

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CAMILA SCHOUERI COLAÇO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DA AYAHUASCA EM  
RATOS: COMPORTAMENTO, QUANTIFICAÇÃO DE MONOAMINAS E DO  
FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)**

BRASÍLIA

2018

**CAMILA SCHOUERI COLAÇO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DA AYAHUASCA EM  
RATOS: COMPORTAMENTO, QUANTIFICAÇÃO DE MONOAMINAS E DO  
FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Eloisa Dutra Caldas

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Márcia Renata Mortari

Brasília

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da publicação.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CC683a Colaço, Camila Schoueri  
Avaliação do potencial antidepressivo da ayahuasca em  
ratos - comportamento, quantificação de monoaminas e do fator  
neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) / Camila Schoueri  
Colaço; orientador Eloisa Dutra Caldas; co-orientador Márcia  
Renata Mortari. -- Brasília, 2018.  
103 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências  
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Depressão. 2. Ayahuasca. 3. BDNF. 4. Monoaminas. I.  
Caldas, Eloisa Dutra, orient. II. Mortari, Márcia Renata,  
co-orient. III. Título.

## **CAMILA SCHOUERI COLAÇO**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DA AYAHUASCA EM RATOS: COMPORTAMENTO, QUANTIFICAÇÃO DE MONOAMINAS E DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 21 de novembro de 2018.

#### **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas (Presidente)  
Universidade de Brasília (FUB/UnB) - Presidente

---

Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem  
Universidade de Brasília (FUB/UnB) - Membro Efetivo

---

Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - Membro Efetivo

---

Prof. Dr. Carlos Martin Infante Cordova  
Universidade de Brasília (FUB/UnB) - Membro Suplente

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Eloisa Dutra Caldas e co-orientadora Márcia Mortari por todo o conhecimento proporcionado. Por depositarem em mim a confiança necessária para a realização deste trabalho e por serem exemplos de mulheres e pesquisadoras excepcionais.

A equipe de pesquisa: Luciana, Stéfany, Vinicius, Willie e Robson pela amizade adquirida durante o trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e por toda ajuda prestada durante o estudo.

À toda a equipe do Laboratório de Toxicologia, em especial à Denise Carvalho, Patrícia Diniz, André Sales, Beatriz Werneck e Joseane Mozzaquatro pelo suporte técnico prestado, pelos treinamentos e por tirar as dúvidas quanto ao uso dos equipamentos do laboratório.

Ao veterinário Rafael, ao Wilson e sua equipe do biotério por serem sempre dedicados e cuidadosos com os animais.

Aos técnicos e servidores do Instituto de Biologia, em especial ao Rafael e ao Danilo.

À professora Aline Pic-Taylor por ceder o seu espaço para o armazenamento das amostras.

À FAP-DF e a CAPES pelo fomento dos estudos.

Aos meus pais, irmão, namorado e amigos pelo apoio e compreensão.

A Deus pela vida!

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído. ”

**Confúcio**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xviii
RESUMO .....	xix
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Depressão.....	3
2.2. Monoaminas.....	5
2.3. Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).....	15
2.4. Ayahuasca.....	19
2.5. Testes de Comportamento .....	26
3. OBJETIVOS.....	31
Gerais .....	31
Específicos .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1. Animais .....	32
4.2. Preparo e aquisição do chá ayahuasca .....	32
4.3. Caracterização química.....	33
4.4. Delineamento experimental .....	33
4.5. Testes Comportamentais.....	35
4.6. Eutanásia e coleta de material biológico.....	36
4.7. Avaliação hematológica e bioquímica.....	38
4.8. Análise de monoaminas no encéfalo (ausência da formação hipocampal).....	38
4.8.1. Preparo das soluções padrão.....	38

4.8.2.	HPLC-FL .....	39
4.8.3.	Extração das monoaminas das amostras de encéfalo (sem formação hipocampal).....	41
4.8.4.	Validação do método otimizado .....	41
4.9.	Quantificação de BDNF.....	42
4.10.	Análise Estatística .....	44
5.	RESULTADOS .....	45
5.1.	Testes de Comportamento .....	46
5.1.1.	Teste do Campo Aberto .....	46
5.1.2.	Labirinto em Cruz Elevado.....	51
5.1.3.	Natação Forçada .....	56
5.2.	Hematologia.....	58
5.3.	Monoaminas no encéfalo (sem a formação hipocampal) .....	62
5.3.1.	Validação do método analítico .....	62
5.3.2.	Análise de monoaminas nas amostras de encéfalo (sem a formação hipocampal).....	65
5.3.3.	(Sulfato de 4-hydroxy-3-methoxifenilglicol (MHPG), metabólito da norepinefrina .....	65
5.3.4.	Dopamina e seus metabólitos ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovalínico (HVA).....	66
5.3.5.	Serotonina e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).....	72
5.4.	BDNF na formação hipocampal .....	75
6.	DISCUSSÃO.....	80
7.	CONCLUSÃO .....	88
	REFERÊNCIAS .....	90
	ANEXO I - APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO ANIMAL .....	103



## LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

3-MT – 3-Methoxytyramine  
5-HT- Serotonina  
5-HIAA – ácido 5-hydroxiindol-3-acético  
5-HTP – 5-hidroxi-L-triptofano  
ACTH – Hormônio adreocorticotrófico  
ANOVA – Análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ADT – Antidepressivos tricíclicos  
BA – Braço Aberto  
BF – Braço Fechado  
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro  
BSA – Albumina do Soro Bovino  
CE – Células de enterocromafina  
CEUA – Comitê de Ética do Uso Animal  
CG-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrômetro de Massa  
CH<sub>3</sub>COOH – Ácido acético  
Cl<sup>-</sup> - Cloro  
COMT – Catecol-O-metiltransferase  
CONAD – Conselho Nacional Anti-drogas  
CONFEN – Conselho Federal de Entorpecentes  
CV – Coeficiente De Variação  
DA – Dopamina  
DAT – Transportador de dopamina  
DMT – N, N – Dimetiltriptamina  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
DOPAC – Ácido 3,4-diidroxifenilacético  
DP – Desvio Padrão  
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática  
Epi – Epinefrina  
EPM – Erro padrão da média  
EUA – Estados Unidos da América  
FAL – Fosfatase Alcalina  
FLX – Fluoxetina  
H<sub>2</sub>O - Água  
HAM-D – Escala de depressão Hamilton  
HCT – Hematócrito  
HGB – Hemoglobina  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência  
HRL – Harmalina  
HRM – Harmina  
HRP – Enzima peroxidase de rábano  
HVA – Ácido homovalínico  
IMAO – Inibidores da monoamina oxidase  
ISRS – Inibidores seletivos de recaptação de serotonina  
LCE – Labirinto em cruz elevado  
LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada com Espectrômetro de Massa  
LCR – Líquido Cefalorraquidiano  
LDH – Lactato desidrogenase

