

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de Mestrado

PERFIL COMPORTAMENTAL E TOXICOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE DEPENDÊNCIA QUÍMICA AO ETANOL TRATADOS COM
AYAHUASCA

PAULA POLVORA VICTORIA

Pelotas, 2017

PAULA POLVORA VICTORIA

PERFIL COMPORTAMENTAL E TOXICOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS
AO MODELO DE DEPENDÊNCIA QUÍMICA AO ETANOL TRATADOS COM
AYAHUASCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área de Concentração: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Prof^a Dr^a. Giana de Paula Cognato
Coorientador: Prof. Dr. Hudson W. de Carvalho

Pelotas

2017

Paula Polvora Victoria

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V642p Victoria, Paula Polvora

Perfil Comportamental e Toxicológico de Ratos
Submetidos ao Modelo de Dependência Química ao Etanol
Tratados com Ayahuasca / Paula Polvora Victoria ; Giana de
Paula Cognato, orientadora ; Hudson W. de Carvalho,
coorientador. — Pelotas, 2017.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências
Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade
Federal de Pelotas, 2017.

1. Ansiedade. 2. Ayahuasca. 3. Comportamento. 4.
Etanol. 5. Locomoção. I. Cognato, Giana de Paula, orient. II.
Carvalho, Hudson W. de, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

PERFIL COMPORTAMENTAL E TOXICOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE DEPENDÊNCIA QUÍMICA AO ETANOL TRATADOS COM
AYAHUASCA

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 23 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Giana Cognato

Prof.ª. Drª. Giana de Paula Cognato (orientadora). Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Francieli Moro Stefanello

Prof.ª. Drª. Francieli Moro Stefanello. Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Prof.ª. Drª. Gabriele Cordenonzi Ghisleni Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Conceito:

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Claudete e a meu saudoso pai, Paulo, os quais dedicaram suas vidas aos filhos, sempre nos mostrando que a maior herança que podiam nos legar era a educação. Em especial a meu pai o qual jamais mediu esforços para a formação dos filhos. Ao meu marido, Wagner Dieguez, pelo encorajamento e paciência nessa importante etapa da minha vida. Dedico, também, a todos aqueles que acreditaram em meu potencial. Dedico-lhes essa conquista com a mais pura gratidão.

“ O mal dos que estudam as superstições é não acreditarem nelas.
Isso os torna tão suspeitos para tratar do assunto como um biologista que não
acreditasse em micróbios. ”
(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sustento e referencial em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Giana de Paula Cognato, pela oportunidade de realizar o Mestrado, pelo suporte, paciência, compreensão e empenho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Hudson de Carvalho pela paciência, palavras de incentivo, tempo dispendido para ajudar-me a analisar os dados e também pelo paciente trabalho de revisão da minha redação.

A Capes pela bolsa de estudos concedida, sem a qual seria muito mais penoso o processo para efetivar meu mestrado.

Aos queridos IC's: Fernanda Gelati, Cid Farias e Juliane Porto, pela responsabilidade, dedicação e disposição para as longas jornadas de experimentos. Também ao querido Luann Bubols Silveira que, apesar da breve permanência no laboratório, não se tornou menos importante.

À querida IC Bruna Mattos por sempre socorrer-me nos momentos de sufoco com as louças, preparo de reagentes etc.

Aos colegas, funcionários e professores do Neurocan, do PPGBBio, do Laboratório de Frutas e Hortaliças, da Sala de Preparo e do Biotério Central. Em especial: colega Janaína Xavier, Profa. Dra. Roselia Spanevello; Prof. Dr. Wilson Cunico Filho; Profa. Dra. Giovana Gamaro; Prof. Dr. Luciano do Amarante; Profa. Dra. Rejane Tavares, Dra. Anelise Campelo Félix e a funcionária do Biotério Central Fabiane Chaves de Carvalho, sem os quais, em muitos momentos, não teríamos desde espaço físico, equipamentos, suporte técnico e insumos para realizar nossos experimentos.

A Profa. Dra. Izabel Cristina Custodio de Souza por utilizar do seu tempo precioso, com inestimável carinho e profissionalismo, tão importantes para que pudessem ser concretizadas as análises histológicas deste estudo.

Agradeço a Tia Maria Ceci Bretanha e “mana” Inês de Moraes Prado, heroínas sempre presentes, me concedendo o suporte e incentivo nos piores momentos de desânimo e cansaço.

Meus agradecimentos aos amigos Juliane Cardoso, Francine Darley, Kennia Galdino, Carlus Augusto Tavares do Couto e Nathalia Stark Pedra, colegas de mestrado com os quais sempre pude contar não apenas no contexto profissional, sendo, portanto, considerados irmãos na amizade e que certamente estarão presentes em meu coração por toda a minha vida.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta importante etapa, o meu muito obrigado.

RESUMO

VICTORIA, Paula Polvora. Perfil Comportamental e Toxicológico de Ratos Submetidos ao Modelo de Dependência Química ao Etanol Tratados com Ayahuasca. 2017. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação Em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.**

O alcoolismo gera prejuízos para indivíduos e sociedades, abrangendo setores como: saúde, economia; produtividade no trabalho; segurança pública etc. Segundo dados da OMS (2014) o Brasil está em 3º lugar no índice de mortalidade atribuível ao álcool entre homens (74 por 100 mil habitantes) e em 11º lugar entre mulheres (12 por 100 mil habitantes) e, apesar disso, o sistema biomédico tradicional ainda não dispõe de tratamentos eficazes para os transtornos do vício, contando somente com medidas paliativas. Diante deste cenário, o uso contemporâneo do Ayahuasca, a partir da década de 30, nos centros urbanos, passou a chamar a atenção da comunidade científica pelo seu potencial terapêutico nos transtornos de abuso de substâncias, principalmente o alcoolismo. Apesar disto, também se faz necessário um olhar científico atento para questões de ordem toxicológica quanto ao uso dessa bebida. A Ayahuasca consiste em uma bebida de origem xamânico-ameríndia, produto da decocção de duas plantas: o cipó *Banisteriopsis caapi* (contendo alcaloides indólicos β -carbolínicos- harmina, harmalina e tetrahidroharmina, os quais com apresentam atividade inibidora da monoaminoxidase -MAO – hepática e renal) e as folhas do arbusto *Psychotria viridis* (contendo o alcaloide psicodélico N, N-Dimetiltriptamina -DMT). Diante disto, o presente estudo objetivou validar um modelo de dependência química ao etanol em ratos Wistar machos adultos, caracterizar e quantificar os principais alcaloides psicoativos contidos em uma amostra de Ayahuasca e avaliar o potencial toxicológico do tratamento com Ayahuasca em ratos submetidos ao consumo crônico de etanol. Além disto, buscou-se avançar na fronteira do conhecimento quanto à atividade terapêutica, comportamental e toxicológica da Ayahuasca em modelo animal de consumo crônico de etanol. Ratos foram divididos em 4 grupos (n=5), e avaliados ao longo de 19 semanas consecutivas: CC (controles consumindo água); CA (controles consumindo água e tratados com Ayahuasca); EC (consumindo etanol e água); EA (consumindo etanol, água e tratados com Ayahuasca). Os dados gerados foram avaliados sob os seguintes aspectos: perfil de consumo de água e etanol; comportamento de locomoção e ansiedade; perfil toxicológico hepático através de análise histológica e determinação da atividade de biomarcadores sorológicos de dano hepático (AST e ALT); Análise de perfil de toxicidade renal através da dosagem sérica dos metabólitos ureia e creatinina. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao padrão de consumo de álcool ou quanto à atividade exploratória. No entanto, os animais do grupo que consumia apenas etanol apresentaram comportamento ansioso em relação aos demais. Além disto, este comportamento foi prevenido pelo tratamento com o Ayahuasca. Com relação às análises toxicológicas, foi verificado injúria tecidual nos animais submetidos ao modelo de dependência ao etanol, onde as lesões identificadas não

foram prevenidas pelo tratamento com Ayahuasca. Quanto à análise de biomarcadores de função hepática e renal, apenas o grupo que consumia etanol apresentou como alteração uma concentração sérica aumentada de uréia. Diante disso, conclui-se que o tratamento com Ayahuasca, não foi capaz de prevenir as alterações toxicológicas hepáticas induzidas pelo etanol, entretanto os resultados indicam que a Ayahuasca preveniu comportamento ansioso induzido pelo etanol.

Palavras-chave: ansiedade; Ayahuasca; comportamento; etanol; locomoção; toxicidade; Wistar machos.

ABSTRACT

VICTORIA, Paula Polvora. Behavioral and toxicological profile of rats submitted to the model of addiction to ethanol treated with Ayahuasca. 2017. **Dissertation (Master's Degree in Biochemistry and Bioprospecting). Programa de Pós-Graduação Em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.**

It is well known that alcohol addiction compromises individuals and societies in health, economic, public security, and labor sectors. According to WHO (2014) data, Brazil occupies the third position of mortality attributed to alcoholism between men (74/100,000) and the 11th position among women (12/100,000). The biomedical field does not have any efficient treatment against alcoholism, counting only with palliative measures. However, the use of Ayahuasca - a shamanic drink prepared with the use of two plants: Banisteriopsis caapi vine and Psychotria viridis leaves - from 1930 until today, has caught the scientific community attention due to its therapeutical potential to combat alcohol addiction. Hence, the aim of this study is to validate and ethanol chemical dependency model in male adult Wistar rats; characterize and quantify the main psychoactive alkaloids in an Ayahuasca sample; and evaluate the toxicological potential of Ayahuasca treatment in rats exposed to chronic ethanol consumption. The rats were divided into four groups: CC (controls consuming water), CA (controls consuming water and treated with Ayahuasca), EC (rats consuming ethanol and water), EA (rats consuming ethanol, water, and treated with Ayahuasca). Each group was composed by five animals and was evaluated during 19 consecutive weeks. Data was analyzed according to the water and ethanol consumption; locomotion and anxiety behavior; hepatic toxicological status; and renal toxicity status. It was not found statistically significant differences between groups according to alcohol consumption or exploratory activity. However, the rats from the group consuming only alcohol presented anxious behavior compared to rats from other groups, and the Ayahuasca was a protective factor to this behavior. It was verified tissue injury among rats exposed to ethanol dependency, the lesions were not protected by the Ayahuasca treatment. Regarding hepatic and renal function biomarkers, only the group consuming ethanol presented elevated serum urea concentration. We conclude that the treatment with Ayahuasca was not capable of preventing the toxicological and hepatic changes caused by ethanol. However, the Ayahuasca prevented the anxious behavior induced by ethanol.

Keywords: Anxiety; Ayahuasca; behavior; ethanol; locomotion; toxicity; Wistar; male rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Preparo do chá de Ayahuasca	19
Figura 2: <i>Psychotria viridis</i> (chacrona)	20
Figura 3: Cipó <i>Banisteriopsis caapi</i> (LIMA, 2009).....	21
Figura 4: Estrutura dos Principais alcaloides psicoativos da bebida Ayahuasca e sua semelhança estrutural com a serotonina.....	22
Figura 5: Metabolismo Hepático do Etanol.....	31
Figura 6: Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de ratos. Coloração HE.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima-A
ADH	Álcool-Desidrogenase
ALDH	Acetaldeído-Desidrogenase
ALT	Alanina-aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
<i>B. caapi</i>	<i>Banisteriopsis caapi</i>
CKD/ IRC	<i>Chronic Kidney Disease</i> / Insuficiência Renal Crônica
CONAD	Conselho Nacional Antidrogas
CYP-450	Citocromo P-450
<i>D.cabreraana</i>	<i>Diplopterys cabrerana</i>
DL ₅₀	Dose letal mediana
DMT	N, N-Dimetiltriptamina
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i> / Labirinto em Cruz Elevado
EURL	European Union Reference Laboratories
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FAL	Fosfatase alcalina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GGT	Gama-glutamyl-transpeptidase ou Gama-glutamyl transferase
GSSG	Glutationa oxidada
GSH	Glutationa reduzida
HE	Hematoxilina e Eosina
HRL	Harmalina
HRM	Harmina
5-HT	5 - Hidroxitriptamina (Serotonina)
ICH	Conferência Internacional em Harmonização
ISRS	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
MAO	Monoamina oxidase
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OF	<i>Open Field</i> / Campo Aberto
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. viridis</i>	<i>Psychotria viridis</i>
RAM	<i>Radial Arm Maze</i> / Labirinto Radial
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
TGI	Trato Gastrointestinal
THH	Tetrahidroharmalina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UV	Radiação Ultravioleta
UDV	União do Vegetal

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Objetivos	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos.....	18
3. Referencial teórico	19
Ayahuasca: histórico e contextualização	19
Variabilidade de concentração dos principais alcaloides psicoativos da ayahuasca	22
Farmacologia e utilidade clínica da Ayahuasca em transtornos psiquiátricos	23
Ayahuasca como possibilidade alternativa no tratamento da dependência química	24
Potencial Toxicológico do Ayahuasca	27
Etanol	29
Alterações em Biomarcadores de Função Hepática e Renal	32
Alterações Histológicas Hepáticas	34
Estudos comportamentais em animais.....	35
4. Manuscrito	38
5. Considerações Finais.....	68
6. Referências	69
7. Obras Consultadas.....	76
8.	Anexo
.....	77

PARTE II

1. Introdução

O abuso e a dependência de substâncias são problemas centrais da contemporaneidade que afetam indivíduos e sociedades em dimensões importantes relacionadas à saúde, produtividade no trabalho, economia, educação, segurança pública e direito penal. A substância de abuso mais consumida é o álcool, estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) mensuram 3.3 milhões de mortes, no mundo, ao ano, ocasionadas pelo uso indevido do álcool. Além disto, o alcoolismo é fator causal de mais de 200 tipos de doenças. Outra estimativa é o fato de que, o consumo indevido de bebidas alcoólicas é causa *mortis* e incapacitante em períodos relativamente precoces na vida de indivíduos, ou seja, geralmente afeta a faixa etária dos 20 aos 39 anos onde aproximadamente 25% do total de óbitos são atribuíveis ao uso abusivo do álcool. O alcoolismo está relacionado à causa de uma série de distúrbios mentais e comportamentais além de outros comprometimentos à saúde humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). No Brasil estima-se que que 29.9% da população masculina adulta e 9.3% da população feminina adulta apresentam critérios para abuso ou dependência de álcool em algum momento da vida (REISDORFER et al., 2012).

Os tratamentos disponíveis pelo sistema biomédico tradicional para transtornos relacionados ao uso abusivo de álcool (e de outras substâncias) se mostram pouco efetivos e apenas de caráter paliativo (HEILIG et al., 2011). Entretanto, evidências preliminares indicam que usuários de álcool e de outras drogas que buscam superar a dependência junto a grupos xamânicos que utilizam Ayahuasca em seus rituais apresentam melhora dos sintomas de abstinência (LOIZAGA-VELDER; VERRES, 2014; THOMAS et al., 2013). Entre os estudos clínicos envolvendo possíveis métodos terapêuticos emergentes no tratamento de dependência química, em especial ao alcoolismo, se encontra a utilização da de Ayahuasca (WINKELMAN, 2014). Esta bebida consiste da infusão do cipó *Banisteriopsis caapi* (B. caapi), o qual contém alcaloides β -carbolínicos inibidores da monoaminoxidase hepática e gástrica (MAO) com as seguintes plantas que contém N,N-dimetiltriptamina (DMT): folhas do arbusto *Psychotria viridis* (P. viridis), o qual também pode ser substituído pelas da liana *Diplopterys cabrerana* (D. cabrerana) (DOS SANTOS, 2013), ou, ainda, da *Psychotria carthagenensis* (MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a) dependendo do grupo onde o ritual é realizado.

Desde o início da década de 1980, o uso religioso da Ayahuasca tem avançado sobre diferentes regiões do Brasil e do mundo, concentrando-se principalmente em grandes centros urbanos (MCKENNA, 2004). A partir de 1992, o uso desta substância para fins religiosos foi legalizado pelo governo brasileiro e, anos mais tarde, atitudes semelhantes foram tomadas pela união europeia e pela corte suprema dos Estados Unidos da América (REGINATO, 2010). Estudos de orientação etnográfica e neurocientífica tem apontado o potencial terapêutico e neuroprotetor relacionado ao uso de Ayahuasca em diversos contextos desde doenças neurodegenerativas até transtornos de adicção (MCKENNA, 2004). Estudos clínicos tem demonstrado que usuários de álcool e outras drogas de abuso, em busca de superação da dependência, apresentaram melhora nos sintomas de abstinência, e, dessa forma uma maior tolerabilidade ao período de desintoxicação além de relatarem mudanças intrapessoais onde a visão quanto ao uso e abuso de substâncias parece ser modificada, ou seja, em contexto terapêutico ocorreram correções de distorções cognitivas relativas ao uso e abuso de substâncias (LOIZAGA,2014;THOMAS,2013;WINKELMAN,2014).Todavia, ainda há escassez de estudos de caráter toxicológico relacionados à utilização da Ayahuasca.

2. Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação é caracterizar o perfil comportamental e toxicidade da Ayahuasca em modelo animal de consumo crônico de etanol.

Objetivos específicos

- a) Caracterizar e quantificar os principais alcaloides psicoativos presentes na Ayahuasca.
- b) Caracterizar o modelo de dependência química alcoólica através de análises de consumo de etanol e de testes comportamentais de locomoção e ansiedade.
- c) Avaliar, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade do tratamento com Etanol e Ayahuasca através da determinação de parâmetros bioquímicos séricos de função hepática (AST e ALT), renal (ureia e creatinina) e, ainda, investigação histopatológica hepática.

3. Referencial teórico

Ayahuasca: histórico e contextualização

Evidências arqueológicas indicam que a Ayahuasca, bebida psicodélica originalmente utilizada para práticas xamânicas e etnomédicas por povos nativos da Bacia Amazônica, remonta ao ano 1.200 a.C. O uso ritualístico original desta preparação atuaria como ferramenta para Xamãs exercerem suas práticas de curandeirismo, iniciações, adivinho, bem como meio de indução ao autoconhecimento e conexão com a espiritualidade. O termo Ayahuasca, oriundo da língua quéchua ameríndia, pode ser transliterado para o idioma português como “vinho das almas”, em virtude do caráter espiritual que representa. Além disto, a palavra Ayahuasca também é utilizada pelos aborígenes para nomear o cipó *B.caapi*, um dos constituintes da bebida (LABATE; ARAÚJO, 2002).



Figura 1: Preparo do chá de Ayahuasca. Fonte: <http://chasbrasil.com/cha-ayahuasca/>

O chá de Ayahuasca é produto da decocção de duas plantas nativas da Amazônia, as quais exercem ação sinérgica, permitindo assim o efeito alucinógeno da bebida: o cipó *B.caapi* - que contém alcaloides β -carbólicos com ação inibidora

reversível da MAO periférica e central (MCKENNA; RIBA, 2015), e as folhas do arbusto *P. viridis* (GATES, 1979), a qual também pode ser substituído pela Liana *D. Cabrerana* (DOS SANTOS, 2013), cujo componente psicoativo com atividade alucinógena é o alcaloide indólico N,N-Dimetiltriptamina (DMT) (REGINATO, 2010). O DMT, inativo pela via oral, apresenta semelhança estrutural ao neurotransmissor serotonina (5-HT). A inativação do DMT quando ingerido oralmente se deve à sua metabolização pela enzima monoaminoxidase (MAO) hepática e gastrintestinal antes de atingir a circulação sistêmica e exercer seu efeito no sistema nervoso central (SNC) (DOS SANTOS, 2013; SIMÕES; MARIOT, 2003).



Figura 2: Psychotria viridis (chacrona); Fonte:

<http://www.aldeiadeshiva.org/medicinas/ayahuaska.html>



Figura 3: Cipó *Banisteriopsis caapi* (LIMA, 2009). Fonte: <http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/7/624-102.html>.

No entanto, o cipó *B. caapi* contém alcaloides β - carbolínicos capazes de exercerem inibição reversível da enzima MAO, permitindo dessa forma que o DMT atinja o SNC e exerça seu efeito psicogênico. Os principais alcaloides β - carbolínicos presentes no cipó *B. caapi* são Harmina (HRM), Harmalina (HRL) e Tetrahydroharmina (THH). Curiosamente, os praticantes xamânicos ancestrais já possuíam o conhecimento da eficácia psicogênica da associação das duas plantas no preparo do chá. (MCKENNA; RIBA, 2015; PIRES; OLIVEIRA; YONAMINE, 2010; SMITH, 1977).

Para as religiões ayahuasqueiras, o chá de Ayahuasca não é considerado psicodélico, e sim uma substância enteógena, ou seja, uma “planta de poder”, aquela que apresenta poderes míticos e religioso que ao alterar a consciência possibilita um contato privilegiado com o “divino” (WINKELMAN, 2014). O alcaloide DMT é uma das substâncias pertencentes à lista I de substâncias proscritas internacionalmente constantes do Protocolo Internacional de Substâncias Psicotrópicas oficializado em Viena no ano de 1971. Sendo assim, a partir do momento em que seu uso atingiu a urbanidade ao longo do século XX, a conclusão de decretos regulatórios referentes à legalidade do uso religioso do chá fora do território nativo prolongou-se por aproximadamente 25 anos (LABATE; FEENEY, 2012). Por outro lado, o advento contemporâneo do uso urbano da Ayahuasca,

facilitou seu acesso por parte da comunidade científica gerando indagações sobre aspectos médicos e psicológicos do uso da bebida, incluindo questionamentos sobre sua utilidade clínica, caracterização, toxicidade e mecanismo de ação (MCKENNA, 2004; MCKENNA; RIBA, 2015).

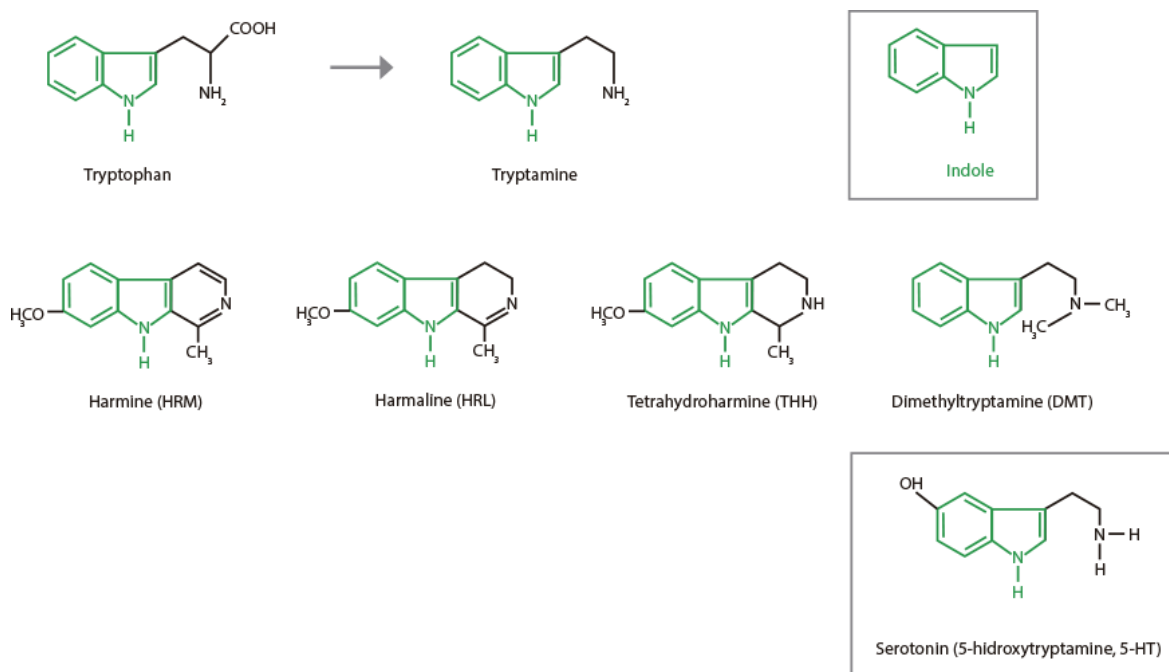


Figura 4: Estrutura dos Principais alcaloides psicoativos da bebida Ayahuasca e sua semelhança estrutural com a serotonina; Fonte: Figura adaptada de Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5^o ed.: Figura 7 pg. 943

Variabilidade de Concentração dos Principais Alcaloides Psicoativos da Ayahuasca

Análises de caracterização dos principais alcaloides de Ayahuasca mostram diferentes concentrações em virtude da variabilidade de lotes, local do plantio, sazonalidade, forma de preparo da bebida, bem como das proporções de plantas utilizadas na decocção (MCKENNA, 2004). Cabe salientar que diferentes grupos sincréticos religiosos e diferentes culturas xamânicas Ayahuasqueiras apresentam variações na preparação da infusão de Ayahuasca, onde algumas plantas podem ser adicionadas ou substituídas por outras da mesma espécie ou que contenham os mesmos alcaloides psicoativos, por exemplo a combinação da *B. caapi* com a

Banisteriopsis inebrians (SCHULTES; HOFMANN; RÄTSCH, 2000), e a substituição do arbusto *P. viridis* (chacrona) por *Psychotria carthagenensis* e *Diplopterys cabrerana*. Há, todavia, controvérsias em relação a presença de alcaloides psicoativos nesta última (LEAL; ELISABETSKY, 1996).

Diversas tribos indígenas que utilizam Ayahuasca podem adicionar outras plantas à preparação, além das tradicionais *P. viridis* e *B. caapi*, desde ingredientes sem atividade psicoativa até psicoestimulantes como cafeína (*Illex guayusa*, *Paullinia voco*), Cocaína (*Erythroxylum coca*) e nicotina (*Nicotiana spp.*). Além disso, a preparação pode conter Escopolamina com ação anticolinérgica-delirante (*Brugmansia spp.*) (DOS SANTOS, 2013; RAFAEL GUIMARÃES DOS SANTOS, 2012; RIBA et al., 2003).

Além disto, existem diferentes graduações da bebida oriundas do número de fervuras que as plantas são submetidas. Por exemplo, o grau G corresponde ao preparo da primeira decocção, enquanto o 2G seria o resultado de uma segunda fervura do grau G, onde a perda de água concentraria maior quantidade de farmacógenos. Já a Graduação Mel sofre dez decocções consecutivas, sendo, portanto, a de maior concentração de constituintes psicoativos em relação a primeira decocção (LABATE; ARAÚJO, 2002). A concentração dos alcaloides psicoativos da Ayahuasca apresentam variabilidade entre 0,05% e 1,95% em peso seco (MCKENNA, 2004; MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a).

A variabilidade encontrada nas concentrações dos principais alcaloides psicoativos da bebida se deve a diversos interferentes. Além da forma de preparo, fatores como sazonalidade (a composição dos constituintes ativos sofre variações conforme a época do ano da colheita), técnicas de colheita e armazenamento. Além disto, os principais compostos psicoativos da Ayahuasca são derivados do metabolismo secundário de suas principais plantas constituintes e, portanto, a produção destes está submetida também às características do solo de plantio (pH, composição, teor hídrico etc.), índices de radiação UV (ultravioleta) que incidem sobre o solo de cultivo e sobre as plantas cultivadas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Farmacologia e utilidade clínica da Ayahuasca em transtornos psiquiátricos

Estudos demonstraram que os alcaloides β -carbolínicos harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetrahidroharmina (THH) presentes no chá de Ayahuasca

permitem a ação psicogênica oral da bebida por impedir a degradação do DMT pela MAO (MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a). Curiosamente, estes alcaloides apresentam maior afinidade inibitória sobre a MAO-A, subtipo da MAO que exerce importante ação de degradação da serotonina quando comparada a MAO-B. Além disso, estudos evidenciam que a THH, além de prolongar a meia-vida do DMT pela inibição da MAO, também bloqueia seletivamente a recaptação de serotonina de forma a impedir o principal mecanismo de término da sinalização serotoninérgica a nível de SNC (MCKENNA, 2004). É importante salientar que o alcaloide β -carbolínico HRM tem ação inibidora específica e reversível da MAO-A, enzima envolvida no metabolismo dos neurotransmissores serotonina, norepinefrina e dopamina, além do DMT. A HRM também atua a nível de SNC como agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A-2C-1A}, em regiões cerebrais como o córtex frontal e região paralímbica (MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a; RAFAEL GUIMARÃES DOS SANTOS, 2012; RIBA et al., 2003; SMITH et al., 1998). Desta forma, a bebida parece exercer múltiplas ações potencializadoras da sinalização serotoninérgica. Além disto, estudos demonstram que a sinalização de receptores 5-HT a nível de SNC exerce ação modulatória sobre outros sistemas de neurotransmissores cuja disfunção, segundo a hipótese monoaminérgica, relaciona-se a uma série de transtornos neuropsiquiátricos como os do humor, de ansiedade, aditivos e outros (MCKENNA, 2004). Nos transtornos de adicção, a depleção nos níveis de serotonina parece estar relacionada tanto com a motivação para o uso e abuso de substâncias quanto com o comportamento de busca compulsiva de substâncias em indivíduos em abstinência. Sendo assim, devido a sua ação sobre a sinalização serotoninérgica, a Ayahuasca parece contribuir com a tolerância aos períodos de abstinência em indivíduos motivados a tratá-la (WINKELMAN, 2014).

Ayahuasca como possibilidade alternativa no tratamento da dependência química

O abuso e a dependência de substâncias são problemas centrais da contemporaneidade que afetam indivíduos e sociedades em dimensões importantes relacionadas à saúde, educação, produtividade no trabalho, seguridade pública e direito penal. A substância de abuso mais consumida é o álcool: estimativas da Organização Mundial de Saúde preveem que 76.3 milhões de pessoas no mundo apresentam transtornos relacionados ao uso nocivo de álcool (WORLD HEALTH

ORGANIZATION, 2014), enquanto dados nacionais estimam que 29.9% da população masculina adulta e 9.3% da população feminina adulta apresentam critérios para abuso ou dependência de álcool (REISDORFER et al., 2012). Além disto, a Síndrome de Abstinência Alcoólica, sem tratamento, pode levar a morte em até 50% dos casos (ROTELLA et al., 2016). Vários estudos demonstram que até o presente momento, dispomos apenas de tratamentos paliativos para tratar a dependência química e, sendo assim, na ausência de tratamentos realmente efetivos, a probabilidade de recaídas, mesmo após anos de abstinência, persiste por toda a vida do indivíduo. Diante disso, evidências científicas mostram que o uso da Ayahuasca em contexto xamânico e terapêutico tem demonstrado melhoras significativas nos transtornos de adicção, especialmente ao etanol (WINKELMAN, 2014). Aparentemente a melhora se deve ao efeito “after-glow”, o qual torna possível para o indivíduo dependente permanecer livre de substâncias de abuso por períodos de vários dias ou até meses após a administração de uma única dose de Ayahuasca, o qual traduz-se no aumento do bem-estar e provavelmente no aumento da tolerabilidade aos períodos de abstinência. Durante essa fase, relatos clínicos de assistência terapêutica com Ayahuasca aliada a outras técnicas psicoterapêuticas, o indivíduo gradualmente vai adquirindo uma reformulação significativa tanto no âmbito intrapessoal quanto extra pessoal. Tal efeito parece ser parcialmente oriundo da regulação da circuitaria serotoninérgica que se encontrava deprimida nos indivíduos portadores de transtornos aditivos e, que por sua vez, fornece uma atividade modulatória de outros sistemas neurotransmissores também prejudicados nos transtornos relacionados à dependência de substâncias (WINKELMAN, 2014).

Apesar da carência de estudos clínicos substanciais de caráter duplo-cego, podemos citar evidências de efetividade terapêutica nos transtornos do vício em centros de tratamento que utilizam a bebida Ayahuasca aliada a outras plantas medicinais, dietas e procedimentos psicoterapêuticos para toxicômanos.

Segundo inúmeros autores, a bebida Ayahuasca utilizada em contexto xamânico-terapêutico afetaria de modo favorável o humor e reduziria a ansiedade, a agressividade, as compulsões e melhoraria a tolerabilidade aos períodos de abstinência de substâncias de abuso, de forma a ser uma forte candidata ao tratamento de pacientes em processo terapêutico de superação da dependência por substâncias de abuso (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; NUNES et al., 2016; SOLER et al., 2016; WINKELMAN, 2014). Um desses estudos, em camundongos,

mostrou que a bebida, além de prevenir comportamentos de sensibilização comportamental ao vício, também que preveniu o comportamento de recaída, mostrando-se efetiva na reversão de efeitos a longo prazo da dependência ao etanol (OLIVEIRA-LIMA et al., 2015). Segundo Winkelman (2014), o efeito terapêutico da bebida ayahuasca estaria relacionado ao que ele denomina como “Psicointegração”. Este seria um processo no qual o tanto o cérebro quando a mente passariam por um momento de equalização de suas unidades funcionais: promovendo uma regulação tanto das funções psicológicas básicas quanto de seus substratos físico-químicos (WINKELMAN, 2014).

