO *et al.* (2015) mostraram que ratos expostos a doses de ayahuasca de 120 mg/kg durante 30 dias tiveram comportamento alterado no teste de condicionamento do medo, dando suporte a ideia de que a bebida pode interferir na associação contextual de eventos emocionais, relacionadas as áreas citadas.

Resultados obtidos em testes comportamentais realizados em ratas tratadas com ayahuasca, em altas doses (15X e 30X as doses usuais) mostram que o comportamento foi semelhante ao observado em animais tratados com fluoxetina, um antidepressivo

mundialmente prescrito e aprovado para tratar desordens, incluindo ansiedade. No teste de natação forçada, a ayahuasca demonstrou efeito antidepressivo mais expressivo que a fluoxetina. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que salientam importância da ação agonista serotoninérgica da ayahuasca como possível antidepressivo (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

No estudo foram utilizados ratos machos *Wistar*, mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, contendo raspas de madeira. Os ratos, com 6 semanas de vida obtidos da USP/SP, foram alojados, individualmente, em sala de temperatura controlada (22 ± 2 °C), em estante ventilada para biotério e mantidos sob um ciclo de 12/12 h luz/escurecimento. A alimentação constitui-se de água filtrada e ração comercial para roedores, *ad libitum*. Os animais foram pesados no início do estudo e nos dias de reposição do álcool. O experimento iniciou-se após o período de aclimatação de duas semanas.

O projeto foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Documento: UnB/DOC n.º 73276214/2014 (ANEXO).

4.2. Chá ayahuasca

O chá utilizado no estudo foi cedido pelo grupo União do Vegetal - UDV, com sede na cidade de Brasília-DF. O chá foi liofilizado e armazenado a -20°C para ser utilizado ao longo dos experimentos. O material liofilizado foi ressolubilizado em água, nos dias de tratamento, e a dose calculada proporcionalmente ao peso de cada animal. A dose de tratamento foi relacionada à dose usual durante um ritual da UDV (150 mL de chá por um indivíduo de 70 kg) nas concentrações de 0,5X, 1X e 2X a dose usual, administradas por gavagem. Essas doses foram escolhidas por serem consideradas seguras, mesmo em administração diária; doses diárias iguais ou superiores a 4X podem representar risco ao sistema nervoso central e óbito (MORAIS, 2014). Análise química prévia por CG-MS/MS mostrou que o chá contém 0,146 mg/mL de DMT, 1,56 mg/mL de harmina e 0,12 mg/mL de harmalina.

4.3. Naltrexona

A naltrexona, fármaco utilizado como controle positivo neste estudo, foi preparada a partir de medicamento disponível em farmácia comercial, Uninaltrex®, 50 mg/comprimido, comprimidos revestidos, laboratório GENOM®. O comprimido foi macerado e solubilizado em solução de cloreto de sódio 0,9% (concentração final 1 mg/mL).

4.4. Protocolo experimental IA2BC

Após período de aclimatação, os animais no grupo de acesso ao etanol, foram treinados para autoadministração de etanol, com paradigma intermitente de duplo bebedouro para escolha descrito anteriormente (Simms *et al.*, 2008; Stuber *et al.*, 2008). Os animais tiveram à disposição, simultaneamente, dois frascos, um com etanol 20% (v/v) e outro com água somente, começando segunda-feira à tarde. Após 24 horas, o frasco de etanol foi substituído por um segundo bebedouro de água, que ficou disponível nas 24 horas seguintes. Esse padrão repetiu-se às quartas-feiras e sextas-feiras. Nos outros dias, os ratos tiveram acesso irrestrito ao suprimento de água nos dois bebedouros. Em cada sessão de ingestão de etanol, a colocação dos bebedouros foi alternada para controlar as preferências do lado do bebedouro. A quantidade de etanol consumida foi determinada pela pesagem dos bebedouros antes do acesso e 24 horas após o acesso. O consumo de etanol foi expresso em gramas por quilograma de peso corporal. A capacidade de contenção da garrafa foi calculada para avaliar a quantidade derramada causada pela manipulação experimental durante as sessões de teste. Os ratos foram expostos ao etanol durante 7 semanas consideradas de treinamento para autoadministração, e na 8ª e última semana (de tratamento), além da exposição ao etanol, eles foram tratados com naltrexona (controle positivo), ayahuasca ou água por gavagem (controle). As doses foram administradas durante 5 dias consecutivos da 8ª semana, iniciando na segunda-feira, juntamente com a primeira sessão de álcool (Figura 8).

A primeira fase do estudo foi conduzida com 20 ratos, que foram divididos

aleatoriamente na 8ª semana de tratamento em grupo controle (n=3), controle positivo (naltrexona intraperitoneal, 2 mg/kg de peso corpóreo; n=3) e três grupos tratados com ayahuasca nas doses 2X (n=3), 1X (n=3) e 0,5X (n=4), administradas por gavagem. Um grupo de animais (n=4) foi exposto somente a água ao longo do experimento para posterior comparação do cérebro desses animais com os dos grupos expostos ao álcool (tratamentos com ayahuasca, naltrexona e sem tratamento). Os animais do grupo exposto à água foram eutanasiados no final da 7ª semana e dos grupos expostos ao etanol no final da 8ª semana.