LOD – Limite de Detecção  
LOQ – Limite de Quantificação  
LSD – Dietilamida do ácido lisérgico  
MADRS – Escala de depressão Montgomery-Åsberg  
MAO – Monoamina oxidase  
MAO-A – Monoamina oxidase do tipo A  
MAO-B – Monoamina oxidase do tipo B  
MAT – Transportador de monoaminas  
MCV – Volume corpuscular das hemácias  
MCH – Hemoglobina corpuscular média  
MCHC – Concentração hemoglobínica corpuscular média  
MHPG – Sulfato de 4-hydroxy-3-methoxifenilglicol  
Na<sub>2</sub>EDTA – Ácido etilenodinitrilotetraacético sal disódio dihidrato  
Na<sup>+</sup> – Sódio  
NET – Transportador de norepinefrina  
NE – Norepinefrina  
NGF – Fator de crescimento de nervo  
NT-3 – neurotrofina-3  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PDW – Amplitude de variação do tamanho das plaquetas  
PLT – Plaquetograma  
RBC – Eritrócitos  
RDW-CV – Coeficiente de variação dos tamanhos dos eritrócitos  
RDW-SD – Desvio Padrão dos volumes dos eritrócitos  
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro  
SERT – Transportador de serotonina  
SIGMAR 1 – Receptor Intracelular Não-Opióide Sigma 1  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SQR – Substância química de referência  
TCA – Teste do campo aberto  
TGO – Transaminase glutâmico oxalacética  
TGP – Transaminase glutâmico pirúvica  
THH – Tetrahydro-harmina  
TMB/E – 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina  
TNF – Teste de natação forçada  
TOF – Espectrômetro de massa por tempo-de-vôo  
Tph – triptofano hidroxilase  
Tris – Trisaminometano  
UDV – União do vegetal  
UnB – Universidade de Brasília  
USP – Farmacopeia Americana  
VPM – Volume plaquetário médio  
WBC – Leucócitos  
W\_LCC – Neutrófilos  
W\_MCC – Monócitos, eosinófilos e basófilos  
W\_SCC – Linfócitos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos principais fármacos de cada uma das classes citadas anteriormente.....	4
<b>Figura 2.</b> Inibição da recaptação de serotonina e norepinefrina na fenda sináptica pelos seus respectivos transportadores (adaptado de David Kraft, MPH Boston).....	5
<b>Figura 3.</b> Estrutura química de monoaminas.....	6
<b>Figura 4.</b> Síntese da serotonina e seu metabólito, 5-HIAA a partir do L-triptofano. <a href="https://www.wikiwand.com/pt/L-Amino%C3%A1cido_arom%C3%A1tico_descarboxilase">https://www.wikiwand.com/pt/L-Amino%C3%A1cido_arom%C3%A1tico_descarboxilase</a> .....	8
<b>Figura 5.</b> Esquema das regiões do cérebro, mostrando o sistema dopaminérgico mesolímbico, que inclui a área tegmental ventral (VTA), o núcleo accumbens, o córtex préfrontal; a amígdala, o estriado e o hipocampo (CLAPP, 2008). ....	9
<b>Figura 6.</b> Via de degradação e inativação da dopamina por ação da monoamina oxidase (MAO) e catacol-Otransferase (COMT). <a href="http://parkinsonipb.blogspot.com/2010/11/dopamina-e-acetialcolina.html">http://parkinsonipb.blogspot.com/2010/11/dopamina-e-acetialcolina.html</a> .....	10
<b>Figura 7.</b> Metabolismo da norepinefrina (RANG et al., 2014) .....	11
<b>Figura 8.</b> Conceito da cascata de sinalização intracelular e plasticidade neural (adaptado de JEON e KIM, 2016).....	16
<b>Figura 9.</b> Folhas de chacrona ( <i>Psychotria viridis</i> ). <a href="https://herbalistics.com.au/product/psychotria-viridis-udv/">https://herbalistics.com.au/product/psychotria-viridis-udv/</a> .....	21
<b>Figura 10.</b> Cipó mariri ( <i>Banisteriopsis caapi</i> ). ....	21
<b>Figura 11.</b> Estrutura química dos componentes do chá e sua comparação com a serotonina. ....	22
<b>Figura 12.</b> Estruturas moleculares da serotonina, DMT e LSD-25 (GAUJAC, 2013)..	23
<b>Figura 13.</b> Aparato utilizado no Teste do Campo Aberto. ....	27
<b>Figura 14.</b> Aparato utilizado no Teste de Cruz Elevado. ....	29
<b>Figura 15.</b> Aparato utilizado no Teste de Natação Forçado .....	30
<b>Figura 16.</b> Ayahuasca sendo liofilizada em nosso laboratório. ....	33
<b>Figura 17.</b> Lâmina da secreção vaginal das fêmeas. ....	34
<b>Figura 18.</b> Gavagem dos ratos. ....	35
<b>Figura 19.</b> Encéfalo dos animais eutanasiados. ....	37
<b>Figura 20.</b> Encéfalo (sem a formação hipocampal) e formação hipocampal, respectivamente, no nitrogênio líquido antes da maceração. ....	37

<b>Figura 21.</b> Encéfalo macerado em nitrogênio líquido. ....	37
<b>Figura 22.</b> Sistema cromatográfico Shimadzu® do Laboratório de Toxicologia: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) injetor; d) coluna; e) detector; f) módulo comunicador; e g) resíduos. ....	39
<b>Figura 23.</b> Transição da coloração azul para a amarela no Elisa. ....	43
<b>Figura 24.</b> Atividade locomotora no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	46
<b>Figura 25.</b> Exploração da área central do campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. * significativo em relação à água, p < 0,05. ....	47
<b>Figura 26.</b> Tempo de permanência em segundos no quadrante central. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	47
<b>Figura 27.</b> Razão entre a locomoção na área central (entradas) e a locomoção total (quadrantes percorridos). Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. * significativo em relação à água, p < 0,05. ....	48
<b>Figura 28.</b> Comportamento exploratório por elevação de tórax (rearing). Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	49
<b>Figura 29.</b> Tempo de permanência em segundos com o tórax elevado (rearing). Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	49

<b>Figura 30.</b> Frequência de autolimpeza no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	50
<b>Figura 31.</b> Tempo gasto com autolimpeza no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	50
<b>Figura 32.</b> Comportamento emocional por defecação no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	51
<b>Figura 33.</b> Comportamento emocional por micção no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. ....	51
<b>Figura 34.</b> Tempo de permanência no braço fechado no teste do Labirinto em Cruz Elevado. Os valores estão expressos em média ± epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	52
<b>Figura 35.</b> Número de entradas nos braços fechados no teste do Labirinto em Cruz elevado. Os valores estão expressos em média ± epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	52
<b>Figura 36.</b> Tempo de permanência no braço aberto no teste do Labirinto em Cruz Elevado. Os valores estão expressos em média ± epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	52
<b>Figura 37.</b> Número de entradas nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz elevado. Os valores estão expressos em média ± epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	53

<b>Figura 38.</b> Comportamento exploratório por número de elevações de tórax no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	53
<b>Figura 39.</b> Comportamento exploratório por tempo de permanência com o tórax elevado no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. ....	54
<b>Figura 40.</b> Comportamento de Autolimpeza no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	54
<b>Figura 41.</b> Tempo de Autolimpeza no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	55
<b>Figura 42.</b> Comportamento emocional por defecação no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	55
<b>Figura 43.</b> Comportamento emocional por micção no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. * significativo em relação à água, $p < 0,05$ .....	56
<b>Figura 44.</b> Tempo de observação do comportamento ativo do tipo escalada no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.....	56
<b>Figura 45.</b> Tempo de observação do comportamento ativo do tipo natação no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.....	57
<b>Figura 46.</b> Quantidade de mergulhos no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9	

machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.....	57
<b>Figura 47.</b> Tempo de observação do comportamento passivo ou flutuação no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média ± epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.....	58
<b>Figura 48.</b> Comportamento emocional por defecação no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média ± epm. H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.....	58
<b>Figura 49.</b> Encéfalo sem fortificar (em preto) e encéfalo fortificado (em rosa).....	62
<b>Figura 50.</b> Pico do padrão de norepinefrina (NE, em azul) na concentração de 2ng/μL no tempo de retenção 2,25 min. Encéfalo fortificado com 2ng/μL de norepinefrina (em preto) e encéfalo sem fortificação (em rosa). ....	63
<b>Figura 51.</b> Efeito matriz da norepinefrina. Curva do padrão da norepinefrina em água e curva do encéfalo fortificado com norepinefrina de 0,01 a 2 ng/μL. ....	64
<b>Figura 52.</b> Quantificação de MHPG em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média ± epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	66
<b>Figura 53.</b> Quantificação de dopamina em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média ± epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	67
<b>Figura 54.</b> Quantificação de DOPAC em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média ± epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. * significativo em relação à água, p < 0,05; ** significativo em relação à água, p < 0,001; **** p < 0,0001 em relação à água; # significativo em relação à fluoxetina, p<0,05; & significativo em relação a todos os outros grupos (exceto Aya1). ....	68
<b>Figura 55.</b> Razão entre DOPAC/DA em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média ± epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9	

machos. * significativo em relação à água, $p < 0,05$ ; ** significativo em relação à água, $p < 0,001$ ; # significativo em relação à fluoxetina, $p < 0,05$ . .....	69
<b>Figura 56.</b> Quantificação de HVA em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média $\pm$ epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	70
<b>Figura 57.</b> Razão entre HVA/DA em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média $\pm$ epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	71
<b>Figura 58.</b> Razão entre HVA/DOPAC em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média $\pm$ epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. * significativo em relação à água, $p < 0,05$ . .....	72
<b>Figura 59.</b> Quantificação de serotonina em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de de encéfalo, expressos em média $\pm$ epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. * significativo em relação ao grupo H <sub>2</sub> O, $p < 0,05$ . .....	73
<b>Figura 60.</b> Quantificação de 5-HIAA em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de de encéfalo, expressos em média $\pm$ epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. * significativo em relação ao grupo H <sub>2</sub> O, $p < 0,05$ . ** significativo em relação ao grupo H <sub>2</sub> O, $p < 0,001$ . .....	74
<b>Figura 61.</b> Razão entre 5-HIAA/5-HT em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média $\pm$ epm; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.....	75
<b>Figura 62.</b> Razão entre o peso da formação hipocampal e o peso do encéfalo do rato (%); H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média $\pm$ epm.....	76
<b>Figura 63.</b> Níveis de BDNF na formação hipocampal dos ratos, em pg/ $\mu$ g proteínas totais; H <sub>2</sub> O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. *	



significativo em relação à água,  $p < 0,05$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm.