A redução de sintomas de síndrome de abstinência, assim como o controle de comportamentos compulsivos, regulação do humor e controle da agressividade pode ser em grande medida devida a ação farmacológica psicoativa dos principais alcaloides encontrados no Ayahuasca. O alcaloide DMT, semelhante estruturalmente ao neurotransmissor 5-HT é o responsável pelo efeito alucinógeno da bebida e apresenta ação agonista dos receptores 5-HT serotoninérgicos (MCKENNA, 2004), os quais apresentam importantes papéis nos mecanismos de regulação do humor, emoção, ansiedade, dentre outros (KAPCZINSKI; QUEVEDO; IZQUIERDO, 2011). Além disto, os alcaloides β -carbolínicos promovem inibição reversível da enzima MAO, reduzindo assim a capacidade de inativação por desaminação dos neurotransmissores noradrenalina e serotonina, e em menor proporção da dopamina, bem como promovem o aumento da biodisponibilidade do DMT.

Adicionalmente, a β -carbolina THH, além da ação inibidora da MAO, também inibe a recaptação de serotonina na fenda sináptica (MCKENNA, 2004; MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984b). Sendo assim, a ação conjunta dos alcaloides da Ayahuasca promove agonismo serotoninérgico e elevação nos níveis dos neurotransmissores noradrenalina, serotonina e dopamina na fenda sináptica (CALLAWAY et al., 1999; MCKENNA; CALLAWAY; GROB, 1998). A serotonina apresenta importante papel na regulação de funções cerebrais atuando como neurotransmissor e neuromodulador. O déficit serotoninérgico relaciona-se a fisiopatologia de diversos transtornos psiquiátricos como depressão, ansiedade, adicção dentre outros. O subtipo de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2c} estão amplamente expressos no SNC os quais atuam de forma a modular o sistema de neurotransmissão dopaminérgica e, desta forma, tal receptor tem sido considerados

alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos que visam tratar doenças de cunho neuropsiquiátrico por disfunções dopaminérgicas, incluindo a drogadição (KAPCZINSKI; QUEVEDO; IZQUIERDO, 2011).

Potencial toxicológico do Ayahuasca

Diversos estudos já abordaram a bebida Ayahuasca como potencial alternativo terapêutico para inúmeras patologias incluindo a adicção, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson e até mesmo para determinados tipos de câncer (PASSOS et al., 2013; SAMOYLENKO et al., 2010; SCHENBERG, 2013; SCHWARZ et al., 2003), todavia sua potência toxicológica deve ser investigada (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014) uma vez que estudos pré-clínicos de toxicidade e segurança, determinação de dosagens terapêuticas e possíveis interações com fármacos e alimentos, ainda são escassos. Na atualidade, o uso da bebida atravessou a fronteira do xamanismo e religiosidade e atingiu a urbanidade, passando a ser utilizada também recreacionalmente como substância de abuso, para alterar a consciência, de forma irresponsável. Tal fato se deve em grande parte à facilidade de aquisição da bebida através do turismo e do comércio via internet (MCKENNA, 2004; MORAES, 2014). A dose usual administradas em cultos na UDV corresponde a 150mL para um indivíduo de 70kg (MORAES, 2014), no entanto não há padronização das dosagens dos alcaloides psicoativos. Além disso, com o uso generalizado de ISRS pela população (Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina) para tratamento de transtornos depressivos, na atualidade, existe a preocupação por parte dos profissionais da saúde quanto a possíveis interações graves desses medicamentos com a Ayahuasca, bebida de ação altamente serotoninérgica e, portanto, candidata ao desencadeamento de Síndrome Serotoninérgica por interação medicamentosa nesses indivíduos. Além disso, em função dos metabólitos ativos dos antidepressivos ISRS apresentarem meia vida longa, podem desencadear interações graves com a Ayahuasca mesmo após semanas da cessação do tratamento medicamentoso (CALLAWAY et al., 1996; COPLAN; GORMAN, 1993).

Além disso, qualquer substância capaz de gerar disfunção no funcionamento normal do Sistema Nervoso (SN) de forma causar injúria tecidual é considerada uma substância Neurotóxica. Tais lesões, quando a nível de SNC podem impactar negativamente as características funcionais de importantes regiões do organismo resultantes de morte neuronal como: déficits motores, cognitivos, dentre outros, segundo as regiões cerebrais atingidas (PULSINELLI, 1992)

Estudos pré-clínicos que administraram doses semelhantes as utilizadas nas cerimônias ayahuasqueiras podem ser de grande importância para avaliar a presença ou não de potencial tóxico no uso crônico da bebida. Um estudo prévio com administração da dose ritualística de 100ml/kg a ratos Wistar machos hipertensos concluiu que, apesar de alterações histológicas de ordem hepática e renal terem sido sugestivas, não houveram diferenças relevantes entre os grupos tratados com ingestão crônica semanal e ingestão diária por um período de 60 dias (SANTOS et al., 2013). Outro estudo realizado segundo o Protocolo OECD 423 determinou que a DL50 oral da bebida, administrada a ratas Wistar, equivaleria a 50 vezes a dose administrada em humanos no contexto ritualístico da UDV (MORAES, 2014).

Outro estudo demonstrou a presença de DMT em sangue e urina humanos, inferindo a produção endógena desses compostos (FRANZEN; GROSS, 1965) e, além disso, estudos de Jacob e Presti (2005), constataram a presença de altas concentrações de DMT na urina de portadores de esquizofrenia (JACOB; PRESTI, 2005). Além disso, outros autores relatam neurotoxicidade de compostos β -carbolínicos em camundongos, justificando o fato através de dano mitocondrial (CHEN et al., 2005), indução de apoptose neuronal induzida por HRM através da ativação da caspase-3 (MIWA et al., 2006), onde os animais apresentavam sinais como tremores e contraturas musculares após exposição a β -carbolinas.

Por outro lado, um estudo mostrou que a dose de 500mg/kg, do chá de Ayahuasca, em ratos, não produziu danos neurológicos e sim efeitos centrais similares aos produzidos por outras drogas serotoninérgicas (LABATE; ARAÚJO, 2002). Outro estudo demonstrou que a exposição à ayahuasca em volume de 1,43 ml/kg (volume correspondente a uma dose ritualística de 100ml para 70kg de peso corporal humano) em ratas Wistar prenhes desde o 6º dia de gestação até o 10º dia de lactação não causou na prole alterações significativas do ponto de vista comportamental, físico ou reflexológico. Todavia, os mesmos animais, ao atingirem a

idade adulta (60 dias), foram reavaliados sob os mesmos parâmetros demonstrando diminuição nos níveis de ansiedade com aumento no número de entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze), diminuição no tempo total no teste de interação social, diminuição no tempo de latência para começar a nadar. Por outro lado, apresentaram menor limiar convulsivante tanto quanto à iniciação como ao término da convulsão (OLIVEIRA et al., 2011).

Um estudo de Moraes (2014) quanto à Toxicidade Aguda, seguindo o protocolo OECD 423, demonstrou que a dose letal aguda (DL50) da bebida, em ratas Wistar é superior a 50 X a dose ritualística utilizada na UDV, inferindo baixa toxicidade oral. No mesmo estudo, foi feita a avaliação de toxicidade crônica onde 125 ratas prenhes foram submetidas a administração oral, por gavagem, de diferentes doses de Ayahuasca da seguinte forma: 125 ratas prenhes foram subdivididas em 5 grupos (n=25) assim sendo: grupo controle (recebendo gavagem de apenas água) e mais 4 grupos recebendo doses correspondentes a (1 ; 2; 4 e 8 X) a dose ritualística, num volume de gavagem correspondendo a 2ml, e cujo tratamento iniciou no 60 dia de gestação e findou no 200 dia de gestação. Durante esse período houveram 24 óbitos dos animais cujos grupos correspondiam às doses mais altas de forma a caracterizar toxicidade materna nas doses em questão. Sinais clínicos de toxicidade que precederam os óbitos foram relatados como tremores, cromodaciorréia, piloereção, lordose, cianose e convulsão.

No mesmo estudo, foram feitas análises histológicas do fígado e rins dos animais eutanasiados no 140 dia após o tratamento com o chá de Ayahuasca, em doses 50X superiores à ritualística da UDV. Os cortes, previamente corados com HE foram analisados por microscopia óptica e mostraram alterações inferiores a 25% do campo analisado, sendo considerados pela autora como alterações de intensidade leve (MORAES, 2014).

Etanol

Dentre as respostas mais preocupantes no que concerne à toxicidade de determinadas substâncias estão as que incorrem em dano hepático e renal, onde pode-se observar danos irreversíveis como o surgimento de cirrose hepática, insuficiência renal e até mesmo câncer. Além disto, disfunções hepática e renal promovidas pelo uso abusivo de etanol repercute no funcionamento global do

organismo visto a importância vital destes órgãos. Já estão bem documentados os prejuízos provocados pelo uso crônico de etanol, comprometendo sistemas fisiológicos saudáveis, e constituindo fator de agravo em estados patológicos já instaurados (GRAMENZI et al., 2006; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; SCHAEFFNER et al., 2005).

Os rins são os principais órgãos do sistema urinário que, além de importantes funções de ordem endócrina, apresentam outras duas funções, não menos consideráveis, de manutenção e recuperação da homeostasia dos líquidos corporais (Osmolaridade) através dos mecanismos de filtração, reabsorção e excreção de eletrólitos; eliminação de toxinas provenientes da ingestão de xenobióticos e seus metabólitos e produtos do metabolismo orgânico como uréia, creatinina e ácido úrico. (FILHO, 2016; GUYTON, 2008; SCHAEFFNER; RITZ, 2012).

Para avaliação de função renal a dosagem sérica de creatinina é o biomarcador mais utilizado considerando que atua como indicador da taxa de filtração glomerular, pois, se houver um aumento na taxa de creatinina sérica acima da normalidade significa que sua excreção urinária, função renal, está sendo insuficiente para compensar sua síntese uma vez que o organismo não é capaz de reabsorvê-la pelos túbulos renais (GEORGE et al., 2017). Outro biomarcador, o qual só é válido para avaliação de função renal quando apresenta alterações juntamente com as concentrações séricas de creatinina é a uréia. A uréia não é um específico marcador de função renal uma vez que é produzido no fígado, através do ciclo da uréia para que a amônia (produto do catabolismo de aminoácidos) onde a amônia (tóxica para o organismo) necessita ser biotransformada em uréia para ser então eliminada pela via renal, através da urina. Sendo assim, aumentos na dosagem de uréia sérica sem alterações nas concentrações sanguíneas de creatinina atuaria principalmente como preditivo de desordens hepáticas (TÚRMINA, 2012).

O consumo crônico e excessivo de bebidas alcoólicas contribui para a fisiopatologia desordens por toxicidade hepática aguda, como a Hepatite Alcoólica bem como por toxicidade por consumo crônico onde os danos hepáticos podem ser manifestados progressivamente nas formas de: esteatose, esteato-hepatite, fibrose e cirrose (BRUHA; DVORAK; PETRTYL, 2012; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). Dentre os principais agentes nocivos provenientes do consumo de etanol são

os seus metabólitos onde três enzimas hepáticas atuam na sua oxidação : a álcool desidrogenase (ADH), o complexo enzimático- citocromo P-450 e a catalase.

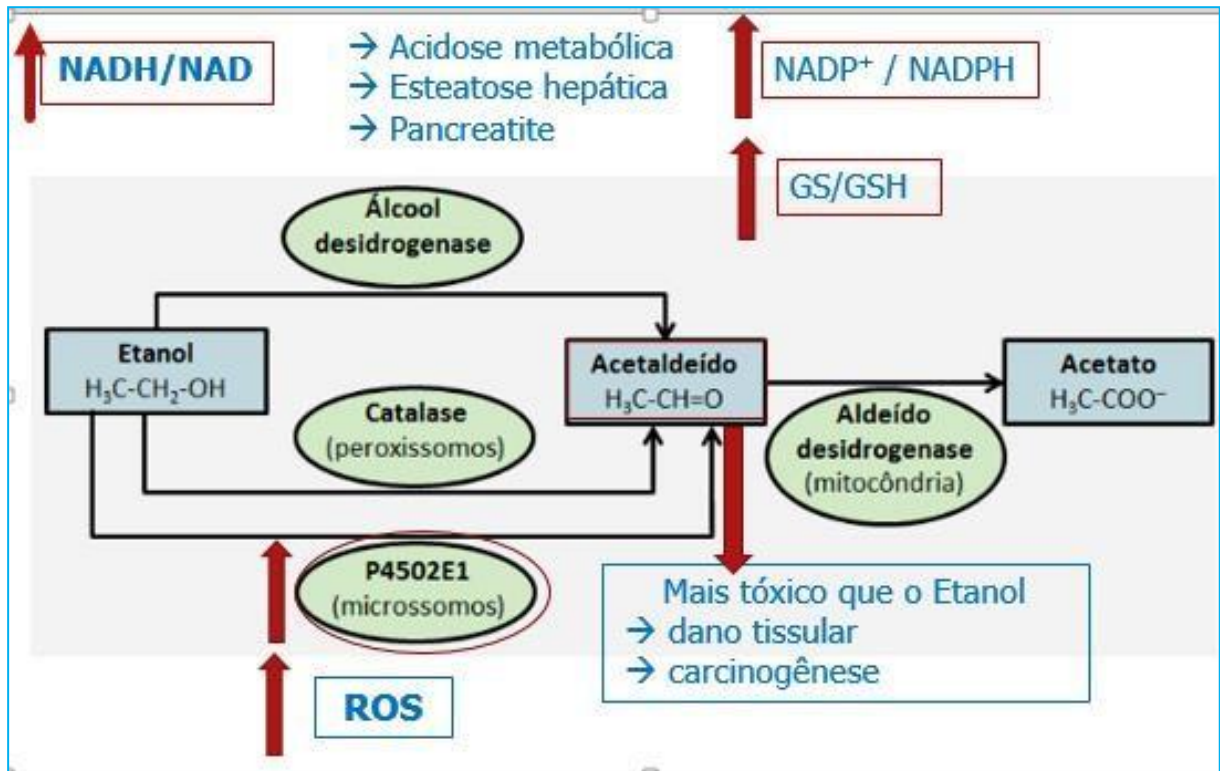


Figura 5: Metabolismo Hepático do Etanol;

Fonte adaptada de: <http://www.cisa.org.br/artigo/5536/metabolismo-alcool.php>

O metabólito acetaldeído é mais tóxico que o etanol e é amplamente distribuído por todo o organismo, não restringindo o dano tissular apenas ao tecido hepático. Além disso, sua produção pela enzima ADH gera um balanço positivo de NADH o que interfere negativamente na beta oxidação de ácidos graxos estando, portanto, relacionado à esteatose hepática e pancreatite. O sistema microsomal hepático também está envolvido na oxidação do etanol a acetaldeído além da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Adicionalmente, em função da alta especificidade da CYP2E1 e sua alta expressão em usuários crônicos de etanol, a produção de acetaldeído supera a capacidade de sua metabolização pela ALD, de forma a agravar o dano hepatocelular e sistêmico (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). O metabolismo alcoólico por meio da CYP2E1, apresenta o agravante de gerar estresse oxidativo aliado a baixa oferta de antioxidantes aos hepatócitos. Desta forma, espécies reativas de oxigênio são capazes de gerar lesão tecidual por

peroxidação lipídica de membranas e, assim, ativar fatores de transcrição que promovam desequilíbrio nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (BRUHA; DVORAK; PETRTYL, 2012; BUCHO, 2012), principalmente o fator de necrose tumoral (TNF- α) (BRUHA; DVORAK; PETRTYL, 2012).

A catalase, por sua vez, contribui normalmente com até 10% no processo de biotransformação do etanol, no interior dos peroxissomos a qual detoxifica o H_2O_2 formando água. (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). No caso de alcoolistas, ocorre um aumento no metabolismo do etanol pelos peroxissomos.

A esteato-hepatite alcoólica manifesta-se tardiamente quando alterações silenciosas de ordem anatomo-morfológicas já se encontram em curso há longo tempo. Sendo a inativação do metabólito tóxico acetaldeído dependente de sua oxidação pela enzima aldeído desidrogenase (ALD), a atividade desta é fator determinante de resistência a danos alcoólicos e variável de indivíduo para indivíduo (FILHO, 2016).

Alterações em Biomarcadores de Função Hepática e Renal

As determinações da atividade de enzimas predominantes no interior do hepatócito em relação a sua atividade no soro são auxiliares para diagnóstico de dano hepatocelular. Desta forma, o aumento das atividades séricas de enzimas fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) podem inferir sobre alterações dos hepatócitos relativas a desordens hepatocelulares ou morte celular. O uso crônico de etanol é fator chave para a fisiopatologia de doenças hepáticas tóxicas as quais também comprometem de forma importante o processo regenerativo do tecido hepático (MANI et al., 2016).