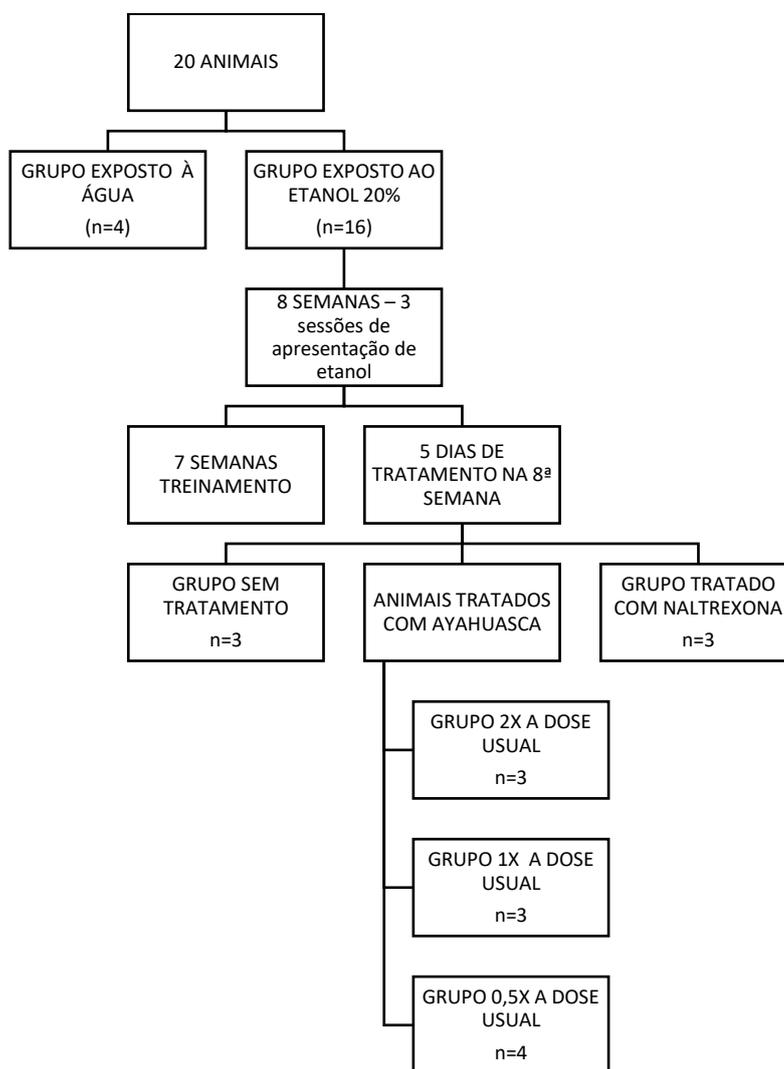


Figura 8: Diagrama da primeira fase do estudo.

Na segunda fase do estudo, o protocolo foi realizado com 10 animais tratados

na 8ª semana com naltrexona, para avaliar a eficácia deste fármaco como controle positivo do protocolo e validá-lo (Figura 9).

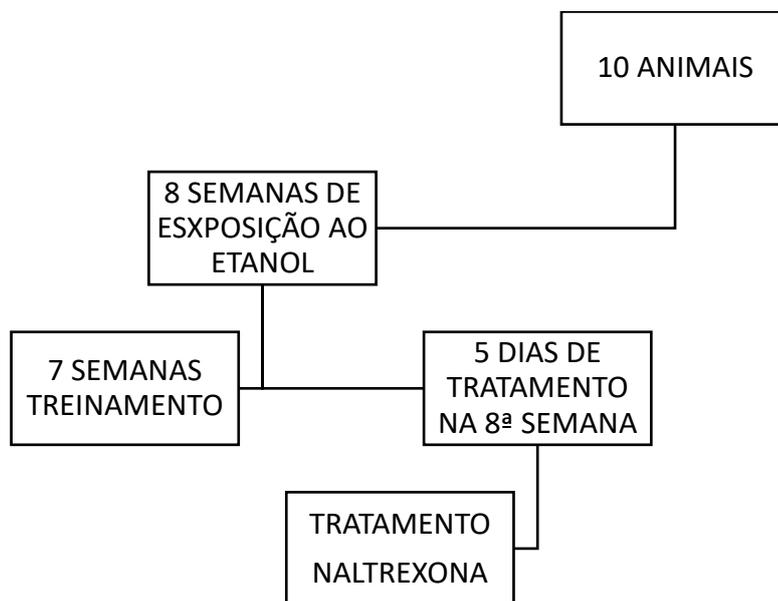


Figura 9: Diagrama da segunda fase do estudo.

Na terceira fase do estudo, o mesmo procedimento da primeira fase foi utilizado, com 20 animais, 18 foram submetidos ao protocolo e separados em grupos para tratamento e 2 não foram expostos ao álcool. Nesta etapa, ainda em andamento, o número de ratos deve chegar a 50 (Figura 10).