..... 77

**Figura 64.** Níveis de BDNF na formação hipocampal do rato, em pg/g encéfalo; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação à água,  $p < 0,05$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm..... 78

**Figura 65.** Níveis de BDNF da formação hipocampal, em pg/mg hipocampo; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm..... 79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração de monoaminas e seus metabólitos em regiões do encéfalo de ratos machos não tratados.....	12
<b>Tabela 2.</b> Concentração média de BDNF no hipocampo em grupos controle de ratos machos.....	18
<b>Tabela 3.</b> Peso total e dos órgãos (g) de animais dos grupos H <sub>2</sub> O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm.....	45
<b>Tabela 4.</b> Ganho de peso durante o tratamento de animais dos grupos H <sub>2</sub> O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm. ....	46
<b>Tabela 5.</b> Análise do eritrograma dos grupos H <sub>2</sub> O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm. ....	59
<b>Tabela 6.</b> Análise do leucograma dos grupos H <sub>2</sub> O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm. ....	60
<b>Tabela 7.</b> Análise bioquímica sérica dos grupos H <sub>2</sub> O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm. ....	61
<b>Tabela 8.</b> Coeficientes de Variação (%CV) e LOQ dos analitos (exceto norepinefrina). .....	64

## RESUMO

Os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da depressão possuem limitações, e estudos têm mostrado ser a ayahuasca uma possível opção terapêutica. A ayahuasca é uma bebida alucinógena geralmente produzida pela cocção do cipó *Banisteriopsis caapi* e das folhas do arbusto *Psychotria viridis*. Os objetivos deste estudo foram avaliar o potencial antidepressivo e ansiolítico da ayahuasca no tratamento crônico da depressão em ratos Wistar por meio de testes comportamentais, quantificação de monoaminas no encéfalo (na ausência da formação hipocampal) e quantificação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na formação hipocampal destes animais. Os ratos (n=85) foram divididos em 5 grupos e tratados, via oral, por 28 dias com H<sub>2</sub>O (controle negativo), fluoxetina (FLX), um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, ou com ayahuasca (Aya) nas doses 0,5, 1 e 2 X equivalentes a dose ritualística. A atividade de locomoção total não foi alterada no teste de campo aberto. Não foi observado efeito antidepressivo da ayahuasca, e da fluoxetina, no teste de natação forçada com esse protocolo de tratamento. Um método por HPLC-FL foi otimizado e validado para análise das monoaminas e seus metabólitos no encéfalo com a ausência da formação hipocampal. A serotonina apresentou-se aumentada significativamente para o grupo Aya2 das fêmeas, enquanto observamos uma redução significativa do seu metabólito (5-HIAA) nos encéfalos dos ratos tratados com FLX quando comparados ao grupo H<sub>2</sub>O. Os níveis do DOPAC, metabólito da dopamina, aumentaram significativamente nos grupos Aya1 e Aya2 com relação ao grupo H<sub>2</sub>O, principalmente nas fêmeas. Os níveis de BDNF na formação hipocampal foram significativamente maiores no grupo FLX comparado ao grupo H<sub>2</sub>O quando consideramos ambos os gêneros, tanto quando o BDNF foi expresso em relação às proteínas totais quanto em relação ao peso do encéfalo total, e nas fêmeas do grupo Aya2 quando expresso em relação ao peso do encéfalo. Concluindo, o aumento da serotonina e do BDNF observado em animais tratados com a ayahuasca indicam potencial efeito dessa bebida no tratamento da depressão que deve ser melhor investigado. Adicionalmente, estudos futuros devem incluir experimentos que possam elucidar o envolvimento da ayahuasca no *turnover* da dopamina, observado nesse estudo.

Palavras-chave: Depressão, Ayahuasca, BDNF, Monoaminas

## ABSTRACT

Pharmacological treatment of depression available currently have limitations, and studies have shown that ayahuasca is a possible therapeutic option. Ayahuasca is a hallucinogenic beverage generally produced by decoction of stems of *Banisteriopsis caapi* and leaves of the shrub *Psychotria viridis*. The objectives of this study were to evaluate the anxiolytic and antidepressant potential of ayahuasca in chronic treatment of depression in Wistar rats through behavioral tests, quantification of monoamines in the brain (without the hippocampus) and quantification of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) neurotrophin in the hippocampus of these animals. Rats (n = 85) were divided into 5 groups and treated orally for 28 days with H<sub>2</sub>O (negative control), fluoxetine (FLX), a selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant, or with ayahuasca (Aya) at doses of 0,5, 1 and 2 X the ritualistic dose. Locomotion activity was not altered in open field test. No antidepressant effect of ayahuasca, and fluoxetine, was observed in the forced swimming tests performed with this treatment protocol. A method by HPLC-FL was optimized and validated for analysis of the monoamines and their metabolites in the brain after removing the hippocampus. Serotonin was significantly increased in the Aya2 group of females, while we observed a significant reduction of its metabolite (5-HIAA) in the brains of FLX treated rats when compared to the H<sub>2</sub>O group. The levels of DOPAC, a dopamine metabolite, increased significantly in the Aya1 and Aya2 groups with respect to the H<sub>2</sub>O group, especially in females. The levels of BDNF in the hippocampus were significantly higher in the FLX group compared to the H<sub>2</sub>O group, both when expressed in relation to total proteins or to brain weight, and in in the Aya2 female group when expressed in relation to brain weight. In conclusion, the increase in serotonin and BDNF levels observed in ayahuasca treated animals indicate a potential of this beverage for treating depression that should be further investigated. Furthermore, future studies should include experimental protocols to elucidate the mechanisms involved in the dopamine turnover caused by ayahuasca, observed in this study.

Keywords: Depression, Ayahuasca, BDNF, Monoamines

# 1. INTRODUÇÃO

A depressão (transtorno depressivo maior) é um distúrbio psicológico que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, podendo ocorrer em qualquer idade, gênero e condição socioeconômica. O transtorno apresenta um importante grau de morbidade e potencial mortalidade, mas sua etiologia ainda não é completamente conhecida (MORET e BRILEY, 2011). Sinais como esperança diminuída, pouca ambição e falta de vontade de viver geram um alto custo indireto para a sociedade (ALTAR, 1999). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão será a causa mais prevalente de incapacidade induzida por doenças até 2030.

Os tratamentos atualmente disponíveis para depressão têm limitações que podem levar a uma baixa eficácia terapêutica, especialmente relacionada a baixas taxas de resposta, bem como efeitos adversos e alta latência para o início da ação terapêutica (PACHER e KECSKEMETI, 2004). A busca de novos fármacos que possam contribuir no tratamento da depressão é de suma importância, visto o alcance populacional do transtorno e os efeitos deletérios que trazem.

A ayahuasca é uma bebida amazônica utilizada há milênios como bebida sagrada em rituais religiosos e de cura por comunidades tradicionais na região amazônica, uso que se expandiu para religiões cristãs a partir de 1930, incluindo o Santo Daime, União do Vegetal e Barquinha (FRECSKA et al., 2016). A ayahuasca é conhecida por diferentes nomes, incluindo yajé, caapi, natema, hoasca, santo daime e vegetal (GROB et al., 1996). Nos últimos 20 anos, as religiões ayahuasqueiras brasileiras estabeleceram uma presença global, com congregações nos EUA, Canadá, Japão, África do Sul, Austrália, Europa e América Latina (LABATE e FEENEY, 2012; HEALTH CANADA, 2017).

A ayahuasca é geralmente preparada a partir da cocção de duas plantas: o cipó *Banisteriopsis caapi* que contém alcaloides  $\beta$ -carbolinas, potentes inibidores da monoamina oxidase (MAO), que é a enzima responsável pela degradação de monoaminas, como a serotonina; e as folhas da *Psycotria viridis*, que contém o agente psicoativo N, N-dimetiltriptamina (DMT), potente agonista dos receptores de serotonina. O DMT não é ativo por via oral, pois é degradado pela MAO no trato gastrointestinal, mas pode se tornar ativo na presença de um inibidor de MAO, sendo esta interação a base da ação psicotrópica da ayahuasca (MCKENNA, 2004).

A ayahuasca apresenta características com provável potencial terapêutico, podendo regularizar os índices de serotonina em condições de déficit ou ainda ser alvo no tratamento da dependência de álcool ou outras substâncias de abuso (MCKENNA, 2004). Estudo conduzido por este grupo de pesquisa mostrou que uma infusão de ayahuasca cedida pela União do Vegetal (UDV) possui potencial efeito antidepressivo em ratos tratados com dose única de 30 vezes a dose utilizada em uma cerimônia religiosa (PIC-TAYLOR et al., 2015).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antidepressivo da ayahuasca por meio da quantificação de monoaminas no encéfalo (sem a formação hipocampal) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na formação hipocampal, além de parâmetros comportamentais, utilizando ratos Wistar.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

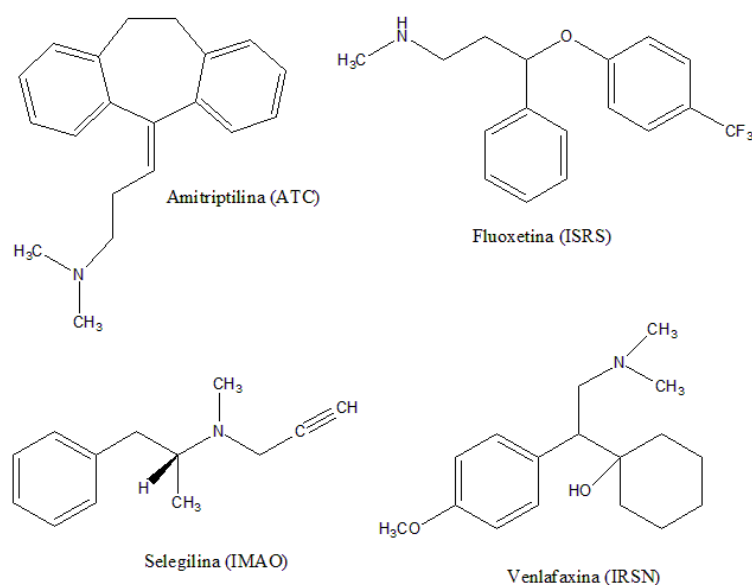
### 2.1. Depressão

A depressão é uma alteração do humor associada a um distúrbio do sistema nervoso central (SNC), recorrente, debilitante e potencialmente ameaçador à vida, ocorrendo em todos os gêneros, idades e origens sociais. Problemas sérios, como o comportamento suicida, ocorrem frequentemente nos pacientes com depressão (LOGAN, 2004).

