

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**MODULAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO POR IBOGAÍNA RELEVANTE  
ÀS SUAS PROPRIEDADES ANTIADITIVAS E TÓXICAS**

**MIRNA BAINY LEAL**

**Orientadora: Profa. Dra. Elaine Elisabetsky**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, como  
requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.**

**Porto Alegre**

**2000**

## AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Elaine Elisabetsky, pela orientação, apoio, carinho, paciência e pelo aprendizado;
- Ao Prof. Dr. Diogo de Souza, pela orientação, estímulo, carinho, incentivo e apoio;
- Ao Coordenador do Curso de Pós- Graduação em Bioquímica, Prof. Dr. João José Sarkis, pelo apoio;
- Aos Professores do Departamento de Farmacologia da UFRGS pelo apoio, em especial ao Prof. Dr. Roberto Thaddeu pela paciência e pelo aprendizado;
- Às funcionárias do Departamento de Farmacologia da UFRGS, pelo apoio, carinho, amizade e auxílio;
- Às funcionárias do Curso de Pós- Graduação em Bioquímica, em especial a Cléia, Sandra, Mariana e Janaína pelo apoio e solicitude;
- Às colegas do Laboratório de Etnofarmacologia, pelo carinho, amizade, e apoio;
- À Kátia Michelin e Ana Paula Jacobus, bolsistas de iniciação científica, pela amizade e auxílio nos experimentos;
- À minha amiga Tânia Alves Amador, pela amizade, carinho e por todo o apoio técnico e psicológico;
- À Adriana Lourenço e Lucimar Filot pela amizade e apoio nos experimentos;
- À Tatiana Emanuelli pela orientação, paciência, carinho e apoio nos experimentos de liberação e captação de glutamato;
- À Lisiane Porciúncula, pelo apoio nos experimentos e por ter propiciado os experimentos com culturas de astrócitos, que muito enriqueceram este trabalho;

- Aos amigos do Lab. 26 e 28 pelo apoio, amizade e carinho, em especial à Cristina Pereira, Lúcia Martini, Rejane, Letícia, Candice, Fernanda e ao André pelo auxílio nos experimentos;
- À Lúcia Vinadé, pela amizade e apoio por ter enviado tantos artigos do exterior que foram cruciais para a elaboração desta tese;
- À Coordenação do Curso de Farmácia da UNISUL, pelo apoio e confiança depositadas em mim, em especial aos meus colegas da Comissão de TCC pelo apoio no período final desta tese;
- À Coordenação do Curso de Farmácia da PUCRS, pelo apoio e em especial à Profa. Flávia Thiesen pelo apoio e confiança e à Profa Ivone Sartor, pelo apoio no período final desta tese;
- À Coordenação do Curso de Farmácia da UCPEL, pelo apoio e oportunidade profissional;
- Ao CNPq pela concessão de Bolsa de estudo;
- Ao Howard Lotsf (NDA International Inc.) pela doação do cloridrato de ibogaína usado nesta tese;
- À Iara e Paty pelo carinho, amizade e apoio psicológico;
- À minha família, que sempre apoiou, estimulou e incentivou o meu crescimento pessoal e profissional, em especial à minha Mãe pelo carinho, pela sabedoria, por sempre estar presente e ter uma palavra de incentivo e apoio;
- Ao Enrique Araújo de Salazar e sua família, pelo carinho, pela acolhida em Pelotas e pela amizade;
- À todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	I
<b>LISTA DE TABELAS</b>	III
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	IV
<b>RESUMO</b>	VI
<b>ABSTRACT</b>	VIII
<b>APRESENTAÇÃO</b>	X
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. EPIDEMIOLOGIA	5
1.2. ABORDAGEM TERAPÊUTICA	6
1.3. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E O RECEPTOR NMDA	9
1.4. ANTAGONISTAS NMDA E DROGADIÇÃO	14
1.5. IBOGAÍNA	17
1.5.1. História	17
1.5.2. Ações Farmacológicas da Ibogaína	20
1.5.2.1. Estudos em Animais	20
1.5.2.2. Ações farmacológicas em Humanos	22
1.5.2.3. Farmacocinética da Ibogaína	24
1.5.2.4. Ação de Ibogaína na Neurotransmissão Central	27
1.5.2.5. Ibogaína e Neurotoxicidade	33
1.6. OBJETIVOS	37
<b>2. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	39

CAPÍTULO 2.1 – MIRNA BAINY LEAL, DIOGO O.G. DE SOUZA AND ELAINE ELISABETSKY. Long-lasting ibogaine protection against NMDA-induced convulsions in mice. <i>Neurochemical Research</i> 25(8):1083-1087, 2000.	40
CAPÍTULO 2.2 – MIRNA BAINY LEAL, KÁTIA MICHELIN, DIOGO SOUZA AND ELAINE ELISABETSKY. NMDA involvement on ibogaine effects on morphine withdrawal in mice. A ser submetido ao <i>Archives of Toxicology</i>	46
CAPÍTULO 2.3 – MIRNA B. LEAL, TATIANA EMANUELLI, LISIANE DE O. PORCIÚNCULA, DIOGO O. SOUZA AND ELAINE ELISABETSKY. Ibogaine alters synaptosomal and glial glutamate release and uptake. Aceito para publicação no <i>NeuroReport</i> 12 (2):263-267, 2001.	65
<b>3. DISCUSSÃO</b>	88
<b>4. CONCLUSÕES</b>	101
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	103

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1** - Representação esquemática da sinapse glutamatérgica 10
- Figura 2** - Representação esquemática do receptor NMDA e seus vários  
sítios de regulação 12
- Figura 3** – Estrutura química da ibogaína 17

### CAPÍTULO 2.1

- Figura 1** – Effects of saline and ibogaine (60 and 80 mg/kg), injected ip 30 min  
24 h, 48 h, and 72 h before sc NMDA (240 mg/kg) on NMDA-  
induced clonic convulsion. 43
- Figura 2** – Effect of saline and ibogaine (60 and 80 mg/kg), on Rotarod test at  
30, 60, 90, and 120 min post treatment. 43
- Figura 3** – Effects of saline and ibogaine (60 and 80 mg/kg) on [<sup>3</sup>H] MK-801  
(2 nM) binding in cortical membranes after 30 min, 24 h, 48 h, and  
72 h post treatment. 43

### CAPÍTULO 2.2

- Figura 1**- Effects of ibogaine, MK-801 and co-administration of ibogaine and  
MK-801 on naloxone-induced jumping in morphine dependent mice. 63
- Figura 2** – Effect of saline and ibogaine on NMDA-induced jumping. 64

### CAPÍTULO 2.3.

- Figura 1**- Effects of ibogaine on basal and K<sup>+</sup>-stimulated release of [<sup>3</sup>H]  
Glutamate from mice cortical (A) and cerebellar (B) synaptosomes. 81

- Figura 2** - Effect of the absence of calcium on [<sup>3</sup>H]glutamate release induced by ibogaine (1 mM) or 40 mM KCl (K<sup>+</sup>) from mice cortical synaptosomes. 83
- Figura 3**- Effect of TTX on [<sup>3</sup>H]glutamate release induced by ibogaine (1 mM) or 20 μM veratridine from mice cortical synaptosomes. 85
- Figura 4** – Effects of ibogaine on [<sup>3</sup>H] glutamate uptake by cortical and Cerebellar synaptosomes of mice (A), and by cortical astrocyte cultures of mice and rats (B). 87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Concentrações de ibogaína em vários tecidos corporais	25
<b>Tabela 2:</b> Sítios e mecanismos de ação de ibogaína no sistema nervoso central	27



## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato

ANOVA – Análise de variância

APV – ácido 2-amino-5-fosfonoaléico

CEBRID – Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas

DE<sub>50</sub> – Dose eficaz para 50%

5,7-di-CI-KYN – 5,7 dichlorokynurenic acid

DOM – 2,5 dimetóxi-4-metanfetamina

DOPAC – 3,4-ácido dihidroxifenilacético

DSM-IV - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais- quarta edição

ECG – Eletrocardiograma

EEG – Eletroencefalograma

EGTA – éter etileno glicol-bis( $\beta$ -amino etílico)

FBS – Soro fetal bovino

FDA - Food and Drug Administration

GLAST – transportador de glutamato e aspartato

GLT- transportador de glutamato

GTP $\gamma$ S – guanosina trifosfato

5- HIAA – Ácido-5-hidróxiindolacético

HVA – Ácido homovanílico

icv – intracerebroventricular

ip – intraperitoneal

iv – intravenosa

KA- Ácido cáinico

LDH – Lactato desidrogenase

LSD – dietilamida do ácido lisérgico

LTP- Potenciação de Longa Duração

mGluR – Receptor glutamatérgico metabotrópico

MK-801- ( $\pm$ )-5-metil-10,11-dihidróxi-5H-dibenzo (a,d)ciclo-hepteno-5,10-imina ou dizocilpina

NIDA - National Institute on Drug Abuse

NIH - National Institutes of Health

NMDA- N-Metil-D-Aspartato

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCP- Fenciclidina

PIB – Produto interno bruto

Proteína G – Proteína ligante de nucleotídeo da guanina

PTZ – Pentilenotetrazol

sc – subcutânea

SEM – Erro padrão médio

SNC – Sistema nervoso central

TCP – 1-[1-(2-tienil)-ciclohexil]piperidina (análogo da fenciclidina)

TTX – Tetrodotoxina

## RESUMO

Ibogáína é um alcalóide isolado de *Tabernanthe iboga*, com suposta atividade antiaditiva. Relatos de casos, bem como estudos clínicos não controlados, sugerem que uma única dose de ibogáína é capaz de eliminar os sintomas da síndrome de abstinência e a compulsão pelo uso de drogas, efeitos que se mantêm por longos períodos de tempo. Estas propriedades tem sido evidenciadas experimentalmente em roedores.

Embora saiba-se que a ibogáína pode afetar vários sistemas de neurotransmissores, as bases neuroquímicas para esta possível atividade antiaditiva ainda não estão esclarecidas.

Ibogáína age como um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, e foi demonstrado que vários antagonistas de receptores NMDA atenuam a dependência, a tolerância, a sensibilização, e o reforço produzidos por drogas de abuso. O sistema glutamatérgico também tem sido implicado na neurotoxicidade induzida por altas doses de ibogáína. Assim, o objetivo principal desta tese foi contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação antiaditivo e neurotóxico de ibogáína, focalizando o sistema glutamatérgico e as interações com os receptores NMDA, através de análises *in vivo* e *in vitro*.

Os resultados demonstram que uma única administração de ibogáína resulta em efeitos a longo prazo mensuráveis *in vivo* e *in vitro*, não atribuíveis à toxicidade. Sugere-se que ocorram alterações funcionais de longo prazo em receptores NMDA, que podem ser relevantes no contexto terapêutico de ibogáína e outros antagonistas NMDA.

“Jumping” (saltos ininterruptos) é o principal sintoma da síndrome de abstinência a morfina em camundongos. Demonstrou-se que a ibogáína e o MK-801 inibiram de maneira dose-dependente, e atuaram sinergicamente, quanto à inibição do “jumping” precipitado por naloxona em camundongos dependentes de morfina. Estes resultados sugerem que o efeito da

ibogaína na fase aguda da síndrome de abstinência a opióides pode ser mediado por receptores NMDA. Demonstramos ainda que a ibogaína inibe o “jumping” precipitado por NMDA em camundongos sem tratamento prévio com morfina, e que este efeito não é observado a longo prazo. Este resultado sugere que o “jumping” pode ser consequência de uma ativação aguda do receptor NMDA. A análise de união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 em membranas de córtex cerebral de camundongos, não evidenciou diferenças na densidade ou sensibilidade de receptores NMDA em animais abstinentes de morfina tratados ou não com ibogaína ou MK-801 comparados a camundongos livres de morfina. Estes resultados corroboram a idéia de que a síndrome de abstinência possa de fato estar relacionada a uma alteração funcional transitória dos receptores NMDA.

Verificou-se que ibogaína em altas concentrações estimula a liberação e inibe a captação de glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral (mas não de cerebelo) de camundongos (mas não de ratos). A estimulação da liberação de glutamato não ocorre em presença de concentrações despolarizantes de potássio, e não é dependente de cálcio extracelular ou canais de sódio voltagem dependente. Verificamos ainda que ibogaína também inibe a captação de glutamato em culturas de astrócitos de córtex cerebral de camundongos e ratos. Estes resultados sugerem que altas concentrações de ibogaína induzem efeitos neurotóxicos em regiões específicas do cérebro, variáveis entre diferentes espécies animais.

Este trabalho demonstrou que o sistema glutamatérgico em geral, e os receptores NMDA em particular, estão envolvidos no efeito antiaditivo da ibogaína, e podem estar relacionados ao efeito neurotóxico de altas doses desta droga. Este trabalho também reafirma a importância do estudo de produtos naturais como uma importante fonte de novas substâncias protótipo com aplicação terapêutica.

## ABSTRACT

Ibogaine is an alkaloid isolated from *Tabernanthe iboga* with putative antiaddictive properties. Anecdotal reports, as well as uncontrolled clinical data, suggest that a single dose of ibogaine attenuates withdrawal symptoms and drug craving for extended periods of time. These reports are somewhat supported by animals studies.

Ibogaine alters various neurotransmitter systems. However the neurochemical basis for this alleged antiaddictive activity remain unclear. Ibogaine acts as a NMDA receptor antagonist; and various NMDA receptors antagonists attenuate dependence, tolerance, sensitization, and reinforcing properties produced by drugs of abuse. The glutamatergic system has also been implicated in the neurotoxicity induced by high doses of ibogaine. Hence, the purpose of this thesis was to clarify the mechanism of the antiaddictive and neurotoxic effects of ibogaine, focusing on the glutamatergic system and the modulation of NMDA receptors by *in vivo* and *in vitro* analysis.

The results demonstrate that a single administration of ibogaine results in long lasting effects, detectable *in vivo* and *in vitro*, and unrelated to its toxicity. Such results, understood as functional long lasting changes in NMDA receptors, may be relevant within the context of therapeutic uses of ibogaine and NMDA antagonists.

Jumping is a distinct sign of morphine withdrawal in mice. Ibogaine and MK-801 dose dependently inhibited the naloxone-induced jumping in morphine dependent mice; moreover, there is synergism of ibogaine and MK-801 in this inhibition. This results suggest that the inhibitory effects of ibogaine on the acute phase of opiate withdrawal symptoms are mediated by NMDA receptors. Additionally, we demonstrate that ibogaine inhibited NMDA-induced jumping in morphine naive mice, and that this is not a long term

effect. This result suggests that jumping may be consequent to an acute activation of NMDA receptors. The analysis of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to mice cortical membranes, did not reveal differences in the density or sensitivity of NMDA receptors in morphine withdrawal mice, treated or not with ibogaine or MK-801, in comparison with morphine free mice. These findings support the idea that the morphine withdrawal syndrome may indeed be associated with an acute and transient functional state of NMDA receptors.

We verified that high concentrations of ibogaine stimulate glutamate release and inhibit glutamate uptake by cortical (but not cerebellar) synaptosomes of mice (but not rats). The ibogaine-induced glutamate release was not observed in the presence of depolarizing K<sup>+</sup> concentrations, and is independent of exogenous Ca<sup>2+</sup> and voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channels. Additionally, ibogaine nearly abolished glutamate uptake by cortical astrocyte cultures from rats and mice. The data provide direct evidence of glutamate involvement in the neurotoxicity induced by high doses of ibogaine in specific regions of brain, variable among animal species.

This study demonstrates that the glutamatergic system in general, and NMDA receptors in particular, are involved in the antiaddictive effects of ibogaine, and may be also related to its neurotoxic effect in higher doses. This study also ratifies the importance of studying natural products as an important source of new prototype drugs with therapeutic application.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por Introdução, Artigos Científicos publicados e a ser submetido à publicação, Discussão, Conclusões e Bibliografia. O item 1. **Introdução** oferece embasamento para o estabelecimento dos objetivos bem como para o desenvolvimento da metodologia empregada nesta tese. O item 2. é constituído por **Artigos** (material e métodos, resultados e discussão dos resultados encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo). O item 3. **Discussão**, contém interpretações e comentários gerais sobre todos os trabalhos publicados ou submetidos. O item 4. **Conclusões** representa as conclusões gerais, baseando-se nos objetivos da tese. O item 5. **Referências Bibliográficas** refere-se somente às citações que aparecem na introdução e discussão. As referências bibliográficas que se referem a materiais e métodos, resultados e discussão parcial encontram-se nos artigos do item 2.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de drogas psicoativas é quase tão antigo quanto a própria humanidade. Ao longo da história, tem-se registro de que uma grande parte das sociedades faziam uso de alguma substância com a finalidade de alterar o humor, o pensamento e os sentimentos (O'BRIEN, 1996; GRAEFF, 1999). Todos os agentes que alteram o comportamento são passíveis de serem ingeridos em excesso quando os efeitos comportamentais são agradáveis (GRAEFF, 1989; O'BRIEN, 1996), e o abuso ou uso não médico de fármacos caracteriza-se pelo emprego destes com o intuito de produzir emoções e sensações gratificantes, independentes do efeito terapêutico (PECHANSKY & FUCHS, 1998).

Os principais representantes das substâncias mais usadas abusivamente são álcool, barbitúricos e benzodiazepínicos, opióides, solventes voláteis (depressores gerais do SNC); cocaína, anfetamina e derivados, e nicotina (estimulantes do SNC); maconha; fenciclidina; antiparkinsonianos (alucinógenos) (PRESTON & WALSH, 1998).

Nos últimos 25 anos, o uso abusivo e a dependência de drogas têm sido definidos e redefinidos por várias organizações (O'BRIEN, 1996). Embora possam ocorrer simultaneamente, dependência e abuso de drogas são conceitos diversos. Considera-se abuso a “auto-administração de uma droga que desvia dos padrões sócio-culturais aceitos em uma sociedade, ou subgrupo social, em uma determinada época” (GRAEFF, 1989). Nos contextos populares e legislativos, o termo abuso de drogas significa uso de substância ilícita ou qualquer uso não prescrito de uma droga que visa a ser usada como medicamento, bem como o uso perigoso ou excessivo de substâncias legalmente disponíveis, como o álcool e tabaco (JAFFE, 1999).

Dependência, segundo a OMS (1974) “é um estado mental e muitas vezes físico que



resulta da interação entre um organismo vivo e uma dada substância. Caracteriza-se por comportamento que sempre inclui uma compulsão de tomar a droga para experimentar seu efeito psíquico e, às vezes, evitar o desconforto provocado por sua ausência" (GRAEFF, 1989; O'BRIEN 1996). Segundo NESTLER (1992) "dependência é definida como a necessidade de uma exposição contínua a uma droga de modo a evitar a síndrome de abstinência (distúrbios físicos e/ou psicológicos) quando a droga é retirada". Conforme definição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - quarta edição (DSM-IV), "o aspecto essencial da dependência é um agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que o indivíduo continua usando a substância apesar dos problemas significativos relacionados a esta" (JAFFE, 1999). A dependência é considerada um resultado de adaptações neuronais que ocorrem no organismo em resposta à repetida exposição à droga. Pode ser considerada artificial a distinção entre dependência física e psicológica, já que ambas são mediadas por mecanismos neurais possivelmente similares (NESTLER, 1992).

Outro termo bastante utilizado, e que muitas vezes é usado como sinônimo de dependência de drogas é *adição*<sup>1</sup>, que é definida "como o uso compulsivo de uma droga apesar das consequências adversas". A dependência física fazia parte da definição de *adição*, mas atualmente não é mais considerada como um aspecto necessário ou suficiente para caracterizar *adição* de droga (NESTLER, 1992; O'BRIEN, 1996).

O que se pode observar é que a compulsão por ingerir uma droga, com diminuição do controle para limitar a ingestão, são características comuns à maioria das definições de dependência e *adição*. Este comportamento é o resultado da associação entre propriedades

---

<sup>1</sup> Nesta tese os termos *adição* e *drogadição* serão utilizados de uma forma mais ampla, podendo ser substituídos por dependência de drogas.

reforçadoras positivas e negativas obtidas com o uso crônico de uma dada substância. Propriedades reforçadoras são comuns à maioria das drogas abusadas pelo homem, e são partes cruciais da dependência às substâncias (KOOB, 1999).

Reforço pode ser definido como a capacidade de uma substância de provocar efeitos que levam o usuário a desejar ingeri-las novamente; isto é, um processo pelo qual o estímulo aumenta a probabilidade de resposta (KOOB, 1999; PECHANSKY & FUCHS, 1998). O processo pode ser entendido como uma forma de plasticidade comportamental na qual alterações comportamentais ocorrem em resposta à exposição aguda à substância reforçadora. No cérebro existem sistemas reforçadores que normalmente medeiam o reforço produzido por estímulos/comportamentos reforçadores naturais como comida, sexo e interação social. A associação tão rápida entre a substância reforçadora e a resposta de procura à droga, pode refletir as capacidades das substâncias de modularem diretamente estes sistemas reforçadores pré-existentes no cérebro (SELF & NESTLER, 1995). Uma substância pode aumentar a probabilidade de ser auto-administrada, quando o desejado é a presença do estímulo da substância (reforço positivo), ou quando espera-se o alívio ou a eliminação de algum sintoma da síndrome de abstinência (reforço negativo) (KOOB, 1999).

Tolerância e síndrome de abstinência são outros termos relacionados à dependência de drogas. Tolerância representa a diminuição do efeito com a repetida exposição a uma dose constante de uma dada droga, ou a necessidade de um aumento da dose para manter o mesmo efeito (NESTLER, 1992). A tolerância pode desenvolver-se com maior rapidez e intensidade para alguns efeitos de uma droga e não para outros (GRAEFF, 1989). A síndrome de abstinência constitui-se de um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais diretamente relacionadas à repentina retirada (ou redução) da dose de uma substância psicoativa, à qual o organismo tinha sofrido exposição contínua, ou ainda, à

administração de antagonistas (BANBERY, 1998; O'BRIEN, 1996). Sinais da síndrome de abstinência associados com o cessar da administração crônica de um fármaco são comumente caracterizados por respostas opostas às ações iniciais desse fármaco (KOOB, 1999). Para drogas de uma mesma classe farmacológica, a síndrome de abstinência é semelhante, mas existe diferenças entre as classes (BANBERY, 1998).

Mesmo com a dependência de drogas afligindo a humanidade por séculos, ainda não são conhecidos os mecanismos pelos quais determinadas drogas levam à dependência, e nem os fatores genéticos que tornam alguns indivíduos particularmente vulneráveis à dependência (NESTLER et al., 1992). No entanto, sabe-se que as substâncias variam em sua capacidade de produzir sensações reforçadoras imediatas no usuário. Aquelas que provocam sensações agradáveis muito intensas têm maior probabilidade de serem ingeridas repetidamente. Quanto maior a propriedade reforçadora da substância, maior a possibilidade de haver abuso. O potencial de abuso também é influenciado pela velocidade com que o início da ação da substância ocorre, o que facilita ou dificulta a associação entre a ingestão da droga e o reforço. A velocidade para o início da ação depende da farmacocinética e das propriedades físico-químicas da droga (O'BRIEN, 1996; WOLF, 1998a).

As propriedades reforçadoras das substâncias estão associadas à sua capacidade de aumentar os níveis de alguns neurotransmissores em áreas críticas do cérebro. O sistema dopaminérgico mesolímbico é o principal substrato neural do reforço produzido por várias drogas. Ele é constituído de axônios que dirigem-se da área tegmental ventral (do núcleo A10) ao núcleo estriado ventral, núcleo acumbens, hipotálamo e outras regiões que compõem o sistema límbico; todas estas áreas estão envolvidas nos mecanismos subjacentes à auto-administração de drogas (KOOB, 1992, 1999).

## **1.1. EPIDEMIOLOGIA**

O abuso de drogas acentuou-se desde o final dos anos sessenta, e a realidade atual é a existência de um número muito grande de dependentes de drogas com distúrbios importantes, entre os quais inúmeros transtornos psiquiátricos (AHMED et al, 1999; BUCHOLZ, 1999), problemas pessoais e sociais (NESTLER, 1992; PECHANSKY & FUCHS, 1998), e muitas doenças associadas ao uso da droga, como a AIDS e o câncer (JAFFE, 1999; BERGEN & CAPORASO, 1999). As drogas de abuso também geram altos gastos para a sociedade com programas de prevenção, tratamento e reabilitação, e ainda grande fardo ao sistema judicial criminal, incluindo prisões e julgamentos (O'BRIEN, 1997; PECHANSKY & FUCHS, 1998).

No Brasil não existem muitas estatísticas disponíveis sobre o consumo de drogas e os custos sociais decorrentes. Os dados disponíveis são fragmentários e obtidos, em geral em populações ou sobre drogas específicas (BUCHER, 1992). Entre todas as substâncias, o álcool é a que tem merecido maior atenção nas investigações epidemiológicas. Estima-se que a prevalência de alcoolismo seja em torno de 6 a 8% da população com mais de 14 anos (SANTANA & ALMEIDA FILHO, 1990). Em Porto Alegre foi apontada uma prevalência de 15,5% de consumidores de mais de 30 gramas diárias de etanol e de 9,3% de indivíduos com indicadores de dependência ao etanol (MOREIRA et al., 1996).

Os estudantes são a população mais estudada. Segundo o IV levantamento de 1997 sobre uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus, em dez capitais brasileiras, feito pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), a porcentagem de estudantes relatando uso de drogas em geral (exceto tabaco e álcool), variou de 19% em São Paulo até 30% em Porto Alegre. Os solventes foram as substâncias mais usadas, seguida pela maconha e anfetamínicos. Numa comparação feita entre os resultados de

quatro levantamentos realizados entre 1987 e 1997 pelo CEBRID, observa-se que dentre as drogas mais usadas, o uso da cocaína, bem como dos anfetamínicos e da maconha tiveram crescimento significativo (GALDUROZ et al., 1997).

Outra pesquisa realizada na cidade de Porto Alegre por PECHANSKY (1998) entre jovens (10-18 anos), avaliando vários aspectos relacionados ao uso de álcool, mostrou que a prevalência do uso de álcool é alta (71,5%), especialmente entre os mais velhos (94,4%).

Álcool e nicotina geram problemas médico-sociais mais graves do que as drogas ilícitas (GRAEFF, 1999). O custo para a sociedade norte-americana, incluindo os gastos com tratamento da dependência, conseqüências médicas, perda de emprego, crimes e acidentes ligados diretamente ao consumo de drogas foi calculado, no ano de 1992, pelo National Institute on Drug Abuse (NIDA) e National Institutes of Health (NIH), em US\$ 246 bilhões. Destes, US\$ 98 bilhões envolveram drogas ilícitas, sendo o restante (US\$ 148 bilhões) decorrente do uso do álcool etílico e do tabaco (HOLLAND & MUSHINSKI, 1999). Em outro estudo os valores gastos com substâncias de abuso no ano de 1995, nos EUA, foi bem mais alto: total US\$ 428 bilhões, sendo US\$ 176 bilhões com abuso de álcool, US\$ 138 bilhões com tabaco e US\$ 114 bilhões com outras drogas de abuso (RICE, 1999).

No Brasil, os dados disponíveis sobre o custo social do consumo de drogas indicam que os custos diretos e indiretos, decorrentes do consumo de álcool, equivalem a 5,4% do PIB, e do tabaco a 2,2 % do PIB. Estima-se que o custo do uso indevido de outras drogas fica em torno de 0,3% do PIB (BUCHER, 1992).