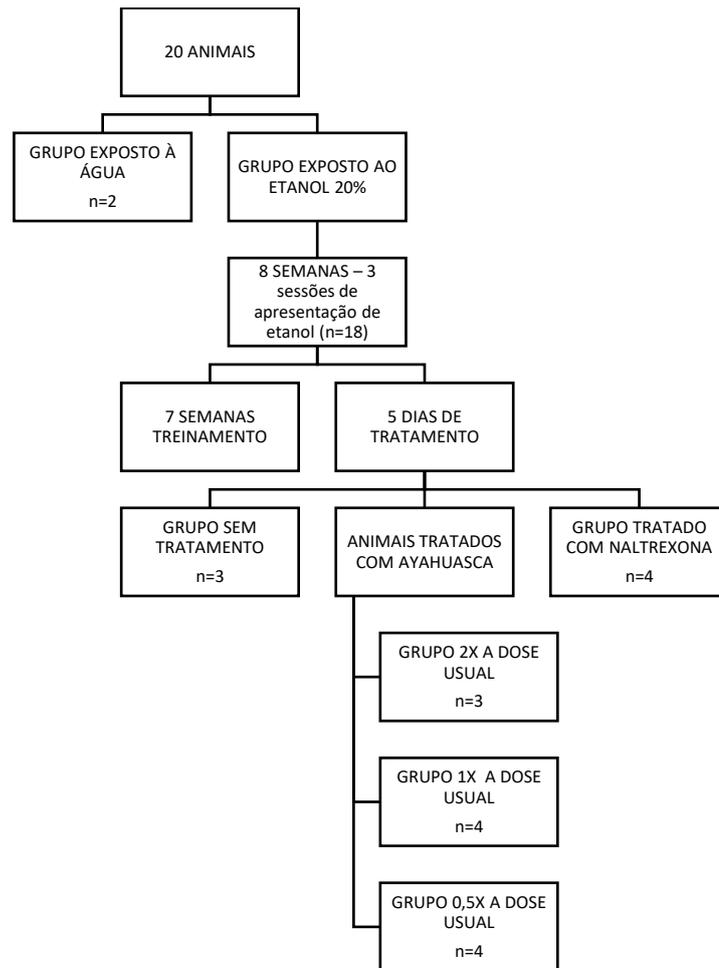


Figura 10: Diagrama da terceira fase do estudo

4.5. Análise estatística

A análise estatística realizada utilizando o programa *IBM SPSS*, versão 20. Diferenças de volume de álcool entre os grupos foram investigadas por meio de análise de variância (*one way ANOVA*), análise *posthoc* T3 de *Dunnet*, considerando significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Primeira fase do estudo

A Tabela 1 mostra os resultados, em consumo médio de etanol por peso corpóreo em cada semana obtido na primeira fase do estudo. Nesta fase, os 16 animais foram submetidos a 3 eventos de exposição ao etanol por semana, totalizando 48 medidas de etanol consumido. Foi observado que a quantidade de etanol mensurada após as sessões de exposição ao etanol oscilava consideravelmente, com coeficiente de variação (CV) variando de 29 a 93% entre a primeira e sétima semana. Na oitava semana, além da exposição ao etanol, nos animais foram tratados com naltrexona (3 animais, 9 eventos de exposição) e com três doses de ayahuasca por gavagem (3 ou 4 animais por dose), além de um grupo controle que recebeu apenas água por gavagem (3 animais). O objetivo é observar se o tratamento diminuiu o consumo de álcool.

Tabela 1. Resultados da primeira fase do estudo, consumo médio de etanol

	Consumo de etanol (mL/kg p.c)	Desvio padrão	CV (%)
Semana 1 (<i>n=16, N=48</i>)	28,78	26,72	92,86
Semana 2 (<i>n=16, N=48</i>)	24,34	20,48	84,15
Semana 3 (<i>n=16, N=48</i>)	30,42	21,41	70,39
Semana 4 (<i>n=16, N=48</i>)	37,70	20,89	55,40
Semana 5 (<i>n=16, N=48</i>)	44,06	12,85	29,16
Semana 6 (<i>n=16, N=48</i>)	49,20	21,52	43,74
Semana 7 (<i>n=16, N=48</i>)	51,66	23,53	45,54
Semana 8			
<i>Sem tratamento</i> (<i>n=3, N=9</i>)	39,96	20,37	50,99
<i>Naltrexona</i> (<i>n=3, N=9</i>)	44,28	20,75	46,88
<i>Ayahuasca 0,5</i> (<i>n=4, N=12</i>)	48,33	18,96	39,23
<i>Ayahuasca 1</i> (<i>n=3, N=9</i>)	39,29	15,10	38,42
<i>Ayahuasca 2</i> (<i>n=3, N=9</i>)	39,40	16,51	41,91

N= número de eventos de exposição ao etanol por semana x número de animais por grupo; n= número de animais por grupo; CV= coeficiente de variação, número total de animais.

Mesmo com a grande variação no consumo de etanol em cada semana, foi possível verificar um aumento significativo, considerando $p \geq 0,05$, do consumo de álcool a partir da quinta semana de exposição, que permaneceu inalterado até a sétima semana (Figura 11).

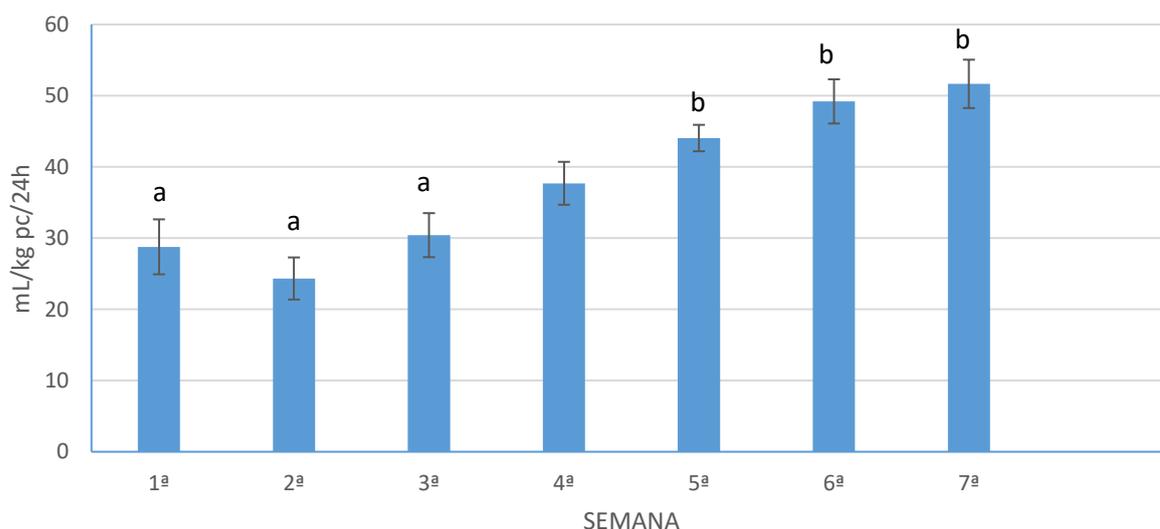


Figura 11: Resultado da primeira fase do estudo, médias do consumo geral de etanol por semana. Letras diferentes marcam diferenças estatísticas. As barras representam o erro padrão.