Kamoun et al. (2016), administrou a ratos Wistar machos e adultos, durante 15 dias consecutivos a dose de 3g/kg de etanol e comparou parâmetros de função hepática, estresse oxidativo e função renal após este tratamento, contra o grupo controle. Este estudo demonstrou que o tratamento com etanol promoveu aumento percentual nas atividades dos seguintes biomarcadores de função hepática: AST, 75%; ALT, 59%; FAL, 48% e GGT, 31% em relação ao grupo controle, sendo,

portanto, indicativos de hepatotoxicidade alcoólica. Adicionalmente, danos oxidativos por peroxidação lipídica significativos nos tecidos hepático e renal dos animais que receberam etanol, nas magnitudes de 25% e 75%, foram observados quando comparados ao grupo controle. Em relação à avaliação de função renal, foi observado um aumento da creatinina plasmática acompanhado de redução nos níveis de ureia em relação ao grupo controle, o qual foi acompanhado de elevação no clearance de creatinina no grupo tratado com etanol em relação ao controle, inferindo lesão renal.

O alcoolismo está associado à fisiopatologia da Insuficiência Renal Crônica (IRC), glomerulonefrite e falência renal. Paradoxalmente, achados bem documentados e de metodologia rigorosa demonstraram que o uso moderado de bebidas alcoólicas apresenta um efeito antagônico, ou seja, exerce efeito preventivo para a evolução de doença renal crônica (DRC) (SCHAEFFNER; RITZ, 2012). Um estudo de coorte prospectivo conduzido em 2005 por Schaeffner e colaboradores foi realizado com 11.023 homens inicialmente saudáveis os quais forneceram amostras de sangue coletadas 14 anos após uma primeira avaliação baseada no consumo de álcool. O grupo que consumiu no mínimo 7 doses semanais de bebida alcoólica apresentou níveis de creatinina sérica iguais ou superiores a 1,5 mg/dL (sendo 1,5 mg/dL considerado como limite de normalidade para a taxa de creatinina sérica), enquanto o grupo que consumiu apenas uma dose semanal apresentou níveis de creatinina sérica não superior a 1mg/dL (taxa normal). Outro estudo demonstrou que o consumo moderado de álcool exerceu efeito preventivo para o agravamento de deficiência na taxa de filtração glomerular em pacientes com doença renal prévia (KAARTINEN et al., 2009).

O aumento na concentração de ureia sérica em ratos também está relacionado a prejuízo de função renal por consumo de etanol e este achado tem sido demonstrado por alguns autores, por exemplo, em um estudo onde esses animais foram submetidos a um tratamento de 4 semanas com etanol apresentaram maior taxa de uréia sérica quando comparados aos controles após 48 horas de bi-nefrectomia (TESCHNER et al., 1988). Outro estudo revelou níveis séricos mais elevados de ureia após tratamento com etanol (SCHAEFER et al., 1989).

Alterações Histológicas

Em estudos de toxicidade, a análise histológica é de grande importância para complementar pois pode prever danos antecipadamente e, desta forma, reverter injúrias celulares as quais progressivamente levariam a alterações funcionais irreversíveis a órgãos importantes para o metabolismo geral como o fígado e rins (FILHO, 2016; GUYTON, 2008). O fígado constitui o órgão vital de processamento de nutrientes e xenobióticos absorvidos pelo trato digestivo (CHUANG et al., 2016; GRAMENZI et al., 2006; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007), e o hepatócito é a célula de função primordial para a função metabólica e detoxicante, ou seja, o principal alvo de toxicidade hepática (CARR et al., 2017; FILHO, 2016; ZELIKOFF, 1998).

São considerados padrões para normalidade do tecido hepático: homogeneidade do parênquima, identificação do espaço porta, veia hepática bem definida, presença de integridade nos cordões sinusóides convergindo para a veia centro lobular, veias hepáticas bem definidas, integridade e centralização dos núcleos dos hepatócitos além de nucléolos bem evidenciados, integridade de núcleo e citoplasma bem como ausência de morte celular (necrose/apoptose) (MORAES, 2014).

Alterações na morfologia nuclear incluem rompimento de membranas de organelas, hipertrofia de células de Kupffer (macrófagos), presença de áreas com infiltrado inflamatório, núcleos com cromatina extremamente condensada, esteatose, degeneração hidrópica (balonização) e/ ou gordurosa, necrose e apoptose (MORAES, 2014).

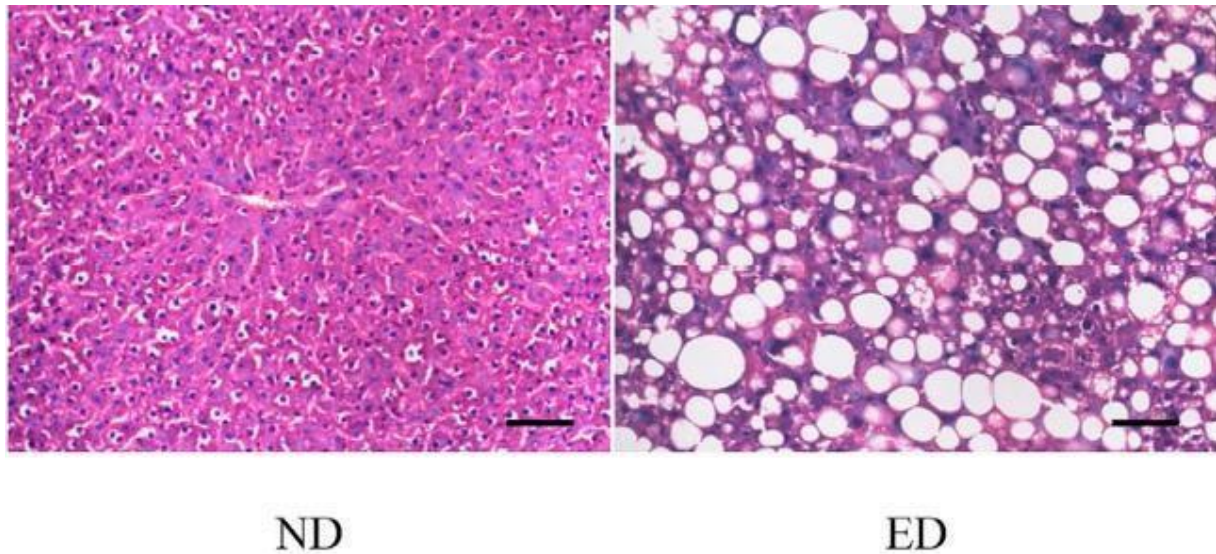


Figura 6: Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de ratos. Coloração HE. Onde os animais são subdivididos em dois grupos: (ND) - Dieta Normal; (ED) – Consumo crônico de etanol. Na figura correspondente ao grupo (ED) verifica-se: esteatose de hepatócitos com infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica com balonização. Fonte: (WEN et al., 2017)

Estudos comportamentais em animais

Hakami et al. (2017) dividiu 14 ratos Wistar machos adultos em 2 grupos: Grupo Controle (apenas etanol e veículo) e Grupo Augmentin (recebendo Etanol- e Augmentin). Durante as primeiras 5 semanas ambos os grupos consumiram apenas as soluções etílicas, em modelo de livre escolha, nas concentrações de etanol 10 e 30% v/v. A partir da quarta semana, a ingesta de água e das soluções etílicas foram aferidas 3 vezes por semanas e registradas em g/kg/ dia para obtenção da média de consumo. Foi observado que o tratamento com Augmentin na dose de 100mg/kg durante 5 dias consecutivos reduziu o consumo de etanol quando comparado ao grupo controle, no entanto essa redução na ingesta de etanol acompanhou uma elevação significativa no consumo de água (HAKAMI et al., 2017). Da mesma forma, vários outros estudos também relatam essa associação. Com este achado podemos inferir que o aumento na ingesta de água seria um mecanismo compensatório no volume de fluidos ingeridos, pela redução no consumo de etanol (ALASMARI; RAO; SARI, 2016; RAO et al., 2015). Ficou claro também que o tratamento com a gavagem de Augmentin relaciona-se a um menor consumo de etanol.

Outro estudo envolvendo os efeitos do uso crônico de etanol em ratos adolescentes avaliou as alterações neurológicas e comportamentais induzidas pelo tratamento com etanol em relação ao grupo controle. Os ratos tratados com etanol receberam por gavagem uma dose de 1,5g/kg enquanto que o grupo controle recebeu gavagem com salina. Ambos tratamentos foram administrados 1 vez ao dia por um período de 5 dias. Logo após o tratamento, os animais foram submetidos a um período de 15 dias de abstinência ao etanol e, logo após esse período foram realizados testes comportamentais de *Open field* (OF), *Elevated Plus Maze* (EPM) e *Radial Arm Maze* (RAM). O grupo tratado com etanol apresentou déficit de memória de referência no RAM sem alterações na memória de trabalho, inferindo alterações na neurogênese hipocampal que pode sugerir déficit cognitivo na idade adulta, associado à exposição persistente ao álcool desde adolescência. No EPM os ratos tratados com etanol apresentaram comportamento de ansiedade (LOXTON; CANALES, 2017).

Motaghinejad et al., (2014) avaliou a atividade motora em 14 ratos com idade aproximada de 8 semanas, pesando aproximadamente 200 +/- 8,0g foram subdivididos em dois grupos (n=7) e, após 2 semanas de ambientação, um dos grupos Grupo Etanol (Et) foi submetido a gavagem com etanol 2g/kg/dia e o grupo controle (C) recebeu etanol por autoadministração também por um período de 21 dias. No 22º dia, ambos os grupos foram submetidos ao teste comportamental *Open field* (OF) para avaliação da atividade motora, demonstrando que ambos os grupos citados Grupo Et (gavagem) e grupo controle-C (autoadministração de etanol) apresentaram alterações motoras relacionadas à ansiedade como redução da atividade exploratória.

PARTE III

4. Manuscrito

Os resultados desta pesquisa e sua discussão são apresentados a seguir na forma de artigo científico.

BEHAVIORAL AND TOXICOLOGICAL PROFILE OF RATS SUBMITTED TO
FREE-CHOICE MODEL OF ETHANOL INTAKE TREATED WITH AYAHUASCA.

Paula Polvora Victoria ¹, Cid Pinheiro Farias ², Fernanda Gelati Sekine ³,
Janaína Xavier da Silveira ¹, Mayara Sandrielly Pereira Soares ¹, Gabriele dos Anjos
Berwaldt ¹, Gabriela de Oliveira Silveira ⁴, Hugo Carlos Bolzon Gonzalez ³, Wilson
Cunico Filho ¹, Giovana Duzzo Gamaro ¹, Rosélia Maria Spanevello ¹, Maurício
Yonamine ⁴, Izabel Cristina Custódio de Souza ⁵, Hudson W. de Carvalho ², Giana
de Paula Cognato ^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de
Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas, RS, Brasil.

²Faculdade de Medicina, Curso de Psicologia, Universidade Federal de
Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

³Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São
Paulo, SP, Brasil.

⁵Instituto de Biologia, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de
Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

*Corresponding Author:

Giana de Paula Cognato (E-mail: giana.cognato@gmail.com)

Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Campus Universitário Capão do Leão, S/N, Prédio 5, Segundo Andar, Sala
dos Professores da Farmácia.

CEP: 96160-000 Capão do Leão, RS, Brasil

Phone: +55 53 3275 72 33

Abstract

Purpose: There are several reports that point out the use of Ayahuasca – a shamanic psychoactive drink prepared with the use of two plants- as an alternative therapy for the treatment of chemical dependence, mainly for alcohol addiction. Therefore, aim of the present study was validate a model of chemical dependence on ethanol in rats, to characterize of the main alkaloid Ayahuasca components and to verify whether treatment with Ayahuasca can cause changes in addiction through behavioral and toxicological analyzes.

Methods: Twenty adult male rats were divided into four groups of five animals each: CC (controls consuming water), CA (controls consuming water and treated with Ayahuasca), EC (consuming ethanol and water), EA (consuming ethanol, water, and treated with Ayahuasca).The treatments was evaluated during 19 weeks. The Ethanol, groups receiving alcoholic solution of 5% and 10% (n=5), free choice, and Ayahuasca groups receiving seven full doses of 500 mg/kg/mL of Ayahuasca dry extract (n = 5). The animals were evaluated through behavioral tests of locomotion, anxiety and ethanol and water consumption. After the behavioral analysis, toxicological evaluations and histological examination were performed, as well as analyzes of liver function markers (ALT and AST) and renal (creatinine and urea) markers.

Results: Our data showed that the animals did not present difference in relation to alcohol consumption between the groups treated or not with Ayahuasca. We can infer that the difference ethanol consumption in animals than humans is caused by motivation found in individuals under treatment for alcohol dependence. The exploratory activity was not altered in any of the treated groups. However, the animals that consumed only ethanol had an anxiogenic behavior that was prevented by the treatment with the Ayahuasca. Regarding to toxicological analyzes, evaluations of liver tissue morphology of animals submitted to the ethanol dependence model presented several lesions, which were not prevented with Ayahuasca treatment. In addition, after analysis of biomarkers of hepatic and renal function, only urea levels were altered by chronic ethanol consumption.

Conclusion: Our data showed it is valid to suppose that the protocol used for model of chemical dependence to ethanol can be validated under the following aspects: the behavioral tests showed that the animals that ingested only ethanol had an ansiogenic behavior, which was prevented in the rats treated with Ayahuasca. In addition, the consumption behavior of the ethylic solutions remained constant during the 19 weeks of the study, even after the treatment with Ayahuasca and adulteration of the ethylic solutions with aversive flavor, through the addition of quinine.

Ayahuasca treatment, in general, does not prevent toxicological changes observed in chronic ethanol consumption. However, some behavioral changes caused by chronic ethanol consumption (such as anxiogenic behavior) can be prevented by treatment with Ayahuasca.

Keywords: Ayahuasca, Ethanol, Chemical dependence, Behavior analysis, Toxicological analysis.

1. Background

Alcohol abuse and dependence is a major public health problem related to various social and individual problems. The World Health Organization estimates that approximately 76.3 million people worldwide report alcohol-related disorders (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). The drugs available for the treatment of alcohol misuse disorders are mostly ineffective or only palliative (HEILIG et al., 2011). Thus, the investigation or development of new pharmacological treatments to reduce alcohol consumption is required.

Among the studies involving possible emerging therapeutic methods for treating substance addiction in humans, the infusion known as Ayahuasca has received some attention in the scientific literature (WINKELMAN, 2014). In fact, retrospective studies in humans have documented that individuals with addiction problems who sought treatment within Ayahuasca shamanic communities became abstinent or displayed a significant improvement in the management of their substance use (LOIZAGA-VELDER; VERRES, 2014; THOMAS et al., 2013). Thus, Ayahuasca may represent an ethnopharmacological resource in the treatment of disorders related to the misuse of substances.

The Ayahuasca is the product of the decoction of two plants native to the Amazon: the *Banisteriopsis caapi* (*B. caapi*) and the *Psychotria viridis* (*P. viridis*). The first contains three primary harmala alkaloids (harmine, harmaline, and tetrahydroharmine) with reversible inhibitory action of peripheral and central monoamine oxidase (MAO) (MCKENNA; RIBA, 2015). The second contains a psychedelic component: the indole alkaloid N, N-dimethyltryptamine (DMT) (GATES, 1979; REGINATO, 2010). The hepatic and gastrointestinal MAO inhibitory action of the β -alkaloids prevents the deterioration of the DMT molecule and consequently allows its action in the nervous system. The DMT is structurally similar to the neurotransmitter serotonin (5-HT) and this molecule is believed to be the main cause of the alterations in perception and consciousness related to Ayahuasca administration.

It has been reported that the components of Ayahuasca may have action at the cortical mesolimbic level, mainly influencing the dopaminergic neurotransmission system in the striatum (GARRETT; SOARES-DA-SILVA, 1990; MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a): a pathway related to the development of substance addiction and abuse (PATRICK; BERNAT, 2006). Ethnographic and neuroscience studies have shown the potential therapeutic and neuroprotective effect of the

Ayahuasca in different contexts (MCKENNA, 2004). However, to the best of our knowledge, there is no study that investigates the toxicological potential of Ayahuasca, especially if it is administered along with other substances, such as alcohol.

Thus, the current study aims to characterize and quantify the main psychoactive alkaloids present in Ayahuasca samples, validate the model of alcoholic chemical dependence through analyzes of ethanol consumption and behavioral tests of locomotion and anxiety and to advance the understanding of the toxicological profile of rats submitted to chronic ingestion of ethanol and treated with Ayahuasca. In addition, to verify the influence of Ayahuasca on the behavior of ethanol consumption.

