

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAROLINA APARECIDA DE FARIA ALMEIDA

**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL E SEUS
ANÁLOGOS, BEM COMO DO N,N-DIMETILTRIPTAMINA E DA HARMINA,
COMPONENTES DA AYAHUASCA, FRENTE À NEUROTOXICIDADE INDUZIDA
PELO ETANOL**

ALFENAS/MG

2024

CAROLINA APARECIDA DE FARIA ALMEIDA

**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL E SEUS
ANÁLOGOS, BEM COMO DO N,N-DIMETILTRIPTAMINA E DA HARMINA,
COMPONENTES DA AYAHUASCA, FRENTE À NEUROTOXICIDADE INDUZIDA
PELO ETANOL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

Coorientadores: Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia

Profa. Dra. Tania Marcourakis

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Almeida, Carolina Aparecida de Faria.

Estudo do potencial efeito neuroprotetor do canabidiol e seus análogos, bem como do N,N-dimetiltriptamina e da harmina, componentes da ayahuasca, frente à neurotoxicidade induzida pelo etanol / Carolina Aparecida de Faria Almeida. - Alfenas, MG, 2024.

127 f. : il. -

Orientador(a): Larissa Helena Lobo Torres Pacheco.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Canabidiol. 2. DMT. 3. HRM. 4. Alcoolismo. I. Pacheco, Larissa Helena Lobo Torres, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

CAROLINA APARECIDA DE FARIA ALMEIDA

"ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL E SEUS ANÁLOGOS, BEM COMO DO N,N-DIMETILTRIPTAMINA E DA HARMINA, COMPONENTES DA AYAHUASCA, FRENTE À NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO ETANOL"

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 12 de julho de 2024.

Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Lídia Emmanuela Wiazowski Spelta
Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão
Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Carla Speroni Cerpon
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Rafaela Figueiredo Rodrigues
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, Professor do Magistério Superior**, em 12/07/2024, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1288455** e o código CRC **62B7B19C**.

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus, à Virgem Maria e aos meus amigos santos. Também dedico à toda minha família, em especial à minha querida Tia Eni (em memória) e minha bisavó Maria Antônia, querida Vó Veia (em memória).

AGRADECIMENTOS

Não tem como pensar neste trabalho, neste tempo e não ser grata. Começar o doutorado parecia um sonho tão distante. Porém, este sonho chegou em 2020 e de um jeito muito melhor. Passei por muitos desafios, dentre eles me matricular nos primeiros dias de uma pandemia, mas com a graça divina e muito trabalho duro superei todos eles. Hoje meu coração se enche de alegria e gratidão, pois a menina sonhadora pode enfim dizer - assim como Santa Terezinha do Menino Jesus – que o Bom Deus seria incapaz de nos inspirar sonhos irrealizáveis. Assim, agradeço primeiramente à Deus, por ter me alcançado com tão grande ternura durante todo esse período, principalmente por me colocar sempre ao lado das melhores pessoas durante todo o trabalho. À virgem Maria, São José, Terezinha, Fracisco e Santa Rita por toda fiel intercessão.

À minha família, meus pais, Argeu e Cida, por sempre serem meu suporte e segurança e me darem todo amor. Meu irmão Daniel, por todo amor e ajuda. Minha cunhada Suzane, pelos conselhos e amizade. Meu irmão Thiago por me abraçar nos momentos de choro e mostrar que está sempre comigo. Minha cunhada Raquel por me amar. Meus sobrinhos, Arthur e Manuela, por serem minha alegria, meus melhores sorrisos e por me amarem incondicionalmente. Meus avós, Maria e Hélio, todos meus tios, tias, primos, primas e agregados por serem minha alegria e fazerem meus dias melhores quando estamos juntos. Por todos meus primos-sobrinhos. Crianças, vocês me trazem a paz e a leveza nos dias de dificuldade em cada sorriso e amor quando me chamam: “Tia Carol”. Família, vocês são a minha maior riqueza.

À Profa. Dra. Larissa Torres, por toda paciência, amor e dedicação. Por entender meus limites e sempre me ajudar a superá-los. Por acreditar sempre no meu trabalho. Por me fazer uma pesquisadora melhor, uma profissional melhor e uma mulher melhor. Por me ensinar no amor, apontando o que precisa ser melhorado e elogiando o que precisa ser elogiado. Sou muito grata a Deus, pela imensa graça de te ter como orientadora. Para mim, uma mãe “acadêmica” que faz tudo para o meu bem e que quer sempre o meu melhor. Obrigada Larissa, por ser muito mais do que você supostamente deveria ser e agregar sempre mais na minha formação.

Ao Prof. Dr. Raphael Garcia, que me acolheu em Diadema, me ensinou, orientou, me fez sair de mim e ainda não deixava faltar o sagrado chocolate nos dias de sexta-feira. Rapha, obrigada por dar sempre o seu melhor e fazer toda diferença na minha formação.

À Profa. Dra. Tania Marcourakis, por sempre me acolher na cidade universitária com tanto carinho, e se preocupar comigo. Gratidão Profa. por sempre me socorrer, e sempre orientar e ensinar com tanto amor.

A todos os colegas do LAFEC, por toda colaboração. Técnica Marilene, Profa. Dra. Marcinha, Profa. Dra. Lisandra, Profa. Dra. Carla por toda ajuda durante esse período. Pelos discentes, Renata, Thâmara, Bruna e todos os discentes do grupo de pesquisa pelo companherismo. Em especial, Jessyca e Alessandra, por toda amizade, choros, risadas, cafés e muito mais. Dividir esse tempo com vocês me fez muito melhor. Amo vocês. Aos alunos de iniciação científica, Camila, Ana Carolina e Fernanda, por toda ajuda nos protocolos comportamentais.

Aos colegas discentes do programa, Milton, Naiane e Tássia, gratidão por toda amizade, ajuda e por sempre compartilhar o conhecimento.

Aos alunos da Unifesp Diadema, Felype, Gabriela, Giulia, Luana, Fernanda e Isabela, por me acolherem, me ensinarem e me permitir ensinar e compartilhar conhecimento com vocês. Amo vocês.

Aos alunos da USP-SP, Vitor, Juliana, Gabriela e Mateus, por sempre me acolherem e me ajudarem. Vitor, não tenho palavras para expressar minha gratidão a você. Muito mais que um colaborador, aquele me acode quando preciso de ajuda, você é um grande amigo, que me ouve e me conforta quando preciso. Gratidão por toda ajuda, principalmente neste fim. Que São José cuide sempre de você.

Aos discentes da Unifesp Diadema, Gabriela e Weskley, por toda amizade e parceria, durante o período que trabalhei no mesmo laboratório. Por sempre me colocarem de cabeça erguida quando o dia estava meio cinzento. Por todos os cafés. Também ao Prof. Richard, por sempre ajudar e emprestar os equipamentos e materiais necessários.

À Profa. Dra. Liliam, por me acolher e me ajudar nas técnicas da cultura. A aluna Milena por sempre me alegrar com seu sorriso encantador.

A todos os docentes e discentes do Laboratorio Multidisciplinar de Saúde e Meio Ambiente (LABMSMA) por toda ajuda.

Ao Natepe – Unifesp Diadema, a todos os técnicos pela ajuda. Principalmente á técnica Rogéria, que além de me ajudar a usar o citometro, se tornou uma grande amiga.

À Profa. Dra. Daniela Chagas, ao discente Albert Neto e a todos do LFQMM por toda colaboração na extração dos compostos da ayahuasca.

Ao Prof. Dr. Cláudio Viegas, a discente Graziella Franco e a todos do PeQuim por toda colaboração na síntese dos análogos do canabidiol.

A todo pessoal do biotério da UNIFAL-MG, principalmente a técnica Érika por toda ajuda nos protocolos *in vivo*.

Aos laboratórios de fisiologia, bioquímica-clínica, bioquímica básica, toxicologia e genética humana da UNIFAL-MG, por toda ajuda com equipamentos e materias.

À minha querida psicóloga Maria Cláudia, por me ouvir e me ajudar a encontrar o meu melhor. Gratidão Maria.

Ao amigo e técnico Rafael Fernandes, por sempre me socorrer e me ajudar da melhor forma possível.

À toda Comunidade Mariana Resgate por toda ajuda, carinho, acolhimento e amor no inicio desta trajetória. Amo vocês.

Aos amigos, Flavi, Bruna, Lari, Beth, Pri, Raul, Doug, Aline, Vitor, Andrea, Camilinha, Cris, Yago, Luciara, Helen, Cristiano, e muitos outros por todo amor, carinho e oração. Amo muito vocês.

À amiga Fernanda por se fazer presente mesmo longe e sempre estar disposta a ouvir os audios, rir e chorar comigo. Amo você Fer.

À amiga Tamires, por me acolher diversas vezes, me fazer rir, deixar sempre tudo mais leve. Gratidão Tamis, amo você.

À amiga Renata, por me acolher, me aconselhar, me ajudar. Te amo Re.

À amiga Carla por toda ajuda e amizade nos mais diversos momentos

Ao Rei da Cana, na pessoa do meu Tio Gonzaga, meu irmão Thiago, meu primo Neto e demais funcionários, pelas caronas para o ABC paulista que tanto me ajudaram a concluir o experimento. E mais que isso, por todo amor, carinho, conversas, risadas, nas viagens de madrugada, nos cafés no rodoanel e na padaria. Gratidão.

À familia Goes Hamati, por me acolher sempre e me amarem.

À funcionária tercerizada, Rose, por todo carinho e atenção e por sempre estar pronta para me ajudar.

A todos os funcionários da limpeza e segurança da UNIFAL-MG, Unifesp Diadema e USP-SP por todo trabalho realizado.

Ao colegiado do PPGCF por todo ensinamento durante o tempo que realizei o trabalho de representante discente, por todo carinho e paciência, tantos nas reuniões, como nas comissões a qual fiz parte.

À secretária do PPGCF, Fabiana, por todo amor e carinho sempre que me recebia. Por sempre me ajudar em tudo. Amo você Fabi. Gratidão.

A todo PPGCF pela oportunidade de aprender, trabalhar e fazer ciência.

À USP-SP e a Unifesp Diadema por toda colaboração e auxílio durante este período

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

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – 141878/2020e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – 2017/21834-8.

RESUMO

O tratamento do transtorno por uso de álcool (TUA) é um desafio clínico, já que há alta incidência de recaída. Diversas substâncias, como psicodélicos, têm sido estudadas nesse contexto. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial terapêutico do canabidiol e seus análogos, do DMT e da HRM em modelos pré-clínicos relacionados ao TUA. Foram realizados estudos *in vivo* em camundongos para avaliar os efeitos ansiolítico e antidepressivo do canabidiol e seus análogos por meio do labirinto em cruz elevado e do nado forçado. Também foram avaliados os efeitos do DMT e da HRM, componentes da ayahuasca na sensibilização comportamental ao etanol. Foram realizados estudos *in vitro* para avaliar os efeitos do canabidiol e seus análogos, DMT e HRM frente à neurotoxicidade induzida pelo etanol. A maior concentração sem efeito neurotóxico (NOAEL) foi determinada para todos os compostos. O ensaio de brometo de tetrazólio (MTT) foi utilizado para a determinação da viabilidade celular, o teste de anexina/pi foi utilizado para ver as diferenças entre os estágios de morte celular, e as alterações moleculares foram avaliadas por meio do teste de e *Western blot* para Bax e Bcl-2. Nos ensaios *in vivo*, os resultados mostraram que o canabidiol (10 mg/Kg) e seus análogos PQM-242 (3 mg/Kg) e PQM-249 (1 mg/Kg) apresentaram efeito ansiolítico e antidepressivo. Já os resultados da ação do DMT, HRM e da associação DMT/HRM na sensibilização comportamental mostraram que somente a HRM foi capaz de atenuar a expressão da sensibilização. Nos ensaios *in vitro*, a neurotoxicidade do etanol induziu apoptose e apoptose tardia nas células SH-SY5Y e também aumento dos níveis de Bax. Todos os compostos, canabidiol e seus análogos PQM-242 e PQM-249, DMT, HRM na concentração de 10 μ M e associação de 1:2 DMT/HRM apresentaram efeito neuroprotetor, protegendo as células SH-SY5Y da apoptose e apoptose tardia induzida pelo etanol. Entretanto, somente o análogo PQM-242 foi capaz de bloquear o aumento dos níveis de Bax induzido pelo etanol.

Palavras-chave: Canabidiol, DMT, HRM, alcoolismo.

ABSTRACT

The treatment of alcohol use disorder (AUD) is a clinical challenge due to the high incidence of relapse. Several substances, such as psychedelics, have been studied in this context. The aim of this study was to investigate the therapeutic potential of cannabidiol and its analogues (PQM-242 and PQM-249), DMT and HRM, in preclinical models related to AUD. *In vivo* studies were carried out in Swiss mice to evaluate the anxiolytic and antidepressant effects of cannabidiol and its analogues through the elevated plus maze and forced swimming tests. The effects of DMT and HRM, components of ayahuasca, on behavioral sensitization to ethanol were also evaluated. *In vitro* studies were conducted to assess the effects of cannabidiol and its analogues, DMT, and HRM against ethanol-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. The highest non-toxic effect concentration (NOAEL) was determined for all compounds. The tetrazolium bromide (MTT) assay was used to determine cell viability, and cellular stages of death and molecular changes were evaluated using annexin/PI and Western blot tests for Bax and Bcl-2, respectively. In *in vivo* assays, cannabidiol (10 mg/kg) and its analogues PQM-242 (3 mg/kg) and PQM-249 (1 mg/kg) had anxiolytic and antidepressant effects. On behavioral sensitization protocol, only HRM was able to attenuate the expression of sensitization. In *in vitro* assays, ethanol-induced neurotoxicity caused apoptosis and late apoptosis in SH-SY5Y cells, and also increased Bax levels. All compounds - CBD and its analogues PQM-242 and PQM-249, DMT, HRM at a concentration of 10 μ M, and a 1:2 DMT/HRM association - showed a neuroprotective effect, protecting SH-SY5Y cells from apoptosis and late apoptosis induced by ethanol. However, only the PQM-242 analogue was able to block the increase in Bax levels induced by ethanol.

Keywords: Cannabidiol, DMT, HRM, alcoholism.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	ARTIGO 1 - HARMINA É CAPAZ DE ATENUAR A EXPRESSÃO DA SENSIBILIZAÇÃO AO ETANOL EM CAMUNDONGOS.....	16
3	ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO E ANTIDEPRESSIVO DO CANNABIDIOL E SEUS ANÁLOGOS.....	38
4	ARTIGO 3 - HARMINE (HRM) AND DIMETHYLTRYPTAMINE (DMT), AYAHUASCA COMPOUNDS, ISOLATED AND IN COMBINATION, PREVENT THE ETHANOL-INDUCED NEUROTOXICITY IN SH-SY5Y CELLS).....	72
5	ARTIGO - 4 NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CANNABIDIOL AND ITS ANALOGUES, PQM-242 AND PQM-249, AGAINST ETHANOL-INDUCED NEUROTOXICITY IN SH-SY5Y CELLS).....	99
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
	REFENRÊNCIAS	119
	APÊNDICES	120
	ANEXOS	126

1 INTRODUÇÃO GERAL

O consumo excessivo do etanol representa um grave problema de saúde pública, além de estar relacionado a problemas sociais e econômicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata, em seu último relatório publicado em 2018, que o consumo abusivo de etanol é responsável por mais de 3 milhões de mortes por ano, não contabilizando as pessoas que ficam incapacitadas pelos acidentes causados ou pelos danos lesivos do etanol ao organismo (World Health Organization, 2018). Com a pandemia COVID-19 houve um aumento no número de pessoas com transtornos relacionados ao uso do etanol nos Estados Unidos (Mcpheeters *et al.*, 2023). No Brasil, um relatório feito pelo governo do distrito de federal em junho de 2024, mostra que os valores de prevalência para o consumo abusivo de etanol no Brasil foram de 16,1% em 2006, 20,9% em 2020 e 18,3 em 2021 (Distrito Federal, 2022). O padrão de consumo do etanol e o volume ingerido, assim como casos de intoxicações e de transtorno pelo uso de etanol influenciam nas consequências de curto e longo prazo à saúde. Além disso, também podem ocorrer problemas sociais envolvendo terceiros, como acidentes de trânsito e violência doméstica (World Health Organization, 2018). O percentual de adultos brasileiros que conduziram veículos motorizados após o consumo abusivo de álcool, pelo menos uma vez em um período de 30 dias, foi de 1,4% em 2008, 7,3% em 2016 e de 5,3% em 2021 (Distrito Federal, 2022). Ainda, o uso de etanol foi responsável pela sétima principal causa de incapacidade e risco de morte precoce (Glantz *et al.*, 2020).

Tal uso pode levar a um transtorno classificado como transtorno por uso de substâncias, uma doença cíclica e crônica (Koob; Volkow, 2010; Vieta, 2016). No caso do etanol, é chamado de transtorno pelo uso de álcool (TUA). Quando o transtorno por uso de substâncias se estabelece, há uma perda total do controle da quantidade administrada, o que torna a droga mais importante do que aspectos básicos como alimentação e higienização (Nestler; Aghajanian, 1997). Além disso, quando ocorre privação da droga, o usuário entra na fase de abstinência, que é caracterizada por sintomas emocionais negativos, como ansiedade, depressão e irritabilidade. Tais sintomas representam um reforço negativo para o uso da droga, já que o usuário tende a buscar a substância para eliminar estes sintomas (Koob;

Volkow, 2010). Dessa forma, o transtorno por uso de substâncias é considerado uma forma de neurotoxicidade, que inclui alterações moleculares e comportamentais.

Nos Estados Unidos, no ano de 2021, quase 29,5 milhões de pessoas a partir dos 12 anos de idade foram diagnosticadas com TUA segundos os critérios do Manual de diagnóstico estatístico de transtornos mentais (DSM-5), sendo que somente cerca de 0,9% delas receberam tratamento farmacoterapêutico (McPheeters *et al.*, 2023). O tratamento do transtorno por uso de substâncias envolve abordagens multidisciplinares com acompanhamento psicológico e familiar, grupo de autoajuda, reabilitação neuropsicológica e psicossocial, ações preventivas e redução de danos. Na psicoterapia são realizadas terapias individuais e em grupos, as quais reconstruem a personalidade do paciente e melhora seu relacionamento com os que estão a sua volta (Coriale *et al.*, 2018). Na terapia medicamentosa, o tratamento é feito para amenizar o desconforto sintomático da retirada da substância e prevenir as recaídas. No caso do etanol, a naltrexona, um agonista do receptor μ , é utilizado para o tratamento do TUA (Burnette *et al.*, 2022). No entanto, tal tratamento medicamentoso não é efetivo, pois mais de 60% dos indivíduos tratados voltam a beber nos primeiros 12 meses (Burnette *et al.*, 2022; MERKX *et al.*, 2011). Este fato se deve a heterogeneidade inerente aos indivíduos que possuem TUA (Burnette *et al.*, 2022). Portanto, nenhum medicamento será eficaz a todos indivíduos que possuem o transtorno, e assim o desenvolvimento de possíveis opções na farmacoterapia mais eficazes e diversificadas é necessário (Burnette *et al.*, 2022).

Neste contexto, o desenvolvimento e estudo de novas substâncias com possíveis potenciais neuroprotetores são necessárias. O canabidiol, uma substância que constitui cerca de 40% dos extratos da planta *Cannabis sativa*, possui características ansiolíticas, depressivas, antipsicóticas e neuroprotetoras, sem apresentar efeito psicótico. Assim, substâncias sintetizadas a partir deste composto tornam-se uma estratégia terapêutica interessante, inclusive para o transtorno causado pelo uso de substâncias. Ainda, estudos indicam que substâncias com ações psicodélicas, como ayahuasca e seus alcaloides (como N,N-dimetiltriptamina, DMT e a β -carbolina, harmina, HRM), têm sido cada vez mais estudadas como possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento de ansiedade e depressão com características neuroprotetoras. Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo investigar o

potencial terapêutico de análogos do canabidiol, DMT e HRM em modelos pré-clínicos relacionados ao transtorno do uso de etanol. Para isso, os objetivos específicos dos ensaios *in vivo* são: avaliar o efeito ansiolítico e antidepressivo do canabidiol e dos seus análogos; e avaliar os efeitos do DMT e da HRM na sensibilização comportamental induzida pelo etanol. Já para os ensaios *in vitro* os objetivos específicos são: avaliar a neurotoxicidade do canabidiol, dos análogos do canabidiol, do DMT e da HRM a partir da construção de uma curva concentração resposta; avaliar o potencial neuroprotetor do canabidiol, dos análogos do canabidiol, do DMT e da HRM frente à neurotoxicidade induzida pelo etanol em cultura de células de neuroblastoma SH-SY5Y; e investigar alterações moleculares induzidas pelo etanol, canabidiol, análogos do canabidiol, DMT e HRM nas vias de ativação de apoptose. Com isso, o trabalho visa contribuir para consolidação de conhecimento na área, para que tais substâncias possam ser utilizadas com eficácia e segurança.

2 ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO N,N-DIMETILTRIPTAMINA (DMT) E DA HARMINA NA EXPRESSÃO DA SENSIBILIZAÇÃO AO ETANOL EM CAMUNDONGOS

Carolina Aparecida Faria Almeida¹, Renata Maria Leal de Souza¹, Jessyca Milene Ribeiro¹, Alessandra Oliveira Silva¹, Daniela Aparecida Chagas de Paula⁴, Albert Katchborian Neto⁴, Karina Camargo Teixeira⁴, Tania Marcourakis², Raphael Caio Tamborelli Garcia^{3*}, Larissa Helena Torres^{1*}

¹Departamento de alimentos e medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 13B, 05508-000, São Paulo/SP, Brazil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Rua São Nicolau, 210, 1º andar, 09913-030, Diadema/SP, Brazil.

⁴Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

Declaração de conflito de interesse: nenhum.

Endereço para correspondência

*Autor correspondente:

Larissa Helena Torres

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Centro - Alfenas/MG

CEP: 37130-001

Tel: +55-35-3701-9513

Email: larissa.torres@unifal-mg.edu.br

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Setor de Bioquímica, Farmacologia e Toxicologia

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas

Universidade Federal de São Paulo – Unifesp

Rua São Nicolau, 2010 – 1º andar

Centro – Diadema -SP

CEP: 09913-030

Tel: +55-11-33854137

e-mail: raphael.garcia@unifesp.br

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde relata que o consumo abusivo de etanol é um problema de saúde pública. Apesar de diversos fármacos serem utilizados no tratamento do transtorno do uso de álcool (TUA), ainda há uma alta incidência de recaída. Estudos indicam que substâncias com ações psicodélicas, como ayahuasca e seus alcaloides (como N,N-dimetiltriptamina, DMT e as β -carbolinas), têm sido cada vez mais estudadas como possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento do transtorno por uso de substâncias. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do DMT, principal componente ativo da ayahuasca, e da β -carbolina harmina (HRM), na sensibilização comportamental pelo etanol. Para tanto, o DMT foi extraído das folhas da *Psychotria viridis* e a HRM foi extraída do caule da *Banisteriopsis caapi*. Camundongos *Swiss* machos adultos foram submetidos ao ensaio de sensibilização comportamental ao etanol por meio da análise da atividade locomotora em campo aberto. Os animais sensibilizados ao etanol foram tratados com DMT, HRM ou DMT+HRM durante 9 dias no período de abstinência. No oitavo dia de tratamento foi realizado o teste labirinto em cruz elevado. Após o tratamento os animais foram desafiados com etanol para avaliar a expressão da sensibilização. Os resultados mostraram que houve aumento da atividade locomotora dos animais que receberam etanol durante o período da aquisição da sensibilização. Este aumento foi atenuado somente nos animais que foram tratados com harmina durante o período de abstinência. Nenhuma substância foi capaz de diminuir a ansiedade induzida pelo etanol. Os resultados sugerem que a harmina apresenta um melhor potencial no tratamento do TUA, contudo mais estudos são necessários para entender esse mecanismo.

Palavras chaves: Ayahuasca, alcoolismo, ansiedade.

1. INTRODUÇÃO

O etanol é uma substância lícita altamente consumida no mundo. Seu uso de forma abusiva representa grande risco à saúde da população, sendo esse responsável por cerca de 13,5% do total global de mortes de indivíduos pertencentes a faixa etária de 20 a 39 anos, como também por inúmeros casos de morbidade e incapacidade (OLIVEIRA et al.; 2023).

Segundo um estudo publicado em 2021 pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em consenso com a Organização mundial da Saúde (OMS), a doença hepática (63,9%), os distúrbios neuropsiquiátricos (27,4%) e o alcoolismo representam as principais causas de mortalidade ocasionada pelo uso nocivo de álcool. Além disso, o estudo aponta que em relação aos transtornos psiquiátricos, predomina-se os sintomas de depressão, ansiedade, agitação e hipomania durante o período de intoxicação e a síndrome de abstinência (LIMA et al.; 2022). A síndrome de abstinência do álcool é caracterizada por uma série de sintomas, os quais podem se manifestar em decorrência tanto da abstenção, quanto da diminuição do consumo da bebida alcoólica, após um período de 6 horas. Nesse período, há um decaimento dos níveis de dopamina, principalmente no núcleo accumbens (HAIDAR, 2018).

As intervenções farmacológicas e não farmacológicas envolvidas no tratamento da dependência ao etanol, englobam tanto o uso de medicamentos aversivos, antidepressivos e ansiolíticos, como também o apoio terapêutico proporcionado pela adesão dos pacientes a terapias psicológicas e em grupos de apoio. Apesar da elevada eficácia do tratamento, ainda há casos de reincidência à dependência, o que reflete na necessidade da procura de novos agentes terapêuticos (LARANJEIRA et al.; 2000). O uso de substâncias alucinógenas, como ayahuasca, ibogaína e ácido lisérgico, tem sido estudado como estratégias para o tratamento da dependência (RODRIGUES, 2022).

A ayahuasca, também conhecida como “cipó de morto” ou “vinho das almas”, é uma bebida utilizada em rituais religiosos, preparada através do cozimento de duas espécies de plantas, denominadas *Psychotria viridis* e *Banisteriopsis caapi*, as

quais possuem em sua composição dimetilriptamina (DMT) e alcalóides β -carbolinas, tais como harmina (HRM), harmalina e tetrahydroharmina (MARTINS et al.; 2022). O DMT é caracterizado como agonista não seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}, tendo também afinidade por outros receptores de serotonina, dopamina e acetilcolina, enquanto os alcaloides β -carbonilas atuam como inibidores de monoamina oxidase (MAO) (LOPES, 2023). Nesse contexto, o presente trabalho visa investigar o potencial terapêutico do DMT e da β -carbolina HRM, em associação e isolados, na sensibilização comportamental pelo etanol.

2. METÓDOS

2.1 EXTRAÇÃO DO DMT E DA HRM

A extração do DMT e da HRM foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas do Laboratório de Fitoquímica, Química medicinal é Metabolômica (LFQMM). Os extratos puros hidroetanólicos (7:3 etanol:H₂O, v/v, 0,1% de ácido acético) foram preparados: um apenas de folhas de *P. viridis* (CEP) e o outro apenas de cipós de *B. caapi* (CEB). O processo extrativo foi auxiliado por maceração, sendo o solvente renovado a cada 24 horas por 3 dias. Posteriormente, os extratos foram filtrados e secos em rotaevaporador a 40 °C. Um fracionamento ácido-base foi realizado para todos os extratos (CEB e CEP). Inicialmente, os extratos foram acidificados com 15% HCl (v/v) para pH 2,0. A extração líquido-líquido foi realizada com solventes orgânicos de polaridades crescentes. Hexano foi adicionado ao extrato bruto e particionado. Após isso, a partição foi feita com acetato de etila (EAF); a fração restante foi basificada com NaOH 15% (v/v) até pH 8,0 e novamente particionada com acetato de etila para obtenção dos alcaloides (ALK) e das frações hidroalcólicas (HAL). Todas as frações foram submetidas à CCD. O reagente de Dragendorff foi utilizado na fração ALK para confirmar a presença de alcaloides.

As frações dos alcaloides de *P. viridis* e *B. caapi* (ALKP e ALKB, respectivamente) foram submetidas à cromatografia em coluna para isolamento dos compostos majoritários. Sílica gel (o tamanho da partícula era de 40–63 μ m, 230–400 Mesh) foi usado para cromatografia flash. As análises foram realizadas em

colunas de vidro (3 cm de diâmetro e 30 cm de altura), acopladas a um sistema de pressão. Um método de gradiente foi aplicado para ALKB e ALKP usando a mistura CHCl_3 :MeOH como eluente. Iniciou-se com 100% de clorofórmio até a fase móvel atingir 50% de cada solvente, seguido de eluição final usando 100% de metanol. Todas as fases móveis foram acidificadas com ácido acético a 1%. Em seguida, as amostras foram analisadas por CDD e reveladas sob análise de UV e reagente de Dragendorff. Assim, foi possível agrupar frações com perfis semelhantes. Subfração 5 obtida a partir de cromatografia flash ALKB mostrou um ponto de CCD intenso. O precipitado se separou rapidamente do sobrenadante. Posteriormente, foi possível recrystalizar o sobrenadante obtido porque o precipitado era preferencialmente solúvel em CHCl_3 e o sobrenadante em MeOH.

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com livre acesso à água e comida (ração para roedores Nuvilab CR1®), temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de doze horas (luz ligada às 7 horas). Todos os experimentos foram realizados no período claro. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética desta instituição (CEUA UNIFAL-MG 0066/2021).

2.3 SUBSTÂNCIAS

O DMT e HRM foram obtidos por extração, recrystalizados e posteriormente diluídos em DMSO 0,5% para que fosse possível administrar por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1,76 mg/Kg de DMT e 1,23 mg/Kg de HRM. O etanol (EtOH) (Merck do Brasil, S.A.) foi administrado em uma solução de 15% (v/v), preparada com solução salina (NaCl 0,9%) na dose de 2,2 g/Kg. Solução de salina ou DMSO 0,5% em salina foi utilizada como solução controle (SAL). Todas as injeções foram administradas por via intraperitoneal (i.p.).

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

O ensaio de sensibilização comportamental consistiu em duas fases: aquisição e expressão da sensibilização. Para que ocorresse o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, nos três primeiros dias do experimento os animais foram expostos durante 10 minutos ao campo aberto após 5 minutos a injeção de salina. Este procedimento permitiu uma habituação dos animais ao aparelho de observação. No quarto dia, os animais receberam uma injeção de salina ou etanol na dose de 2,2 g/Kg de animal, de acordo com o grupo experimental, e após 5 minutos da aplicação, a atividade locomotora foi quantificada durante 10 minutos em campo aberto. Este procedimento foi repetido cinco vezes em dias alternados, conforme descrito por Almeida et al. (2022).

O tratamento com o DMT e HRM (isolados e em associação) foi realizado durante nove dias, após a aquisição da sensibilização, da seguinte forma: os animais receberam via oral salina, DMT, HRM ou DMT+HRM, de acordo com o grupo experimental, na dose de 1,76 mg/Kg de DMT e 1,23 mg/Kg de HRM (ALMEIDA et al., 2022). Após a ingestão, foram colocados novamente nas caixas e depois de 40 minutos foram posicionados em campo aberto por 10 minutos. No oitavo dia de tratamento, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado. Após o período de tratamento, realizou-se a análise da expressão da sensibilização (desafio), quando os animais receberam uma injeção de etanol e após o período de 5 minutos foram expostos ao campo aberto para análise da atividade locomotora durante 10 minutos. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos camundongos, as observações de todos os animais foram realizadas sempre em um horário específico, sendo o horário da manhã o escolhido (7h30min às 11h30min). O registro da atividade foi realizado com uma câmera digital. O software EthoVision® (Noldus, The Netherlands) foi utilizado para quantificar a distância percorrida por cada animal.

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

- Grupo S/S/E (n=10): animais que receberam salina durante a aquisição

da sensibilização comportamental, salina durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

- Grupo S/D/E (n=10): animais que receberam salina durante a aquisição da sensibilização comportamental, DMT durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

- Grupo S/H/E (n=10): animais que receberam salina durante a aquisição da sensibilização comportamental, HRM durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

- Grupo S/DH/E (n=10): animais que receberam salina durante a aquisição da sensibilização comportamental, DMT+HRM durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

- Grupo E/S/E (n=15): animais que receberam etanol durante a aquisição da sensibilização comportamental, salina durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

- Grupo E/D/E (n=15): animais que receberam etanol durante a aquisição da sensibilização comportamental, DMT durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

- Grupo E/H/E (n=15): animais que receberam etanol durante a aquisição da sensibilização comportamental, HRM durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

- Grupo E/DH/E (n=15): animais que receberam etanol durante a aquisição da sensibilização comportamental, DMT + HRM durante o período de abstinência e etanol para avaliar a expressão da sensibilização.

2.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

A atividade locomotora dos animais foi avaliada por meio de campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 40 cm de altura) (BROADHURST, 1960). Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto e a atividade locomotora dos animais foi observada por um

período de 10 minutos. Após cada observação, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool-água 5%, antes da introdução do próximo animal, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior.

O labirinto em cruz elevado, principal equipamento para avaliar ansiedade em roedores, consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho com paredes de 20 cm de altura, elevado a 60 cm do chão. Os braços similares são cruzados em ângulo reto e ligados através de uma área central. O comportamento natural do animal é permanecer por mais tempo nos braços fechados, pois se trata de um local onde o animal se sente seguro. O aumento do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos indica efeito ansiolítico da substância testada (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; PELLOW et al., 1985). Foi observado o tempo de permanência na exploração dos braços abertos e o número de entrada nos braços abertos um período de 5 minutos. O índice de ansiedade dos animais foi calculado da seguinte maneira: índice de ansiedade = $1 - \{([\text{Tempo gasto nos braços abertos}/\text{Tempo de duração do teste}] + [\text{Número de entradas nos braços abertos}/\text{Total do número de entradas}])/2\}$ (CONTRERAS et al., 2014).

Também foram avaliados os parâmetros *grooming* e *head dipping* de cada animal (REEVES et al., 2016; RODGERS et al., 1997; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). O *grooming* é um comportamento natural de autolimpeza do animal (lamber das patas dianteiras, patas traseiras e pernas; nariz, face e lavagem da cabeça; fricção oral direcionada para região anogenital ou cauda). A prática excessiva de *grooming* caracteriza um comportamento compulsivo, que está relacionado à situação de estresse e não com a sujeira da pele do animal (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992; VAN ERP et al., 1994). O *head dipping* se caracteriza pela exploração dos animais nos braços abertos, quando o animal abaixa a cabeça o suficiente para que os olhos desapareçam. É um comportamento considerado de avaliação de risco ou de função exploratória, sendo utilizado como parâmetro complementar para avaliar a ansiedade (HOSHINO; UGA; DE PAULA, 2004).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

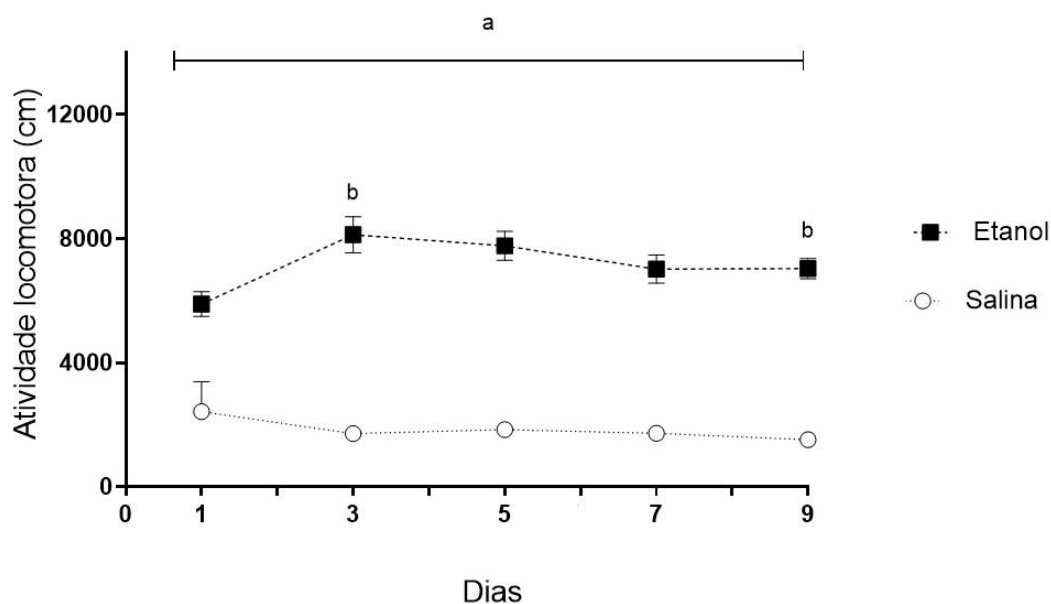
Os dados da atividade locomotora da fase de aquisição da sensibilização e a comparação do D1 (aquisição da sensibilização) com o dia do defasio (expressão da sensibilização) foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguido do pós-teste *Newman-Keuls*. Os dados da atividade locomotora da fase da expressão da sensibilização foram analisados por ANOVA factorial, seguido do pós-teste LSD. Os dados dos parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevado na fase de abstinência foram analisados por ANOVA factorial, seguido do pós-teste *Newman-Keuls*. O *software Statistic 7.0* (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para analisar dados comportamentais. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os dados foram relatados como média \pm EPM. Todos os dados foram plotados pelo *software GraphPad Prism* versão 8.0.

3. RESULTADOS

3.1 AQUISIÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO

A Figura 1 apresenta a atividade locomotora dos animais tratados com salina ou etanol no campo aberto durante os dias da aquisição da sensibilização (Dias: 1, 3, 5, 7 e 9) em um período de 10 minutos. O grupo etanol apresenta maior atividade locomotora em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). No dia 9 da aquisição da sensibilização, o grupo etanol apresentou um aumento da atividade locomotora em relação ao dia 1 da aquisição da sensibilização.