Os resultados mostrados na Figura 11 corroboram os resultados descritos em estudos anteriores utilizando o protocolo, onde os ratos apresentam um comportamento de baixo consumo inicial médio, um aumento gradativo, alcançando estabilidade por volta da quarta semana de oferta de etanol. Esse aumento gradativo no consumo é considerado uma das vantagens deste protocolo de ingestão voluntária, visando mimetizar o comportamento social de ingestão de álcool, que começa com níveis moderados de consumo e aumenta gradativamente até o consumo excessivo.

A Figura 12 mostra o impacto do tratamento aplicado aos ratos na oitava semana de tratamento no consumo de etanol, considerando TCCF como base de consumo a média de consumo das semanas 5, 6 e 7. Não foi possível verificar diferenças significativas no

consumo de álcool na 8ª semana entre os grupos não tratados e tratados com naltrexona ou ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual), quando comparado com a linha, nem mesmo no controle positivo com naltrexona, indicando que o protocolo não foi efetivo.

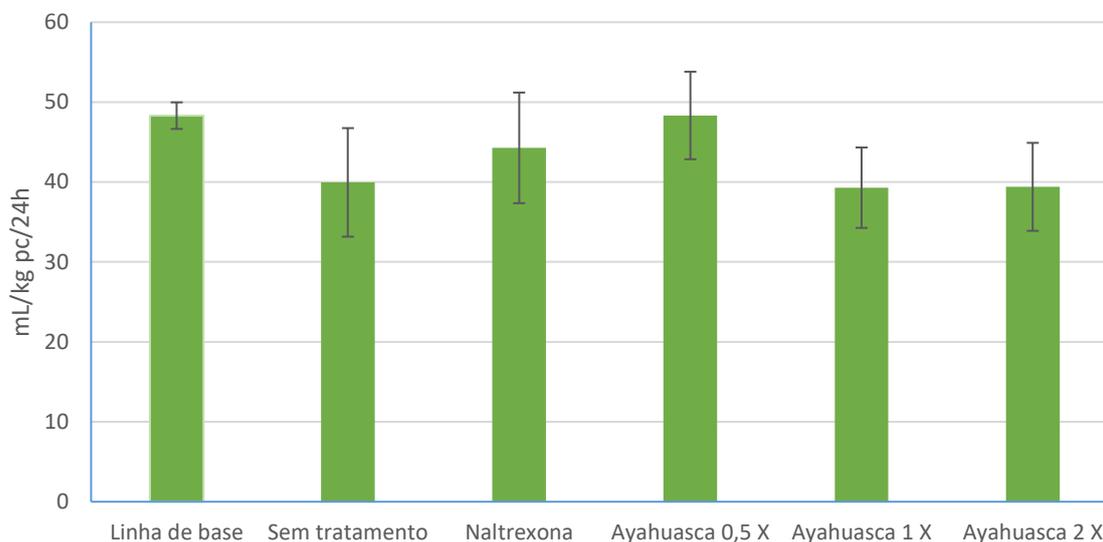


Figura 12: Resultado da primeira fase. Linha de base (média do consumo das semanas 5, 6 e 7) e média de consumo da 8ª semana, separada por grupos (Sem tratamento, naltrexona, Ayahuasca 0,5 X, Ayahuasca 1X e Ayahuasca 2X). Letras iguais demonstrando que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados na última semana. $p > 0,05$. As barras representam o erro padrão.

Nossa hipótese foi que houve derramamento de etanol dos bebedouros, aleatoriamente entre os frascos, o que inviabilizou a detecção de qualquer diferença significativa entre os consumos dos grupos na etapa de tratamento do protocolo. Os bebedouros foram trocados para realização da segunda fase do estudo (Figura 13). Esses bebedouros comportavam um volume menor de etanol (400 mL), e ficavam quase totalmente preenchidos pelo líquido. Essa estratégia foi recomendada por pesquisadores que utilizam o protocolo a partir de contato pessoal, e visa diminuir a quantidade de ar e pressão na tentativa de diminuir o derramamento.



Figura 13: Bebedouros utilizados no estudo. À esquerda, o bebedouro utilizado na primeira fase e à direita o bebedouro utilizado na segunda e terceira fase.

5.2. Segunda fase do estudo

A segunda fase do estudo visou validar o protocolo utilizando 10 animais tratados apenas com naltrexona (30 eventos de exposição), controle positivo, utilizando os novos frascos. Os resultados são apresentados (Tabela 2). É possível verificar menores coeficientes de variação nesta fase (entre 17 e 75%), comparando com os resultados da primeira fase.

Tabela 2: Resultados da segunda fase do estudo, consumo médio de etanol

	Consumo de etanol (mL/kg pc/24h)	Desvio padrão	CV (%)
Semana 1 (<i>n=10, N=30</i>)	29,12	14,27	48,99
Semana 2 (<i>n=10, N=30</i>)	37,21	28,07	75,43
Semana 3 (<i>n=10, N=30</i>)	42,00	15,41	36,68
Semana 4 (<i>n=10, N=30</i>)	46,67	15,35	32,89
Semana 5 (<i>n=10, N=30</i>)	44,68	7,86	17,60
Semana 6 (<i>n=10, N=30</i>)	50,60	18,32	36,20
Semana 7 (<i>n=10, N=30</i>)	44,36	8,63	19,45
Semana 8 <i>Naltrexona (n=10, N=30)</i>	34,27	9,59	27,98

N= número de exposições ao etanol durante todo o estudo multiplicado pelo n (número de animais). CV=coeficiente de variação.

Foi possível verificar que os animais consumiram progressivamente o etanol, com aumento significativo observado a partir da terceira semana, em comparação com as primeiras, estabilização até a sétima semana e diminuição significativa do consumo com tratamento com naltrexona na oitava semana, que voltou a ser semelhante ao das primeiras duas semanas (Figura 14).