## **1.2. ABORDAGEM TERAPÊUTICA**

Apesar de muitos anos de pesquisas intensivas, todos os tratamentos disponíveis para tratar dependência de drogas são notoriamente inefetivos (NESTLER, 1992). As

abordagens terapêuticas gerais estão principalmente dirigidas aos usuários compulsivos e fisicamente dependentes, e o planejamento das medidas terapêuticas é orientado pela intensidade do problema. Estas abordagens terapêuticas dividem-se em medidas de desintoxicação, controle do uso compulsivo e tratamento das complicações médicas (PECHANSKY & FUCHS, 1998). A desintoxicação é um processo rápido e de bons resultados no alcance de um estado de afastamento das drogas; usualmente envolve prescrição de fármacos para atenuar sintomas da síndrome de abstinência e aliviar outros problemas conseqüentes da ausência da droga (O'BRIEN, 1997; BANBERY, 1998). Porém, o tratamento da dependência exige meses ou anos para a reabilitação, pois o curso do tratamento ainda caracteriza-se por uma sucessão de fases de abstinência e de recaídas (BISAGA & POPIK, 2000). Isto indica que todos os medicamentos que visam ajudar a evitar as recaídas e a diminuir ou aliviar os sinais e sintomas da síndrome de abstinência revelaram, até o momento, benefícios no máximo modestos (O'BRIEN, 1997; PECHANSKY & FUCHS, 1998, BISAGA & POPIK, 2000).

O êxito do tratamento é avaliado segundo a ocorrência de períodos de abstinência cada vez mais prolongados e recaídas menos freqüentes, mais breves e menos intensas (WOLF, 1998a).

Apesar das aparentes similaridades entre os sintomas psicológicos (dependência e compulsão) produzidos por várias, mas não por todas substâncias de abuso, há tratamentos farmacológicos tradicionalmente usados para sistemas de receptores específicos, nos quais as substâncias de abuso estão provavelmente atuando (POPIK et al., 1995b, O'BRIEN, 1997). Terapia de reposição ou substituição, como, por exemplo, metadona no tratamento da dependência de opióides, embora efetiva enquanto mantida, tem um índice de recaída de 80% quando o tratamento é interrompido (POPIK et al., 1995b; WOLF, 1998a; BISAGA

& POPIK, 2000). O mesmo ocorre nos tratamentos do abuso de estimulantes (cocaína, por exemplo), com compostos que atuam na recaptação de dopamina (POPIK et al., 1995b; WOLF, 1998a). A síndrome de abstinência de benzodiazepínicos, álcool e outros hipnosedativos é tradicionalmente tratada com barbitúricos ou benzodiazepínicos de longa ação (GRAEFF, 1999; BISAGA & POPIK, 2000). A terapia de reposição de nicotina (por via oral ou transcutânea) tem sido eficaz em reduzir os sintomas de abstinência associados à interrupção do hábito de fumar (O'BRIEN, 1997; GRAEFF, 1999; BISAGA & POPIK, 2000).

Outra abordagem envolve o uso de antagonistas farmacológicos (O'BRIEN, 1997). No tratamento da dependência de opióides, o antagonista naltrexona é o mais usado, embora sua aceitação pelos pacientes seja muito limitada (GREENSTEIN et al., 1984). Mais recentemente, naltrexona tem sido usada para tratar alcoolismo, já que o sistema opióide pode estar envolvido na ação reforçadora do álcool (O'BRIEN, 1997). Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina também estão sendo utilizados no tratamento de alcoolistas (GRAEFF, 1999).

Embora álcool, opióides, psicoestimulantes, sedativos e maconha tenham estruturas químicas e sítios de ação diferentes no cérebro, os modelos patológicos da ingestão destas substâncias tem características comportamentais semelhantes. Isto leva a inferir que as substâncias capazes de causar adição exercem sua ação através de vias neurais e de sistemas de neurotransmissores comuns (Di CHIARA et al., 1998). Este substrato comum pode exercer um papel na fisiopatologia de desordens aditivas e pode também ser alvo potencial para tratamentos farmacológicos.

Embora não se conheça exatamente o denominador comum ao mecanismo de adição a diferentes drogas, a neurotransmissão glutamatérgica e os receptores NMDA são

considerados atualmente componentes críticos (TRUJILLO & AKIL, 1991, 1995; BISAGA & POPIK, 2000).

### **1.3. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E O RECEPTOR NMDA**

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Este aminoácido está presente em alta concentração no sistema nervoso e é responsável pela transmissão excitatória rápida, potenciação de longa duração (LTP) e participa centralmente na plasticidade neuronal, funções cognitivas e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (DINGLELINE & MCBAIN, 1994, OZAWA et al, 1998).

No cérebro, o glutamato é sintetizado no terminal nervoso por transaminação, por redução do  $\alpha$ -cetoglutarato (proveniente do ciclo de Krebs e pela ação da glutamato desidrogenase) e por desaminação da glutamina (pela ação da glutaminase). Também pode ser sintetizado por outras vias menos expressivas, a partir na ornitina e prolina (NICHOLS, 1994).

Dentro do terminal nervoso, parte do glutamato é estocado em vesículas sinápticas. Estas captam o glutamato através de transporte ativo obtido por um gradiente eletroquímico de prótons gerado por uma ATP-ase que bombeia prótons para o interior da vesícula (NICHOLLS & ATTWELL, 1990).

Quando um potencial de ação alcança o terminal nervoso, ocorre um influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), através de canais sensíveis à voltagem, promovendo a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática pré-sináptica e subsequente liberação do glutamato na fenda sináptica (NICHOLLS & ATTWELL, 1990).



O glutamato liberado interage com os seus receptores nas membranas pós e pré-sináptica e de células gliais. Na figura 1 pode-se observar um esquema da sinapse glutamatérgica.

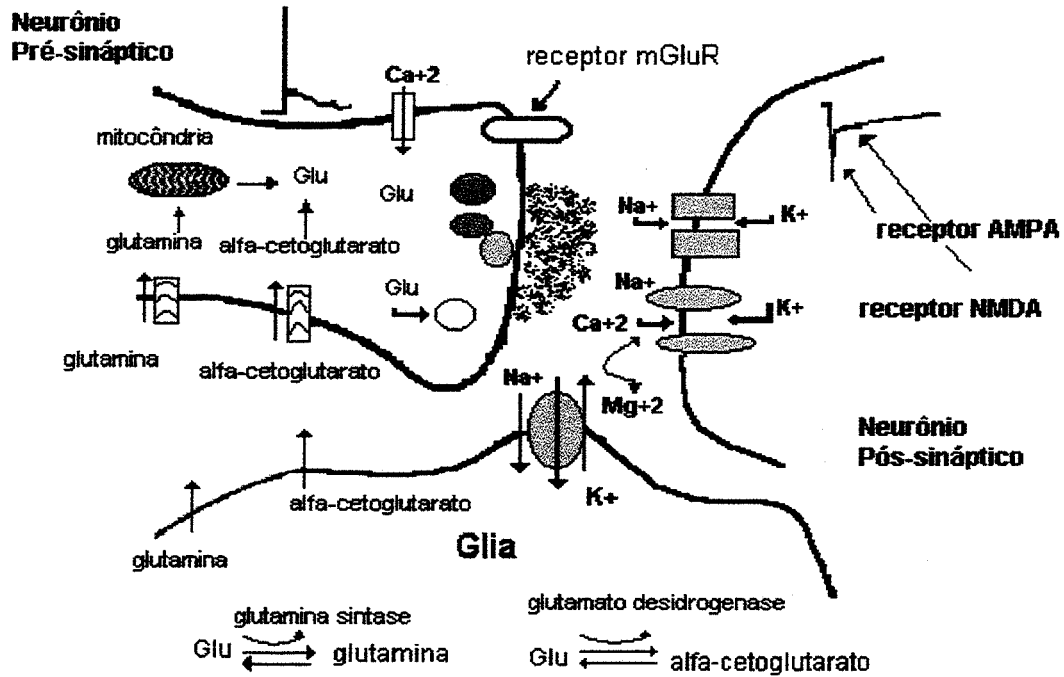


Figura 1: Representação esquemática da sinapse glutamatérgica.

Modificado a partir de DICHTER & WILCOX, 1997.

A neurotransmissão glutamatérgica é mediada por duas classes distintas de receptores, classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e funcionais: os ionotrópicos, que são ligados a canais iônicos [N-Metil-D-Aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) e ácido cáinico (KA)] e os metabotrópicos, que são acoplados a proteínas G e modulam a produção de segundo-mensageiros. São conhecidos oito subtipos de receptores metabotrópicos, classificados em três grupos conforme o mecanismo de transdução de sinal ao qual estão ligados, homologia e farmacologia (COTMAN et al., 1995; OZAWA et al., 1998).

A transmissão é finalizada pela recaptação do glutamato por transportadores  $\text{Na}^+$ -dependentes, de alta afinidade localizados na membrana neuronal (EAAC1, EAAT4 e EAAT5) ou na membrana de células gliais (GLT-1 e GLAST) (ANDERSON & SWANSON, 2000; TANAKA, 2000). A captação de glutamato pelas células gliais é a mais importante para a finalização da transmissão (NICHOLS, 1994; SWANSON et al., 1997; ANDERSON & SWANSON, 2000). O glutamato captado pelas células gliais é convertido em glutamina pela ação da glutamina sintetase, a qual é transportada para os neurônios, onde será convertida a glutamato pela enzima mitocondrial glutaminase (NICHOLS, 1994).

Os receptores NMDA (figura 2) são canais com grande permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e baixa permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (OZAWA et al., 1998). Apresentam vários sítios para ligantes distintos que regulam a abertura do canal: um sítio para glutamato ou NMDA e um sítio para o co-agonista endógeno glicina (insensível à estriknina) – a ligação de duas moléculas de glicina e duas de glutamato são necessárias para a ativação do canal NMDA. Há sítios modulatórios que ligam poliaminas e zinco. Vários antagonistas do receptor NMDA, que atuam em diferentes locais do receptor já foram descritos: antagonistas do sítio de glicina (ácido 5,7-dicloroquinurênico), antagonistas do sítio de poliaminas (ifenprodil) e

antagonistas que se ligam a diferentes sítios dentro do canal, bloqueando a entrada de íons (MK-801, PCP, cetamina, memantina, dextrometorfano, amantadina). Quando a membrana neuronal está em estado de repouso o canal do receptor NMDA apresenta-se bloqueado por  $Mg^{2+}$  (DINGLELINE & MACBAIN, 1994; COTMAN et al., 1995; BLOOM, 1996; OZAWA et al., 1998; DINGLELINE et al., 1999).

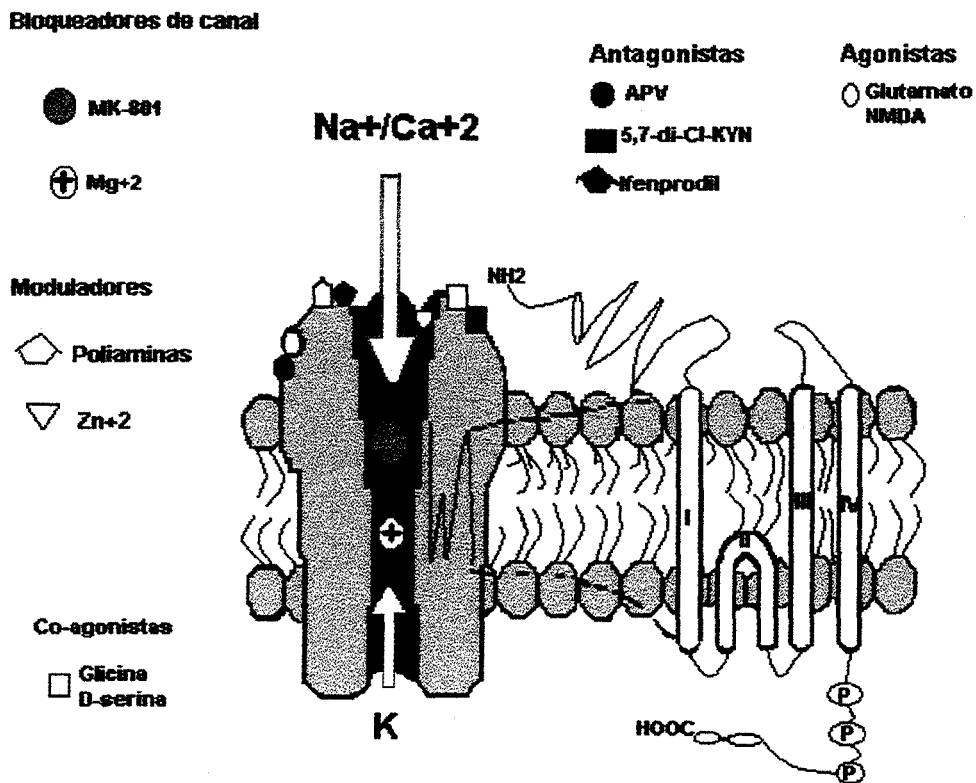


Figura 2 – Representação esquemática do receptor NMDA e seus vários sítios de regulação. Reproduzido de BISAGA & POPIK (2000).

O receptor NMDA exerce um papel crucial nas alterações plásticas associadas com a função normal do cérebro (ex. aprendizado e memória); por outro lado, o complexo mecanismo que controla a plasticidade sináptica no cérebro também introduz pontos de vulnerabilidade para patologias (COTMAN et al., 1995). Neste caso, o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pode ser tóxico para os neurônios, e uma superestimulação do sistema glutamatérgico pode levar a uma excitotoxicidade que pode causar dano ou morte celular (OZAWA et al., 1998, SATTLER & TYMIANSKI, 2000). A excitotoxicidade causada por glutamato pode ser decorrente do aumento da concentração extracelular deste neurotransmissor (por aumento na liberação ou redução da captação neuronal ou, principalmente, glial), levando a uma estimulação excessiva dos seus receptores, em especial os do tipo NMDA (que aumentam a condutância ao cálcio). Porém, cabe ressaltar que a ativação de receptores não-NMDA também pode aumentar direta ou indiretamente o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (OZAWA et al., 1998; SATTLER & TYMIANSKI, 2000; TANAKA, 2000). Uma falha em algum dos pontos de modulação da atividade do receptor NMDA, ou o aumento na concentração de glutamato extracelular, pode contribuir em processos subjacentes a algumas condições patológicas, tais como doenças neurodegenerativas, isquemia, trauma, epilepsia, bem como drogadição (CHOI, 1988; MORRIS, 1989; TRUJILLO & AKIL, 1995; LIPTON & ROSENBERG, 1994; MELDRUM, 1994, 1995; OZAWA et al., 1998; BISAGA & POPIK, 2000). De fato antagonistas de receptores NMDA tem sido explorados como potenciais drogas anticonvulsivantes, neuroprotetoras e antiaditivas, antidepressivas e analgésicas (MELDRUM, 1995, MAO, 1999, BISAGA & POPIK, 2000).

#### **1.4. ANTAGONISTAS NMDA E DROGADIÇÃO**

Antagonistas de receptores NMDA podem interferir com o desenvolvimento, manutenção e expressão do processo fisiopatológico, que se julga ser comum a todas as drogas de abuso, e podem ter potenciais implicações terapêuticas (TRUJILLO & AKIL, 1991; WOLF & KHANSA, 1991; SHOIAB & STOLERMAN, 1992, 1996; KHANNA et al., 1993; PUDIACK & BOZARTH, 1993; FILE & FERNANDES, 1994; POPIK & SKOLNICK, 1996; OH et al., 1997; POPIK & DANYSZ, 1997; TSUDA et al., 1997, 1998a,b,c; WOLF, 1998b; BISAGA & POPIK, 2000). Vários modelos animais de dependência e adição têm sido usados nos estudos que avaliam o potencial de antagonistas de receptor NMDA nas propriedades aditivas de várias drogas.

O modelo de auto-administração de drogas mostra que existe uma relação direta entre as drogas que são auto-administradas pelos animais e aquelas com alto potencial de abuso em humanos (STOLERMAN, 1992; KOOB, 1999).

Vários estudos têm demonstrado que antagonistas NMDA inibem a auto-administração de cocaína (SHENK et al., 1993; PULVIRENTI et al., 1997; SHOIAB et al., 1995; PIERCE et al., 1997) e de morfina (BESPALOV & ZVARTAU, 1996; SEMENOVA et al., 1999); os resultados com auto-administração de álcool são variáveis de acordo com o protocolo usado, porém em alguns trabalhos tem sido mostrado que AP5 (antagonista competitivo de NMDA) diminui a auto-administração de álcool (LIN & HUBBARD, 1995; RASSNICK et al., 1992).

No modelo de preferência condicionada por local, os animais experenciam dois ambientes, um associado ao uso da droga e outro não. É avaliado o tempo que o animal permanece em um dos ambientes. Este paradigma é amplamente usado para acessar as

propriedades de reforço das drogas (STOLERMAN, 1992; KOOB, 1995). Antagonistas NMDA exercem efeitos inibitórios na preferência por local induzida por morfina, cocaína e metanfetamina (TZSCHENTKE & SCHMIDT, 1995; Del POZO et al., 1996; POPIK & KOLASIEWICZ, 1999). No modelo de ativação da locomoção condicionada, foi verificado que antagonistas NMDA também inibem a hiperatividade condicionada induzida por anfetamina e cocaína (STEWART & DRUHAN, 1993; BESPALOV & ZVARTAU, 1996; DAMIANOPOULOS & CAREY, 1995).

Após repetidas administrações, algumas drogas produzem tolerância, correspondendo a mudanças neuroadaptativas que podem estar relacionadas a outras manifestações do uso crônico de drogas, incluindo a dependência física (KOOB, 1995, 1999). O efeito de antagonistas NMDA na tolerância tem sido extensivamente estudado, particularmente com opióides (BISAGA & POPIK, 2000; ELLIOT et al., 1995), e estes estudos tem demonstrado que antagonistas agindo em vários sítios modulatórios no receptor NMDA reduzem o desenvolvimento de tolerância ao(s): efeito analgésico de opióides (TRUJILLO & AKIL, 1991; POPIK & KOZELA, 1999), diazepam (STEPPUHN & TURSKI, 1993; FILE & FERNANDES, 1994), barbitúricos (OH et al., 1997), efeito hipnótico do etanol (KARCZ-KUBICHA & LILJEQUIST, 1995), efeitos cognitivos do etanol (KHANNA et al., 1991, 1993; WU et al., 1993; RAFI-TARI et al., 1996), efeito aversivo da nicotina (SHOIAB & STOLERMAN, 1996).

A dependência física pode ser avaliada através de tratamento crônico com várias drogas de abuso (ex. opióides, álcool e benzodiazepínicos). A síndrome de abstinência que ocorre quando cessa a administração da droga ou através da administração de um antagonista revela se existe dependência. Vários antagonistas de receptores NMDA reverteram a síndrome de abstinência induzida por barbitúricos (OH et al., 1997), etanol

(FIDECKA & LANGWINSKI, 1989; MORRISETT et al., 1990), diazepam (STEPPUHN & TURSKI, 1993; TSUDA et al., 1997, 1998a,b,c), e reduzem a expressão física da síndrome de abstinência de morfina precipitada por naloxona (BRISTOW et al., 1997; GONZÁLEZ et al., 1997; POPIK & DANYSZ, 1997; POPIK & SKOLNICK, 1996; POPIK et al., 1998). Adicionalmente, antagonistas NMDA inibem o desenvolvimento bem como a manutenção da dependência de morfina (TRUJILLO & AKIL, 1991; 1995; POPIK & SKOLNICK, 1996; POPIK et al., 1998).

A sensibilização refere-se a um aumento progressivo do efeito de uma droga, que se desenvolve com repetida administração e persiste após longos períodos de abstinência. É observada tipicamente através de efeitos comportamentais, tais como atividade locomotora e estereotipia (KALIVAS et al., 1992; ROBINSON & BERRIDGE, 1993; WOLF, 1998b). Antagonistas competitivos e não-competitivos de receptores NMDA atenuam os efeitos estimulatórios locomotores e de estereotipia induzida por psicoestimulantes, opióides e nicotina, demonstrando que a neurotransmissão mediada por receptores NMDA está envolvida no desenvolvimento de sensibilização comportamental a estas drogas (WOLF & KHANSA, 1991, SHOIAB & STOLERMAN, 1992; PUDIACK & BOZARTH, 1993; WOLF, 1998b; BISAGA & POPIK, 2000).

Estudos clínicos tem sido desenvolvidos usando antagonistas de receptores NMDA em pacientes dependentes de drogas; entre eles pode-se citar: o dextrometorfano (antagonista não-competitivo), que tem sido testado em pacientes dependentes de opióides (BISAGA et al., 1997; BISAGA & POPIK, 2000); amantadina e memantina (antagonistas não competitivos), usados em pacientes em síndrome de abstinência de cocaína, usuários de cocaína e em compulsão por cocaína (TENNANT & SAGHERIAN, 1987; THOMPSON, 1992; ALTERMAN et al., 1992; COLLINS et al., 1998); acamprosato (seu mecanismo não

é bem claro, modifica a modulação do sítio para poliamina no receptor NMDA), que tem sido usado como adjuvante no tratamento de pacientes alcoolistas (GAR BUTT et al., 1999; POPP & LOVINGER, 2000); cicloserina (em altas doses é antagonista competitivo) e lamotrigina (inibidora da liberação de glutamato e aspartato), os quais tem sido testados em pacientes dependentes de opióides (BISAGA & POPIK, 2000).

Os estudos mostram que algumas destas drogas podem ser úteis no tratamento da dependência de drogas, porém não são conclusivos; alguns mostram, até mesmo, resultados contraditórios. A procura por novas e melhores drogas é, portanto, amplamente justificada.

## 1.5. IBOGAÍNA

### 1.5.1. História

Ibogaína é um alcalóide indólico (figura 3) encontrado nas raízes do arbusto africano *Tabernanthe iboga* (família Apocinaceae). Extratos da raiz de iboga têm uma longa história de uso por nativos do Gabão, principalmente em baixas doses, como um estimulante, para combater fadiga, fome, sede e manter os caçadores acordados; em altas doses é usada em rituais religiosos e de iniciação em algumas sociedades secretas (como o culto do Bwiti), por suas propriedades alucinogênicas (GOUTAREL et al., 1993; LOTSOFF, 1995; POPIK et al., 1995b). Estudos conduzidos na França na primeira metade deste século indicaram que as raízes de iboga tinham propriedades alucinogênicas e estimulantes (POPIK et al., 1995b).

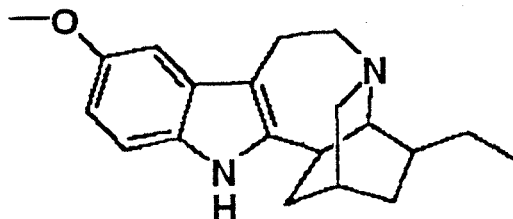


Figura 3: Estrutura química da ibogaína. Modificado a partir de POPIK et al. (1995b)



A espécie *Tabernanthe iboga* foi primeiramente descrita em 1889 por Henri Baillon, no Museu de História Natural de Paris, a partir de uma amostra trazida da África em 1864. Em 1901, o alcalóide foi isolado na sua forma cristalina e teve sua ação inebriante sobre o SNC estudada em cães. Os primeiros estudos farmacológicos na França indicaram ibogaína para o uso clínico, como estimulante na “atonía” cardíaca e neurastenia. Nos anos 40, estudos demonstraram sua ação simpatomimética e inibitória da colinesterase sérica, chegando a ser comercializada na França, em uma preparação farmacêutica denominada Lambèrene® (contendo 8mg de ibogaína por comprimido). Lambèrene® era indicada como estimulante físico e mental, bem como em casos de depressão, convalescença, infecções e astenia (GOUTAREL et al., 1993). Posteriormente, outra preparação contendo 40 mg do extrato total de iboga e 10 mg de *Atropa belladonna* por cápsula, denominada Iperton®, foi comercializada como tônico e estimulante (POPIK et al., 1995b).

Apesar de não ser muito difundida nos EUA, ibogaína apareceu no mercado ilícito de drogas na década de 60, o que fez com que em 1968 o governo federal americano incluísse a ibogaína entre as substâncias análogas ao ácido lisérgico e certos estimulantes do SNC, classificadas como "substâncias capazes de produzir dependência ou prejudicar a saúde humana"; mais tarde esta classificação passou a vigorar também em diversos países da Europa, como França e Bélgica (GOUTAREL et al., 1993). Em 1970 a Food and Drug Administration (FDA) classificou a ibogaína entre as substâncias “Schedule I” (proibido todo uso não científico) (POPIK et al., 1995b).

Paralelamente, no início dos anos 60, o jovem americano Howard Lotsof, participou de uma festa com amigos usuários de drogas, na qual ibogaína foi consumida como alucinógeno. Esta substância despertou um interesse muito maior que o de uma simples diversão, pois Lotsof observou que os amigos que haviam experimentado a nova droga não

sentiram necessidade do uso de heroína, substância da qual eram dependentes, e não apresentaram quaisquer sinais de abstinência. Percebendo o potencial da nova descoberta, Lotsof reuniu toda a documentação disponível sobre iboga e ibogaína e fundou a N.D.A. International Inc., a fim de comercializar cápsulas de cloridrato de ibogaína (sob o nome de Endabuse®) para o tratamento de drogaditos (GOUTAREL et al., 1993). Lotsof obteve, entre 1985 e 1992, cinco patentes para o uso de ibogaína na interrupção da dependência de narcóticos (1985), anfetamina e cocaína (1986), álcool (1989), nicotina (1991) e para dependência de múltiplas drogas (1992) (LOTSOF, 1995). Tais patentes afirmam que uma única dose oral de ibogaína (4 a 25 mg/kg) interrompe a dependência de drogas, permitindo aos pacientes viverem sem droga pelos 6 meses seguintes (GOUTAREL et al., 1993; POPIK et al., 1995b). O tratamento interrompe os aspectos fisiológicos e psicológicos da adição e elimina o desejo de usar drogas; uma série de 4 tratamentos foi citada como sendo efetiva por aproximadamente 3 anos (SISKO, 1993; LOTSOF, 1995).

Segundo Lotsof (1995), a ibogaína não é um substituto para narcóticos ou estimulantes e não vicia: é um interruptor da dependência química. A maioria dos pacientes tratados pelo procedimento patenteado por Lotsof (que inclui administração única de ibogaína) (GOUTAREL et al., 1993) permanece livre da dependência química por um período de 3 a 6 meses, sendo que em aproximadamente 10% dos casos o efeito se estende por 2 anos ou mais. Outros 10 % voltaram ao uso de droga apenas duas semanas após o tratamento. Entre 30% e 35% dos pacientes tratados com sucesso tiveram numerosas experiências mal sucedidas com outros tipos de tratamento (LOTSOF, 1995). Outros estudos mostraram que a terapia com ibogaína resulta em 25% dos pacientes livre das drogas e da compulsão por seis meses, 40-50% são curados com auxílio adicional de psicoterapia, e 20-30% retornam ao uso da droga no mês seguinte ao tratamento (REGAN,

1992 apud POPIK et al., 1995b). Há indicações da eficácia do tratamento de dependência de opióides e cocaína através de estudos pré-clínicos realizados por pesquisadores nos Estados Unidos, Holanda e Canadá (LOTSOF, 1995).

Quanto à eficácia no tratamento da dependência de álcool ou nicotina, não existem estudos conclusivos (de todos os pacientes tratados com ibogaína, apenas um era dependente somente de álcool). Os relatos mostram que em muitos destes casos a ingestão de álcool diminuiu ou cessou. Todos os pacientes dependentes de nicotina também eram dependentes de outras drogas, e não existem relatos relacionando especificamente o abandono do uso de nicotina por estes pacientes (LOTSOF, 1995).