Figura 1: Curva temporal da aquisição da sensibilização



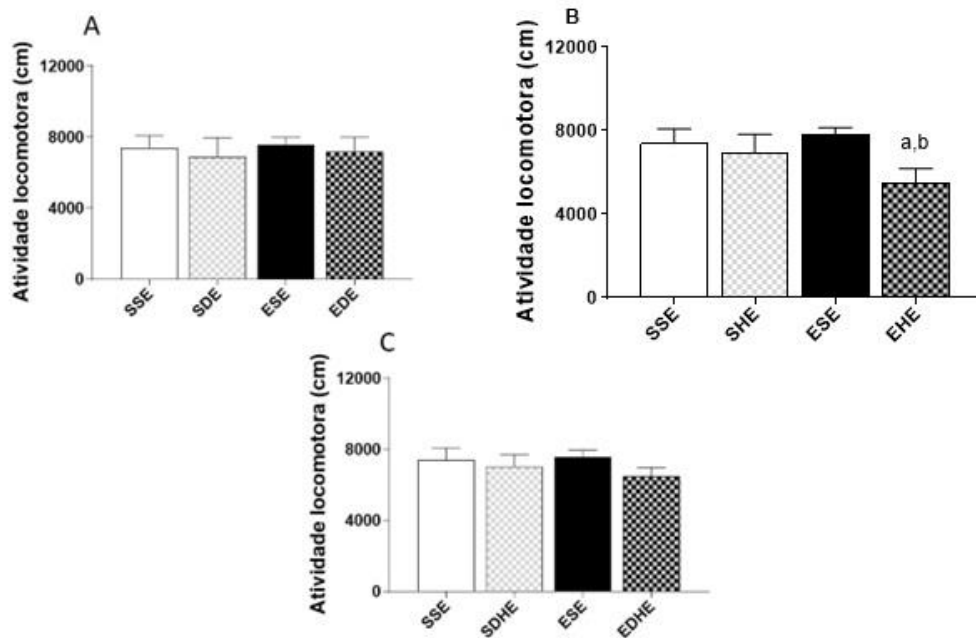
Fonte: Da autora

Nota: Distância total percorrida em campo aberto na aquisição da sensibilização. Dados expressos em cm (média \pm EPM). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *Newman-Keuls*. a) Grupo etanol vs grupo controle, $p < 0,05$; b) Comparação com D1 do mesmo grupo experimental, $p < 0,05$.

3.2 EXPRESSÃO DA SENSIBILIZAÇÃO

A Figura 2 apresenta a atividade locomotora em campo aberto na expressão da sensibilização (dia do desafio) nos animais que foram previamente tratados com salina ou etanol durante a aquisição da sensibilização e com DMT (Figura 2A), HRM (Figura 2B) ou DMT/HRM (Figura 2C) durante a fase de abstinência do etanol e que receberam etanol no dia do desafio. ANOVA fatorial mostrou que houve uma diminuição na atividade locomotora no grupo EHE em comparação com os grupos SSE e ESE ($p < 0,05$). A Figura 3 apresenta a comparação entre a aquisição da sensibilização (dia 1) e a expressão da sensibilização (Desafio). ANOVA medidas repetidas mostrou que houve aumento na atividade locomotora dos animais no dia do desafio em comparação com o dia 1 ($p < 0,05$).

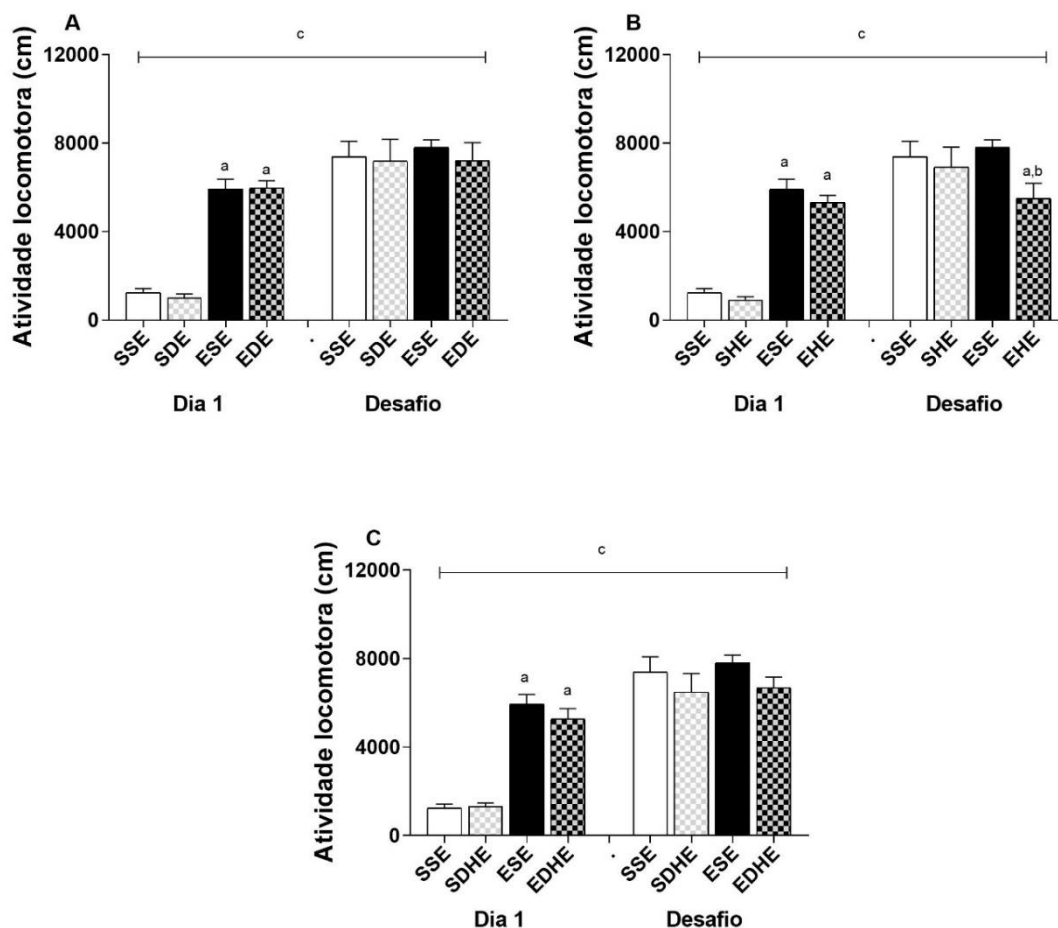
Figura 2: Expressão da sensibilização



Fonte: Da autora

Nota: Distância total percorrida em campo aberto na expressão da sensibilização. Dados expressos em cm (média \pm EPM). A) DMT; B) HRM; C) DMT/HRM. ANOVA fatorial, seguido do teste LSD. a: $p < 0,05$ em comparação com o grupo SSE; b: $p < 0,05$ em comparação com o grupo ESE.

Figura 3: Comparação entre a aquisição e a expressão da sensibilização



Fonte: Da autora

Nota: Distância total percorrida em campo aberto na expressão da sensibilização. Dados expressos em cm (média \pm EPM). A) DMT; B) HRM; C) DMT/HRM. ANOVA medidas repetidas, seguido do teste *Newman-Keuls*. a: $p < 0,05$ em comparação com o grupo SSE; b: $p < 0,05$ em comparação com o grupo ESE.

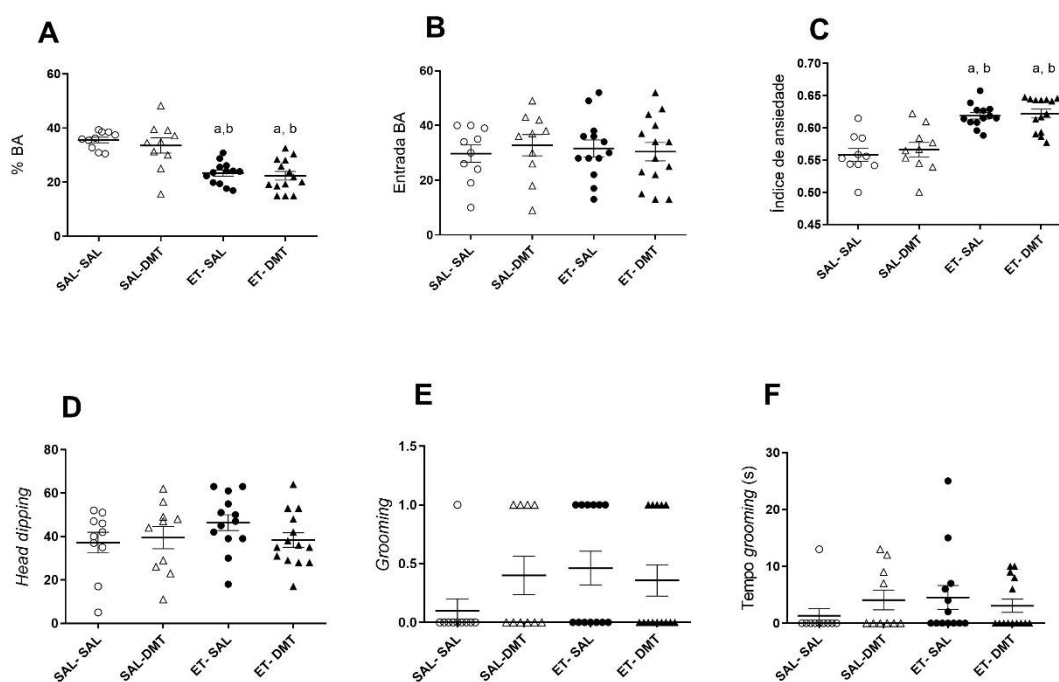
3.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

3.3.1 DMT

A Figura 4 apresenta os diferentes parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado para os animais que receberam tratamento com DMT. É possível observar que os animais que receberam etanol na aquisição da sensibilização e salina (ET-SAL) ou DMT (ET-DMT) durante o tratamento apresentaram uma diminuição da porcentagem de

tempo nos braços abertos (Figura 4A), bem como aumento no índice de ansiedade (Figura 4C) em comparação com os grupos SAL-SAL ($p < 0,05$) e SAL-DMT ($p < 0,05$). Os demais parâmetros analisados, número de entrada nos braços abertos (Figura 4B); frequência de *head dipping* (Figura 4D); e frequência (Figura 4E) e tempo de *grooming* (Figura 4F), não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 4: Parâmetros do Labirinto em cruz elevado – animais tratados com DMT



Fonte: Da autora

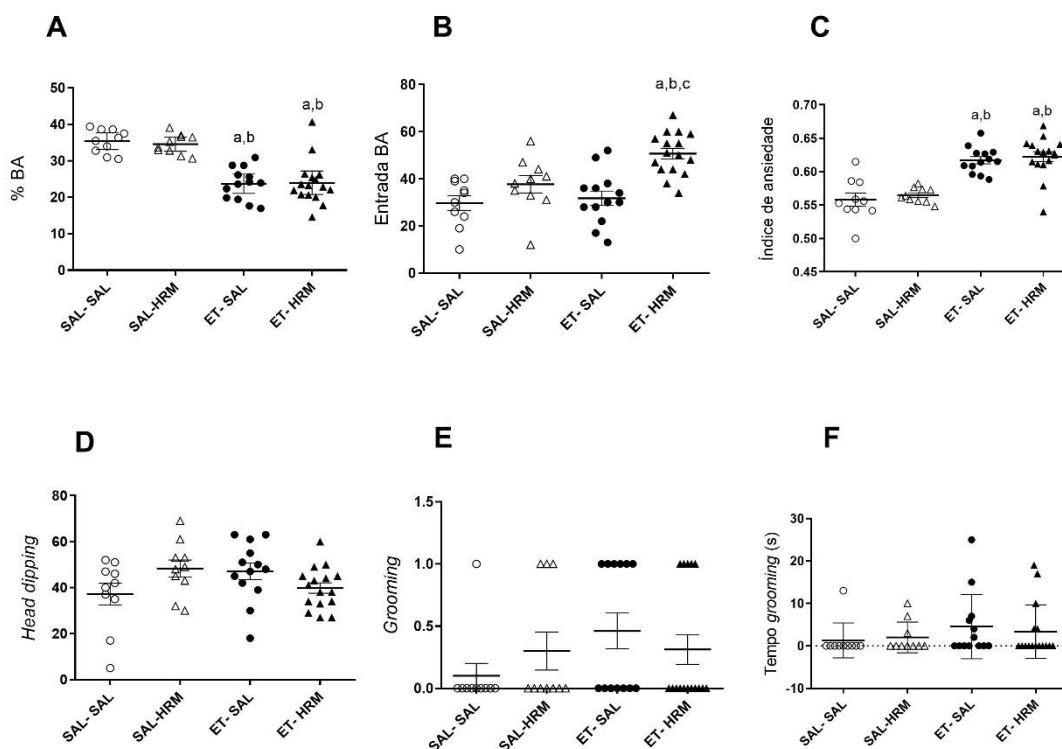
Nota: Análise dos parâmetros no teste de labirinto em cruz elevado durante 5 minutos dos animais previamente tratados com solução controle e DMT na dose de 1,76 mg/kg. (A) Porcentagem de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência no labirinto em cruz elevado (5 minutos). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. (B) Número de entrada nos braços. Dados expressos em número absolutos. (C) Índice de ansiedade. Dados expressos em número absolutos. (D) Frequência de *head dipping*. Dados expressos em número absolutos. (E) Frequência de *grooming*. Dados expressos em número absolutos. (F) Tempo total de *grooming*. Dados expressos em segundos. Grupos: SAL-SAL, SAL-DMT, ET-SAL e ET-DMT. ANOVA fatorial, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-SAL, (b) $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-DMT.

3.3.2 HRM

A Figura 5 apresenta os diferentes parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado para os animais que receberam HRM. As Figuras 5A e 5C demonstram a

porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e o índice de ansiedade dos animais. É possível observar que ambos os grupos que receberam etanol na aquisição da sensibilização e tiveram ou não o tratamento com HRM (ET-SAL; ET-HRM) apresentaram uma diminuição da porcentagem de tempo nos braços abertos e aumento do índice de ansiedade em comparação com os grupos SAL-SAL ($p < 0,05$) e SAL-HRM ($p < 0,05$). Os animais que receberam etanol na aquisição da sensibilização e tiveram o tratamento com HRM apresentaram uma elevação do número de entrada nos braços abertos em comparação com os grupos SAL-SAL ($p < 0,05$), SAL-HRM ($p < 0,05$) e ET-SAL ($p < 0,05$) (Figura 5B). Os demais parâmetros analisados (frequência de *head dipping*, frequência e tempo total de *grooming*) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Figuras 5D-F).

Figura 5: Parâmetros do Labirinto em cruz elevado – animais tratados com HRM



Fonte: Da autora

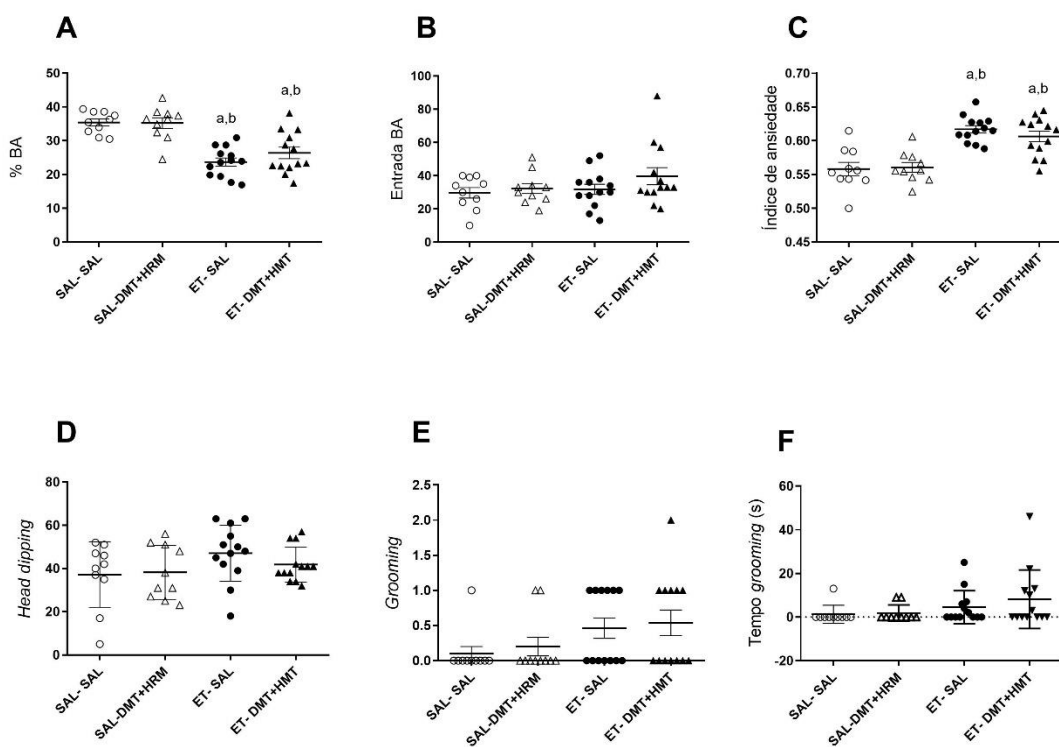
Nota: Análise dos parâmetros no teste de labirinto em cruz elevado durante 5 minutos dos animais previamente tratados com solução controle e HRM na dose de 1,23 mg/kg. (A) Porcentagem de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência no labirinto em cruz elevado (5 minutos). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. (B) Número de entrada nos braços. Dados expressos em número absolutos. (C) Índice de ansiedade. Dados expressos em número absolutos. (D) Frequência de *head dipping*. Dados expressos em número absolutos. (E) Frequência de *grooming*. Dados expressos em número absolutos. (F) Tempo total de

grooming. Grupos: SAL-SAL, SAL-HRM, ET-SAL e ET-HRM. ANOVA fatorial, seguido do teste Newman-Keuls. (a) $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-SAL, (b) $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-HRM, (c) $p < 0,05$ em relação ao grupo ETANOL-SALINA.

3.3.3 DMT e HRM

A Figura 6 apresenta os diferentes parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado para os animais que receberam associação de DMT + HRM. As Figuras 6A e 6B mostram a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e o índice de ansiedade dos animais. É possível observar que ambos os grupos que receberam etanol na aquisição da sensibilização e tiveram ou não tratamento com DMT + HRM (ET-SAL; ET-DMT+HRM) apresentaram uma diminuição da porcentagem de tempo nos braços abertos e aumento no índice de ansiedade em comparação com os grupos SAL-SAL ($p < 0,05$) e SAL-DMT+HRM ($p < 0,05$). Os demais parâmetros analisados (número de entrada nos braços abertos, frequência de *head dipping*, frequência e tempo de *grooming*) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 6B, 6D-F).

Figura 6: Parâmetros do Labirinto em cruz elevado – animais tratados com DMT + HRM.



Fonte: Da autora

Nota: Análise dos parâmetros no teste de labirinto em cruz elevado durante 5 minutos dos animais previamente tratados com solução controle e DMT+ HRM na dose de 1,76 mg/kg e 1,23 mg/Kg, respectivamente. (A) Porcentagem de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência no labirinto em cruz elevado (5 minutos). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. (B) Número de entrada nos braços. Dados expressos em número absolutos. (C) Índice de ansiedade. Dados expressos em número absolutos. (D) Frequência de *head dipping*. Dados expressos em número absolutos. (E) Frequência de *grooming*. Dados expressos em número absolutos. (F) Tempo total de *grooming*. Dados expressos em segundos. Grupos: SAL-SAL, SAL-DMT+HRM, ET-SAL e ETDMT+ HRM. ANOVA fatorial, seguido do teste *Newman-Keuls*. (b) $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-DMT+HRM.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os animais tiveram uma aquisição da sensibilização ao etanol e apresentaram um comportamento ansioso durante o período de abstinência ao etanol. Ainda, a HRM foi capaz de atenuar a expressão da sensibilização. Apesar da HRM ter sido a única substância capaz de aumentar o número de entradas nos braços abertos, o índice de ansiedade também aumentou neste grupo, sugerindo que não houve efeito ansiolítico.

Estudos anteriores sobre o TUA que também usaram a sensibilização comportamental em roedores como protocolo, mostraram que a administração de etanol em dias alternados foi capaz de aumentar a atividade locomotora dos animais na aquisição da sensibilização, corroborando com o nosso estudo (ALMEIDA et al., 2022; OLIVEIRA-LIMA et al., 2015). A aquisição é um termo operacional referente aos efeitos moleculares e celulares imediatos que induzem a sensibilização, ou seja, a aquisição da sensibilização refere-se ao desenvolvimento desta, em que se observam alterações em nível celular e molecular em neurônios de diferentes regiões cerebrais (STEKETEE; KALIVAS, 2011). Tais alterações são associadas ao aumento da liberação de glutamato e de dopamina, que estão relacionados à ocorrência de uma potenciação de longa duração (UNGLESS et al., 2001).

Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa mostrou que o tratamento com ayahuasca na dose de 1,76 mg de DMT/Kg durante a fase de abstinência foi eficaz na diminuição da expressão da sensibilização comportamental pelo etanol em camundongos previamente sensibilizados por esta substância (ALMEIDA et al., 2022). Sendo assim, a hipótese inicial do estudo era que o tratamento com a HRM

administrada de forma isolada, e tratamento DMT/HRM juntos fossem capazes de bloquear ou diminuir a expressão da sensibilização, visto que o DMT de maneira isolada seria metabolizado pelas enzimas MAO do intestino. Porém, somente os animais que receberam HRM durante a fase de abstinência e foram sensibilizados pelo etanol tiveram uma diminuição na atividade locomotora no dia do desafio.

No presente estudo também foi observado um aumento da atividade locomotora no dia do desafio nos animais que receberam salina na fase de aquisição, tanto os do grupo controle como os do grupo tratado na fase da abstinência, sugerindo uma sensibilização cruzada. A expressão é a manifestação da sensibilização que se dá após um período de abstinência. Envolve mudanças na função neuronal responsável pelas respostas comportamentais (STEKETEE; KALIVAS, 2011). A expressão gera alterações duradouras e que levam a uma resposta acentuada às drogas, já que envolve fatores de transcrição e expressão gênica, principalmente em circuitos glutamatérgicos e dopaminérgicos presentes no sistema límbico (JUNG et al., 2013). A expressão da sensibilização pode ser afetada por uma série de fatores como a dose de etanol utilizada, o período da fase de abstinência, idade e espécies dos animais, além do estresse (CAMARINI; MARIANNO; VER, 2018). Repetidos fatores estressores podem gerar a sensibilização cruzada (CAMARINI; MARIANNO; VER, 2018). As repetidas injeções de salina durante um período de tempo da aquisição da sensibilização de drogas de abuso como etanol e cocaína, já foram descritas na literatura como tais fatores estressores capazes de causar uma sensibilização cruzada (ALMEIDA et al., 2022; DER-GHAZARIAN et al., 2017; SANTOS-ROCHA et al., 2018).

Outros trabalhos avaliaram o potencial da ayahuasca frente aos efeitos do etanol no teste de preferência de lugar condicionado, um teste que também está relacionado ao transtorno pelo uso de etanol. Nestes trabalhos, a ayahuasca apresentou um potencial farmacológico para o tratamento no transtorno pelo uso de etanol (CATA-PRETA et al., 2018; GIANFRATTI et al., 2022; SERRA et al., 2022).

A síndrome de abstinência alcoólica é um dos fatores que caracteriza o desenvolvimento do transtorno pelo uso do álcool (CID 11, 2023). Sua manifestação se dá em um intervalo de 6-8 horas após uma pausa ou interrupção do uso da droga pelo indivíduo, sendo a ansiedade um sintoma característico desse período. Os sintomas ansiosos desenvolvidos estão relacionados a algumas alterações

neurobiológicas, como a queda dos níveis de dopamina e 5-HT no núcleo accumbens (BONASSOLI, 2014). O mecanismo de ação da ayahuasca no alívio desses sintomas envolve o aumento da quantidade de neurotransmissores associados à sensação de bem-estar e humor, sendo eles a serotonina, acetilcolina e dopamina. Esse aumento é proporcionado pela ação do DMT e HRM (COLAÇO, 2018; MARTINS, 2022).

Em modelos animais, o teste do labirinto em cruz elevado é amplamente empregado para avaliação da ansiedade e da mobilidade em modelos animais. Esse teste é fundamentado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos, sendo o animal confrontado entre o impulso de explorar locais desconhecidos e o de evitar áreas mais perigosas, como os locais mais altos (COLAÇO, 2018). Alguns pesquisadores observaram que os animais quando submetidos a agentes ansiolíticos apresentam um maior tempo de permanência nos braços abertos, sendo, portanto, o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos determinantes inversamente proporcionais à ansiedade. Já o comportamento de *head dipping* e *grooming* se correlacionam à avaliação de risco e a situações de estresse, respectivamente (COLAÇO, 2018).

Em estudo sobre o uso da ayahuasca no tratamento do transtorno pelo uso ao etanol, avaliou o comportamento de camundongos *Swiss* machos sensibilizados com etanol tratados e não tratados com ayahuasca em uma dosagem padronizada 1,76 mg/Kg de DMT. Os resultados obtidos pelo mesmo evidenciaram potenciais efeitos ansiolíticos da bebida. Em relação ao teste realizado em labirinto em cruz elevado, diferentemente do observado no presente trabalho, verificou-se um aumento de permanência dos animais tratados nos braços abertos em comparação aos não tratados. Essa diferença de resultado pode estar relacionada a uma possível degradação do DMT pela MAO, enzima presente no trato digestório, já que a administração do DMT foi realizada via gavagem (ALMEIDA, 2022). Nesse mesmo estudo, o aumento de *grooming* pelos animais que receberam etanol na aquisição durante o período da abstinência em relação ao grupo controle, evidência um comportamento do tipo ansioso desses animais. Tal resultado, corrobora com os nossos resultados, em que os animais que receberam etanol durante o período de aquisição tiveram um aumento do índice de ansiedade em relação ao grupo controle no período de abstinência.

Um estudo realizado sobre o perfil comportamental e toxicológico de ratos submetidos ao modelo de sensibilização ao etanol e tratamento com ayahuasca (500 mg/Kg), administrada pelo método de gavagem, demonstrou que os animais sensibilizados ao etanol e tratados com ayahuasca, obtiveram uma prevenção e amenização do comportamento ansiogênico durante o período de abstinência. Ao contrário do nosso estudo, a análise comportamental foi realizada em campo aberto (VICTORIA, 2017).

Em suma, os dados apresentados sugerem que dentre os componentes presentes na planta, a HRM apresenta resultados mais efetivos do que o DMT e DMT+HRM na atenuação da sensibilização comportamental pelo etanol. As substâncias, nas doses utilizadas no presente estudo, não apresentaram efeito no comportamento ansioso dos animais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. A. F. et al. Ayahuasca, a psychedelic beverage, modulates neuroplasticity induced by ethanol in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 416, p. 113546, jan. 2022.
- BONASSOLI, V. T. Efeitos da intoxicação e abstinência de etanol sobre os parâmetros neuroinflamatórios em regiões mesencefálicas relacionadas à ansiedade em ratos. 2014. 105f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. CID – 11 para estatísticas de mortalidade e morbidade. 2023. Disponível em: <<https://icd.who.int/browse11/lm/en#/http://id.who.int/icd/entity/1580466198>> Acesso em: 16 out. 2023.
- CAMARINI, R.; MARIANNO, P.; RAE, M. Social Factors in Ethanol Sensitization. In: *International Review of Neurobiology*. [s.l: s.n.]. v. 140p. 53–80.
- CATA-PRETA, E. G. et al. Ayahuasca and Its DMT- and β -carbolines – Containing Ingredients Block the Expression of Ethanol-Induced Conditioned Place Preference in Mice: Role of the Treatment Environment. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, 29 maio 2018.
- CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL. Álcool e a saúde dos Brasileiros: Panorama 2023. São Paulo, 2023.
- CHAVES, S. N. S. Efeitos comportamentais e bioquímicos da abstinência alcoólica

no zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822). 2018. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, 2018. 38

COLAÇO, C. S. Avaliação do potencial antidepressivo da Ayahuasca em ratos – comportamento, quantificação de monoaminas e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). 2018. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

DER-GHAZARIAN, T. S. Et al. Effects of a 5-HT1B Receptor Agonist on Locomotion and Reinstatement of Cocaine-Conditioned Place Preference after Abstinence from Repeated Injections in Mice. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 11, n. 73, p. 1–10, 10 out. 2017.

FERNANDES, G. J. D. Avaliação do efeito da exposição de camundongos ao Teste de Exposição ao Rato sobre as respostas celulares e comportamentos relacionados à dependência de etanol. 2019. 78f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

FILHO, J. C. V.; ROCHA, J. O.; CURTO, H. N.; BARBOSA, M. H. D.; MIRANDA, T. S. Aspectos clínicos e diagnósticos em saúde mental. 1. Ed. Belém: RFB editora, 2023.

FREITAS, M. G.; STOPA, S. R.; SILVA, E. N. Consumo de bebidas alcoólicas no Brasil: estimativas de razões de prevalências – 2013 – 2019. *Ver. Saúde Pública*, Brasília, v. 57, jan. 2023.

GIANFRATTI, B. et al. Ayahuasca blocks ethanol preference in an animal model of dependence and shows no acute toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 285, p. 114865, mar. 2022.

GUIRAUD, J.; ADDOLORATO, G.; ANTONELLI, M.; AUBIN, H. J.; BEJCZY, A.; et al. Oxibato de sódio para manutenção de abstinência em pacientes dependentes de álcool: um estudo internacional, multicêntrico, randomizado, ensaio duplo-cego, controlado por placebo. *Journal of Psychopharmacology*. 2022. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/02698811221104063>> Acesso em: 20 out. 2023.

Haidar, F. C. Depressão, ansiedade, estresse e habilidades de enfrentamento em usuários de álcool e outras drogas. 2018. 77 F. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Psicologia) – Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Maranhão, 2018.

JUNG, E.-S. Et al. Cocaine-Induced Behavioral Sensitization in Mice: Effects of Microinjection of Dopamine D2 Receptor Antagonist into the Nucleus Accumbens. *Experimental Neurobiology*, v. 22, n. 3, p. 224–231, 30 set. 2013.

LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C.; MARQUES, A. C. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. *Brazilian Journal of Psychiatry*, jun. 2000. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbp/a/FLRYmL7W3dFQxFdMxZRNzqz/>>. Acesso em: 10 out. 2023.

LAVERDE, C. F. Sensibilização comportamental ao etanol em camundongos: avaliação da expressão da proteína (delta) fosb e possíveis efeitos da lateralização na via mesocorticolímbica. 2019. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, Araraquara, 2019.

LIMA, A. L. O.; NETO, J. L. S.; FRANCO, J. V. V.; VALENTE, G. G. T.; BARBOSA, J. M.; LOBO, G. S.; ROSA, G. M. A.; LEMOS, A. R.; VIANA, Y. C.; MONTES, A. S. 39

LOPES, T. G. G. Substâncias psicodélicas como “novas” estratégias terapêuticas na psiquiatria. 2023. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, 2023.

MARTINS, B. L.; LEITE, E. S.; SALOME, R. E. V.; PIAZERA, B. K. L. Os benefícios do uso da ayahuasca como ferramenta alternativa ao tratamento convencional da depressão: uma revisão de literatura. Ver. Científica UBM, Barra Mansa, v.24, n.48, p. 95-111, nov. 2022.

NAVES, G.; SABATKE, G.; SOUZA, J. F.; CRUZ, R. O.; LIMA, I. A. B. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental dos usuários de álcool no Brasil: uma revisão integrativa da literatura. Brazilian Journal of Health Review. jun. 2023. Disponível em: <<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/60924/43982>>. Acesso em: 16 out. 2023.

OLIVEIRA, R. S. C.; MATIAS, J. C.; FERNANDES, C. A. O. R.; GAVIOLI, A.; MARANGONI, S. R.; ASSIS, F.B. Internações por transtornos mentais e comportamentais devidos ao uso de álcool no Brasil e regiões: análise de tendência temporal, 2010-2020. Brasília: Epidemiologia e Serviços de Saúde, 2023.

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 and Behavior, v. 142, p. 28–36, 2015.

OWENS, R. A.; SMALLING, M.; FITZPATRICK, J. J. Saúde mental, transtorno por uso de substâncias e transtorno por uso de opioides: atualizações e estratégias de tratamento. Ver. Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas, Ribeirão Preto, v.17, jul./set. 2021.

RODRIGUES, R. F. Disseleneto m-Trifluormetil difenila atenua as fases da sensibilização motora comportamental induzida por morfina em camundongos. 2022. 42f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2022. 40

RODRIGUES, T. G. Os efeitos da ayahuasca no tratamento terapêutico da ansiedade e depressão. 2022. 26 F. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Centro Universitário UniFG Guanambi, Guanambi, 2022.

SANTOS-ROCHA, J. B. et al. Involvement of neuronal nitric oxide synthase in cross-sensitization between chronic unpredictable stress and ethanol in adolescent and adult mice. Alcohol, v. 68, p. 71–79, maio 2018.

SERRA, Y. A. et al. Role of 5-HT_{2A} receptors in the effects of ayahuasca on ethanol

self-administration using a two-bottle choice paradigm in male mice. *Psychopharmacology*, v. 239, n. 6, p. 1679–1687, 7 jun. 2022.

SILVA, I. Q. Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no córtex pré-frontal medial na ansiedade de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado. 2021. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021.

STEKETEE, J. D., KALIVAS, P. W. Desejo de Drogas: Sensibilização Comportamental e Recaída ao comportamento de Procura de Drogas. *Rev. Pharmacol.* V. 63, p. 348-365, 2011.

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacological Reviews*, v. 63, n. 2, p. 348–365, jun. 2011.

TAVARES, J. Avaliação dos efeitos da retirada do álcool a curto e longo prazo sobre comportamentos relacionados à ansiedade e marcação de células serotoninérgicas no núcleo dorsal da rafe de ratos. 2018. 77f. Dissertação (pós – graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

TEIXEIRA, J. Tratamento Farmacológico da Síndrome de Abstinência Alcoólica. *Ver. Científica da Ordem dos Médicos*, Lisboa, v. 35, n.4, p. 286-293, jan. 2021.

Transtornos de Ansiedade no adulto. Disponível em: <<https://linhasdecuidado.saude.gov.br/portal/ansiedade/definicao/>> . Acesso em: 1 nov. 2023.

Transtornos psiquiátricos relacionados ao uso de álcool. *Research, Society and Development*, 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/36204/30228>>. Acesso em: 10 out. 2023.

UENO, T. M. R. L.; NASCIMENTO, N. G.; SOUZA, M. M.; SOUSA, I. F.; GARCEZ, J. C. D.; MARTINS, A. Ayahuasca e as pesquisas relacionadas ao contexto religioso: revisão integrativa. *Research, Society and Development*.dez. 2022. Disponível em:<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/38784/32030>>. Acesso em: 29 out. 2023.

UNGLESS, M. A. et al. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, v. 411, n. 6837, p. 583–587, maio 2001.

VICTORIA, P. P. Perfil comportamental e toxicológico de ratos submetidos ao modelo de dependência química ao etanol tratados com ayahuasca. 2017. 79f. Dissertação (pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

3 ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO E ANTIDEPRESSIVO DO CANABIDIOL E SEUS ANÁLOGOS

Carolina Aparecida Faria Almeida¹, Jessyca Milene Ribeiro¹, Alessandra Oliveira Silva¹; Renata Maria Leal de Souza¹, Graziella dos Reis Rosa Franco⁴, Cláudio Viegas Júnior⁴, Tania Marcourakis², Raphael Caio Tamborelli Garcia^{23*}, Larissa Helena Torres^{1*}.

¹Departamento de alimentos e medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 13B, 05508-000, São Paulo/SP, Brazil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Rua São Nicolau, 210, 1º andar, 09913-030, Diadema/SP, Brazil.

⁴Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

Declaração de conflito de interesse: nenhum.

Endereço para correspondência

*Autor correspondente:

Larissa Helena Torres

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Centro – Alfenas/MG

CEP: 37130-001

Tel: +55-35-3701-9513

Email : larissa.torres@unifal-mg.edu.br

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Setor de Bioquímica, Farmacologia e Toxicologia

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas

Universidade Federal de São Paulo – Unifesp

Rua São Nicolau, 2010 – 1º andar

Centro – Diadema -SP

CEP: 09913-030

Tel: +55-11-33854137

e-mail: raphael.garcia@unifesp.br

RESUMO

A depressão e a ansiedade são sintomas comuns relacionados à abstinência do transtorno do uso ao álcool. Apesar da existência de diversos fármacos utilizados nos quadros de depressão e ansiedade, menos da metade das pessoas estão recebendo tratamento efetivo. O potencial ansiolítico e antidepressivo do canabidiol, uma molécula não psicoativa da *Cannabis sativa*, tem sido vastamente estudado desde a década de 1970. E o uso de novas moléculas, análogas ao canabidiol, pode melhorar e potencializar tais efeitos. Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar o potencial terapêutico do canabidiol e de seus análogos no tratamento da ansiedade e da depressão por meio de ensaios comportamentais em roedores. Para tanto, camundongos *Swiss* machos adultos foram submetidos ao tratamento agudo com canabidiol e seus análogos nas doses de 1 mg/Kg, 3 mg/Kg e 10 mg/Kg. Para avaliação do comportamento ansioso foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado no primeiro dia. Já para a avaliação do comportamento depressivo, foi realizado o teste nado forçado no dia seguinte. Os animais tratados com o canabidiol (10 mg/Kg) e seus análogos, PQM-242 (3 mg/Kg) e PQM-249 (1 mg/Kg), apresentaram um aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos, e uma diminuição do índice de ansiedade em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, os animais que receberam PQM-242 (3 mg/Kg) e PQM-249 (1 mg/Kg) também apresentaram um aumento na frequência de *head dipping* em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) no teste labirinto em cruz elevado. Ambos os grupos tratados com essas mesmas substâncias tiveram uma diminuição no tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($p < 0,05$). Os resultados encontrados são promissores, visto que duas moléculas, PQM-242 3 mg/Kg e PQM-249 1 mg/Kg apresentaram tanto efeito ansiolítico antidepressivo, em dose menor que o canabidiol.

Palavras-chave: Canabidiol; depressão; ansiedade.

1. INTRODUÇÃO

Há uma estimativa de que 300 milhões de pessoas em todo o globo sofram de transtorno depressivo e cerca de 800 mil pessoas no mundo são vítimas do suicídio por ano, sendo a segunda maior causa de morte entre jovens de 15 a 29 anos. Já os dados para a ansiedade mostram que em 2015 cerca de 264 milhões de pessoas sofriam de transtornos de ansiedade, sendo que havia uma prevalência entre as mulheres, 4,6% da população mundial, comparado a 2,6% dos homens. Além disso, as Américas apresentaram um total de 57,22 milhões de pessoas com ansiedade, o que representa 21% dos casos totais (WHO, 2017).

Tanto o transtorno depressivo, quanto o transtorno de ansiedade podem ser comorbidades de outros transtornos, como abstinência ao etanol, ou síndrome de abstinência alcoólica, a qual ocorre no transtorno de uso do álcool (TUA) (AIRAGNES et al., 2019). No TUA, quando há privação do acesso ao álcool o indivíduo entra em um estado de abstinência, que possui sinais e sintomas desagradáveis, como disforia, irritabilidade, ansiedade, agitação, angústias deprimentes, sinais contrários aos produzidos pela droga, o que induz a busca da droga para cessar tais sintomas, levando a recaída (FARROKH et al., 2021; LARANJEIRA et al., 2000; MACIEL; KERR-CORRÊA, 2004). Portanto, para que tratamento do TUA seja efetivo, é preciso tratar também os sintomas negativos associados a abstinência (TIGLÃO; MEISENHEIMER; OH, 2021).