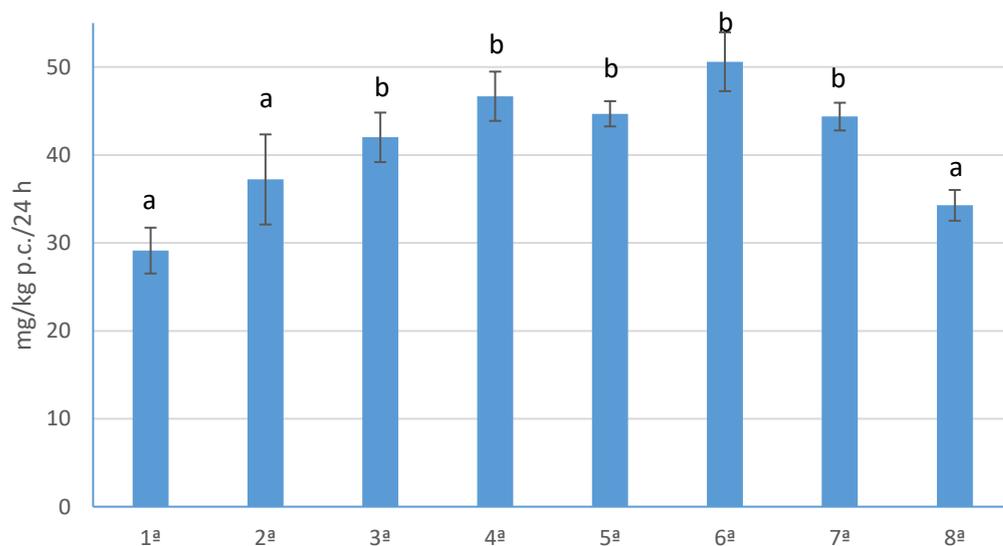


Figura 14: Resultado da segunda fase do estudo, com animais tratados com naltrexona na oitava semana. Média \pm erro padrão (n=30). Letras diferentes indicam diferença significativa

A Figura 15 mostra o consumo de etanol significativamente menor na semana de tratamento com naltrexona comparado com a linha de base (3^o a 7^o semana), confirmando que o protocolo IA2BC foi eficiente para detectar a ação da naltrexona na diminuição de consumo de álcool por ratos *Wistar*.

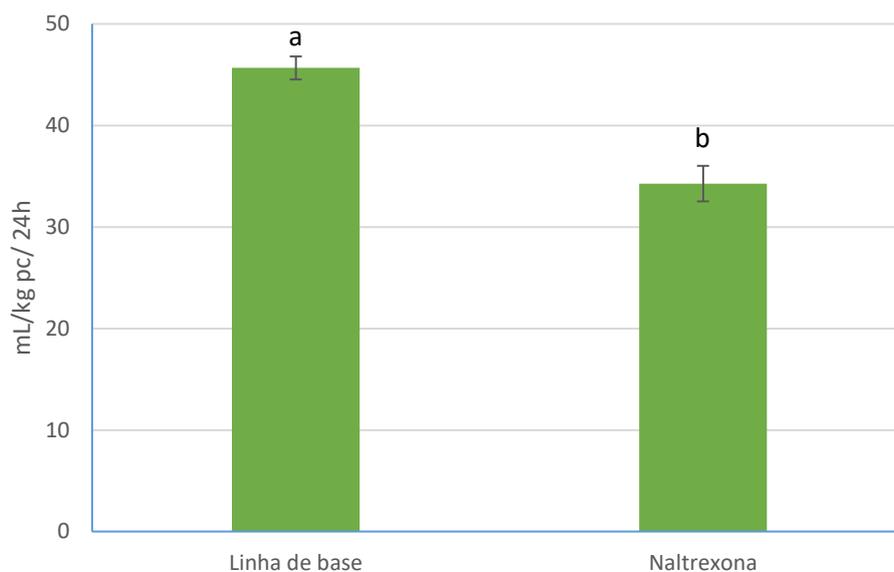


Figura 15: Comparação da linha de base (média do consumo da 3^a a 7^a semana) com a média de consumo da última semana, dos animais tratados com naltrexona. Letras diferentes marcam diferenças estatísticas, considerando $p \leq 0,05$. As barras representam o erro padrão.

5.3. Terceira fase do estudo

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos na terceira fase do estudo, onde 18 animais foram expostos ao etanol em 3 seções semanais (54 eventos de exposição). O coeficiente de variação observado para cada semana variou entre 47 e 64%, menor que aquele obtido na primeira fase do estudo.

Tabela 3: Resultados da terceira fase do estudo, média do consumo de etanol

	Consumo de etanol (mL/kg pc/24h)	DESVIO PADRÃO	CV (%)
Semana 1 (<i>n=18, N=54</i>)	22,14	12,36	55,84
Semana 2 (<i>n=18, N=54</i>)	25,47	15,50	60,86
Semana 3 (<i>n=18, N=54</i>)	23,05	14,73	63,87
Semana 4 (<i>n=18, N=54</i>)	25,57	15,75	61,58
Semana 5 (<i>n=18, N=54</i>)	30,20	16,94	56,10
Semana 6 (<i>n=18, N=54</i>)	30,63	14,60	47,65
Semana 7 (<i>n=18, N=54</i>)	35,45	20,72	58,46
Semana 8			
<i>Sem tratamento</i> (<i>n=3, N=9</i>)	45,30	9,73	21,48
<i>Naltrexona</i> (<i>n=4, N=12</i>)	26,11	9,17	35,13
<i>Ayahuasca 0,5</i> (<i>n=4, N=12</i>)	23,42	11,05	47,17
<i>Ayahuasca 1</i> (<i>n=4, N=12</i>)	30,77	13,40	43,53
<i>Ayahuasca 2</i> (<i>n=3, N=9</i>)	25,81	17,60	68,18

N= número de eventos de exposição por semana vezes o número de animais (n).

CV= coeficiente de variação.