No Brasil, os transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão, estão entre as principais causas de aposentadorias por invalidez, e entre as cinco doenças que mais provocaram afastamento temporário do trabalho (MOURA et al., 2007; ROMBALDI et al., 2010). A depressão se caracteriza como a segunda maior causa de incapacidade no mundo, perdendo apenas para as doenças cardíacas isquêmicas, com uma estimativa de 350 milhões de pessoas afetadas globalmente (WHO, 2016). O ônus econômico dos transtornos depressivos nos EUA foi estimado como sendo mais de U\$ 210 bilhões, com aproximadamente 45% atribuíveis a custos diretos, 5% para os custos relacionados com suicídio e 50% para custos no local de trabalho (BRUNIER e CHAIB, 2017).

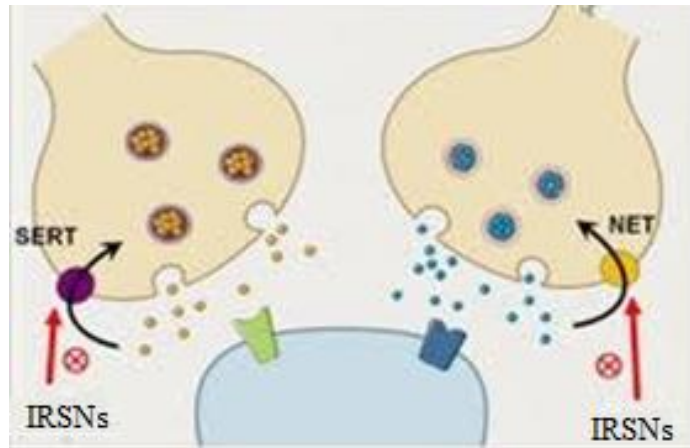
A falta de apoio a pessoas com transtornos mentais, aliada ao medo do estigma, impede que muitas pessoas acessem o tratamento de que precisam para viver vidas saudáveis e produtivas (BRUNIER e CHAIB, 2017). Existem diversos tipos e/ou níveis de depressão. A *depressão maior* inclui sinais graves que interferem na capacidade da pessoa de trabalhar, dormir, estudar, comer e aproveitar a vida. O *transtorno depressivo persistente*, que dura pelo menos dois anos, pode levar a episódios de depressão maior, juntamente com períodos de sinais menos graves. A *depressão psicótica* ocorre quando uma pessoa sofre de depressão grave e alguma forma de psicose, como ter falsas crenças perturbadoras ou uma ruptura com a realidade e alucinações. O *transtorno afetivo sazonal* ocorre durante o inverno, quando há menos luz solar natural, e geralmente diminui durante a primavera e o verão (NIH, 2018). Em média, um episódio depressivo dura seis meses e em 20% dos casos, dura mais de dois anos. Em 60-70% dos casos, a depressão se torna uma condição recorrente com episódios múltiplos ao longo da vida, com pessoas passando cerca de 20% de sua vida em um humor deprimido (VOS et al., 2004).

Apesar dos mais de 60 anos de pesquisa no campo da depressão, os processos neurobiológicos precisos e os mecanismos moleculares que causam esta doença complexa ainda são pouco entendidos (HAENISCH e BÖNISCH, 2011). Diversos estudos vêm associando a depressão a disfunções das aminas biogênicas. De acordo com essa teoria, a depressão pode ser atribuída ao desequilíbrio funcional ou à deficiência de neurotransmissores, incluindo a dopamina (DA), a serotonina (5-HT) e a norepinefrina (NE) (KRISHNAN e NESTLER, 2008). A hipótese é apoiada pelos efeitos terapêuticos dos antidepressivos tricíclicos (ADT), dos inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), dos inibidores da recepção de serotonina e norepinefrina (IRSN) e dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), que melhoram as funções de curto prazo das monoaminas (Figura 1). Os IMAOs aumentam os níveis de serotonina, dopamina e de norepinefrina inibindo a degradação enzimática desses neurotransmissores. Os ADTs bloqueiam a recaptura das monoaminas, principalmente NE e 5-HT, e em menor proporção a DA nas fendas sinápticas, sendo, portanto, não seletivo (MORENO et al., 1999). Os novos ISRSs e IRSNs aumentam seletivamente os níveis de serotonina e de serotonina e norepinefrina, respectivamente, inibindo a recaptção desses neurotransmissores pelos seus transportadores (Figura 2) (WHITE et al., 2005).



**Figura 1.** Estrutura dos principais fármacos de cada uma das classes citadas anteriormente.





**Figura 2.** Inibição da recaptação de serotonina e norepinefrina na fenda sináptica pelos seus respectivos transportadores (adaptado de David Kraft, MPH Boston). SERT-transportador de serotonina; NET- transportador de norepinefrina; IRSNs- inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina.

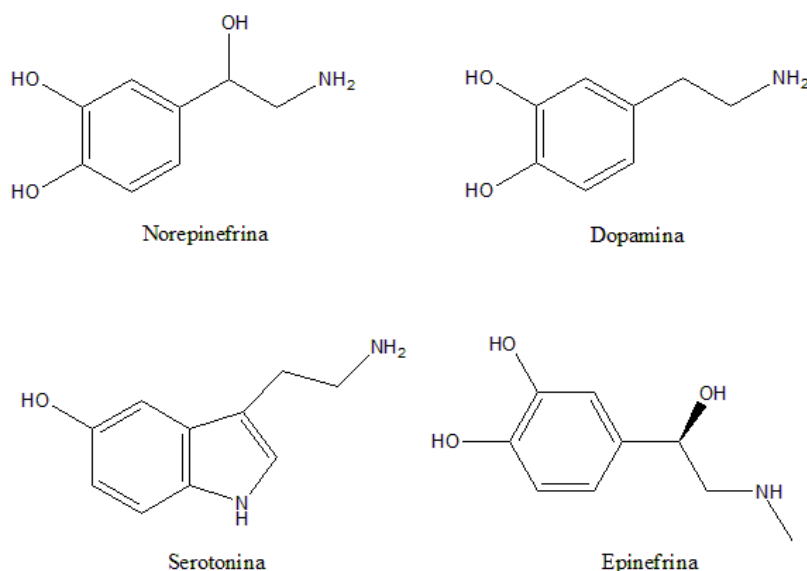
Embora os antidepressivos aumentem rapidamente as concentrações sinápticas de 5-HT, este efeito inicial não alivia os sinais da depressão imediatamente. Na verdade, uma resposta clínica máxima aos antidepressivos não se tornará aparente até várias semanas de tratamento contínuo (GELENBERG e CHESEN, 2000). O problema é agravado pela possibilidade de não resposta ao primeiro tratamento de escolha, levando ao atraso na resposta clínica e danos aos pacientes, incluindo persistência dos sinais, decepção com o fracasso do tratamento e, conseqüentemente, uma menor probabilidade condicional de eficácia do próximo medicamento prescrito (ZOHAR et al., 2018).

O início tardio e lento da ação dos antidepressivos tem sido explicado pela exigência de mecanismos adaptativos neuronais, como a adaptação de receptores sinápticos. Apenas cerca de 50% dos pacientes com depressão apresentam remissão completa enquanto recebem os antidepressivos disponíveis atualmente, com ou sem psicoterapia concomitante, e até 80% mostram respostas parciais. Com base nesses fatos, ainda há uma grande necessidade de tratamentos farmacológicos mais efetivos para depressão (HAENISCH e BÖNISCH, 2011).

## 2.2. Monoaminas

Neurotransmissores monoaminérgicos incluindo 5-HT, DA, NE e epinefrina (Epi) são ativamente envolvidos na fisiopatologia da depressão (HAENISCH e

BÖNISCH, 2011; HUANG et al., 2014) (Figura 3). Dada a interconectividade dentro da rede monoaminérgica, qualquer ação em um sistema pode reverberar nos outros sistemas. Vale ressaltar que fármacos com modos de ação seletivo ou múltiplos podem ter efeitos terapêuticos (EL MANSARI et al., 2010).



**Figura 3.** Estrutura química de monoaminas.

Transportadores de monoaminas (MAT), incluindo o transportador de norepinefrina (NET), o transportador de serotonina (SERT) e o transportador de dopamina (DAT) estão localizados na membrana plasmática dos terminais nervosos pré-sinápticos dos quais os neurotransmissores monomaniacos são liberados, além de células gliais. Todos os três MATs pertencem à família gênica SLC6 de transportadores de neurotransmissores dependentes de canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (MASSON et al., 1999)

A *serotonina* é uma monoamina sintetizada nos neurônios serotoninérgicos do SNC e em células de enterocromafina (CE) no intestino (BANSKOTA et al., 2018). É encontrada no SNC de todos os animais, e tem sido associada a diversos fatores, incluindo regulação de temperatura, ritmicidade circadiana, vômitos, agressão e balanço energético (GILMAN et al., 1991). Muito antes do nascimento, a 5-HT já está envolvida nas vias de desenvolvimento que contribuem para a aprendizagem, o pensamento e a reatividade ao estresse. Ela regula diversos processos críticos de desenvolvimento, como divisão celular, diferenciação, migração, mielinização, sinaptogênese e poda

dendrítica antes de assumir seu segundo papel como neurotransmissor no cérebro maduro, regulando a cognição, atenção, emoção, dor, sono e excitação (GASPAR et al., 2003; BRUMMELTE et al., 2017).