2. Material and Methods

Ayahuasca

Three liters of Ayahuasca were prepared using the original methodology used for shamanic rituals and donated by the Santo Daime Church in March 2015. The nucleus is located in the metropolitan region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

The Ayahuasca sample was lyophilized and immediately stored at -80°C in an ultra freezer with key, which was under the responsibility of professors Giana de Paula Cognato and Hudson W. de Carvalho. All the experiments of the current study were performed using the lyophilized Ayahuasca and its main psychoactive components were characterized.

Characterization of main psychoactive compounds in the Ayahuasca Sample.

i. Reagents.

Boric acid, methanol and acetonitrile were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Classic Sep-Pack® C18 cartridges (360 mg) were purchased from Waters Co. (Bellefonte, PA, USA). Diphenhydramine, harmine (hydrochloride) and harmaline (hydrochloride) were obtained from Sigma Co. (St Louis, MO, USA). Tetrahydroharmine was synthesized according to the procedure described by Callaway et al. (1996). 1.0 mg / mL dimethyltryptamine was obtained from Cerilliant Co (Round Rock, Texas, USA).

ii. Extraction of Ayahuasca alkaloids.

An aliquot of 0.5 mL of Ayahuasca was added with 3.0 mL of borate buffer solution (pH 9.0). Diphenhydramine was used as an internal standard (PI). The C18 solid phase extraction (SPE) cartridges were conditioned with 2.0 mL of methanol, 1.0 mL of deionized water and 2.0 mL of borate buffer solution (pH 9.0). The sample solution was then transferred to the cartridges. Washing was performed with 1.0 mL of an acetonitrile: water solution (1: 9). After drying for 7 minutes under compression, the elution was done with 2.0 mL of methanol. From the eluate, 2 μ L was injected into the GC-NPD.

iii. GC-NPD Analysis.

The analyzes for DMT, harmine, harmaline and tetrahydroharmine were performed on Agilent Technologies model 6890 gas chromatograph equipped with a nitrogen-phosphor detector and 7683 series automatic injector (Little Falls, DE, USA). Chromatographic separation was achieved on an HP Ultra-2 fused silica capillary column (25 m $\times$ 0.2mm $\times$ 0.33 μ m film thickness), with ultra-pure nitrogen as the entrainment gas at a constant flow of 1.0 mL / min. Injections (2 μ L) were performed in splitless mode. The injector and detector temperatures were 280°C. The oven temperature was maintained at 70°C for 1 min; Programmed at 30°C/min. At 120 ° C, 20°C/min at 300°C and maintained at 300°C for 4 min. Analytes were identified based on the comparison of retention times relative to the corresponding internal standard analyzed during the same run. The quantification was based on the ratio of the integrated peak area of the analyte to that of the internal standard. The final result was multiplied by 100 to compensate for the dilution (CALLAWAY et al., 1996; PIRES et al., 2009).

Animals

Twenty adult male Wistar rats were obtained, from the Biotério of the Universidade Federal de Pelotas (UFPeI). The animals were housed individually cages under controlled lighting conditions (light / dark cycle of 12h, with lights on from 07:00) and temperature (22°C $\pm$ 2°C). All animals was offered food and water ad libitum, both in the habituation period and in the experimental phase.

Model of Ethanol Addiction and Ayahuasca Treatment

The animals were submitted to a habituation time for a period of 7 days, where they did not receive any treatments. Each animal had in its cage a bottle containing 500 mL of filtered water, which volume of basal consumption was measured, recorded, and replaced every other day. The animals were divided in the following groups: Control Group (CC) - consuming only water ($n = 5$); Control Group - Ayahuasca (CA) - consuming only water and submitted to treatment with Ayahuasca ($n = 5$); Control Ethanol (EC)- consuming water, ethanol 5% or 10% ($n=5$); Ethanol- Ayahuasca (EA) -consuming water, ethanol 5% or 10%,and submitted to treatment with Ayahuasca ($n=5$). Thus, the first ten weeks of treatment aimed at the acquisition of the habit of ethanol consumption by the designated groups. Throughout this period, on alternate days, the consumption of ethanol solutions and water were measured, recorded and, in addition, all three bottles had their positions switched without sequential repetition. After this first treatment step, the ethanol solutions were removed for 3 weeks (abstinence period). At this stage, the rats were exposed to the Ayahuasca treatment (500mg/kg of dry extract of Ayahuasca in 1mL of water by gavage). From the fourteenth week, ethanol solutions were again offered for another 3 weeks (resubmission phase). At the end of the resubmission period, hydroalcoholic solutions had their flavor adulterated with aversive flavoring 0.05g/L quinine, to validate the model of dependence on ethanol, in according with Goodwin, et al (2000) giving continuity to the model of free choice for another three weeks, and consumptions continued to be monitored and recorded. The performed model was an adaptation of Carnicella et al. (2014), Hopf et al. (2010) and Rao et al (2013). treatment with Ayahuasca consisted of oral administration, by gavage, of 500 mg/kg of dry extract (lyophilized) diluted in filtered water (total 1mL suspension), in according with De Castro-Neto et al (2013).

Behavioral Analysis

In order to characterize the behavior profile of rats submitted to the model of chronic ethanol intake and treated with Ayahuasca, it was evaluated the ethanol and water intake and the locomotor activity.

Ethanol and water consumption

The consumption of water and ethanol by the different groups analyzed in this study were measured throughout the experimental period (19 weeks). Briefly, every two or three days, the volume of liquid consumed by the animals (water, 5% ethanol or 10% ethanol) was measured through a graduated cylinder and cataloged for further analysis.

Locomotor activity and evaluation of anxiety

The locomotor activity was assessed using the open-field apparatus, as previously described (COGNATO et al., 2011). Briefly, the open field consisted of a box with 1m width x 1m length x 1m height approximately, divided into quadrants by lines drawn on the floor of the apparatus. The parameters evaluated were the number of line crossings (to evaluate the locomotion) and latency to enter the center of apparatus as well as the time dispended in the center of apparatus (measures of anxiety). Animals were placed in the corner of Open-field and were allowed to explore the maze for 10 minutes. All tests were filmed and analyzed after the test was done.

Analysis of Ayahuasca and Ethanol Toxicology

Histological analysis of liver

Liver samples were fixed in buffered formaldehyde solution at 10% for a minimum of three hours. The samples were processed according to routine histological techniques to paraffin embedding. Three histological sections were made for each blade three slides for each animal group (15 blades and 45 thickness of 5µm), stained with hematoxylin-eosin. The sections were analyzed by optical light microscope (Nikon Eclipse E200) at 100x magnification. The images were captured randomly in three areas of each of the blades and analyzed by the program, Motic Images Plus 2.0. These thicknesses were scanned with Digital Camera (Moticam 5.0 mp) coupled to an optical light microscope with a resolution of 2048 x 1536 pixels, as calibration obtained by using a standard scale. To compare the degree of inflammation of histological images was used Image-J software.

Analysis of Serum Biomarkers of liver and kidney function.

The enzymatic activity of AST (Aspartate Aminotransferase) and ALT (Alanine Aminotransferase) aminotransferases are part of screening for hepatocellular

damage investigation. Analyzes were performed in rat serum using the Liquiform / Labtest Diagnostic AST and ALT kits by the UV / IFCC kinetic method in Cobas Mira Plus® equipment and the analyzes were performed as instructed by the manufacturer (LABTEST, 2007, 2011, 2013a, 2013b). For the determination of the serum levels of Urea and Creatinine, LABTEST Kits were used and the analyzes were performed according to the manufacturer's instructions on the Cobas Mira Plus® equipment.

Statistical analysis

Percentage of intake: Non-parametric statistics for dependent samples (Wilcoxon Test) were used to estimate differences in volume intake in alcohol and water using SPSS Statistics version 17 software. Data were represented by average $\pm$ S.D. and results were considered significant if p values were < 0.05 .

Behavior and toxicological analysis: Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test were used to analyze locomotor activity and anxiety profile of rats submitted to chronic model of ethanol intake and Ayahuasca treatment. Data were represented by average $\pm$ S.E. with a $p < 0.05$ representing statistical difference using Graphpad Prism version 5.01 software.

3 Results

Characterization of main psychoactive compounds in Ayahuasca Sample

The Ayahuasca sample, at 500mg, used in this experiment had the following concentrations of psychoactive alkaloids analyzed: 0.28mg DMT, ie 0.056% (w/w); 0.70 mg THH, i.e. 0.14% (w/w); 0.13 mg of HRL, i.e. 0.026% (w/w) and 0.57 mg of HRM, i.e. 0.114% (w/w), according to Table 1.

Behavioral Analysis.

The profile of water and ethanol intake did not change significantly after statistical analysis in all groups tested.

Soon after administration of the dose of Ayahuasca corresponding to 500 mg/kg of dry extract, the animals were placed in their respective housing and observed for 40 minutes. Behavioral differences regarding control animals were

observed in Ayahuasca treated rats after ten minutes of gavage with the beverage. The animals had a higher number of groomings than the untreated animals. In addition, these animals also had increased sniffing, masticatory movements and blinking.

The locomotor and anxiety behaviors were also evaluated after ethanol and Ayahuasca treatment (Figure 3). Groups EC, CA and EA did not show any significant difference in the number of line crossing when compared to CC group (Figure 3 A). However, EC group had a significant change in latency to enter the central quadrant (Figure 3 B) and time spent in the central quadrant (Figure 3 C) when compared to CC group, which characterized an anxiogenic behavior induced by ethanol chronic intake. In addition, when ethanol-treated animals were also treated with Ayahuasca, the entheogenic infusion was able to prevent the anxiogenic behavior elicited by ethanol (Figures 3 B and 3 C). It was observed no significant change in latency to enter the central quadrant and time spent in the central quadrant in animals treated only with Ayahuasca (CA group) when compared to control group (CC).

Histological analysis of liver.

The histological analysis is shown in Figure 4 by representative photomicrographic images of liver samples of control (CC: A and B), Ayahuasca (CA: C and D), Ethanol (EC: E and F) and Ethanol plus Ayahuasca treatments (EA: G and H). In CC group, it was observed normal hepatic parenchyma (A) with rows of hepatocytes converging to the central lobular vein (CV) and sinusoidal capillaries (B). In CA group, it can be observed a normal aspect of hepatic parenchyma (C), with observed immune cells migration from blood vessels to hepatic parenchyma (black* on D) and vacuolated hepatocytes (green arrow on D). Hepatic slices of EC group have shown Kupffer cells hypertrophy (red arrows on F), dead cells (black * on F), apoptotic bodies (red * on F) and hepatocytes regeneration (black arrows on F). Hepatic slices of EA group have shown vacuolated hepatocytes (Green arrows on H) Kupffer cells hypertrophy (red arrows on H), necrosis (red* on H) and a consequential disorganization of the lobular architecture. It can be also observed a mononuclear inflammatory infiltrate (in the black * on H) and hepatocytes regeneration (black arrow on H).

Biomarkers of liver and renal function

After chronic intake of ethanol and Ayahuasca treatment, we analyzed the serum activity of AST and ALT, as well as creatinine and urea levels (Figure 5). Was not observed any change in AST (Figure 5 A) and ALT (Figure 5 B) activities and creatinine levels (Figure 5 C). However, there was an increase in urea serum levels after ethanol chronic intake (group EC; Figure 5 D), even when rats were also treated with Ayahuasca (group EA; Figure 5 D).

4 Discussion

Alkaloids characterization of Ayahuasca sample

Several analyzes of characterization of the main alkaloids of Ayahuasca show different concentrations due to the variability of lots, planting site, seasonality, form of preparation of the beverage, as well as the proportions of plants used in the decoction (MCKENNA, 2004). It should be noted that different religious syncretic groups and different Ayahuasca shamanic cultures present variability where some add other species of plants, besides *B.caapi* and *P.viridis*, to the preparation of the beverage (LABATE; ARAÚJO, 2002). In addition, there are different graduations of the infusion according to the number of boils which is submitted the plants, i.e., the degree G corresponds to the preparation of the first decoction while the 2G is submitted to a second boil where the loss of water concentrates more amount of pharmacogens. However, the Mel Graduation has ten consecutive decoctions, being therefore the one with the highest concentration of psychoactive constituents in relation to the first decoction (LABATE; ARAÚJO, 2002). The concentration of Ayahuasca's psychoactive alkaloids varies between 0.05% and 1.95% in dry weight (MCKENNA, 2004; MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984b). Our results are in accordance to the variation of pharmacogens described above.

The variability found in the concentrations of the main psychoactive alkaloids in the Ayahuasca infusion is also due to several factors that go beyond the preparation process. It is known that there are important differences in the concentrations of pharmacogens with regard to seasonality (the composition of the

active constituents undergoes variations depending on the time of the year), the techniques of harvesting and storage also interfere. In addition, the Ayahuasca alkaloids are derived from the secondary metabolism of the two main constituent plants, and this depends on the characteristics of the planting soil (pH, composition, water content among others) as well as the UV (Ultraviolet) Soil and plants are submitted (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

It would be interesting to standardize the process of cultivation, handling, collection and preparation regarding the probable future uses of Ayahuasca in a therapeutic context, not interfering in the cultural aspects of the Shamanic peoples and syncretic-religious groups, whose basis is not the clinical use rather ritualistic one.

Behavioral analysis

After each administration of Ayahuasca, it was observed that animals had a higher number of groomings, sniffing, masticatory movements and blinking. These observations are in accordance to literature (PIRES et al., 2009) and may be understood as evidence of the activity of the substance in the nervous system.

The behavioral analysis performed in this study helped characterized the free-choice of ethanol intake as a model of addiction development. In EC group, it was observed no alterations on the pattern of alcohol intake throughout all treatment, even after the adulteration of hydro alcoholic solutions with quinine, a known aversive chemical for rodents. Our data are in accordance to literature, since Hopf and colleagues (2010) showed that motivation to seek and consume ethanol was not changed by quinine adulteration (0.001 to 0.1 g/L) in rats exposed to 3-4 months of a free-choice model of ethanol intake, suggesting the potential development of abnormal ethanol seeking behaviors following a long-term exposure to the intermittent-access procedure (HOPF et al., 2010). It was also observed that the treatment with Ayahuasca did not change the pattern of ethanol intake. The only pre-clinical study relating Ayahuasca and Ethanol was performed by Oliveira-Lima and colleagues (2015) and the focus of analysis were locomotor behavior. Therefore, after a chronic intake of ethanol, the chronic Ayahuasca treatment performed was not able to prevent the consumption of alcohol in rats (OLIVEIRA-LIMA et al., 2015).

Evidence have shown the development of anxiety-behavior after chronic and chronic treatments with ethanol. After 21 days of exposure to 2 to 6% alcoholic

solution, Wistar rats have explore significantly less the open arms in plus maze task when compared to control animals (GONZAGA et al., 2016). Another study from literature have shown that rats receiving alcohol treatment once a day for 5 consecutive days displayed no alteration in the Open field task following a 15-day withdrawal period. However, these animals showed alterations in Elevated Plus maze task presenting anxiety-like effects when compared to control group (LOXTON; CANALES, 2017). Therefore, our results regarding the anxiety profile after ethanol treatment are in accordance to the ones elicited by literature.

Furthermore, our findings show that Ayahuasca prevent the onset of anxious-like behavior in animals submitted to ethanol treatment. These finding are not only in accordance to literature data that shows that Ayahuasca has anxiolytic effects, but advance on it by showing that it prevent the anxiogenic effects of ethanol intake. Osorio and coworkers (2015) have demonstrated that patients with high scores of anxiety levels have shown an improvement of symptoms after a single dose of Ayahuasca (OSÓRIO et al., 2015). Oliveira-Lima and colleagues (2015) have demonstrated no alteration in locomotor behavior of rodents (mice) after a brief Ayahuasca treatment (OLIVEIRA-LIMA et al., 2015). Also, Favaro and coworkers (2015) have shown that after a 30 days of Ayahuasca treatment there was no alteration in the behavior of naive rats in the plus maze apparatus (FAVARO et al., 2015).

Toxicological characterization

The histological evaluation of tissues involved in the metabolism of xenobiotics together with the functional evaluation of these organs are of great importance for the determination of the toxic potential of new substances candidates for new therapeutic alternatives. In the tissue evaluation, tissue integrity, absence or presence of injury and, in this case, the body's responses to the damage caused by the test substance are verified. As regards toxicologicals analysis, we can verify hepatic alterations such as, vacuolated hepatocytes, and migration of leukocytes in hepatic parenchyma of CA rats. In addition, mononuclear cell aggregates, and hepatocellular necrosis with subsequent regeneration of hepatocytes was observed in EC and EA when compared to normal parenchyma (CC). Our results have demonstrated that when rats are submitted to only Ayahuasca treatment, a few changes in hepatic tissue are

observed (observed immune cells migration from blood vessels to hepatic parenchyma and vacuolated hepatocytes). There are a small number of studies regarding Ayahuasca in the hepatic tissue. However, data from literature did not show significant histological alterations in relation to the control groups in renal and hepatic tissue of Wistar rats submitted to weekly ritual dose for a period of 60 days, where the ritual dose corresponded to 100 ml / kg (DOS SANTOS, 2013). Our results regarding the Ayahuasca treated group (CA) are in accordance to the literature, once it was observed some alteration in hepatic tissue which can not be associated with cellular damage. On the other hand, when animals were submitted to Ethanol chronic intake (EC group) or Ethanol plus Ayahuasca treatment (EA group), it was observed several modifications in hepatic tissue which are related to cellular damage (Kupffer cells hypertrophy, dead cells, apoptotic bodies, necrosis, disorganization of the lobular architecture and hepatocytes regeneration).