Os resultados comparando as semanas de apresentação de álcool mostram um consumo inicial baixo, o aumento só pode ser considerado significativo nas semanas 6 e 7, comparando com a semana 1 (Figura 16), e a média do consumo dessas semanas foram consideradas a linha de base de consumo (estabilização) neste experimento. A Figura 17 mostra o consumo da semana de tratamento (8ª semana), separando os resultados por grupos, comparado com a linha de base. O grupo dos animais não tratados (gavagem com água) teve um aumento significativo do consumo de etanol em relação à linha de base e aos grupos tratados com naltrexona e ayahuasca na dose 0,5X. Porém, o tratamento com naltrexona ou ayahuasca não diminuiu o consumo de etanol. Estes resultados, porém, ainda são pouco conclusivos devido ao número reduzido de animais por grupo tratado (3 ou 4 animais por grupo, Tabela 3).

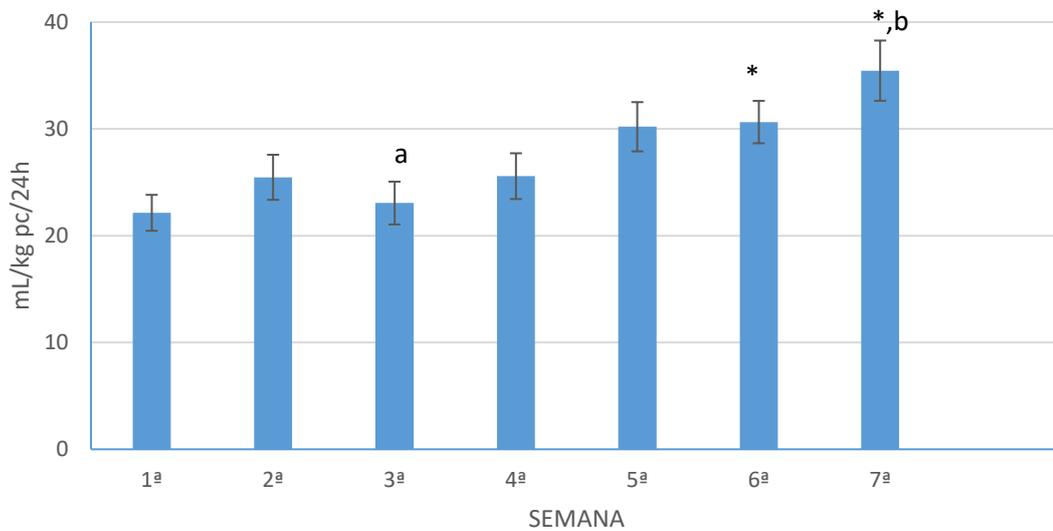


Figura 16: Resultado da terceira fase do estudo. * indica diferença significativa com a semana 1; letras diferentes indicam diferença significativa. Média ± erro padrão

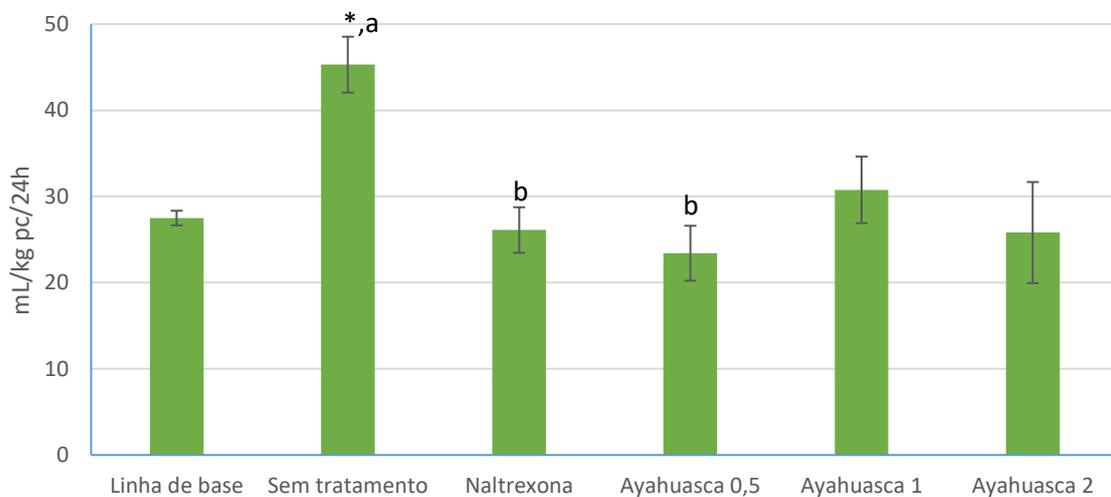


Figura 17: Resultado da terceira fase do estudo. Comparação da linha de base (consumo médio das semanas 6 e 7) e médias da 8ª semana separadas por grupo de tratamento. *diferença significativa em relação à linha de base. Letras diferentes representam diferenças estatísticas considerando $p \leq 0,05$. As barras representam erro padrão. N= 3 vezes o número de animais em cada grupo

6. CONCLUSÃO

O protocolo IA2BC não funcionou na primeira fase do estudo, possivelmente devido à perda de álcool nos bebedouros. A troca dos bebedouros corrigiu o problema e os resultados obtidos mostraram que o protocolo foi validado na segunda fase do estudo, consuzido com o controle positivo, a naltrexona. Na terceira fase do trabalho, o protocolo está sendo aplicado para testar eficácia terapêutica da ayahuasca, porém os resultados ainda são inconclusivos devido ao número reduzido de animais testados até o momento (3-4 animais por grupo de tratamento na oitava semana).