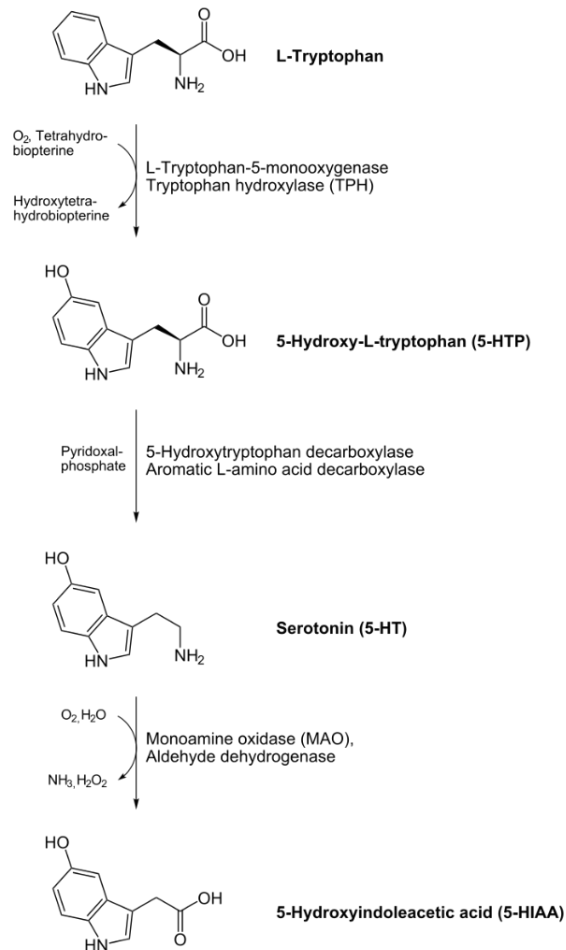
As CEs sintetizam 5-HT a partir de seu precursor L-triptofano que, por sua vez, provém de uma dieta proteica. Primeiramente, o L-triptofano é convertido em 5-hidroxi-L-triptofano (5-HTP), catalisado pela enzima triptofano hidroxilase (Tph), seguindo da descarboxilação da 5-HTP pela enzima L-aminoácido descarboxilase resultando na produção de 5-HT (Figura 4). Esta reação requer alguns cofatores, como vitamina B6, vitamina B3 e magnésio. Existem duas isoformas das enzimas Tph: a Tph1, presente principalmente nas CEs, e a Tph2, encontrada no SNC e nos neurônios entéricos. Assim, a produção de 5-HT na periferia e no SNC é regulada principalmente por Tph1 e Tph2, respectivamente. Uma vez liberada, a 5-HT é transportada para as células circundantes pelo SERT e degradada em ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) pela MAO. O SERT também ajuda na absorção de 5-HT pelas plaquetas na circulação (FIDALGO et al., 2013). Há sete famílias de receptores de 5-HT (5-HTR) identificadas até hoje (5-HTR1; 5-HTR7) (NADAL-VICENS et al., 2009).

O neurotransmissor 5-HT atua como um importante regulador de processos de desenvolvimento neural e, portanto, alterações na sua sinalização promovem alterações estruturais e funcionais no cérebro. Deficiência de 5-HT está relacionada com ansiedade, obsessões e compulsões. Por outro lado, o aumento da atividade da 5-HT pode estar associado a sinais de fadiga (MORET e BRILEY, 2011). Os ISRSs, como fluoxetina, bloqueiam o SERT no neurônio pré-sináptico, o qual regula os níveis de 5-HT extracelulares (PINHEIRO et al., 2017).

A medição de 5-HIAA no cérebro após o uso de drogas, alterações fisiológicas e em certas condições patológicas é frequentemente utilizada como um índice da atividade de 5-HT (VAN DER VEGT, 2002). Entretanto, segundo Wolf et al. (1985), o uso de 5-HIAA como medida do estado da neurotransmissão de 5-HT não é adequado, uma vez que, dependendo do mecanismo pelo qual a 5-HT é liberada do neurônio pré-sináptico, os níveis de 5-HIAA no cérebro refletem a atividade da MAO e não a liberação ou utilização da serotonina.

A razão 5-HIAA/5-HT indica o nível metabólico de 5-HT, e seu aumento reflete o aumento do *turnover* do neurotransmissor e o aumento da atividade serotoninérgica

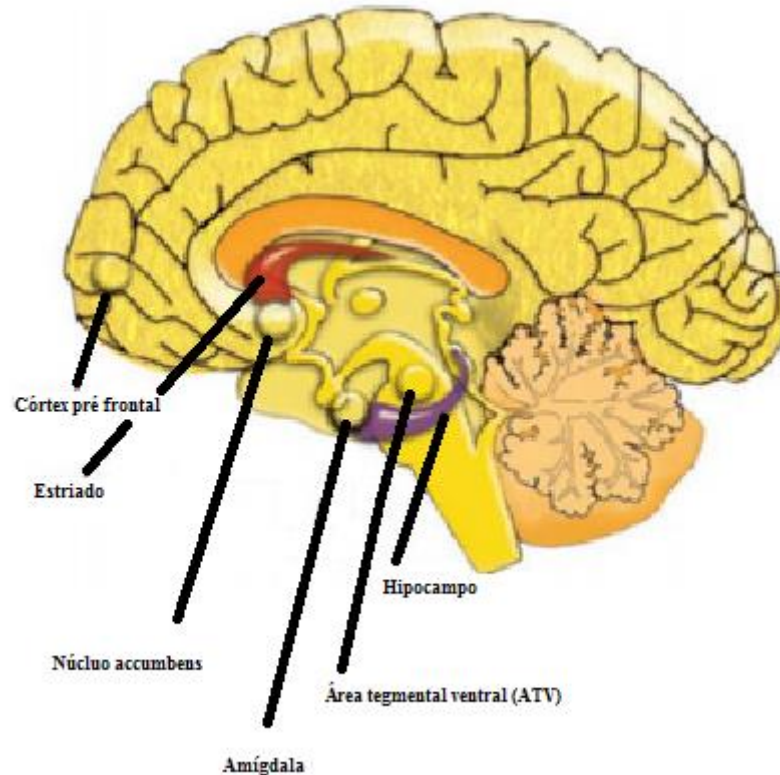
em camundongos depressivos (HUANG et al., 2014). Estudos do líquido cefalorraquidiano mostraram que os níveis de 5-HIAA e HVA foram menores em pacientes com história de suicídio (JONES et al., 1990).



**Figura 4.** Síntese da serotonina e seu metabólito, 5-HIAA a partir do L-tryptofano. [https://www.wikiwand.com/pt/L-Amino%C3%A1cido\\_arom%C3%A1tico\\_descarboxilase](https://www.wikiwand.com/pt/L-Amino%C3%A1cido_arom%C3%A1tico_descarboxilase)

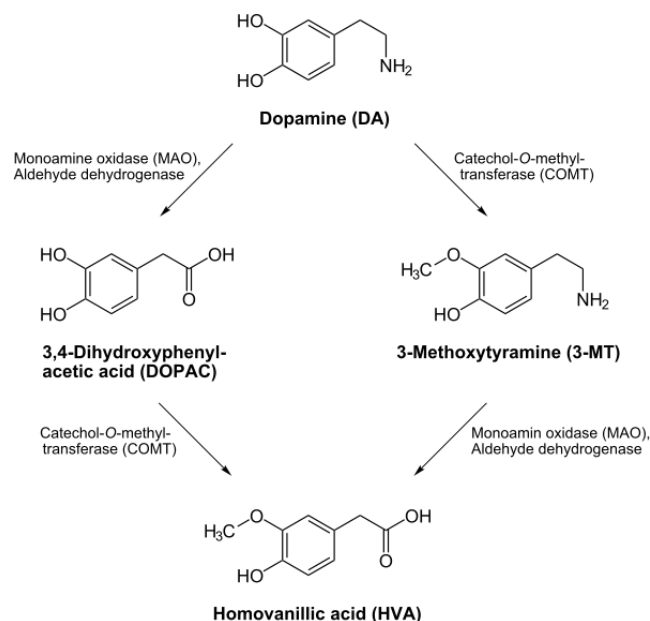
A *dopamina* está relacionada com o controle motor, o comportamento motivado, aprendizado e memória (SYED et al., 2018). Ela é o principal mediador do reforço motivacional de recompensas, atuando por meio da via mesolímbica dopaminérgica (CARLEZON e THOMAS, 2009), formado por projeções aferentes de neurônios na área tegmentar ventral ao núcleo accumbens (Figura 5). Os efeitos reforçadores de muitas drogas de abuso, particularmente as psicoestimulantes, são mediados pelo

aumento dos níveis de dopamina no núcleo accumbens (BRIERLEY e DAVIDSON, 2012).



**Figura 5.** Esquema das regiões do cérebro, mostrando o sistema dopaminérgico mesolímbico, que inclui a área tegmental ventral (ATV), o núcleo accumbens, o córtex pré frontal; a amígdala, o estriado e o hipocampo (adaptado de CLAPP, 2008).

A dopamina também é metabolizada pela MAO, formando o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), que é posteriormente metabolizado em ácido homovanílico (HVA) pela catecol-O-metiltransferase (COMT) (Figura 6) (SUOMINEN et al., 2013).