## **1.5.2. Ações Farmacológicas da Ibogaína**

### **1.5.2.1. Estudos em Animais**

Evidências de efetividade de ibogaína (2,5-40 mg/kg) em modelos animais de adição incluem observações de redução da auto-administração de: morfina em ratos (GLICK et al., 1991, 1992, 1994, 1996; DWORKIN et al., 1995) (em alguns animais este efeito foi observado por vários dias) (GLICK et al., 1991), cocaína em ratos (CAPPENDIJK & DZOLJIC 1993; GLICK et al., 1992, 1996) e camundongos (SERSHEN et al., 1994), e álcool em ratos (REZVANI et al., 1995). O pré-tratamento com ibogaína inibiu a estimulação locomotora induzida por morfina (MAISONNEUVE et al., 1992b), nicotina (MAISONNEUVE et al., 1997a) e cocaína em camundongos (SERSHEN et al., 1992b). No entanto, em ratos, os efeitos são contraditórios (bloqueio ou aumento da estimulação locomotora induzida por cocaína), tanto em ratos tratados aguda quanto cronicamente com cocaína (MAISONNEUVE & GLICK, 1992; BRODERICK et al., 1994; POPIK et al., 1995b; SZUMLINSKI et al., 1999a,b). Efeitos opostos de ibogaína também têm sido

relatados para atividade locomotora induzida por d- anfetamina ou metanfetamina: inibição da atividade locomotora em camundongos (SERSHEN et al., 1992a) e ratos (BLACKBURN & SZUMLINSKI, 1997, SZUMLINSKI et al., 2000a) ou estimulação da atividade em ratos (MAISONNEUVE et al., 1992a; SERSHEN et al., 1992a).

Ibogáina (40-80 mg/kg, ip ou 4-16 µg/kg, icv) atenuou a síndrome de abstinência de morfina precipitada por naloxona ou naltrexona em camundongos, ratos (DZOLJIC et al., 1988; GLICK et al., 1992; CAPPENDIJK et al., 1994; POPIK et al., 1995a) e macacos (ACETO et al., 1990). Contudo estes resultados não foram replicados em ratos (SHARPE & JAFFE, 1990) ou camundongos (FRANCES et al., 1992).

Ibogáina (40 mg/kg) atenuou a preferência por lugar induzida por anfetamina (MOROZ et al., 1997). Contudo, em relação à morfina, há relatos de atenuação da preferência por lugar induzida por morfina (PARKER et al., 1995) ou ausência de efeito da ibogáina quanto a este parâmetro (LUXTON et al., 1996). Ibogáina per se não possui propriedades reforçadoras ou aversivas, e não afeta a preferência por lugar motivada por outras drogas que não são reforçadoras.

Tremores no corpo e cabeça, caracteristicamente produzidos por estimulação serotoninérgica, ocorrem em ratos após a administração de ibogáina (SLOVITER et al., 1980). Em um estudo comparativo entre o efeito estimulante de ibogáina e 2,5-dimetóxi- 4-metilanfetamina (DOM, uma droga altamente seletiva para receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2</sub>), ioimbina (estruturalmente semelhante à ibogáina) e dietilamida do ácido lisérgico (LSD- um composto indólico agonista serotoninérgico não específico) foi mostrado que o efeito estimulante de ibogáina é muito similar àquele produzido pelo LSD (PALUMBO & WINTER, 1992).

Estudos comportamentais em gatos e cães também foram feitos. Após administração

intravenosa de ibogaína (2-10 mg/kg), os animais apresentaram excitação, dilatação da pupila, piloereção e tremor. Este estado dura entre 1-2 horas. Em cães, a ibogaína causa um aumento na pressão sanguínea e um aumento na frequência cardíaca (POPIK et al., 1995b).

### **1.5.2.2. Ações farmacológicas em Humanos**

Várias ações psicotrópicas da ibogaína foram relatadas. Estas ações são dependentes da dose. Altas doses do extrato bruto de *Tabernanthe iboga* causa excitação, sensação de embriaguez, confusão mental e alucinações. O extrato total de iboga é um estimulante central e em altas doses pode levar a convulsões e parada respiratória. Os efeitos cardiovasculares incluem alterações na pressão sanguínea e potenciação na resposta pressora da adrenalina. As ações do extrato bruto, que inclui outros alcalóides, podem ser diferentes daquelas da ibogaína (POPIK et al., 1995b)

Referências às propriedades alucinógenas da ibogaína, em rituais de iniciação, na África, nos quais grande quantidade das raízes eram mastigadas, indicam que o pico dos efeitos ocorre cerca de 2 horas após a administração da droga, não sendo relatados efeitos subseqüentes como exaustão ou depressão (GOUTAREL et al., 1993; POPIK et al., 1995b). Por apresentar atividade psicoativa, foi explorada a possibilidade do uso deste alcalóide para facilitar a psicoterapia. Cláudio Naranjo, um psicoterapeuta chileno, observou 40 sessões utilizando ibogaína (4-5 mg/kg) em 30 pacientes e relatou que “o estado psíquico assim induzido pode ser descrito como um estado semelhante a um sonho sem perda de consciência” (GOUTAREL et al., 1993).

Os efeitos do tratamento com ibogaína são observados em três etapas distintas: efeitos agudos, intermediários e a longo prazo (LOTSOF, 1995). Os efeitos agudos observados durante o tratamento são divididos em três estágios (GOUTAREL et al., 1993):

as primeiras reações são usualmente notadas dentro de 20 a 45 minutos após a administração oral, sendo que a primeira indicação dos efeitos da ibogaína é o relato de insensibilidade da pele, presença de zumbidos e oscilações sonoras, e a percepção de que os objetos parecem vibrar intensamente. O paciente tenta manter-se deitado, e quando tenta andar, apresenta sinais de ataxia, náuseas e vômito. Os efeitos totais são notados dentro de duas a duas horas e meia após ingestão via oral. Um dos principais efeitos durante esta primeira fase é a produção de um estado que simula um sonho, com o paciente acordado e preservada a capacidade de responder a questionamentos que lhe sejam feitos. Normalmente não sentem vontade de falar, preferindo dar atenção às visões que estão experimentando (LOTSOF, 1995). Estas visões são como um “flash back”: situações importantes da vida, da infância são vistas como num filme passando em alta velocidade (GOUTAREL et al, 1993; LOTSOF, 1995; POPIK et al.1995b), com as primeiras visões aparecendo uma hora após a administração da ibogaína. O segundo estágio é chamado de fase cognitiva, porque o paciente faz uma avaliação de suas experiências passadas, revividas através das visões. Esta fase ocorre logo após a etapa das visões que, geralmente acaba abruptamente dentro de 3-5 horas. Referindo-se às visões que ocorrem durante o tratamento com ibogaína, a Dra. Debora Mash (Universidade de Miami) diz: “existem profundas experiências associadas com ibogaína que podem ser transformadoras da vida” (MORRIS, 1999). Esta avaliação parece levar o paciente a modificar seu comportamento e interromper o uso das drogas (GOUTAREL et al., 1993). Já nesta etapa percebe-se uma atenuação dos sintomas da síndrome de abstinência (LOTSOF, 1995). No terceiro estágio, o indivíduo permanece acordado por mais de 20 horas, dorme por um curto período (cerca de duas horas) e acorda em ótima forma e sentindo não necessitar mais de drogas (GOUTAREL et al., 1993). Há uma interrupção da compulsão pela droga à qual o paciente

é dependente, este efeito é percebido pelo paciente cerca de 48-72 horas após a administração da ibogaína; contudo, o terapeuta normalmente percebe a ausência da compulsão entre 45 min à 1 hora e meia após a administração da ibogaína (LOTSOF, 1995).

Pode-se dizer que ibogaína induz à liberação de memórias reprimidas, e que a reavaliação intelectual das memórias eventualmente leva a integração de novas idéias à personalidade e conduta do paciente (REGAN, 1992 apud POPIK et al., 1995b). Embora a eficácia clínica ainda não tenha sido rigorosamente avaliada, o interesse na pesquisa de ibogaína no tratamento da drogadição têm crescido nos últimos anos, gerando estudos clínicos sobre segurança e eficácia (POPIK et al., 1995b).

SHEPPARD (1994) documentou os efeitos a longo prazo de ibogaína no consumo de opióides, nas semanas e meses subseqüentes à administração de ibogaína a 7 dependentes de heroína. Foi administrada uma única dose, que variou de 700-1800 mg de ibogaína; ao final de 24-38 horas, nenhum dos pacientes apresentou sinais significativos de síndrome de abstinência. Apenas um deles parou completamente com o uso de heroína; outros 3 permaneceram sem usar a droga por 14 ou mais semanas após o tratamento; os três restantes tiveram recaídas dentro de 2 dias a poucas semanas pós-tratamento.

Apesar das evidências clínicas, os mecanismos pelos quais a ibogaína interfere na dependência e síndrome de abstinência de drogas ainda não foram esclarecidos.

### **1.5.2.3. Farmacocinética da Ibogaína**

Os relatos dos efeitos a longo prazo de ibogaína em humanos após uma única dose, juntamente com os efeitos persistentes em modelos de autoadministração em animais, sugeriram que ibogaína pudesse ter um metabólito ativo com uma meia-vida mais longa, já que a meia-vida de ibogaína é cerca de 1 hora, em ratos, e fica indetectável dentro de 12

horas (DHAHIR et al., 1971; GLICK et al., 1991; POPIK et al., 1995b). Foi identificado um único metabólito primário em amostras de sangue de ratos, primatas e humanos (HEARN et al, 1995, MASH et al, 1995), a 12-hidroxiibogamina (noribogaína). Mais recentemente foi caracterizada a formação deste metabólito no fígado, através do sistema microsomal, pelo citocromo P4502D6 (OBACH et al, 1998).

As concentrações de ibogaína detectadas no cérebro, sangue e outros tecidos de roedores, variam muito entre os estudos de acordo com o método utilizado. Na tabela 1 pode-se observar alguns destes resultados.

Tabela 1: Concentrações de ibogaína em vários tecidos corporais

Animal	Dose (via de adm)	Tempo após administração	Tecido analisado	Concentração encontrada	Referência
Camundongo	10mg/kg (iv)	10 s	Cérebro	~ 133 $\mu$ M	Zetler et al., 1972
Rata	40 mg/kg (ip)	1h 19 h	Cérebro	3,26 $\mu$ g/g 0,19 $\mu$ g/g	Gallagher et al., 1995
Rata	40 mg/kg (ip)	1h 12h	Cérebro	10 $\mu$ M 0,2 $\mu$ M	Hough et al., 1996
Rata	40 mg/kg (ip)	1h 12h	Tecido adiposo	20 $\mu$ M 0,8 $\mu$ M	Hough et al., 1996
Rata	40mg/kg (sc)	1h 12h	Cérebro	40 $\mu$ M 2 $\mu$ M	Hough et al., 1996
Rata	40mg/kg (sc)	1h 12h	Tecido adiposo	50 $\mu$ M 5 $\mu$ M	Hough et al., 1996
Rato	50mg/kg (oral)		Cérebro	Faixa de 4 – 17 $\mu$ M	Staley et al., 1996
Rato	40 mg/kg (ip)	1h 5h 19h	Cérebro	6 $\mu$ M 0,9 $\mu$ M 0,2 $\mu$ M	Pearl et al., 1997
Rata	40 mg/kg (ip)	1h 5h 19h	Cérebro	10 $\mu$ M 1 $\mu$ M 0,7 $\mu$ M	Pearl et al., 1997



Pode-se notar que existem diferenças nas concentrações encontradas entre sexo, quando o tratamento e a espécie animal foram as mesmas (PEARL et al., 1997). De acordo com os estudos de HOUGH et al. (1996, 2000) a ibogaína se deposita no tecido adiposo; isto está de acordo com a natureza lipofílica desta droga e este seqüestro no tecido adiposo tem sido sugerido como uma das causas da longa duração de ação desta droga. Também foi observado que ibogaína sofre metabolismo de primeira passagem já que as concentrações encontradas após administração por via intraperitoneal são bem menores do que aquelas encontradas por via subcutânea, quando comparadas nos mesmos tempos.

Algumas medidas farmacocinéticas tem sido obtidas após uma única dose de ibogaína em humanos (em pacientes voluntários). Com a administração de 600 e 800 mg/kg de ibogaína a dois pacientes do sexo masculino, o pico da concentração da droga na corrente sanguínea ocorreu após quatro horas; foram encontradas concentrações de 600 e 1250 ng/ml respectivamente. O tempo requerido para a eliminação (>90%) de ibogaína foi de 24 h. A concentração do metabólito, noribogaína, ainda permanecia alta (na faixa de 800 ng/ml) 24 h após a administração. Uma paciente dependente de opióide, tratada com uma única dose oral de 500 mg/kg de ibogaína teve níveis muito baixos de ibogaína no sangue; entretanto, o nível de metabólito foi comparável àquele visto nos pacientes do sexo masculino, que receberam altas doses (MASH et al., 1998). Estes resultados já tinham sido previamente observados em roedores, onde a concentração de noribogaína em ratas foi maior no cérebro e no sangue 1, 5 e 19 horas após a administração quando comparada aos ratos com o mesmo tratamento (PEARL et al., 1997).

Vários estudos em animais têm sido feitos com noribogaína, a fim de determinar o seu perfil farmacológico. Foi encontrado que noribogaína (40 mg/kg, ip), de maneira semelhante à ibogaína (40 mg/kg, ip), diminui a auto-administração de morfina e cocaína,

reduz o efeito estimulante locomotor de morfina e diminui os níveis extracelulares de dopamina no núcleo acumbens e estriado de ratos. Contudo, diferente de ibogaína, noribogaína não induziu tremores (GLICK et al., 1996).

#### **1.5.2.4. Ação de Ibogaína na Neurotransmissão Central**

Além dos estudos comportamentais, o perfil farmacológico de ibogaína tem também sido estudado através de ensaios de ligação com neuroreceptores. Estes estudos mostraram que ibogaína age, com diferentes afinidades, sobre vários sistemas de neurotransmissores. Na tabela 2 pode-se observar as múltiplas propriedades da ibogaína no SNC.

Tabela 2: Sítios e mecanismos de ação de ibogaína no sistema nervoso central

Sistema Neurotransmissor	Mecanismo	Referência
Colinérgico	Inibidor não competitivo de receptor nicotínico, inibidor de liberação de catecolaminas mediada por receptor nicotínico	Benwel et al., 1996; Schneider et al., 1996; Badio et al., 1997; Maisonneuve et al., 1997a; Mah et al., 1998; Fryer & Lukas, 1999
Glutamatérgico	Antagonista de receptor NMDA	Popik et al., 1994, 1995a; Mash et al., 1995; Chen et al., 1996; Staley et al., 1996; Sweetnam et al., 1995; Itzhak & Ali, 1998
Opióide	Agonista de receptor $\kappa$ Agonista de receptor $\mu$	Deecher et al., 1992; Pearl et al., 1995b; Sweetnam et al., 1995
Sigma	Agonista de receptor $\sigma_2$	Bowen et al., 1995; Mach et al., 1995
Dopaminérgico	Inibidor de transportador	Mash et al., 1995; Staley et al., 1996; Wells et al., 1999
Serotoninérgico	Inibidor de transportador	Mash et al., 1995; Staley et al., 1996

A maioria dos estudos citados na tabela 2 foram feitos em tecidos cerebrais de roedores; entretanto, foi utilizado também tecido de cérebro humano (MASH et al., 1995) nos estudos do efeito de ibogaína no receptor NMDA.

O metabólito de ibogaína, noribogaína, também foi avaliado em alguns destes sistemas. Foi demonstrado que noribogaína tem uma afinidade maior por receptores  $\mu$  e  $\kappa$ -opióide do que aquela vista com ibogaína (STALEY et al., 1996; PEARL et al., 1995a; GLICK & MAISONNEUVE, 1998; PABLO & MASH, 1998), no sistema glutamatérgico teve uma afinidade menor pelo receptor NMDA (MASH et al., 1995; LAYER et al., 1996) e na ligação ao transportador de dopamina e serotonina, noribogaína apresentou afinidade semelhante à ibogaína (STALEY et al., 1996; GLICK & MAISONNEUVE, 1998).

Como visto anteriormente, o sistema dopaminérgico tem sido implicado nas propriedades reforçadoras de várias drogas de abuso. A administração aguda de várias drogas de abuso aumentam os níveis de dopamina extracelular no núcleo acumbens e em menor quantidade no estriado (DI CHIARA & IMPERATO, 1988). Também tem sido mostrado que anfetamina e cocaína podem aumentar o nível extracelular de dopamina no córtex pré-frontal (MAISONNEUVE et al., 1990). O mecanismo pelo qual estas drogas aumentam os níveis de dopamina difere para cada droga: anfetamina aumenta principalmente a liberação de dopamina, cocaína bloqueia a recaptção de dopamina, morfina, nicotina e etanol aumentam o disparo neuronal dopaminérgico (DI CHIARA & IMPERATO, 1988). Entretanto o efeito de ibogaína no sistema dopaminérgico não é claro. Muitos estudos tem mostrado que ibogaína pode aumentar (MAISONNEUVE & GLICK; 1992; MAISONNEUVE et al., 1992; GLICK et al., 1993), diminuir (PEARL et al., 1995b, 1996) ou não afetar (SERSHEN et al., 1995, FRENCH et al., 1996, SZUMLINSKI et al., 2000b) a estimulação da liberação de dopamina induzida por cocaína, anfetamina ou

morfina.

Outros estudos tem demonstrado que ibogaína “per se” pode alterar a liberação de dopamina: em altas doses, aumenta e em baixas doses diminui os níveis de dopamina (ALI et al., 1996; REID et al., 1996; BAUMANN et al., 1998, 2000). Porém, FRENCH et al. (1996), mostraram que ibogaína não alterou a atividade espontânea de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral. O efeito de ibogaína nos níveis de metabólitos da dopamina, também é controverso. Foi mostrado que ibogaína deprime os níveis dos metabólitos 3,4-ácido dihidróxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) em certas áreas do cérebro por mais de 19 horas após a administração (MAISONNEUVE et al., 1991) ou aumenta estes metabólitos no estriado, bulbo olfatório e hipotálamo de ratos (BAUMANN et al., 1998, 2000). A Ibogaína não tem ação direta em receptores dopaminérgicos (D1 e D2). Quanto ao transporte de dopamina, BRODERICK et al., 1992 Apud POPIK et al., 1995 mostraram que a ibogaína não altera a captação de dopamina em sinaptossomas, enquanto WELLS et al. (1999) mostraram que ibogaína inibe o transporte de dopamina no cérebro, porém numa concentração micromolar, onde já há afinidade por outros sistemas de neurotransmissores. Neste caso, se o efeito antiaditivo de ibogaína ocorre nesta faixa de concentração, este efeito pode ser devido à ação em vários sistemas de neurotransmissores, não só no sistema dopaminérgico.

A semelhança estrutural entre ibogaína e LSD, gerou vários estudos do efeito de ibogaína no sistema serotoninérgico. Os resultados dos estudos de união específica de ibogaína com receptores serotoninérgicos são contraditórios: alguns autores relataram afinidade (SWEETNAM et al., 1995) e outros não encontraram afinidade alguma de ibogaína por receptores serotoninérgicos (DEECHER et al., 1992; STALEY et al., 1996). Os resultados de estudos de discriminação de drogas com LSD e outros agonistas

serotoninérgicos, também têm sido conflitantes (PALUMBO & WINTER, 1992; SCHECHTER & GORDON, 1993; HELSLEY et al., 1997b, 1998 b,c, 1999; WINTER et al., 1999), mas a maioria demonstra que pode existir uma generalização parcial entre ibogaína e LSD ou outros agonistas serotoninérgicos.

A ibogaína aumenta os níveis de serotonina no núcleo acumbens e estriado. Foi sugerido que ibogaína pode inibir a recaptação e estimular a liberação de serotonina (WEI et al., 1998). O efeito de ibogaína no aumento dos níveis extracelulares de serotonina parece ser transitório (dura em torno de 3 horas). Embora ALI et al. (1996) tenham encontrado uma diminuição dos níveis de serotonina no estriado, 1 h após a administração de ibogaína, foi sugerido que efeitos a curto prazo de ibogaína, tais como a diminuição na ingestão de álcool e o efeito alucinógeno, manifestados nas primeiras horas após o tratamento com ibogaína em humanos, possa ser mediado por este aumento de serotonina (GLICK & MAISONNEUVE, 1998; WEI et al., 1998).

A ibogaína diminui os níveis do principal metabólito de serotonina, ácido-5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no córtex cerebral, hipocampo e bulbo olfatório de camundongos (SERSHEN et al., 1992b; ALI et al., 1996).

No sistema opióide, a noribogaína teve maior afinidade pelos receptores  $\mu$  e  $\kappa$  opióide do que a ibogaína. Tem sido sugerido que o metabólito possa estar mais diretamente relacionado à inibição da síndrome de abstinência e auto-administração de morfina, já que noribogaína estimulou a união específica de guanilil 5'- $\gamma$ -[<sup>35</sup>S]tio]-trifosfato ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S), demonstrando que o metabólito funciona como agonista de receptor  $\mu$  (PABLO & MASH, 1998). Vários estudos tem avaliado o efeito de ibogaína e noribogaína (destituídos de atividade analgésica) (ACETO et al., 1990; CAO & BHARGAVA, 1997) na ação antinociceptiva de morfina e outros agonistas de receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , em

camundongos. Tem sido demonstrado que ibogaína e noribogaína aumentam a antinocicepção induzida por morfina (BAGAL et al., 1996), mas não modificou o efeito antinociceptivo de agonistas de receptores  $\kappa$  e  $\delta$  (BHARGAVA et al., 1997). Em estudos de tolerância ao efeito antinociceptivo de morfina em camundongos, foi mostrado que tanto ibogaína quanto noribogaína atenuam tolerância ao efeito antinociceptivo induzida por morfina em camundongos (BHARGAVA & CAO, 1997; SHARMA & BHARGAVA, 1998) e que este efeito é seletivamente mediado por receptores  $\mu$ -opióide (CAO & BHARGAVA, 1997). Levando-se em consideração que doses menores de noribogaína em relação à ibogaína são eficazes no bloqueio da tolerância à morfina, sugeriu-se que o efeito de ibogaína possa ser mediado pela conversão ao metabólito (BHARGAVA & CAO, 1997). Também tem sido especulado que o efeito de ibogaína na síndrome de abstinência de opióide não esteja relacionado com sua ação em receptores opióides, mas sim por potenciar os efeitos intracelulares da morfina. Esta hipótese é baseada nos resultados obtidos em experimentos que determinam a atividade da enzima adenilato ciclase: quando se adiciona à preparação somente ibogaína ou noribogaína a atividade da enzima não é afetada, mas a adição de ambos compostos aumenta significativamente a inibição da atividade da enzima. Esta potenciação foi observada quando a atividade da adenilato ciclase foi inibida por morfina e também por serotonina (RABIN & WINTER, 1996).

A propriedade da ibogaína de inibir o receptor colinérgico nicotínico e a consequente inibição da liberação de catecolaminas tem sido considerada relevante, principalmente no que se refere ao efeito antiaditivo e a possibilidade de inibir o reforço produzido pela nicotina (BADIO et al., 1997; BENWELL et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1996; MAISONNEUVE et al., 1997a; MAH et al., 1998; FRYER & LUKAS, 1999).

Tem merecido especial atenção a propriedade de ibogaína em atuar como

antagonista glutamatérgico e as implicações disso para suas propriedades antiaditivas. Foi demonstrado que ibogaína é um inibidor competitivo da união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 e [<sup>3</sup>H]TCP ao receptor NMDA (POPIK et al., 1994, 1995a; MASH et al., 1995; SWEETNAN et al., 1996; STALEY et al., 1996; ITZHAK & ALI, 1998). Também tem sido demonstrado que ibogaína não se liga em outros sítios do receptor NMDA, nem em receptores glutamatérgicos não-NMDA (ITZHAK & ALI, 1998). Vários estudos tem indicado a similaridade do efeito entre a ibogaína e os antagonistas não-competitivos de receptor NMDA. Em um modelo de discriminação de drogas em ratos, ibogaína (DE<sub>50</sub> 64,9 mg/kg) substituiu MK-801 como um estímulo discriminativo (POPIK et al., 1995a). Ibogaína (100 mg/kg) inibiu 75% das convulsões induzidas por NMDA (GETER-DOUGLASS & WITKIN, 1999) e bloqueou parcialmente a letalidade induzida por NMDA (CHEN et al. 1996). Ibogaína inibe a síndrome de abstinência precipitada por naloxona em camundongos dependentes de morfina, e esta inibição é revertida por glicina (POPIK et al., 1995a). Além disso, a ibogaína bloqueia a morte celular induzida por glutamato em culturas de neurônios (POPIK et al., 1995a). Adicionalmente foi demonstrado que a ibogaína bloqueia a despolarização induzida por NMDA em neurônios motores isolados da medula espinhal de rãs (MASH et al., 1995). Através de estudos eletrofisiológicos, em culturas de neurônios hipocámpais de ratos, foi demonstrado que a ibogaína produz um bloqueio da corrente mediada por receptores NMDA (POPIK et al., 1995a; CHEN et al., 1996). Alguns estudos comparativos entre os efeitos de ibogaína e MK-801 na transmissão dopaminérgica e na secreção de corticosterona e prolactina não tem demonstrado um mimetismo entre estas duas drogas. Ibogaína provocou inibição dos níveis de dopamina e aumento dos metabólitos DOPAC e HVA no estriado, bulbo olfatório e hipotálamo de ratos, enquanto MK-801 aumentou discretamente o nível de dopamina e metabólitos

somente em algumas regiões. Quanto ao efeito neuroendócrino, tanto MK-801 quanto ibogaína aumentaram a secreção de corticosterona, mas somente ibogaína aumentou a secreção de prolactina no plasma de ratos (BAUMANN et al., 1998, 2000).

O fato de ibogaína inibir a união específica de [<sup>3</sup>H]TCP (um análogo da fenciclidina) levou à hipótese de que os efeitos de ibogaína semelhantes a fenciclidina (tais como alucinações) possa estar relacionado com esta propriedade. Porém, alguns estudos de discriminação de drogas mostraram que ibogaína não substituiu fenciclidina como estímulo discriminativo, dissociando os efeitos comportamentais agudos de ibogaína da ligação ao sítio de fenciclidina no receptor NMDA (HELSLEY et al., 1998a; JONES et al., 1998).

A administração aguda de ibogaína induziu a expressão dos genes *egr-1* e *c-fos* no cérebro de camundongos. Tem sido especulado que este efeito pode ser consequência do bloqueio de receptores NMDA (ALI et al., 1999).

Embora todos os mecanismos propostos até hoje mereçam investigações adicionais, acredita-se que o perfil farmacológico de ibogaína (incluindo o seu putativo efeito anidiaditivo) é provavelmente resultado da interação com múltiplos locais de ação (POPIK et al., 1995b; SWEETNAM et al., 1995; STALEY et al., 1996; MASH et al., 1998; GLICK & MAISONNEUVE, 1998)

#### **1.5.2.5. Ibogaína e Neurotoxicidade**

Tem sido demonstrado que a ibogaína não precipita sinais de síndrome de abstinência ou causa dependência (ACETO et al., 1990). Porém, desde que O'HEARN et al. (1993, 1995) mostraram que a ibogaína (100 mg/kg ou 3 doses de 100 mg/kg) causa degeneração de células de Purkinje no cerebelo de ratos, vários estudos têm sido conduzidos para avaliar a neurotoxicidade deste composto. Além disso, O'HEARN &



MOLLIVER (1997) sugeriram que a ativação de neurônios do complexo olivar inferior levam à liberação de glutamato nos terminais das fibras trepadeiras distribuídas na superfície das células de Purkinje; esta liberação excessiva de glutamato é que provocaria a morte destas células.

O'CALLAGHAN et al. (1996) avaliaram o efeito de ibogaína administrada aguda (50, 100 ou 150 mg/kg, ip – 1 vez ao dia/3 dias) e cronicamente (25, 75 ou 150 mg/kg, via oral – 1 vez ao dia/14 dias) em ratos machos e fêmeas. Os resultados mostraram que a administração de ibogaína causou astrogliose dose-dependente e que este efeito se estendeu por outras áreas do cérebro além do verme cerebelar. Após o tratamento agudo, a astrogliose foi verificada tanto em fêmeas quanto em machos; porém, após o tratamento crônico, a astrogliose foi 200 vezes maior nas fêmeas do que nos machos, demonstrando que este efeito, além de dependente da dose, também é dependente do sexo. O efeito neurotóxico de ibogaína parece ser também dependente da espécie avaliada: SCALLET et al. (1996) mostraram que após o tratamento com ibogaína (100 mg/kg) foi observada neurotoxicidade apenas nos ratos, e não em camundongos. Estudos em primatas não mostraram dano neuropatológico, após a administração por 5 dias de ibogaína (25 mg/kg, via oral ou 100mg/kg, sc ) (MASH et al., 1998).