Os tratamentos disponíveis para tais ansiedade e depressão dividem-se em tratamento psicoterapêuticos medicamentosos. Os medicamentos mais utilizados são os inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina e os benzodiazepínicos. Entretanto, menos da metade dos pacientes com depressão ou transtorno da ansiedade recebem tratamento adequado (OPAS/OMS, 2020) e cerca de 70% das pessoas continuam apresentando os sintomas mesmo recebendo o tratamento específico (RUBERTO; JHA; MURROUGH, 2020; WILES et al., 2018). Embora a definição de depressão resistente ao tratamento não esteja totalmente clara, uma resposta inadequada a um antidepressivo com eficácia comprovada é um indicador de mau prognóstico; e uma resposta inadequada a dois ou mais tratamentos de dose e duração adequadas no atual episódio depressivo maior são frequentemente usadas para operacionalizar a definição de depressão resistente ao

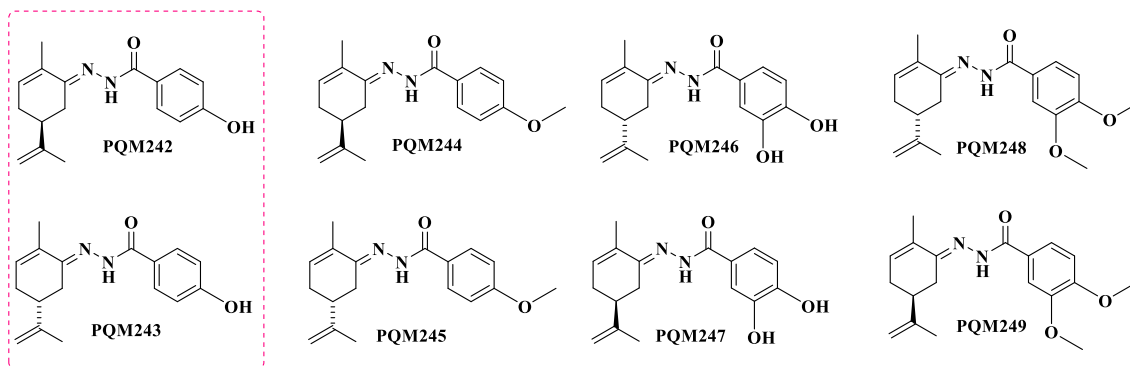
tratamento em ensaios clínicos (CONWAY; GEORGE; SACKEIM, 2017). Sintomas de depressão, experimentados por aqueles que têm resistência ao tratamento de depressão, tendem a ser piores e mais difíceis de serem superados (FEKADU et al., 2011). Se não houver remissão dos sintomas, os pacientes têm um risco aumentado de experimentar comprometimento funcional, transtornos relacionados a substâncias como etanol e outras drogas e até mesmo suicídio (NEMEROFF, 2007). Neste contexto, a busca por terapias efetivas para estes pacientes se faz necessária. O canabidiol, uma substância que constitui cerca de 40% dos estratos da planta *Cannabis sativa*, possui características ansiolíticas, depressivas, antipsicóticas e neuroprotetoras, sem apresentar efeito psicótico (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2020a). Com isso, substâncias sintetizadas a partir deste composto tornam-se um alvo terapêutico interessante. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a ação ansiolítica e antidepressiva de análogos do canabidiol.

2. MÉTODOS

2.1 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS DO CANABIDIOL

A série de compostos dos análogos do canabidiol foi sintetizada pelo Prof. Dr. Cláudio Viegas do Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM). As informações a respeito da síntese e das estruturas são sigilosas e confidenciais. Resumidamente, os análogos de canabidiol foram sintetizados a partir de um planejamento sintético baseado no uso da R- (-)-carvona e S-(+)-carvona como materiais de partida comerciais, conforme delineado na Figura 1, gerando a Série A: PQM-242 a PQM-249, com 8 compostos. Tomando-se como exemplo os ácidos benzoicos funcionalizados, estes foram convertidos aos respectivos ésteres, e subsequentemente às respectivas hidrazidas. Em etapa subsequente, uma reação de acoplamento destas benzoidrazidas funcionalizadas com a R-(-)- carvona (21), levou à série-alvo A.

Figura 1: Análogos do canabidiol



Fonte: FRANCO, 2019

Nota: Abordagem sintética para a obtenção das séries-alvo A de análogos acilarilidrazônicos e oxietileno-benzamídicos do canabidiol

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com idade de 6 a 7 semanas de vida, com peso médio em torno de 25g a 30g, provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram retirados do biotério 5 dias antes da data de início do experimento para ambientação e foram mantidos em caixas de polietileno, com livre acesso à água e comida (ração para roedores Nuvilab CR1®), temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de doze horas (luz ligada às 7:00 h). Todos os experimentos foram realizados no período claro. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética desta Instituição (CEUA UNIFAL-MG 0012/2021).

2.3 SUBSTÂNCIAS

Os análogos do canabidiol da Série A (PQM-242 a PQM-249) e o canabidiol (protótipo) foram diluídos em uma solução veículo composta por 5% de DMSO + 95 % salina. Foram utilizadas 3 doses de cada composto: 1 mg/Kg, 3 mg/kg e 10 mg/kg (ALMEIDA et al., 2013; SALES et al., 2018). Soluções 5% de DMSO + 95% salina foram utilizadas como solução controle (CTRL). Todas as injeções foram administradas por via intraperitoneal i.p.

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

Os animais receberam uma injeção i.p. de salina, de canabidiol (protótipo) ou de cada uma das oito (08) moléculas da Série A (PQM-242 a PQM-249) em suas respectivas doses (10 mg/Kg, 3 mg/Kg e 1 mg/Kg) e logo após foram submetidos ao ensaio comportamental de cada dia: em labirinto em cruz elevado (D1) e nado forçado (D2). Os ensaios comportamentais foram realizados sempre no período da manhã. Imediatamente após o teste nado forçado, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

No total foram utilizados 224 animais, de acordo com os grupos experimentais descritos abaixo, sendo que XXX se refere ao número da molécula avaliada (PQM-242 a PQM-249), sendo 8 moléculas no total.

-Grupo Controle (n = 8): Os animais receberam solução veículo i.p. e logo depois foram submetidos ao ensaio comportamental do dia.

-Grupo CBD 10 mg/kg (n = 8): Os animais receberam o canabidiol na dose de 10 mg/kg e logo depois foram submetidos ao ensaio comportamental do dia.

-Grupo PQM-XXX 10 mg/kg (n = 8): Os animais receberam o análogo do canabidiol na dose de 10 mg/kg e logo depois foram submetidos ao ensaio comportamental do dia.

-Grupo CBD 3 mg/kg (n = 8): Os animais receberam o canabidiol na dose de 3 mg/kg e logo depois foram submetidos ao ensaio comportamental do dia.

-Grupo PQM-XXX 3 mg/kg (n = 8): Os animais receberam o análogo do canabidiol na dose de 3 mg/kg e logo depois foram submetidos ao ensaio comportamental do dia.

-Grupo CBD 1 mg/kg (n = 8): Os animais receberam o canabidiol na dose de 1 mg/kg e logo depois foram submetidos ao ensaio comportamental do dia.

-Grupo PQM-XXX 1 mg/kg (n = 8): Os animais receberam o análogo do canabidiol na dose de 1 mg/kg e logo depois foram submetidos ao ensaio comportamental do dia.

2.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

O labirinto em cruz elevado, principal equipamento para avaliar ansiedade em roedores, consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados

de mesmo tamanho com paredes de 20 cm de altura, cruzados em ângulo reto e ligados através de uma área central, elevado a 60 cm do chão. O aumento do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos indica efeito ansiolítico da substância testada (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; PELLOW et al., 1985). O índice de ansiedade dos animais foi calculado da seguinte maneira: índice de ansiedade = $1 - \{([\text{Tempo gasto nos braços abertos}/\text{Tempo de duração do teste}] + [\text{Número de entradas nos braços abertos}/\text{Total do número de entradas}])/2\}$ (CONTRERAS et al., 2014). Também foram avaliados os parâmetros *grooming* e *head dipping* de cada animal (REEVES et al., 2016; RODGERS et al., 1997; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992).

O nado forçado foi realizado em um cilindro contendo 14 cm de água. O animal foi colocado nesse cilindro durante 6 minutos sendo avaliado o tempo total de imobilidade (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Tal teste é baseado no “desespero comportamental”, pois os animais são submetidos a uma situação aversiva: nadar em um cilindro que não possui apoio para o mesmo e com uma enorme borda superior que o impede de fugir. Este ensaio é frequentemente utilizado para avaliação de substâncias com potencial antidepressivo (DAL-ZOTTO; MARTÍ; ARMARIO, 2000; DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997; LINODEOLIVEIRA; LIMA; CAROBREZ, 2005; PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Na imobilidade analisa-se o tempo que o animal permanece praticamente imóvel, se movendo somente o suficiente para manter a cabeça para fora da água. O tempo de imobilidade diminui quando o animal é tratado com antidepressivos (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977; SUGIMOTO et al., 2011).

Em todos os testes comportamentais o registro da atividade foi realizado com uma câmera digital. O software EthoVision® (Noldus, The Netherlands) foi utilizado para as análises comportamentais do labirinto em cruz elevado. O teste de nado forçado foi analisado manualmente.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Para que fosse possível responder à pergunta do estudo, ou seja, se a molécula avaliada possui efeito ansiolítico e antidepressivo em administração aguda, a análise estatística foi realizada para cada molécula isoladamente, comparando-a com o controle (veículo) e o canabidiol (protótipo). Assim, os dados foram

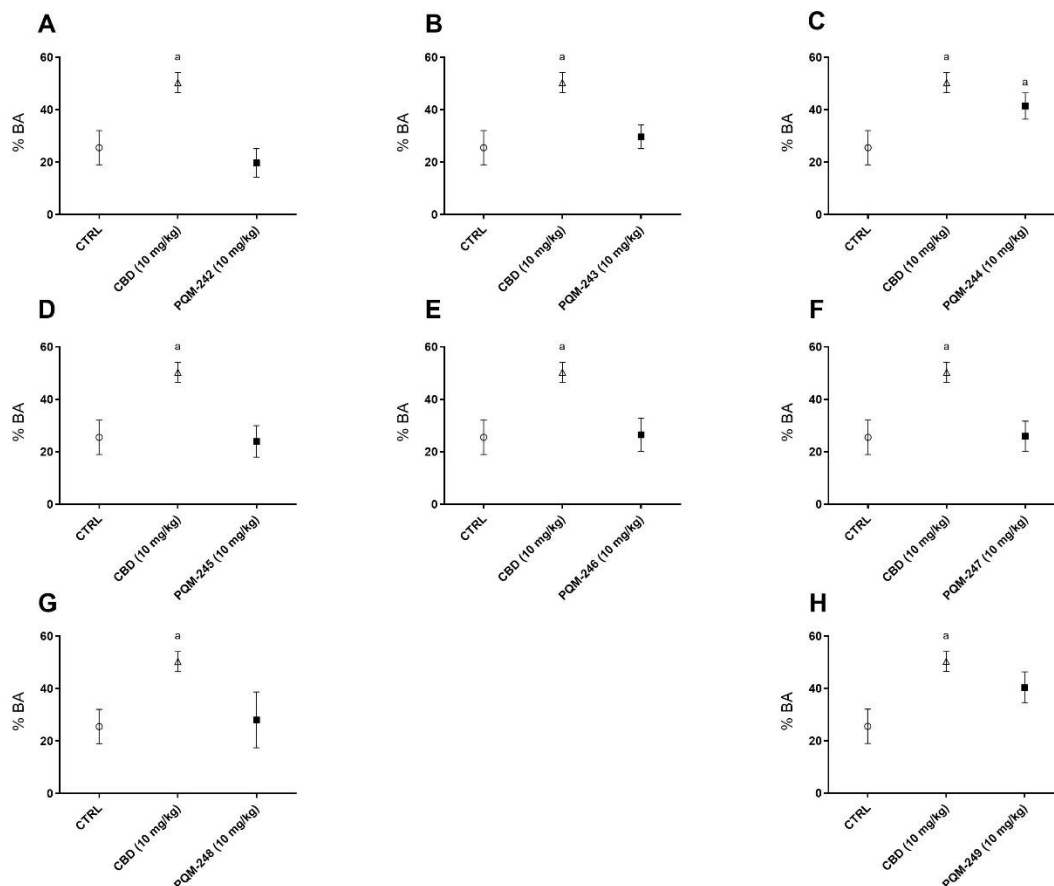
comparados por meio de análise de variância (ANOVA) uma via, seguida do teste *post-hoc Newman-Keuls*. O *software Statistic 7.0* (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para analisar dados comportamentais. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os dados foram relatados como média \pm EPM. Todos os dados foram plotados pelo *software GraphPad Prism* versão 8.0.

3. RESULTADOS

3.1 DOSE 10 MG/KG

A Figura 2 apresenta a porcentagem de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação ao tempo total do teste (5 minutos) para os animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol 10 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 10 mg/Kg. Como esperado, o grupo canabidiol apresentou maior porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). O grupo PQM-244 também apresentou maior porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$; Figura 2C).

Figura 2: Permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Dose 10 mg/Kg.

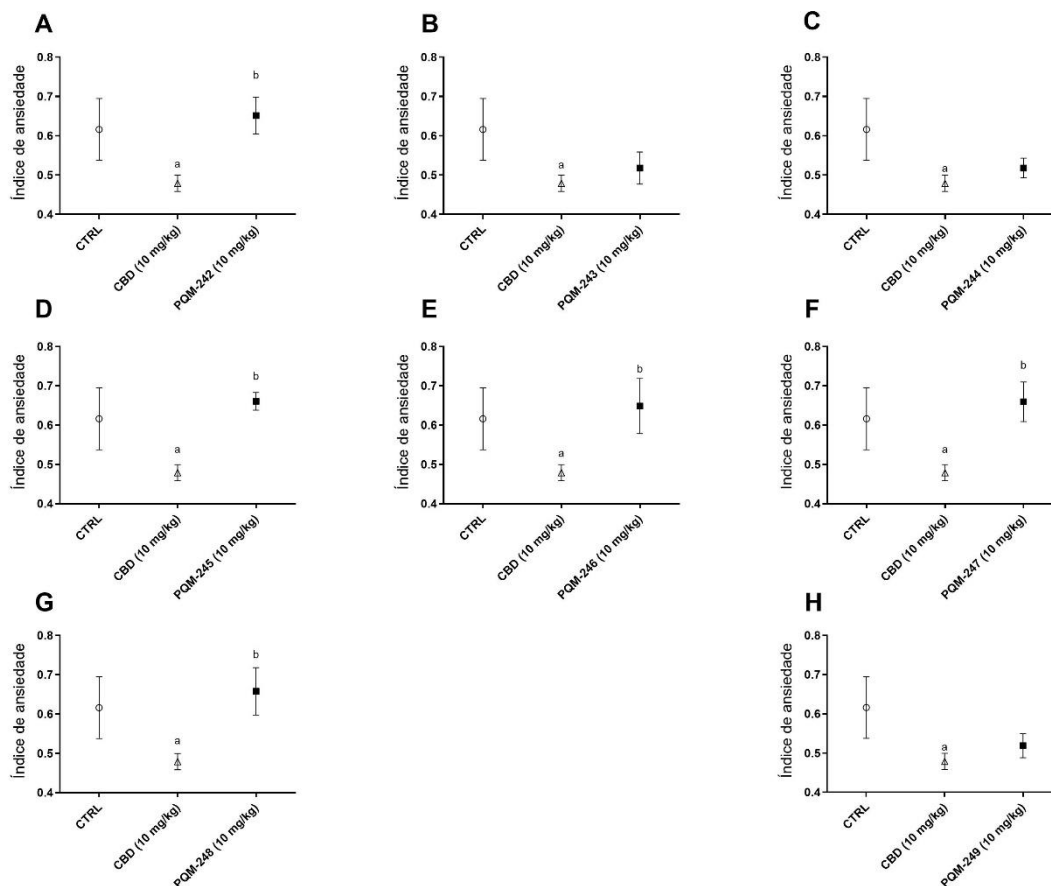


Fonte: Da autora

Nota: Porcentagem de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência no labirinto em cruz elevado (5 minutos) dos animais tratados com solução controle, CBD (10 mg/Kg) e PQM-XXX (10 mg/Kg). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. Grupos (n=8; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL

A Figura 3 apresenta o índice de ansiedade para os animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol 10 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 10 mg/Kg. Como esperado, o grupo canabidiol apresentou menor índice de ansiedade em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). Os grupos PQM-242, PQM-245, PQM-246, PQM-247 e PQM-248 apresentaram maior índice de ansiedade em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$; Figura 3A, 3D-G).

Figura 3: Índice de ansiedade. Dose 10 mg/Kg.

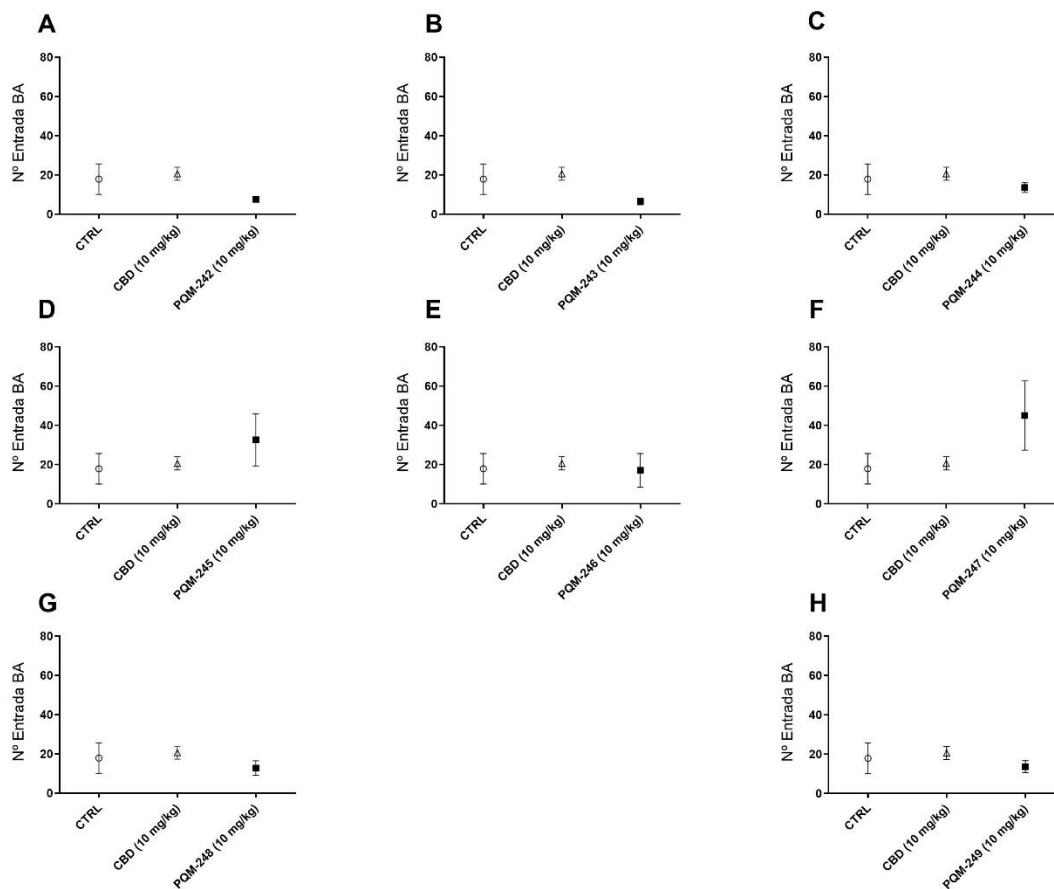


Fonte: Da autora

Nota: Índice de ansiedade no labirinto em cruz elevado (5 minutos) dos animais tratados com solução controle, CBD (10 mg/Kg) e PQM-XXX (10 mg/Kg). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. Grupos (n=8; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL. (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD.

A Figura 4 apresenta o número de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, enquanto a Figura 5 apresenta o *grooming* e a Figura 6 apresenta o *head dipping* para os animais que foram tratados com a solução controle, o canabidiol 10 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 10 mg/Kg. Não houve diferença estatística em nenhum dos grupos analisados.

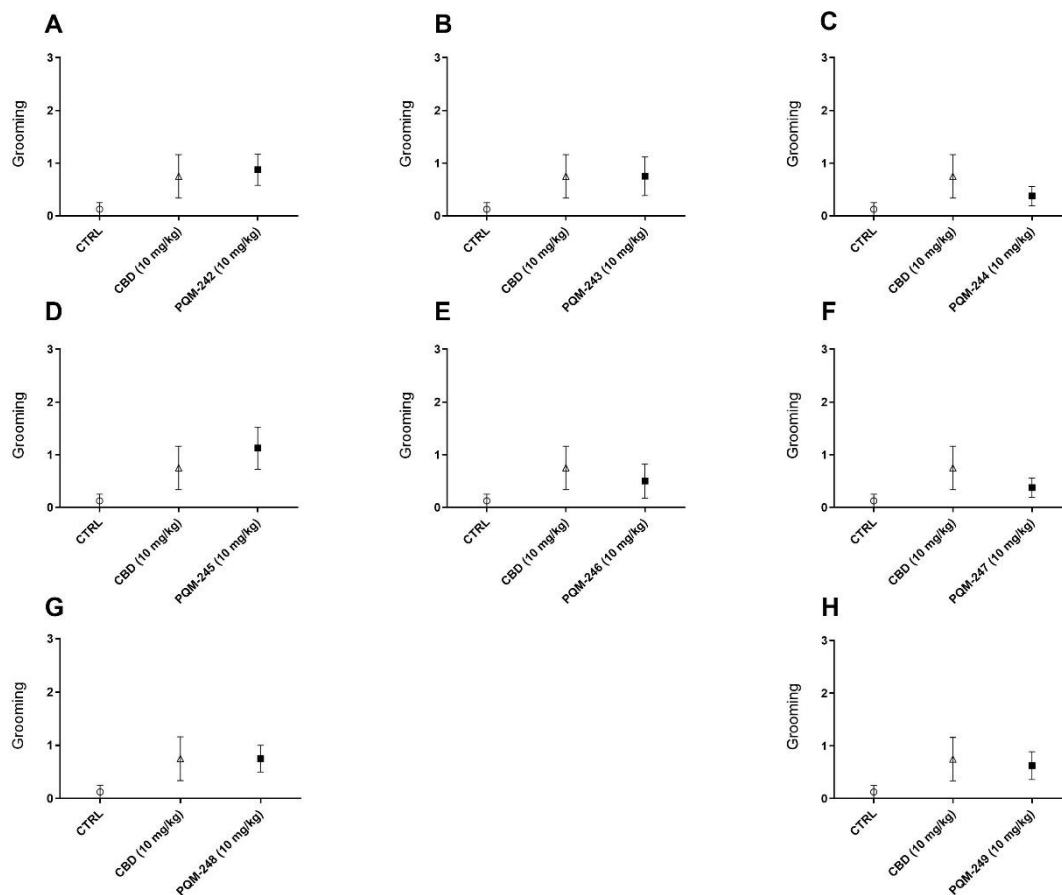
Figura 4: Entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Dose 10 mg/Kg.



Fonte: Da autora

Nota: Número de entrada nos braços abertos dos animais tratados com solução controle, CBD (10 mg/Kg) e PQM-XXX (10 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos \pm EPM. Grupos ($n=8$; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*

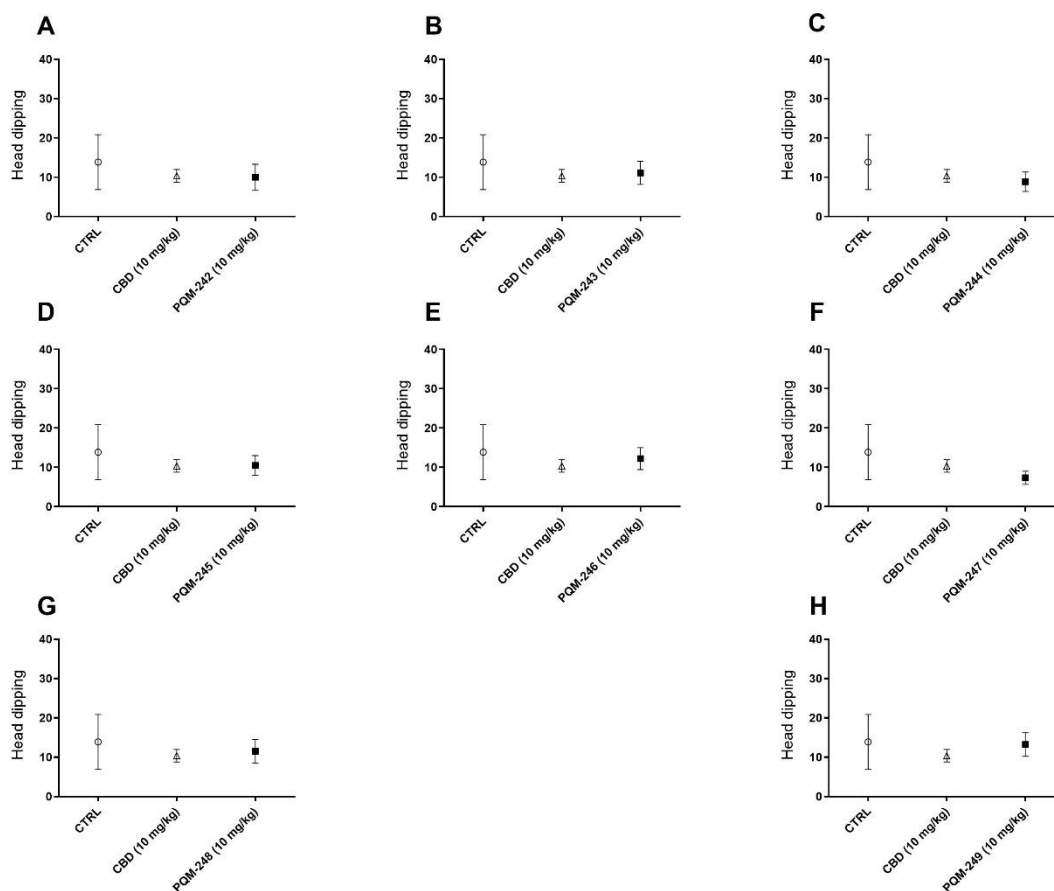
Figura 5: *Grooming* no labirinto em cruz elevado. Dose 10 mg/Kg.



Fonte: Da autora

Nota: Frequência total de *Grooming* no labirinto em cruz elevado dos animais tratados com solução controle, CBD (10 mg/Kg) e PQM-XXX (10 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos \pm EPM. Grupos (n=8; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*

Figura 6: *Head-dipping* no labirinto em cruz elevado. Dose 10 mg/Kg.

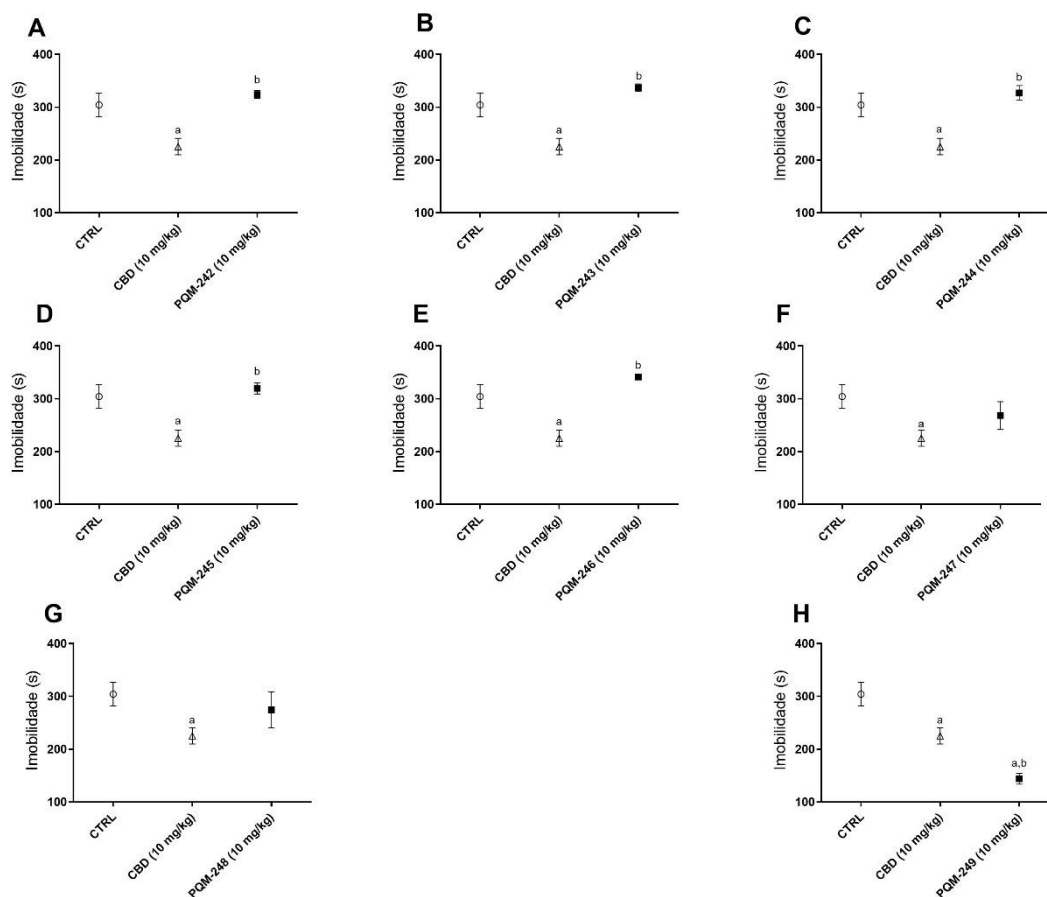


Fonte: Da autora

Nota: Frequência total de *Head dipping* no labirinto em cruz elevado dos animais tratados com solução controle, CBD (10 mg/Kg) e PQM-XXX (10 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos ± EPM. Grupos (n=8; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*

A Figura 7 apresenta o tempo total de imobilidade no teste do nado forçado para os animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol na dose de 10 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) na dose de 10 mg/Kg. Como esperado, os animais que receberam canabidiol apresentaram menor tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). Os grupos PQM-242, PQM-243, PQM-244, PQM-245 e PQM-246 apresentaram maior tempo de imobilidade no teste nado forçado em comparação com o grupo CBD 10 mg/Kg ($p < 0,001$; Figura 7A – 7E), no entanto, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle. Os animais que receberam PQM-249 (Figura 7H) apresentaram menor tempo de imobilidade em comparação com o grupo controle e com o grupo CBD 10 mg/Kg ($p < 0,001$).

Figura 7: Tempo total de imobilidade no nado forçado. Dose 10 mg/Kg.



Fonte: Da autora

Nota: Tempo total de imobilidade no nado forçado dos animais tratados com solução controle, CBD (10 mg/Kg) e PQM-XXX (10 mg/Kg). Dados expressos em segundos \pm EPM. Grupos (n=8; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (10 mg/Kg).

O Quadro 1 representa um resumo dos parâmetros comportamentais analisados no labirinto em cruz elevado e no nado forçado dos animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol na dose de 10 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) na dose de 10 mg/Kg.

Quadro 1: Resumo dos resultados comportamentais da dose de 10 mg/Kg.

Substâncias	% Permanência BA	Índice de ansiedade	Número de entradas BA	Grooming	Head dipping	Tempo de imobilidade
CBD	↑ (CT)	↓ (CT)	-	-	-	↓(CT)
PQM-242	↑(CT)	↑ (CBD)	-	-	-	↑ (CBD)
PQM-243	-	-	-	-	-	↑ (CBD)
PQM-244	-	-	-	-	-	↑ (CBD)
PQM-245	-	↑ (CBD)	-	-	-	↑ (CBD)
PQM-246	-	↑ (CBD)	-	-	-	↑ (CBD)
PQM-247	-	↑ (CBD)	-	-	-	-
PQM-248	-	↑ (CBD)	-	-	-	-
PQM-249	-	-	-	-	-	↓ (CT e CBD)

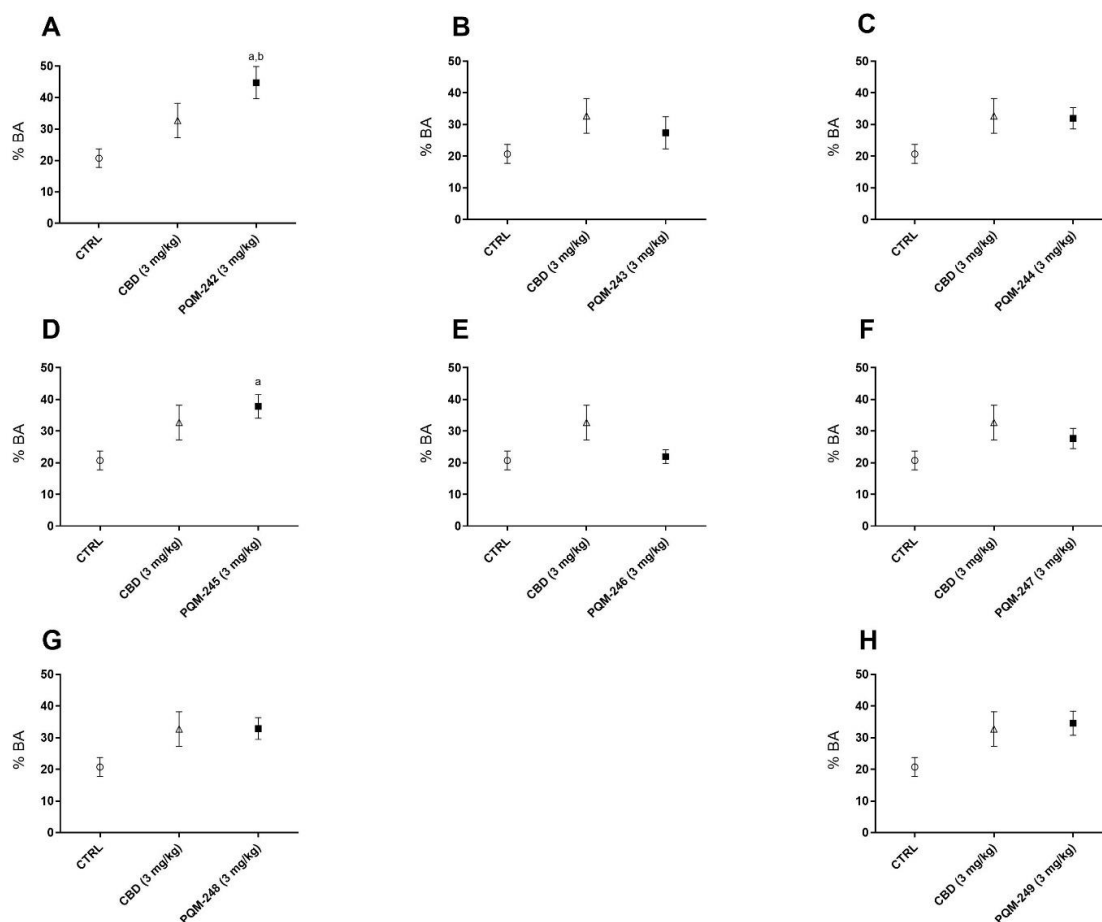
Fonte: Da autora

Nota: (↑) : aumento; (↓) diminuição; (-) sem alteração.

3.2 DOSE DE 3 MG/KG

A Figura 8 apresenta a porcentagem de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação ao tempo total do teste (5 minutos) para os animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol 3 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 3 mg/Kg. O grupo PQM-242 (Figura 8A) apresentou maior tempo de permanência nos braços abertos quando comparado ao grupo controle e ao grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$). Além disso, os animais que receberam tratamento com a molécula PQM-245 apresentaram maior tempo de permanência nos braços abertos em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$; Figura 8D). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas (Figuras 8B-C, 8E-H).

Figura 8: Permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Dose 3 mg/Kg

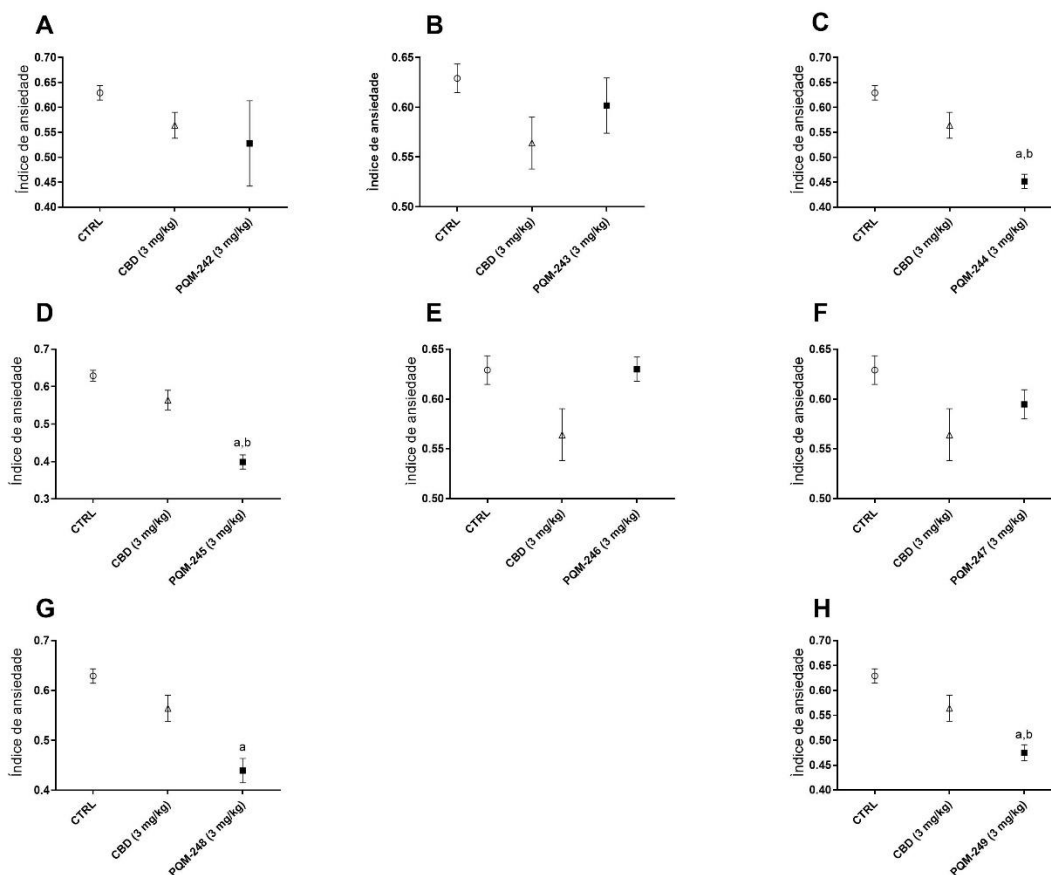


Fonte: Da autora

Nota: Porcentagem de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência no labirinto em cruz elevado (5 minutos) dos animais tratados com solução controle, CBD (3 mg/Kg) e PQM-XXX (3 mg/Kg). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. Grupos (n=8; 3 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (3 mg/Kg)

O índice de ansiedade dos animais que receberam solução controle, canabidiol 3 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 3 mg/Kg está descrito na Figura 9. Os grupos PQM-244 (Figura 9C), PQM-245 (Figura 9D), PQM-249 (Figura 9H) apresentaram um menor índice de ansiedade em comparação ao controle ($p < 0,001$) e ao grupo canabidiol 3 mg/Kg ($p < 0,001$). Já o grupo PQM-248 (Figura 9G) apresentou um menor índice de ansiedade somente em comparação ao controle ($p < 0,001$).