The liver damage is observed in liver samples of animals submitted to ethanol intake in several studies on literature (FERNANDO; SOYSA, 2016; LEE; KO, 2016; LU; CEDERBAUM, 2015; MANI et al., 2016). We also observed that the treatment with Ayahuasca seems to make the ethanol damage even worst and this data are pioneer in the literature. It should be noted that the histological damages found were observed in 500mg/kg of Ayahuasca for a treatment period whose frequency differs from that used in shamanic Ayahuasca rituals. Therefore, animals received a total of five doses over a period of two consecutive weeks whereas the ritualistic doses correspond approximately to a minimum period of 15 days between a dose and another. With that in mind, we can suggest that in the ritualistic frequency no hepatic damages would likely be observed. It is also worth noting that patients treated with Ayahuasca for ethanol dependence remain abstinent from alcohol during treatment and this is the objective since studies show a greater tolerability to abstinence due to treatment with Ayahuasca (WINKELMAN, 2014). We can infer that the histological damages observed are related to the chronic use of ethanol, which in itself already shows hepatic toxicity and the synergetic effect of hepatic overload caused by the dose and frequency of administered Ayahuasca may have been the determining factors for the findings of histological changes.

It is well known that laboratory tests of serological biomarkers are used for the diagnosis of Alcoholic Liver Disease (DHA). However, the results are not always correlated with the histological findings. Thus, although we did not find significant

changes in the AST and ALT enzymes in the treated groups (EA, CA, EtOH), uremia without the presence of alterations in serum creatinine could be an indication of hepatic overload where the metabolism of nitrogen compounds is Exacerbated by hepatocellular damage in order to optimize excretion of ammonia via the kidney in order to prevent hepatic encephalopathy caused by hyperammonemia. When liver damage progress, we may observe an increase in uremia without necessarily finding significant changes in liver enzymes such as AST and ALT because there is no hepatic tissue feasible enough to release such enzymes. Findings of hypoalbuminemia, hypoprothrombinemia, hyperbilirubinemia together with a serum increase of bile acids would be biomarkers indicative of such an assumption (TESCHNER et al., 1988).

The increase in Urea production in rats due to ethanol consumption has been demonstrated by some authors. In one study, animals submitted to a 4-week treatment with ethanol had a higher rate of serum urea when compared to controls after 48 hours of bi-nephrectomy (TESCHNER et al., 1988). Another study revealed higher serum levels of urea after ethanol treatment (SCHAEFER et al., 1989). Our results are in accordance to that, since we have found a increase in urea level in serum of rats submitted to chronic model of ethanol intake. However, Adachi and colleagues (1995) have found suppression in the urea synthesis after rats were submitted to a chronic ethanol intake. These author have performed a much longer ethanol treatment (6 months) when compared to the one performed in our study. Besides, the dose of ethanol given though gavage to the rats were higher (32% alcohol) when compared to our study (2 bottles of 5 and 10 % alcohol free choice) (ADACHI et al., 1995).

5 Conclusion

Our data suggest it can be verified that the model of chemical dependence on ethanol could be validated; Ayahuasca treatment at a dose of 500mg / kg for a period of 3 weeks every two days was not effective in preventing both ethanol consumption behavior and liver histological changes. However, some behavioral changes caused during the period of ethanol consumption (such as anxiogenic behavior) have shown preventive efficacy through treatment with Ayahuasca and, as such, may be related to reports of better tolerability to periods of ethanol withdrawal, as well as decrease in

the compulsive behavior of relapses, in people under treatment with Ayahuasca for addiction disorders.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES and Fundação de Amparo à pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- ADACHI, K. et al. Studies on urea synthesis in the liver of rats treated chronically with ethanol using perfused livers, isolated hepatocytes, and mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, v. 50, n. 9, p. 1391-1399, 26 out. 1995.
- ALASMARI, F.; RAO, P. S. S.; SARI, Y. Effects of cefazolin and cefoperazone on glutamate transporter 1 isoforms and cystine/glutamate exchanger as well as alcohol drinking behavior in male alcohol-preferring rats. *Brain Research*, v. 1634, p. 150-157, 1 mar. 2016.
- ALLEN JR, L.; POPOVICH, N.; ANSEL, H. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 9. ed. Artmed, 2013.
- BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 85, out. 2005.
- BRUHA, R.; DVORAK, K.; PETRÝL, J. Alcoholic liver disease. *World Journal of Hepatology*, v. 4, n. 3, p. 81-90, 27 mar. 2012.
- BUCHO, M. S. C. R. DA C. *Fisiopatologia da Doença Hepática Alcoólica*. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2012.
- CALLAWAY, J. C. et al. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 20, n. 6, p. 492-497, out. 1996.
- CALLAWAY, J. C. et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 65, n. 3, p. 243-256, jun. 1999.
- CARNICELLA, S.; RON, D.; BARAK, S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, v. 48, n. 3, p. 243-252, may. 2014.
- CARR, D. F. et al. Towards better models and mechanistic biomarkers for drug-induced gastrointestinal injury. *Pharmacology & Therapeutics*, 27 jan. 2017.

CHEN, Q. et al. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer*, v. 114, n. 5, p. 675-682, 1 maio 2005.

CHUANG, C.-H. et al. Heat-Killed *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus johnsonii* Reduce Liver Injury Induced by Alcohol In Vitro and In Vivo. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 21, n. 11, 31 out. 2016.

COGNATO, G. P. et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases role in the pathophysiology of cognitive impairment induced by seizure in early age. *Neuroscience*, v. 180, p. 191-200, 28 abr. 2011.

COPLAN, J. D.; GORMAN, J. M. Detectable levels of fluoxetine metabolites after discontinuation: an unexpected serotonin syndrome. *The American Journal of Psychiatry*, v. 150, n. 5, p. 837, maio 1993.

DOMÍNGUEZ-CLAVÉ, E. et al. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. *Brain Research Bulletin*, v. 126, n. Pt 1, p. 89-101, set. 2016.

DOS SANTOS, R. G. A critical evaluation of reports associating ayahuasca with life-threatening adverse reactions. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 45, n. 2, p. 179-188, jun. 2013.

FAVARO, V. M. et al. Effects of Long-Term Ayahuasca Administration on Memory and Anxiety in Rats. *PloS One*, v. 10, n. 12, p. e0145840, 2015.

FERNANDO, C. D.; SOYSA, P. Evaluation of Hepatoprotective activity of *Eriocaulon quinquangulare* in vitro using porcine liver slices against ethanol induced liver toxicity and free radical scavenging capacity. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, p. 74, 24 fev. 2016.

FRANZEN, F.; GROSS, H. Tryptamine, N,N-dimethyltryptamine, N,N-dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. *Nature*, v. 206, n. 988, p. 1052, 5 jun. 1965.

GARRETT, M. C.; SOARES-DA-SILVA, P. Role of type A and B monoamine oxidase on the formation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in tissues from the brain of the rat. *Neuropharmacology*, v. 29, n. 10, p. 875-879, out. 1990.

GATES, B. New Names in Banisteriopsis and Diplopterys (Malpighiaceae) of the Guayana Highland. *Brittonia*, v. 31, n. 1, p. 108-109, 1979.

GEORGE, B. et al. Xenobiotic transporters and kidney injury. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19 jan. 2017.

GONZAGA, N. A. et al. Ethanol withdrawal induces anxiety-like effects: Role of nitric oxide synthase in the dorsal raphe nucleus of rats. *Alcohol* (Fayetteville, N.Y.), v. 52, p. 1-8, maio 2016.

GOODWIN, Frances LW; BERGERON, Natasha; AMIT, Zalman. Differences in the consumption of ethanol and flavored solutions in three strains of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 65, n. 3, p. 357-362, 2000.

GRAMENZI, A. et al. Review article: alcoholic liver disease--pathophysiological aspects and risk factors. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 24, n. 8, p. 1151-1161, 15 out. 2006.

HAKAMI, A. Y. et al. Effects of orally administered Augmentin on glutamate transporter 1, cystine-glutamate exchanger expression and ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Behavioural Brain Research*, v. 320, p. 316-322, 1 mar. 2017.

HEILIG, M. et al. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 12, n. 11, p. 670-684, 20 out. 2011.

HOPF, F. W. et al. Motivation for alcohol becomes resistant to quinine adulteration after 3 to 4 months of intermittent alcohol self-administration. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, v. 34, n. 9, p. 1565-1573, 1 set. 2010.

JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. *Medical Hypotheses*, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005.

KAARTINEN, K. et al. Alcohol consumption and kidney function in IgA glomerulonephritis. *Nephron. Clinical Practice*, v. 112, n. 2, p. c86-93, 2009.

KAMOUN, Z. et al. Hepatoprotective and nephroprotective effects of sardinelle (*Sardinella aurita*) protein hydrolysate against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25 out. 2016.

LABATE, B. C.; ARAÚJO, W. S.. O uso ritual da ayahuasca. [São Paulo, Brazil?]: Campinas, SP, Brasil: FAPESP; Mercado de Letras, 2002.

LABATE, B. C.; FEENEY, K. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: implications and challenges. *The International Journal on Drug Policy*, v. 23, n. 2, p. 154-161, mar. 2012.

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 54, n. 1, p. 37-40, out. 1996.

LEE, S. Y.; KO, K. S. Effects of S-Adenosylmethionine and Its Combinations With Taurine and/or Betaine on Glutathione Homeostasis in Ethanol-induced Acute Hepatotoxicity. *Journal of Cancer Prevention*, v. 21, n. 3, p. 164-172, set. 2016.

LOIZAGA-VELDER, A.; VERRES, R. Therapeutic effects of ritual ayahuasca use in the treatment of substance dependence--qualitative results. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 46, n. 1, p. 63-72, mar. 2014.

LOXTON, D.; CANALES, J. J. Long-term cognitive, emotional and neurogenic alterations induced by alcohol and methamphetamine exposure in adolescent rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 74, p. 1-8, 6 mar. 2017.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. Autophagy Protects against CYP2E1/Chronic Ethanol-Induced Hepatotoxicity. *Biomolecules*, v. 5, n. 4, p. 2659-2674, 16 out. 2015.

MANI, V. et al. Antioxidant and anti-inflammatory role of zingerone in ethanol-induced hepatotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 421, n. 1-2, p. 169-181, out. 2016.

MCKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 102, n. 2, p. 111-129, may. 2004.

MCKENNA, D. J.; TOWERS, G. H.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 10, n. 2, p. 195-223, abr. 1984a.

MCKENNA, D. J.; TOWERS, G. H.; ABBOTT, F. S. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants Part 2: Constituents of orally-active Myristicaceous hallucinogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 12, n. 2, p. 179-211, nov. 1984b.

MCKENNA, D.; RIBA, J. New World Tryptamine Hallucinogens and the Neuroscience of Ayahuasca. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 6 fev. 2015

MIWA, J. M. et al. The protoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron*, v. 51, n. 5, p. 587-600, 7 set. 2006.

MORAES, J. A. DE. Toxicidade aguda e crônica do chá de Ayahuasca (Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis), por análise Histológica em ratas Wistar. Dissertação de Mestrado—Brasília: Universidade de Brasília, 2014.

MOTAGHINEJAD, M. et al. Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, v. 87, p. 721-740, 14 jan. 2017.

NUNES, A. A. et al. Effects of Ayahuasca and its Alkaloids on Drug Dependence: A Systematic Literature Review of Quantitative Studies in Animals and Humans. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 48, n. 3, p. 195-205, ago. 2016.

OLIVEIRA, C. D. R. DE et al. Neurobehavioral, reflexological and physical development of Wistar rat offspring exposed to ayahuasca during pregnancy and lactation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 6, p. 1065-1076, dez. 2011.

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. *Physiology & Behavior*, v. 142, p. 28-36, 1 abr. 2015.

OSÓRIO, F. DE L. et al. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Revista Brasileira De Psiquiatria* (Sao Paulo, Brazil: 1999), v. 37, n. 1, p. 13-20, mar. 2015.

PASSOS, C. S. et al. Indole alkaloids of Psychotria as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors. *Phytochemistry*, v. 86, p. 8-20, fev. 2013.

PATRICK, C. J.; BERNAT, E. M. The construct of emotion as a bridge to between personality and psychopathology. In: KRUEGER, R. F.; TACKETT, J. L. (Eds.). . *Personality and psychopathology*. New York, NY: Guilford Press, 2006. p. 174-209.

PIRES, A. P. S. et al. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage. *Phytochemical analysis: PCA*, v. 20, n. 2, p. 149-153, abr. 2009.

PIRES, A. P. S.; OLIVEIRA, C. D. R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: a review of pharmacological and toxicological aspects. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 31, n. 1, p. 15-23, 2010.

PULSINELLI, W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* (London, England), v. 339, n. 8792, p. 533-536, 29 fev. 1992.

RAFAEL GUIMARÃES DOS SANTOS. Ayahuasca: physiological and subjective effects, comparison with d-amphetamine, and repeated dose assessment. 2012.

RAO, P. S. S. et al. Effects of ampicillin, cefazolin and cefoperazone treatments on GLT-1 expressions in the mesocorticolimbic system and ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Neuroscience*, v. 295, p. 164-174, 4 jun. 2015.

RAO, P. S. S.; SARI, Y. Effectiveness of ceftriaxone treatment in preventing relapse-like drinking behavior following long-term Ethanol dependence in P Rats. *Journal of addiction research & therapy*, v. 5, p. 1-12, 12 fev. 2014.

REGINATO, A. D. DE A. Regulamentação de uso de substância psicoativa para uso religioso: o caso da Ayahuasca. *TOMO*, v. 17, p. 58-78, 2010.

REISDORFER, E. et al. Prevalence and associated factors with alcohol use disorders among adults: a population-based study in southern Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 15, n. 3, p. 582-594, set. 2012.

RIBA, J. et al. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306, n. 1, p. 73-83, July. 2003.

ROTELLA, F. M. et al. Baclofen differentially mediates fructose-conditioned flavor preference and quinine-conditioned flavor avoidance in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 775, p. 15-21, 15 mar. 2016.

SAMOYLENKO, V. et al. Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, n. two, p. 357-367, 3 Feb. 2010.

SANTOS, A. C. et al. Cardiovascular, Renal and Hepatic Effects Produced by Chronic Administration of Ayahuasca in Hypertensive Rats. *Revista Ciências em Saúde*, v. 3, n. 4, 2013.

SCHAEFER, R. M. et al. Catabolic effects of ethanol in chronically uremic rats. *Nephron*, v. 51, n. 1, p. 67-72, 1989.

SCHAEFFNER, E.; RITZ, E. Alcohol and kidney damage: a Janus-faced relationship. *Kidney International*, v. 81, n. 9, p. 816-818, may 2012.

SCHAEFFNER, E. S. et al. Alcohol consumption and the risk of renal dysfunction in apparently healthy men. *Archives of Internal Medicine*, v. 165, n. 9, p. 1048-1053, 9 maio 2005.

SCHENBERG, E. E. Ayahuasca and cancer treatment. *SAGE open medicine*, v. 1, 2013.

SCHULTES, R. E.; HOFMANN, A.; RÄTSCH, C. Plantas de los dioses: las fuerzas mágicas de las plantas alucinógenas. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica, 2000.

SCHWARZ, M. J. et al. Activities of extract and constituents of Banisteriopsis caapi relevant to parkinsonism. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 75, n. 3, p. 627-633, jun. 2003.

SIMÕES, C. M. O.; MARIOT, A. (EDS.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. e ampliada ed. Florianópolis, SC: Porto Alegre, RS: Editora da UFSC; Editora da UFRGS, 2003.

SMITH, C. M.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica. Porto Alegre (RS): Artmed, 2007.

SMITH, R. L. et al. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 61, n. 3, p. 323-330, nov. 1998.

SMITH, T. A. Tryptamine and related compounds in plants. *Phytochemistry*, v. 16, n. 2, p. 171-175, 1977.

SOLER, J. et al. Exploring the therapeutic potential of Ayahuasca: acute intake increases mindfulness-related capacities. *Psychopharmacology*, v. 233, n. 5, p. 823-829, mar. 2016.