Doses menores de ibogaína (40 mg/kg), mais relacionadas com o efeito antiaditivo em roedores, também foram testadas em ratos e os resultados mostraram que nesta dose ibogaína não causa degeneração de células de Purkinje no cerebelo. Os autores sugerem que não existe relação entre as propriedades neurodegenerativas e antiaditivas da ibogaína (MOLINARI et al., 1996). Confirmando estes resultados XU et al. (2000) não encontraram degeneração de células de Purkinje ou astrogliose em ratos tratados com ibogaína (25 ou 50 mg/kg, ip- administração única), mas confirmaram o efeito neurotóxico nas doses de 75 e

100 mg/kg. Em um tratamento crônico com ibogaína (10 mg/kg, ip- por 60 dias) em ratos não foi observada degeneração de células de Purkinje (HELSLEY et al., 1997a).

Em humanos existem dados sobre a avaliação da toxicidade de ibogaína através de acompanhamento de pacientes tratados sob condições controladas. Três pacientes dependentes de cocaína (intranasal, intravenosa ou crack), dois deles também dependentes de álcool e um de heroína, foram tratados com cápsula de cloridrato de ibogaína (20-25 mg/kg), no Centro Médico Paitilla, no Panamá. O monitoramento dos pacientes incluiu exame médico e psiquiátrico, bem como exames laboratoriais, eletroencefalograma (EEG-exame intermitente, durante 24 h) e eletrocardiograma (ECG). Na avaliação neurológica foi detectada uma disfunção cerebelar em todos os pacientes dentro de 2 horas, a qual foi expressa como nistágmo, tremor sem dismetria e ataxia, podendo ocorrer náusea induzida pelo movimento e vômito. Os sinais diminuíram, mas permaneceram até 8 horas após o tratamento. Não foram observados sintomas de ansiedade. O EEG e o ECG foram normais e nenhuma anormalidade médica foi observada durante e após o tratamento. Após 24 h todos os exames neurológicos foram normais e os pacientes não apresentaram sinais de abstinência ou compulsão (LUCIANO, 1998).

Em outros relatos de monitoramento clínico de 30 pacientes dependentes de drogas e tratados com ibogaína (500, 600 ou 800 mg), também não foram verificadas alterações importantes, com exceção de náuseas e tremor logo após a administração (MASH et al., 1998).

Existem relatos de morte de algumas pacientes tratadas com ibogaína. Na Holanda, faleceu uma paciente que estava em tratamento para dependência química; a causa da morte não foi determinada, e os níveis de ibogaína encontrados no sangue (0,75 mg/l) não tem sido relacionados com concentrações tóxicas em animais e/ou humanos (ALPER et al.,

1999). Na Europa, ocorreu a morte de uma paciente suíça que recebeu ibogaína numa sessão de psicoterapia (LOTSOF, 1995). Mais recentemente, em um Hospital do Panamá, ocorreu a morte de uma paciente que estava sob tratamento com ibogaína. Antes de começar o tratamento a paciente teve um diagnóstico que, segundo MASH et al. (1998) incluía: “dependência para opióides e cocaína; amenorréia há 11 meses; história de asma; úlcera péptica e hipertensão. A paciente recebeu 4 doses de ibogaína (entre 10 e 30 mg/kg) num período de 15 meses. O quadro clínico da paciente revelava uma hipercoagulação generalizada, levando a um processo trombótico resultando na oclusão da artéria mesentérica e morte. Este processo foi associado a um provável quadro infeccioso”. Embora tenha sido demonstrado que a morte da paciente não estava necessariamente relacionada ao uso de ibogaína, este fato associado aos relatos das outras mortes e somado à possibilidade de ibogaína causar toxicidade cerebelar, fazem com que exista uma grande preocupação por parte da FDA e do NIDA (EUA), quanto à possível introdução de ibogaína na terapêutica. Por conta destes relatos a FDA excluiu as mulheres de testes clínicos que seriam feitos na Universidade de Miami (LOTSOF, 1995; ALPER et al., 1999).

## 1. 6. OBJETIVOS

Considerando: i) a importância da busca por novos medicamentos que sejam comprovadamente eficazes no tratamento da dependência de drogas; ii) que antagonistas de receptor NMDA tem sido explorados como novas e promissoras alternativas para o tratamento de dependência e que a ibogaína é um antagonista NMDA; iii) que estudos clínicos sugerem que uma única dose de ibogaína interrompe os aspectos fisiológicos e psicológicos da síndrome de abstinência e elimina a compulsão por longos períodos de tempo; iv) que os estudos experimentais indicam que ibogaína de fato interfere na dependência e abstinência de várias drogas ; v) que as bases neuroquímicas da alegada atividade antiaditiva da ibogaína ainda não estão esclarecidas; e vi) que tem sido sugerido que a neurotoxicidade causada por altas doses de ibogaína possa estar associada a uma hiperestimulação do sistema glutamatérgico; o objetivo principal desta tese foi contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação antiaditivo e neurotóxico da ibogaína, focalizando o sistema glutamatérgico e as interações com os receptores NMDA *in vivo* e *in vitro*.

Para tanto foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) avaliar a participação dos receptores NMDA no efeito a longo prazo da ibogaína:
  - a) investigando o curso do efeito da ibogaína em convulsões induzidas por NMDA;
  - b) investigando o curso do efeito da ibogaína na união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 em membranas de córtex cerebral de camundongos.

2) contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação da ibogaína na dependência de morfina:

- a) comparando o efeito da ibogaína e MK-801 na expressão de abstinência precipitada por naloxona em camundongos dependentes de morfina;
- b) verificando o efeito da ibogaína na união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 em membranas de córtex cerebral de camundongos abstinentes de morfina.

3) avaliar o potencial neurotóxico da ibogaína:

- a) investigando o efeito da ibogaína na liberação e captação de glutamato em preparações de sinaptossomas de córtex cerebral e cerebelo de camundongos e ratos;
- b) investigando o efeito da ibogaína na captação de glutamato em culturas de astrócitos de córtex cerebral de camundongos e ratos.

## **2. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

CAPÍTULO 2.1 – MIRNA BAINY LEAL, DIOGO O.G. DE SOUZA

AND ELAINE ELISABETSKY. Long-lasting ibogaine  
protection against NMDA-induced convulsions in mice.  
*Neurochemical Research* 25(8):1083-1087, 2000.

CAPÍTULO 2.2 – MIRNA BAINY LEAL, KÁTIA MICHELIN, DIOGO  
SOUZA AND ELAINE ELISABETSKY. NMDA  
involvement on ibogaine effects on morphine withdrawal  
in mice. A ser submetido ao Archives of Toxicology.



**NMDA involvement on ibogaine effects on morphine withdrawal in mice**

Mirna B. Leal<sup>1</sup>, Kátia Michelin<sup>2</sup>, Diogo Souza<sup>1</sup> and Elaine Elisabetsky<sup>1,2</sup>✉.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, CPG-Bioquímica, Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Etnofarmacologia, Depto. de Farmacologia, ICBS, UFRGS. Rua Sarmiento Leite 500, sala 202, 90050-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

✉ Corresponding author: Elaine Elisabetsky, C P 5072, 90041-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax 55 51 316-3121; [elisasky@vortex.ufrgs.br](mailto:elisasky@vortex.ufrgs.br).

**Abstract**

Ibogaine (ibo) is an alkaloid with putative antiaddictive properties, attenuating opiates dependence and withdrawal. Ibogaine acts as a non competitive NMDA antagonist, and NMDA receptors have been implicated in the physiological basis of drug addiction. The purpose of this study was to evaluate the effects of ibogaine in the naloxone-induced withdrawal syndrome in morphine dependent mice. Jumping was significantly ( $p < 0.01$ ) inhibited by ibo (40 and 80 mg/kg 64.2% and 96.9% inhibition, respectively) and MK-801 (0.15 and 0.30 mg/kg, 67.3 and 97.7% inhibition, respectively). Co-administration of lower doses of ibo and MK-801 results in 94.7% inhibition of jumping, comparable to the effects of higher doses of either ibo or MK-801. Ibogaine also significantly inhibited NMDA-induced jumping when given 30min (but not 24 h) prior to NMDA. There were no significant differences in [ $^3\text{H}$ ]MK-801 binding to cortical membranes from naive animals, morphine dependent animals, morphine dependent animals treated with ibogaine or MK-801. This study provides further evidence that ibogaine does have an inhibitory effect on opiate withdrawal symptoms, and suggests that during morphine withdrawal there is an ibogaine sensitive functional and transitory alteration of NMDA receptor.

**Key words:** ibogaine, morphine withdrawal, NMDA-receptor, [ $^3\text{H}$ ] MK-801 binding

## **Introduction**

Detoxification is a necessary step in treating opioid dependence, usually through the use of pharmacologically equivalent morphine agonists such as methadone (Alper et al, 1999; Bisaga and Popik, 2000). These morphine agonists are selected for their ability to counteract symptoms of withdrawal syndrome, their long-lasting effect, and by their lack of marked reinforcing properties (Wolf, 1998). However, despite somewhat adequate management of abstinence, relapse rates remain unacceptably high (Bisaga and Popik, 2000).

Ibogaine is an indole alkaloid, extracted from the African shrub *Tabernanthe iboga*, with putative antiaddictive properties (Popik et al, 1995b). Anecdotal reports, as well as uncontrolled clinical data, suggest that a single dose of ibogaine given to subjects dependent on opioids and cocaine resulted in minimal or no withdrawal symptoms and decreased drug craving for extended periods of time (Sisko, 1993; Lotsof, 1995; Mash et al, 1998). In support of these findings, studies with rodents have indicated that ibogaine can interfere with dependence and withdrawal associated with substances of abuse, including cocaine and morphine (Glick et al, 1991, Popik et al, 1995b).

While the neurochemical basis for the putative antiaddictive properties of ibogaine remain unclear, several reports have shown that at pharmacologically relevant concentrations, ibogaine acts as an N-methyl-D-aspartate (NMDA), ionotropic glutamate receptor subtype antagonist; specifically ibogaine competitively inhibits [<sup>3</sup>H]MK801 and [<sup>3</sup>H]TCP binding to NMDA receptors (Mash et al., 1995; Popik et al., 1994, 1995a; Sweetnam et al., 1995; Layer et al., 1996, Staley et al., 1996), blocks glutamate-induced

cell death (Popik et al., 1995a), and produces a blockade of NMDA-mediated currents in a voltage-dependent manner (Mash et al., 1995; Popik et al., 1995a; Chen et al., 1996).

Inasmuch as the NMDA receptors have been implicated in the physiological basis of drug addiction, as well as in long lasting plastic changes in neuronal function, this property may be relevant to the putative ibogaine antiaddictive activity. It has been shown that NMDA antagonists attenuate or reverse the development, maintenance and expression of the pathophysiological process common to all drugs of abuse including opiates (Trujillo and Akil, 1995, Popik and Danysz, 1997, Bisaga and Popik, 2000). Accordingly, ibogaine substitutes for MK-801 in drug discrimination paradigms, and the ability of ibogaine to attenuate naloxone-precipitated jumping in morphine-dependent mice is abolished by glycine (Popik et al., 1995a).

In order to verify if persistent changes in NMDA receptors could be shown *in vivo* and *in vitro* after a single administration of ibogaine we recently examined the time course of ibogaine effects on NMDA-induced seizures and on [<sup>3</sup>H]MK-801 binding in mice cortex membranes (Leal et al, 2000). Ibogaine (80 mg/kg, ip) was effective in inhibiting convulsions induced by NMDA at 24 and 72 hours post administration. Likewise, [<sup>3</sup>H]MK-801 binding was significantly decreased at 24 and 72 h post ibogaine. Interestingly enough, no significant differences from controls were found at 30 min or 48 h post ibogaine. The data suggest that a long lasting and complex pattern of modulation of NMDA receptors prompted by a single dose of ibogaine may be associated to its antiaddictive properties.

Considering the apparent non linear after effects of ibogaine on NMDA receptors and on morphine dependence and withdrawal (Glick et al, 1991), the purpose of this study is to

evaluated ibogaine effects on signs of naloxone-induced withdrawal in morphine dependent mice, as well as the NMDA binding to suchlike mice cortical membranes.

### **Methods**

**Animals:** Male albino adult (25-35g) mice (CF-1 strain), bred at the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (Porto Alegre, RS, Brazil), were used in all experiments. Mice were kept on a 12 light/dark cycle, at a room temperature of 22 °C, with free access to food and water in our own facilities for at least 1.5 months before the experiments.

**Drugs:** N- Methyl-D-Aspartate (NMDA), glycine and morphine sulfate were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA), (+) MK-801 hydrogen Maleate was purchased from RBI (Natick, MA, USA), and [<sup>3</sup>H] MK-801 (22.5 Ci/mmol) was purchased from Du-Pont-NEN (Boston, MA, USA). Glutamic acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ibogaine hydrochloride was kindly donated by Howard Lotsof (NDA Int. Inc., USA). All other reagents were of analytical grade. Drugs were dissolved in milli-Q water.

### **Behavioral Experiments**

**Naloxone-induced jumping in morphine-dependent mice:** The method of Popik et al. (1995a) and Zarridast and Farzin (1996) was adapted as follows. Morphine sulfate was injected intraperitoneally (ip) 3 times daily (9:30, 13:30 and 17:30 h) on the following dosage schedule: the first three doses were 50, 50 and 75 mg/kg, respectively; the higher dose at the third daily injection was aimed to minimize potential overnight withdrawal. Each of the doses was increased by 25 mg/kg/day. Morphine administration was carried out over a maximum of 3 days, with an additional dose (50 mg/kg) administered on the

morning (9:30 h) of the test (day 4). Two hours after the last dose of morphine, mice were injected (ip) with: saline, MK-801 0.15 and 0.30 mg/kg, ibogaine 40 and 80 mg/kg, and ibogaine 40 + MK-801 0.15 mg/kg. Forty-five minutes after the last injection, mice were given naloxone (5 mg/kg, ip) and immediately placed in transparent plastic cylinders (19 cm diameter, 42 cm high). The number of jumps (at least 1 cm above the floor) during the subsequent 10 min was recorded. A blank control group (run in parallel with experimental groups) consisted of the same schedule of drug and treatments administration, except that all injections were of saline (NaCl 0.9%). Results were analyzed by means of ANOVA followed by Duncan post-hoc test.

**NMDA-induced jumping:** The method is detailed elsewhere (Leal et al, 2000). Ibogaine (60 and 80 mg/kg) or saline were injected (ip) 30 min and 24 h before subcutaneous (sc) NMDA (240 mg/kg). After receiving NMDA, animals were individually placed in plexiglas boxes (20x20x20 cm) and observed during 60 min for the occurrence of jumping. Results are expressed as the percentage of jumping animals. Data were analyzed by means of the Fisher exact probability test.

#### Neurochemistry

**Membrane Preparation:** Membranes were prepared as described by Emanuelli et al. (1998). After treatments (saline, MK-801 0.3 mg/kg or ibogaine 80 mg/kg) and naloxone administration (as detailed above), mice were decapitated, and the brains rapidly removed; brains were also removed from a group of naive (non treated) mice, as control. Each membrane preparation consisted of the pooled brains of two equally treated mice. Cerebral cortice were dissected and homogenized (20:1 vol/weight) in 0.32 M sucrose containing 10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, and 1 mM MgCl<sub>2</sub>. All steps were carried out at 4°C. The

homogenate was centrifuged twice at 1,000g for 15 min and the final pellet discarded. Both supernatants were pooled and centrifuged at 27,000g for 15 min. The resulting pellet was lysed in 20 volumes of 5 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4 for 30 min, and centrifuged at 27,000 g for 15 min. This pellet was washed three times with lysing buffer (20:1 v:w) by centrifuging at 27,000g for 15 min. The final pellet was frozen at -70°C for at least 24 h. On the day of the binding assay, the membranes were rapidly thawed in a water bath (37°C), homogenized with 3 volumes of 5 mM Tris/HCl, pH 7.4, and centrifuged at 27,000g for 15 min. The resulting pellet was resuspended in the same buffer, pre-incubated at 37°C for 30 min and centrifuged at 27,000g for 15 min. The pellet was washed three times in 3 volumes of 5 mM Tris/HCl, pH7.4, and centrifuged at 27,000g for 15 min. The final pellet was resuspended in the same buffer in order to yield a protein concentration of 1-2 mg/ml and used for binding assays. Protein concentration was measured according to Lowry et al. (1951).

Binding of [<sup>3</sup>H]MK-801. Binding assay was based on the method of Piggott et al. (1992). Membranes (~200 µg protein/tube) were incubated in 5mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) at 25° C for 1h, containing 2 nM [<sup>3</sup>H] MK-801 in the presence of glutamate (50 µM) and glycine (30 µM) in a final volume of 0.5 ml. Non-specific binding was defined as binding which occurred in the presence of 34 µ M of non-radioactive MK-801. After incubation, membranes were filtered (reduced pressure, Whatman GF-B filter prewetted in 5 mM Tris/HCl buffer), and rinsed rapidly three times with 5 ml of ice-cold buffer. The dried filters were deposited in vials and radioactivity measured by scintillation counting. All experiments were performed in triplicate. Results were analyzed by means of ANOVA followed by Duncan post-hoc test.

## **Results**

Figure 1 shows the effects of ibogaine (40 and 80 mg/kg), MK-801 (0.15 and 0.3 mg/kg) and the co-administration of ibogaine (40 mg/kg) and MK-801 (0.15 mg/kg) on naloxone-induced jumping in morphine dependent mice. Jumping was significantly inhibited by ibogaine (64% with 40 mg/kg and 97% with 80 mg/kg) and MK-801 (67% with 0.15 mg/kg and 98% with 0.3 mg/kg). Co-administration of lower doses of ibogaine and MK-801 results in 95% of jumping inhibition, comparable to higher doses of either ibogaine or MK-801 alone. Hyperactivity and the Straub tail effect were seen after morphine injections.

Figure 2 shows the effects of ibogaine (80 mg/kg) administered 30 min and 24 h before NMDA on NMDA-induced jumping. Ibogaine significantly inhibited NMDA-induced jumping when given 30min prior to NMDA; nevertheless, if ibogaine is given 24h prior to NMDA, there is no alteration in NMDA-induced jumping.

There were no significant differences in [<sup>3</sup>H]MK801 binding to cortical membranes from naive animals ( $0.13 \pm 0.01$  pmol/mg protein), morphine dependent animals ( $0.18 \pm 0.09$  pmol/mg protein), morphine dependent animals treated with ibogaine ( $0.18 \pm 0.05$  pmol/mg protein) or morphine dependent animals treated with MK-801 ( $0.16 \pm 0.2$  pmol/mg protein) (data not shown).

## **Discussion**

It has been shown that morphine withdrawal precipitates glutamate release (Aghajanian et al., 1994; Jhamandas et al., 1996; Tokuyama and Ho, 1996, Vlaskovska et al., 1997); conversely, icv glutamate injection precipitates withdrawal signs in morphine dependent



(but not naive) rats (Tokuyama et al., 1996). Moreover, expression of withdrawal precipitated by naloxone (Popik and Skolnick, 1996, Popik and Danysz, 1997, Popik et al, 1998) or glutamate (Tokuyama et al., 1996), can be blocked by NMDA antagonists acutely administered, or even co-administered with morphine (Trujillo and Akil, 1991).

Attenuating effects of ibogaine on signs of morphine withdrawal in rodents are contradictory, with positive and negative reports in rats and mice (Dzoljic et al., 1988; Sharpe & Jaffe, 1990; Frances et al., 1992; Glick et al., 1992; Cappendijk et al., 1994; Popik et al., 1995a). In the present study we found that ibogaine (a NMDA antagonist) inhibits naloxone-induced jumping in morphine dependent mice. Additionally, co-administration of less effective doses of ibogaine and MK-801 together inhibited jumping as efficiently as higher doses of either ibogaine or MK-801 alone. These results agree with previous suggestions by Popik et al (1995a), in that the inhibitory effects of ibogaine on opiate withdrawal symptoms are mediated by NMDA receptors.

The observation that NMDA induces jumping regardless of pre established opioid dependence, supports the hypothesis that jumping involves the activation of NMDA receptors. Although a long lasting modulation of NMDA receptors may be associated to antiaddictive properties of ibogaine (Leal et al, 2000), the fact that ibogaine inhibited NMDA-induced jumping 30 min, but not 24 hours, after NMDA administration further supports the idea that a NMDA receptor-mediated system is crucial in the acute expression of opioid withdrawal.

Regarding [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to cortex membranes, we found that results with morphine abstinent mice are not significantly altered in comparison to naive mice, nor with morphine dependent mice treated with ibogaine or MK-801. This finding may indicate that

the density and sensibility of cortical NMDA receptor is not noticeably altered during naloxone-induced morphine withdrawal, an acute process that may be rather related to a brief and transient functional state of NMDA receptors. Correspondingly, it has been suggested that tolerance/dependence and withdrawal may be independent process. According to the time-course effects of drug exposure proposed by Nestler and Aghajanian (1997), withdrawal is a short term phenomena, that includes an enhancement of glutamate. The fact that there was no alteration on [<sup>3</sup>H]MK-801 binding in cortical membranes of morphine abstinent mice do not exclude NMDA receptors involvement on morphine dependence and tolerance, a more long lasting phenomenon. Indeed, it has been shown that the binding of [<sup>3</sup>H]MK-801 was not altered in cortex, but increased in the hippocampus of morphine-abstinent mice (Gudehithlu and Bhargava, 1996).

Interactions between NMDA receptor antagonists and drugs of abuse appear to be rather complex (Nestler and Aghajanian, 1997), interfering with the development, maintenance and expression of the pathophysiological processes common to all drugs of abuse (Trujillo and Akil, 1991; Bisaga and Popik, 2000). Tolerance and dependence may be viewed as the result from neuronal adaptations induced by repeated drug exposure, NMDA receptors been implicated in the establishment of such long term changes (Rossetti and Carboni, 1995; Ripley and Little, 1995).

This study provides further evidence that ibogaine does inhibit on opiate withdrawal symptoms. Adding to the established long lasting NMDA mediated effects of ibogaine, we suggest that during morphine withdrawal there is a ibogaine sensitive functional alteration of NMDA receptor.

**Acknowledgements**

The authors wish to thank Adriana L. da Silva for assistance in experiments, Howard Lotsof (NDA Inc.) for donation of ibogaine hydrochloride. This work was supported by grants CNPq and Pronex (N<sup>o</sup> 41960904-366/96 to D.O.G Souza). All procedures were carried out according to the institutional policies on animal experimental handling.

References

1. Aghajanian GK, Kogan JH, Moghaddam B (1994) Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 636:126-130.
2. Alper KR, Lotsof HS, Frenken GMN, Luciano DJ, Bastiaans J (1999) Treatment of acute opioid withdrawal with ibogaine. *Am J Addict* 8:234-242.
3. Bisaga A, Popik P (2000) In Search of a new pharmacological treatment for drug and alcohol addiction: N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. *Drug Alcohol Depend* 59:1-15.
4. Cappendijk SLT, Fekkes D, Dzoljic M (1994) The inhibitory effect of norharman on morphine withdrawal syndrome in rats: comparison with ibogaine. *Behav Brain Res* 65:117-119.
5. Dzoljic ED, Kaplan CD, Dzoljic MR (1988) Effect of ibogaine on naloxone precipitated withdrawal syndrome in chronic morphine dependent rats. *Arch Int Pharmacodyn* 294, 64-70.
6. Chen K, Kokate TG, Donevan SD, Carrol FI, Rogawski MA (1996) Ibogaine block of the NMDA receptor: in vitro and in vivo studies. *Neuropharmacology* 35:423-431.
7. Emanuelli T, Antunes VF, Souza, DOG (1998) Characterisation of L-[<sup>3</sup>H] Glutamate binding to fresh and frozen crude plasma membranes isolated from cerebral cortex of adults rats. *Biochem Mol Biol Int* 44:1265-1272.
8. Frances B, Gout R, Cros J, Zajac JM (1992) Effects of ibogaine on naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent mice. *Fundam Clin Pharmacol* 6:327-332.

9. Glick SD, Rossman K, Steindorf S, Maisonneuve IM, Carlson JN (1991) Effects and aftereffects of ibogaine on morphine self-administration in rats. *Eur J Pharmacol* 195: 341-345.
10. Glick SD, Rossman K, Maisonneuve IM, Carlson JN Effects of ibogaine on acute signs of morphine withdrawal in rats: independence from tremor. *Neuropharmacology* 31, 497-500, 1992.
11. Gudehithlu KP, Bhargava HN (1996) Differential binding of [<sup>3</sup>H] MK-801 to brain regions and spinal cord of mice treated chronically with morphine. *Gen Pharmacol* 27:91-94.
12. Jhamandas JH, Harris KH, Petron T, Jhamandas KH (1996) Activation of nitric oxide-synthesing neurones during precipitated morphine withdrawal. *NeuroReport* 7: 2843-2846.
13. Layer RT, Skolnick P, Bertha CM, Bandarage UK, Kuehne ME, Popik P (1996) Structurally modified ibogaine analogs exhibit differing affinities for NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 309:159-165.
14. Leal MB, Souza DOG, Elisabetsky E (2000) Long-lasting ibogaine protection against NMDA-induced convulsions in mice. *Neurochem Res* 25:1083-1087.
15. Lotsof H S (1995) Ibogaine in the treatment of chemical dependence disorders: clinical perspectives. *MAPS* 5:16-27.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

17. Mash DC, Kovera CA, Buck BE, Norenberg MD, Shapshak P, Hearn WL, Sanchez-Ramos J (1998) Medication development of ibogaine as a pharmacotherapy for drug dependence. *Ann N Y Acad Sci* 844:274-292.
18. Mash DC, Staley JK, Pablo JP, Holohean AM, Hackman JC, Davidoff RA (1995) Properties of ibogaine and its principal metabolite (12-hydroxyibogamine) at the MK-801 binding site of the NMDA receptor complex. *Neurosci Lett* 192: 53-56.
19. Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278:58-63.
20. Piggott MA, Perry EK, Perry RH, Court JA (1992) [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex, and its modulation in humans frontal cortex during development and aging. *Brain Res* 588:277-286.
21. Popik P, Layer RT, Skolnick P (1994) The putative anti-addictive drug Ibogaine is a competitive inhibitor of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex. *Psychopharmacology* 114: 672-674.
22. Popik P, Layer RT, Fossom LH, Benveniste M, Geter-Douglass B, Witkin JM, Skolnick P, (1995a) NMDA antagonist properties of the putative anti-addictive drug, Ibogaine. *J Pharmacol Exp Ther* 275:753-760.
23. Popik P, Layer RT, Skolnick P (1995b) 100 years of Ibogaine: neurochemical and pharmacological actions of a putative anti-addictive drug. *Pharmacol Rev* 47: 235-253.
24. Popik P, Skolnick P (1996) The NMDA antagonist memantine blocks the expression and maintenance of morphine dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 53:791-797.

25. Popik P, Danysz W (1997) Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine. *J Pharmacol Exp Ther* 280:854-865.
26. Popik P, Mamczarz J, Fraczek M, Widla G, Hesselink M, Danysz W (1998) Inhibition of reinforcing effects of morphine and naloxone-precipitated opioid withdrawal by novel glycine site and uncompetitive NMDA receptor antagonists. *Neuropharmacology* 37:1033-1042.
27. Ripley TL, Little HJ (1995) Ethanol withdrawal hyperexcitability in vitro is selectively decreased by a competitive NMDA receptor antagonist. *Brain Res* 699:1-11.
28. Rosseti ZL, Carboni S (1995) Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 283:177-183.
29. Sharpe LG, Jaffe JH (1990) Ibogaine fails to reduce naloxone-precipitated withdrawal in the morphine-dependent rat. *NeuroReport* 1:17-19.
30. Sisko B (1993) Interrupting drug dependency with Ibogaine: a summary of four case histories. *MAPS* 4: 15-23.
31. Staley JK, Ouyang Q, Pablo J, Hearn WL, Flynn DD, Rothman RB, Rice KC, Mash, DC (1996) Pharmacological screen for activities of 12-hydroxyibogamine: a primary metabolite of the indole alkaloid ibogaine. *Psychopharmacology* 127:10-18.
32. Sweetnam PM, Lancaster J, Snowman A, Collins JL, Perschke S, Bauer C, Ferkany J (1995) Receptor binding profile suggests multiple mechanisms of action are responsible for ibogaine's putative anti-addictive activity. *Psychopharmacology* 118:369-376.