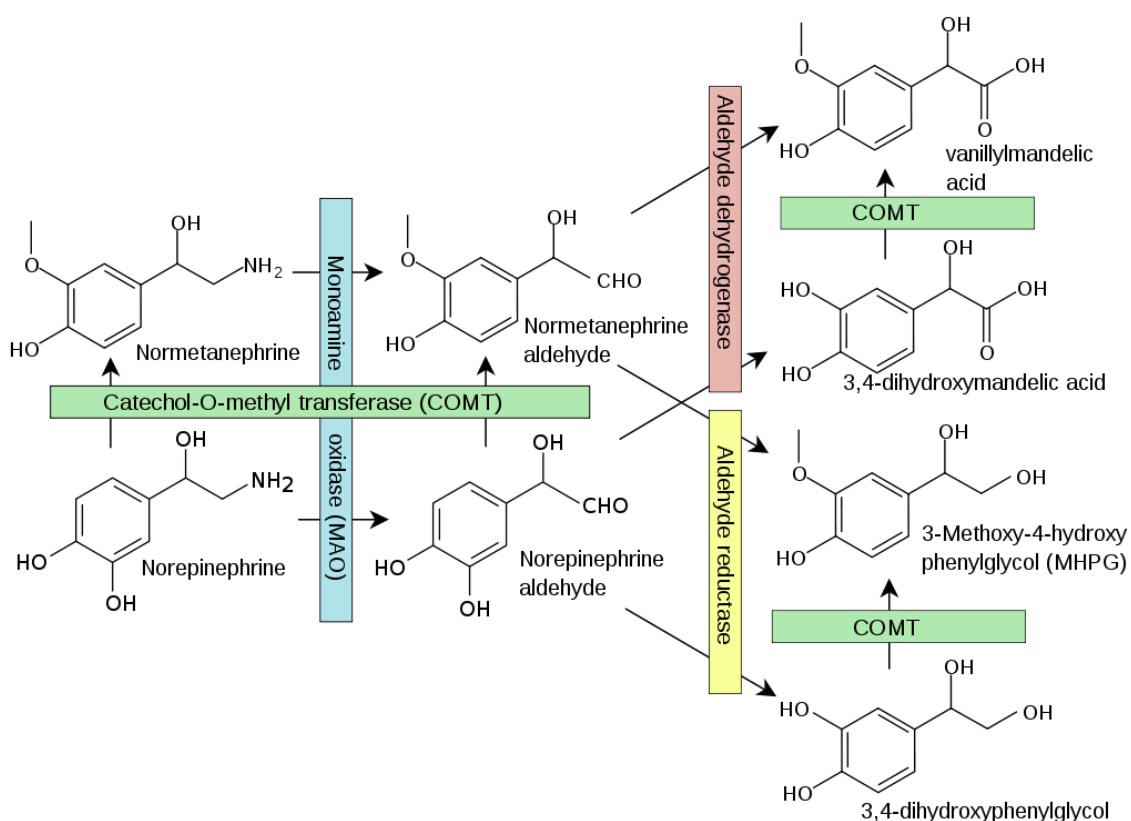


**Figura 6.** Via de degradação e inativação da dopamina por ação da monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-transferase (COMT). <http://parkinsonipb.blogspot.com/2010/11/dopamina-e-acetialcolina.html>

O DOPAC é o principal metabólito da dopamina nos cérebros dos ratos, enquanto nos primatas e humanos, ele é rapidamente metilado em HVA, que é o principal metabólito da biotransformação da dopamina nessas espécies (HRDINA e SINGHAL, 1981). O nível de DOPAC no líquido cefalorraquidiano (LCR) é um indicador de degeneração nigrostriatal e um aumento do nível de DOPAC no córtex pré-frontal medial é relacionado ao estresse (KING e FINLAY, 1997). Por outro lado, o aumento do nível de HVA no LCR está relacionado a tentativas de suicídio e transtorno de estresse pós-traumático (GONDA et al., 2007). Além disso, diminuições nas concentrações de DOPAC e HVA estão associadas à doença de Parkinson e esquizofrenia (WYATT et al., 1995), e são indicadores das atividades dopaminérgicas centrais (REVIN e JOHN, 2012).

A *norepinefrina* (ou noradrenalina) é formada pela hidroxilação da dopamina pela enzima dopamina  $\beta$ -monooxigenase, que ocorre predominantemente nas vesículas neurais (MUSACCHIO, 2013). Este neurotransmissor tem sido relacionado ao controle da plasticidade cerebral, estado de despertar e ciclo sono-vigília, e alteração no sistema noradrenérgico tem sido implicado com o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, depressão, ansiedade e recuperação após lesão cerebral traumática

(SCHERER, 2008). Valores significativamente reduzidos de norepinefrina foram observados em todas as áreas do cérebro na doença de Parkinson, com um padrão diferente de concentração em cada área. O 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) é o principal metabólito da norepinefrina no cérebro (Figura 7), e um importante biomarcador para a troca do estado maníaco para o estado de remissão no transtorno bipolar (KURITA et al., 2014). Os maiores valores de MHPG livres foram encontrados no hipotálamo, no núcleo accumbens, tálamo e núcleo rubro (RIEDERER et al., 1977).



**Figura 7.** Metabolismo da norepinefrina (RANG et al., 2014)

Estudos em pacientes deprimidos em remissão e que não tomam mais medicação têm mostrado que uma redução drástica dos níveis de NE (pela inibição da enzima sintética chave, tirosina hidroxilase, com  $\alpha$ -metil-p-tirosina) resulta em um rápido reaparecimento de sinais depressivos. A neurotransmissão reduzida de NE está associada à diminuição do estado de alerta, baixa energia, problemas de desatenção, concentração e habilidade cognitiva (MORET e BRILEY, 2011). No entanto, depleção

de catecolaminas em voluntários saudáveis não resulta em humor deprimido (RUHÉ et al., 2007).

A concentração das monoaminas nas diversas regiões do cérebro do grupo controle em vários estudos estão mostrados na Tabela 1. Nenhum estudo analisou o encéfalo em sua totalidade.

Os níveis de norepinefrina variaram entre 0,15 a 1,86 ng/mg (no hipotálamo), e o de seu metabólito MHPG entre 0,05 a 0,16 ng/mg. Os níveis de dopamina e seus metabólitos DOPAC e HVA são maiores no estriado (3,9 a 7,9 ng/mg, 4,1-5,2 ng/mg e 0,6-1,27 ng/mg, respectivamente), enquanto nas outras regiões variou entre 0,03 e 0,78 ng/mg; na formação hipocampal, a concentração da dopamina e seus metabólitos foi a mais baixa ou não foi detectada. A concentração de serotonina variou entre 0,17 e 1,7 ng/mg (hipotálamo) e de seu metabólito 5-HIAA entre 0,3 a 0,87 ng/mg.

**Tabela 1.** Concentração de monoaminas e seus metabólitos em regiões do encéfalo de ratos machos não tratados.

<b>Monoamina</b>	<b>Concentração, ng/mg (região do cérebro)</b>	<b>Referência</b>	
Norepinefrina	0,25 (medula oblongata)	Fonseca et al. (2017)	
	0,64 (área ventral tegmental)		
	0,28 (cerebelo)		
	0,39 (amígdala)		
	0,27 (hipocampo)		
	0,38 (córtex)		
	0,38 (mesencéfalo)		
	0,43 (substância negra)		
	0,32 (região estriada)		Lakshmana e Raju (1997)
	1,86 (hipotálamo)		
0,90 (hipocampo)	Castro-Neto et al. (2013)		
		0,30 (amígdala)	
0,21(região estriada)	Martinez et al. (2018)		
		0,19 (hipocampo)	
		0,15 (córtex)	
		1,00 (hipotálamo)	
		0,45 (mesencéfalo)	



<b>Monoamina</b>	<b>Concentração, ng/mg (região do cérebro)</b>	<b>Referência</b>
MHPG	0,16 (região estriada) 0,07 (hipocampo) 0,11 (córtex) 0,05 (hipotálamo) 0,07 (mesencéfalo)	Martinez et al. (2018)
Dopamina	3,90 (região estriada) 0,08 (amígdala) 0,07 (córtex) 0,15 (substância negra) 0,10 (região ventral tegmental)	Fonseca et al. (2017)
	7,90 (região estriada)	Peat e Gibb (1983)
	7,56 (região estriada) 0,36 (hipotálamo)	Lakshmana e Raju (1997)
	0,03 (hipocampo) 0,08 (amígdala)	Castro-Neto et al. (2013)
	6,40 (região estriada) 0,25 (hipocampo) 0,21 (córtex) 0,60 (hipotálamo) 0,78 (mesencéfalo)	Martinez et al. (2018)
	4,50 (região estriada)	Muneoka et al. (2010)
DOPAC	0,08 (córtex) 5,18 (região estriada) 2,44 (amígdala)	Santos et al. (2018)
	0,70 (região estriada) 0,01 (hipocampo) 0,02 (córtex) 0,09 (hipotálamo) 0,05 (mesencéfalo)	Martinez et al. (2018)
	4,10 (região estriada)	Muneoka et al. (2010)
HVA	0,60 (região estriada) 0,04 (amígdala) 0,06 (substância negra)	Fonseca et al. (2017)