SUDDENDORF, R. F. Research on alcohol metabolism among Asians and its implications for understanding causes of alcoholism. *Public Health Reports* (Washington, D.C.: 1974), v. 104, n. 6, p. 615-620, dez. 1989.

TESCHNER, M. et al. Chronic ethanol ingestion enhances catabolism and muscle protease activity in acutely uremic rats. *Nephron*, v. 50, n. 4, p. 338-344, 1988.

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

WEN, J. et al. Protective effects of recombinant human cytoglobin against chronic alcohol-induced liver disease in vivo and in vitro. *Scientific Reports*, v. 7, p. 41647, 27 jan. 2017.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Management of substance abuse. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/facts/en/index.html>. Acesso em: 2 set. 2017.

ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology*, v. 129, n. 1, p. 63-71, 7 ago. 1998.

Fig. 1

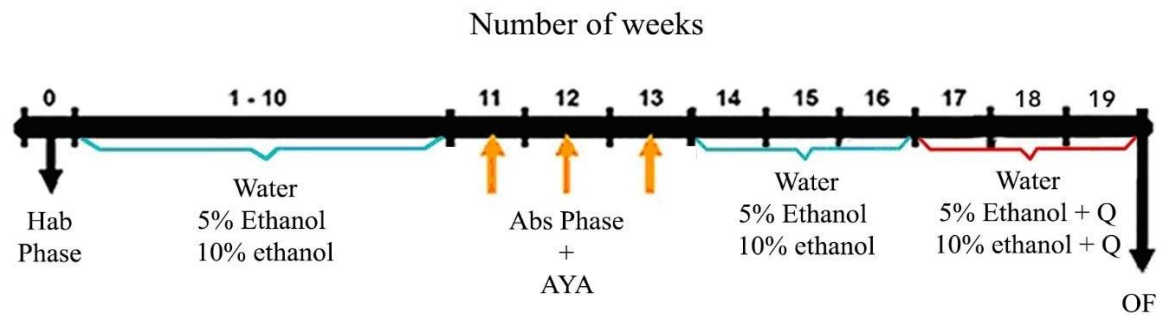


Figure 1: Schematic representation of the procedures performed over 19 weeks of treatment. Legend: hab phase - habituation phase; Abs phase - Ethanol abstinence phase; Q-Quinine; OF - Open field task.

Table 1: Concentration of each active principle measured by gas-chromatography

Ayahuasca 1mL (500 mg/mL)	Concentration in 500 mg of Ayahuasca	%(p/p)
DMT	0.28 mg	0.056
THH	0.70mg	0.14
HRL	0.13mg	0.026
HRM	0.57mg	0.114

Legend: DMT - N,N-dimethyltryptamine; THH - Tetrahydroharmine; HRL - Harmaline; HRM - Harmine.

Fig. 2

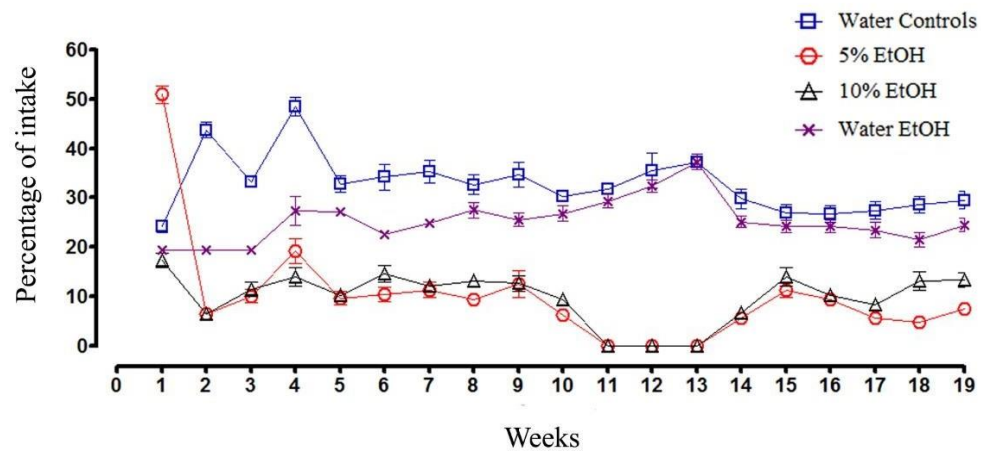


Figure 2: Percentage of volume intake during the 19 weeks of treatments of all groups. Blue squares represents the volume intake of CC and CA. The water, 5% ethanol and 10% ethanol intake of EC and EA groups are represented by the letter x, red circle and black triangle, respectively. The weeks 11, 12 and 13 represent ethanol withdrawal. The weeks 17, 18 and 19 represent alcohol adulteration with aversive flavor (quinine).

Fig. 3

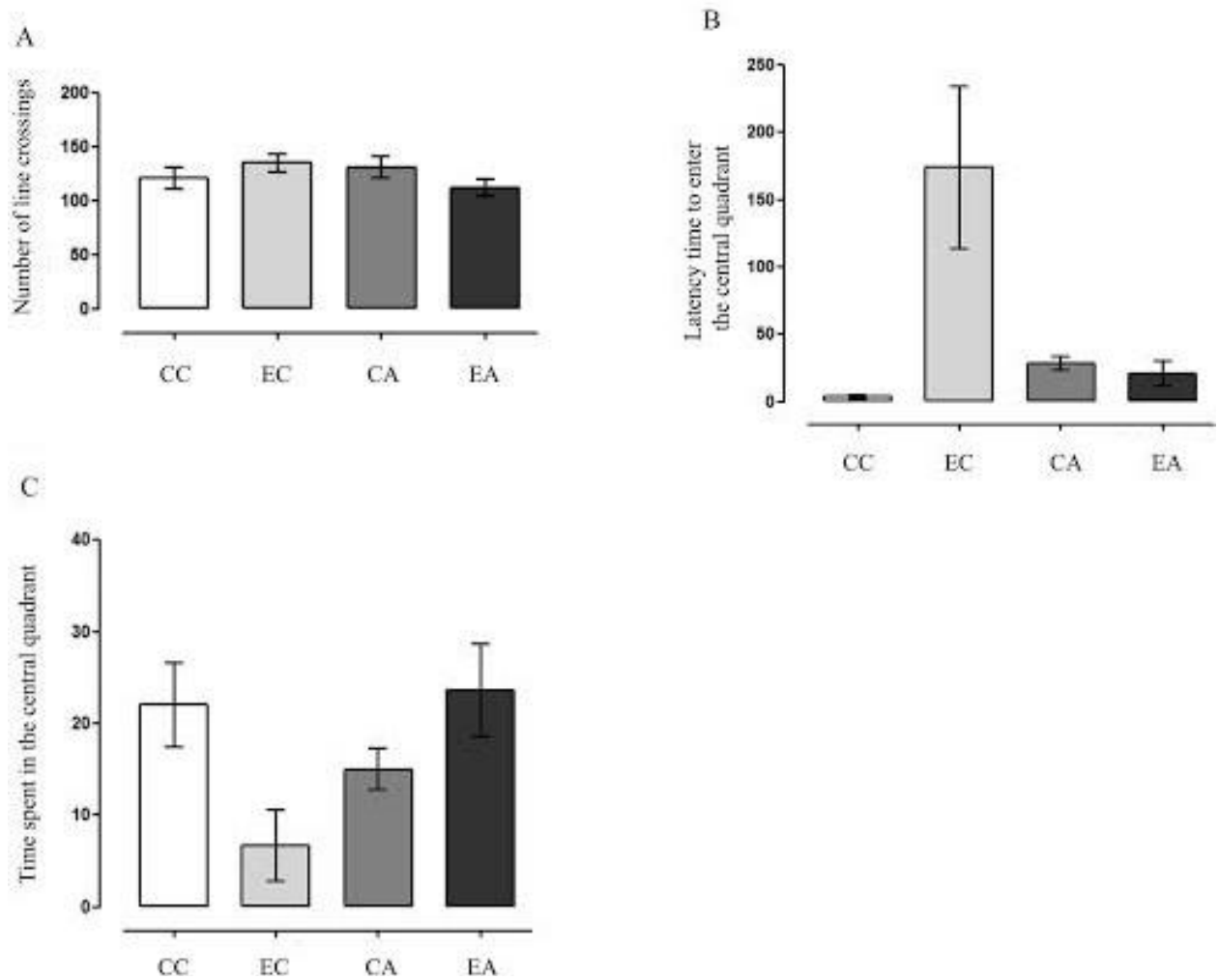


Figure 3: Open field test for locomotor and anxiety tasks. The rats were submitted to free choice model of chronic ethanol intake and Ayahuasca treatment. Locomotor activity represented by number of line crossings (A). Anxiety behavior represented by latency to enter the central quadrant (B) and time spent in the central quadrant (C). Each bar represents the average $\pm$ SE of 5 animals per group. All data were evaluated by two-way ANOVA after Bonferroni post-test and * represent statistically significant difference with $p < 0.05$ when compared to CC group.

Legend: CC - Control Group; EC - Ethanol treated group; CA - Ayahuasca treated group; EA - Ethanol and Ayahuasca treated group.

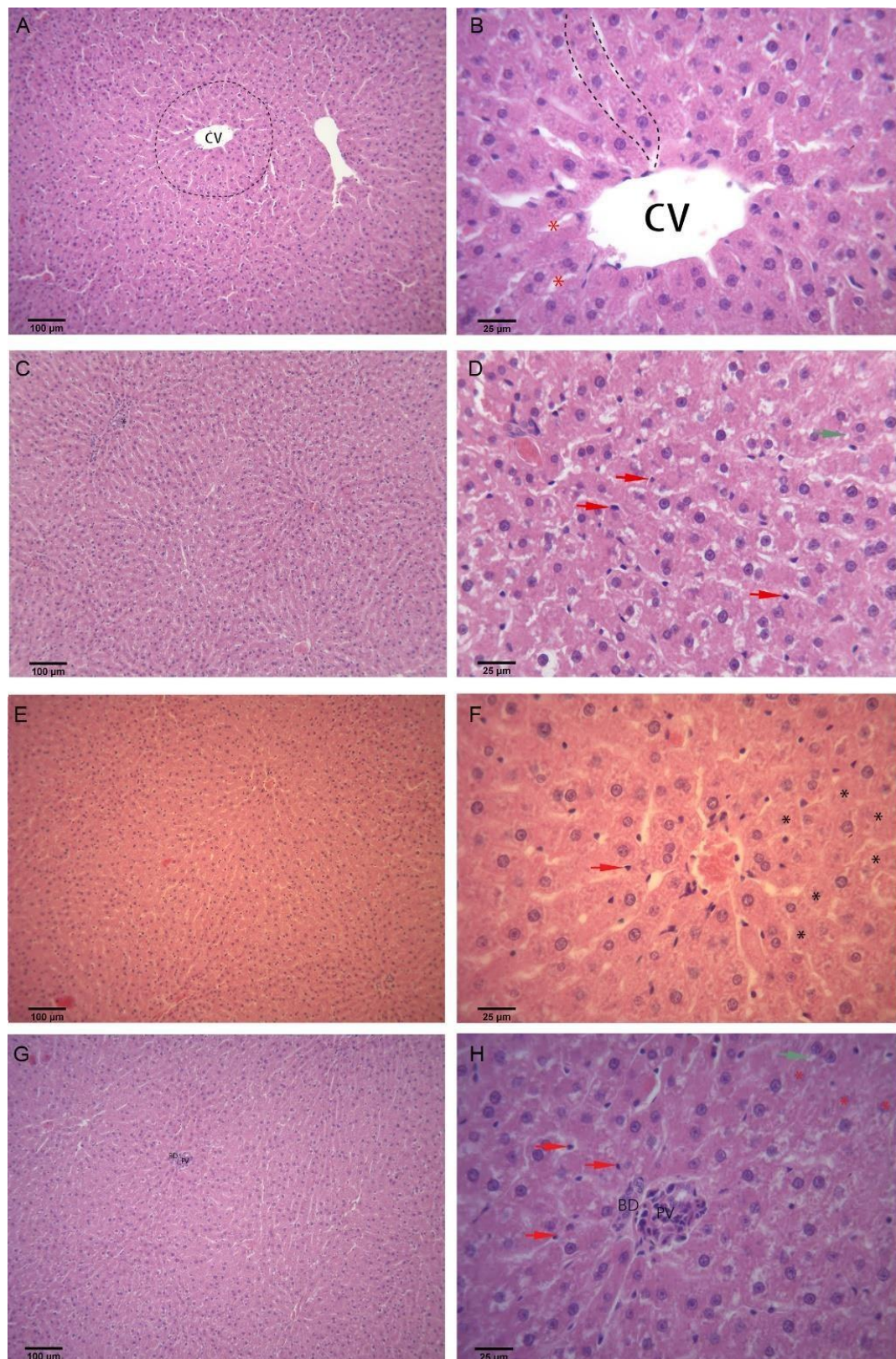


Figure 4: Liver photomicrography of all groups in original magnifications and Hematoxylin-eosin (H&E) coloring. CC: A- general aspect of hepatic parenchyma- H&E, 10x. B- Normal hepatic parenchyma, rows of hepatocytes converging to central

lobular vein (dotted black) and sinusoidal capillaries (red asterisks) -H&E, 40x. CA: C- general aspect of hepatic parenchyma - H&E, 10x. D - hepatocytes vacuolated (green arrow), Kupffer cells (red arrows) - H&E, 40x. EC: E- general aspect of hepatic parenchyma- H&E, 10x. F- Hypertrophy of Kupffer cells (red arrows), apoptosis (black asterisks)- H&E, 40x. EA: G- general aspect of hepatic parenchyma, Portal Treated (PT) with the presence of immune cells, Bile Duct (BD) in longitudinal section, hepatocytes vacuolated (green arrow), Hypertrophied Kupffer cells (red arrows), cell death (red asterisks) and consequent disorganization of lobular architecture- H&E, 40x. original magnifications

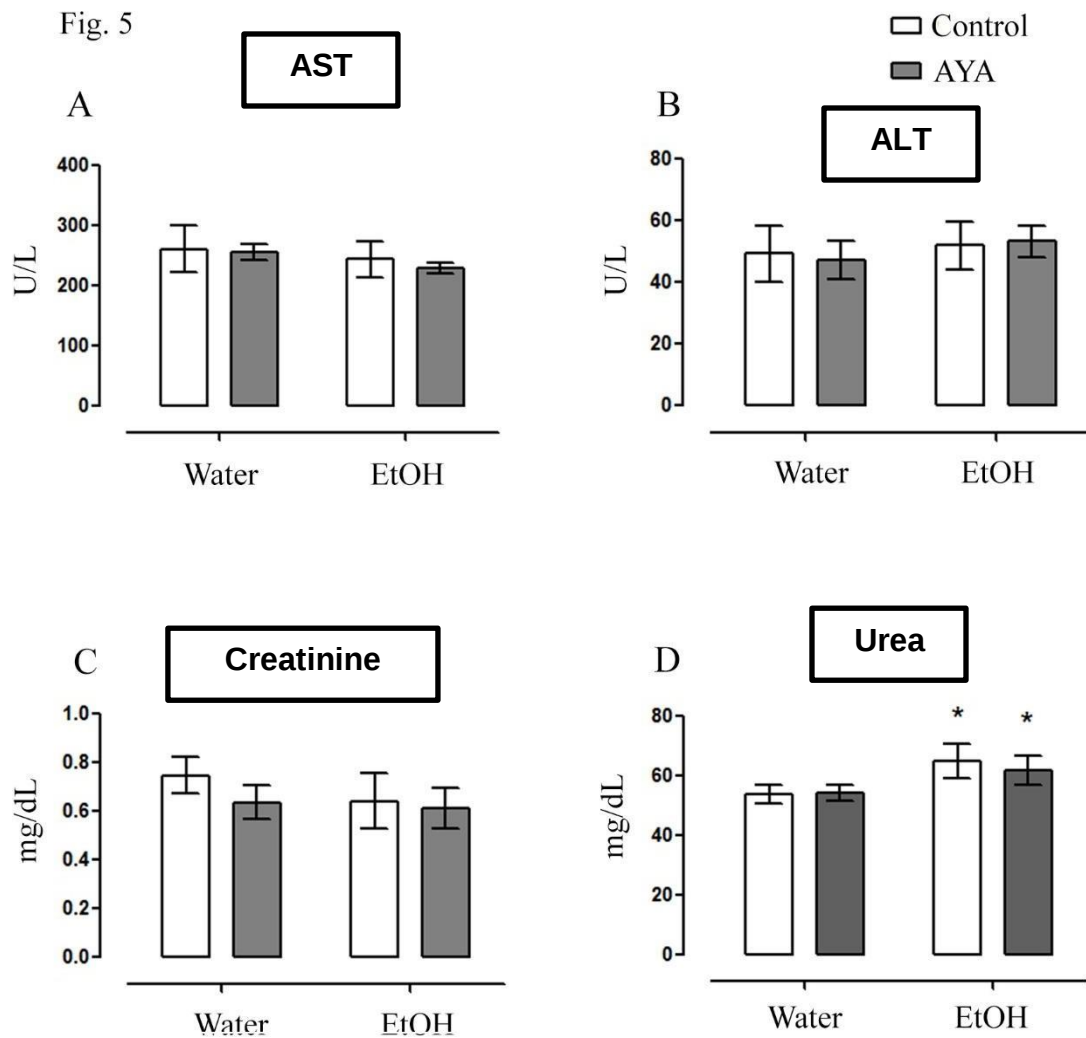


Figure 5: Biomarkers of liver and renal functions, AST (A), ALT (B), Creatinine (C), and Urea (D). Each bar represent the average $\pm$ S.D. of 5 animals per group. All data were evaluated by Two-way ANOVA after Bonferroni port-test and * represent significant statistical difference with $P < 0.05$ when compared to CC group.