33. Tokuyama S, Hiroyuki W, Ho IK (1996) Direct evidence for a role of glutamate in the expression of the opioid withdrawal syndrome. *Eur J Pharmacol* 295:123-129.
34. Tokuyama S, Ho IK (1996) Inhibitory effect of diltiazem, an L-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, on naloxone-induced glutamate levels in the locus coeruleus of opioid-dependent rats. *Brain Res* 722: 212-216.
35. Trujillo KA, Akil H (1991) Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251:85-87.
36. Wolf, K (1998) Addiction Medicine. In: KARKH J (ed) *Drug Abuse Handbook*. CRC, São Francisco, pp 500-513.
37. Zarridast M-R, Farzin D (1996) Nicotine attenuates naloxone-induced jumping behavior in morphine-dependent mice. *Eur J Pharmacol* 298:1-6.



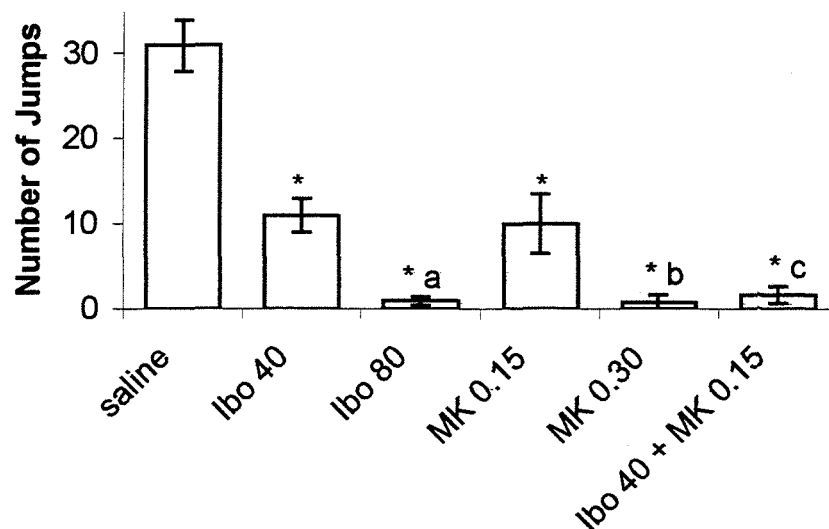


Figure 1: Effects of ibogaine, MK-801 and co-administration of ibogaine and MK-801 on naloxone-induced jumping in morphine dependent mice. Ibo 40 = ibogaine 40 mg/kg, Ibo 80 = ibogaine 80 mg/kg, MK0.15 = MK-801 0.15 mg/kg, MK0.3 = MK-801 0.3 mg/kg. Data are express as mean ( SEM ± N=10-13). \* = p<0.01 compared to saline; a= p<0.01 compared to Ibo 40; b= p<0.01 compared to MK 0.15; c= p<0.01 compared to Ibo 40 and MK 0.15. ANOVA/Duncan.

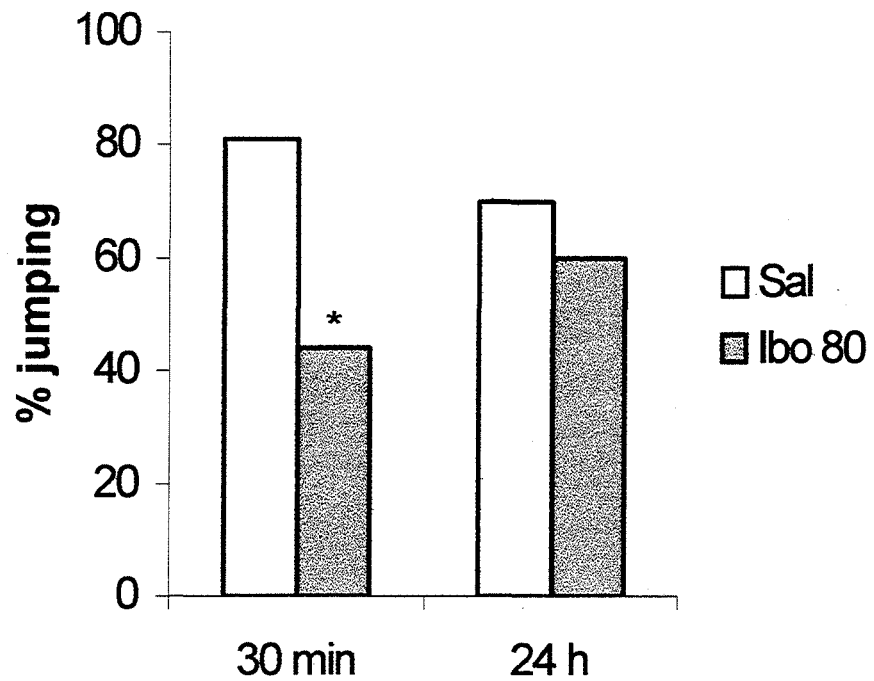


Figure 2: Effect of saline and ibogaine on NMDA-induced jumping. Sal= saline and Ibo 80= ibogaine 80 mg/kg injected ip 30 min and 24 h before sc NMDA (240 mg/kg). (N= 14-21). Data expressed as percentage of mice presenting jumping. \* =  $p < 0.05$ , Fisher Test.

CAPÍTULO 2.3 – MIRNA B. LEAL, TATIANA EMANUELLI, LISIANE  
DE O. PORCIÚNCULA, DIOGO O. SOUZA AND  
ELAINE ELISABETSKY. Ibogaine alters synaptosomal  
and glial glutamate release and uptake. Aceito para  
publicação no NeuroReport 12 (2): 263-267, 2001.

**Ibogaine alters synaptosomal and glial glutamate release and uptake.**

Mirna B. Leal<sup>1</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>1,3</sup>, Lisiane de O. Porciúncula<sup>1</sup>, Diogo O. Souza<sup>1</sup> and Elaine Elisabetsky<sup>1,2,CA</sup>

<sup>1</sup> Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica and <sup>2</sup> Departamento de Farmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, CCR, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

Running title: Ibogaine effects on brain glutamate transport.

CA: Elaine Elisabetsky, Caixa Postal 5072, 90041-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone/Fax (55) (51) 316-3121; [elisasky@vortex.ufrgs.br](mailto:elisasky@vortex.ufrgs.br)

**Abstract**

Ibogaine has aroused expectations as a potentially innovative medication for drug addiction. It has been proposed that the NMDA glutamate receptor antagonism by ibogaine may be one of the mechanisms underlying its antiaddictive properties; glutamate has also been implicated in ibogaine-induced neurotoxicity. We here report the effects of ibogaine on [<sup>3</sup>H]glutamate release and uptake in cortical and cerebellar synaptosomes, as well as in cortical astrocyte cultures, from mice and rats. Ibogaine (2-1000 μM) had no effects on glutamate uptake or release by rat synaptosomes. However, ibogaine (500-1000 μM) significantly inhibited the glutamate uptake and stimulated the release of glutamate by cortical (but not cerebellar) synaptosomes of mice. Additionally, ibogaine (1000 μM) nearly abolished glutamate uptake by cortical astrocyte cultures from rats and mice. The data provide direct evidence of glutamate involvement in the ibogaine-induced neurotoxicity.

**Key words:** ibogaine, glutamate, release, uptake, synaptosomes, astrocyte, rats, mice.

## **Introduction**

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the mammalian brain, is believed to play important roles in several physiological and pathological processes. Glutamatergic neurotransmission is achieved through ionotropic (ligand-gated ion channel) and metabotropic (coupled to cellular effectors) receptors (1). Specifically, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) ionotropic glutamate receptor subtype seems to be crucial in plastic changes associated with normal brain function (1). However, an over stimulation of the glutamatergic system has been implicated in acute neurological disorders as well as in neurodegenerative diseases (2). Glutamate concentrations are adequately maintained (below toxic levels) in the synaptic cleft by means of neuronal and, especially, by glial uptake. Glial uptake is performed by two carrier proteins located in astrocytes (glutamate transporter 1 [GLT1] and glutamate/aspartate transporter [GLAST]) (3,4).

Ibogaine, an indole alkaloid, has appeared in the drug addiction therapy scenario as a truly innovative drug, arousing high expectations (5,6). Ibogaine has been shown to interfere with various neurotransmitter systems (7), including the glutamatergic, acting as a non-competitive NMDA antagonist (6,8). Because the glutamatergic system has also been implicated in drug addiction (9), this property may be relevant to the putative ibogaine antiaddictive properties. In fact, it has been shown that NMDA antagonists attenuate or reverse the development of tolerance, dependence and/or sensitization induced by several drugs of abuse (9,10,11).

Despite relevant evidence of ibogaine antiaddictive properties, obtained from *in vivo* and *in vitro* animal data as well as clinical accounts (5, 6, 8, 12), the development of ibogaine as a treatment for drug addiction has been halted by data suggesting serious

neurotoxicity (13,14,15,16). It has been suggested that glutamate may play a central role in ibogaine-induced neurotoxicity. Specifically, it was postulated that ibogaine activation of inferior olivary neurons leads to excessive release of glutamate at climbing fibers, resulting in Purkinje cells loss (14). However, there is no direct evidence that ibogaine could lead to an over stimulation of the glutamatergic system.

Considering the presumed importance of glutamate in mediating both the antiaddictive and neurotoxic properties of ibogaine, the purpose of this study was to investigate the effects of ibogaine on glutamate release and uptake by cortical and cerebellar synaptosomes prepared from mouse and rat brain. Additionally, we have studied the effects of ibogaine on glutamate uptake by cortical astrocyte cultures from mice and rats.

## **Methods**

*Animals:* Male albino adult mice (CF-1 strain), bred at the Instituto de Pesquisas Biológicas (Porto Alegre, Brazil), and Wistar rats from our own breeding colony were used. The animals were kept in separate animal rooms, on a 12 light/dark cycle, at a room temperature of 22°C, with free access to food and water.

*Preparation of synaptosomes:* Animals were decapitated and the cortices and cerebella were removed and used to prepare synaptosomes on a discontinuous Percoll gradient according to Dunkley et al. (17). Protein concentration was measured according to the method of Lowry et al. (18).

*[<sup>3</sup>H]Glutamate Release:* Determination of [<sup>3</sup>H]glutamate release was accomplished according to the method described by Miguez et al. (19). The synaptosomal preparation was incubated in HEPES buffered salt solution (HBSS, composition in mM: HEPES 27, NaCl 133, KCl 2.4, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, Glucose 12, CaCl<sub>2</sub> 1.0), pH 7.4 (adjusted

with HCl), for 15 min at 37°C in the presence of [<sup>3</sup>H] glutamate (Amersham, specific activity 53 Ci/mmol, final concentration 5 x 10<sup>-7</sup> M). Aliquots of labeled synaptosomes (1.4 mg protein) were centrifuged at 16000 x g for 1 min. Supernatants were discarded, and the pellets were washed four times in HBSS by centrifugation at 16000 x g for 1 min (at 4°C). To assess the basal release of [<sup>3</sup>H]glutamate, the final pellet was resuspended in HBSS and incubated for 60 s in the absence (control) or presence of ibogaine hydrochloride (2-1000 µM), at 37°C. Incubation was terminated by immediate centrifugation (16000 x g, 1min). Radioactivity present in supernatants and pellets was separately determined in a Wallac scintillation counter. The released [<sup>3</sup>H]glutamate was calculated as a percentage of the total amount of radiolabel present in the synaptosomes at the start of the incubation period. K<sup>+</sup>-stimulated [<sup>3</sup>H]glutamate release was assessed as described for basal release, except that the incubation medium contained 40 mM KCl to induce synaptosomal depolarization. The effect of ibogaine (1 mM) on [<sup>3</sup>H]glutamate release by cortical synaptosomes in the absence of Ca<sup>2+</sup> was performed in a medium similar to that described above, except that CaCl<sub>2</sub> was omitted and 2 mM EGTA were added. In some experiments tetrodotoxin 5 µM (TTX) was added with ibogaine (1 mM) and veratridine (20 µM).

*[<sup>3</sup>H]Glutamate Uptake by synaptosomes:* The synaptosomal preparation was washed twice by suspending in 3 volumes of 0.3 M sucrose, in 15 mM Tris/acetate buffer (pH 7.4) and centrifuging at 35000 x g for 15 min. The final pellet was resuspended in 0.3 M sucrose, 15 mM Tris/acetate buffer (pH 7.4), and incubated in HBSS (Hepes buffered salt solution, composition in mM: HEPES 24, NaCl 119, KCl 2.1, MgSO<sub>4</sub> 1.08, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.08, Glucose 10.8, CaCl<sub>2</sub> 0.9), pH 7.4 (adjusted with HCl), in the presence of [<sup>3</sup>H]glutamate (final concentration 100 nM) in the absence or in the presence of ibogaine



hydrochloride (2-1000  $\mu\text{M}$ ), for 1 min at 37°C. The reaction was stopped by filtration through GF/B filters. The filters were washed 3 times with 3 ml of ice-cold 15 mM Tris/acetate buffer (pH 7.4) in 155 mM ammonium acetate. The radioactivity retained on the filters was measured in a Wallac scintillation counter. Specific [ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake was calculated as the difference between the uptake obtained in the incubation medium described above, and the uptake obtained with a similar incubation medium in which choline chloride was substituted for NaCl.

*Primary cortical astrocyte cultures:* The method of Swanson et al. (20) for preparing primary cortical astrocyte cultures was used with minor modifications, as described below. The cortical tissue of newborn mice or rats was dissociated mechanically. The dissociated cells were washed, suspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and plated in Falcon 24 well tissue culture plates at an approximate density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. The cultures were maintained in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The medium was exchanged weekly. At confluence (days 13-15), 10  $\mu\text{M}$  cytosine arabinoside was added and after 48h this medium was replaced with medium containing 3% FBS and 0.15 mM di-butylcAMP (dBcAMP). Addition of dBcAMP to the media induced the expression of GLT-1 and increased the expression of GLAST (20). Cultures were used at 25-30 days *in vitro*.

*[ $^3\text{H}$ ]Glutamate uptake in astrocyte cultures:* Glutamate uptake was measured as described by Swanson et al. (20). Briefly, the culture media were replaced with a modified HBSS containing 2 mM glucose buffered to pH 7.2 with 5 mM Piperazine-N,N'-Bis[ethanesulfonic acid] (PIPES), and pre-incubated for 30 min, at 37°C, in the absence or in the presence of ibogaine (0.1 or 1 mM). After this pre-incubation period, the uptake was started by adding 0.01  $\mu\text{Ci/ml}$  L-[ $^3\text{H}$ ]glutamate (Amersham, specific

activity 53 Ci/mmol) plus 100 $\mu$ M of unlabeled glutamate to each culture well. The uptake was terminated after 7 min of incubation (37°C), by washing the cell cultures twice with ice-cold HBSS, followed immediately by cell lysis in 0.5 N NaOH/0.05% lauryl sulfate. Nonspecific uptake was measured in HBSS containing choline chloride instead of NaCl. Aliquots were taken for scintillation counting and protein assays (18).

*Measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity:* In order to evaluate the integrity of the synaptosomes and astrocyte cultures after the incubation period, an aliquot of the supernatant was withdrawn and frozen for later determination of LDH activity. LDH activity was measured using an assay kit (Doles Reagents, Brazil) modified as described by Romano et al.(21). LDH activity was assessed by measuring the amount of a colored complex derived from the NADH formed by the enzymatic reaction using a spectrophotometric method (510 nm).

*Statistical analysis:* Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test when appropriate. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant, and F values are presented only when a significant difference was found.

## **Results**

Figure 1 shows ibogaine's effects on [ $^3$ H]glutamate release from mice synaptosomes. Ibogaine (500 and 1000  $\mu$ M) significantly increased basal [ $F(5, 29) = 2,54, p < 0.05$ ], but not  $K^+$ -stimulated glutamate release by cortical synaptosomes (Figure 1A). In cerebellar synaptosomes (Figure 1B) ibogaine (up to 1 mM) did not modify basal or  $K^+$ -stimulated [ $^3$ H]glutamate release.

In order to determine the  $Ca^{2+}$ -dependence of the ibogaine effect on glutamate release,

mice cortical synaptosomes were incubated in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  and in the presence of 2 mM EGTA (Figure 2). The effect of the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  on ibogaine-induced glutamate release was compared to the effect of the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{K}^{+}$ -stimulated glutamate release. Two-way ANOVA (2 calcium conditions x 3 treatments) revealed a significant effect of treatment [ $F(2,36)=26.50$ ,  $p<0.01$ ] and a significant calcium condition x treatment interaction [ $F(2,36)=3.90$ ,  $p<0.05$ ]. Post-hoc analysis (Duncan's test) indicated that ibogaine-induced [ $^3\text{H}$ ]glutamate release was not modified by the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , while  $\text{K}^{+}$ -stimulated [ $^3\text{H}$ ]glutamate release was significantly attenuated when  $\text{Ca}^{2+}$  was absent.

The role of  $\text{Na}^{+}$  channels on ibogaine-induced glutamate release was investigated by adding the  $\text{Na}^{+}$ -channel blocker TTX ( $5\mu\text{M}$ ) to the incubation (Figure 3). Two-way ANOVA (2 TTX conditions x 3 treatments) revealed a significant effect of treatment [ $F(2,29)=12.18$ ,  $p<0.01$ ] and a significant TTX condition x treatment interaction [ $F(2,29)=8.82$ ,  $p<0.01$ ]. Post-hoc analysis revealed that TTX did not affect ibogaine-induced [ $^3\text{H}$ ]glutamate release, while completely abolishing [ $^3\text{H}$ ]glutamate release induced by veratridine ( $20\mu\text{M}$ ), a  $\text{Na}^{+}$ -channel activator.

In contrast with the results obtained in mice synaptosomes, ibogaine had no effect on [ $^3\text{H}$ ]glutamate release by cortical or cerebellar synaptosomes from rats (data not shown).

Figure 4 shows ibogaine effects on [ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake. Ibogaine ( $500$  and  $1000\mu\text{M}$ ) significantly inhibited [ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake (27% and 38%, respectively) by cortical mice synaptosomes [ $F(5,20)=7.64$ ,  $p<0.01$ ], while having no significant effect on the [ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake by mice cerebellar synaptosomes (Figure 4A). Ibogaine had no effects on [ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake by cortical or cerebellar synaptosomes from rats (data not shown). Ibogaine  $1\text{mM}$  (but not  $100\mu\text{M}$ ) inhibited [ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake by cortical

astrocyte cultures from mice (96%) [F(2,6)= 135,9, p<0.01] and rats (97%) [F(2,9)= 29,26, p<0.01] (Figure 4B).

Synaptosomes and astrocyte cultures did not show any significant leakage of the cytosolic marker LDH after incubation with ibogaine (2-1000  $\mu$ M) (data not shown), indicating that ibogaine did not disrupt astrocyte cells or synaptosomal plasma membranes in our assay conditions.

### **Discussion**

The glutamatergic system is said to be implicated in drug addiction (9) and its overstimulation is involved in neural damage (2). Likewise, the putative antiaddictive and neurotoxic properties of ibogaine have been associated with glutamate (5,8,10,14). In this study we evaluated effects of ibogaine on extracellular glutamate levels, by investigating its effects (2-1000  $\mu$ M) on [ $^3$ H] glutamate release and uptake by cortical and cerebellar synaptosomes of mice and rats, and on [ $^3$ H]glutamate uptake by mice and rats cortical astrocyte cultures.

At concentrations likely to be present in the brain with therapeutically relevant ibogaine antiaddictive doses (4-133  $\mu$ M) (8,22,23,24), we did not find any significant effects on [ $^3$ H]glutamate release or uptake by synaptosomes or cortical astrocyte cultures of rats or mice.

The main findings of our study indicate that higher concentrations of ibogaine increased (37-45%) glutamate release and inhibited (27-38%) glutamate uptake in cortical synaptosomes of mice. Moreover, there was an almost complete inhibition of glutamate uptake by cortical astrocyte cultures in mice (96%) and rats (97%).

Considering the crucial role of astrocyte uptake in physiological and pathological processes (4), and that neuronal release and astrocytic uptake are concomitant processes

in neural activity, the effect of ibogaine on astrocyte uptake seems to be the most relevant.

The absence of a significant LDH leakage after synaptosomal or cell culture incubation with ibogaine indicate that increased glutamate release and glutamate uptake inhibition can not be attributed to the disruption of plasma membrane.

Ibogaine-induced glutamate release was not observed in the presence of depolarizing  $K^+$  concentrations. In addition, unlike  $K^+$ -stimulated glutamate release, ibogaine-induced release was not affected by removing  $Ca^{2+}$  from the medium. These data indicate that unlike  $K^+$ , ibogaine may induce synaptosomal depolarization through a mechanism(s) independent of exogenous  $Ca^{2+}$ . Nonetheless, our results did not rule out a possible involvement of intracellular calcium stores in ibogaine-induced glutamate release, which could be mobilized through the activation of some metabotropic receptor.

TTX, which inactivates voltage-sensitive  $Na^+$  channels (25), did not alter ibogaine-induced [ $^3H$ ]glutamate release, indicating that voltage-sensitive  $Na^+$  channels are not involved in ibogaine-induced glutamate release.

Altogether, the results suggest that ibogaine could increase glutamate concentrations in the synaptic cleft through an stimulation of neuronal glutamate release, mediated by a synaptic depolarization independent of exogenous  $Ca^{2+}$  and of voltage sensitive  $Na^+$ -channels. It has been reported that ibogaine binds to sigma-2 receptors (26) and ibogaine activates sigma-2 receptors, suggesting that this could induce glutamate release, leading to neurotoxicity (5).

Extracellular glutamate concentrations are usually maintained at low levels by its  $Na^+$ -dependent transport into neurons and, especially, astrocytes (3). Ibogaine inhibited both glutamate uptake by mice cortical synaptosomes (neuronal transporters) and by mice

cortical astrocyte cultures. These results reinforce the proposal that high ibogaine concentrations could increase extracellular glutamate, leading to excitotoxic concentrations in the synaptic cleft.

It is unlikely that the ibogaine effects reported in the present study could be related to the antiaddictive property of this compound. The effects here reported were observed at ibogaine concentrations thought to be higher than those proposed to be therapeutically effective (8,22,23). Moreover, therapeutic properties of ibogaine have been attributed to a depression and not to a stimulation of glutamatergic activity (6,10). Nevertheless, an ibogaine-induced increase of extracellular glutamate concentrations could be implicated in the neurotoxic effects of this compound. Indeed, it has been suggested that the Purkinje cell loss observed after *in vivo* administration of ibogaine to rats could be related to the activation of inferior olivary neurons, leading to excessive glutamate release at climbing fibers (14). Our data are in agreement with this hypothesis, and we have provided for the first time direct evidence that ibogaine inhibits astrocytic uptake; this effect could amplify glutamate excitotoxicity brought about by glutamate release by olivary neurons.

Clinical data (including postmortem studies) suggest low risk for ibogaine-induced cerebellar toxicity in humans in the dose range purported to be effective for opiate and cocaine detoxification (6). However, caution is necessary since ibogaine toxicity seems to be dependent on several factors, including sex, dosage regimen, and species (13). Discrepancies in ibogaine effects between rats and mice have been previously reported (16), including differential effects in cortex. Accordingly, our data point to species and regional differences concerning ibogaine's effects on glutamate release and uptake. The differential effects of ibogaine on glutamate uptake in rats and mice, astrocytes and

neurons, cortex and cerebellum, could be related to differences in the expression of the various transport systems involved in glutamate uptake.

### **Conclusion**

The data reported here contribute to the understanding of the mechanisms of actions of ibogaine, by demonstrating direct effects of ibogaine on glutamate uptake and release. We believe that these effects are unlikely to participate in the purported therapeutic antiaddictive properties of this alkaloid, but may be relevant to its eventual toxicity.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Howard Lotsof (NDA Inc.) for donation of ibogaine hydrochloride, and Dr. Rodrigo B. Leal for useful suggestions for this study. This work was supported by grants CNPq and Pronex (N<sup>o</sup> 41960904-366/96 to D.O.G Souza).

**References**

1. Ozawa S, Kamiya H, and Tsukuki K. *Prog Neurobiol* 54,581-618, 1998.
2. Lipton SA and Rosenberg PA. *New Eng J Med* 330,613-622, 1994.
3. Gegelashvili G and Schousboe A. *Brain Res Bull* 45, 233-238, 1998.
4. Anderson CM and Swanson RA. *Glia* 32, 1-14, 2000.
5. Glick SD and Maisonneuve IM. *Ann NY Acad Sci* 844,214-226, 1998.
6. Mash DC, Kovera CA, Buck BE et al. *Ann NY Acad Sci* 844,274-292, 1998.
7. Sweetnam PM, Lancaster J, Snowman A et al. *Psychopharmacology*, 118,369-376, 1995.
8. Popik P, Layer RT and Skolnick P. *Pharmacol Rev* 47,235-253,1995.
9. Trujillo KA and Akil H. *Drug Alcohol Depend* 38,139-154, 1995.
10. Popik P, Layer RT, Fossom LH et al. *J Pharmacol Exp Ther* 275,753-760, 1995
11. Tsuda M, Suzuki T and Misawa M. *Neurosci Lett*, 240, 113-115, 1998.
12. Alper KR, Lotsof H, Frenken GMN et al. *Am J Addict* 8,234-242, 1999.
13. O'Callaghan JP, Rogers TS, Rodman LE et al. *Ann NY Acad Sci* 801,205-216, 1996.
14. O'Hearn E, Zhang P and Molliver ME. *NeuroReport* 6,1611-1616, 1995.
15. O'Hearn E and Molliver ME. *J Neurosci* 17,8828-8841, 1997.
16. Scallet AC, Rountree R, Ye X et al. *Ann NY Acad Sci* 801,217-226, 1996.
17. Dunkley PR, Heath J, Harrison SM et al. *Brain Res* 441,59-71, 1988.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. *J Biol Chem* 193,265-275, 1951.
19. Miguez PV, Leal RB, Mantovani M et al. *NeuroReport* 10,67-70, 1999.
20. Swanson RA, Liu J, Miller JW et al. *J Neurosci* 17,932-940, 1997.
21. Romano C, Price MT and Olney, JW. *J Neurochem.* 65,59-67, 1995.
22. Hough LB, Pearl SM and Glick SD. *Life Sci* 58,PL119-122, 1996.



23. Pearl SM, Hough LB, Boyd DL et al. *Pharmacol Biochem Behav* 4,809-815, 1997.
24. Staley JK, Ouyang Q, Pablo, J et al. *Psychopharmacol* 127,10-18, 1996.
25. Nichols DG. *Proteins, Transmitter and Synapses*. Blackwell Scientific Publications:Cambridge, 1994.
26. Mach RH, Smith CR and Childers SR. *Life Sci* 57,PL57-62, 1995.

Figure 1- Effects of ibogaine on basal (●) and K<sup>+</sup>-stimulated (■) release of [<sup>3</sup>H] glutamate from mice cortical (A) and cerebellar (B) synaptosomes. Glutamate released is expressed as percentage of total radioactivity content. Data are means ± SEM from 4-8 independent experiments. \* = p<0.05, compared to control (basal release in the absence of ibogaine), ANOVA/ Duncan.