Figura 9: Índice de ansiedade. Dose 3 mg/Kg.

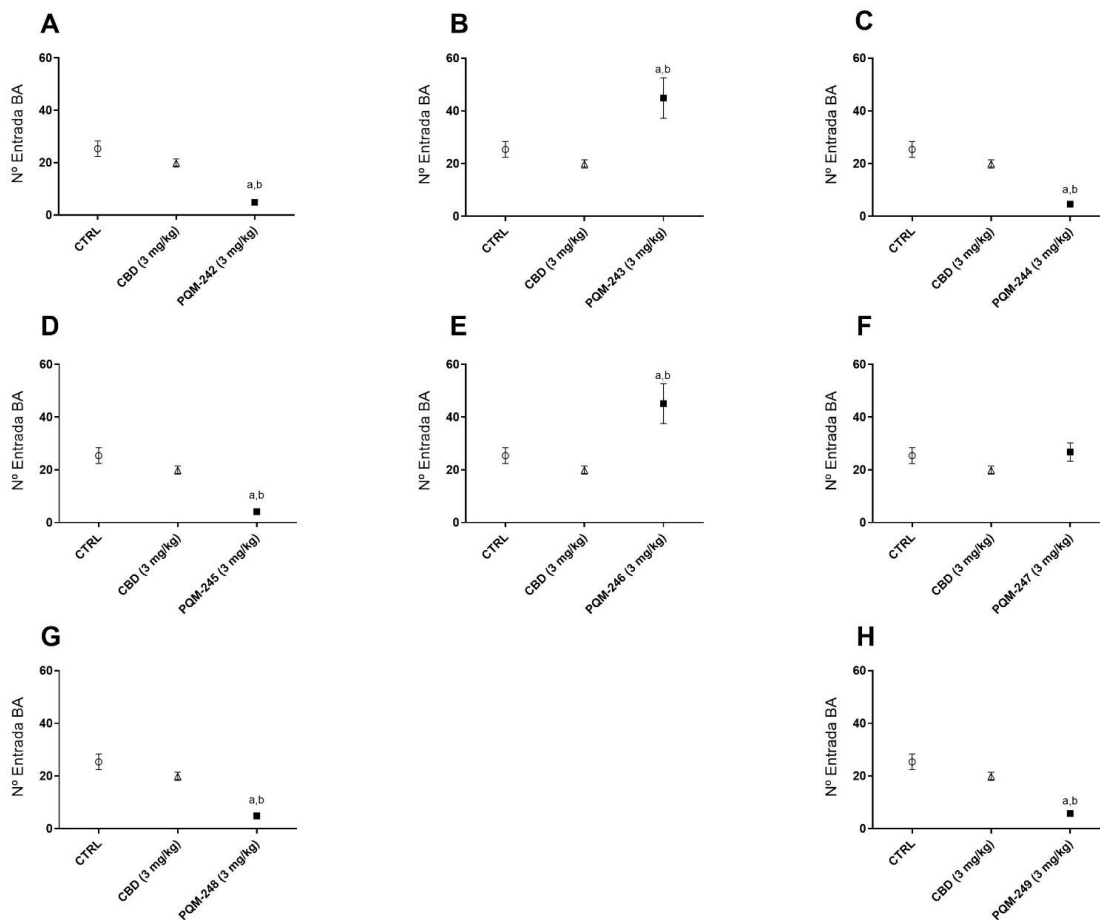


Fonte: Da autora

Nota: Índice de ansiedade no labirinto em cruz elevado (5 minutos) dos animais tratados com solução controle, CBD (3 mg/Kg) e PQM-XXX (3 mg/Kg). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. Grupos (n=8; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL. (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD.

A Figura 10 apresenta o número de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado para os animais que foram tratados com a solução controle, o canabidiol 3 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 3 mg/Kg. Os grupos PQM-242, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM249 apresentaram menor número de entrada nos braços abertos em relação ao grupo controle e ao grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$, Figuras 10 A, C-D, F-H). Já os animais que receberam tratamento com as moléculas PQM-243 e PQM-246 tiveram um aumento no número de entrada nos braços abertos em relação ao grupo controle e ao grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$, Figuras 10 B, E).

Figura 10: Número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Dose 3 mg/Kg

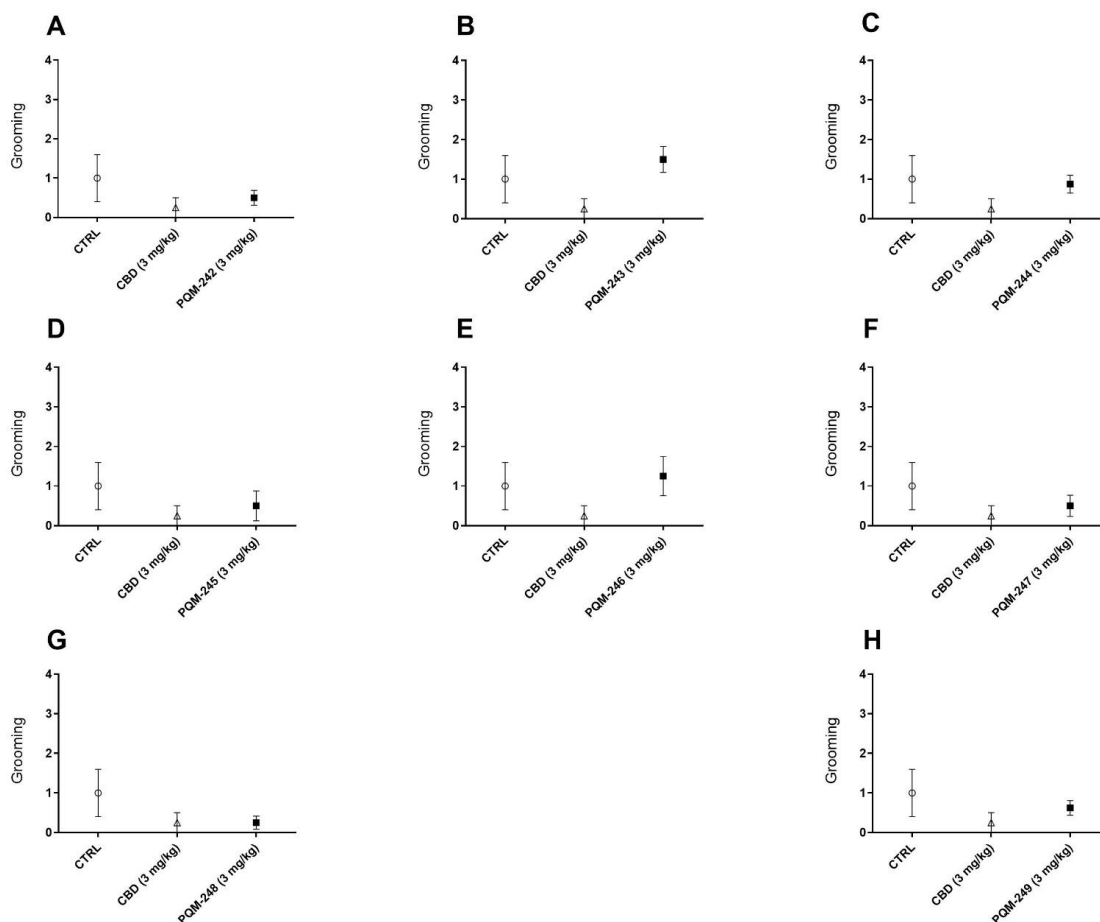


Fonte: Da autora

Nota: Número de entrada nos braços abertos dos animais tratados com solução controle, CBD (3 mg/Kg) e PQM-XXX (3 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos \pm EPM. Grupos (n=8; 3 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (3 mg/Kg)

A Figura 11 apresenta a frequência de *grooming* para os animais que foram tratados com a solução controle, o canabidiol 3 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 3 mg/Kg. Não houve diferença estatística em nenhum dos grupos analisados.

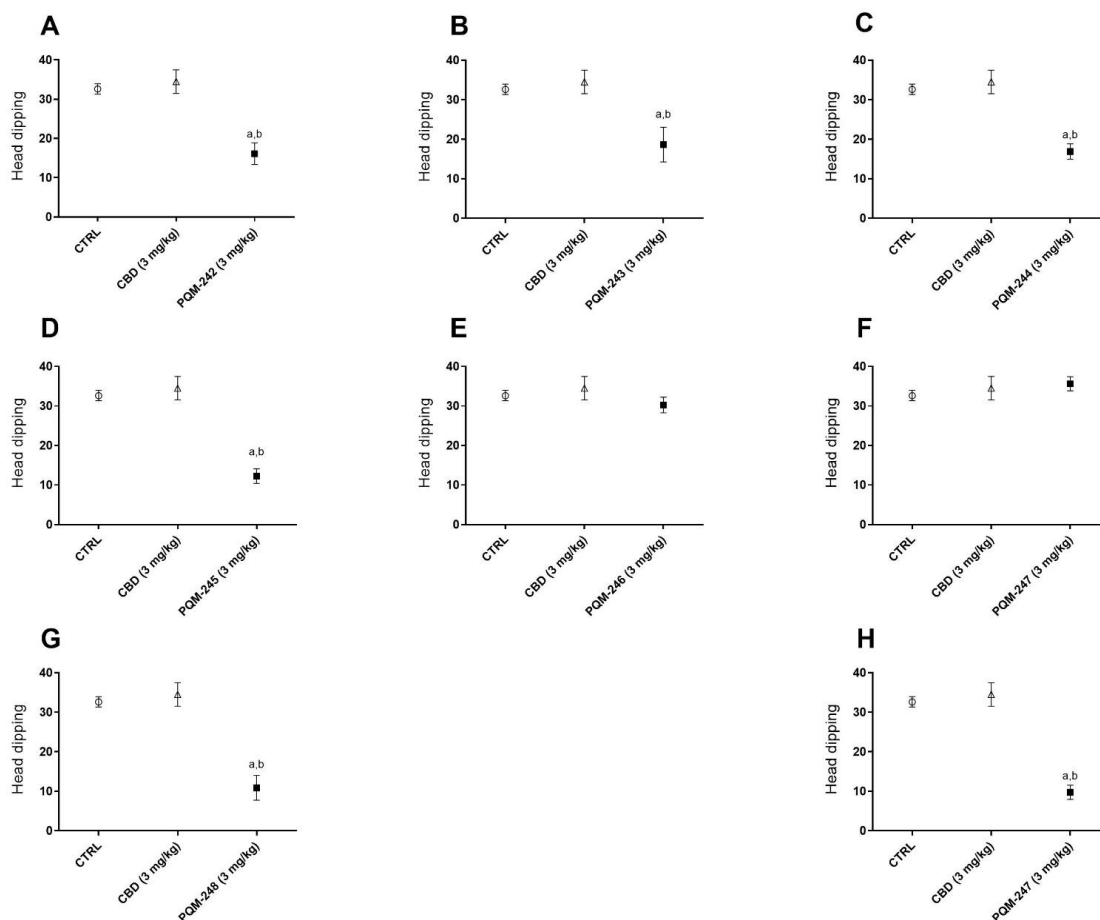
Figura 11: *Grooming* no labirinto em cruz elevado. Dose 3 mg/Kg



Fonte: Da autora

Nota: Frequência total de *grooming* no labirinto em cruz elevado dos animais tratados com solução controle, CBD (3 mg/Kg) e PQM-XXX (3 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos ± EPM. Grupos (n=8; 3 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*

A Figura 12 apresenta a frequência de *head dipping* para os animais que foram tratados com a solução controle, o canabidiol 3 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 3 mg/Kg. Os grupos PQM-242, PQM-243, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM-249 apresentaram uma diminuição de frequência de *head dipping* em comparação com o grupo controle e o grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$, Figura 12 A-D, G-H).

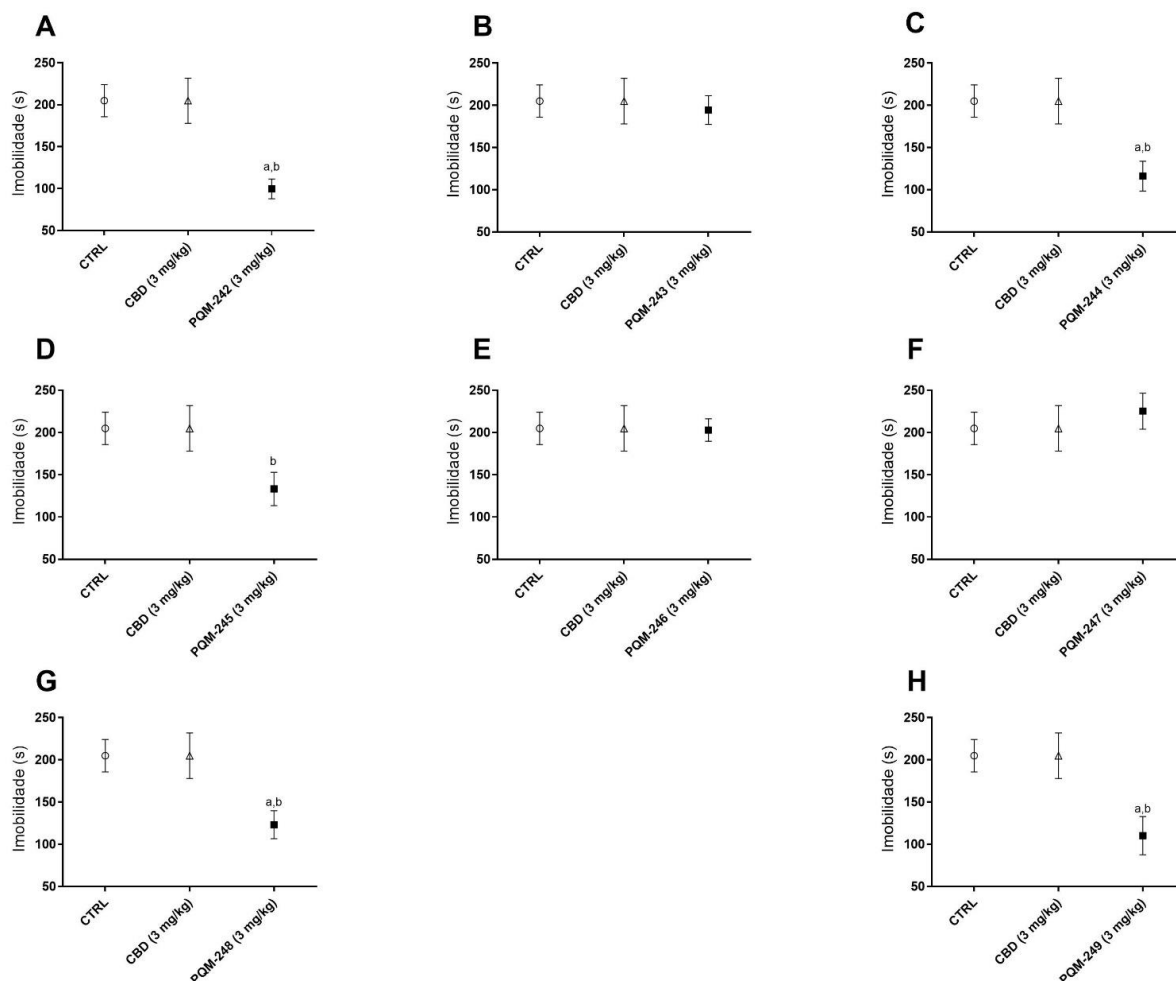
Figura12: *Head dipping* no labirinto em cruz elevado. Dose 3 mg/Kg

Fonte: Da autora

Nota: Frequência total de *head dipping* no labirinto em cruz elevado dos animais tratados com solução controle, CBD (3 mg/Kg) e PQM-XXX (3 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos ± EPM. Grupos (n=8; 3 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (3 mg/Kg)

A Figura 13 apresenta o tempo total de imobilidade no teste do nado forçado para os animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol na dose de 3 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) na dose de 3 mg/Kg. Os grupos PQM-242, PQM-244, PQM-248 e PQM-249 apresentaram maior tempo de imobilidade no teste nado forçado em comparação com o grupo controle e o grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$; Figura 13A, C, G-H). Os animais que receberam PQM-245 (Figura 13D) apresentaram menor tempo de imobilidade em comparação com o grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$).

Figura13: Tempo total de imobilidade no nado forçado. Dose 3 mg/Kg



Fonte: Da autora

Nota: Tempo total de imobilidade no nado forçado dos animais tratados com solução controle, CBD (3 mg/Kg) e PQM-XXX (3 mg/Kg). Dados expressos em segundos \pm EPM. Grupos (n=8; 3 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (3 mg/Kg)

O Quadro 2 representa um resumo dos parâmetros comportamentais analisados no labirinto em cruz elevado e no nado forçado dos animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol na dose de 3 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) na dose de 3 mg/Kg.

Quadro 2: Resumo dos resultados comportamentais da dose de 3 mg/Kg.

Substâncias	% Permanência BA	Índice de ansiedade	Número de entradas BA	Grooming	Head dipping	Tempo de imobilidade
CBD	-	-	-	-	-	-
PQM-242	↑(CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)
PQM-243	-	-	↑(CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	-
PQM-244	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)
PQM-245	↑(CT)	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CBD)
PQM-246	-	-	↑(CT e CBD)	-	-	-
PQM-247	-	-	-	-	-	-
PQM-248	-	↓ (CT)	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)
PQM-249	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)

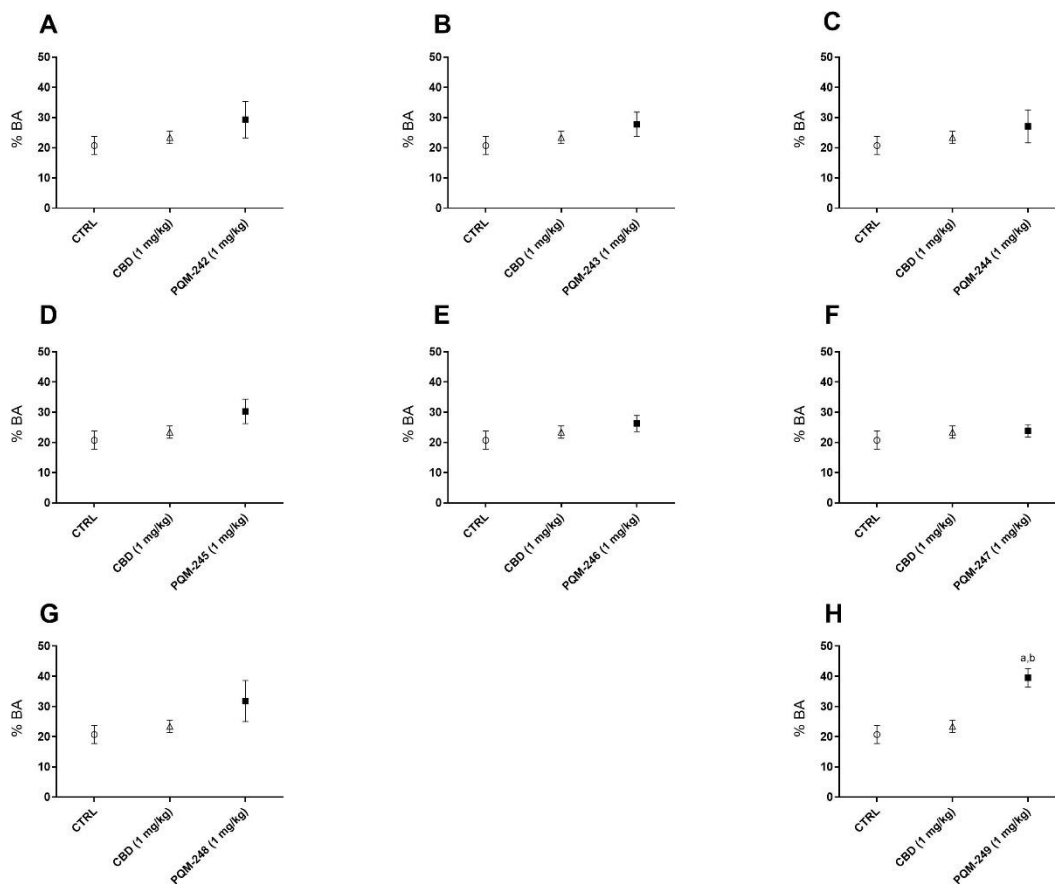
Fonte: Da autora

Nota: (↑) : aumento; (↓) diminuição; (-) sem alteração.

3.3 DOSE 1 MG/KG

A Figura 14 apresenta porcentagem de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação ao tempo total do teste (5 minutos) para os animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol 1 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 1 mg/Kg. O grupo PQM-249 (Figura 14H) apresentou maior tempo de permanência nos braços abertos quando comparado ao grupo controle e ao grupo CBD 1 mg/Kg ($p < 0,001$). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa.

Figura14: Permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Dose 1 mg/Kg.

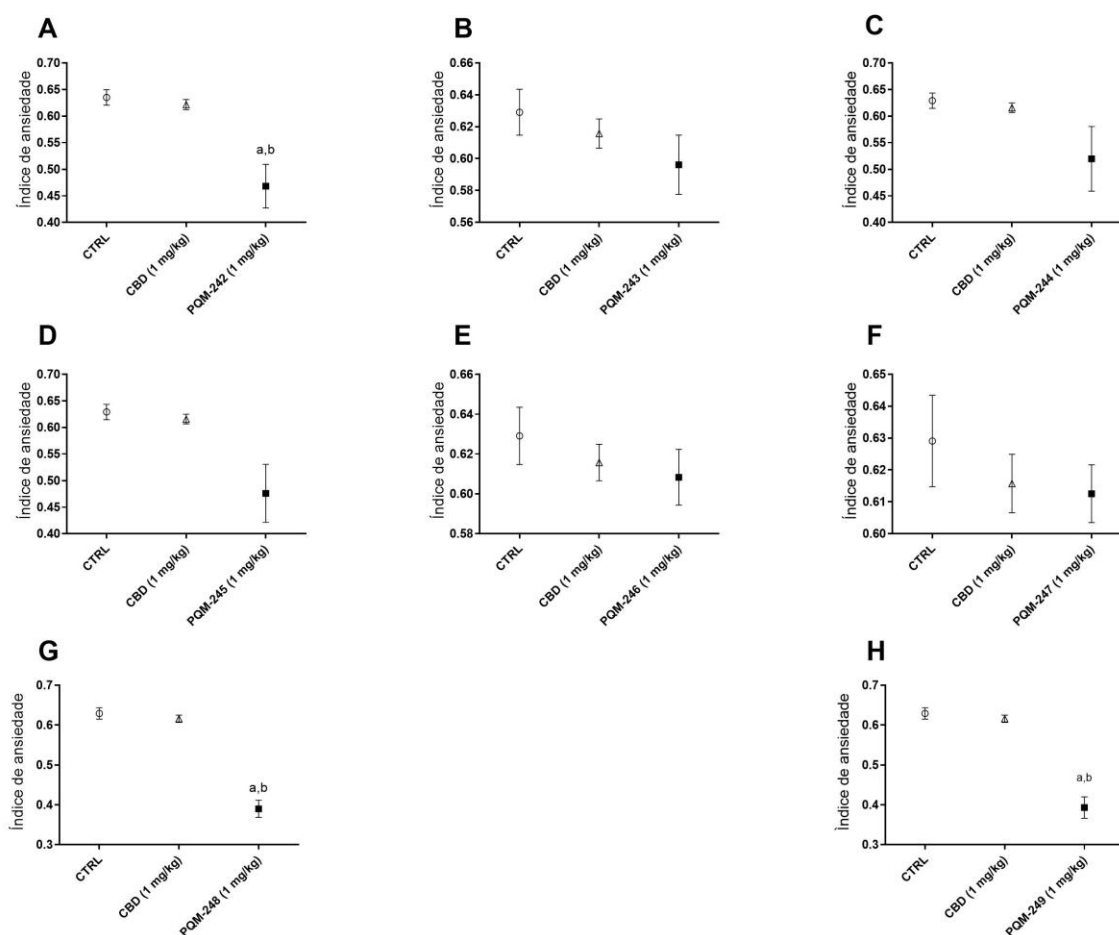


Fonte: Da autora

Nota: Porcentagem de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência no labirinto em cruz elevado (5 minutos) dos animais tratados com solução controle, CBD (1 mg/Kg) e PQM-XXX (1 mg/Kg). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. Grupos (n=8; 1 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (1 mg/Kg)

A Figura 15 apresenta o índice de ansiedade dos animais tratados com a solução controle, canabidiol 1 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 1 mg/Kg. O grupo PQM-242 (Figura 15A), PQM-248 (Figura 15G) e PQM-249 (Figura 15H) apresentaram um menor índice de ansiedade em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$) e com o grupo CBD 1mg/Kg ($p < 0,001$).

Figura 15: Índice de ansiedade. Dose 1 mg/Kg.

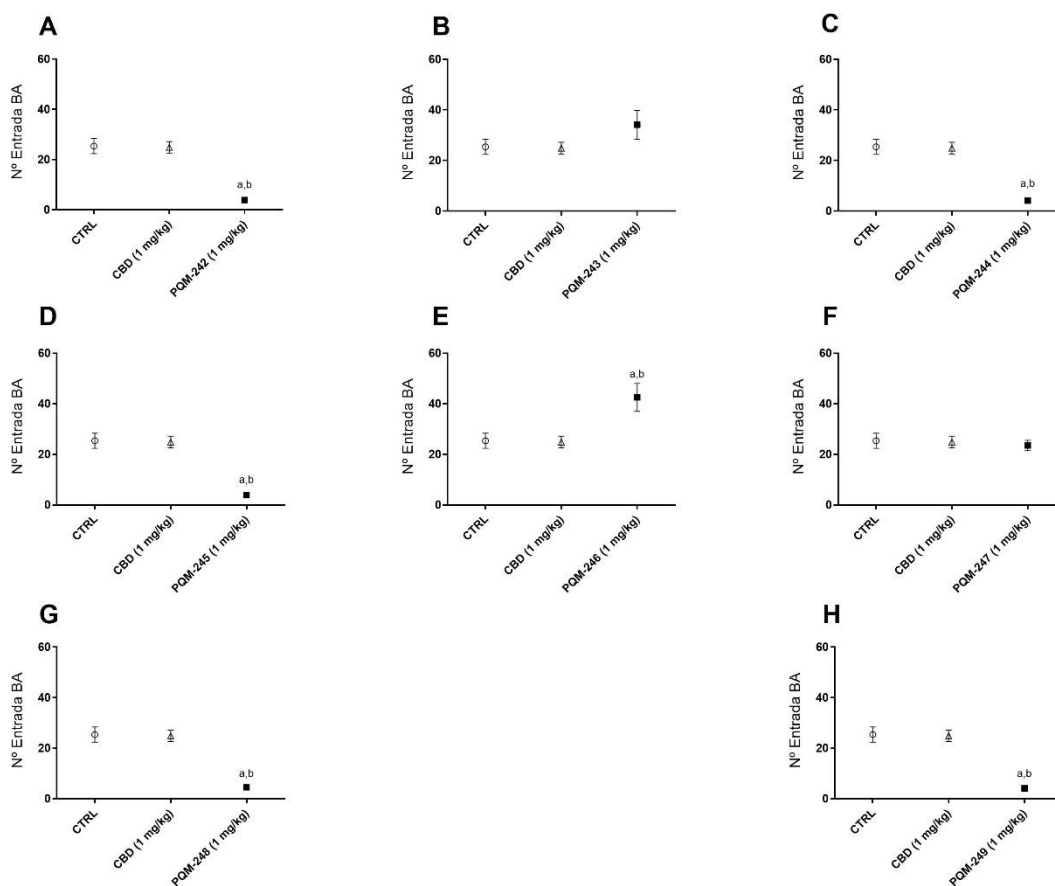


Fonte: Da autora

Nota: Índice de ansiedade no labirinto em cruz elevado (5 minutos) dos animais tratados com solução controle, CBD (1 mg/Kg) e PQM-XXX (1 mg/Kg). Dados expressos em % de permanência nos braços abertos \pm EPM. Grupos (n=8; 10 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL. (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD.

A Figura 16 apresenta o número de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado para os animais que foram tratados com a solução controle, o canabidiol 1 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 1 mg/Kg. Os grupos PQM-242, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM-249 apresentaram menor número de entrada nos braços abertos em relação ao grupo controle e ao grupo CBD 1 mg/Kg ($p < 0,001$, Figuras 16 A, C-D, F-H). Os animais que receberam tratamento com a molécula PQM-246 tiveram um aumento no número de entrada nos braços abertos em relação ao grupo controle e ao grupo CBD 1 mg/Kg ($p < 0,001$, Figuras 16E).

Figura16: Entrada nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Dose 1 mg/Kg

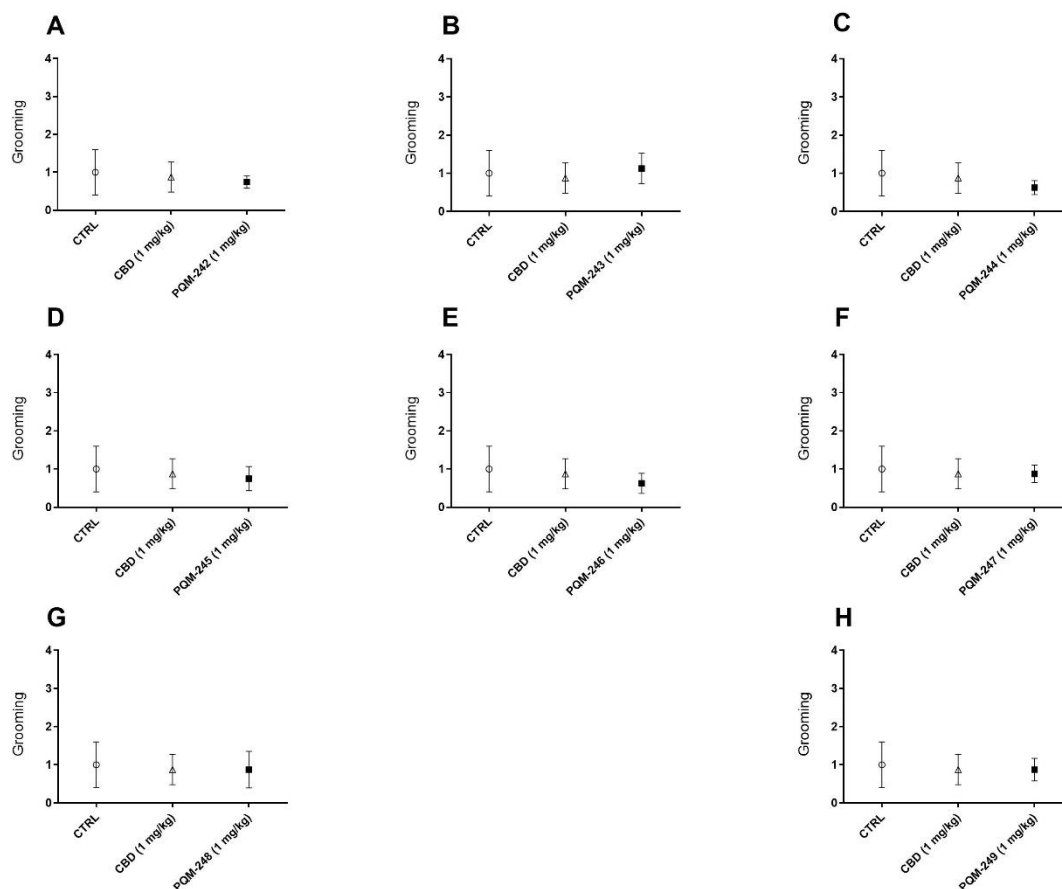


Fonte: Da autora

Nota: Número de entrada nos braços abertos dos animais tratados com solução controle, CBD (3 mg/Kg) e PQM-XXX (1 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos \pm EPM. Grupos (n=8; 1 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (1 mg/Kg)

A Figura 17 apresenta a frequência de *grooming* para os animais que foram tratados com a solução controle, o canabidiol 1 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 1 mg/Kg. Nenhum grupo experimental apresentou diferença estatística.

Figura17: *Grooming* no labirinto em cruz elevado. Dose 1 mg/Kg

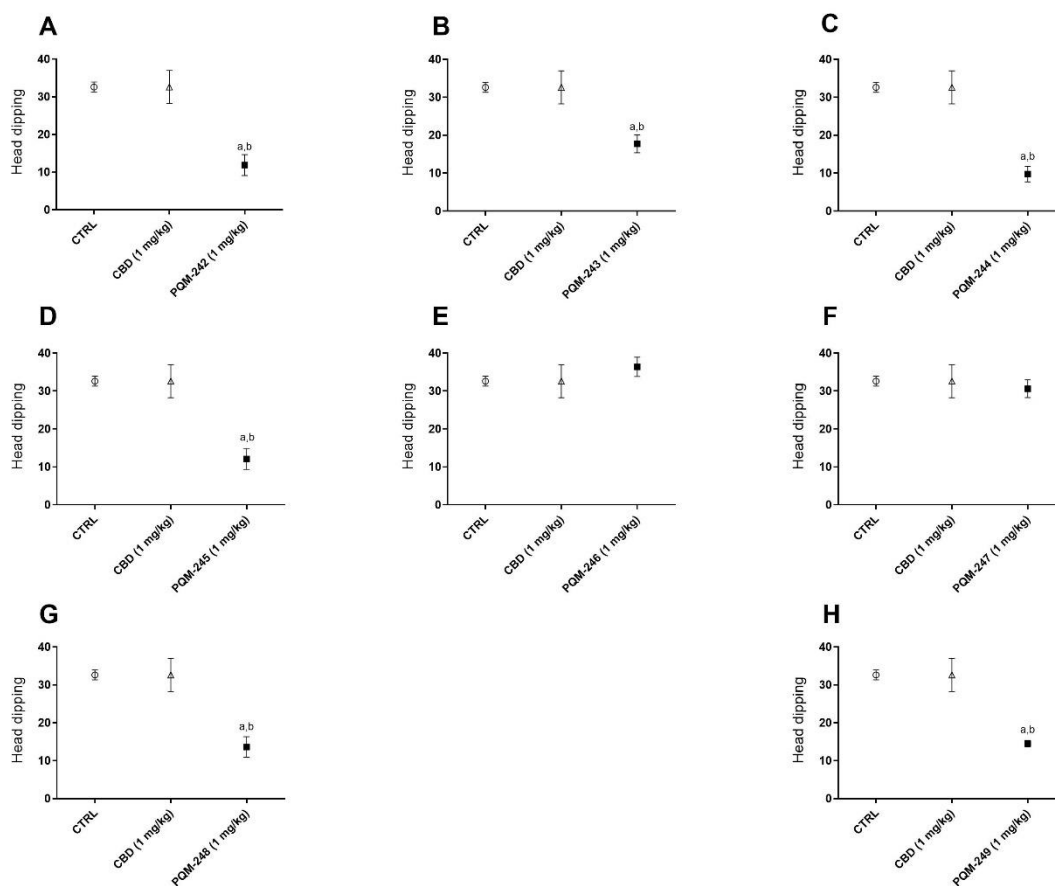


Fonte: Da autora

Nota: Frequência total de *grooming* no labirinto em cruz elevado dos animais tratados com solução controle, CBD (1 mg/Kg) e PQM-XXX (1 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos \pm EPM. Grupos (n=8; 1 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*

A Figura 18 apresenta a frequência de *head dipping* para os animais que foram tratados com a solução controle, o canabidiol 1 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) 1 mg/Kg. Os animais tratados com as moléculas PQM-242, PQM-243, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM-249 apresentaram uma diminuição de frequência de *head dipping* em comparação com o grupo controle e o grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$, Figura 18A-D, G-H).

Figura 18: *Head dipping* no labirinto em cruz elevado. Dose 1 mg/Kg

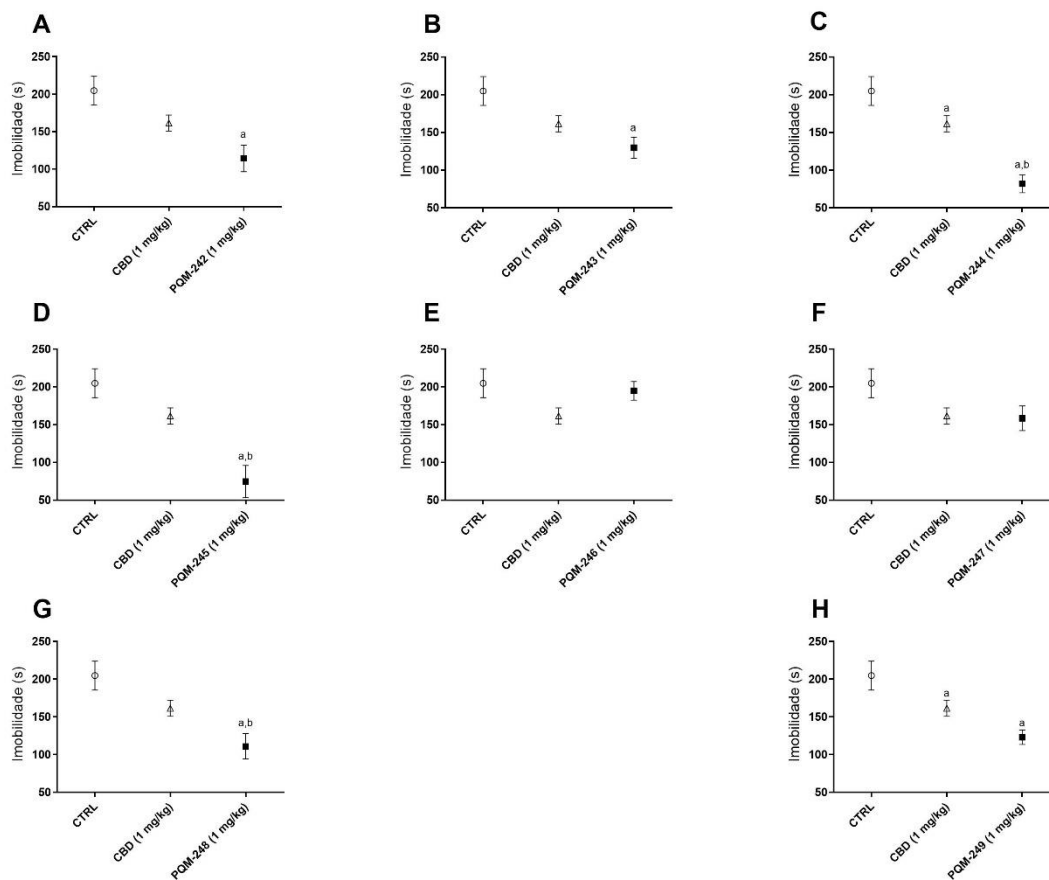


Fonte: Da autora

Nota: Frequência total de *head dipping* no labirinto em cruz elevado dos animais tratados com solução controle, CBD (1 mg/Kg) e PQM-XXX (1 mg/Kg). Dados expressos em números absolutos \pm EPM. Grupos (n=8; 1 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (1 mg/Kg)

A Figura 19 apresenta o tempo total de imobilidade no teste do nado forçado para os animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol na dose de 1 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) na dose de 1 mg/Kg. Os grupos PQM-242, PQM-243, PQM-249 apresentaram maior tempo de imobilidade no teste nado forçado em comparação com o grupo CBD 1 mg/Kg ($p < 0,001$; Figura 19A-B, H). Os animais que receberam PQM-244 e PQM-245 (Figuras 19C-D) apresentaram menor tempo de imobilidade em comparação com o grupo controle e com o grupo CBD 3 mg/Kg ($p < 0,001$).