7. REFERÊNCIAS

- _____. Library Cataloguing-in-Publication. Data global status report on alcohol and health, **World Health Organization** – WHO, 2014.
- _____. Neuroscience of psychoactive substance use and dependence. **World Health Organization** -WHO, 2004.
- Batista I, Reis M. Farmacologia das substâncias psicoativas. **Artmed**, 1ª edição, 25-52. 2010
- Brasil. Medida Provisória nº 2186-16, de 23 de agosto de 2001. Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Brasília, 2001.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Coordenação Nacional de DST/Aids. A Política do Ministério da Saúde para atenção integral a usuários de álcool e outras drogas / Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, Coordenação Nacional de DST e Aids. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Cópia do Decreto Legislativo no. 2, de 5 de junho de 1992. Aprova o texto do Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada na Cidade do Rio de Janeiro, no período de 5 a 14 de junho de 1992. Brasília, 2000.
- Brunton LL, Chabner B A, Knollmann BC As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman ,12ª edição. **AMGH Editora**, 2012.
- Callaway JC, & Grob CS. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse interactions. **Journal of psychoactive drugs**, 30(4), 367-369, 1998.
- Callaway JC, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, Raymon LP, Poland RE, Andrade EN, Andrade EO, Mash DC. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. **Journal of ethnopharmacology**, 65(3):243-56, 1999.

- Carnicella S, Ron D, Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. **Alcohol**, 48(3):243-52, 2014.
- Castro LA, Baltieri DA. Tratamento farmacológico da dependência do álcool. **Revista brasileira de Psiquiatria**, 26: 43-46, 2004.
- Czachowski CL, Delory MJ. Acamprosate and naltrexone treatment effects on ethanol and sucrose seeking and intake in ethanol-dependent and nondependent rats. **Psychopharmacology**, 204(2):335-48, 2009.
- Da Silva MTB, de Araújo FLO, Félix FHC, Simão AFL, Lobato RDFG, de Sousa FCF, de Vasconcelos M. Álcool e nicotina: mecanismos de dependência. **Revista Neurociências**, 18(4):531-539, 2010.
- de Roux A, Cavalcanti M, Marcos MA, Garcia E, Ewig S, Mensa J, Torres A. Impact of alcohol abuse in the etiology and severity of community-acquired pneumonia. **CHEST Journal**, 129(5):1219-25, 2006.
- Diehl A, Cordeiro DC, Laranjeira R. Tratamentos farmacológicos para dependência química: da evidência científica à prática clínica, 1ª edição, **Artmed**, 2009.
- Domínguez-Clavé E, Soler J, Elices M, Pascual JC, Álvarez E, de la Fuente Revenga M, Friedlander P, Feilding A, Riba J. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. **Brain research bulletin**, 126(Pt 1):89-101, 2016.
- Dos Santos RG, Osório FL, Crippa JA, Hallak JE. Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 38(1):65-72, 2016.
- Dos Santos RG, Valle M, Bouso JC, Nomdedéu JF, Rodríguez-Espinosa J, McIlhenny EH, Barker SA, Barbanoj MJ, Riba J. Autonomic, neuroendocrine, and immunological effects of ayahuasca: a comparative study with d-amphetamine. **Journal of clinical psychopharmacology**, 31(6):717-26, 2011.
- Fábregas JM, González D, Fondevila S, Cutchet M, Fernández X, Barbosa PC, Alcázar-Córcoles MÁ, Barbanoj MJ, Riba J, Bouso JC. Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. **Drug and alcohol dependence**, 111(3):257-61, 2010.
- Favaro VM, Yonamine M, Soares JC, Oliveira MG. Effects of Long-Term Ayahuasca Administration on Memory and Anxiety in Rats. **PloS one**, 10(12):e0145840, 2015.
- Fu R, Gregor D, Peng Z, Li J, Bekker A, Ye J. Chronic Intermittent Voluntary Alcohol Drinking Induces Hyperalgesia in Sprague-Dawley Rats. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, 7(3):136-44, 2015.
- Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and

- alcohol-use disorders. **The Lancet**, 373(9682):2223-33, 2009.
- Grobin, A. C., Matthews, D. B., Devaud, L. L., & Morrow, A. L. The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol. **Psychopharmacology**, 139(1-2), 2-19, 1998.
- Haes TM, Clé DV, Nunes TF, Roriz-Filho JS e Moriguti, JC. Álcool e sistema nervoso central. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, 43(2), 153-163, 2010.
- Halpern JH, Sherwood AR, Passie T, Blackwell KC, Rutenber AJ. Evidence of health and safety in American members of a religion who use a hallucinogenic sacrament. **Medical Science Monitor**, (8):SR15-22, 2008.
- Hwa LS, Chu A, Levinson SA, Kayyali TM, DeBold JF, Miczek KA. Persistent Escalation of Alcohol Drinking in C57BL/6J Mice With Intermittent Access to 20% Ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 35(11):1938-47, 2011.
- Hypotheses regarding the mechanisms of ayahuasca in the treatment of addictions.
- Jacobs MR, Fehr KOB. Addiction Research Foundation's drugs and drug abuse: a reference text. 2ª edição. **Addiction Research Foundation**, 1987.
- Kalichman SC, Simbayi LC, Kaufman M, Cain D, Jooste S. Alcohol use and sexual risks for HIV/AIDS in sub-Saharan Africa: systematic review of empirical findings. **Prevention science**, 8(2):141-51 2007.
- Knopik VS, Heath AC, Madden PA, Bucholz KK, Slutske WS, Nelson EC, Statham D, Whitfield JB, Martin. Genetic effects on alcohol dependence risk: re-evaluating the importance of psychiatric and other heritable risk factors. **Psychological medicine**, 34(8):1519-30, 2004.
- Kranzler HR, Van Kirk J. Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: A meta-analysis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 25(9):1335-41, 2001.
- Kuypers KP, Riba J, de la Fuente Revenga M, Barker S, Theunissen EL, Ramaekers JG. Ayahuasca enhances creative divergent thinking while decreasing conventional convergent thinking. **Psychopharmacology**, 233(18):3395-403, 2016.
- Li J, Cheng Y, Bian W, Liu X, Zhang C, Ye JH. Region-Specific Induction of FosB/ Δ FosB by Voluntary Alcohol Intake: Effects of Naltrexone. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 34(10):1742-50., 2010.
- Liester MB, Prickett JI. Hypotheses regarding the mechanisms of ayahuasca in the treatment of addictions. **Journal of psychoactive drugs**, 44(3):200-8, 2012.
- Maciel C. Kerr-Corrêa F. Complicações psiquiátricas do uso crônico do álcool: síndrome de