<b>Monoamina</b>	<b>Concentração, ng/mg (região do cérebro)</b>	<b>Referência</b>
	0,11 (região ventral tegmental)	
	0,11 (córtex)	Santos et al. (2018)
	1,27 (região estriada)	
	0,38 (amígdala)	
	0,91 (região estriada)	Martinez et al. (2018)
	0,02 (hipocampo)	
	0,05 (córtex)	
	0,07 (hipotálamo)	
	0,07 (mesencéfalo)	
	1,20 (região estriada)	Muneoka et al. (2010)
Serotonina	1,20 (região estriada)	Peat e Gibb (1983)
	0,55 (região estriada)	Lakshmana e Raju (1997)
	1,02 (hipotálamo)	
	0,60 (hipocampo)	Castro-Neto et al. (2013)
	0,20 (amígdala)	
	0,70 (região estriada)	Martinez et al. (2018)
	0,32 (hipocampo)	
	0,71 (córtex)	
	1,70 (hipotálamo)	
	1,55 (mesencéfalo)	
	0,17 (região estriada)	Muneoka et al. (2010)
5-HIAA	1,30 (região estriada)	Peat e Gibb (1983)
	0,37 (região estriada)	Martinez et al. (2018)
	0,39 (hipocampo)	
	0,30 (córtex)	
	0,74 (hipotálamo)	
	0,87 (mesencéfalo)	
	0,60 (região estriada)	Muneoka et al. (2010)

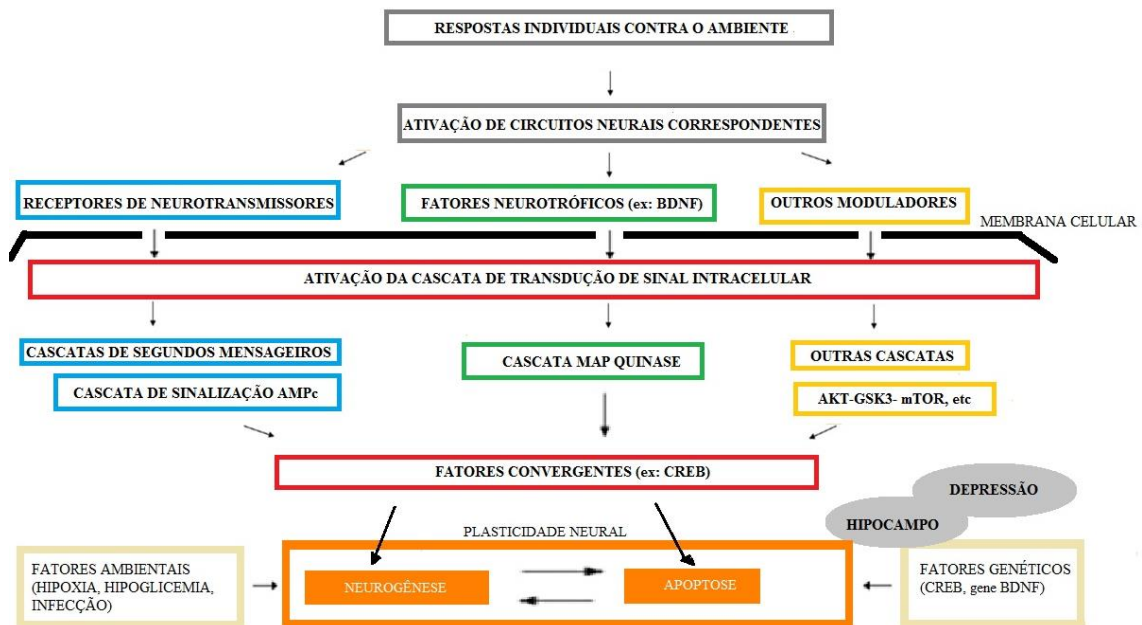
### **2.3. Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)**

A depressão é uma doença de origem neuroquímica e tem sido associada a alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (MANJI et al., 2001). Agentes que atuam diretamente em fatores alvo nestas vias poderiam ser novos compostos promissores para a terapia da depressão. O BDNF é a neurotrofina mais abundante no SNC, e é intimamente envolvido na sobrevivência e manutenção de células neurais, bem como na transmissão neural.

O BDNF, o fator de crescimento de nervo (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4) pertencem à família das neurotrofinas, peptídeos que regulam o crescimento e a sobrevivência dos neurônios, que são expressas significativamente na formação hipocampal, e estão envolvidas em processos relacionados à aprendizagem e memória. Adicionalmente, acredita-se que o BDNF desempenha um papel crucial na depressão maior, tendo um papel como regulador central da plasticidade neuronal dentro do hipocampo pós-natal (BOHLEN e BOHLEN, 2018). Um estudo de meta-análise mostrou que os níveis de BDNF estão diminuídos na mania bipolar e na depressão bipolar quando comparada com os grupos controle (FERNANDES et al., 2011).

As neurotrofinas maduras não só desempenham papéis importantes no contexto da sobrevivência neuronal, como também desempenham papéis importantes na manutenção da arquitetura do encéfalo adulto. Em comparação com outros órgãos, como fígado ou baço, níveis elevados de BDNF podem ser detectados no cérebro (KATOH-SEMBA et al., 1997). Na formação hipocampal em particular, a expressão do BDNF pode variar dependendo do estresse, de exercícios ou aprendizagem. Além disso, o BDNF desempenha um papel importante na facilitação da formação de redes neurais (SARUTA et al., 2012).

O BDNF é também um regulador de mecanismos de plasticidade (SHIMIZU et al., 2003). A neuroplasticidade cerebral envolve diferentes processos, incluindo a formação dendrítica, remodelação sináptica, potenciação de longa duração, desenvolvimento axonal, e neurogênese, tornando o cérebro capaz de se adaptar e responder perante vários estímulos (Figura 8) (MANJI et al., 2003).



**Figura 8.** Conceito da cascata de sinalização intracelular e plasticidade neural (adaptado de JEON e KIM, 2016).

Alguns estudos mostram que o tratamento antidepressivo crônico aumenta a expressão de mRNA de BDNF (NIBUYA et al., 1996; DE FOUBERT et al., 2004), o que estimulou a formulação da hipótese da neurotrofina, que explicaria o atraso entre o tratamento com os antidepressivos e o alívio dos sintomas devido ao tempo necessário para a expressão alterada da neurotrofina e consequente plasticidade sináptica (CASTRÉN e RANTAMÄKI, 2010; CALABRESE et al., 2009). A hipótese do BDNF é que a depressão é baseada na deficiência de neurotrofina na formação hipocampal, e que antidepressivos normalizam essa deficiência. Essa hipótese é baseada nos efeitos adversos do estresse nesta região, que reduz a expressão de BDNF, enquanto a administração de antidepressivos a longo prazo mostra resultados opostos, aumentando a resistência ao estresse (JOCA et al., 2003).

Outra evidência vem de estudos em humanos que mostram uma diminuição do BDNF sérico em pacientes deprimidos e BDNF sérico elevado após o tratamento com antidepressivos (SHIMIZU et al., 2003). Estudos relataram aumentos robustos dos níveis de mRNA de BDNF em várias partes do cérebro, incluindo o córtex e hipocampo após tratamentos com vários antidepressivos (SSRI, ATC, IMAO) (DUMAN, 2004). Chen et al. (2001) relataram aumento dos níveis de imunoreatividade do BDNF no hipocampo em cérebros *post-mortem* de indivíduos que foram tratados com

antidepressivos. Essas evidências suportam a hipótese que liga a patogênese do comportamento suicida e da depressão a uma plasticidade neural alterada, o que prejudica a capacidade do cérebro para responder adequadamente aos estímulos do ambiente. A hipótese é de que mudanças patológicas nos níveis de BDNF são responsáveis pelo déficit neuropsicológico associados com a depressão, estresse e suicídio (DWIVEDI, 2012). Shimizu et al. (2003) hipotetizaram que uma diminuição nos níveis de BDNF pode reduzir o efeito neuroprotetor e causar dano neuronal induzido pelo estresse, levando a uma vulnerabilidade biológica e susceptibilidade às doenças depressivas.

Polimorfismos no gene BDNF parecem não só estarem associados à depressão, mas também com um menor volume hipocampal (GONUL et al., 2011). O hipocampo é a estrutura cerebral associada ao estresse, à depressão e à mecanismos antidepressivos mais estudada. Como o hipocampo está associado à aprendizagem e à memória, também está associado ao comprometimento cognitivo na depressão. O estresse crônico induz alterações atroficas nas sub-regiões do hipocampo e há uma redução do volume hipocampal e do córtex pré-frontal em pacientes com depressão (BREMNER et al., 2000). Isto suporta a hipótese de que a expressão dos fatores de crescimento dos nervos, especificamente o BDNF, é reduzida em pacientes com depressão (DRZYZGA et al., 2009), e que os antidepressivos normalizam essa deficiência (YU e CHEN, 2011. LEE e KIM, 2010).

Segundo Kim et al. (2007), pacientes com depressão que já tentaram suicídio tiveram níveis plasmáticos de BDNF significativamente menores que os pacientes com depressão sem tentativa de suicídio, achado consistente com o estudo *post-mortem* mostrando níveis de BDNF significativamente menores no hipocampo e no córtex pré-frontal de vítimas de suicídio (KAREGE et al., 2005). Como o BDNF pode atravessar a barreira hematoencefálica, o nível de BDNF no plasma pode refletir o nível de BDNF no cérebro. Estudos de Karege et al. (2002) e Klein et al. (2010) mostram que há uma correlação positiva entre os níveis de BDNF no sangue total e os níveis de BDNF no hipocampo nos ratos ( $r^2=0.44$ ,  $p=0.025$ ).