Figura 19: Tempo total de imobilidade no nado forçado. Dose 1 mg/Kg.



Fonte: Da autora

Nota: Tempo total de imobilidade no nado forçado dos animais tratados com solução controle, CBD (1 mg/Kg) e PQM-XXX (1 mg/Kg). Dados expressos em segundos \pm EPM. Grupos (n=8; 1 mg/Kg): CTRL, CBD, PQM-242 (A), PQM-243 (B), PQM-244 (C), PQM-245 (D), PQM-246 (E), PQM-247 (F), PQM-248 (G) e PQM-249 (H). ANOVA uma via, seguido do teste *Newman-Keuls*. (a) $p < 0,001$ em relação ao grupo CTRL, (b) $p < 0,001$ em relação ao grupo CBD (1 mg/Kg)

O Quadro 3 representa um resumo dos parâmetros comportamentais analisados no labirinto em cruz elevado e no nado forçado dos animais que foram tratados com a solução controle, canabidiol na dose de 1 mg/Kg e os análogos do canabidiol (PQM-242 – PQM-249) na dose de 1 mg/Kg.

Quadro 3: Resumo dos resultados comportamentais da dose de 1 mg/Kg.

Substâncias	% Permanência BA	Índice de ansiedade	Número de entradas BA	Grooming	Head dipping	Tempo de imobilidade
CBD	-	-	-	-	-	-
PQM-242	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT)
PQM-243	-	-	-	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT)
PQM-244	-	-	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)
PQM-245	-	-	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)
PQM-246	-	-	↑(CT e CBD)	-	-	-
PQM-247	-	-	-	-	-	-
PQM-248	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)
PQM-249	↑(CT e CBD)	↓ (CT e CBD)	↓ (CT e CBD)	-	↓ (CT e CBD)	↓ (CT)

Fonte: Da autora

Nota: (↑) : aumento; (↓) diminuição; (-) sem alteração.

3. DISCUSSÃO

Os resultados sugerem que os análogos do canabidiol PQM-242 e PQM-249 se apresentam mais promissores, apresentando efeito ansiolítico e antidepressivo em modelos animais.

O efeito ansiolítico do canabidiol se dá em doses baixas (1 a 5 mg/kg) e intermediárias (10 a 20 mg/kg), enquanto em doses altas (acima de 50 mg/kg) o seu efeito é ansiogênico (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2020b). O efeito ansiolítico de doses baixas e intermediárias é mediado pela ação agonista do canabidiol sobre os receptores 5-HT_{1A}, sendo esse efeito bloqueado pela administração de WAY100635, um antagonista do receptor 5-HT_{1A} (ZANELATI et al., 2010). O efeito ansiogênico do canabidiol em altas doses está relacionado à ativação do receptor TRPV1, o que também foi comprovado pelo uso da capsazepina, um antagonista do TRPV1 (CAMPOS; GUIMARÃES, 2009). Sales et al. 2019 mostraram efeito antidepressivo do canabidiol quando administrado agudamente nas doses de 7 a 30 mg/Kg. Os autores observaram menor tempo de imobilidade no teste de nado forçado e aumento na concentração do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (SALES et al., 2019).

Como era esperado, o tratamento com canabidiol 10 mg/Kg apresentou aumento no tempo de permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado, diminuição no índice de ansiedade e diminuição no tempo de imobilidade no nado forçado, indicando efeito ansiolítico e antidepressivo do canabidiol (MOREIRA;

AGUIAR; GUIMARÃES, 2006; RESSTEL et al., 2009). Os resultados também confirmam que os efeitos ansiolítico e antidepressivo do canabidiol são dose-dependentes. Não foi observado nenhum efeito para o canabidiol na dose de 3 mg/kg. Na dose de 1 mg/Kg o único efeito observado foi a diminuição da imobilidade no nado forçado.

No labirinto em cruz elevado, a medida clássica validada por Pellow et al. (1985) para analisar a ansiedade é o número de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos, pois o comportamento basal do animal, por estar em um ambiente totalmente novo, é permanecer dentro dos braços fechados, sendo que neste local o animal se sente seguro de possíveis predadores. Desta forma, um aumento no número de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos mostra que o animal está menos ansioso (LA-VU et al., 2020). Tal efeito é observado pela administração de benzodiazepínicos, ansiolíticos clássicos. A administração de midazolam, por exemplo, leva ao aumento no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). No presente estudo, somente os animais tratados com as moléculas PQM-242 na dose de 3 mg/Kg e PQM-249 na dose de 1 mg/Kg apresentaram aumento no tempo de permanência nos braços abertos. Enquanto os grupos PQM-243 (3 mg/Kg) e PQM-246 (1 mg/Kg) apresentaram aumento no número de entrada nos braços abertos, os grupos PQM-242, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM-249 nas doses de 3 mg/Kg e 1 mg/Kg apresentaram diminuição. Os animais tratados com a molécula PQM-249 apresentaram um aumento de percentagem nos braços abertos e uma diminuição no número de entradas, efeitos que podem ser considerados antagônicos. Contudo, o menor número de entrada nos braços abertos, pode ser explicado pelo maior tempo de permanência no mesmo, indicando efeito ansiolítico dessa substância. Os grupos PQM-242 (3 mg/Kg) e PQM-244 (10 mg/Kg) também apresentaram efeito ansiolítico, pelo aumento no tempo de permanência nos braços abertos e/ou aumento no número de entrada nos braços abertos. Outro parâmetro analisado, foi o índice de ansiedade que considera o tempo gasto nos braços abertos, e o número de entradas tanto nos braços abertos, quanto nos braços fechados. Na dose de 3 mg/kg os analogos PQM-242, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM-249 apresentaram diminuição no índice de ansiedade em comparação com grupo controle. Já na dose de 1 mg/kg, os compostos PQM-242, PQM-248 e

PQM-249 também apresentaram menor índice de ansiedade em comparação com o controle.

Outros parâmetros são complementares na avaliação da ansiedade no labirinto em cruz elevado, entre eles pode-se citar o *grooming* e o *head dipping*. O *grooming* é um comportamento que está relacionado a compulsão, sendo que o aumento de *grooming* é gerado por um aumento de estresse que está relacionado com ansiedade. Portanto, uma diminuição na frequência de *grooming* pode indicar um efeito ansiolítico. Tal efeito é confirmado pelo uso de benzodiazepínicos, que diminuem a frequência de *grooming* (DUNN et al., 1981). O *head dipping* é um comportamento de avaliação risco, ou seja, ao ir para os braços abertos e inclinar sua cabeça para fora e para baixo do labirinto em cruz elevado, o animal está se arriscando. A administração de diazepam induz aumento da frequência de *head dipping*, indicando que o aumento de *head dipping* também está relacionado ao efeito ansiolítico (MATSUMOTO et al., 2021). No presente estudo não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao *grooming*. Contudo, os grupos PQM- 242, PQM-243, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM-249 nas doses de 3 mg/Kg e 1 mg/Kg apresentaram diminuição na frequência de *head dipping*, indicando uma diminuição na avaliação de risco.

O efeito antidepressivo foi avaliado no teste de nado forçado. O tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado é diminuído quando estes são tratados com substâncias que apresentam um potencial antidepressivos. Por exemplo, camundongos C57BL/6J adultos tratados com desipramina na dose de 3,2 mg/Kg, um antidepressivo tricíclico, tiveram seu tempo de imobilidade diminuído em relação ao grupo controle (KOEK; SANDOVAL; DAWS, 2018). Os resultados do presente estudo sugerem que os análogos do canabidiol apresentam efeitos antidepressivos. Os animais que receberam PQM-242, PQM-244, PQM-245, PQM-248 e PQM-249 na dose de 3 mg/Kg, e também os que receberam PQM- 244, PQM-245, PQM-248 e PQM- 249 na dose de 1 mg/Kg apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade em comparação com o grupo controle e com o canabidiol. Os grupos PQM-242 e PQM-243 na dose de 1 mg/Kg também apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade em comparação somente com o grupo controle. Além disso, o tratamento com PQM-249 (10 mg/Kg) induziu menor tempo de imobilidade no nado forçado, tanto na comparação com o grupo controle quanto na comparação com o canabidiol.

As moléculas PQM-242 na dose de 3 mg/Kg e PQM-249 na dose de 1 mg/Kg apresentaram tanto efeito ansiolítico, como efeito antidepressivo, em doses menores que o canabidiol. Além disso, as duas moléculas apresentaram algum tipo de efeito em todas as doses. Tais moléculas são promissoras, contudo, novos estudos são necessários para melhor compreensão de seus efeitos.

Referências

- AIRAGNES, G. et al. Alcohol withdrawal syndrome management: Is there anything new? *La Revue de Médecine Interne*, v. 40, n. 6, p. 373–379, jun. 2019.
- ALMEIDA, V. et al. Cannabidiol exhibits anxiolytic but not antipsychotic property evaluated in the social interaction test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 41, mar. 2013.
- CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 33, n. 8, nov. 2009.
- CONTRERAS, C. M. et al. Myristic Acid Produces Anxiolytic-Like Effects in Wistar Rats in the Elevated Plus Maze. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- CONWAY, C. R.; GEORGE, M. S.; SACKEIM, H. A. Toward an Evidence-Based, Operational Definition of Treatment-Resistant Depression. *JAMA Psychiatry*, v. 74, n. 1, 1 jan. 2017.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 49, n. 1, p. 171–176, set. 1994.
- DAL-ZOTTO, S.; MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brain Research*, v. 114, n. 1–2, p. 175–181, set. 2000.
- DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, v. 5, n. 2, p. 107–112, 1997.
- DUNN, A. J. et al. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or β -endorphin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 15, n. 4, p. 605–608, out. 1981.
- FARROKH, S. et al. Alcohol Withdrawal Syndrome in Neurocritical Care Unit: Assessment and Treatment Challenges. *Neurocritical Care*, v. 34, n. 2, p. 593–607, 13 abr. 2021.
- FEKADU, A. et al. Long-Term Impact of Residual Symptoms in Treatment-Resistant Depression. *The Canadian Journal of Psychiatry*, v. 56, n. 9, set. 2011.
- GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules*, v. 10, n.

11, 19 nov. 2020a.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules*, v. 10, n. 11, p. 1575, 19 nov. 2020b.

KOEK, W.; SANDOVAL, T. L.; DAWS, L. C. Effects of the antidepressants desipramine and fluvoxamine on latency to immobility and duration of immobility in the forced swim test in adult male C57BL/6J mice. *Behavioural Pharmacology*, v. 29, n. 5, p. 453–456, ago. 2018.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In: [s.l: s.n.]. p. 69–74.

LA-VU, M. et al. To Approach or Avoid: An Introductory Overview of the Study of Anxiety Using Rodent Assays. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 14, 26 ago. 2020.

LARANJEIRA, R. et al. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 22, n. 2, p. 62–71, jun. 2000.

LINODEOLIVEIRA, C.; LIMA, T.; CAROBREZ, A. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. *Behavioural Brain Research*, v. 158, n. 2, p. 243–250, 30 mar. 2005.

MACIEL, C.; KERR-CORRÊA, F. Complicações psiquiátricas do uso crônico do álcool: síndrome de abstinência e outras doenças psiquiátricas. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 26, n. suppl 1, p. 47–50, maio 2004.

MATSUMOTO, D. et al. Bumetanide prevents diazepam-modified anxiety-like behavior in lipopolysaccharide-treated mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 904, p. 174195, ago. 2021.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 30, n. 8, p. 1466–1471, dez. 2006.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *Journal of Psychiatric Research*, v. 41, n. 3–4, abr. 2007.

OPAS/OMS. OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. .

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, n. 3, p. 149–167, ago. 1985.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v. 266, n. 5604, abr. 1977.

REEVES, S. L. et al. M-Track: A New Software for Automated Detection of Grooming Trajectories in Mice. *PLOS Computational Biology*, v. 12, n. 9, p. e1005115, 16 set. 2016.

RESSTEL, L. B. M. et al. 5-HT 1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 156, n. 1, p. 181–188, jan. 2009.

RODGERS, R. J. et al. Risk Assessment Behaviour: Evaluation of Utility in the Study

of 5-HT-Related Drugs in the Rat Elevated Plus-Maze Test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 57, n. 4, p. 817–827, ago. 1997.

RUBERTO, V. L.; JHA, M. K.; MURROUGH, J. W. Pharmacological Treatments for Patients with Treatment-Resistant Depression. *Pharmaceuticals*, v. 13, n. 6, 4 jun. 2020.

SALES, A. J. et al. Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 86, ago. 2018.

SALES, A. J. et al. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Molecular Neurobiology*, v. 56, n. 2, 4 fev. 2019.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, v. 72, n. 3, p. 825–852, 1 jul. 1992.

SUGIMOTO, Y. et al. Differences between mice strains in response to paroxetine in the forced swimming test: Involvement of serotonergic or noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology*, v. 672, n. 1–3, p. 121–125, dez. 2011.

TIGLAO, S. M.; MEISENHEIMER, E. S.; OH, R. C. Alcohol Withdrawal Syndrome: Outpatient Management. *American family physician*, v. 104, n. 3, p. 253–262, 1 set. 2021.

WHO, W. H. O. Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates. Geneva, Switzerland: [s.n.].

WILES, N. et al. Management of treatment-resistant depression in primary care: a mixed-methods study. *British Journal of General Practice*, v. 68, n. 675, out. 2018.

ZANELATI, T. et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *British Journal of Pharmacology*, v. 159, n. 1, jan. 2010.

4 ARTIGO 3 - HARMINE (HRM) AND DIMETHYLTRYPTAMINE (DMT), AYAHUASCA COMPOUNDS, ISOLATED AND IN COMBINATION, PREVENT THE ETHANOL-INDUCED NEUROTOXICITY IN SH-SY5Y CELLS

Carolina Aparecida Faria Almeida¹, Vitor Bruno², Gabriela Salles dos Santos³, Isabella de Carvalho Alves³, Giulia de Assis Braz³, Jessyca Milene Ribeiro¹, Daniela Aparecida Chagas de Paula⁴, Albert Katchborian Neto⁴, Karina Camargo Teixeira⁴, Tania Marcourakis², Raphael Caio Tamborelli Garcia^{3*}, Larissa Helena Torres^{1*}

1- Department of Food and Drugs, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

2- Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences; University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 13B, 05508-000, São Paulo/SP, Brazil.

3- Department of Pharmaceutical Sciences, Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo, Rua São Nicolau, 210, 1º andar, 09913-030, Diadema/SP, Brazil.

4- Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

Declarations of interest: none

Address for correspondence

*Corresponding author:

Larissa Helena Torres

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Centro - Alfenas/MG

CEP: 37130-001

Tel: +55-35-3701-9513

Email: larissa.torres@unifal-mg.edu.br

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Setor de Bioquímica, Farmacologia e Toxicologia

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas

Universidade Federal de São Paulo – Unifesp

Rua São Nicolau, 2010 – 1º andar

Centro – Diadema -SP

CEP: 09913-030

Tel: +55-11-33854137

e-mail: raphael.garcia@unifesp.br

ABSTRACT

Ayahuasca is a traditional tea with psychoactive effect, and it has been used for several mental disorders, including alcohol use disorder. *In vitro* studies evaluating its neurotoxicity and neuroprotective effect against ethanol are scarce. Therefore, the aim of this study is to evaluate the neurotoxicity and neuroprotective potential of different sources of ayahuasca tea (Aya1-5; concentrations standardized by μM of DMT), as well as its main isolated compounds – dimethyltryptamine (DMT) and harmine (HRM) – against ethanol-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. A concentration-response curve (CRC) was obtained for ethanol (10 to 1000 mM); five different samples of ayahuasca teas (1 to 100 μM of DMT each); DMT and HRM (0.1 to 1000 μM of each), and also for the fraction of both together (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10, DMT and HRM) after 48 hours of exposure using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Based on that, the no-observable adverse effect level (NOAEL) was determined – 10 μM of DMT for Aya 2, 10 μM for DMT, 10 μM for HRM, and 1:2 DMT:HRM – and incubated with ethanol (250 mM) for 48 hours. MTT cell viability assay, flow cytometry (annexin V and propidium iodide), and Bax and Bcl-2 western blot analysis was performed. Ethanol 250 mM increase apoptosis and late apoptosis events, which were prevented by DMT, HRM, and DMT:HRM. In conclusion, DMT, HRM e its association have a potential neuroprotective effect against ethanol induced toxicity.

Key words: alcohol; addition; toxicity; psychedelics.

1. Introduction

Alcohol abuse use, a health public problem, is one of main preventable cause of death in the world (NIAAA, 2024). According to the last World Health Organization (WHO) Alcohol Report approximately 3 million of people die every year due to alcohol abusive use (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Alcohol abuse use

is responsible for around 13.5% of the global total of deaths of individuals aged 20 to 39 years old (DE OLIVEIRA et al., 2023). Cancer, cardiovascular, liver, and neuropsychiatric disease, as well as alcohol use disorder (AUD), represent the main causes of mortality, morbidity, and disability induced by alcohol (ABBAS et al., 2023; ÅBERG; FÄRKKILÄ; MÄNNISTÖ, 2020; HENDRIKS, 2020; RAMKISSOON; SHAH, 2022; ROERECKE, 2021).

AUD is a cyclic and chronic disease, where there is a lack of control use and behavior changes despite harm caused by repeated use (SLIEDRECHT et al., 2019). The pharmacological and non-pharmacological interventions involved in AUD treatment include both the use of aversive medications, antidepressants and anxiolytics, as well as the therapeutic support provided by patients' adherence to psychological therapies and support groups (PATEL; BALASANOVA, 2021). Nevertheless, medicines available for AUD are limited, just three medicines are approved by US Food and Drug Administration (FDA) (MCPHEETERS et al., 2023). Despite the effectiveness of treatment provided, alcohol relapse is still an issue in AUD, which reflects the need to search for new substances that may improve AUD treatment (GOLTSEKER et al., 2023).

Psychedelic substances have become a major focus of study for neuroscientists due to the treatment potential these substances hold for a range of diseases, especially those related to the central nervous system (CNS) (MAIA et al., 2023) such as anxiety (DOS SANTOS et al., 2021), depression (PALHANO-FONTES et al., 2019), personality disorders (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2019), and substance use disorder, including alcohol (AUD) (BERLOWITZ et al., 2019). Ayahuasca, also known as “vine of the dead” or “wine of souls”, is a tea prepared by the decoction of two species of plants, *Psychotria viridis* and *Banisteriopsis caapi*, which contain N,N-dimethyltryptamine (DMT) and alkaloids in their composition, β -carboline, such as harmine (HRM), respectively (MARTINS et al., 2023). DMT is characterized as a non-selective agonist for serotonergic 5-HT_{2A} receptors and has affinity for other serotonin, dopamine and acetylcholine receptors, while β -carbonyl alkaloids act as monoamine oxidase (MAO) inhibitors (SAEGER; OLSON, 2022).

Research involving ayahuasca indicates that this beverage has significant potential in treating AUD, both in preclinical models (ALMEIDA et al., 2022; GIANFRATTI et al., 2022), and observational studies (BARBOSA et al., 2016, 2018).

In addition, in a randomized placebo-controlled trial, ayahuasca had a significant antidepressant effect, abstinence symptoms, after a single dose when compared to placebo (PALHANO-FONTES et al., 2019).

However, despite the millenary intake of ayahuasca, little is known about the toxicity of this beverage and its effects on the CNS. Then, *in vitro* studies evaluating a potential neuroprotection effect of new substances against neurotoxicity induced by drug of abuse are essential for the development of new pharmacology therapy for drug addiction due to the lack of treatment for this global health public problem. Thus, this study aimed to evaluate the neurotoxicity and the neuroprotective action of different sources of ayahuasca tea and its main compound DMT and HRM against the neurotoxicity induced by ethanol in SH-SY5Y cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and drugs

Ayahuasca teas (Aya 1-5) samples were obtained from different sources. Aya 1 and Aya 2 were donated by the Jurema Institute, Aya 3 was donated by an unidentified source, Aya 4 came from the Xamânico Fogo Sagrado Center, and Aya 5 was provided by Anayahuasca. Teas were acquired by donation of School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. They were submitted to a freezing-dried process (Liotop L101, Liobras) and DMT and HRM were quantified using an ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) system (DE OLIVEIRA SILVEIRA et al., 2020). Data obtained through these processes were summarized in Table 1.

Table 1: Concentration of DMT and HRM obtained from each sample of lyophilized ayahuasca tea and the fold-increase of HRM concentration compared to DMT.

Sources	Lyophilized Aya mass (mg)	[DMT (mg/mL)	[HRM] (mg/mL)	[HRM] fold-increase
Jurema Institute (Aya 1)	104.89	0.17	0.35	2.1
Jurema Institute (Aya 2)	109.68	0.22	0.43	2.0
Not identified (Aya 3)	103.62	0.40	0.58	1.5
Xamânico Fogo Sagrado Center (Aya 4)	106.37	0.36	2.33	6.5
Anayahuasca (Aya 5)	103.78	0.26	0.64	2.5

DMT and HRM were isolated from *B. caapi* and *P. viridis* extracts respectively. *B. caapi* was collected in Pindamonhangaba, SP (22° 45' 47.5" S 45° 28' 05.9" W) and *P. viridis* was collected in Piedade, SP (23° 41' 40.0" S 47° 26' 03.8" W). The protocol of crude extract and fraction of each plant, also the protocol of isolation and identification of DMT and HRM were described in (KATCHBORIAN-NETO et al., 2020) Ethanol (99%) was obtained from Sigma-Aldrich®.

The concentration of substances was obtained from a 1 M mother solution. Aya teas were soluble in supplemented DMEM/HAM's F12, thus their mother solution was soluble in supplemented DMEM/HAM's F12 and then the solution was filtered (Millipore Express® PES Membrane 0.22µm). As DMT and HRM are not soluble in supplemented DMEM/HAM's F12, a concentrated solution was made with DMSO. Therefore, a vehicle group (VE) containing 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 was used.

2.2. SH-SY5Y cell culture and exposure conditions

SH-SY5Y human neuroblastoma was acquired in ATCC (CRL-2266™). Cell thawing, growing, and passages protocols were performed according to (SANTOS et

al., 2022).

Time of exposure, 48 hours, was determinate based on (KATCHBORIAN-NETO et al., 2020). Firstly, for 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay cells were plated in 24-well places at a density of 1×10^5 cells per well to provide the concentration-response curve (CRC) of each substance regarding their neuroprotection or neurotoxicity properties. Then, for Annexin/Pi flow cytometry assay cells were placed in 12-well places at a density of 1×10^6 cells per well to provide stage of cells, among viable and death cells. Finally, for Western blot analysis cells were plated in cell culture flash 25 cm² (T25) at a density of 2.0×10^6 cells. In all experiments, the wall of cell places incubation was filled with parafilm to avoid ethanol evaporation during the exposure.

2.3. Cell viability

SH-SY5Y cell viability was evaluated by MTT (Sigma®) assay (Mosmann 1983; Liu et al. 1997), according to protocol described by (Dos Santos et al., 2022). After the exposure period, a CRC was established to determine the risk assessment of each substance and identify suitable concentrations for subsequent experiments.

To evaluate the neurotoxicity of the five different samples of ayahuasca, CRC were built with concentrations ranging from 1 to 100 μ M, based on the amount of DMT presents in each tea. CRCs were also done for the main ayahuasca alkaloids, DMT and HRM, ranging from 0.1 to 1000 μ M, while ethanol CRC spanned concentrations from 10 to 1000 mM. Moreover, a CRC was developed for combination of DMT and HRM at different proportions of DMT:HRM - 1:1, 1:2, 1:5 and 1:10.

After determining the risk assessment of substances, the chosen concentration of Aya, DMT, HRM and DMT:HRM proportion fraction were incubated with ethanol to evaluate the potential neuroprotective effects of these substances against ethanol-induced neurotoxicity. KCl was used as the positive control cell death.

2.4. Cells death stage

After the exposure time, the stage of cell death was measured using commercially available FITC Annexin V Apoptosis Detection (A13201) and PI (BMS500PI) by the manufacturer's instructions. The analysis was read on Flow cytometry FacsCalibur (BD) equipment and FlowJo v7 software; 10 000 events per sample were collected in all analyses. The protocol was conducted according to (UDO et al., 2021).

2.5. Western blot analysis

Cells were collected after the exposure time and then the pellet was sonicated with 50 μ l of RIPA buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate including protease and phosphatase inhibitor cocktails (Thermo Scientific, 78442). The Western blot technique was performed according to (ALMEIDA et al., 2022). The following primary antibodies used were mouse monoclonal anti-Bax 1:1000 (Abcam, ab77566) and rabbit monoclonal anti-Bcl-2 1:1000 (Abcam, ab182858). The secondary antibodies used were anti-mouse (Sigma-Aldrich, NA931V) and anti-rabbit (Sigma-Aldrich, NA934V) conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (GE Healthcare UK Limited). The endogenous control was the monoclonal anti- β -actin 1:25000 (Sigma-Aldrich).

3. Statistical analysis

All the experiments were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. GraphPad Prism software version 9.0 was used for analysis and plotting data. Data was reported as mean \pm SEM, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

4. Results

Figure 1 displays the CRC of SH-SY5Y cell viability after exposure to various samples and concentrations of ayahuasca (from 1 to 100 μ M based on the DMT

quantification; n=18) for 48 hours. While Figure 1a is summarizing the results, Figures 1b-f show the CRCs of each ayahuasca tea (1-5, respectively).

Aya 1 (Fig. 1b), Aya 3 (Fig. 1d), and Aya 5 (Fig. 1f) exhibited a similar pattern of alteration in cell viability. For all of them, one-way ANOVA suggested a significant effect of treatment (for Aya 1, $F(4, 85) = 230.8$; $p < 0.0001$; for Aya 3, $F(4, 85) = 135.6$; $p < 0.0001$; for Aya 5, $F(4, 85) = 146.6$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test revealed a progressive and persistent reduction in cell viability for all concentrations tested compared to the control group, as follows: 1 μM ($p < 0.001$ for Aya 1; $p < 0.05$ for Aya 3; $p < 0.01$ for Aya 5) and 10 and 100 μM ($p < 0.0001$ for both concentrations for all samples). Moreover, statistical differences were observed among all concentrations for the three samples: 1 μM compared to 10 and 100 μM , and 10 μM compared to 100 μM ($p < 0.001$ for all comparisons). In addition, the control group and all concentrations tested statistically differed from the KCl group ($p < 0.0001$ for all samples), except for the concentration of 100 μM for all samples.

For Aya 2 (Fig. 1c), one-way ANOVA showed a significant treatment effect ($F(4, 85) = 149.2$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test indicated that the reduction in cell viability was only statistically significant for the concentration of 100 μM compared to the control group ($p < 0.0001$). Moreover, the highest concentration (100 μM) statistically differed from both lower concentrations tested (1 and 10 μM , respectively; $p < 0.0001$). The group treated with KCl showed decreased cell viability compared to the control, 1, and 10 μM groups ($p < 0.0001$), but not compared to the 100 μM group ($p > 0.9999$). Thus, Aya 2's no observed adverse effect level (NOAEL) is 10 μM of DMT, and this concentration was chosen to continue the experiments.

The results for cell viability for Aya 4 are shown in Fig. 1e. One-way ANOVA suggested a significant treatment effect ($F(4, 82) = 382.0$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test indicated a reduction in cell viability for all three concentrations tested compared to the control group ($p < 0.0001$). Moreover, statistical differences were also observed when comparing all three concentrations ($p < 0.0001$), except for the comparison of 10 vs. 100 μM . The KCl-treated group showed a reduction in cell viability compared to the control and 1 μM group ($p < 0.0001$), but the two higher concentrations (10 and 100 μM , respectively) had a similar cell viability to the KCl-treated group ($p > 0.9999$).

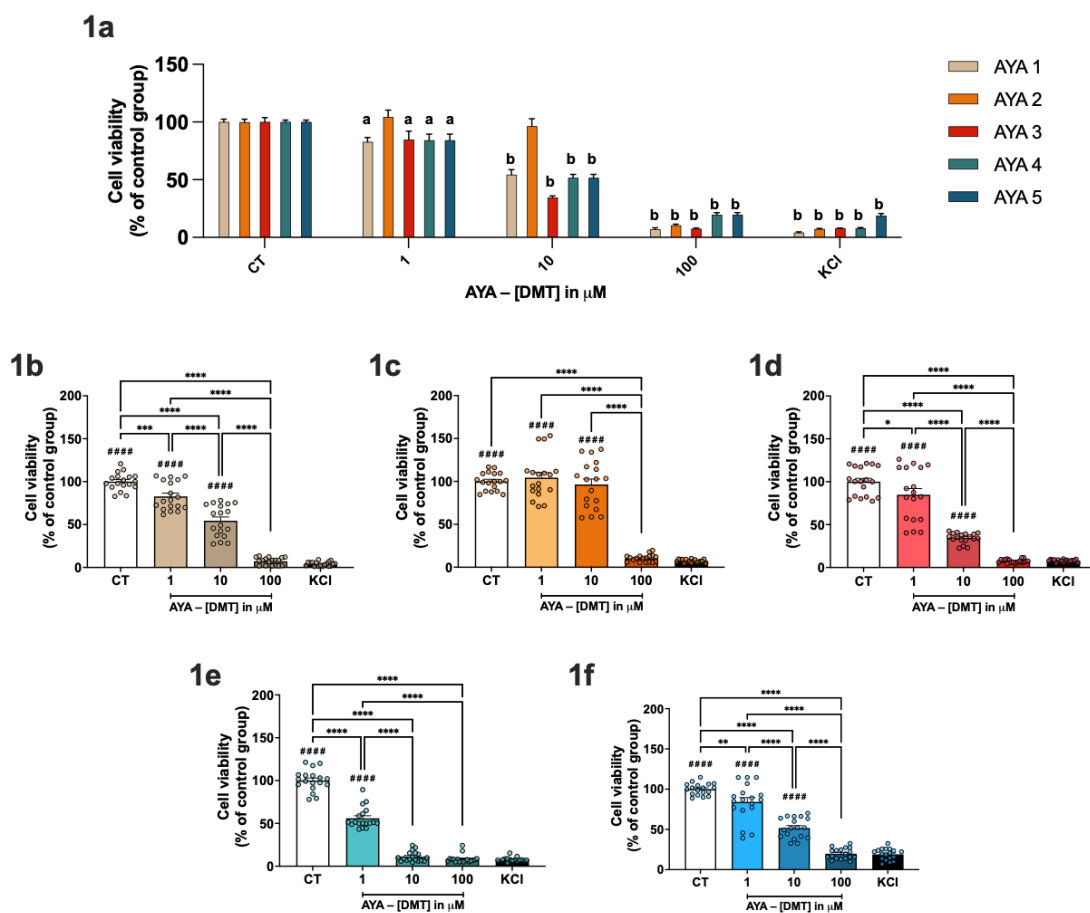


Fig. 1: Concentration response curve (CRC) for five different sources of ayahuasca tea ($n = 18/\text{group}$) (1a). Cell viability results after 48 hours of exposure to Aya teas (1, 10 and 100 μM of DMT) for Aya 1 (1b), Aya 2 (1c), Aya 3 (1d), Aya 4 (1e) and Aya 5 (1f). KCl 250 mM was used as the positive control for cell death. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test and were expressed as % of the control group (mean \pm SEM). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$. # indicates the significant differences compared to the KCl group. ##### $p < 0.0001$.

Figure 2 shows the CRC of SH-SY5Y cell viability after exposure to different concentrations (from 0.1 to 1000 μM) of DMT (Fig. 2a, 2b) and HRM (Fig. 2c, 2d), as well as a range of fractions (from 1:1 to 1:10) of the DMT:HRM combination (Fig. 2e) for 48 hours. For the DMT CRC (Fig. 2a), one-way ANOVA revealed a significant difference in treatment ($F(7, 136) = 89.21$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test suggested no statistical difference among the CT, VE, and DMT-treated groups at concentrations from 0.1 to 100 μM . However, it indicated a decrease in cell viability after 48 hours of DMT exposure at a concentration of 1000 μM compared to all other groups ($p < 0.0001$; Fig. 2a). The KCl-treated group exhibited the lowest cell viability rate compared to all other groups ($p < 0.0001$). Moreover, the DMT IC₅₀ is

approximately 1056 μM ($R^2 = 0.608$; Fig. 2b). Therefore, DMT's NOAEL is 100 μM .

Regarding the cells exposed to HRM for 48 hours, one-way ANOVA for its CRC showed a significant treatment effect ($F(7, 136) = 39.11$; $p < 0.0001$; Fig. 2c). Bonferroni's test suggested no statistical differences among the CT, VE, 1 μM , and 10 μM HRM groups. However, the two higher concentrations (100 μM and 1000 μM) showed a decrease in cell viability compared to CT and VE ($p < 0.0001$ for both). Additionally, 100 μM HRM group exhibited lower cell viability compared to 0.1, 1 and 10 μM ($p < 0.0001$ for all) groups. The 1000 μM HRM group also showed decreased cell viability compared to the 0.1, 1 and 10 μM groups ($p < 0.0001$ for all). The KCl-treated group showed decreased cell viability compared to all other groups ($p < 0.0001$ and $p < 0.005$ for the 100 μM group), except for the 1000 μM group. The HRM IC₅₀ is 109.3 μM ($R^2 = 0.650$; Fig. 2d), thus, HRM's NOAEL is 10 μM . Consequently, for both substances (DMT and HRM), after conducting the experiment with the same concentration, 10 μM was chosen for the next steps of the experiment.

For the CRC of the DMT:HRM combination, one-way ANOVA suggested a significant effect for treatment ($F(8, 153) = 55.56$; $p < 0.0001$; Fig. 2e). Bonferroni's test showed no statistically significant difference among the CT, VE, DMT, and HRM groups, as previously shown. For the 1:1 fraction of DMT:HRM, cell viability was lower compared to the DMT, 1:5 ($p < 0.001$ for both), and 1:10 ($p < 0.0001$) groups. Moreover, the DMT:HRM proportion 1:10 had lower cell viability compared to all the other groups ($p < 0.0001$), except for the KCl-treated group. The KCl-treated group exhibited decreased cell viability compared to all the other groups ($p < 0.0001$).

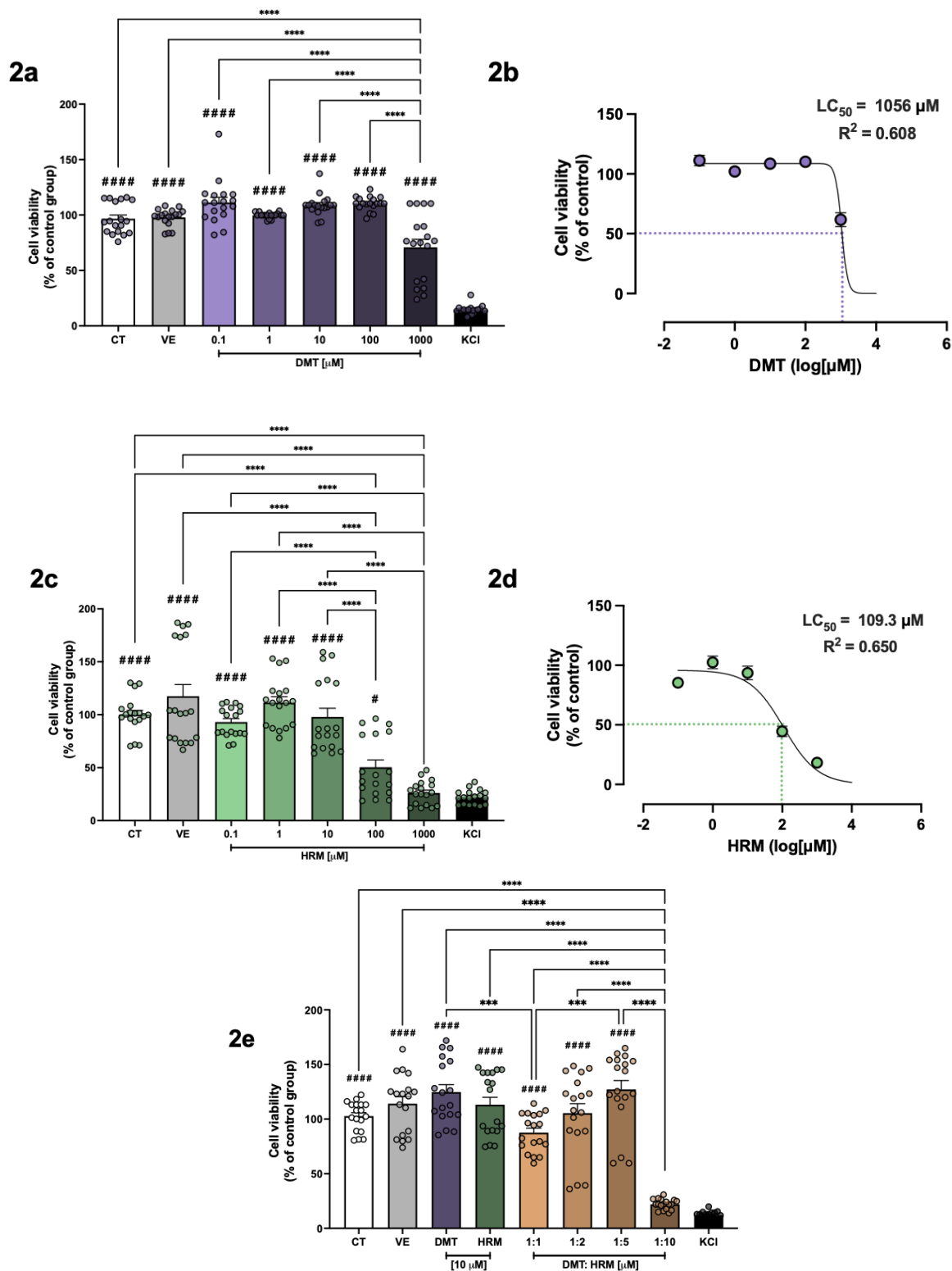


Fig. 2: Concentration response curve (CRC) for DMT (Fig. 2a and 2b), HRM (Fig. 2c and 2d) and DMT:HRM combination (Fig. 2e). Cell viability results ($n = 18/\text{group}$) after 48 hours of exposure of DMT (0.1, 1, 10, 100 and 1000 μM), HRM (0.1; 1, 10, 100 and 1000 μM) or DMT:HRM combination (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10). The values of DMT (2b) and HRM (2d) concentrations were transformed in a log function to calculate the respective IC_{50} . 250 mM KCl was the positive control cell death. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc and are expressed as % of control group (mean \pm SEM). *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$. # indicates the significant

differences compared to the KCl group. # $p < 0.05$. ##### $p < 0.0001$.