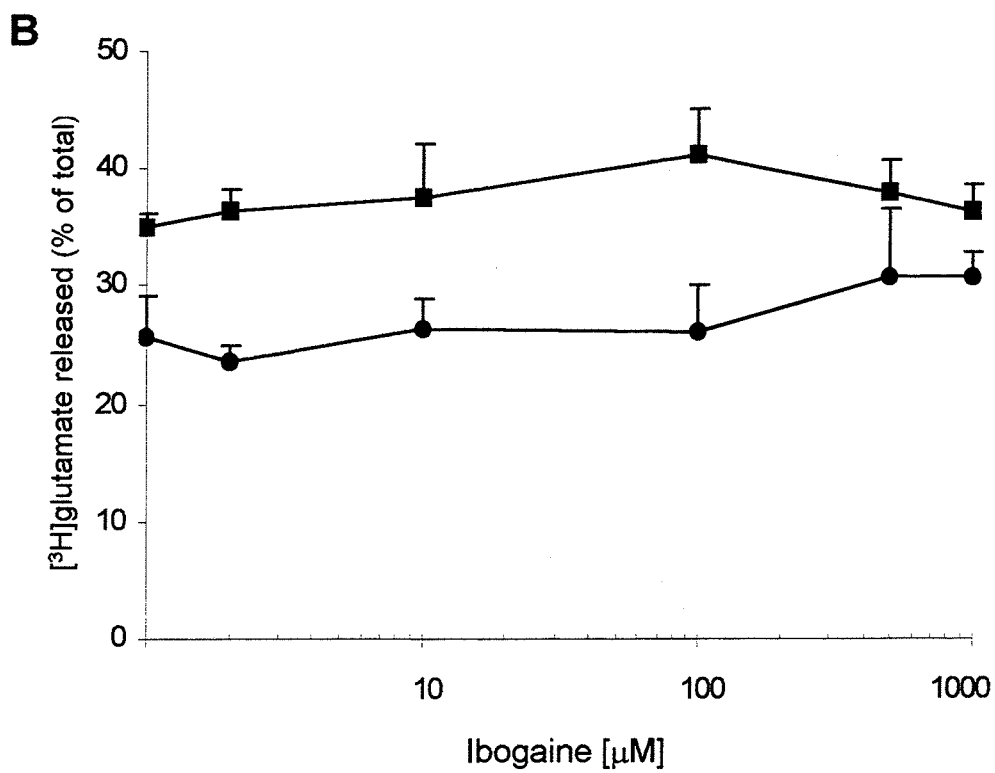
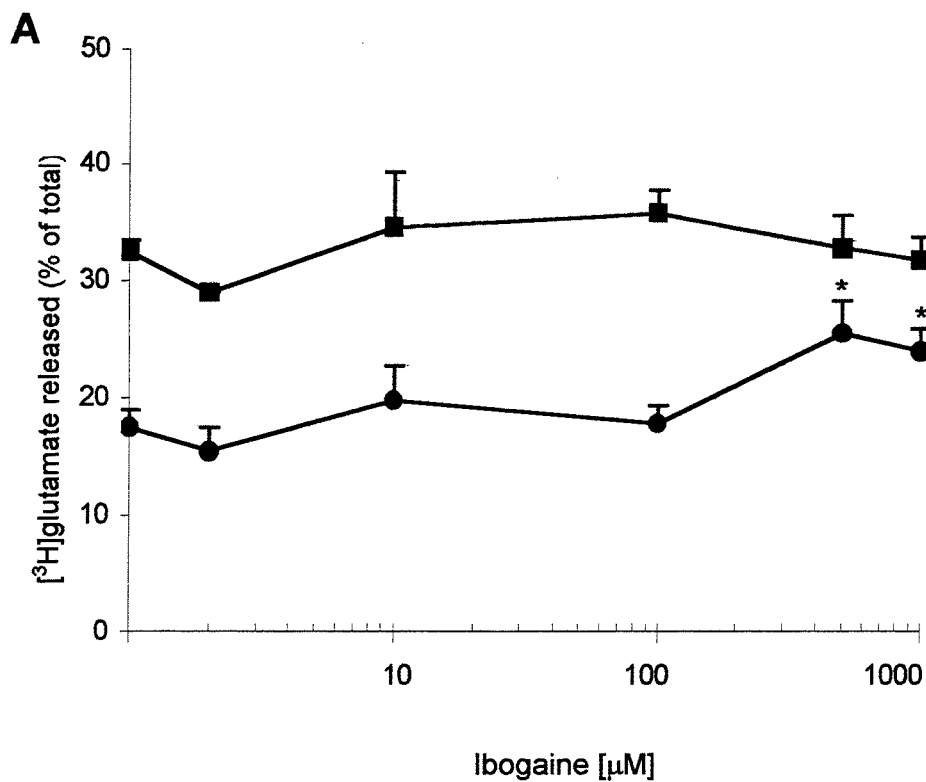


Figure 2 - Effect of the absence of calcium on [<sup>3</sup>H]glutamate release induced by Ibogaine (Ib 1 mM) or 40 mM KCl (K<sup>+</sup>) from mice cortical synaptosomes. Glutamate released is expressed as a percentage of control (low K<sup>+</sup>-concentration, without ibogaine). Data are means ± SEM from 7 independent experiments. \* = p<0.05 and \*\* = p<0.01, compared to respective control. # = p<0.05, compared to K<sup>+</sup>-induced release in the presence of Ca<sup>2+</sup>, ANOVA/ Duncan.

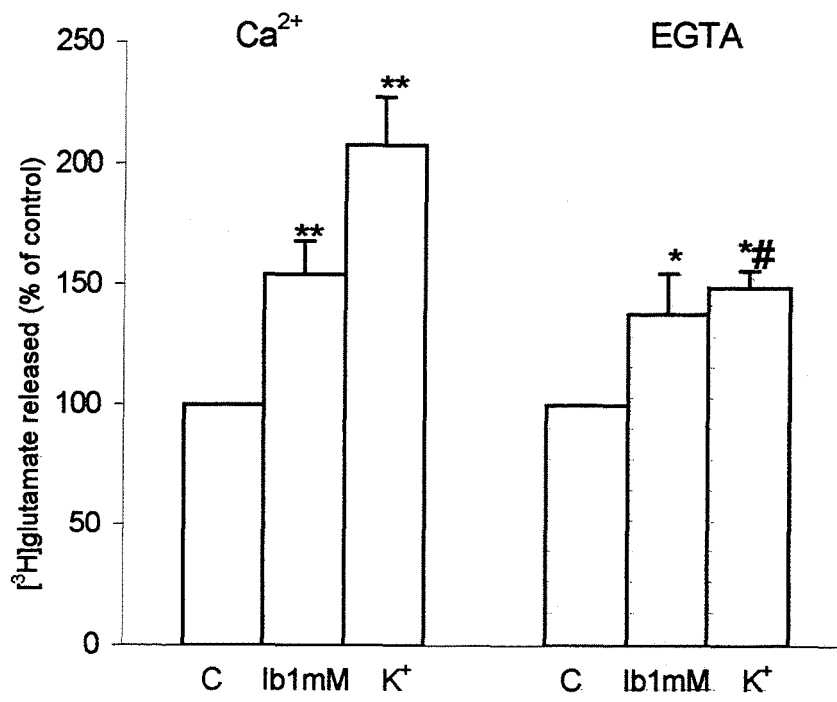


Figure 3- Effect of TTX on [<sup>3</sup>H]glutamate release induced by ibogaine (Ib 1 mM) or 20 μM veratridine (V) from mice cortical synaptosomes. Glutamate released is expressed as percentage of total radioactivity content. Data are means ± SEM from 4-6 independent experiments. \*\* = p<0.01, compared to respective control. # = p<0.05, compared to veratridine without TTX, ANOVA/ Duncan.

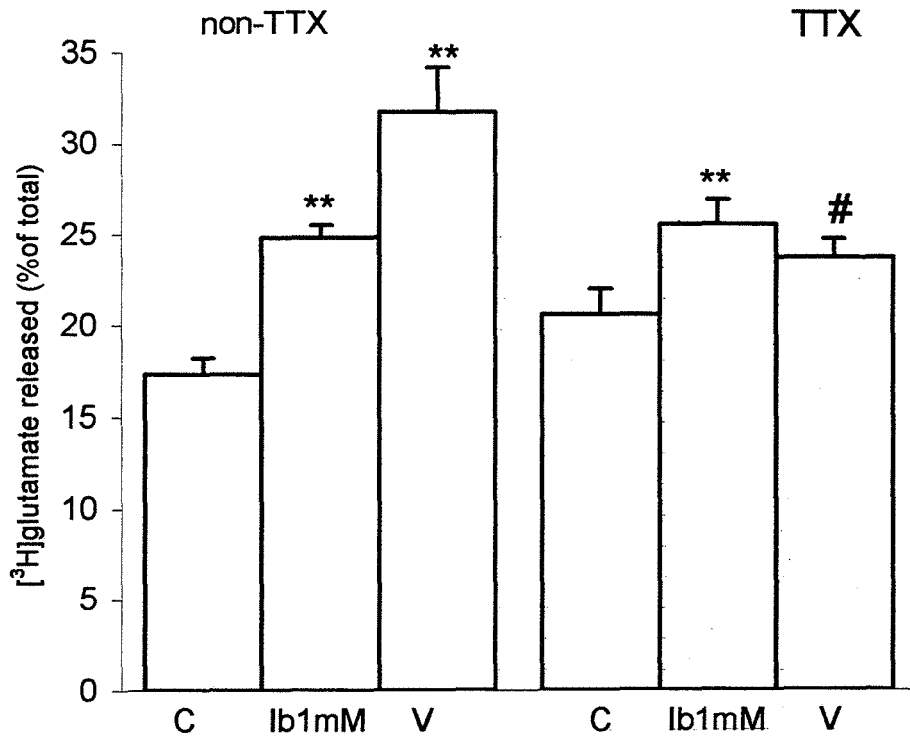
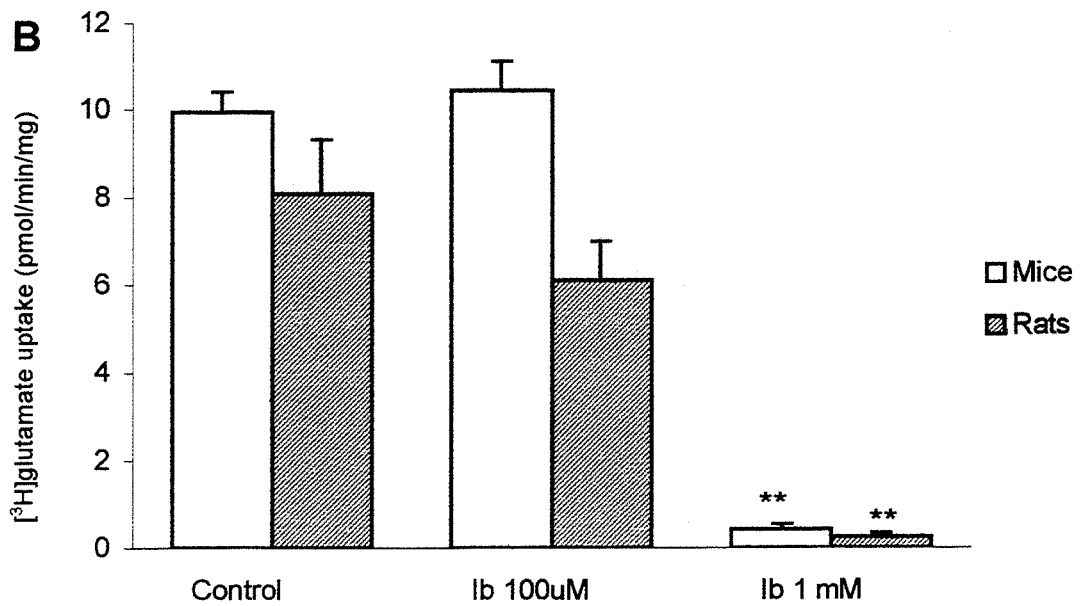
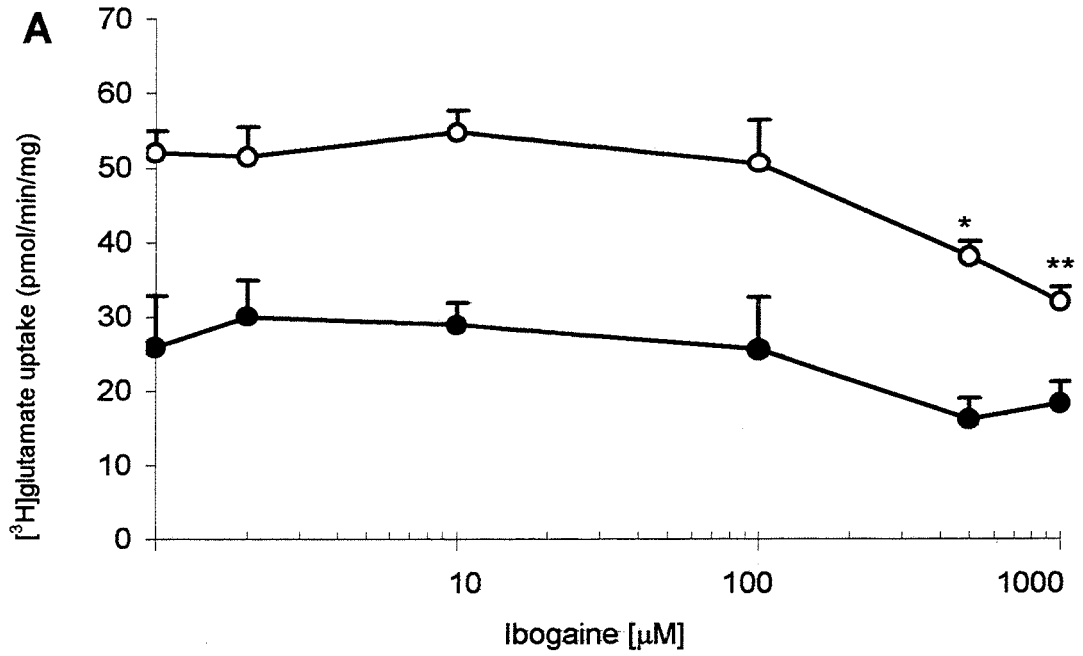


Figure 4 - Effects of ibogaine on [<sup>3</sup>H] glutamate uptake by cortical (○) and cerebellar (●) synaptosomes of mice (A), and by cortical astrocyte cultures of mice and rats (B). [<sup>3</sup>H]Glutamate uptake is expressed as pmol/min/mg of protein. Data are means ± SEM from 3-5 independent experiments. \* = p<0.05 and \*\* = p<0.01, compared to control, ANOVA/Duncan.





### **3. DISCUSSÃO**

O desenvolvimento de farmacoterapias para a drogadição tem sido baseado num paradigma de modo de ação único de determinadas drogas. Entre as farmacoterapias destacam-se as terapias de substituição ou reposição, tais como metadona e nicotina para tratar dependência de heroína e tabaco, respectivamente. Porém estes tratamentos, quando finalizados, são acompanhados de um índice de recaída muito alto (por exemplo, pacientes tratados com metadona chegam a 80% de recaída pós-tratamento) (WOLF, 1998a; BISAGA & POPIK, 2000). Como alternativa, atualmente os esforços têm sido direcionados para a busca de terapias que modulem ou interfiram no mecanismo de ação das drogas de abuso ou da própria drogadição (GLICK & MAISONNEUVE, 2000; BISAGA & POPIK, 2000). Estas terapias podem ser denominadas de “interferência” (GLICK & MAISONNEUVE, 1998). Dentro deste contexto, surgem as alegações das propriedades antiaditivas de ibogaína.

Vários relatos de casos, sustentados por alguns estudos clínicos, tem sugerido que uma única dose de ibogaína é capaz de interromper os aspectos fisiológicos e psicológicos da síndrome de abstinência, e eliminar a compulsão pelo uso de drogas por longos períodos de tempo (SISKO, 1993; LOTSOFF, 1995; POPIK et al., 1995b; GLICK & MAISONNEUVE, 1998). Estudos experimentais tem indicado que ibogaína realmente interfere na dependência e nos sintomas da síndrome de abstinência de opióides, estimulantes e etanol em roedores (GLICK et al., 1991; POPIK et al., 1995b; GLICK & MAISONNEUVE, 1998). Embora as bases neuroquímicas para esta atividade antiaditiva ainda não estejam totalmente esclarecidas, se sabe que a ibogaína é capaz de interferir em vários sistemas de neurotransmissores

(DEECHER et al., 1992; MASH et al., 1995; PEARL et al., 1995a; SWEETNAM et al., 1995; STALEY et al., 1996; FRYER & LUKAS, 1999).

Ibogaína parece ter um mecanismo de ação profundamente diferente das outras drogas atualmente disponíveis na farmacoterapia da drogadição. Ibogaína não parece ser um antagonista ou agonista dopaminérgico, ou opióide convencional, ou ainda um inibidor de recaptção de monoaminas; também não se trata de uma terapia de substituição como a metadona (POPIK et al., 1995b; GLICK & MAISONNEUVE, 1998; MASH et al., 1998, ALPER et al., 2000). A afinidade significativa de ibogaína por múltiplos sítios de ligação dentro do sistema nervoso central, levanta a hipótese de que seu efeito antiaditivo possa ser o resultado de uma complexa interação com e entre os múltiplos sistemas neurotransmissores (POPIK et al., 1995b; SWEETNAM et al., 1995; STALEY et al., 1996; MASH et al., 1998; GLICK & MAISONNEUVE, 1998). Tem sido demonstrado que ibogaína tem afinidade por receptores  $\mu$  e  $\kappa$ -opióides, receptores  $\sigma$  (agindo como agonista), e pelos receptores glutamatérgico NMDA e colinérgico nicotínico (agindo como antagonista). Muito interesse tem sido dado ao antagonismo do receptor NMDA como um possível mecanismo de ação, com particular relevância para o suposto efeito na síndrome de abstinência de opióides (MASH et al., 1995, 1998; POPIK et al., 1995a; CHEN et al., 1996; LAYER et al., 1996; GLICK & MAISONNEUVE, 1998). Este interesse deve-se, principalmente, aos resultados de vários estudos que mostram que antagonistas de receptores NMDA aliviam os aspectos físicos e motivacionais da síndrome de abstinência, atenuam a dependência, a tolerância, a sensibilização, e o reforço produzidos por várias drogas de abuso (TRUJILLO & AKIL, 1991; WOLF & KHANSA, 1991; SHOIAB & STOLERMAN, 1992, 1996; KHANNA et al., 1993; PUDIACK & BOZARTH, 1993; FILE & FERNANDES, 1994; POPIK & SKOLNICK, 1996;

OH et al., 1997; POPIK & DANYSZ, 1997; TSUDA et al., 1997, 1998a,b,c; WOLF, 1998b). A demonstração de que antagonistas de receptores NMDA, tal como o MK-801, podem interferir com o desenvolvimento, manutenção e expressão do processo fisiopatológico comum a todas as drogas de abuso, tem óbvias implicações terapêuticas (BISAGA & POPIK, 2000). De fato, o receptor NMDA exerce um importante papel na plasticidade neuronal e comportamental (OZAWA et al, 1998; DINGLELINE et al., 1999) e tem sido associado tanto com as funções normais do cérebro (como aprendizado e memória) como na neurodegenera o associada a doenç as agudas ou cr nicas (como choque isqu mico, epilepsia e doenç a de Parkinson) (DINGLELINE et al., 1999). Sabe-se que o uso crônico de drogas levam a neuroadaptaç es no sistema de reforço no SNC. Estas neuroadaptaç es contribuem tanto para os processos de compulsão pela droga, quanto para as recaídas observadas após um período de abstinência (NESTLER, 1992; SELF & NESTLER, 1995; KOB, 1999; SELF, 1998). A aprendizagem também está associada a estes processos (SELF, 1998). As altera es que ocorrem a longo prazo com exposi o crônica a drogas podem ser mediadas pela neurotransmissão glutamatérgica, através dos receptores NMDA (NESTLER & AGHAJANIAN, 1997).

O objetivo principal deste trabalho foi contribuir para o esclarecimento do mecanismo de a o anti-aditivo e neurotóxico de ibogaína, focalizando principalmente o sistema glutamatérgico e as intera es de ibogaína com os receptores NMDA *in vivo* e *in vitro*.

Nós avaliamos a participa o dos receptores NMDA nos efeitos de curto e longo prazo de uma única administra o de ibogaína. O fizemos através da investiga o do efeito de ibogaína sobre convulsões induzidas por NMDA e em paralelo na união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801, em membranas de córtex cerebral de camundongos aos 30 min, 24, 48 e 72 h após o

tratamento com ibogaína (Artigo 1).

Foi observado que ibogaína inibiu 50 % das convulsões induzidas por NMDA quando as convulsões foram induzidas 24 e 72 h pós ibogaína; não se observou efeito quando as convulsões foram induzidas 30 min ou 48 h após ibogaína. Estes resultados mostraram correlação temporal com a diminuição da união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 em membranas de córtex cerebral de camundongos tratados com ibogaína. Também observamos que as doses de ibogaína usadas induziram tremor temporário, mas não ataxia. Através do teste do desempenho no Rota-rod, foi verificado que os animais não apresentaram déficit motor após 60 min da administração de ibogaína. O teste também foi realizado 24, 48 e 72 h após a administração de ibogaína, sem nenhum déficit observado.

Presença de tremor logo após a administração de ibogaína tem sido relatada, tanto em roedores (GLICK & MAISONNEUVE, 1998) quanto em humanos (GOUTAREL, 1993; LOTSOFF, 1995, MASH et al., 1998), mas nenhum dano tecidual foi relatado após administração de até 100 mg/kg em camundongos (SCALLET et al., 1996). Portanto, aliando estas informações aos resultados do teste de Rota-rod, pode-se sugerir que o antagonismo duradouro provocado por uma única dose de ibogaína quanto a convulsões induzidas por NMDA, demonstrado neste trabalho, não é resultado de toxicidade a longo prazo. No entanto o modelo de atividade intermitente de ibogaína observado tanto nas convulsões induzidas por NMDA, quanto na união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801, refuta explicações simplistas.

Há na literatura a discussão sobre o papel da noribogaína, nos efeitos a longo prazo encontrados com ibogaína. Embora tenha sido demonstrado que este metabólito tenha menor afinidade do que ibogaína pelo receptor NMDA, poderia ser sugerido que as alterações desencadeadas por ibogaína, poderiam ser reforçadas ou mantidas pelo seu metabólito (MASH

et al., 1995, 1998; STALEY et al., 1996). Outra consideração importante quanto à farmacocinética de ibogaína, refere-se à sua afinidade pelo tecido adiposo (HOUGH et al., 1996, 2000). Ibogaína poderia ser temporariamente sequestrada no tecido adiposo e a sua liberação gradual é que levaria a uma adaptação neuronal significativa, e aos consequentes efeitos a longo prazo.

É possível postular que os efeitos observados 24 h após o tratamento com ibogaína possam ser um efeito direto de ibogaína ou seu metabólito no receptor NMDA, enquanto que o efeito observado após 72 h possa ser decorrente de um efeito secundário de ibogaína, mediado por uma cascata de eventos intracelulares levando a uma expressão alterada dos receptores NMDA. ALI et al. (1999) demonstraram que uma única administração de ibogaína induz a expressão dos genes de expressão precoce *egr-1* e *c-fos* em várias regiões do cérebro, entre elas o córtex cerebral frontal de camundongos. Alguns estudos mostram que ativação de *c-fos* no cérebro é induzida por vários estímulos (HERRERA & ROBERTSON, 1995) e que este gene interfere em processos de memória, estados emocionais ou efeitos de drogas a longo prazo (NESTLER, 1992; GRAEFF, 1999), e *egr-1* está envolvido na plasticidade neuronal do hipocampo, especialmente LTP e processos cognitivos (ABRAHAM et al., 1993; MELLO et al., 1992). Entre as drogas que induzem estes genes, encontram-se os psicoestimulantes, tais como cocaína e anfetamina. Esta indução provocada por ibogaína poderia estar relacionada ao seu efeito na neurotransmissão dopaminérgica e/ou serotoninérgica; porém diferentemente dos psicoestimulantes, ibogaína também induziu *egr-1* e *c-fos* no septo e hipocampo. Os autores sugeriram que o efeito de ibogaína nestas áreas poderia estar relacionado com o bloqueio de receptores NMDA (ALI et al., 1999). No entanto, o efeito esperado de ibogaína, no que se refere ao seu efeito antagonista de receptores NMDA, seria de inibição da indução destes

genes, já que a administração aguda de MK-801 bloqueou a indução da expressão de *c-fos* e outros genes no hipocampo em estudos de LTP (WORLEY et al., 1993). Por enquanto as teorias relacionados ao efeito de ibogaína na indução dos genes de expressão precoce não passam de especulações; mais estudos precisariam ser feitos para esclarecer a relação do efeito antiaditivo de ibogaína e a indução destes genes.

Considerando o envolvimento dos receptores NMDA nos efeitos a longo prazo de ibogaína evidenciado neste trabalho, e considerando-se que o antagonismo de receptores NMDA por ibogaína possa ser relevante para o efeito na síndrome de abstinência de opióides (MASH et al., 1995, 1998; POPIK et al., 1995a; CHEN et al., 1996; LAYER et al., 1996; GLICK & MAISONNEUVE, 1998), também foi objetivo deste trabalho contribuir para o esclarecimento do papel dos receptores NMDA no mecanismo de ação de ibogaína na dependência de morfina (Artigo 2).

Neste trabalho nós comparamos o efeito de ibogaína, MK-801 e a co-administração de ibogaína e MK-801 na expressão de abstinência precipitada por naloxona em camundongos dependentes de morfina. “Jumping” (o principal sinal de abstinência precipitado por naloxona em animais dependentes de morfina) foi significativamente inibido por ibogaína e MK-801. Observou-se também um efeito sinérgico entre ibogaína e MK-801, já que a co-administração dos dois inibe o “jumping” e diminui a dose necessária de cada substância para esta inibição significativa. Estes resultados sugerem que o efeito da ibogaína na síndrome de abstinência de opióides pode ser mediado por receptores NMDA. Corroborando esta hipótese, demonstramos ainda que a administração de NMDA em camundongos sem tratamento prévio com morfina, pode induzir “jumping” semelhante àquele precipitado por naloxona. Este “jumping” também pode ser inibido por ibogaína, quando esta é administrada 30 min (mas não 24h) antes da

administração de NMDA. Este resultado sugere que o “jumping” pode ser resultado de uma ativação aguda do receptor NMDA e que esta ativação pode ser crucial na expressão aguda da síndrome de abstinência de opióides.

A fim de melhor investigar o efeito de ibogaína na síndrome de abstinência de morfina, bem como o envolvimento dos receptores NMDA, foi avaliado o efeito de ibogaína na união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 em membranas de córtex cerebral de camundongos abstinentes. Os resultados mostraram que a união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 não foi alterada pela dependência à morfina, ou pelo tratamento prévio com ibogaína ou MK-801.

Estes resultados indicam que não há alteração no número ou na sensibilidade de receptores NMDA durante a síndrome de abstinência, corroborando a idéia de que este fenômeno possa estar de fato relacionado a uma alteração funcional transitória dos receptores NMDA. Isto está de acordo com o proposto por NESTLER & AGHAJANIAN (1997) quanto ao curso de tempo das alterações resultantes da exposição às drogas, que entende a síndrome de abstinência como um fenômeno a curto prazo, relacionado, entre outros fatores, a um aumento da transmissão glutamatérgica nesta fase. O fato de não ter sido encontradas alterações na união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 em córtex de camundongos dependentes e abstinentes de morfina, não exclui a possibilidade do envolvimento dos receptores NMDA na dependência e tolerância induzida por morfina. Estes processos estão relacionados com alterações a longo prazo induzidas por drogas, e de fato foi demonstrado que a união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801 não é alterada em córtex cerebral, mas está aumentada em hipocampo de camundongos cronicamente tratados (3 dias) com “pellets” de morfina implantados subcutaneamente (GUDEHITHLU & BHARGAVA, 1996).