Legend: AYA - Ayahausca; EtOH - Ethanol

5. Considerações Finais

Diante do exposto, verifica-se que é possível supor que o protocolo utilizado para o modelo de dependência química ao etanol foi validado sob os seguintes aspectos: os testes comportamentais demonstraram comportamento do tipo ansiogênico nos animais submetidos ao tratamento com etanol o qual foi prevenido pelo tratamento com Ayahuasca, a adulteração das soluções etílicas com sabor aversivo (quinino) não foi capaz de impedir a continuidade nem reduzir o consumo de etanol. Além disso, o consumo crônico de etanol foi capaz de promover comportamento tipo ansiogênico não só no período de abstinência, mas durante todo o tratamento, característica sugestiva de dependência ao etanol, Heilig (2010).

O tratamento com 7 doses de extrato seco de Ayahuasca, com intervalo de dois dias entre cada dose, equivalente a 500mg/kg de extrato seco liofilizado, não foi eficaz para prevenir o comportamento de consumo de etanol nem as alterações histológicas hepáticas.

Em relação à eficácia preventiva da Ayahuasca em relação ao comportamento tipo ansiogênico em ratos, pode estar relacionada ao controle do comportamento compulsivo à recaídas, em pessoas sob tratamento com Ayahuasca para transtornos do vício.

6. Referências

- ADACHI, K. et al. Studies on urea synthesis in the liver of rats treated chronically with ethanol using perfused livers, isolated hepatocytes, and mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 9, p. 1391-1399, 26 out. 1995.
- ALASMARI, F.; RAO, P. S. S.; SARI, Y. Effects of cefazolin and cefoperazone on glutamate transporter 1 isoforms and cystine/glutamate exchanger as well as alcohol drinking behavior in male alcohol-preferring rats. **Brain Research**, v. 1634, p. 150-157, 1 mar. 2016.
- ALLEN JR, L.; POPOVICH, N.; ANSEL, H. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. [s.l.] Artmed, 2013.
- ARTLINE FILMS. **Ayahuasca: Las Puertas de La Percepción**, [s.d.]. Disponível em: <<https://youtu.be/Dgoqg3Teq6M?t=13>>. Acesso em: 2 set. 2017
- BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, out. 2005.
- BRUHA, R.; DVORAK, K.; PETRTYL, J. Alcoholic liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 4, n. 3, p. 81-90, 27 mar. 2012.
- BUCHO, M. S. C. R. DA C. **Fisiopatologia da Doença Hepática Alcoólica**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2012.
- CALLAWAY, J. C. et al. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 492-497, out. 1996.
- CALLAWAY, J. C. et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 3, p. 243-256, jun. 1999.
- CARNICELLA, S.; RON, D.; BARAK, S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 48, n. 3, p. 243-252, maio 2014.
- CARR, D. F. et al. Towards better models and mechanistic biomarkers for drug-induced gastrointestinal injury. **Pharmacology & Therapeutics**, 27 jan. 2017.
- CHEN, Q. et al. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 5, p. 675-682, 1 maio 2005.
- CHUANG, C.-H. et al. Heat-Killed *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus johnsonii* Reduce Liver Injury Induced by Alcohol In Vitro and In Vivo. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 11, 31 out. 2016.
- COGNATO, G. P. et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases role in the pathophysiology of cognitive impairment induced by seizure in early age. **Neuroscience**, v. 180, p. 191-200, 28 abr. 2011.

COPLAN, J. D.; GORMAN, J. M. Detectable levels of fluoxetine metabolites after discontinuation: an unexpected serotonin syndrome. **The American Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 5, p. 837, maio 1993.

DOMÍNGUEZ-CLAVÉ, E. et al. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. **Brain Research Bulletin**, v. 126, n. Pt 1, p. 89-101, set. 2016.

DOS SANTOS, R. G. A critical evaluation of reports associating ayahuasca with life-threatening adverse reactions. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 45, n. 2, p. 179-188, jun. 2013.

FAVARO, V. M. et al. Effects of Long-Term Ayahuasca Administration on Memory and Anxiety in Rats. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. e0145840, 2015.

FERNANDO, C. D.; SOYSA, P. Evaluation of Hepatoprotective activity of Eriocaulon quinquangulare in vitro using porcine liver slices against ethanol induced liver toxicity and free radical scavenging capacity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, p. 74, 24 fev. 2016.

FILHO, G. B. **Bogliolo. Patologia**. 9. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2016.

FRANZEN, F.; GROSS, H. Tryptamine, N,N-dimethyltryptamine, N,N-dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. **Nature**, v. 206, n. 988, p. 1052, 5 jun. 1965.

GARRETT, M. C.; SOARES-DA-SILVA, P. Role of type A and B monoamine oxidase on the formation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in tissues from the brain of the rat. **Neuropharmacology**, v. 29, n. 10, p. 875-879, out. 1990.

GATES, B. New Names in Banisteriopsis and Diplopterys (Malpighiaceae) of the Guayana Highland. **Brittonia**, v. 31, n. 1, p. 108-109, 1979.

GEORGE, B. et al. Xenobiotic transporters and kidney injury. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 19 jan. 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZAGA, N. A. et al. Ethanol withdrawal induces anxiety-like effects: Role of nitric oxide synthase in the dorsal raphe nucleus of rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 52, p. 1-8, maio 2016.

GOODWIN, Frances LW; BERGERON, Natasha; AMIT, Zalman. Differences in the consumption of ethanol and flavored solutions in three strains of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 3, p. 357-362, 2000.

GRAMENZI, A. et al. Review article: alcoholic liver disease--pathophysiological aspects and risk factors. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, n. 8, p. 1151-1161, 15 out. 2006.

GUYTON, A. C. **Fisiologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HAKAMI, A. Y. et al. Effects of orally administered Augmentin on glutamate transporter 1, cystine-glutamate exchanger expression and ethanol intake in alcohol-preferring rats. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 316-322, 1 mar. 2017.

HEILIG, M. et al. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 670-684, 20 out. 2011.

HOPF, F. W. et al. Motivation for alcohol becomes resistant to quinine adulteration after 3 to 4 months of intermittent alcohol self-administration. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 9, p. 1565-1573, 1 set. 2010.

JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical Hypotheses**, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005.

KAARTINEN, K. et al. Alcohol consumption and kidney function in IgA glomerulonephritis. **Nephron. Clinical Practice**, v. 112, n. 2, p. c86-93, 2009.

KAMOUN, Z. et al. Hepatoprotective and nephroprotective effects of sardinelle (*Sardinella aurita*) protein hydrolysate against ethanol-induced oxidative stress in rats. **Environmental Science and Pollution Research International**, 25 out. 2016.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos: uma abordagem translacional**. [s.l: s.n.].

LABATE, B. C.; ARAÚJO, W. S. (EDS.). **O uso ritual da ayahuasca**. [São Paulo, Brazil?]: Campinas, SP, Brasil: FAPESP; Mercado de Letras, 2002.

LABATE, B. C.; FEENEY, K. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: implications and challenges. **The International Journal on Drug Policy**, v. 23, n. 2, p. 154-161, mar. 2012.

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, n. 1, p. 37-40, out. 1996.

LEE, S. Y.; KO, K. S. Effects of S-Adenosylmethionine and Its Combinations With Taurine and/or Betaine on Glutathione Homeostasis in Ethanol-induced Acute Hepatotoxicity. **Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 3, p. 164-172, set. 2016.

LIMA, E. G. C. **O uso ritual da Ayahuasca: da Floresta Amazônica aos centros urbanos**. Dissertação de Mestrado—Brasília: Universidade de Brasília, 2009.

LOIZAGA-VELDER, A.; VERRES, R. Therapeutic effects of ritual ayahuasca use in the treatment of substance dependence--qualitative results. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 46, n. 1, p. 63-72, mar. 2014.

LOXTON, D.; CANALES, J. J. Long-term cognitive, emotional and neurogenic alterations induced by alcohol and methamphetamine exposure in adolescent rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 74, p. 1-8, 6 mar. 2017.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. Autophagy Protects against CYP2E1/Chronic Ethanol-Induced Hepatotoxicity. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 2659-2674, 16 out. 2015.

MANI, V. et al. Antioxidant and anti-inflammatory role of zingerone in ethanol-induced hepatotoxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 421, n. 1-2, p. 169-181, out. 2016.

MCKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 2, p. 111-129, maio 2004.

MCKENNA, D. J.; CALLAWAY, J. C.; GROB, C. S. **The Heffter Review of Psychedelic Research**. [s.l: s.n.]. v. 1

MCKENNA, D. J.; TOWERS, G. H.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carboline constituents of ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 195-223, abr. 1984a.

MCKENNA, D. J.; TOWERS, G. H.; ABBOTT, F. S. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants Part 2: Constituents of orally-active Myristicaceous hallucinogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 2, p. 179-211, nov. 1984b.

MCKENNA, D.; RIBA, J. New World Tryptamine Hallucinogens and the Neuroscience of Ayahuasca. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, 6 fev. 2015.

MIWA, J. M. et al. The protoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 587-600, 7 set. 2006.

MORAES, J. A. DE. **Toxicidade aguda e crônica do chá de Ayahuasca (Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis), por análise Histológica em ratos Wistar**. Dissertação de Mestrado—Brasília: Universidade de Brasília, 2014.

MOTAGHINEJAD, M. et al. Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 87, p. 721-740, 14 jan. 2017.

NUNES, A. A. et al. Effects of Ayahuasca and its Alkaloids on Drug Dependence: A Systematic Literature Review of Quantitative Studies in Animals and Humans. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 48, n. 3, p. 195-205, ago. 2016.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. DE A.; BATISTUZZO, J. A. DE O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. [s.l.] Atheneu SP, 2014.

OLIVEIRA, C. D. R. DE et al. Neurobehavioral, reflexological and physical development of Wistar rat offspring exposed to ayahuasca during pregnancy and lactation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1065-1076, dez. 2011.

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. **Physiology & Behavior**, v. 142, p. 28-36, 1 abr. 2015.

OSÓRIO, F. DE L. et al. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. **Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 37, n. 1, p. 13-20, mar. 2015.

PASSOS, C. S. et al. Indole alkaloids of Psychotria as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors. **Phytochemistry**, v. 86, p. 8-20, fev. 2013.

PATRICK, C. J.; BERNAT, E. M. The construct of emotion as a bridge to between personality and psychopathology. In: KRUEGER, R. F.; TACKETT, J. L. (Eds.). **Personality and psychopathology**. New York, NY: Guilford Press, 2006. p. 174-209.

PIRES, A. P. S. et al. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage. **Phytochemical analysis: PCA**, v. 20, n. 2, p. 149-153, abr. 2009.

PIRES, A. P. S.; OLIVEIRA, C. D. R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: a review of pharmacological and toxicological aspects. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 31, n. 1, p. 15-23, 2010.

PULSINELLI, W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. **Lancet** (London, England), v. 339, n. 8792, p. 533-536, 29 fev. 1992.

RAFAEL GUIMARÃES DOS SANTOS. Ayahuasca: physiological and subjective effects, comparison with d-amphetamine, and repeated dose assessment. 2012.

RAO, P. S. S. et al. Effects of ampicillin, cefazolin and cefoperazone treatments on GLT-1 expressions in the mesocorticolimbic system and ethanol intake in alcohol-preferring rats. **Neuroscience**, v. 295, p. 164-174, 4 jun. 2015.

RAO, P. S. S.; SARI, Y. Effectiveness of ceftriaxone treatment in preventing relapse-like drinking behavior following long-term Ethanol dependence in P Rats. **Journal of addiction research & therapy**, v. 5, p. 1-12, 12 fev. 2014.

REGINATO, A. D. DE A. Regulamentação de uso de substância psicoativa para uso religioso: o caso da Ayahuasca. **TOMO**, v. 17, p. 58-78, 2010.

REISDORFER, E. et al. Prevalence and associated factors with alcohol use disorders among adults: a population-based study in southern Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 3, p. 582-594, set. 2012.

RIBA, J. et al. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 73-83, jul. 2003.

ROTELLA, F. M. et al. Baclofen differentially mediates fructose-conditioned flavor preference and quinine-conditioned flavor avoidance in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 775, p. 15-21, 15 mar. 2016.

SAMOYLENKO, V. et al. Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 357-367, 3 fev. 2010.

SANTOS, A. C. et al. Cardiovascular, Renal and Hepatic Effects Produced by Chronic Administration of Ayahuasca in Hypertensive Rats. **Revista Ciências em Saúde**, v. 3, n. 4, 2013.

SCHAEFER, R. M. et al. Catabolic effects of ethanol in chronically uremic rats. **Nephron**, v. 51, n. 1, p. 67-72, 1989.

SCHAEFFNER, E.; RITZ, E. Alcohol and kidney damage: a Janus-faced relationship. **Kidney International**, v. 81, n. 9, p. 816-818, maio 2012.

SCHAEFFNER, E. S. et al. Alcohol consumption and the risk of renal dysfunction in apparently healthy men. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n. 9, p. 1048-1053, 9 maio 2005.

SCHENBERG, E. E. Ayahuasca and cancer treatment. **SAGE open medicine**, v. 1, p. 2050312113508389, 2013.

SCHULTES, R. E.; HOFMANN, A.; RÄTSCH, C. **Plantas de los dioses: las fuerzas mágicas de las plantas alucinógenas**. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica, 2000.

SCHWARZ, M. J. et al. Activities of extract and constituents of Banisteriopsis caapi relevant to parkinsonism. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 627-633, jun. 2003.

SIMÕES, C. M. O.; MARIOT, A. (EDS.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. e ampliada ed. Florianópolis, SC: Porto Alegre, RS: Editora da UFSC; Editora da UFRGS, 2003.

SMITH, C. M.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica**. Porto Alegre (RS): Artmed, 2007.

SMITH, R. L. et al. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 61, n. 3, p. 323-330, nov. 1998.

SMITH, T. A. Tryptamine and related compounds in plants. **Phytochemistry**, v. 16, n. 2, p. 171-175, 1977.

SOLER, J. et al. Exploring the therapeutic potential of Ayahuasca: acute intake increases mindfulness-related capacities. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 5, p. 823-829, mar. 2016.

SUDDENDORF, R. F. Research on alcohol metabolism among Asians and its implications for understanding causes of alcoholism. **Public Health Reports (Washington, D.C.: 1974)**, v. 104, n. 6, p. 615-620, dez. 1989.

TESCHNER, M. et al. Chronic ethanol ingestion enhances catabolism and muscle protease activity in acutely uremic rats. **Nephron**, v. 50, n. 4, p. 338-344, 1988.

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

TÚRMINA, J. Â. **Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo Lasiodiplodia theobromae MMPI**. Dissertação de Mestrado—Guarapuava: Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2012.

WEN, J. et al. Protective effects of recombinant human cytoglobin against chronic alcohol-induced liver disease in vivo and in vitro. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41647, 27 jan. 2017.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health, 2014**. [s.l.: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Management of substance abuse**. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/facts/en/index.html>. Acesso em: 2 set. 2017.

ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 7 ago. 1998.

7. Obras Consultadas

FURASTÉ, Pedro Augusto. Normas técnicas para o trabalho científico: explicitação das normas da ABNT. 17.ed. Porto Alegre: Dáctilo Plus, 2014.

MORE: Mecanismo online para referências, versão 2.0. Florianópolis: UFSC Rexlab, 2013. Disponível em: < <http://www.more.ufsc.br/> >. Acesso em: 04/ 02/ 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS (UFPel). Manual para elaboração de Trabalhos Acadêmicos: Tese, Dissertação e Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCC) e de Especialização (TCPP). Pelotas. 2017.

Anexos

Anexo