Figure 3 illustrates the CRC of SH-SY5Y cell viability after exposure to different concentrations of ethanol (from 10 to 1000 μM) for 48 hours ($n = 6$). One-way ANOVA indicated a significant effect for treatment ($F(6, 35) = 190.5$; $p < 0.0001$; Fig. 3a). Bonferroni's test results showed a significant decrease in cell viability starting from 100 μM of ethanol, as follows: for 100 μM ($p < 0.01$), 250 μM ($p < 0.0001$), 500 μM ($p < 0.001$) and 1000 μM ($p < 0.0001$). There was no significant difference between cell viability when they are exposed to 10 μM ethanol ($p = 0.6706$). In addition, the concentrations of 250, 500, and 1000 μM showed decreased cell viability compared to the concentration of 10 μM ($p < 0.0001$). The concentrations of 250 μM ($p < 0.01$) and 500 and 1000 μM ($p < 0.0001$ for both) showed decreased cell viability compared to the concentration of 100 μM . The concentrations of 500 μM ($p < 0.001$) and 1000 μM ($p < 0.0001$) exhibited lower cell viability compared to the concentration of 250 μM . Similarly, 1000 μM showed decreased cell viability compared to 500 μM ($p < 0.0001$). The KCl-treated group exhibited reduced cell viability compared to all groups ($p < 0.0001$), except for the group treated with 1000 μM ethanol.

The ethanol IC_{50} is 489.9 μM ($R^2 = 0.925$; Fig. 3b). The concentration chosen to continue the experiment was 250 μM , as this concentration is between the lowest observable adverse effect level (LOAEL) of ethanol (100 μM) and the ethanol IC_{50} (489.0 μM).

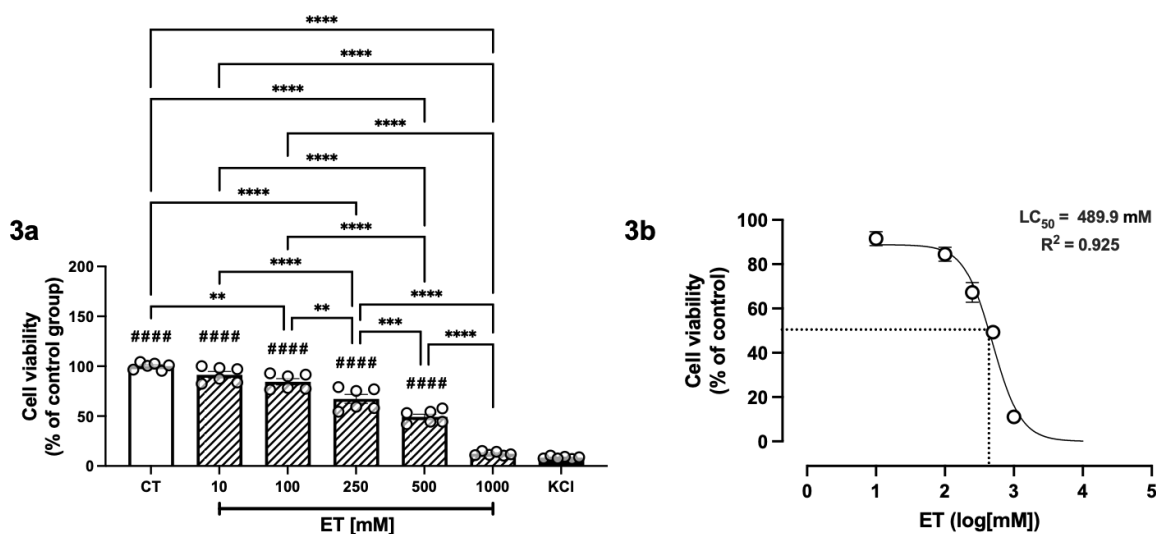


Fig. 3: Concentration response curve (CRC) for ET (3a,b). Cell viability results ($n = 6/\text{group}$), expressed as percentage of SH-SY5Y cell that reduced chemically MTT to formazan compared with control group (CT), after 48 hours of ET (10, 100, 250, 500 and 1000 mM). The values of ET (3b) concentrations were transformed in a log function to calculate its IC_{50} . 250 mM. KCl was the positive control cell death. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test and are expressed as % of control group (mean \pm SEM). ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$. # indicates the significant differences compared to the KCl group. ##### $p < 0.0001$.

Figure 4 shows the cell viability after 48h of exposure to ayahuasca (10 μM Aya 2, Fig. 4a), 10 μM DMT (Fig. 4b), 10 μM HRM (Fig. 4c) and 1:2 DMT:HRM (Fig. 4d) combined to ethanol 250 mM. Regarding Aya 2 effects in the context of ET-induced neurotoxicity (Fig. 4a; $n = 18/\text{group}$), one-way ANOVA showed a significant treatment effect ($F(4, 85) = 133.0$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test revealed a decrease in cell viability when cells were exposed to AYA ($p < 0.01$), ET ($p < 0.0001$), and AYA+ET ($p < 0.0001$) compared to the CT group. Moreover, the ET-treated group exhibited lower cell viability compared to the AYA group ($p < 0.0001$), and the AYA+ET group showed decreased cell viability compared to the ET group ($p < 0.05$), and AYA group ($p < 0.0001$), suggesting a synergistic increase in the neurotoxicity of the substances. The KCl-treated group displayed the lowest cell viability compared to all other groups ($p < 0.0001$).

Related to the cell viability after exposure to DMT and ethanol ($n = 18/\text{group}$; Fig. 4b), one-way ANOVA showed a significant treatment effects ($F(5, 102) = 181.4$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test showed that exposure to DMT had no effect on cell viability compared to the CT ($p = 0.2617$) and VE ($p > 0.9999$) groups. Cells exposed to ethanol treatment had decreased viability compared to the CT, VE groups, and

DMT-treated groups ($p < 0.0001$). Moreover, the combined treatment of DMT+ET exhibited lower cell viability compared to the CT, VE, and DMT groups ($p < 0.0001$), but not compared to the ET group ($p > 0.9999$). The KCl-treated group displayed the lowest cell viability compared to all other groups ($p < 0.0001$).

A one-way ANOVA showed significant treatment effects ($F(5, 102) = 113.2$; $p < 0.0001$) of HRM against ethanol-induced neurotoxicity ($n = 18/\text{group}$; Fig. 4c). Bonferroni's test indicated that HRM exposure had no effect on cell viability compared to the CT and VE groups. In contrast, ethanol exposure induced a decrease in cell viability compared to the CT, VE, and HRM groups ($p < 0.0001$). The combined treatment of HRM+ET exhibited higher cell viability compared to all other groups ($p < 0.05$ for the CT, VE, and ET groups, and $p < 0.0001$ for the ET-treated group). The KCl-treated group showed the lowest cell viability compared to all other groups ($p < 0.0001$).

Figure 4d displays the cell viability after 48h of exposure to the 1:2 fraction of DMT:HRM in the context of ethanol-induced neurotoxicity ($n = 18/\text{group}$). One-way ANOVA showed a significant treatment effect ($F(5, 102) = 180.5$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test indicated that cells treated with the 1:2 DMT:HRM fraction had increased cell viability compared to the CT, VE, and combined treatment 1:2+ET groups ($p < 0.0001$ for all comparisons). The ethanol exposure group showed decreased cell viability compared to the CT, VE, isolated treatment with 1:2, and combined treatment of 1:2+ET ($p < 0.0001$ for all comparisons). Additionally, the KCl-treated group exhibited the lowest rate of cell viability compared to all other groups ($p < 0.0001$).

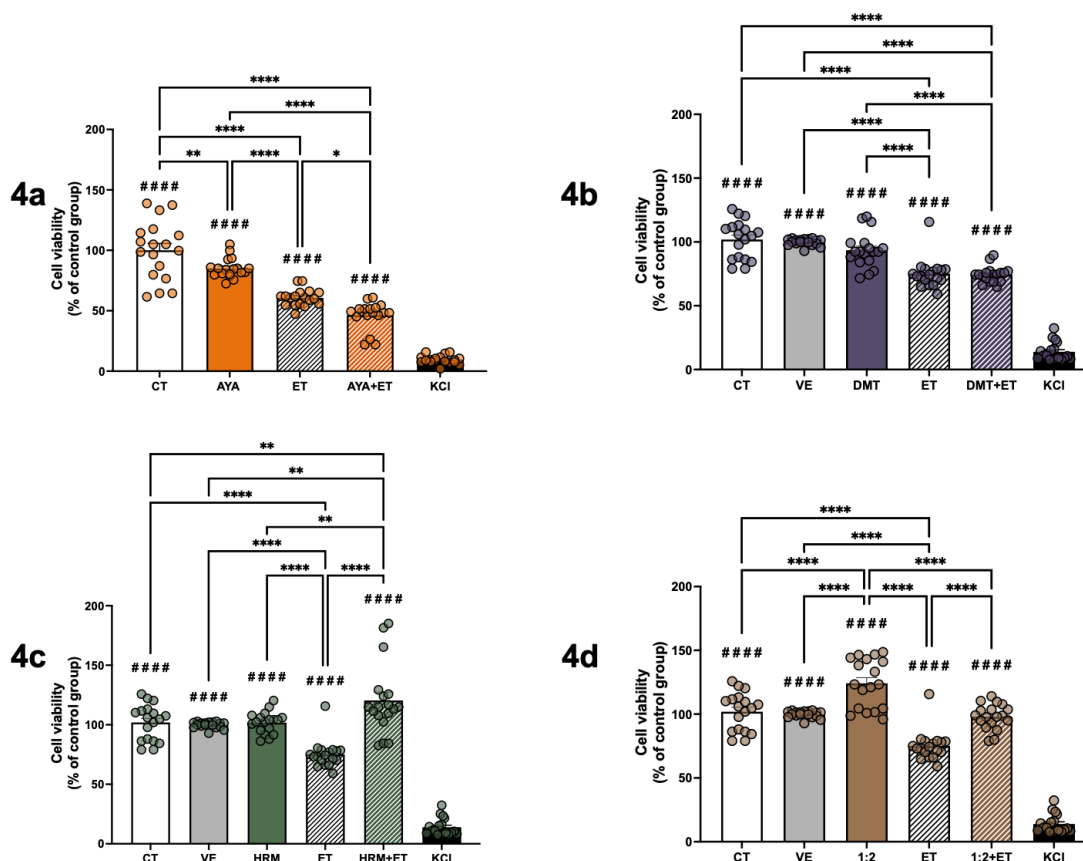


Fig. 4: Cell viability results ($n = 18/\text{group}$) after 48 hours of exposure of Aya 2 (DMT $10\mu\text{M}$, Fig. 4a), DMT ($10\mu\text{M}$, Fig. 4b), HRM ($10\mu\text{M}$, Fig. 4c), and DMT:HRM combination (1:2, Fig. 4d) with ET (250 mM). 250 mM KCl was the positive control cell death. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test and were expressed as % of control group (mean \pm SEM). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$. # indicates the significant differences compared to the KCl group. #### $p < 0.0001$.

Figures 5, 6, and 7 show the analysis of stage of cell death performed by Annexin V/PI flow cytometry assays after 48 hours of exposure to DMT, HRM, and DMT:HRM (1:2) respectively. The flow cytometry panels were illustrated (Fig. 5a, 6a, and 7a), which depict the density of viable cells (bottom left quadrant, Q4), cells undergoing apoptosis (upper left quadrant, Q1), late apoptosis (upper right quadrant, Q3), or necrosis (bottom right quadrant, Q3), along with the corresponding percentage of cells for these contexts (Fig. 5, 6, 7b-e).

Analysis of cell death by Annexin V/PI flow cytometry assay of SH-SY5Y cells after 48 hours of $10\mu\text{M}$ DMT exposure ($n = 3$). Cells were treated with DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), DMT $10\mu\text{M}$ (DMT), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (DMT+ET). Flow cytometry panel displaying the density of viable cells (Q4), cells undergoing

apoptosis (Q1), late apoptosis (Q2) or necrosis (Q3) (5a). Percentage of viable cells (5b), cells undergoing apoptosis (5c), late apoptosis (5d) and necrosis (5e) after exposure. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data are expressed as % of cells (mean \pm SEM). ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$. For SH-SY5Y cells exposed to DMT (Figure 5), one-way ANOVA showed a significant effect of treatment on viable cells ($F(4, 10) = 31.37$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test indicated that the percentage of cells decreased significantly when exposed to ethanol compared to the CT, DMT, and DMT+ET ($p < 0.0001$, for all of them) and VE ($p < 0.001$) groups. Regarding cells undergoing apoptosis and late apoptosis, statistical analysis revealed a similar pattern: one-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($F(4, 10) = 15.88$; $p < 0.0001$ for apoptosis and $F(4, 10) = 33.73$; $p < 0.0001$ for late apoptosis). Bonferroni's test showed that the ethanol exposure induced an increase in the percentage of cells in both stages compared to the CT ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, for apoptosis and late apoptosis, respectively), vehicle ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, for apoptosis and late apoptosis, respectively), DMT ($p < 0.001$ for apoptosis and $p < 0.0001$ for late apoptosis), and DMT+ET group ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$, for apoptosis and late apoptosis, respectively). For cells undergoing to necrosis, one-way ANOVA indicated no statistical difference in treatment ($F(4, 10) = 1.515$; $p = 0.2701$).

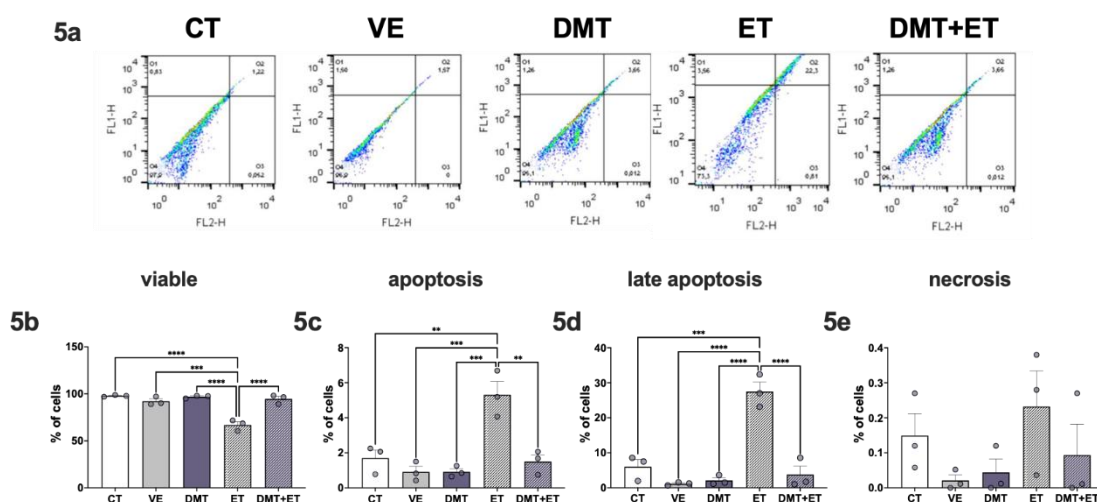


Fig. 5: Analysis of cell death by Annexin V/Pi flow cytometry assay of SH-SY5Y cells after 48 hours of 10 μM HRM exposure (n = 3). Cells were treated with DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), DMT 10 μM (DMT), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (DMT+ET). Flow cytometry panel displaying the density of viable cells (Q4), cells undergoing apoptosis (Q1), late apoptosis (Q2) or necrosis (Q3) (5a). Percentage of viable cells (5b), cells undergoing apoptosis (5c), late apoptosis (5d) and necrosis (5e) after exposure. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data are expressed as % of cells (mean ± SEM). **p < 0.01. ***p < 0.001. ****p < 0.0001.

When SH-SY5Y cells were exposed to HRM (Figure 6), one-way ANOVA showed a significant effect of treatment on viable cells ($F(4, 10) = 49.48$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test indicated that the percentage of cells decreased significantly when were exposed to ethanol compared to the CT, VE, HRM, and HRM+ET ($p < 0.0001$, for all of them) group. In the context of cells undergoing apoptosis and late apoptosis, statistical analysis revealed a similar pattern: one-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($F(4, 10) = 18.26$; $p < 0.0001$ for apoptosis and $F(4, 10) = 56.44$; $p < 0.0001$ for late apoptosis). Regarding to ethanol group, Bonferroni's test suggested a substantial increase in the percentage of cells in both stages compared to the control ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, for apoptosis and late apoptosis, respectively), vehicle ($p < 0.001$ for apoptosis and $p < 0.0001$ for late apoptosis, respectively), HRM ($p < 0.001$ for apoptosis and $p < 0.0001$ for late apoptosis), and HRM+ET group ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$, for apoptosis and late apoptosis, respectively). For cells undergoing to necrosis, one-way ANOVA indicated no statistical difference in treatment ($F(4, 10) = 3.084$; $p = 0.0677$).

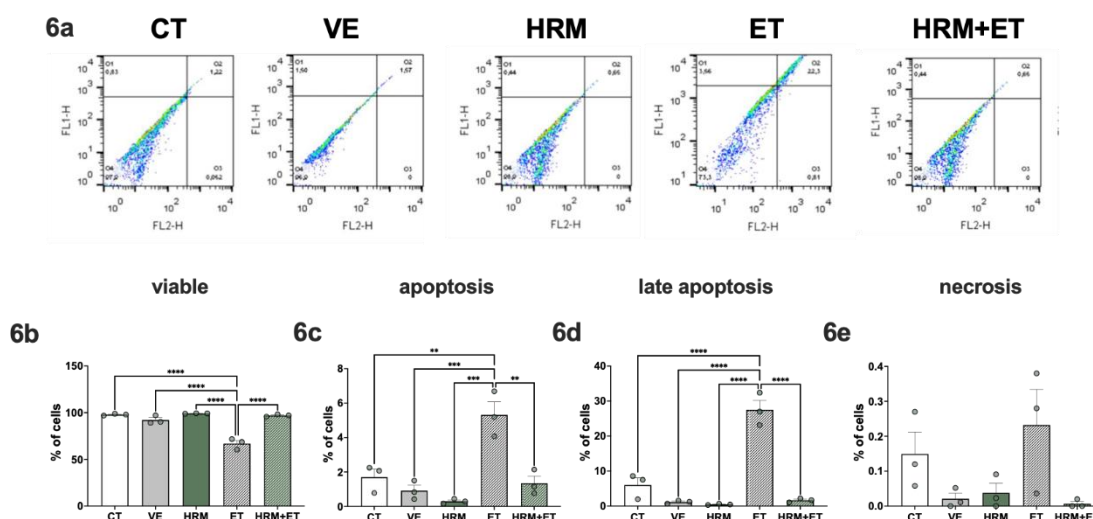


Fig. 6: Analysis of cell death by Annexin V/Pi flow cytometry assay of SH-SY5Y cells after 48 hours of 10 μ M HRM exposure ($n = 3$). Cells were treated with DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), harmine 10 μ M (HRM), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (HRM+ET). Flow cytometry panel displaying the density of viable cells (Q4), cells undergoing apoptosis (Q1), late apoptosis (Q2) or necrosis (Q3) (5a). Percentage of viable cells (5b), cells undergoing apoptosis (5c), late apoptosis (5d) and necrosis (5e) after exposure. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data are expressed as % of cells (mean \pm SEM). ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

Finally, one-way ANOVA for SH-SY5Y cells were exposed to 1:2 DMT:HRM (Figure 7) showed a significant effect of treatment on viable cells ($F(4, 10) = 21.34$; $p < 0.0001$). Bonferroni's test indicated that the percentage of cells decreased significantly when exposed to ethanol compared to the control ($p < 0.0001$), vehicle ($p < 0.001$), 1:2 ($p < 0.01$), and 1:2+ET ($p < 0.001$) group. Concerning cells undergoing apoptosis and late apoptosis, statistical analysis revealed a similar pattern: one-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($F(4, 10) = 10.13$; $p = 0.0015$ for apoptosis and $F(4, 10) = 23.20$; $p < 0.0001$ for late apoptosis).

Regarding ET group, Bonferroni's test showed a substantial increase in the percentage of cells in both apoptosis and late apoptosis stages compared to CT ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively), VE ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively), and 1:2+ET group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). However, when ET group was compared to 1:2 group, there was no difference for apoptosis ($p = 0.0765$), but for late apoptosis ($p < 0.01$). For cells undergoing to necrosis, one-way ANOVA indicated statistical effect for treatment ($F(4, 10) = 8.339$; $p = 0.0032$). Bonferroni's test suggested an increase in the percentage of cells treated with 1:2+ET in comparison to the control group ($p < 0.01$).

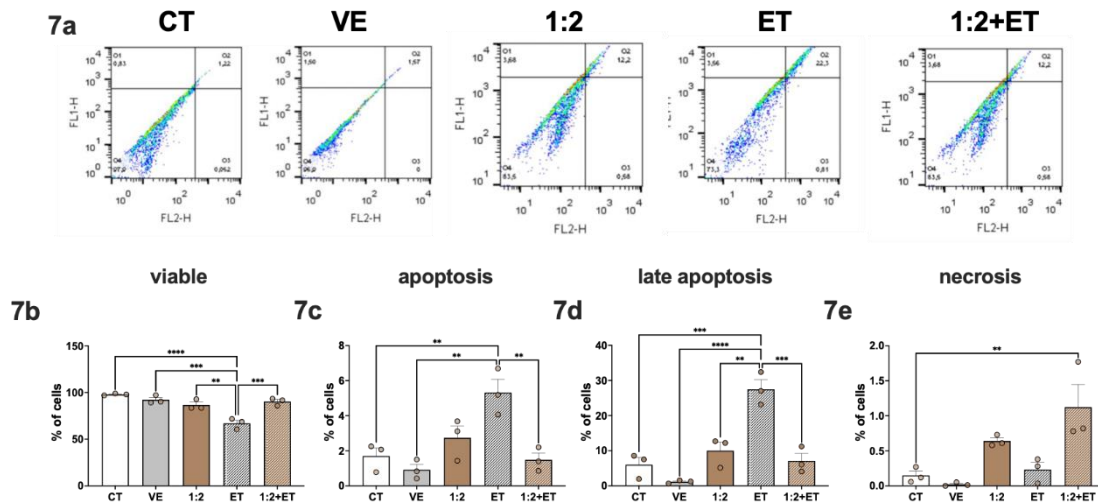


Fig. 7: Analysis of cell death by Annexin V/Pi flow cytometry assay of SH-SY5Y cells after 48 hours of 1:2 DMT:HRM exposure (n = 3). Cells were treated with DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), 1:2 DMT:HRM (1:2), ethanol 250 mM (ET) and association of substances (1:2+ET). Flow cytometry panel displaying the density of viable cells (Q4), cells undergoing apoptosis (Q1), late apoptosis (Q2) or necrosis (Q3) (5a). Percentage of viable cells (5b), cells undergoing apoptosis (5c), late apoptosis (5d) and necrosis (5e) after exposure. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data are expressed as % of cells (mean ± SEM). ** p < 0.01. ***p < 0.001. ****p < 0.0001.

Figures 8, 9, and 10 show Bax and Bcl-2 protein levels and the Bax/Bcl-2 ratio when SH-SY5Y cells were exposed to DMT, HRM or 1:2 DMT:HRM, ethanol, and their combination, respectively. For Bax level, one-way ANOVA suggested a significant treatment effect ($F(4, 20) = 5.868$). Bonferroni's test indicated that ethanol treatment increased the Bax protein level compared to the CT and VE groups ($p < 0.01$ for both comparisons, Fig. 8a). The one-way ANOVA showed no significant treatment effect for Bcl-2 protein level ($F(4, 20) = 1.770$, $p = 0.1745$, Fig. 8b) or Bax/Bcl-2 ratio ($F(4, 20) = 0.5540$, $p = 0.6984$, Fig. 8c).

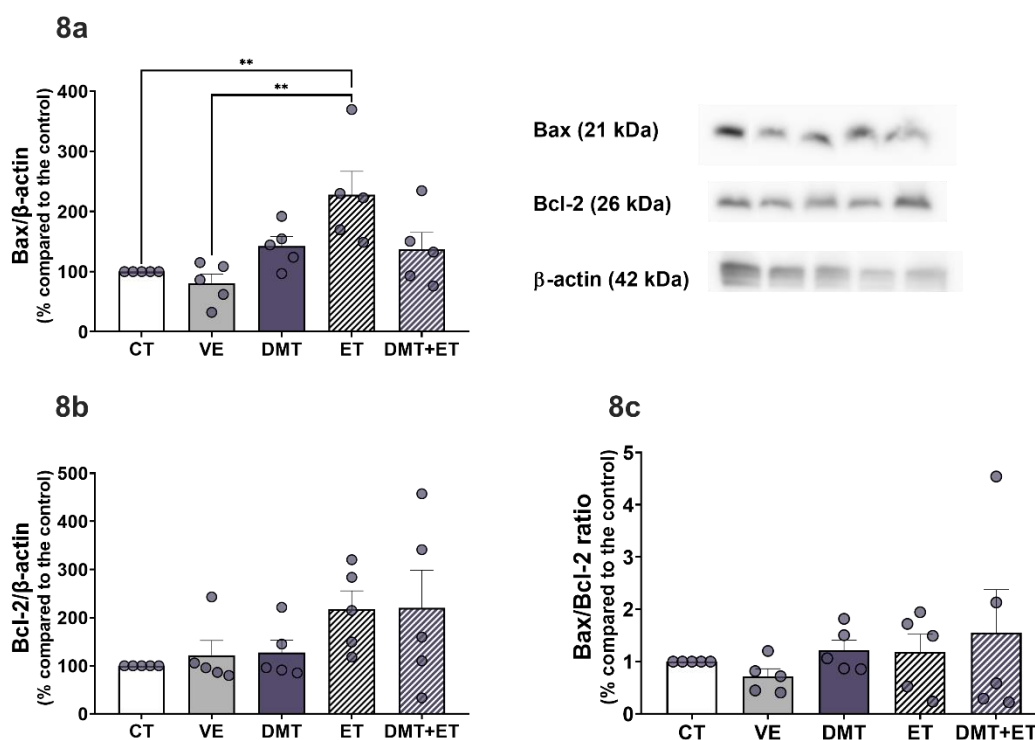


Fig 8: Analysis of Bax and Bcl-2 proteins by Western blot. SH-SY5Y cells were incubated with DMEM/HAM's F12 (CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (VE), DMT 10 μ M (DMT), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (DMT+ET). (8a) Bax protein; (8b) Bcl-2 protein; (8c) Bax/Bcl-2 ratio. Data were obtained by one way ANOVA followed by Bonferroni's test and are expressed as % of control group (mean \pm SEM). ** $p < 0.01$.

The results for Bax and Bcl-2 protein levels and the Bax/Bcl-2 ratio for SH-SY5Y cells exposed to HRM, ET and its combination are displayed in Fig. 9a, 9b and 9c, respectively. For these exposures, one-way ANOVA showed no treatment effects for Bax level ($F(4, 20) = 0.9623$, $p = 0.4497$, Fig. 9a) and Bax/Bcl-2 ratio ($F(4, 20) = 0.09608$, $p = 0.9825$, Fig. 9c), but showed a significant treatment effect for Bcl-2 level ($F(4, 20) = 2.915$, $p = 0.0474$, Fig. 9b). However, Bonferroni's test revealed no statistical differences among groups.

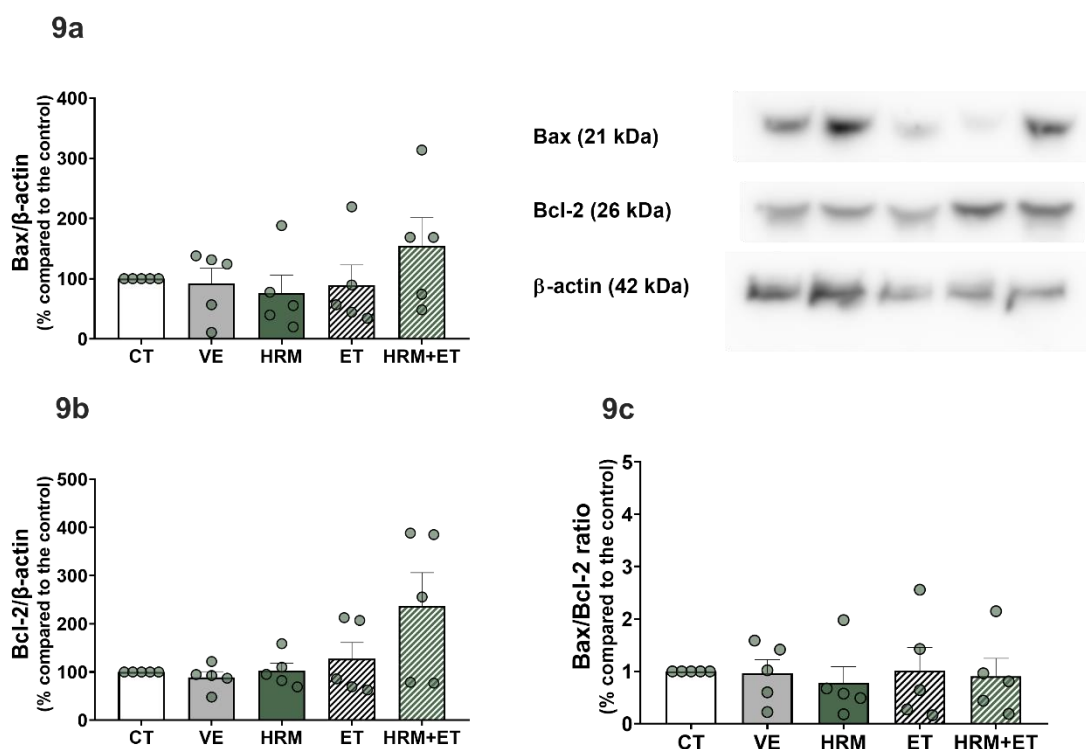


Fig 9.: Analysis of Bax and Bcl-2 proteins by Western blot. SH-SY5Y cells were incubated with DMEM/HAM's F12 (CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (VE), HRM 10 μ M (HRM), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (HRM+ET). (9a) Bax protein; (9b) Bcl-2 protein; (9c) Bax/Bcl-2 ratio. Data were obtained by one way ANOVA followed by Bonferroni's test and are expressed as % of control group (mean \pm SEM).

Fig. 10a, 10b and 10c demonstrated the results for Bax and Bcl-2 protein levels and the Bax/Bcl-2 ratio for SH-SY5Y cells exposed to DMT:HRM, ET and its combination, respectively. For these exposures, one-way ANOVA showed no treatment effects for Bax level ($F(4, 15) = 3.343$, $p = 0.0381$, Fig. 10a) and Bcl-2 level ($F(4, 15) = 0.4694$, $p=0.7574$, Fig. 10b), but showed a significant treatment effect for Bax/Bcl-2 ratio ($F(4, 15) = 4.019$ $p = 0.0207$, Fig. 10c). Bonferroni's test revealed that VE group had an increase of Bax/Bcl-2 ratio related to 1:2+ET group ($p < 0.05$, Fig. 10c).

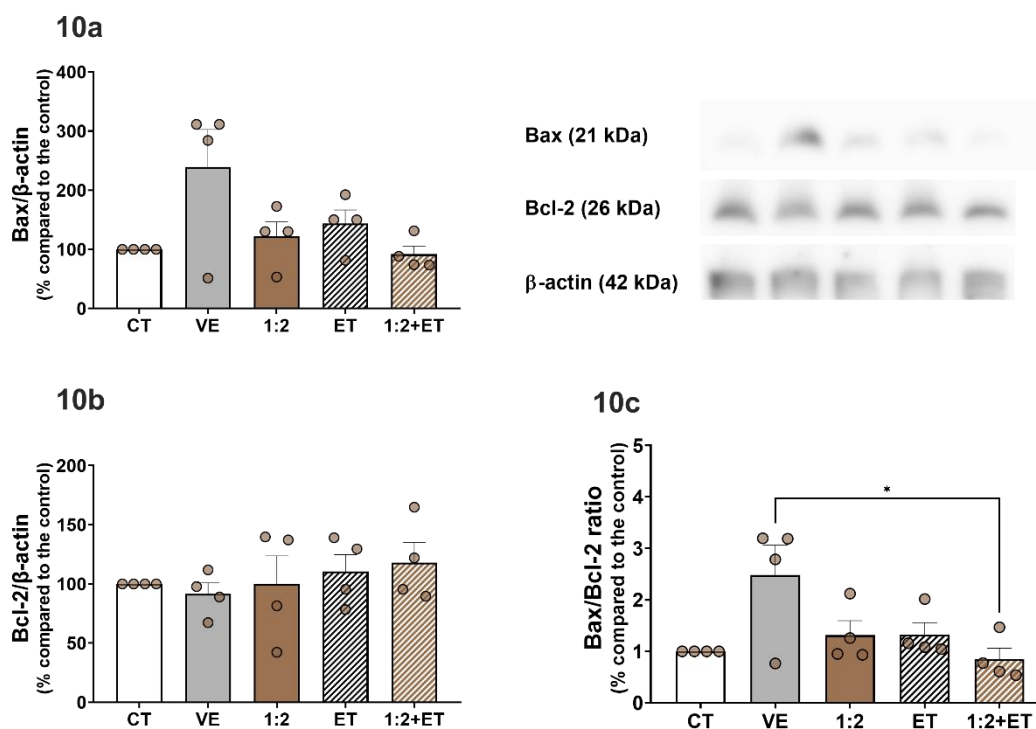


Fig 10.: Analysis of Bax and Bcl-2 proteins by Western blot. SH-SY5Y cells were incubated with DMEM/HAM's F12 (CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (VE), 1:2 DMT:HRM (1:2), ethanol 250 mM (ET) and association of substances (1:2+ET). (10a) Bax protein; (10b) Bcl-2 protein; (10c) Bax/Bcl-2 ratio. Data were obtained by one way ANOVA followed by Bonferroni's test and are expressed as % of control group (mean \pm SEM). * $p < 0.05$.

5. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to assess potential neuroprotective effects of the main compounds of ayahuasca, DMT and HRM, against ethanol induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. This study indicates that among the five sources of ayahuasca tea tested, only one, at a specific concentration, was not able to induce neurotoxicity in SH-SY5Y cells, which reinforces the importance of studies focused on isolated substances. Additionally, our study also found that HRM and the combination of DMT:HRM (1:2) protected the cell from the ethanol-induced neurotoxicity in both cell viability assays, while DMT displayed protect the cells against ethanol toxicity in the Annexin/Pi cytometry flow assay. Furthermore, our findings indicate that the mechanism of cell death due to ethanol toxicity is apoptosis and late apoptosis, effects prevented by HRM, DMT and DMT:HRM (1:2), and ethanol seems to increase the levels of the proapoptotic gene Bax.

Each ayahuasca tea possesses a distinct chemical composition, varying in both quality and quantity due to several reasons, such as the way that the tea is prepared and the botanic particularities of each plant, which diversifies as soil characteristics and the exposure to sunlight may differ its compounds levels (SIMÃO et al., 2019). Thus, it is expected that the effect of any tea sources may be different from each other. Then, as an effort to standardize the methods and to make possible the comparison among the ayahuascas, all the tested concentrations were determinate based on its DMT level. In this study, apart from Aya 2, the other tea sources induced neurotoxicity at all concentrations evaluated, reinforcing the difference between teas. KATCHBORIAN-NETO et al., (2020) made CRC in SH-SY5Y cells of two different ayahuasca teas, one from Santo Daime church and other that the authors made from collected plants. The authors found a decrease in cell viability in 10.5 µg/ml of the ayahuasca (0.173 µM of DMT) made from them, while the ayahuasca from Santo Daime church did not present any neurotoxicity. Moreover, SIMÃO et al., (2020) evaluated neurotoxicity of the tea mixtures (*P. viridis/B. caapi*) in the immortalized rat mesencephalic dopaminergic neuron (N27) cell line. The authors verified that the neurotoxicity was concentration-dependent, suggesting an additive and/or synergistic neurotoxic effect among the components of each plant, being that each plant have several compounds than DMT and HRM. Other psychedelics, such as MDMA (3,4-methylenedioxy-N-methamphetamine) and DOI (2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine), have also had their neurotoxic effects assessed. CAPELA et al., (2013) performed both MTT and LDH assays and revealed that these substances promoted neuronal death in cultured hippocampal neurons in a concentration-dependent manner after 48 hours of exposure. This neurotoxic effect was also accompanied by the activation of caspases 8 and 3.

As four sources tested of ayahuasca demonstrated a neurotoxicity effect on SH-SY5Y cells in all concentrations tested. Moreover, Aya 2 did not protect ethanol induced neurotoxicity, and even increased this neurotoxicity, the followed experiments with ayahuasca sources were discontinued. Moreover, it was determinate the neurotoxicity of two main compounds of ayahuasca tea, DMT and HRM. While HRM induced neurotoxicity at 100 and 1000 µM, DMT induced neurotoxicity only at 1000 µM. As the concentration of 10 µM showed no difference in cell viability in two compounds, it was the concentration chosen for following the

experiments. KATCBORIAN-NETO et al. (2020) also evaluated the cell viability of DMT and HRM by the MTT test in SH-SY5Y cells at concentrations 1, 1.5, 2.5 and 10.5 µg/ml after 48 and 72 hours of exposure. The authors demonstrated that only the concentration of 10.5 µg/ml (49.46 µM) of HRM had a decrease in cell viability compared to control group, corroborating our results. As ayahuasca psychoactive effect is due to the synergistic effect among DMT and β-carbolines, such as HRM, the neurotoxicity of the association of these both compounds was evaluated. To choose the fraction for evaluating DMT/HRM association, a ratio of DMT:HRM was calculated based on the concentration found in each ayahuasca sources tested in this study. Therefore, 1:1, 1:2, 1:5 and 1:10 DMT:HRM association were chosen for determining the neurotoxicity. Only the 1:10 association DMT:HRM had a reduction in cell viability compared to the control group. As the viability of the 1:1 association was statistically lower than the viability of the HRM, the 1:2 DMT:HRM was chosen to continue for following experiments.

As expected, ethanol induced neurotoxicity in SH-SY5Y from 100 mM after 48 hours of exposure. Also, 250 mM was the concentration between NOAEL and LC50, thus the following experiments used 250mM of ethanol. GETACHEW et al., (2018) showed that after 24 hours of exposure to ethanol at 50, 100, 200 and 500 mM there was a decrease in cell viability in SH-SY5Y cells. In addition, our results demonstrated that ethanol induced apoptosis and late apoptosis and increased Bax levels in the DMT exposure experiment in SH-SY5Y cells after 48 hours of exposure. These results are consistent with what was observed by LOTFULLINA and KHAZIPOV, (2017) that showed that ethanol induced apoptosis in the brain development, and by SUN et al., (2017), which demonstrated that an exposure up to 200 mM ethanol for 24 hours induced apoptosis in SH-SY5Y cells. Bax is a pro-apoptotic of the intrinsic pathway, which leads to activation of caspases (PEÑA-BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2018). The neurotoxic effects induced by ethanol were prevented by HRM, DMT and 1:2 DMT:HRM. The results of the HRM and 1:2 DMT:HRM were robust and observed in both assays tested.