Os receptores glutamatérgicos de várias áreas cerebrais parecem também estar envolvidos no efeito de diversas drogas de abuso. Sabe-se que o sistema dopaminérgico mesolímbico está relacionado com as propriedades reforçadoras positivas das drogas de abuso, e tem sido sugerido que o efeito a longo prazo induzido por estas drogas neste sistema possa ser decorrente da estimulação de receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA na área tegmental ventral (FITZGERALD et al., 1996; NESTLER & AGHAJANIAN, 1997, SELF, 1998). Esta hipótese foi baseada nos resultados de estudos do efeito da administração crônica de cocaína e morfina na expressão de subunidades específicas de receptores glutamatérgicos na área tegmental ventral: os resultados mostraram que cocaína aumenta a expressão tanto da subunidade GluR1 de receptores glutamatérgicos AMPA, quanto da subunidade NMDAR1 de receptores NMDA, enquanto morfina aumenta somente a expressão da subunidade GluR1 de receptores AMPA (FITZGERALD et al., 1996). Aumento da expressão de GluR1 e NMDAR1 também foram observados com administração crônica de etanol (ORTIZ et al., 1995). Drogas psicotrópicas que não causam reforço ou sensibilização (ex. desipramina, sertralina, haloperidol ou racloprida) não tem efeito na regulação da expressão destas subunidades na área tegmental ventral (FITZGERALD et al., 1996). Portanto, o efeito da morfina na área tegmental ventral estaria mais relacionado com receptores AMPA. No entanto o efeito de ibogaína na dependência de opióides não seria mediado através destes receptores, já que SWEETNAM et al. (1995) mostraram que ibogaína não tem afinidade por receptores AMPA.

O papel dos receptores NMDA na dependência de morfina precisa ser melhor esclarecido e, mesmo que inúmeros outros mecanismos possam estar envolvidos, não se pode desprezar o fato de que antagonistas de receptor NMDA interferem em várias fases do processo induzido pela administração crônica de morfina. Tolerância/ dependência e síndrome

de abstinência podem ser considerados processos independentes (NESTLER & AGHAJANIAN, 1997). Tolerância e dependência podem ser o resultado de uma adaptação neuronal induzida por repetidas administrações de drogas, e os receptores NMDA podem estar implicados no estabelecimento destas alterações a longo prazo (RIPLEY & LITTLE, 1995; ROSSETTI & CARBONI, 1995).

Nossos estudos corroboram com esta hipótese, sugerindo que durante a síndrome de abstinência de morfina ocorre uma alteração funcional aguda e transitória do receptor NMDA que pode ser antagonizada pela ibogaína. O efeito de ibogaína na inibição da expressão de receptores NMDA que só é visto a longo prazo pode, por sua vez, mediar os processos relacionados à dependência e tolerância induzidas por morfina.

Sabe-se, no entanto, que a neuroadaptação induzida por drogas pode também depender de alteração de mecanismos de transdução (NESTLER, 1992; NESTLER & AGHAJANIAN, 1997). A administração crônica de morfina provoca um aumento na expressão da enzima adenilato ciclase no córtex cerebral e hipocampo, regiões que parecem ser importantes no efeito a longo prazo de drogas, em especial os efeitos cognitivos (NESTLER & AGHAJANIAN, 1997). A atividade da enzima adenilato ciclase estimulada por ativação de receptores opióides foi inibida por ibogaína, enquanto a administração de ibogaína ou de noribogaína não altera a atividade da enzima não estimulada por opióides (RABIN & WINTER, 1996). Este efeito pode, portanto, ser um dos mecanismos pelos quais ibogaína interfere a longo prazo na dependência de morfina. As alterações por ibogaína de fatores de transcrição que estão relacionadas com alterações a longo prazo induzida por drogas, como discutido anteriormente, pode ser outro mecanismo pelo qual a ibogaína exerça efeitos na dependência de opióides.

A transmissão glutamatérgica pode estar associada a processos fisiológicos e patológicos, já que o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pode ser responsável tanto pela alteração de plasticidade neuronal associada a funções normais do cérebro, quanto à neurotoxicidade (NAKANISHI, 1992; OZAWA et al., 1998, SATTLER & TYMIANSKI, 2000). Como foi sugerido que a neurotoxicidade causada por altas doses de ibogaína poderia estar associada a uma hiperestimulação do sistema glutamatérgico (O'HEARN & MOLLIVER, 1997), outro objetivo desta tese foi avaliar o papel do glutamato no efeito neurotóxico de ibogaína. Investigou-se o efeito de ibogaína na liberação e captação de [ $^3\text{H}$ ] glutamato em preparações de sinaptossomas de córtex cerebral e cerebelo de camundongos e ratos, e na captação de [ $^3\text{H}$ ] glutamato em culturas de astrócitos de córtex cerebral de camundongos e ratos (Artigo 3).

Uma rápida remoção do glutamato do espaço extracelular é necessária para prevenir o efeito neurotóxico da superestimulação dos receptores glutamatérgicos (CHEN et al., 2000). A remoção do glutamato da fenda sináptica ocorre através da recaptação deste neurotransmissor por transportadores  $\text{Na}^+$ -dependentes, de alta afinidade, localizados na membrana neuronal ou na membrana de células gliais (ANDERSON & SWANSON, 2000; TANAKA, 2000). A captação de glutamato pelas células gliais é mais importante para a finalização da transmissão (NICHOLS, 1994; SWANSON et al., 1997; ANDERSON & SWANSON, 2000; CHEN et al., 2000). Nossos resultados mostraram que altas concentrações de ibogaína estimularam a liberação e inibiram a captação de [ $^3\text{H}$ ] glutamato por sinaptossomas de córtex cerebral de camundongos. A inibição foi quase completa na captação de [ $^3\text{H}$ ] glutamato em culturas de astrócitos de córtex cerebral de camundongos e ratos. Considerando a importância da captação por astrócitos tanto em processos patológicos quanto fisiológicos, pode-se dizer que o efeito de ibogaína na captação glial é o mais relevante.

Demonstramos ainda que ibogaína não alterou a liberação de [<sup>3</sup>H] glutamato na presença de concentrações despolarizantes de potássio (K<sup>+</sup>). A fim de melhor investigar o mecanismo pelo qual altas concentrações de ibogaína afetam a liberação de [<sup>3</sup>H] glutamato, nós comparamos o efeito de ibogaína na presença e ausência de cálcio. Os resultados mostraram que ibogaína (diferentemente do K<sup>+</sup>) altera a liberação de [<sup>3</sup>H] glutamato por um mecanismo independente de cálcio exógeno. Demonstramos também que os canais de sódio voltagem dependentes não estão envolvidos na liberação de glutamato induzida por ibogaína, já que a adição de TTX não alterou o efeito de ibogaína.

Os resultados mostram que ibogaína aumenta a concentração de glutamato na fenda sináptica, por mecanismo independente de cálcio extracelular e de canais de sódio voltagem dependente. A ativação de receptores sigma-2 tem sido sugerida na literatura como um possível mecanismo pelo qual ibogaína leva a uma liberação de glutamato (GLICK & MAISONNEUVE, 1998). A inibição da captação sinaptossomal e, principalmente, da captação glial em córtex cerebral de camundongos, reforça a proposta de que altas concentrações de ibogaína podem aumentar o glutamato extracelular, levando a concentrações excitotóxicas na fenda sináptica. Através dos resultados deste trabalho nós demonstramos, pela primeira vez, um efeito direto de ibogaína na liberação e captação de glutamato. Este efeito de ibogaína pode estar relacionado com a excitotoxicidade atribuída à esta droga. O efeito de ibogaína tanto na liberação quanto na captação de glutamato, não pode ser relacionado com as propriedades antiaditivas de ibogaína: primeiro porque o mecanismo proposto para o seu efeito terapêutico envolve inibição (e não estimulação) do sistema glutamatérgico; segundo, porque as concentrações de ibogaína associadas a doses terapeuticamente relevantes, não apresentaram efeitos significativos na liberação ou captação

de [<sup>3</sup>H] glutamato nos sistemas estudados.

Ibogaína também não apresentou efeito significativo, em todas concentrações testadas, na liberação ou na captação de [<sup>3</sup>H] glutamato por sinaptossomas de cerebelo de camundongos e ratos, nem em córtex cerebral de ratos. Estes resultados estão de acordo com os vários relatos indicando que o efeito tóxico de ibogaína é diferente entre ratos e camundongos (SCALLET et al., 1996), incluindo também diferenças entre estruturas. Toxicidade cerebelar induzida por ibogaína, não foi encontrada em humanos (dados clínicos incluindo estudos pós-morte) na dose considerada efetiva para detoxificação de dependentes de opióide e cocaína (MASH et al., 1998). As diferenças nos efeitos de ibogaína na captação em camundongos e ratos, astrócitos e neurônios, córtex cerebral e cerebelo, podem estar relacionadas com a expressão de vários sistemas de transporte envolvidos na captação de glutamato.

Cabe ainda ressaltar que as diferenças e contradições que tem sido observadas na literatura em relação ao efeito da ibogaína em um mesmo modelo experimental, podem estar muitas vezes relacionadas com as diferenças de doses, espécies e sexo utilizadas. Deve-se, portanto, ter cuidado na extrapolação de dados relacionados com efeitos de ibogaína, principalmente o efeito tóxico por ser dependente de vários fatores.

Este trabalho demonstrou que o sistema glutamatérgico em geral, e os receptores NMDA em particular, estão envolvidos no efeito antiaditivo de ibogaína, e podem estar relacionados a um efeito neurotóxico de altas doses desta droga.

Ibogaína deve continuar merecendo atenção especial no que se refere ao esclarecimento de seu mecanismo de ação, em especial no sistema glutamatérgico. Mesmo que esta droga não seja introduzida na terapêutica, ela pode ser considerada uma droga protótipo, podendo servir de ferramenta para a melhor compreensão de processos relacionados a

drogadição, bem como para o desenvolvimento de outras drogas na terapia de drogadição, e também para outras doenças neuropsiquiátricas

Este trabalho também confirma a importância do estudo de produtos naturais usados por comunidades tradicionais como uma importante fonte de novas substâncias protótipos ou terapêuticas.

#### 4. CONCLUSÕES

- Uma única administração de ibogaína resulta em efeitos a longo prazo mensuráveis *in vivo* e *in vitro*.

↳ estes efeitos não são atribuíveis à toxicidade.

- Sugere-se que a ibogaína induza alterações funcionais de longo prazo em receptores glutamatérgicos NMDA.

↳ tais alterações podem ser relevantes no contexto terapêutico de ibogaína e outros antagonistas NMDA.

- Ibogaína e MK-801 inibem de maneira dose-dependente, e atuam sinergicamente, quanto à inibição do “jumping” precipitado por naloxona em camundongos dependentes de morfina.

↳ sugere-se que este efeito da ibogaína de fato pode ser mediado por receptores NMDA.

- A administração crônica de morfina não provoca alterações em receptores NMDA em córtex cerebral de camundongos mensuráveis através da união específica de [<sup>3</sup>H] MK-801.

↳ a expressão da síndrome de abstinência não é diretamente relacionada a alterações na densidade e sensibilidade de receptores NMDA corticais.

- Ibogaína inibe agudamente o “jumping” induzido por NMDA; este efeito não é observado a longo prazo.

↳ sugere-se que os sinais da síndrome de abstinência de opióides possam estar associados à ativação aguda e transitória de receptores NMDA.

- Em altas concentrações (500 e 1000  $\mu\text{M}$ ) a ibogaína estimula a liberação e inibe a captação de glutamato em preparações de sinaptossomas de córtex cerebral (mas não de cerebelo) de camundongos (mas não de ratos).

- A estimulação da liberação de glutamato não ocorre em presença de concentrações despolarizantes de potássio; é independente de cálcio extracelular e de canais de sódio voltagem dependente.

- Ibogaína inibe a captação de glutamato (1000  $\mu\text{M}$ ) em culturas de astrócitos de córtex cerebral de camundongos e ratos.

↳ sugere-se que altas concentrações de ibogaína induzem efeitos neurotóxicos em regiões específicas do cérebro.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, W.C., MASON, S.E., DEMMER, J., WILLIAMS, J.W., RICHARDSON, C.L., TATE, W.P., LAWOR, P.A., DRAGUNOW, M. Correlation between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56:717-727, 1993.
- ACETO, M.D., BOWMAN, E.R., HARRIS, L.S. Dependence studies of new compounds in the rhesus monkey, rat and mouse. *NIDA Res. Monogr.* 95:578-631, 1990.
- AHMED, A.G., SALIB, E., RUBEN, S. Psychiatric disorders in first-degree relatives of patients with opiate dependence. *Med Sci Law* 39:219-227, 1999.
- ALI, S.F., NEWPORT, G.D., SLIKKER Jr, W., ROTHMAN, R.B., BAUMANN, M.H. Neuroendocrine and neurochemical effects of acute ibogaine administration: a time course evaluation. *Brain Res.* 737:215-220, 1996.
- ALI, S.F., THIRIET, N., ZWILLER, J. Acute ibogaine injection induces expression of the immediate early genes, *egr-1* and *c-fos*, in mouse brain. *Mol. Brain Res.* 74:237-241, 1999.
- ALPER, K.R., LOTSOFF, H.S., FRENKEN, G.M.N., LUCIANO, D.J., BASTIAANS, J. Treatment of acute opioid withdrawal with ibogaine. *Am. J. Addict.* 8:234-242, 1999.
- ALPER, K.R., LOTSOFF, H.S., FRENKEN, G.M.N., LUCIANO, D.J., BASTIAANS, J. Ibogaine in acute opioid withdrawal – An open label case series. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 909:257-259, 2000.

- ALTERMAN, A.I., DROBA, M., ANTELO, R.E., CORNISH, J.W., SWEENEY, K.K., PARIKH, G.A., O'BRIEN, C.P. Amantadine may facilitate detoxification of cocaine addicts. *Drug Alcohol Depend.* 31:19-29, 1992.
- ANDERSON, C.M., SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14, 2000.
- BADIO, B., PADGETT, W.L., DALY, J.W. Ibogaine: a potent noncompetitive blocker of ganglionic/neuronal nicotinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 51:1-5, 1997.
- BAGAL, A. A., HOUGH, L.B., NALWALK, J.W., GLICK, S.D. Modulation of morphine-induced antinociception by ibogaine and noribogaine. *Brain Res.* 741:258-262, 1996.
- BANBERY, J. Treatment of withdrawal syndromes In: *Drug Abuse Handbook*. Edit. por J. KARKH. Cap. 7, p. 512-526. CRC: São Francisco, 1998.
- BAUMANN, M.H., ROTHMAN, R.B., ALI, S.F. Neurochemical and neuroendocrine effects of ibogaine: comparison to MK-801. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 844:252-264, 1998.
- BAUMANN, M.H., ROTHMAN, R.B., ALI, S.F. Comparative neurobiological effects of ibogaine and MK-801 in rats. *Drug Alcohol Depend.* 844:252-264, 2000.
- BENWEL, M.M., HOLTOM, P.E., MORAN, R.J., BALFOUR, D.K. Neurochemical and behavioural interactions between ibogaine and nicotine in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 117:743-749, 1996.
- BERGEN, A.W., CAPORASO, N. Cigarette smoking. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1365-1375, 1999.
- BESPALOV, A.Y., ZVARTAU, E. Intraaccumbens administration of NMDA receptor antagonist (+/-)-CPP prevents locomotor activation conditioned by morphine and amphetamine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55:203-207, 1996.

- BHARGAVA, H.N., CAO, Y-J. Effects of noribogaine on the development of tolerance to antinociceptive action of morphine in mice. *Brain Res.* 771:343-346, 1997.
- BHARGAVA, H.N., CAO, Y-J., ZHAO, G-M. Effects of ibogaine and noribogaine on the antinociceptive action of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptor agonists in mice. *Brain Res.* 752:234-238, 1997.
- BISAGA, A., GIANELLI, P., POPIK, P. Opiate withdrawal with dextromethorphan. *Am. J. Psychiatry* 154:584, 1997.
- BISAGA, A., POPIK, P. In search of a new pharmacological treatment for drug and alcohol addiction: N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. *Drug Alcohol Depend.* 59:1-15, 2000.
- BLACKBURN, J.R., SZUMLINSKI, K.K. Ibogaine effects on sweet preference and amphetamine induced locomotion: implications for drug addiction. *Behav. Brain Res.* 89:99-106, 1997.
- BLOOM, F.E. Neurotransmissão e o Sistema Nervoso Central. In: *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Edit. por J.G. HARDMAN; L.E LIMBIRD. 9. ed. Cap. 12, p.197-216. MacGraw Hill:Rio de Janeiro, 1996.
- BOWEN, W.D., VILNER, B.J., WILLIAMS, W., BERTHA, C.M., KUEHNE, M.E., JACOBSON, A.E. Ibogaine and its congeners are  $\sigma_2$  receptor selective ligands with moderate affinity. *Eur. J. Pharmacol.* 279:R1-R3, 1995.
- BRISTOW, L.J., HOGG, J.E., HUTSON, P.H. Competitive and glycine/NMDA receptor antagonists attenuate withdrawal-induced behaviours and increased hippocampal acetylcholine efflux in morphine-dependent rats. *Neuropharmacology*, 36:241-250, 1997.

- BRODERICK P.A. PHELAN, F.T., BERGER, S.P. Ibogaine alters cocaine-induced biogenic amine and psychostimulant dysfunction but not [<sup>3</sup>H] GBR-12935 binding to the dopamine transporter protein. In: Problems of Drug Dependence, *NIDA Research Monograph*, 119: 285, 1992 apud POPIK, P.; LAYER, R.T.; SKOLNICK, P. 100 Years of Ibogaine: Neurochemical and Pharmacological Actions of a Putative Anti-addictive Drug. *Pharmacol. Rev.* 47:234-253, 1995.
- BRODERICK, P.A., PHELAN, F.T., ENG, F., WECHSLER, R.T. Ibogaine modulates cocaine response which are altered due to environmental habituation: In vivo microvoltammetric and behavioral studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49:711-728, 1994.
- BUCHER, R. A situação das drogas no Brasil: visão epidemiológica. *Drogas e Drogadição no Brasil*. pp 9-26. Artes Médicas:Porto Alegre, 1992.
- BUCHOLZ, K.K. Nosology and Epidemiology of addictive disorders and their comorbidity. *Psychiatr. Clin. North Am.*, 22(2): 221-239, 1999.
- CAO, Y-J, BHARGAVA, H.N. Effects of ibogaine on the development of tolerance to antinociceptive action of  $\mu$ -,  $\gamma$  and  $\kappa$ -opioid receptor agonists in mice. *Brain Res.* 752:250-254, 1997.
- CAPPENDIJK, S.L.T., DZOLJIC, M.R.. Inhibitory effects of ibogaine on cocaine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 241: 261-265, 1993.
- CAPPENDIJK, S.L., VRIES, R., DZOLJIC, M.R. Excitatory amino acid receptor antagonists and naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 3:111-116, 1993.

- CAPPENDIJK, S.L.T., FEKKES, D., DZOLJIC, M. The inhibitory effect of norharman on morphine withdrawal syndrome in rats: comparison with ibogaine. *Behavioural Brain Research* 65: 117-119, 1994.
- CHEN, K., KOKATE, T.G., DONEVAN, S.D., CARROL, F.I., ROGAWSKI, M.A. Ibogaine block of the NMDA receptor: *in vitro* and *in vivo* studies. *Neuropharmacology* 35:423-431, 1996.
- CHEN, Y., YING, W., SIMMA, V., CHEN, Y., COPIN, J-C., CHAN, P.H., SWANSON, R.A. Overexpression of Cu, Zn superoxide dismutase attenuates oxidative inhibition of astrocyte glutamate uptake. *J. Neurochem.* 75:939-945, 2000.
- CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634, 1988.
- COLLINS, E.D., WARD, A.S., McDOWELL, D.M., FOLTIN, R.W., FISCHMAN, M.W. The effects of memantine on the subjective, reinforcing and cardiovascular effects of cocaine in humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9:587-598, 1998.
- COTMAN C.W., KAHLE, J.L., MILLER, S.E., ULAS, J., BRIDGES, R.J. Excitatory amino acid neurotransmission. IN: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Edit. por F.E. Bloom, D.J. Kupfer. Cap. 6, pp.75-85. Raven-Press:New York, 1995.
- DAMIANOPOULOS, E.N., CAREY, R.J. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor mediation of cocaine induced corticosterone release and cocaine conditioned stimulant effects. *Behav. Brain Res.*, 68:219-228, 1995.

- DEECHER, D.C., TEITLER, M., SODERLUND, D.M., BORNMANN, W.G., KUEHNE, M.E., GLICK, S.D. Mechanisms of action of ibogaine and harmaline congeners based radioligand binding studies. *Brain Res.* 571: 242-247, 1992.
- Del POZO, E., BARRIOS, M. BAEYENS, J.M. The NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK-801) stereoselectively inhibits morphine induced place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology* 125: 209-213, 1996.
- DHAHIR. H.I., JAIN, N.C., FORNEY, R.B. The identification of ibogaine in biological materials. *J. Forensic. Sci.* 16:103-108, 1971.
- Di CHIARA, G., IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentration in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5274-5278, 1988.
- Di CHIARA, G., TANDA, G., CADONI, C., AVQUAS, C., BASSAREO, V., CARBONI, E. Homologies and differences in the action of drugs abuse and a conventional reinforcer (food) on dopamine transmission: an interpretative framework of the mechanism of drug dependence. *Adv. Pharmacol.* 42:983-987, 1998.
- DICHTER, M.A., WILCOX, K.S. Excitatory synaptic transmission. IN: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Edit. por J. Engel Jr, T.A. Pedley. Cap 23, pp. 251-263. Lippincott-Raven Publishers:Philadelphia, 1997.
- DINGLEDINE, R., McBAIN, C.J. Excitatory amino acid transmitters. In: *Basic Neurochemistry*. Edit. por G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, P.B. Molinoff, pp. 367-387, Raven Press: New York, 1994.
- DINGLEDINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51:7-62, 1999.

- DWORKIN, SI., GLEESON, S., MELONI, D., KOVES, T.R., MARTIN, T.J. Effects of ibogaine on responding maintained by food, cocaine and heroin reinforcement in rats. *Psychopharmacology* 117:257-261, 1995.
- DZOLJIC, E.D., KAPLAN, C.D., DZOLJIC, M.R. Effect of ibogaine on naloxone precipitated withdrawal syndrome in chronic morphine dependent rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 294, 64-70, 1988.
- ELLIOT, K., KEST, B., MAN, A., KAO, B., INTURRISI, C.E. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, mu and kappa opioid tolerance, and perspectives on new analgesic drug development. *Neuropsychopharmacology* 13:347-356, 1995.
- FIDECKA, S., LANGWINSKI, R. Interaction between ketamine and ethanol in rats and mice. *Pol. J. Pharmacol.* 41:23-32, 1989.
- FILE, S.E., FERNANDES, C. Dizocilpine prevents the development of tolerance to the sedative effects of diazepam in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47, 823-826, 1994.
- FITZGERALD, L.W., ORTIZ, J., HAMEDANI, A.G., NESTLER, E. J. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J. Neurosci.* 16:274-282, 1996.
- FRANCES, B., GOUT, R., CROS, J., ZAJAC, J.M. Effects of ibogaine on naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 6:327-332, 1992.
- FRENCH, E.D., DILLON, K., ALI, S.F. Effects of ibogaine, and cocaine and morphine after ibogaine, on ventral tegmental dopamine neurons. *Life Sci.* 59:PL199-PL205, 1996.

- FRYER, J.D., LUKAS, R.J. Noncompetitive functional inhibition at diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes by bupropion, phencyclidine, and ibogaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:88-92, 1999.
- GALDURÓZ, J.C.; D'ALMEIDA, V.; CARVALHO, V.; CARLINI, E.A. *IV Levantamento sobre o Uso de Drogas entre Estudantes de 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> Graus em Dez Capitais Brasileiras.* São Paulo: CEBRID – Escola Paulista de Medicina, 1997.
- GALLAGHER, C. A. , HOUGH, L.B., KEEFNER, S.M., SEYED-MOZAFFARI, A., ARCHER, S., GLICK, S.D. Identification and quantification of the indole alkaloid ibogaine in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochem. Pharmacol.*, 49:73-79, 1995.
- GARBUTT, J.C., WEST, S.L., CAREY, T.S., LOHR, K.N., CREWS, F.T. Pharmacological treatment of alcohol dependence, a review of the evidence. *J. Am. Med. Assoc.* 281:1318-1325, 1999.
- GETER-DOUGLASS, B., WITKIN, J.M. Behavioral effects and anticonvulsant efficacies of low-affinity, uncompetitive NMDA antagonists in mice. *Psychopharmacology* 146:280:289, 1999.
- GLICK, S.D., ROSSMAN, K., STEINDORF, S. MAISONNEUVE, I.M. CARLSON, J.N. Effects and aftereffects of ibogaine on morphine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 195, 341-345, 1991.
- GLICK, S.D., ROSSMAN, K., MAISONNEUVE, I.M., CARLSON, J.N. Effects of ibogaine on acute signs of morphine withdrawal in rats: independence from tremor. *Neuropharmacology* 31, 497-500, 1992.



- GLICK, S.D., ROSSMAN, K., WANG, F., DONG, N., KELLER JR., R.W. Local effects of ibogaine on extracellular levels of dopamine and its metabolites in nucleus accumbens and striatum: interactions with D-amphetamine. *Brain Res.* 628, 201-208, 1993.
- GLICK, S.D., KUEHNE, M.E., RAUCCI, J., WILSON, T.E., LARSON, D., KELLER JR., R.W., CARLSON, J.N. Effects of iboga alkaloids on morphine and cocaine self-administration in rats: relationship to tremorigenic effects and to effects on dopamine release in nucleus accumbens and striatum. *Brain Res.* 657, 14-22, 1994.
- GLICK, S.D., PEARL, S.M., CAI, J., MAISONNEUVE, I.M. Ibogaine-like effects of noribogaine in rats. *Brain Res.* 713:294-297, 1996.
- GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I.M. Mechanisms of Antiaddictive Actions of Ibogaine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 844:214-226, 1998.
- GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I.M. Development of novel medications for drug addiction. The legacy of an African shrub. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 909:88-103, 2000.
- GONZÁLEZ, P., CABELLO, P., GERMANY, A., NORRIS, B. CONTRERAS, E. Decrease of tolerance to, and physical dependence on morphine by, glutamate receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 332:257-262, 1997.
- GOUTAREL, R., GOLLNHOFER, O., SILLANS, R. Pharmacodynamics and therapeutic applications of iboga and ibogaine. *Psychodelic Monographs and Essays* 6, 71-111, 1993.
- GRAEFF, F.G. *Drogas Psicotrópicas e seu Modo de Ação*. 2.ed. São Paulo: EPU, 1989.
- GRAEFF, F.G. Abuso e dependência de drogas. IN: *Fundamentos de Psicofarmacologia*. Edit por F. G. Graeff, F.S.Guimarães. pp.197-221 São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

- GREENSTEIN, R.A., ARNDT, I.C., McLELLAN, A.T., O'BRIEN, C.P., EVANS, B. Naltrexone: a clinical perspective. *J. Clin. Psychiatry* 45:25-28, 1984.
- GUDEHITHLU, K.P., BHARGAVA, H.N. Differential binding of [<sup>3</sup>H] MK-801 to brain regions and spinal cord of mice treated chronically with morphine. *Gen. Pharmacol.* 27:91-94, 1996.
- HARSING, L.G., SERSHEN, H., LAJTHA, A. Evidence that ibogaine releases dopamine from the cytoplasmic pool in isolated mouse striatum. *J. Neural Transm.* 96, 215-225, 1994.
- HEARN, W.L., PABLO, J., HIME, G.W., MASH, D.C. Identification and quantification of ibogaine and an O-demethylated metabolite in brain and biological fluids using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Analytic. Toxicol.* 19:427-433, 1995.
- HELSLEY, S., DLUGOS, C.A., PENTNEY, R.J., RABIN, R.A., WINTER, J.C. Effects of chronic ibogaine treatment on cerebellar Purkinje cells in the rat. *Brain Res.* 759:306-308, 1997a.
- HELSLEY, S., RABIN, R.A., WINTER, J.C. The effects of noribogaine and harmaline in rats trained with ibogaine as a discriminative stimulus. *Life Sci.* 60:PL147-PL153, 1997b.
- HELSLEY, S., FILIPINK, R.A., BOWEN, W.D., RABIN, R.A., WINTER, J.C. The effects of sigma, PCP, and opiate receptor ligands in rats trained with ibogaine as a discriminative stimulus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59:495-503, 1998a.
- HELSLEY, S., FIORELLA, D., RABIN, R.A., WINTER, J.C. Behavioral and biochemical evidence for a nonessential 5-HT<sub>2A</sub> component of the ibogaine-induced discriminative stimulus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59:419-425, 1998b.