- abstinência e outras doenças psiquiátricas. **Rev Bras Psiquiatr**, 26 (Supl I), 47-50, 2004.
- Mason BJ, Ownby RL. Treatment of alcohol-dependent outpatients with acamprosate: a clinical review. **Journal of Clinical Psychiatry**, 5(2):58-69, 2001.
- Mckenna DJ, Callaway JC, Grob CS. The scientific investigation of Ayahuasca: a review of past and current research. **The Heffter Review of Psychedelic Research**, 1 65-77, 1998.
- Mill DJ, Bito-Onon JJ, Simms JA, Li R, Bartlett SE. Fischer Rats Consume 20% Ethanol in a Long-Term Intermittent-Access Two-Bottle-Choice Paradigm. **Plos One**, 8(11):e79824, 2013.
- Morais, Juliana Alves de. Toxicidade aguda e crônica do chá ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*), por análise histológica em ratas wistar. 2014. xvii, 87 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília, 2014
- Moreau AW, Amar M, Le Roux N, Morel N, Fossier P. Serotonergic Fine-Tuning of the Excitation-Inhibition Balance in Rat Visual Cortical Networks. 20(2):456-67, 2010.
- Oliveira-Lima AJ, Santos R, Hollais AW, Gerardi-Junior CA, Baldaia MA, Wuo-Silva R, Yokoyama TS, Costa JL, Malpezzi-Marinho EL, Ribeiro-Barbosa PC, Berro LF, Frussa-Filho R, Marinho EA. Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. **Physiology & behavior**, 142:28-36. 2015.
- Pic-Taylor A, da Motta LG, de Morais JA, Junior WM, Santos Ade F, Campos LA, Mortari MR, von Zuben MV, Caldas ED. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. **Behavioural processes**, 118:102-10, 2015.
- Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J.
- Samson HH, Chappell A, Czachowski C, Sharpe A. Alcohol..Measuring ethanol-seeking behavior: the effect of using repeated extinction trials. **Alcohol**, (3):205-9, 2001.
- Schenberg EE, Alexandre JF, Filev R, Cravo AM, Sato JR, Muthukumaraswamy SD, Yonamine M, Waguespack M, Lomnicka I, Barker SA, da Silveira DX. Acute biphasic effects of ayahuasca. **PloS one**, 10(9):e0137202, 2015.
- Schuckit MA. Alcohol-use disorders. **The Lancet**, 373 (9662)492-501, 2009.
- Schulte T, Oberlin BG, Kareken DA, Marinkovic K, Müller-Oehring EM, Meyerhoff DJ, Tapert S. How acute and chronic alcohol consumption affects brain networks: insights from multimodal neuroimaging. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, (12):2017-27, 2012.
- Silva MTA, Guerra LGGC, Gonçalves FL, Garcia-Mijares M, Ghilardi HJ, Madi M, BBP,

- e Scoz MC .Análise funcional da dependência de drogas. **Sobre comportamento e cognição**, 422-442, 2001.
- Simms JA, Steensland P, Medina B, Abernathy KE, Chandler LJ, Wise R, Bartlett SE. Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long–Evans and Wistar rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 32(10):1816-23 2008.
- Soler J, Elices M, Franquesa A, Barker S, Friedlander P, Feilding A, Pascual JC, Riba J. Exploring the therapeutic potential of Ayahuasca: acute intake increases mindfulness-related capacities. **Psychopharmacology**, 233(5):823-9, 2016.
- Stahl SM, Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical application. **Cambridge university press**. 2ª edição ,415-420, 2000.
- Stuber GD, Hopf FW, Hahn J, Cho SL, Guillory A, Bonci A. Voluntary ethanol intake enhances excitatory synaptic strength in the ventral tegmental area. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 32(10):1714-20, 2008.
- Suyama, M. J.; Baltieri, D. A. Acamprosato-uma opção no tratamento do alcoolismo. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, 2(2):43-51, 2004.
- Swift, M.; Lewis, C. Farmacologia da dependência e abuso de drogas. Princípios da farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2ª edição, **Nova Guanabara**, 2009.
- Tomie A, Miller WC, Dranoff E, Pohorecky LA. Intermittent presentations of ethanol sipper tube induce ethanol drinking in rats. **Alcohol And Alcoholism**, 41(3):225-30, 2006.
- Tsai GE, Ragan P, Chang R, Chen S, Linnoila VM, Coyle JT. Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. **American Journal of Psychiatry**, 155(6):726-32 1998.
- Valle M, Maqueda AE, Rabella M, Rodríguez-Pujadas A, Antonijoan RM, Romero S, Alonso JF, Mañanas MÀ, Barker S, Friedlander P, Feilding A, Riba J.. Inhibition of alpha oscillations through serotonin-2A receptor activation underlies the visual effects of ayahuasca in humans. **European Neuropsychopharmacology**, 26(7):1161-75, 2016.
- Wang YH, Samoylenko V, Tekwani BL, Khan IA, Miller LS, Chaurasiya ND, Rahman MM, Tripathi LM, Khan SI, Joshi VC, Wigger FT, Muhammad IJ. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal of ethnopharmacology**, 128(3):662-71, 2010.
- Wise RA. Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. **Psychopharmacologia**, 29(3):203-10, 1973.

Wong DV, Ferreira JRDO, Fonteles MM, Viana, GS, Souza FC e Vasconcelos SM. Álcool e neurodesenvolvimento: aspectos genéticos e farmacológicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 5(1):16-31, 2008.

Zaleski M, Morato GS, Silva VAD e Lemos T. Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal syndrome. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 26:40-42 2004.

ANEXO – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



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

Brasília, 14 de agosto de 2014.



DECLARAÇÃO

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




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

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