In vitro studies that evaluate ayahuasca and its compounds potential effects in CNS are still scarce. However, the neuroprotective effects of ayahuasca, its crude extracts, and its compounds in SH-SY5Y cells have been studied against others induced toxicity, such as 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced toxicity. While

ayahuasca, its crude extracts and HRM induced protection against 6-OHDA-induced toxicity, DMT did not present any effect (KATCHBORIAN-NETO et al., 2020). Hence, a therapeutic potential in neurodegenerative disorders is suggested for crude extracts and HRM. SANTOS and collaborators. (2022), suggested in their study that β -carboline presented B. caapi have an anti-inflammatory potential because they reduced proinflammatory production in BV-2 microglial cells. In fact, DMT and HRM present neurogenesis and neuroplasticity effects, which are important effect for protection of neuro cells (MORALES-GARCÍA et al., 2017; MORALES-GARCIA et al., 2020).

In summary, our results suggest that the main compounds of ayahuasca, DMT and HRM, and the fraction 1:2 DMT:HRM have a potential effect neuroprotective against ethanol induced neurotoxicity. In addition, the mechanism of this protection may involve intrinsic pathway. However, more studies are needed to elucidate it.

References

ABBAS, D. et al. Extrahepatic Health Effects of Alcohol Use and Alcohol-associated Liver Disease. *Clinical Therapeutics*, v. 45, n. 12, p. 1201–1211, 1 dez. 2023.

ÅBERG, F.; FÄRKKILÄ, M.; MÄNNISTÖ, V. Interaction Between Alcohol Use and Metabolic Risk Factors for Liver Disease: A Critical Review of Epidemiological Studies. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 44, n. 2, p. 384–403, 1 fev. 2020.

Alcohol-Related Emergencies and Deaths in the United States | National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). Disponível em: <<https://www.niaaa.nih.gov/alcohols-effects-health/alcohol-topics/alcohol-facts-and-statistics/alcohol-related-emergencies-and-deaths-united-states>>. Acesso em: 22 jun. 2024.

ALMEIDA, C. A. F. et al. Ayahuasca, a psychedelic beverage, modulates neuroplasticity induced by ethanol in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 416, p. 113546, 7 jan. 2022.

BARBOSA, P. C. R. et al. Psychological and neuropsychological assessment of regular hoasca users. *Comprehensive Psychiatry*, v. 71, p. 95–105, 1 nov. 2016.

BARBOSA, P. C. R. et al. Assessment of alcohol and tobacco use disorders among religious users of ayahuasca. *Frontiers in Psychiatry*, v. 9, n. APR, p. 344826, 24 abr. 2018.

BERLOWITZ, I. et al. Short-Term Treatment Effects of a Substance Use Disorder Therapy Involving Traditional Amazonian Medicine. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 51, n. 4, p. 323–334, 8 ago. 2019.

CAPELA, J. P. et al. The neurotoxicity of hallucinogenic amphetamines in primary

cultures of hippocampal neurons. *NeuroToxicology*, v. 34, n. 1, p. 254–263, 1 jan. 2013.

DE OLIVEIRA, R. S. C. et al. Hospitalizations for mental and behavioral disorders due to alcohol use in Brazil and regions: a temporal trend analysis, 2010-2020. *Epidemiologia e Serviços de Saúde : Revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil*, v. 32, n. 1, p. 2023, 2023.

DE OLIVEIRA SILVEIRA, G. et al. Stability Evaluation of DMT and Harmala Alkaloids in Ayahuasca Tea Samples. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 2072, v. 25, n. 9, p. 2072, 29 abr. 2020.

DOMÍNGUEZ-CLAVÉ, E. et al. Ayahuasca improves emotion dysregulation in a community sample and in individuals with borderline-like traits. *Psychopharmacology*, v. 236, n. 2, p. 573–580, 14 fev. 2019.

DOS SANTOS, L. A. et al. Neurotoxicity Assessment of 1-[(2,3-Dihydro-1-Benzofuran-2-yl)Methyl]Piperazine (LINS01 Series) Derivatives and their Protective Effect on Cocaine-Induced Neurotoxicity Model in SH-SY5Y Cell Culture. *Neurotoxicity Research*, v. 40, n. 6, p. 1653–1663, 1 dez. 2022.

DOS SANTOS, R. G. et al. Ayahuasca Improves Self-perception of Speech Performance in Subjects With Social Anxiety Disorder: A Pilot, Proof-of-Concept, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 41, n. 5, p. 540–550, 1 set. 2021.

GETACHEW, B. et al. Protective Effects of Donepezil Against Alcohol-Induced Toxicity in Cell Culture: Role of Caspase-3. *Neurotoxicity Research*, v. 34, n. 3, p. 757–762, 1 out. 2018.

GIANFRATTI, B. et al. Ayahuasca blocks ethanol preference in an animal model of dependence and shows no acute toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 285, p. 114865, 1 mar. 2022.

GOLTSEKER, K. et al. Alcohol-specific transcriptional dynamics of memory reconsolidation and relapse. *Translational Psychiatry* 2023 13:1, v. 13, n. 1, p. 1–12, 15 fev. 2023.

HENDRIKS, H. F. J. Alcohol and Human Health: What Is the Evidence? *Annual Review of Food Science and Technology*, 2020.

KATCHBORIAN-NETO, A. et al. Neuroprotective potential of Ayahuasca and untargeted metabolomics analyses: applicability to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 255, p. 112743, 12 jun. 2020.

LOTFULLINA, N.; KHAZIPOV, R. Ethanol and the Developing Brain: Inhibition of Neuronal Activity and Neuroapoptosis. <https://doi.org/10.1177/1073858417712667>, v. 24, n. 2, p. 130–141, 5 jun. 2017.

MAIA, L. O. et al. Ayahuasca's therapeutic potential: What we know – and what not. *European Neuropsychopharmacology*, v. 66, p. 45–61, 1 jan. 2023.

MARTINS, B. L. et al. Os benefícios do uso da ayahuasca como ferramenta alternativa ao tratamento convencional da depressão: uma revisão de literatura. *Revista Científica do UBM*, p. 95–111, 3 jan. 2023.

MCPHEETERS, M. et al. Pharmacotherapy for Alcohol Use Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA*, v. 330, n. 17, p. 1653–1665, 7 nov. 2023.

- MORALES-GARCÍA, J. A. et al. The alkaloids of *Banisteriopsis caapi*, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis in vitro. *Scientific Reports* 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–13, 13 jul. 2017.
- MORALES-GARCIA, J. A. et al. N,N-dimethyltryptamine compound found in the hallucinogenic tea ayahuasca, regulates adult neurogenesis in vitro and in vivo. *Translational Psychiatry* 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–14, 28 set. 2020.
- PALHANO-FONTES, F. et al. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. *Psychological Medicine*, v. 49, n. 4, p. 655–663, 1 mar. 2019.
- PATEL, A. K.; BALASANOVA, A. A. Treatment of Alcohol Use Disorder. *JAMA*, v. 325, n. 6, p. 596–596, 9 fev. 2021.
- PEÑA-BLANCO, A.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal*, v. 285, n. 3, p. 416–431, 1 fev. 2018.
- RAMKISSOON, R.; SHAH, V. H. Alcohol Use Disorder and Alcohol-Associated Liver Disease. *Alcohol Research: Current Reviews*, v. 42, n. 1, 2022.
- ROERECKE, M. Alcohol's Impact on the Cardiovascular System. *Nutrients*, v. 13, n. 10, 1 out. 2021.
- SAEGER, H. N.; OLSON, D. E. Psychedelic-inspired approaches for treating neurodegenerative disorders. *Journal of neurochemistry*, v. 162, n. 1, p. 109–127, 1 jul. 2022.
- SANTOS, B. W. L. et al. Components of *Banisteriopsis caapi*, a Plant Used in the Preparation of the Psychoactive Ayahuasca, Induce Anti-Inflammatory Effects in Microglial Cells. *Molecules*, v. 27, n. 8, p. 2500, 1 abr. 2022.
- SIMÃO, A. Y. et al. Toxicological Aspects and Determination of the Main Components of Ayahuasca: A Critical Review. *Medicines* 2019, Vol. 6, Page 106, v. 6, n. 4, p. 106, 18 out. 2019.
- SIMÃO, A. Y. et al. Evaluation of the Cytotoxicity of Ayahuasca Beverages. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 5594, v. 25, n. 23, p. 5594, 28 nov. 2020.
- SLIEDRECHT, W. et al. Alcohol use disorder relapse factors: A systematic review. *Psychiatry Research*, v. 278, p. 97–115, 1 ago. 2019.
- SUN, W. et al. Study of acetylcholinesterase activity and apoptosis in SH-SY5Y cells and mice exposed to ethanol. *Toxicology*, v. 384, p. 33–39, 1 jun. 2017.
- UDO, M. S. B. et al. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, contributes to cocaine-induced rat primary hippocampal neuronal death in a synergistic and time-dependent manner. *Archives of Toxicology*, v. 95, n. 5, p. 1779–1791, 1 maio 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health 2018 Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018. *Who.Int*, p. 478, 2018.

5 ARTIGO 4 - NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CANNABIDIOL AND ITS ANALOGUES, PQM-242 AND PQM-249, AGAINST ETHANOL-INDUCED NEUROTOXICITY IN SH-SY5Y CELLS

Carolina Aparecida Faria Almeida¹, Vitor Bruno², Jessyca Milene Ribeiro¹, Alessandra Oliveira Silva¹; Giulia de Assis Braz³, Felype Valentim Duarte Castelhana³, Gabriela Salles dos Santos³, Graziella dos Reis Rosa Franco⁴, Cláudio Viegas Júnior⁴, Tania Marcourakis², Larissa Helena Torres^{1*}, Raphael Caio Tamborelli Garcia^{3*}

¹Department of Food and Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

²Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences; University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 13B, 05508-000, São Paulo/SP, Brazil.

³Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo, Rua São Nicolau, 210, 1º andar, 09913-030, Diadema/SP, Brazil.

⁴Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas/MG, Brazil.

Declarations of interest: none

Address for correspondence

*Corresponding author:

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Setor de Bioquímica, Farmacologia e Toxicologia

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas

Universidade Federal de São Paulo – Unifesp

Rua São Nicolau, 2010 – 1º andar

Centro – Diadema -SP

CEP: 09913-030

Tel: +55-11-33854137

e-mail: raphael.garcia@unifesp.br

Larissa Helena Torres

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Centro - Alfenas/MG

CEP: 37130-001

Tel: +55-35-3701-9513

Email: larissa.torres@unifal-mg.edu.br

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) has anxiolytic, antidepressant, antipsychotic and neuroprotective effects, without presenting a psychotic side effect. Therefore, synthetic analogs of CBD become an interesting therapeutic target, including the treatment for alcohol use disorder (AUD). Thus, *in vitro* studies are crucial to verify the toxicity as well as the protective effects of these compounds. Therefore, the aim of this study was to evaluate the neurotoxicity and neuroprotective potential of CBD and its analogs, PQM-242 and PQM-249, against ethanol-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. A concentration-response curve (CRC) was obtained for CBD, PQM-242 and PQM-249 (0.1, 1, 10, 100 and 1000 μM of each) to determine the no-observed adverse effect level (NOAEL). Exposures were performed for 48h in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Subsequently, the NOAEL of each cannabinoid was incubated for 48 hours in the presence of the lethal concentration 50 (LC_{50}) of ethanol (250 mM). Cell viability tests were performed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and annexin V/propidium iodide dye (flow cytometry). Bax and Bcl-2 proteins were analyzed by western blot technique. When comparing the estimated LC_{50} for each substance, CBD was more toxic for this cell culture model, with a LC_{50} equal to 44 μM , while its synthetic analogues presented a LC_{50} higher than 600 μM . Although the NOAEL for PQM-242 and PQM-249 were 100 μM , NOAEL for CBD was 10 μM . Thus, the concentration chosen for all substances to incubate with ethanol LC_{50} was 10 μM . All substances were able to prevent ethanol neurotoxicity through the decrease in both early and late apoptosis. In addition, PQM-242 was able to prevent the increase of proapoptotic Bax level. In summary, these data suggest that CBD, PQM-242 and PQM-249 have demonstrated neuroprotective potential. Therefore, these substances may have an interest potential effect against AUD treatment.

Key words: ethanol, cannabidiol, CBD analogs, toxicity, SH-SY5Y.

1. Introduction

Currently, endocannabinoid system and natural cannabinoids and synthetic cannabinoids, which may have some effect, are being the target of scientific interest. As endocannabinoid system has a neuromodulatory effect, it assists plasticity pathways in the brain. Thus, cannabidiol (CBD), a natural compound present in *Cannabis sativa* that act in endocannabinoid system, has been studied on treatment of several diseases, such as epilepsy, chronic pain, generalized anxiety disorder, substance use disorder (SUD) and others (BRITCH; BABALONIS; WALSH, 2020; GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2020). Additionally, CBD is capable of inhibiting norepinephrine, dopamine, serotonin, GABA and adenosine uptake. Furthermore, it is also an agonist of 5HT1A and 5HT2A receptors, with this interaction being decisive for neuroprotection and intensity of impulse control, which are closely related to substance use disorder (CAMPOS et al., 2016). Manipulation of the endocannabinoid CB2 receptor has become more investigated and has demonstrated better effects against drug-induced neurotoxicity, such as cocaine, since agonists of these receptors seem to promote an attenuation of hyperlocomotion, self-administration and especially the release of dopamine which is induced by drugs on reward system (GOBIRA et al., 2019; ZHANG et al., 2017).

Despite all these evidences, studying CBD is still complex in several places due to the cannabis prejudice. Therefore, the development of molecular synthesis techniques and the creation of analogous molecules may be an interesting way to solve this issue. Analogous molecules are molecules with the same chemical base, but with specific improvements (PEREIRA SANGI, 2016). Today organic synthesis plays a fundamental role in the discovery and development of new drugs. Using strategies such as target-guided synthesis, the design of specific compounds that act with known molecular targets may increase their efficacy and selectivity. These new synthetic tools are extremely useful, allowing the discovery of new compounds and their physiological responses (PEREIRA SANGI, 2016). As a result, substances analogous to cannabidiol become an interesting target to research for the treatment of SUD, since these analogous substances aim to enhance the therapeutic effects already known in the starting molecule. Nevertheless, *in vitro* studies which evaluate neuroprotective effect of CBD against drug neurotoxicity are scarce, especially

ethanol, a licit drug which its abuse use may lead to alcohol use disorder (AUD), a cyclic and chronic disease which is considered a neurotoxicity mechanism (RAMKISSOON; SHAH, 2022). Hence, the aim of this study is to evaluate the neurotoxicity of CBD and its analogues, PQM-242 and PQM-249, and their possible neuroprotective potential against ethanol neurotoxicity.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and drugs

The analogues of CBD, PQM-242 and PQM-249, were synthesized from R- and S-carvones. The information about synthesis routes is described in Franco et al. (2024). CBD was gently provided by University of São Paulo (USP-SP). As CBD and the analogues of CBD are not soluble in supplemented DMEM/HAM's F12, concentrated solutions were performed using dimethylsulfoxide (DMSO). Therefore, a vehicle group (VE) was made from 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12. Ethanol (99%) was obtained from Sigma-Aldrich® and was used in the concentration 250 mM, which based on previous studies from our group (Almeida, 2024). The concentration of other substances was obtained from a 1 M concentrated solution.

2.2. SH-SY5Y cell culture and exposure conditions

SH-SY5Y human neuroblastoma cells were obtained from ATCC (CRL-2266™) and gently provided by the Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences of São Paulo University (UNIFESP). Cell thawing protocol, cell growing protocol, and cell passages protocol, as well as exposure period (48h) were performed according to DOS SANTOS et al. (2022).

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983; Liu et al. 1997) cells were plated in 24-well plates at a density of 1×10^5 cells per well to provide the concentration-response curve (CRC) of each substance regarding their neuroprotection or neurotoxicity properties according to protocol described in DOS SANTOS et al. (2022). Therefore, to evaluate the neurotoxicity of CBD and the analogues PQM-242 and PQM-249, the concentration range for CRC was 0.1 to 1000 μ M. The lethal concentration 50 (LC50) and the no-observed adverse effect level (NOAEL) were obtained for each substance.

To evaluate the neuroprotective effect, the NOAEL of CBD and its analogues, PQM-242 and PQM-249, was incubated in the presence of the LC50 of ethanol for 48 hours. MTT, flow cytometry using annexin/propidium iodide (PI), and western blot assays were performed. For the annexin/PI flow cytometry assay, cells were placed in 12-well plates at a density of 1×10^6 cells per well to provide viable cells, as well as cells in early and late apoptosis, and in necrosis (UDO et al., 2021). When cell plates were used, their wall were filled with parafilm to avoid ethanol evaporation during the exposure. For the western blot analysis, cells were plated in cell culture flasks (25 cm² – T25) at a density of 2×10^6 cells per T25.

2.3. MTT cell viability assay

MTT cell viability assay was performed according to DOS SANTOS et al. (2022). Briefly, after each exposure, all the medium content was removed, and cells were washed twice with phosphate buffer solution (PBS). Cells were then incubated with 0.5 mg/mL MTT solution for 3h at 5% CO₂ / 37°C. Subsequently, after the removal of MTT solution, dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to solubilize the formazan and to measure the absorbance at 595 nm (Synergy HT/BioTek, USA). Results were expressed as a percentage of the control value, and DMSO was used as a blank solution.

2.4. Flow cytometry: annexin V/PI

Flow cytometry using annexin V and PI was performed as described by UDO et al. (2021). Briefly, after each exposure, all the medium content was removed and placed in tube. Then, cells were detached with trypsin (TrypLE™ Express Enzyme 1X, Gibco), inactivated with fetal bovine serum (FBS, 10% in culture medium), and added in the same tube with medium content described previously. After cell removal, the content was centrifugated, the supernatant discarded, and cells were washed twice with cold phosphate buffer solution. The pellet was resuspended in 100 µL of annexin V buffer (HEPES/NaOH 0.1M pH = 7.4; NaCl 1,4M; CaCl₂ 25 mM), 5 µL of each FITC-annexin and PI was added, and the solution was homogenized and incubated for 15 minutes in a dark place. Finally, 400 µL of annexin V buffer was added and the content was analyzed by flow cytometry (FacsCalibur BD equipment

and FlowJo v7 software; 10,000 events per sample were collected in all analyses). Results were expressed as a percentage of viable cells, percentage of cells in both early and late apoptosis, and percentage of cells in necrosis.

2.5. Western blot analysis

The Western blot technique was performed according to Almeida et al. 2022. Briefly, cells were collected after the exposure time and then the pellet was sonicated with 50 μ L of RIPA buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate including protease and phosphatase inhibitor cocktails (Thermo Scientific, 78442). The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-Bax 1:1000 (Abcam, ab77566); rabbit monoclonal anti-Bcl-2 1:1000 (Abcam, ab182858). The secondary antibodies used were anti-mouse (Sigma-Aldrich, NA931V) and anti-rabbit (Sigma-Aldrich, NA934V) conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (GE Healthcare UK Limited). The endogenous control was the monoclonal anti- β -actin 1:25000 (Sigma-Aldrich).

2.5 Statistical analysis

All the experiments were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. The nonlinear regression equation used for CRCs was the log(inhibitor) vs. response equation, with a variable slope (four parameters). GraphPad Prism software version 9.0 was used for analysis and plotting data. Data was reported as mean \pm SEM, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

4. Results

Figure 1 displays the CRCs for the compounds PQM-242 (**Fig. 1a**), PQM-249 (**Fig. 1c**), and CBD (**Fig. 1e**), along with their cell viability curves (**Fig. 1b, 1d, and 1f**, respectively).

After 48 hours of exposure of SH-SY5Y cells to PQM-242, one-way ANOVA indicated a significant treatment effect ($F_{(6, 77)} = 103.8$; $p < 0.0001$; **Fig. 1a**). Bonferroni's test revealed no statistical difference in cell viability between the CT and VE groups, but a reduction in cell viability in the PQM-242-treated group starting at a

concentration of 100 μM when compared to the CT group ($p < 0.05$). Furthermore, the 1000 μM PQM-242-treated group also showed reduced cell viability compared to both the CT and VE groups ($p < 0.0001$). Additionally, the 1000 μM PQM-242-treated group exhibited lower cell viability compared to the other three tested doses ($p < 0.0001$ for all). As for the positive control, KCl showed the lowest cell viability rate compared to the other groups ($p < 0.0001$). Consequently, the PQM-242's NOAEL is 10 μM and the LC_{50} is approximately 167.6 μM ($R^2 = 0.673$; **Fig. 1b**).

Regarding the exposure to PQM-249, a one-way ANOVA indicated a significant treatment effect ($F_{(6, 77)} = 270.0$; $p < 0.0001$; **Fig. 1c**). Bonferroni's test showed no statistical difference in cell viability among the following groups: CT, VE and 1 from 100 μM PQM-249. In addition, all these groups exhibited higher cell viability compared to the 1000 μM PQM-249-treated group ($p < 0.0001$). The KCl-treated group had the lowest cell viability rate compared to all groups ($p < 0.0001$), except the 1000 μM PQM-249-treated group. Therefore, the NOAEL assessed for PQM-249 is 100 μM and the LC_{50} is approximately 666 μM ($R^2 = 0.906$; **Fig. 1d**).

One-way ANOVA for SH-SY5Y cells treated with CBD indicated a significant treatment effect ($F_{(6, 77)} = 92.50$; $p < 0.0001$; **Fig. 1e**). Bonferroni's test showed no statistically significant difference in cell viability levels between the CT and VE groups. The 100 and 1000 μM CBD-treated groups showed reduced cell viability compared to both CT and VE groups ($p < 0.0001$ for all comparisons). Moreover, the two highest CBD concentrations (100 and 1000 μM) exhibited lower cell viability levels compared to the lowest CBD concentrations (1 and 10 μM ; $p < 0.0001$ for all comparisons). Additionally, treatment with KCl reduced cell viability compared to the CT, VE, and 1 and 10 μM CBD-treated groups ($p < 0.0001$ for all). The NOAEL for CBD is 10 μM and the LC_{50} is approximately 47 μM ($R^2 = 0.864$; **Fig. 1f**).

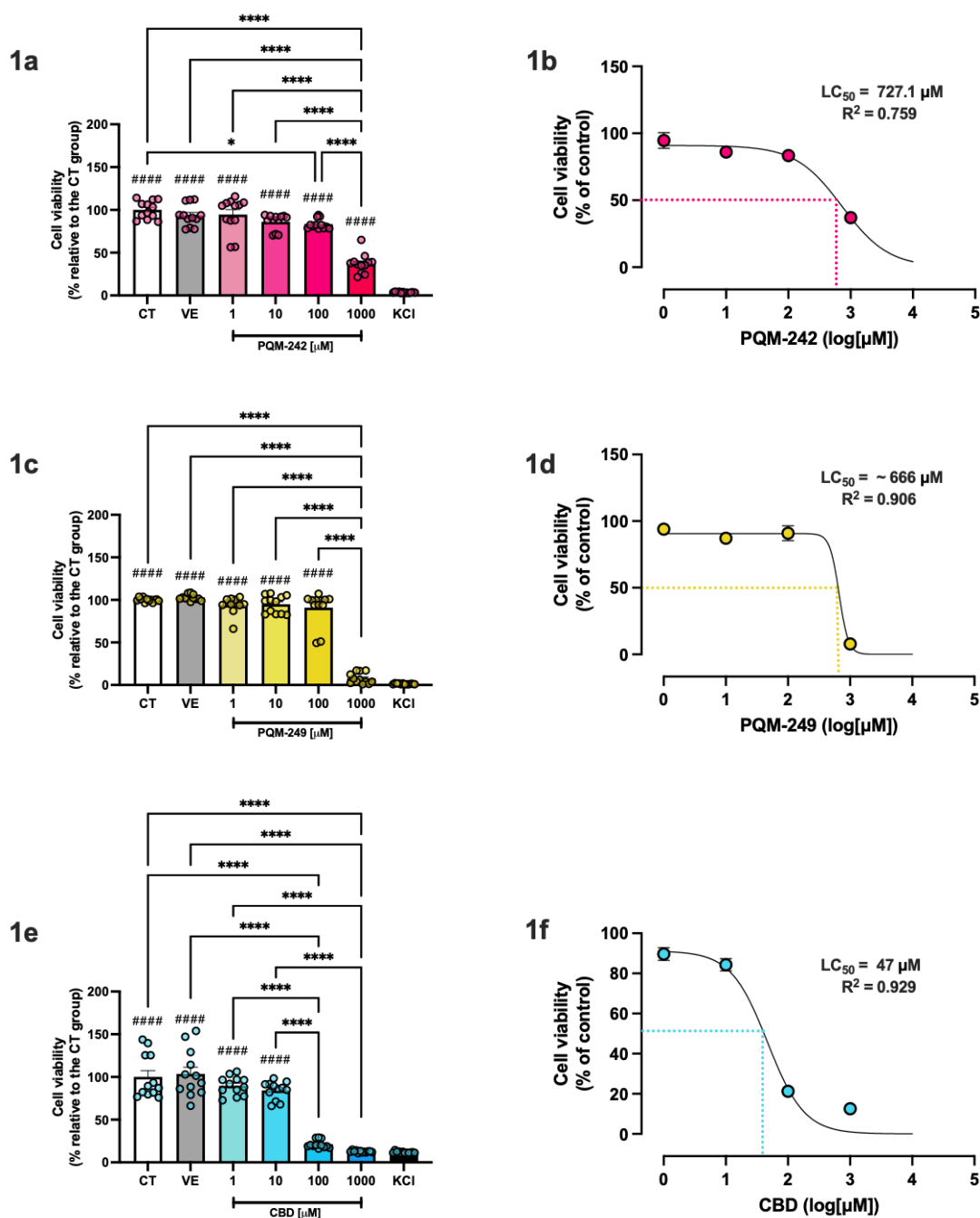


Figure 1. Concentration-response curves of SH-SY5Y cells exposed to five different concentrations (1, 10, 100, and 1000 μM) of PQM-242 (Fig. 1a), PQM-249 (c), and CBD (e), and their cell viability curves (Fig. 1b, 1d, and 1f, respectively). For comparison, cells were also exposed to DMEM/HAM's F12 (control, CT) and 0.1% DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE). KCl was used as a positive control. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test and were expressed as a percentage relative to the CT group (mean \pm SEM). * $p < 0.05$. **** $p < 0.0001$. # indicates significant comparisons to the KCl group: ##### $p < 0.0001$.

The neuroprotective effects of PQM-242 (Fig. 2a), PQM-249 (Fig. 2b), and CBD (Fig. 2c) in the context of ethanol-induced neurotoxicity are illustrated in Figure 2. The pre-treatment with PQM-242, PQM-249 and CBD revealed a significant treatment effect, as indicated by one-way ANOVA ($F_{(5, 102)} = 220.2$; $p < 0.0001$; Fig.

2a; $F_{(5, 102)} = 440.0$; $p < 0.0001$; **Fig. 2b**; $F_{(5, 102)} = 218.4$; $p < 0.0001$; **Fig. 2c**). Bonferroni's test revealed the same pattern of results for all three situations, as follows: the ET-treated group exhibited the lowest cell viability rate compared to the other groups ($p < 0.0001$ for all comparisons). In addition, no statistical differences were observed among the other groups (CT, VE, PQM or CBD-treated groups, and their combination with ethanol). Regarding the positive control, treating cells with KCl resulted in a reduction in cell viability compared to all groups ($p < 0.0001$).

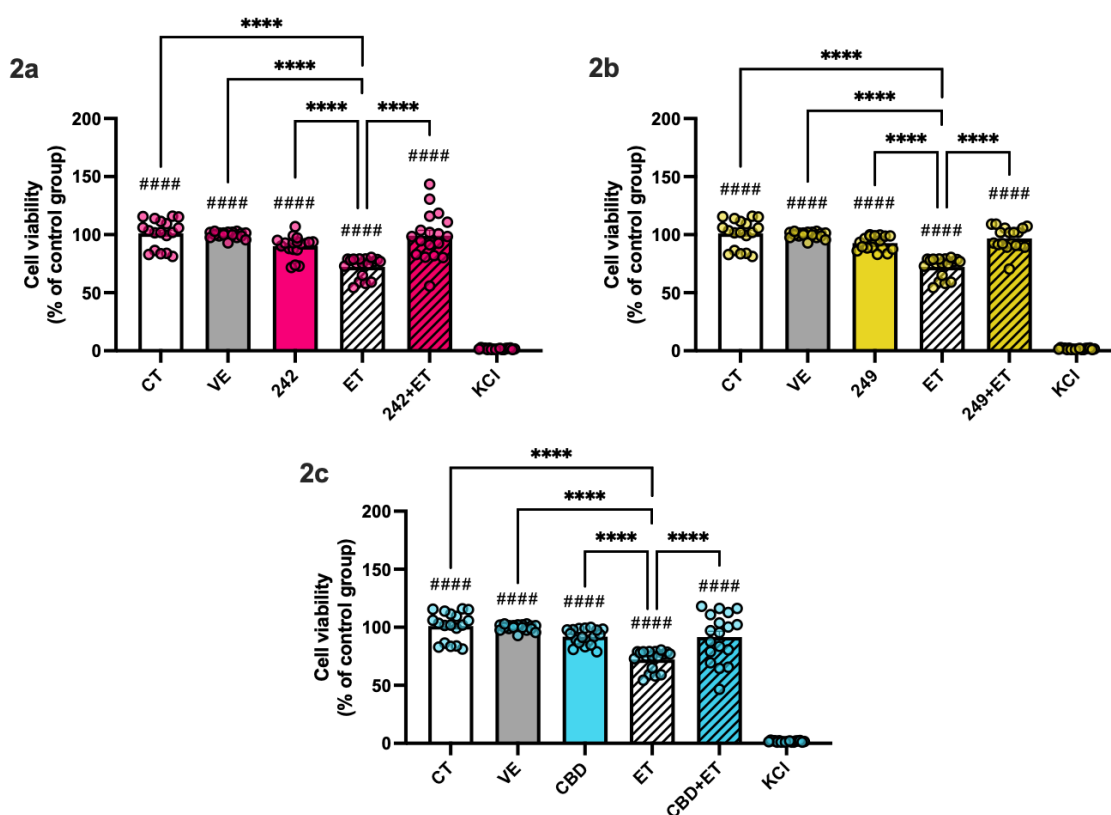


Figure 2. Cell viability of SH-SY5Y cells pretreated with PQM-242 (a), PQM-249 (b), and CBD (c) and exposed to ethanol for 48 hours ($n = 18$). To assess the neuroprotective potential of the substances, cells were exposed to DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), 10 μ M PQM-242, 10 μ M PQM-249, or 10 μ M CBD, 250 mM ethanol (ET), and their combinations with ET. KCl was used as a positive control. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test and were expressed as a percentage relative to the CT group (mean \pm SEM). **** $p < 0.0001$. # indicates significant comparisons to the KCl group: #### $p < 0.0001$.

Figure 3, **Figure 4** and **Figure 5** show the analysis of stage of cell death performed by annexin V/PI flow cytometry assays after 48 hours of exposure to PQM-242, PQM-249, and CBD respectively. In the results presented, we illustrate the flow cytometry panels (**Fig. 3a**, **3a**, and **3a**), which depict the density of viable cells

(bottom left quadrant, Q4), cells undergoing apoptosis (upper left quadrant, Q1), late apoptosis (upper right quadrant, Q2), or necrosis (bottom right quadrant, Q3), along with the corresponding percentage of cells for these contexts (Fig. 3, 4, 5b-e).

For the assay of viable cells after pre-treatment with 10 μ M PQM-242, one-way ANOVA showed a significant treatment effect ($F_{(4, 10)} = 49.48$; $p < 0.0001$; Fig. 3b). Bonferroni's test revealed that the ET-treated group exhibited the lowest cell viability rate compared to all the other groups ($p < 0.0001$). Regarding the apoptosis stage, one-way ANOVA indicated a significant treatment effect ($F_{(4, 10)} = 18.26$; $p < 0.0001$; Fig. 3c). Bonferroni's test indicated that treatment with ethanol increased the percentage of cells in apoptosis compared to the CT ($p < 0.01$), VE ($p < 0.001$), PQM-242 ($p < 0.001$), and PQM-242+ET ($p < 0.001$) groups. Additionally, for the analysis of the percentage of cells in the late apoptosis stage, one-way ANOVA showed a significant treatment effect ($F_{(4, 10)} = 56.44$; $p < 0.0001$; Fig. 3d). Bonferroni's test indicated that the cells treated with ethanol exhibited the highest percentage of cells in late apoptosis compared to all the other groups ($p < 0.0001$). In relation to the necrosis assay, one-way ANOVA revealed no treatment effect ($F_{(4, 10)} = 3.084$; $p = 0.0677$; Fig. 3e).

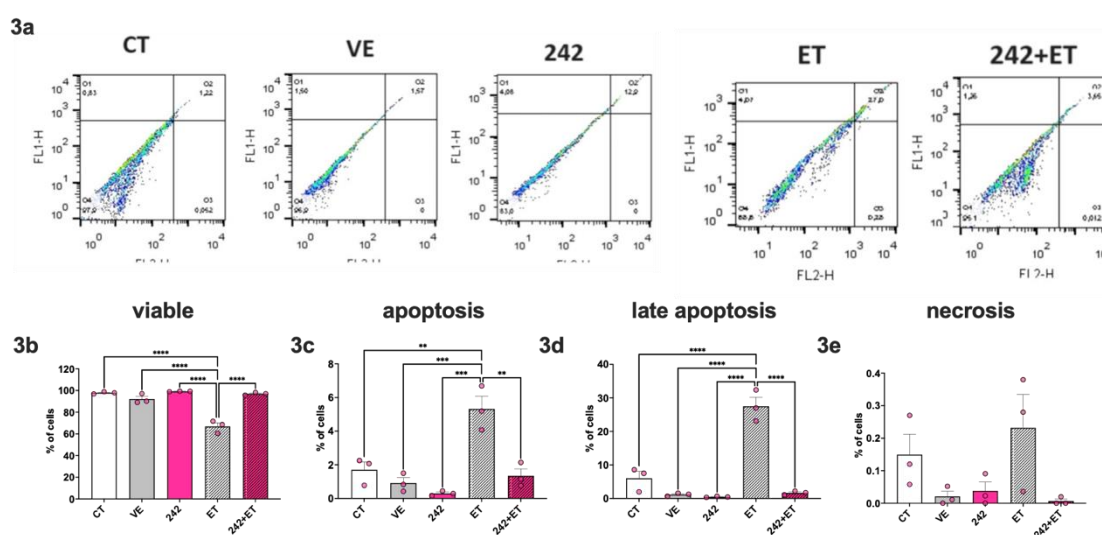


Figure 3. Analysis of cell death by Annexin V/Pi flow cytometry assay of SH-SY5Y cells after 48 hours of 10 μ M PQM-242 exposure ($n = 3$). Cells were treated with DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), PQM-242 10 μ M (242), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (242+ET). (3a) Flow cytometry panel displaying the density of viable cells (Q4), cells undergoing apoptosis (Q1), late apoptosis (Q2) or necrosis (Q3). Percentage of viable cells (3b), cells undergoing apoptosis (3c), late apoptosis (3d) and necrosis (3e) after exposure. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data are expressed as % of cells

(mean \pm SEM). ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

Considering the effects of pre-treatment with 10 μ M PQM-249 on ethanol-induced neurotoxicity, one-way ANOVA showed a significant treatment effect on viable cells ($F_{(4, 10)} = 21.34$; $p < 0.0001$; **Fig. 4b**). Bonferroni's test revealed that ethanol-treated cells exhibited the lowest cell viability rate compared to all other groups ($p < 0.0001$ for the CT group, $p < 0.001$ for the VE group, $p < 0.01$ for the 249-treated group, and $p < 0.001$ for the 249-ET group). Regarding the percentage of cells in the apoptosis stage, one-way ANOVA showed a significant treatment effect ($F_{(4, 10)} = 10.13$; $p = 0.0015$; **Fig. 4c**). Bonferroni's test indicated that ethanol-treated cells had a higher percentage of cells in the apoptosis stage compared to the other groups ($p < 0.01$). For the late apoptosis assay, one-way ANOVA also showed a significant treatment effect ($F_{(4, 10)} = 23.20$; $p < 0.0001$; **Fig. 4d**). Bonferroni's test demonstrated that cells treated with ethanol exhibited the highest percentage of cells in the late apoptosis stage compared to the other groups ($p < 0.001$ for the CT group, $p < 0.0001$ for the VE group, $p < 0.01$ for the 249-treated group, and $p < 0.001$ for the combined treatment of 249+ET). Moreover, one-way ANOVA indicated a significant treatment effect regarding the necrosis assay ($F_{(4, 10)} = 8.339$; $p = 0.0032$; **Fig. 4e**). Bonferroni's test revealed that cells treated with 249+ET exhibited a higher percentage of cells in the necrosis stage compared to the CT group ($p < 0.05$), VE group ($p < 0.01$), and ET group ($p < 0.05$).