- HELSLEY, S., RABIN, R.A., WINTER, J.C. The effects of  $\beta$ -carbolines in rats trained with ibogaine as a discriminative stimulus. *Eur. J. Pharmacol.* 345:139-143, 1998c.
- HELSLEY, S., RABIN, R.A., WINTER, J.C. Further investigations of the serotonergic properties of the ibogaine-induced discriminative stimulus. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 23:317-326, 1999.
- HERRERA, D.G., ROBERTSON, H.A. Activation of *c-fos* in the brain. *Prog. Neurobiol.* 50:83-107, 1995.
- HOLLAND, P., MUSHINSKI, M. Costs of alcohol and drug abuse in the United States, 1992. Alcohol/drugs COI study team. *Stat. Bull. Metrop. Insur. Co.* 80:2-9, 1999.
- HOUGH, L.B., PEARL, S.M., GLICK, S.D. Tissue distribution of ibogaine after intraperitoneal and subcutaneous administration. *Life Sci.* 58, PL119-122, 1996.
- HOUGH, L.B., BAGAL, A.A., S.M., GLICK, S.D. Pharmacokinetic characterization of the indole alkaloid ibogaine in rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 22:77-81, 2000.
- ITZHAK, Y. ALI, S. Effect of ibogaine on the various sites of the NMDA receptor complex and sigma binding sites in rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 844:245-251, 1998.
- JAFFE, J.H. Transtornos relacionados a substâncias. In: *Tratado de Psiquiatria*. Edit. por H.J. Kaplan, B.J. Sadock. V.1. Cap. 13.1, p. 815-837. São Paulo: Artes Médicas, 1999.
- JONES, H.E., LI, H., BALSTER, R.L. Failure of ibogaine to produce phencyclidine-like discriminative stimulus effects in rats and monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59:413-418, 1998.
- KALIVAS, P.W. STRIPLIN, C.D., STEKETEE, J.D., KLITENICK, M.A., DUFFY, P. Cellular mechanisms of behavioral sensitization to drugs of abuse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 654:128-135, 1992.

- KARCZ-KUBICHA, M. LILJEQUIST, S. Effects of post-ethanol administration of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on the development of ethanol tolerance in C57B1 mice. *Psychopharmacology* 120:49-56, 1995.
- KHANNA, J.M., WU, P.H., WEINER, J., KALANT, H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.* 26:643-645, 1991.
- KHANNA, J.M., KALANT, H., SHAH, G., CHAU, A. Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 983-986, 1993.
- KOOB, G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *TIPS* 13:177-184, 1992.
- KOOB, G.F. Animals models of drug addiction. IN: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Edit. por F.E. Bloom, D.J. Kupfer. Cap. 66, pp.759-772. Raven-Press:New York, 1995.
- KOOB G.F. Drug reward and addiction. IN: *Fundamental Neuroscience*. Edit. por M.J. Zigmond, F.E. Bloom, S.C. Landis, J.L. Roberts, L.R. Squire. Cap. 49, pp.1261-1279. Academic-Press:London, 1999.
- LAYER, R.T., SKOLNICK, P., BERTHA, C.M., BANDARAGE, U.K., KUEHNE, M.E., POPIK, P. Structurally modified ibogaine analogs exhibit differing affinities for NMDA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 309:159-165, 1996.
- LIN, N.L., HUBBARD, J.I. An NMDA receptor antagonist reduces ethanol preference in untrained but not trained rats. *Brain Res. Bull.* 36:421-424, 1995.
- LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng. J. Med.* 330:613-622, 1994.

- LOTSOF, H. S. Ibogaine in the treatment of chemical dependence disorders: clinical perspectives. *MAPS* 5, 16-27, 1995.
- LUCIANO, D. Observations on treatment with ibogaine. *Am. J. Addict.* 7:89-90, 1998
- LUXTON, T., PARKER, L.A., SIEGEL, S. Ibogaine fails to interrupt the expression of a previously established one-trial morphine place preference. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 20:857-872, 1996.
- MACH, R.H, SMITH, C.R., CHILDERS, S.R. Ibogaine possesses a selective affinity for  $\sigma_2$  receptors. *Life Sci.* 57:PL57-62, 1995.
- MAH, S.J., TANG, Y., LIAUW, P.E., NAGEL, J.E., SCHNEIDER, A.S. Ibogaine acts at the nicotinic acetylcholine receptor to inhibit catecholamine release. *Brain Res.* 797:173-180, 1998.
- MAISONNEUVE, I.M., KELLER JR, R.W., GLICK, S.D. Blockade of morphine induced stimulation of mesolimbic and striatal dopamine release by ibogaine. *Soc. Neurosci. Abstr.* 16:382.15, 1990
- MAISONNEUVE, I.M., GLICK, S.D. Interactions between ibogaine and cocaine in rats: in vivo microdialysis and motor behavior. *Eur. J. Pharmacol* 212:263-266, 1992.
- MAISONNEUVE, I.M., KELLER JR, R.W., GLICK, S.D. Interactions between ibogaine, a potential anti-addictive agent, and morphine: an in vivo microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* 199:35-42, 1991.
- MAISONNEUVE, I.M., KELLER, R.W., JR, GLICK, S. D. Interactions of ibogaine and d-amphetamine: in vivo microdialysis and motor behavior in rats. *Brain Res.* 579: 87-92, 1992.

- MAISONNEUVE, I.M., MANN, G.L., DEIBEL, C.R., GLICK, S.D. Ibogaine and the dopaminergic response to nicotine. *Psychopharmacology* 129:249-256, 1997a.
- MAISONNEUVE, I.M., VISKER, K.E., MANN, G.L., BANDARAGE, U.K., KUEHNE, M.E., GLICK, S.D. Time-dependent interactions between iboga agents and cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* 336:123-126, 1997b.
- MAO, J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res. Rew.* 30:289-304, 1999.
- MASH, D.C., STALEY, J.K., PABLO, J.P., HOLOHEAN, A.M., HACKMAN, J.C., DAVIDOFF, R.A. Properties of ibogaine and its principal metabolite (12-hydroxyibogamine) at the MK-801 binding site of the NMDA receptor complex. *Neurosci. Lett.* 192: 53-56, 1995.
- MASH, D.C., KOVERA, C.A., BUCK, B.E., NORENBURG, M.D., SHAPSHAK, P., HEARN, W.L., SANCHEZ-RAMOS, J. Medication development of ibogaine as a pharmacotherapy for drug dependence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 844:274292, 1998.
- MELDRUM, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44(Suppl 8): S14-S23, 1994.
- MELDRUM, B.S. Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsia* 36(1): S30-35, 1995.
- MELLO, C.V., VICARIO, D.S., CLAYTON, D.F. Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6818-6822, 1992.
- MOLINARI, H.H., MAISONNEUVE, I.M., GLICK, S.D. Ibogaine neurotoxicity: a re-evaluation. *Brain Res.* 737:255-262, 1996.

- MOREIRA, L.B., FUCHS, F.D., MORAES, R.S., BREDEMEIER, M., CARDOZO, S., FUCHS, S.C., VICTORA, C.G. Alcoholic beverage consumption and associated factors in Porto Alegre, a southern Brazilian city: a population-based survey. *J. Stud. Alcohol* 57:253-259, 1996.
- MOROZ, I, PARKER, L.A., SIEGEL. S. Ibogaine interferes with the establishment of amphetamine place preference learning. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 5:119-122, 1997.
- MORRIS, K. Data accrue on “visionary” agent to interrupt addiction. *The Lancet* 354:1883, 1999.
- MORRIS, R.G.M. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation *in vivo* by the NMDA receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* 9, 3040-3057, 1989.
- MORRISETT, R.A. REZVANI, A.H., OVERSTREET, D., JANOWSKY, D.S. WILSON, W.A., SWARTZWELDER, H.S. MK-801 potently inhibits alcohol withdrawal seizures in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 176:103-105, 1990.
- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603, 1992.
- NESTLER, E.J. Molecular mechanism of drug addiction. *J. Neurosci.* 12:2439-2450, 1992.
- NESTLER, E.J., AGHAJANIAN, G.K. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278:58-63, 1997.
- NICHOLS, D.G. *Proteins, Transmitter and Synapses*. Cap. 9, pp.155-185. Blackwell Scientific Publications:Cambridge, 1994.

- NICHOLLS, D.G., ATTWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. *TIPS* 11:462-468, 1990.
- OBACH, R.S., PABLO, J., MASH, D.C. Cytochrome P4502D6 catalyzes the O-demethylation of the psychoactive alkaloid ibogaine to 12-hydroxyibogamine. *Drug Metab. Disp.* 26:764-768, 1998.
- O'BRIEN, C.P. Dependência e uso abusivo de drogas. In: *Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Edit. por J.E. Hardman, L.E Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman, 9.ed. Cap. 24, p.405-420. McGraw Hill:Rio de Janeiro, 1996.
- O'BRIEN, C.P. A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science* 278:66-70, 1997.
- O'CALLAGHAN, J.P, ROGERS, T.S, RODMAN L.E, PAGE, J.G. Acute and chronic administration of ibogaine to the rat results in astrogliosis that is not confined to the cerebellar vermis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 801:205-216, 1996.
- OH, S., HOSHI, K., HO, I.K. Role of NMDA receptors in pentobarbital tolerance/dependence. *Neurochem. Res.* 22: 767-774, 1997.
- O'HEARN, E., LONG, D.B., MOLLIVER, M.E. Ibogaine induces glial activation in parasagittal zones of the cerebellum. *NeuroReport* 4:299:302, 1993.
- O'HEARN, E., ZHANG, P., MOLLIVER, M.E. Excitotoxic insult due to ibogaine leads to delayed induction of neuronal NOS in Purkinje cell. *NeuroReport* 6:1611:1616, 1995.
- O'HEARN, E., MOLLIVER, M.E. The olivocerebellar projection mediates ibogaine-induced degeneration of Purkinje cells: a model of indirect, trans-synaptic excitotoxicity. *J. Neurosci.* 17:8828-8841, 1997.



- ORTIZ, J., FITZGERALD, L.W., CHARLTON, M., LANE, S., TREVISAN, L., GUITART, X., SHOEMAKER, W., DUMAN, R.S., NESTLER, E.J. Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* 21:289-298, 1995.
- OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUKUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54:581-618, 1998.
- PABLO, J.P., MASH, D.C. Noribogaine stimulates naloxone-sensitive [<sup>35</sup>S]GTPγS binding. *NeuroReport* 9:109-114, 1998.
- PALUMBO, P.A., WINTER, J.C. Stimulus effects of ibogaine in rats trained with yohimbine, DOM, or LSD. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:1221-1226, 1992.
- PARKER, L.A., SIEGEL, S., LUXTON, T. Ibogaine attenuates morphine-induced conditioned place preference. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 3:344-348, 1995.
- PEARL, S.M., HERRICK-DAVIS, K., TEITLER, M., GLICK, S.D. Radioligand-binding study of noribogaine, a likely metabolite of ibogaine. *Brain Res.* 675:342-344, 1995a.
- PEARL, S.M., JOHNSON, D.W., GLICK, S.D. Prior morphine exposure enhances ibogaine antagonism of morphine-induced locomotor stimulation. *Psychopharmacology* 121:470-475, 1995b.
- PEARL, S.M., MAISONNEUVE, I.M., GLICK, S.D. Prior morphine exposure enhances ibogaine antagonism of morphine-induced dopamine release in rats. *Neuropharmacology*, 35:1779-1784, 1996.
- PEARL, S.M., HOUGH, L.B., BOYD D.L., GLICK, S.D. Sex differences in ibogaine antagonism of morphine-induced locomotor activity and in ibogaine brain levels and metabolism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4:809-815, 1997.

- PECHANSKY, F. Patterns of alcohol use among adolescents living in Porto Alegre, Brazil. *J. Psychoactive Drugs* 30:45-51, 1998.
- PECHANSKY, F.; FUCHS, F.D. Fármacos de Uso Não-médico. IN: *Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional*. Edit. por F.D. Fuchs, L. Wannmacher 2.ed. cap. 42, p. 392-411. Guanabara Koogan:Rio de Janeiro, 1998.
- PIERCE, R.C., MEIL, W.M., KALIVAS, P.W. The NMDA antagonist, dizocilpine, enhances cocaine reinforcement without influencing mesoaccumbens dopamine transmission. *Psychopharmacology* 133:188-195, 1997.
- POPIK, P., LAYER, R.T., SKOLNICK, P. The putative anti-addictive drug ibogaine is a competitive inhibitor of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex. *Psychopharmacology* 114, 672-674, 1994.
- POPIK, P., LAYER, R.T., FOSSOM, L.H., BENVENISTE, M., GETER-DOUGLASS, B., WITKIN, J.M., SKOLNICK, P. NMDA antagonist properties of the putative anti-addictive drug, ibogaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 753-760, 1995a.
- POPIK, P., LAYER, R.T., SKOLNICK, P. 100 years of ibogaine: neurochemical and pharmacological actions of a putative anti-addictive drug. *Pharmacol. Rev.* 47, 235-253, 1995b.
- POPIK, P., SKOLNICK, P. The NMDA antagonist memantine blocks the expression and maintenance of morphine dependence. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 791-797, 1996.
- POPIK, P., DANYSZ, W. Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 854-865, 1997.

- POPIK, P., MAMCZARZ, J., FRACZEK, M., WIDLA, G., HESSELINK, M., DANYSZ, W. Inhibition of reinforcing effects of morphine and naloxone-precipitated opioid withdrawal by novel glycine site and uncompetitive NMDA receptor antagonists. *Neuropharmacology* 37:1033-1042, 1998.
- POPIK, P., KOLASIEWICZ, W. Mesolimbic NMDA receptors are implicated in the expression of conditioned morphine reward. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359:288-294, 1999.
- POPIK, P., KOZELA, E. Clinically available NMDA antagonist, memantine attenuates tolerance to analgesic effects of morphine in a mouse tail flick test. *Pol. J. Pharmacol.* 51:223-231, 1999.
- POPP, R.L., LOVINGER, D.M. Interaction of acamprosate with ethanol and spermine on NMDA receptors in primary cultured neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 394:221-231, 2000.
- PRESTON, K.L., WALSH, S.L. Evaluating abuse liability: methods and predictive value. In: *Drug Abuse Handbook*. Edit. por J. KARKH. Cap. 4, p. 276-305. CRC: São Francisco, 1998.
- PUDIAK, C.M., BOZARTH, M.A. L-NAME and MK-801 attenuate sensitization to the locomotor-stimulating effect of cocaine. *Life Sci.* 53, 1517-1524, 1993.
- PULVIRENTI, L., BALDUCCI, C., KOOB, G.F. Dextromethorphan reduces intravenous cocaine self-administration in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 321:279-283, 1997.
- RABIN, RA, WINTER, J.C. Ibogaine and noribogaine potentiate the inhibition of adenylyl cyclase activity by opioid and 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 316:343-348, 1996.

- RAFI-TARI, S., KALANT, H., LIU, J.F., SILVER, I., WU, P.H. Dizocilpine prevents the development of tolerance to ethanol-induced error on a circular maze test. *Psychopharmacology* 125:23-32, 1996.
- RASSNICK, S., D'AMICO, E., RILEY, E., PULVIRENTI, L., ZIEGLGANSBERGER, W., KOOB, G.F. GABA and nucleus accumbens glutamate neurotransmission modulate ethanol self-administration in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 654:502-505, 1992.
- REGAN, L.R. Ibogaine: a quick fix for addiction? *Justicia*, setembro: 1-4, 1992 apud POPIK, P.; LAYER, R.T.; SKOLNICK, P. 100 Years of Ibogaine: Neurochemical and Pharmacological Actions of a Putative Anti-addictive Drug. *Pharmacol. Rev.* 47:234-253, 1995.
- REID, M.S., HSU Jr, K., SOUZA, K.H., BRODERICK, P.A., BERGER, S.P. Neuropharmacological characterization of local ibogaine effects on dopamine release. *J. Neural Transm.* 103:967-985, 1996.
- REZVANI, A.H., OVERSTREET, D.H., LEE, Y-W. Attenuation of alcohol intake by ibogaine in three strains of alcohol-preferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52:615:620, 1995.
- RICE, D.P. Economic costs of substance abuse, 1995. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111:119:125, 1999.
- RIPLEY, T.L., LITTLE, H.J. Ethanol withdrawal hyperexcitability in vitro is selectively decreased by a competitive NMDA receptor antagonist. *Brain. Res.* 699:1-11, 1995.
- ROBINSON, T.E., BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.* 18:247-291, 1993.

- ROSSETI, Z.L., CARBONI, S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 283, 177-183, 1995.
- SANTANA, V.S., ALMEIDA FILHO, N. Aspectos epidemiológicos do alcoolismo. In: *Alcoolismo Hoje*. Edit. por S.P. Ramos. p. 29-44. Artes Médicas:Porto Alegre, 1990.
- SATTLER, R, TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.* 78:3-13, 2000.
- SCALLET, A.C., ROUNTREE, R., YE, X., NONY, P., ALI, S.F. Ibogaine produces neurodegeneration in rat, but not mouse, cerebellum. Neurohistological biomarkers of Purkinje cell loss. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 801:217-226, 1996.
- SCHECHTER, M., GORDON, T.L. Comparison of the behavioral effects of ibogaine from three sources: mediation of discriminative activity. *Eur. J. Pharmacol.* 249:79-84, 1993.
- SCHNEIDER, A.S., NAGEL, J.E., MAH, S.J. Ibogaine selectively inhibits nicotinic receptor-mediated catecholamine release. *Eur. J. Pharmacol.* 317:R1-R2, 1996.
- SELF, D.W. The neurobiology of relapse. In: *Drug Abuse Handbook*. Edit. por J.KARKH. Cap. 6.4, p. 442-463, CRC: São Francisco, 1998.
- SELF, D.W., NESTLER, E.J. Molecular mechanism of drugs reinforcement and addiction. *Ann. Rev. Neurosci.* 18:463-465, 1995.
- SEMENOVA, S. KUZMIN, A.V., DANYSZ, W., BESPALOV, A.Y. Low affinity NMDA receptor channel blockers inhibit initiation of intravenous morphine self-administration in naive mice. *Eur. J. Pharmacol.* 378:1-8, 1999

- SERSHEN, H., HARSING Jr., L.G., HASHIM, A., LAJTHA, A. Ibogaine reduces amphetamine-induced locomotor stimulation in C57BL/6 by mice, but stimulates locomotor activity in rats. *Life Sci.* 51:1003-1011, 1992a.
- SERSHEN, H., HASHIM, A., HARSING Jr., L.G., LAJTHA, A. Ibogaine antagonizes cocaine-induced locomotor stimulation in mice. *Life Sci.* 50:1079-1086, 1992b.
- SERSHEN, H., HASHIM, A., LAJTHA, A. Ibogaine reduces preference for cocaine consumption in C57BL/6 by mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47, 13-19, 1994.
- SERSHEN, H., HASHIM, A., LAJTHA, A. The effect of ibogaine on k-opioid and 5-HT<sub>3</sub> induced changes in stimulation-evoked dopamine release *in vitro* from striatum of C57BL/6 by mice. *Brain. Res. Bull.* 36:587-591, 1995.
- SHARMA, S.S., BHARGAVA, H.N. Enhancement of morphine antinociception by ibogaine and noribogaine in morphine-tolerant mice. *Pharmacology* 57:229-232, 1998.
- SHARPE, L.G., JAFFE, J.H. Ibogaine fails to reduce naloxone-precipitated withdrawal in the morphine-dependent rat. *NeuroReport* 1:17-19, 1990.
- SHENK, S., VALADEZ, A., MACNAMARA, C., HOUSE, D.T., HIGLEY, D., BANKSON, M.G., GIBBS, S., HORGER, B.A. Development and expression of sensitization to cocaine's reinforcing properties: role of NMDA receptors. *Psychopharmacology* 111:332-338, 1993.
- SHEPPARD, S.G. A preliminary investigation of ibogaine: case reports and recommendations for further study. *J. Subst. Abuse Treat.* 11:379-385, 1994.
- SHOAIB, M., STOLERMAN, I.P. MK-801 attenuates behavioural adaptation to chronic nicotine administration in rats. *Br. J. Pharmacol.* 105, 514-515, 1992.

- SHOAIB, M., STOLERMAN, I.P. The NMDA antagonist dizocilpine (MK801) attenuates tolerance to nicotine in rats. *J. Psychopharmacol.* 10:214-218, 1996.
- SHOIAB, M., SCHINDLER, C.W., GOLDBERG, S.R., SCHINDLER, C.W. Behavioural studies with the glycine partial agonist (+)-HA966 on cocaine-induced locomotor activity and reinforcement. *Behav. Pharmacol.* 6:568-576, 1995.
- SISKO, B. Interrupting drug dependency with ibogaine: a summary of four case histories. *MAPS* 4:15-23, 1993.
- SLOVITER, R.S., DRUST, E.G., DAMIANO, B.P., CONNOR, J.D. A common mechanism for lysergic acid indole alkylamine, and phenethylamine hallucinogens: serotonergic mediation of behavioral effects in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214:231-238, 1980.
- STALEY, J.K., OUYANG, Q., PABLO, J., HEARN, W.L., FLYNN, D.D., ROTHMAN, R.B., RICE, K.C., MASH, D.C. Pharmacological screen for activities of 12-hydroxyibogamine: a primary metabolite of the indole alkaloid ibogaine. *Psychopharmacology* 127, 10-18, 1996.
- STEPPUHN, K.G.; TURSKI, L. Diazepam dependence prevented by glutamate antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6889-6893, 1993.
- STEWART, J., DRUHAN, J.P. Development of both conditioning and sensitization of the behavioral activating effects of amphetamine is blocked by the non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801. *Psychopharmacology* 110:125-132, 1993.
- STOLERMAN, I. Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms. *TIPS* 13:170-176, 1992.

- SWANSON, R.A., LIU, J., MILLER, J.W., ROTHSTEIN, J.D., FARRELL, K., STEIN, B.A., LONGUEMARE, M.C. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J. Neurosci.* 17:932-940, 1997.
- SWEETNAM, P.M., LANCASTER, J., SNOWMAN, A., COLLINS, J.L., PERSCHKE, S., BAUER, C., FERKANY, J. Receptor binding profile suggests multiple mechanisms of action are responsible for ibogaine's putative anti-addictive activity. *Psychopharmacology* 118, 369-376, 1995.
- SZUMLINSKI, K.K., MAISONNEUVE, I.M., GLICK, S.D. Ibogaine enhances the expression of locomotor sensitization in rats chronically treated with cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63:457-464, 1999a.
- SZUMLINSKI, K.K., MAISONNEUVE, I.M., GLICK, S.D. Pretreatment with the putative anti-addictive drug, ibogaine, increases the potency of cocaine to elicit locomotor responding: a study with acute and chronic cocaine-treated rats. *Psychopharmacology* 145:227-233, 1999 b.
- SZUMLINSKI, K.K., BALOGUN, M.Y., MAISONNEUVE, I.M., GLICK, S.D. Interactions between iboga agents and methamphetamine sensitization: studies of locomotion and stereotypy in rats. *Psychopharmacology* 151:234-241, 2000a.
- SZUMLINSKI, K.K., MAISONNEUVE, I.M., GLICK, S.D. Differential effects of ibogaine on behavioural and dopamine sensitization to cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* 398:259-262, 2000b.
- TANAKA, K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci. Res.* 37:15-19, 2000.



- TENNANT, F.S., SAGHERIAN, A.A. Double-blind comparison of amantadine and bromocriptine for ambulatory withdrawal from cocaine dependence. *Arch. Intern. Med.*, 147:109-112, 1987.
- THOMPSON, D.F. Amantadine in the treatment of cocaine withdrawal. *Ann. Pharmacother.* 26:933-934, 1992.
- TRUJILLO, K.A., AKIL, H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251, 85-87,1991.
- TRUJILLO, K.A., AKIL, H. Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug Alcohol Depend.* 38, 139-154, 1995.
- TSUDA, M., SUZUKI, T., MISAWA, M. Recovery of decreased seizure threshold for pentylentetrazole during diazepam withdrawal by NMDA receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 324, 63-66, 1997.
- TSUDA, M.; CHIBA, Y.; SUZUKI, T. et al. Upregulation of NMDA receptor subunit proteins in the cerebral cortex during diazepam withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 341: 1998a.
- TSUDA, M.; SUZUKI, T. MISAWA, M. NMDA receptor antagonists potently suppress the spontaneous withdrawal signs induced by discontinuation of long-term diazepam treatment in Fischer 344 rats. *Brain Res.* 790: 82-90, 1998b.
- TSUDA, M., SUZUKI, T., MISAWA, M. Region-specific changes in [<sup>3</sup>H]dizocilpine binding in diazepam-withdrawn rats. *Neurosci. Lett.* 240, 113-115, 1998c.

- TZSCHENTKE, T.M., SCHMIDT, W.J. N-methyl-D-aspartic-acid receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neurosci. Lett.* 193:37-40, 1995.
- WEI, D., MAISONNEUVE, I.M., KUEHNE, M.E., GLICK, S.D. Acute iboga alkaloid effects on extracellular serotonin (5-HT) levels in nucleus accumbens and striatum in rats. *Brain Res.* 800:260-268, 1998.
- WELLS, G.B., LOPEZ, M.C., TANAKA, J.C. The effects of ibogaine on dopamine and serotonin transport in rat brain synaptosomes. *Brain Res. Bull.* 48:641-647, 1999.
- WINTER, J.C. HELSLEY, S., FIORELLA, D., RABIN, R.A. The acute effects of monoamine reuptake inhibitors on the stimulus effects of hallucinogens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63:507-513, 1999.
- WOLF, K. Addiction Medicine. In: *Drug Abuse Handbook*. Edit. por J. KARKH. Cap. 7, p. 500-513, CRC: São Francisco, 1998a.
- WOLF, M.E., KHANSA, M.R. Repeated administration of MK-801 produces sensitization to its own locomotor stimulant effects but blocks sensitization to amphetamine. *Brain Res.* 562, 164-168, 1991.
- WOLF, M.E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog. Neurobiol.* 54:679-720, 1998b.
- WORLEY, P.F., BHAT, R.V., BARABAN, J.M., ERICKSON, C.A., McNAUGHTON, B.L., BARNES, C.A. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J. Neurosci.* 13:4776-4786, 1993.

- WU, P.H., MIHIC, S.J., LIU, J.F., LE, A.D., KALANT, H. Blockade of chronic tolerance to ethanol by the NMDA antagonist, (+)-MK-801. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 157-164, 1993.
- XU, Z., CHANG, L.W., SLIKKER Jr, W., ALI, S.F., ROUNTREE, R.L., SCALLET, A.C. A dose-response study of ibogaine-induced neuropathology in the rat cerebellum. *Toxicol. Sci.* 57:95-101, 2000.
- ZETLER, G., SINGBARTH, G., SCHLOSSER, L. Cerebral pharmacokinetics of tremor-producing harmala and iboga alkaloids. *Pharmacology* 7:237-248, 1972.