4a

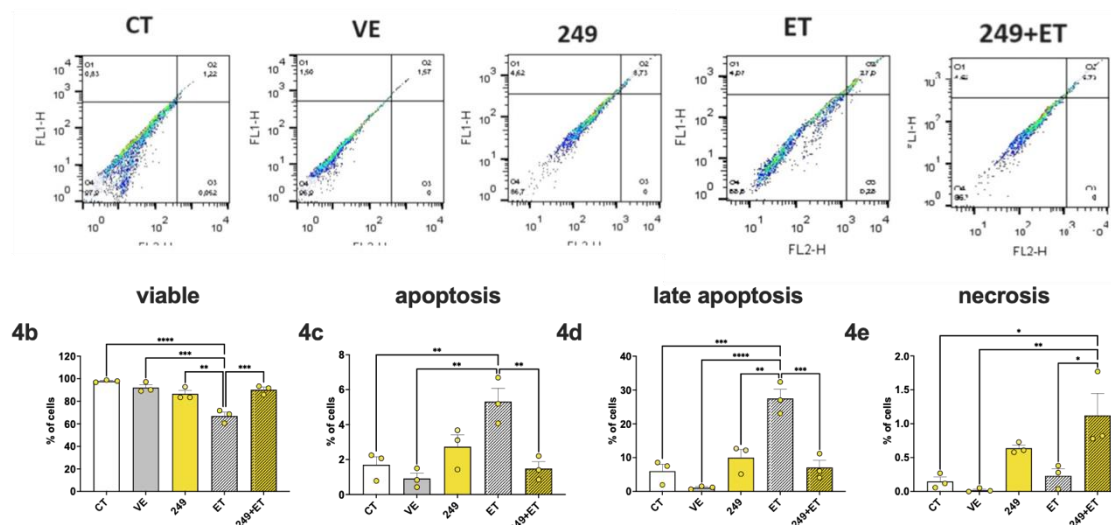


Figure 4. Analysis of cell death by Annexin V/Pi flow cytometry assay of SH-SY5Y cells after 48 hours of 10 μ M PQM-249 exposure ($n = 3$). Cells were treated with DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), PQM-249 10 μ M (249), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (249+ET). (4a) Flow cytometry panel displaying the density of viable cells (Q4), cells undergoing apoptosis (Q1), late apoptosis (Q2) or necrosis (Q3). Percentage of viable cells (4b), cells undergoing apoptosis (4c), late apoptosis (4d) and necrosis (4e) after exposure. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data are expressed as % of cells (mean \pm SEM). ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

When cells were pretreated with CBD before exposure to ethanol, one-way ANOVA indicated significant treatment effects on the percentage of viable cells ($F_{(4, 10)} = 31.37$; $p < 0.0001$; **Fig. 5b**). Bonferroni's test revealed that cells exposed to ethanol exhibited decreased viability compared to all other groups ($p < 0.0001$ for CT, CBD, and CBD+ET groups, and $p < 0.001$ for VE group). Regarding apoptosis, one-way ANOVA showed significant treatment effects ($F_{(4, 10)} = 15.88$; $p = 0.0002$; **Fig. 5c**). Bonferroni's test indicated that the ET group had the highest percentage of cells in apoptosis compared to all other groups ($p < 0.01$ for CT and CBD+ET groups, and $p < 0.001$ for VE and CBD groups). Furthermore, in the late apoptosis assay, one-way ANOVA showed significant treatment effects ($F_{(4, 10)} = 33.73$; $p < 0.0001$; **Fig. 5d**). Bonferroni's test revealed that ethanol treatment increased the percentage of cells in late apoptosis ($p < 0.001$ for CT group and $p < 0.0001$ for VE, CBD, and CBD+ET groups). For necrosis analysis, one-way ANOVA showed no significant treatment effect ($F_{(4, 10)} = 1.515$; $p = 0.2701$; **Fig. 5e**).

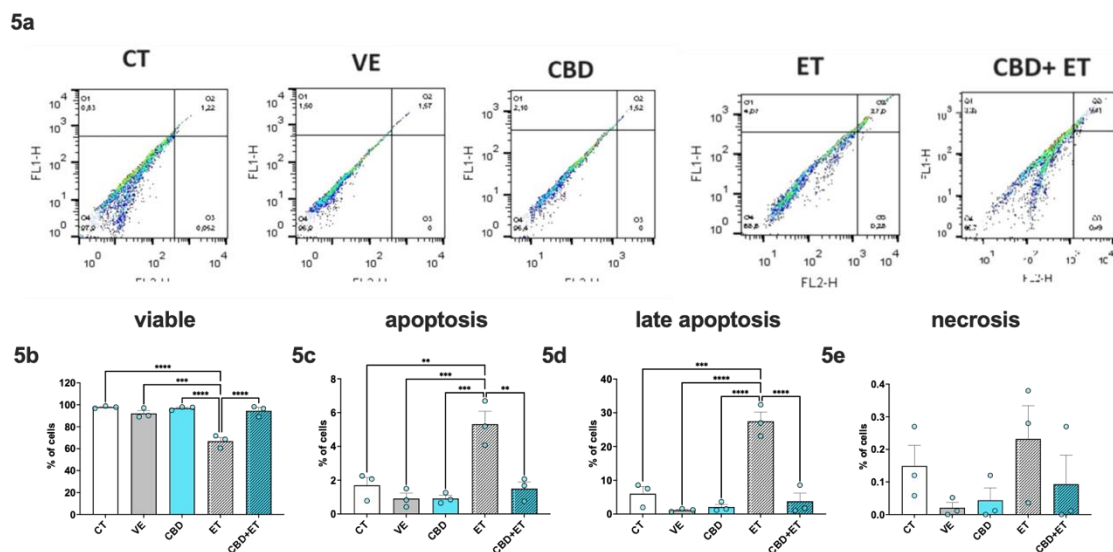


Figure 5. Analysis of cell death by Annexin V/Pi flow cytometry assay of SH-SY5Y cells after 48 hours of 10 μ M CBD exposure ($n = 3$). Cells were treated with DMEM/HAM's F12 (control, CT), 0.1% of DMSO in DMEM/HAM's F12 (vehicle, VE), CBD 10 μ M (CBD), ethanol 250 mM (ET) and association of both substances (CBD+ET). (5a) Flow cytometry panel displaying the density of viable cells (Q4), cells undergoing apoptosis (Q1), late apoptosis (Q2) or necrosis (Q3). Percentage of viable cells (5b), cells undergoing apoptosis (5c), late apoptosis (5d) and necrosis (5e) after exposure. Data were obtained by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data are expressed as % of cells (mean \pm SEM). ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

Figures 6, 7, and 8 display representative membranes for western blot (a), along with the analysis of Bax (b), Bcl-2 (c), and the Bax/Bcl-2 ratio (d) for PQM-242, PQM-249, and CBD, respectively. Considering the effects of the pre-treatment with PQM-242, one-way ANOVA showed significant treatment effect for Bax assay ($F_{(4, 20)} = 5.104$; $p = 0.0053$; **Fig. 6b**). Bonferroni's test revealed that ethanol exposure increased Bax protein level compared to CT ($p < 0.01$), VE and 242+ET groups ($p < 0.05$). For Bcl-2 and the Bax/Bcl-2 ratio, one-way ANOVA showed no treatment effects ($F_{(4, 20)} = 0.6329$; $p = 0.6448$; **Fig. 6c** and $F_{(4, 20)} = 0.4206$; $p = 0.7919$; **Fig. 6d**, respectively).

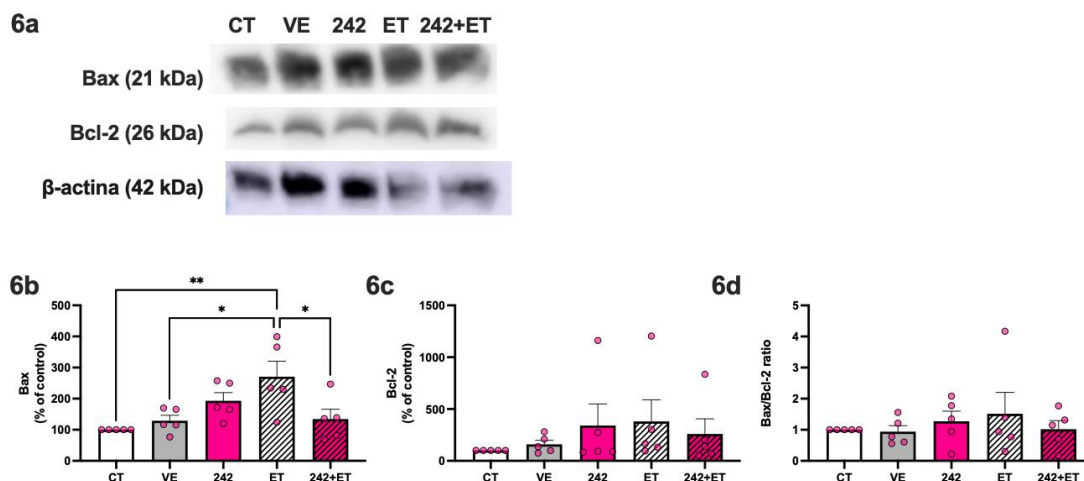


Figure 6. Analysis of Bax and Bcl-2 proteins by Western blot. SH-SY5Y cells were incubated with DMEM/HAM's F12 (CT), 0.1% DMSO in DMEM/HAM's F12 (VE), PQM-242 10 μ M (242), ethanol 250 mM (ET), and the combination of both substances (242+ET). **(6a)** Representative Western blot membranes for Bax (21 kDa), Bcl-2 (26 kDa), and β -actina (42 kDa) protein levels (n = 5). Semi-quantitative analysis of protein levels for Bax **(6b)**, Bcl-2 **(6c)**, and the Bax/Bcl-2 ratio **(6d)**. Data were obtained by one way ANOVA followed by Bonferroni's test and are expressed as % of control group (mean \pm SEM). * p < 0.05. ** p < 0.01.

For the protective effects of PQM-249 in the context of ethanol-induced neurotoxicity, one-way ANOVA showed significant treatment effects for Bax level protein ($F_{(4, 20)} = 4.258$; p = 0.0118; **Fig. 7b**). Bonferroni's test revealed that treatment with ethanol increased Bax protein levels compared to the CT and VE groups (p < 0.05). The one-way ANOVA exhibited no treatment effects for Bcl-2 and the Bax/Bcl-2 ratio ($F_{(4, 20)} = 0.7882$; p = 0.5464; **Fig. 7c** and $F_{(4, 20)} = 0.7662$; p = 0.5597; **Fig. 7d**, respectively).

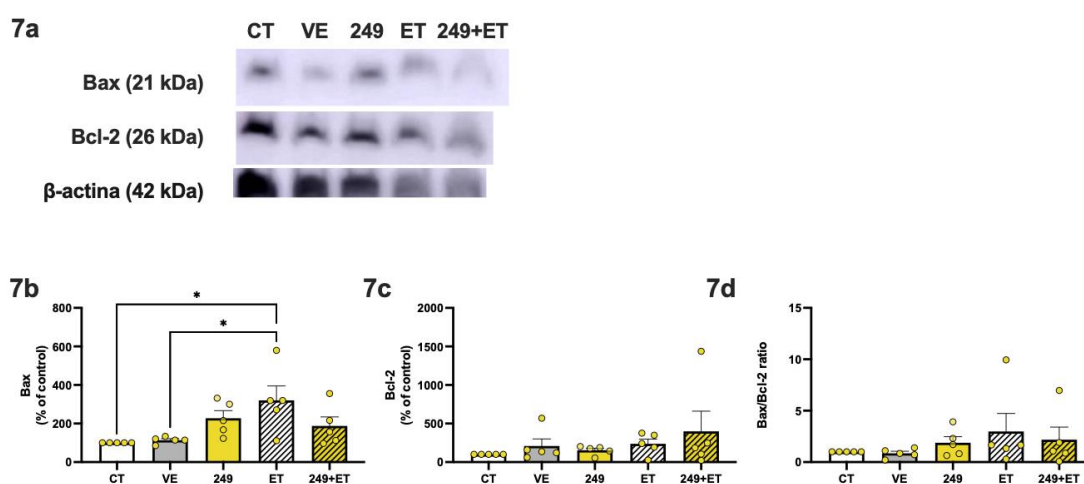


Figure 7. Analysis of Bax and Bcl-2 proteins by Western blot. SH-SY5Y cells were incubated with DMEM/HAM's F12 (CT), 0.1% DMSO in DMEM/HAM's F12 (VE), PQM-249 10 μ M (249), ethanol 250 mM (ET), and the combination of both substances (242+ET). **(6a)** Representative Western blot membranes for Bax (21 kDa), Bcl-2 (26 kDa), and β -actina (42 kDa) protein levels (n = 5). Semi-quantitative analysis of protein levels for Bax **(6b)**, Bcl-2 **(6c)**, and the Bax/Bcl-2 ratio **(6d)**. Data were obtained by one way ANOVA followed by Bonferroni's test and are expressed as % of control group (mean \pm SEM). * p < 0.05.

When cells were pre-treated with CBD, one-way ANOVA showed significant treatment effects for Bax level protein ($F_{(4, 20)} = 4.619$; $p = 0.0084$; **Fig. 8b**). Bonferroni's test revealed that treatment with ethanol increased Bax protein levels compared to the CT and VE groups ($p < 0.05$). The one-way ANOVA exhibited no treatment effects for Bcl-2 and the Bax/Bcl-2 ratio ($F_{(4, 20)} = 1.589$; $p = 0.2160$; **Fig. 8c** and $F_{(4, 20)} = 1.219$; $p = 0.3340$; **Fig. 8d**, respectively).

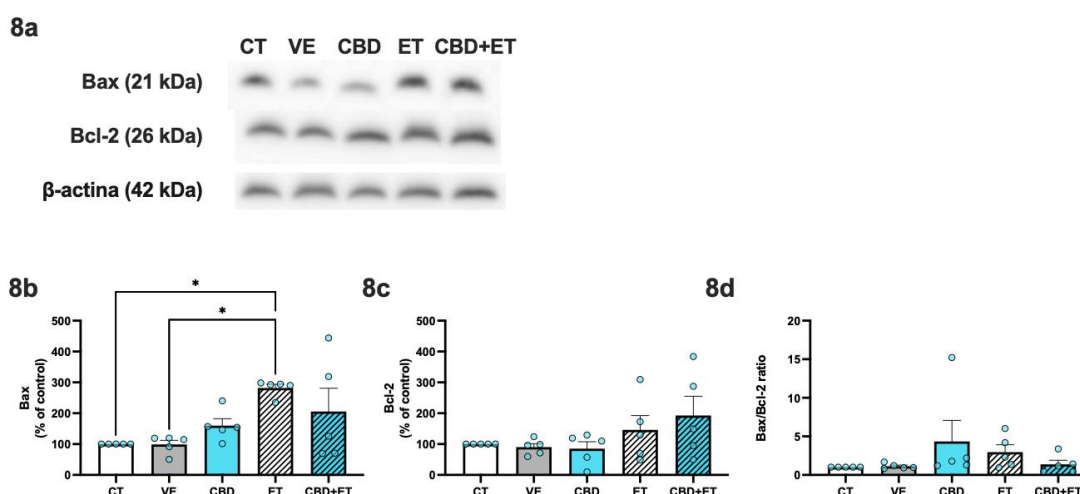


Figure 8. Analysis of Bax and Bcl-2 proteins by Western blot. SH-SY5Y cells were incubated with DMEM/HAM's F12 (CT), 0.1% DMSO in DMEM/HAM's F12 (VE), CBD 10 μ M (CBD), ethanol 250 mM (ET), and the combination of both substances (242+ET). (**6a**) Representative Western blot membranes for Bax (21 kDa), Bcl-2 (26 kDa), and β -actin (42 kDa) protein levels ($n = 5$). Semi-quantitative analysis of protein levels for Bax (**6b**), Bcl-2 (**6c**), and the Bax/Bcl-2 ratio (**6d**). Data were obtained by one way ANOVA followed by Bonferroni's test and are expressed as % of control group (mean \pm SEM). * $p < 0.05$.

5. Discussion

As far as we know, this is the first study that evaluated the neuroprotection potential of CBD and its analogous substances, PQM-242 and PQM-249, against ethanol induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. The results indicate that the CBD analogous were less neurotoxic, presenting a higher LC50 when compared to CBD in SH-SY5Y cells. In addition, both CBD and its analogous demonstrate a neuroprotective potential against ethanol induced neurotoxicity, preventing ethanol apoptosis and late apoptosis. Also, PQM-242 prevented the increase of Bax level, i.e., the intrinsic pathway of apoptosis (D'ARCY, 2019).

In the evaluation of neurotoxicity of the compounds, CBD presented the lowest LC50 compared to its analogous, PQM-242 and PQM-249. CBD LC50 found in our

study was 47 μM , which was similar to LC50 found by URASAKI et al. (2020), 40 μM , whereas for PQM-242 and PQM-249 the LC50 was 727.1 and 666 μM , respectively. Thus, CBD demonstrated higher potential of toxicity compared to its analogs. JANTAS et al., (2024) evaluated the protective potential of CBD in several concentration against oxidative stress and excitotoxicity-related cell damage. The authors showed that nanomolar or low micromolar concentrations of CBD can protect the cell against oxidative stress damage; however, higher CBD concentrations ($> 5 \mu\text{M}$) may induce neurotoxicity activity in SH-SY5Y cells. The cytotoxic effect of CBD may be associated with oxidative stress induction. These CBD neurotoxicity differences among the studies may be related to the supplement of cell culture medium. Culture medium supplemented with 10% of FBS may increase cell resistance to oxidative stress when comparing to cells which were cultivated in 1% N2 supplemented cell culture medium (JANTAS et al. 2024). This may explain these discrepancies between CBD neurotoxicity among studies. In this study, despite CBD showed higher neurotoxicity than its analogs, its NOAEL was 10 μM , differing from Jantas et al. 2014. On the other hand, also contrasting Jantas et al. 2024, other studies demonstrated that CBD did not show any toxicity in concentrations up to 10 μM (JANTAS et al., 2020; KANG et al., 2021; VRECHI et al., 2021; YORDANOV et al., 2022). Regarding PQM-242 and PQM-249 analogs, the same concentration of 10 μM was chosen, even presenting a NOAEL higher than 10 μM .

The ethanol concentration used in the exposure (250 mM) was the LC50 based on previous studies of our group. As our previous study and other studies, ethanol induced apoptosis and late apoptosis, with an increase in Bax levels (SUN et al., 2017); however, there was no difference in the necrosis among groups. The intrinsic pathway of apoptosis is stated by stimuli such as oxidative stress. Thus, proapoptotic proteins, such as Bax, are activated, which results in activation of the intrinsic pathway of apoptosis (D'ARCY, 2019). In addition, ethanol induced neurotoxicity involves oxidative stress (SANGAUNCHOM; DHARMASAROJA, 2020). Thus, these facts corroborate with our results, that ethanol induced apoptosis and late apoptosis in the SH-SY5Y through intrinsic pathway. Meanwhile, the apoptotic ethanol features were prevented by CBD and its analogs, PQM-242 and PQM-249 since late apoptosis and apoptosis events were decreased when cells were incubated with these compounds in combination with ethanol. Furthermore, the

increased of Bax levels was prevented just by PQM-242, with a statistical difference from the ethanol group. Despite Bax levels from PQM-249+ET and CBD+ET groups were not different from ethanol group; these same groups were not different from control group.

This CBD potential to prevent neurotoxicity in SH-SY5Y cells which is induced by different xenobiotics is described elsewhere. For instance, BRANCA et al, (2019) demonstrated that a pre-treatment of CBD (1 μ M) reduces Cd-induced neurotoxicity in SH-SY5Y differentiated cells, preventing apoptosis by downregulating Bax protein. Additionally, in an in vitro model of Parkinson's disease that used retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells exposed to methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), it was demonstrated that the exposure of MPP+ (1 mM) for 48 hours of exposure increased apoptosis, indicated by high levels of Bax protein and caspase 3 (GUGLIANDOLO et al., 2020). This effect was prevented when cells was treated with 10 μ M of CBD. Thus, these studies corroborated with our results, whereupon CBD and its analogues prevent ethanol induced apoptosis and late apoptosis.

Furthermore, recent studies have investigated the neuroprotective potential of new analogues or synthetic substances against ethanol and other drugs. Dos Santos et al. (2022) showed that the synthetic compound LINS01011 (10 μ M) prevented cocaine-induced neurotoxicity (2.5 mM) in SH-SY5Y cells. Additionally, ethanol-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells was mitigated by the flavonoid Epimedium and sodium butyrate (Getachew et al., 2021; Yang et al., 2022). As pharmaceutical treatment of SUD, including AUD, remains challenging due to the limited availability of approved medications, studies on new molecules, such as ours and those mentioned, are essential to addressing this issue.

In conclusion, while CBD showed significant neurotoxicity effect compared to its analogues PQM-242 and PQM-249, all substances (CBD, PQM-242, and PQM-249) at the same concentration (10 μ M) demonstrated protective effects on SH-SY5Y cells against ethanol-induced neurotoxicity. Additionally, PQM-242 also prevented the increase in Bax levels triggered by ethanol. Therefore, these substances may have potential therapeutic effects against AUD.

References

- ALMEIDA, C. A. F. et al. Ayahuasca, a psychedelic beverage, modulates neuroplasticity induced by ethanol in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 416, p. 113546, 7 jan. 2022.
- ALMEIDA, C. A. F. et al. Harmine (HRM) and dimethyltryptamine (DMT), ayahuasca compounds, isolated and in combination, prevent the ethanol-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. 2024. still not published
- BRANCA, J. J. V. et al. Cannabidiol Protects Dopaminergic Neuronal Cells from Cadmium. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2019, Vol. 16, Page 4420, v. 16, n. 22, p. 4420, 12 nov. 2019.
- BRITCH, S. C.; BABALONIS, S.; WALSH, S. L. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology* 2020 238:1, v. 238, n. 1, p. 9–28, 21 nov. 2020.
- CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 119–127, 1 out. 2016.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, v. 43, n. 6, p. 582–592, 1 jun. 2019.
- DOS SANTOS, L. A. et al. Neurotoxicity Assessment of 1-[(2,3-Dihydro-1-Benzofuran-2-yl)Methyl]Piperazine (LINS01 Series) Derivatives and their Protective Effect on Cocaine-Induced Neurotoxicity Model in SH-SY5Y Cell Culture. *Neurotoxicity Research*, v. 40, n. 6, p. 1653–1663, 1 dez. 2022.
- FRANCO, G. R. R. et al. Novel N-Acylaryl Terpene Hydrazone Analogues of Cannabidiol: Synthesis and Evaluation of Their Antinociceptive and Anti-inflammatory Activity. 2024. still not published
- GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules*, v. 10, n. 11, p. 1–34, 1 nov. 2020.
- GETACHEW, B. et al. Sodium Butyrate Protects Against Ethanol-Induced Toxicity in SH-SY5Y Cell Line. *Neurotoxicity Research*, v. 39, n. 6, p. 2186–2193, 1 dez. 2021.
- GOBIRA, P. H. et al. Opposing roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the stimulant and rewarding effects of cocaine. *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 10, p. 1541, 1 maio 2019.
- GUGLIANDOLO, A. et al. Cannabidiol exerts protective effects in an in vitro model of Parkinson's disease activating AKT/mTOR pathway. *Fitoterapia*, v. 143, p. 104553, 1 jun. 2020.
- JANTAS, D. et al. Neuroprotective Effects of Methyl Caffeate against Hydrogen Peroxide-Induced Cell Damage: Involvement of Caspase 3 and Cathepsin D

- Inhibition. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 1530, v. 10, n. 11, p. 1530, 9 nov. 2020.
- JANTAS, D. et al. Protective Effects of Cannabidiol (CBD) against Oxidative Stress, but Not Excitotoxic-Related Neuronal Cell Damage—An In Vitro Study. *Biomolecules* 2024, Vol. 14, Page 564, v. 14, n. 5, p. 564, 9 maio 2024.
- KANG, S. et al. Cannabidiol Induces Autophagy to Protects Neural Cells From Mitochondrial Dysfunction by Upregulating SIRT1 to Inhibits NF- κ B and NOTCH Pathways. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 15, 30 mar. 2021.
- PEREIRA SANGI, D. ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE NA DESCOBERTA DE FÁRMACOS: O EMPREGO DA SÍNTESE ORIENTADA PELA DIVERSIDADE ESTRUTURAL #. *Quim. Nova*, v. 39, n. 8, p. 995–1006, 2016.
- RAMKISSOON, R.; SHAH, V. H. Alcohol Use Disorder and Alcohol-Associated Liver Disease. *Alcohol Research: Current Reviews*, v. 42, n. 1, 2022.
- SANGAUNCHOM, P.; DHARMASAROJA, P. Caffeine Potentiates Ethanol-Induced Neurotoxicity Through mTOR/p70S6K/4E-BP1 Inhibition in SH-SY5Y Cells. *International Journal of Toxicology*, v. 39, n. 2, p. 131–140, 1 mar. 2020.
- SUN, W. et al. Study of acetylcholinesterase activity and apoptosis in SH-SY5Y cells and mice exposed to ethanol. *Toxicology*, v. 384, p. 33–39, 1 jun. 2017.
- UDO, M. S. B. et al. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, contributes to cocaine-induced rat primary hippocampal neuronal death in a synergistic and time-dependent manner. *Archives of Toxicology*, v. 95, n. 5, p. 1779–1791, 1 maio 2021.
- URASAKI, Y. et al. Potency Assessment of CBD Oils by Their Effects on Cell Signaling Pathways. *Nutrients*, v. 12, n. 2, 1 fev. 2020.
- VRECHI, T. A. M. et al. Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells. *Scientific Reports* 2021 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–13, 8 mar. 2021.
- YANG, X. et al. Proteomic Analysis of Protective Effects of Epimedium Flavonoids against Ethanol-Induced Toxicity in Retinoic Acid-Treated SH-SY5Y Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 27, n. 3, 1 fev. 2022.
- YORDANOV, Y. et al. Formulation of Nanomicelles Loaded with Cannabidiol as a Platform for Neuroprotective Therapy. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 12, 1 dez. 2022.
- ZHANG, H. Y. et al. Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addiction Biology*, v. 22, n. 3, p. 752–765, 1 maio 2017.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados, podemos concluir que:

- a) os análogos PQM-242 e PQM-249 apresentaram tanto e/ou efeito ansiolítico, e/ou como efeito antidepressivo em todas as doses analisadas, efeitos comuns na fase de abstinência ao etanol;
- b) enquanto a HRM diminuiu a expressão da sensibilização ao etanol, o DMT e a combinação DMT/HRM não apresentaram efeito;
- c) a concentração letal 50 (CL 50) do etanol foi de 250 mM;
- d) a NOAEL para as substâncias CBD e HRM foi a de 10 μ M; para o PQM-242, PQM-249 e DMT foi a de 100 μ M;
- e) as substâncias PQM-242, PQM-249, DMT, HRM e a associação 1:2 DMT/HRM apresentam-se promissoras no papel neuroprotetor frente aos efeitos tóxicos desencadeados pelo etanol.

REFERÊNCIAS

- BURNETTE, E. M. *et al.* Novel agents for the pharmacological treatment of lcohol use disorder. **Drugs**, v. 82, n. 3, p. 251–274, 8 feb. 2022.
- CORIALE, G. *et al.* Treatment of alcohol use disorder from a psychological point of view. **Rivista di Psichiatria**, v. 53, n. 3, p. 141–148, 2018.
- DISTRITO FEDERAL (Estado). Consumo de álcool na população adulta do Distrito Federal - série histórica 2006 a 2021. **Informe Epidemiológico**, v. 02, n. 04, p. 1–5, 2022.
- DOS SANTOS, L. A. *et al.* Neurotoxicity assessment of 1-[(2,3-Dihydro-1-Benzofuran-2-yl)Methyl]Piperazine (LINS01 Series) derivatives and their protective effect on cocaine-induced neurotoxicity model in SH-SY5Y cell culture. **Neurotoxicity Research**, v. 40, n. 6, p. 1653–1663, 7 Dec. 2022.
- GARCIA, R. C. T. *et al.* M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 17555, 2 Dec. 2015.
- GLANTZ, M. D. *et al.* The epidemiology of alcohol use disorders cross-nationally: findings from the World Mental Health Surveys. **Addictive Behaviors**, v. 102, p. 106128, 2020.
- KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–238, 26 Jan. 2010.
- MCPHEETERS, M. *et al.* Pharmacotherapy for alcohol use disorder. **JAMA**, v. 330, n. 17, p. 1653, 7 Nov. 2023.
- MERKX, M. J. M. *et al.* Guidelines for allocating outpatient alcohol abusers to levels of care: predictive validity. **Addictive Behaviors**, v. 36, n. 6, p. 570–575, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 58–63, 1997.
- VIETA, E. DSM-5.1. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 134, n. 3, Sept. 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health 2018**. Geneve: WHO, 2018.

APÊNDICE A – Metodologia completa dos artigos 1 e 2

MATERIAL E MÉTODOS

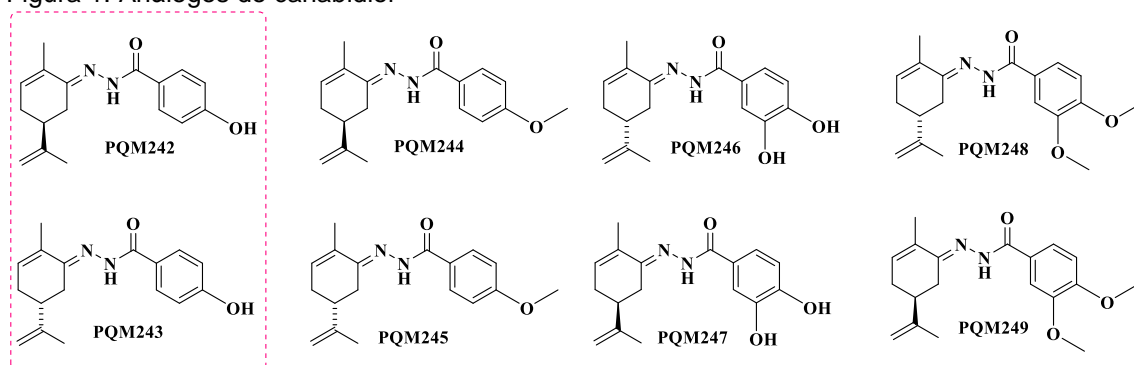
SUBSTÂNCIAS

Os análogos do canabidiol foram sintetizados em colaboração com o Prof. Dr. Claudio Viegas no laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM). O DMT e HRM foram extraídos em colaboração com a Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas do Laboratório de Fitoquímica, Química medicinal é Metabolômica (LFQMM). O CBD foi obtido por doação sendo da *BioSynthesis Pharma Group Limited* (BSPG-Pham, Reino Unido), apresenta pureza de 99,9%, na forma liofilizada. O etanol absoluto utilizado provém da Merck do Brasil, S.A.

Síntese dos análogos do canabidiol

As informações a respeito da síntese e das estruturas são sigilosas e confidenciais. Resumidamente, os análogos de canabidiol foram sintetizados a partir de um planejamento sintético baseado no uso da R- (-)-carvona e S-(+)-carvona como materiais de partida comerciais, conforme delineado na Figura 1, gerando a Série A: PQM-242 a PQM-249, com 8 compostos. Tomando-se como exemplo os ácidos benzoicos funcionalizados, estes foram convertidos aos respectivos ésteres, e subsequentemente às respectivas hidrazidas. Em etapa subsequente, uma reação de acoplamento destas benzoidrazidas funcionalizadas com a R-(-)- carvona (21), levou à série-alvo A.

Figura 1: Análogos do canabidiol



Fonte

: FRANCO, 2019

Nota: Abordagem sintética para a obtenção das séries-alvo A de análogos acilarilidrazônicos e oxietileno-benzamídicos do canabidiol

Extração do DMT e da HRM

Extratos puros hidroetanólicos (7:3 etanol:H₂O, v/v, 0,1% de ácido acético) foram preparados: um apenas de folhas de *P. viridis* (CEP) e o outro apenas de cipós de *B. caapi* (CEB). O processo extrativo foi auxiliado por maceração, sendo o solvente renovado a cada 24 horas por 3 dias. Posteriormente, os extratos foram filtrados e secos em rotaevaporador a 40 °C. Um fracionamento ácido-base foi realizado para todos os extratos (CEB e CEP). Inicialmente, os extratos foram acidificados com 15% HCl (v/v) para pH 2,0. A extração líquido-líquido foi realizada com solventes orgânicos de polaridades crescentes. Hexano foi adicionado ao extrato bruto e particionado. Após isso, a partição foi feita com acetato de etila (EAF); a fração restante foi basificada com NaOH 15% (v/v) até pH 8,0 e novamente particionada com acetato de etila para obtenção dos alcaloides (ALK) e das frações hidroalcoólicas (HAL). Todas as frações foram submetidas à CCD. O reagente de Dragendorff foi utilizado na fração ALK para confirmar a presença de alcaloides.

As frações dos alcaloides de *P. viridis* e *B. caapi* (ALKP e ALKB, respectivamente) foram submetidas à cromatografia em coluna para isolamento dos compostos majoritários. Sílica gel (o tamanho da partícula era de 40–63 µm, 230–400 Mesh) foi usado para cromatografia flash. As análises foram realizadas em colunas de vidro (3 cm de diâmetro e 30 cm de altura), acopladas a um sistema de pressão. Um método de gradiente foi aplicado para ALKB e ALKP usando a mistura CHCl₃:MeOH como eluente. Isto começou com 100% de clorofórmio até a fase móvel atingir 50% de cada solvente, seguido de eluição final usando 100% de

metanol. Todas as fases móveis foram acidificadas com ácido acético a 1%. Em seguida, as amostras foram analisadas por CDD e reveladas sob análise de UV e reagente de Dragendorff. Assim, foi possível agrupar frações com perfis semelhantes. Subfração 5 obtida a partir de cromatografia flash ALKB mostrou um ponto de CCD intenso. Apresentou um precipitado, que se separou rapidamente do sobrenadante. Posteriormente, foi possível recrystalizar o sobrenadante obtido porque o precipitado era preferencialmente solúvel em CHCl_3 e o sobrenadante em MeOH.

CULTURA DE CÉLULAS SH-SY5Y

As células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rodrigo Portes Ureshino da UNIFESP *campus* Diadema. O protocolo de descongelamento celular foi realizado com 10 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 (contendo L-glutamina 2 mM e HEPES 3,5 g/L, LGC BIO), suplementado com soro fetal bovino (Thermo) 10% e antibióticos – penicilina 50 U/mL e estreptomicina 50 $\mu\text{g/mL}$ (LGC BIO) – em tubo cônico de 15 mL. Após a centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado para a adição de 5 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado e posterior cultivo celular em garrafas com filtro (T25) tratadas (TPP®). As células foram mantidas à 37°C e 5% de CO_2 e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. As passagens foram realizadas ao se atingir uma confluência celular de 70-80% com a adição de 1 mL de tripsina 0,25% (LGC BIO). Após 5 minutos em estufa, a tripsina foi inativada com 5 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado, o conteúdo foi centrifugado para descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado e posteriormente cultivadas em garrafas para cultura celular de 25 ou 75 cm^2 com filtro.

ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio do brometo de tetrazólio (MTT), utilizado para medir a atividade metabólica das células viáveis. O MTT é reduzido a formazan (precipitado de coloração violeta), pela succinato

desidrogenase mitocondrial, uma enzima que é ativa em células com metabolismo da cadeia respiratória intacto. Assim, o formazan é quantificado por espectrofotometria e possui correlação direta com o número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células SH-SY5Y foram mantidas em placas de 24 poços (1×10^5 células por poço) e incubadas com concentrações variadas dos compostos PQM 242, PQM 249 e CBD (1; 10; 100; 1000 μM), as quais foram solubilizadas em DMSO (solução mãe) e um veículo foi preparado contendo 0,1% de DMSO final para as diluições; e etanol (100; 250; 500; 1000 mM), por 48 horas. Uma solução de KCl 250 mM foi utilizada como controle positivo de morte celular. Após os períodos de incubação, o sobrenadante (meio de cultura) foi removido e as células foram lavadas com 400 μL de tampão fosfato salina (PBS) estéril a 37°C , por duas vezes. Em seguida, foram adicionados 400 μL de MTT 0,5 mg/mL em cada poço e a placa foi incubada em estufa (5% de CO_2 e 37°C) por 3 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi removida para a adição de 700 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a homogeneização, 200 μL de cada poço foram transferidos, em triplicata, para uma placa de 96 poços para a leitura da absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle e o DMSO foi utilizado como branco (DOS SANTOS *et al.*, 2022).

As curvas concentração-resposta (CCR) de cada substância foram realizadas para se determinar a NOAEL do CBD, PQM 242, PQM 249, DMT, HRM e as associações entre DMT/HRM, bem como a concentração de etanol (ET) próxima à sua CL50. Posteriormente, o efeito decorrente da associação das substâncias nas concentrações supracitadas foi estudado por meio dos seguintes grupos: PQM 242+ET, PQM 249+ET, CBD+ET, DMT+ET, HRM+ET e DMT/HRM+ET.

CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise da integridade da membrana celular, foi utilizado o fluoróforo iodeto de propídio (PI), para marcar as células que estavam com a membrana rompida, enquanto a anexina V foi utilizada para a marcação de células apoptóticas. Quando a anexina V é conjugada ao FITC (isotiocianato de fluoresceína), é possível identificar e quantificar as células por citometria de fluxo. Ao corar as células SH-SY5Y simultaneamente com anexina V-FITC e PI, pode-se diferenciar células viáveis

(FITC negativo; PI negativo), no início de apoptose (FITC positivo; PI negativo) e apoptose tardia ou necrose (FITC positivo; PI positivo). Resumidamente, após cada incubação detalhada anteriormente, as células foram removidas por tripsinização da placa de cultura, centrifugadas (500xg por 5 minutos), lavadas com PBS gelado por duas vezes e coradas com anexina V-FITC e PI por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Posteriormente, as análises foram realizadas por citometria de fluxo (FACSCalibur) (adaptado de GARCIA et al., 2015).

WESTERN BLOT

As proteínas Bax e Bcl-2 foram quantificados nas células de neuroblastoma SH-SY5Y por meio de *Western blot*. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um sonificador com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 1%, Desoxicolato de sódio 0,5%, contendo inibidor de protease e fosfatase (Thermo Scientific, 78442) na diluição 1:5(g/ml) e ajustadas para a mesma concentração proteica pelo método de Bradford. Em seguida, 130 µL da amostra foram diluídos com 30 µL de tampão de Laemmli. Padronizou-se a concentração proteica para 10 µg/µL. As amostras foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15%, onde as proteínas migraram durante 180 minutos, sob diferença de potencial elétrico de 90 V nos primeiros 10 minutos, e 100V no restante do tempo. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (Millipore, 0,2 µm de diâmetro) sob amperagem constante de 0,4 durante 90 minutos. A transferência foi confirmada pela coloração das membranas com o corante vermelho de *Ponceau* e as membranas lavadas com TBST (Tampão Tris-Salina com Tween 20). Após a confirmação, houve o bloqueio com leite desnatado 5% em tampão Tris-Salina por 90 minutos a fim de saturar os sítios de ligações inespecíficas. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos diluídos em TBST e em concentrações previamente padronizadas. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com um anticorpo secundário marcado com peroxidase (anti-*rabbit* e anti-*mouse*, 1:3000 – Santa Cruz *Biotechnology*). O excesso de conjugado foi removido com mais um ciclo de lavagens e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as

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

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da parte *in vitro* do estudo foram analisados por meio de teste t ou análise de variância (ANOVA) de uma via para a análise de dois grupos ou múltiplos grupos, respectivamente, seguidos do pós-teste de *Bonferroni*.

Os valores foram expressos como “média \pm erro padrão da média” e as diferenças foram consideradas significativas para o valor $p < 0,05$.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação o potencial terapêutico de análogos de canabidiol na ansiedade e depressão por meio de estudo pré-clínico em camundongos**, registrada com o nº **0012/2021**, sob a responsabilidade de **Larissa Helena Lobo Torres Pacheco**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **24/05/2021 a 23/04/2022**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Swiss	225	225	0	Biotério central da unifal-mg

Alfenas, 13 de Maio de 2021

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/ceua/autenticidade/certificado/> e digite a chave: 99552082d376bae17dfc3833c508933c

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação dos efeitos do DMT (N,N-dimetiltriptamina) e da Harmina na sensibilização comportamental pelo etanol em camundongos**, registrada com o nº **0066/2021**, sob a responsabilidade de **Larissa Helena Lobo Torres Pacheco**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/03/2022 a 29/02/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / Swiss	130	130	0	Universidade federal de alfenas

Alfenas, 18 de Fevereiro de 2022

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 85ba425a4252828e936ff2cee8ffb14b