No estudo de Katoh-Semba et. al. (1997), o nível mais alto de BDNF foi detectado no hipocampo (5,4 ng/g de peso úmido) de rato com 1 mês de idade, seguido pelo hipotálamo (4,2 ng/g) e pelo septo (1,7 ng/g). Em outras regiões, os níveis de

BDNF variaram entre 0,9 e 1,7 ng/g. O nível de BDNF nos lobos posteriores do cerebelo de ratos com 30 dias de idade foi levemente maior do que nos lobos anteriores. A concentração de BDNF aumentou em todas as regiões do cérebro com o desenvolvimento pós-natal. Nos tecidos periféricos, o BDNF foi encontrado em concentrações muito baixas (0,65 ng/g no baço, 0,21 ng/g no timo e 0,06 ng/g no fígado).

A concentração de BDNF no hipocampo do grupo controle de ratos variou consideravelmente entre estudos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentração média de BDNF no hipocampo em grupos controle de ratos machos.

Linhagem	BDNF (média)	Referência
Sprague-Dawley	0,005 pg/μg hipocampo	Katoh-Semba et al. (1997)
Wistar	0,030 pg/μg hipocampo	Fortunato et al. (2010)
Sprague-Dawley	0,636 pg/μg proteína	Klein et al. (2011)
Sprague-Dawley	0,049 pg/μg proteína (CA1)	Cooke et al. (2015)
	0,075 pg/μg proteína (CA3)	
Wistar	0,5 pg/μg proteína	Afshar et al. (2018)

Em 1999, Tony Altar propôs que fármacos que estimulam seletivamente a produção de neurotrofinas poderiam representar uma nova geração de antidepressivos. Baseado na evidência que liga a plasticidade neuronal e a sinalização de neurotrofinas nos transtornos de humor, tem sido sugerido que os antidepressivos podem melhorar a capacidade de circuitos cerebrais críticos responderem otimamente às demandas ambientais, um processo crítico na recuperação da depressão, envolvendo a sinalização de BDNF (CASTRÉN e RANTAMAKI, 2010).

O tratamento antidepressivo crônico aumenta a expressão de BDNF e a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (MALBERG et al., 2000). O tratamento com fluoxetina, por exemplo, aumenta a expressão de BDNF e acredita-se que o efeito benéfico do tratamento com fluoxetina contra o estresse psicológico é mediado pelo aumento da expressão do BDNF em áreas específicas do cérebro, incluindo o hipocampo, em ratos (LI et al. 2017). A fluoxetina é um típico ISRS amplamente utilizada para tratar transtornos psiquiátricos como depressão maior, transtorno

obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico e outros distúrbios neuropsiquiátricos. Considerando que a ativação do receptor 5-HT aumenta a expressão de BDNF no cérebro, a fluoxetina pode melhorar a expressão do BDNF aumentando o nível de serotonina na fenda sináptica e ativando os receptores de 5-HT. Além disso, os níveis aumentados de BDNF poderiam induzir de forma retrógrada a regeneração serotoninérgica do brotamento axonal e expansão de dendritos no hipocampo e em outras áreas do cérebro, como amígdala, para aliviar sinais psiquiátricos relacionados ao estresse. Assim, a ação recíproca entre 5-HT e o BDNF pode induzir uma interação sinérgica no efeito farmacológico da fluoxetina (LI et al., 2017).

## **2.4. Ayahuasca**

A ayahuasca é uma infusão vegetal psicoativa da Amazônia que, desde tempos imemoráveis, é usada pelos índios como instrumento espiritual e ritual, com extrema religiosidade. A origem do seu uso não é bem conhecida, mas segundo Naranjo (1986), descobertas arqueológicas indicam que o uso da bebida data da pré-história. A palavra ayahuasca é originária da língua quéchua cuja etimologia é: “Aya”: “pessoa morta, espírito” e “Waska”: “corda, liana, cipó”. Numa tradução literal, a palavra significa “corda dos mortos” ou “trepadeira das almas” uma referência ao cipó utilizado na preparação da bebida (FIGUEROA, 2012; TUPPER, 2002).

O Santo Daime é a mais antiga das religiões ayahuasqueiras brasileiras, fundada em 1930 no Acre, pelo seringueiro Raimundo Irineu Serra, conhecido como Mestre Irineu. O Santo Daime consolidou os rituais de preparação da ayahuasca, associando-o a doutrinas espirituais cristãs e hinos cantados por membros da igreja durante a cerimônia (MACRAE, 2004). Nessa comunidade, a bebida é conhecida como chá do Santo Daime. Mesmo após a morte do Mestre Irineu em 1971, o Santo Daime manteve vigorosa atividade, sendo uma das responsáveis pelo fenômeno transnacional de consumo de ayahuasca pelo mundo.

A Barquinha, surgida em 1945 no Acre, é uma vertente criada a partir da igreja Santo Daime, possuindo hoje várias comunidades estabelecidas no Brasil. Seu fundador, o ex-marinheiro Daniel Pereira de Matos, enfatizava o valor dos rituais da ayahuasca

como instrumento de tratamento e cura para uma variedade de doenças (MACRAE, 2004).

O Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (UDV) é a mais nova das religiões ayahuasqueiras, com o maior número de associados, e considerada a mais organizada institucionalmente (MACRAE, 2004). Fundada em 1961 por José Gabriel da Costa, em Rondônia, a UDV promove e incentiva ativamente pesquisas com ayahuasca. O Projeto Hoasca, por exemplo, envolveu esforços interdisciplinares com cientistas do Brasil, Estados Unidos e Finlândia para avaliar os efeitos dessa bebida na vida dos frequentadores da igreja e usuários de ayahuasca de longa data, comparando-os com controles pareados de não usuários (MELO, 2013; MCKENNA, 2004).

Essas três entidades religiosas contribuíram para expansão do consumo da ayahuasca e hoje o uso da infusão no contexto religioso atingiu um alcance mundial com representantes e suporte legal nos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa (TUPPER, 2008; HEALTH CANADA, 2017).

No território brasileiro, a utilização de ayahuasca num contexto religioso é liberada desde a década de 80 pelo CONFEN (Resolução nº 06/1986), cabendo às gestantes a responsabilidade pelo uso e pela preservação do desenvolvimento fetal. Crianças podem receber o chá desde que autorizado pelos pais (Resolução 05/04 CONAD). Em 26 de janeiro de 2010, o governo brasileiro reafirmou a regulamentação do uso para fins religiosos, tendo nessa mesma resolução o veto à comercialização e propaganda, além de coibir seu uso em conjunto com outras drogas e em eventos de turismo (Resolução Nº1 CONAD, de 25 de janeiro de 2010) (LABATE e FEENEY, 2012).

A ayahuasca é geralmente composta da videira de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) e folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) (MCKENNA et al., 1998). As folhas da *P. viridis* (Figura 9), conhecida popularmente como rainha ou chacrona, contêm o alcalóide DMT (N,N dimetiltriptamina, Figura 11), com fórmula química similar à do neurotransmissor serotonina. O DMT é agonista dos receptores serotoninérgicos, principalmente o 5-HT<sub>2A</sub>, mas quando ingerido é rapidamente degradado pela MAO (RIBA, 2003).



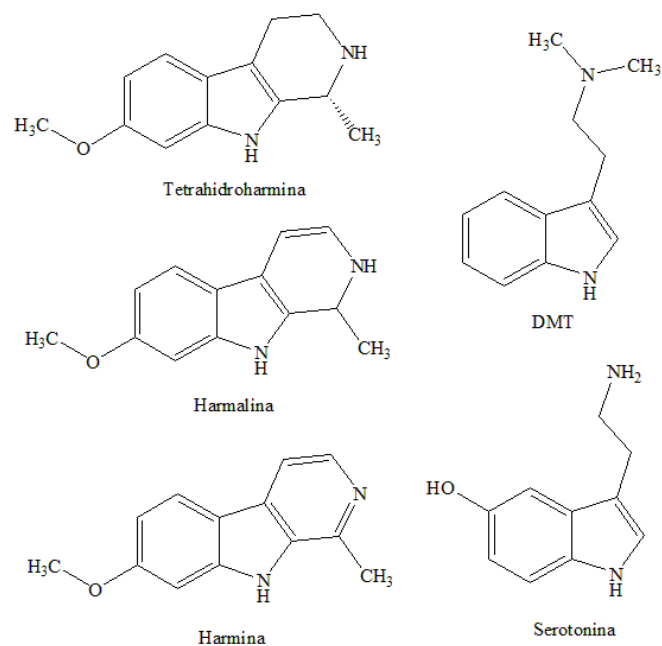


**Figura 9.** Folhas de chacrona (*Psychotria viridis*).  
<https://herbalistics.com.au/product/psychotria-viridis-udv/>

As  $\beta$ -carbolinas (harmina, harmalina e tetra-hidroharmina, Figura 11) contidas no cipó *Banisteriopsis caapi* (Figura 10), também conhecido como mariri, têm ação inibidora sobre a MAO, permitindo que o DMT chegue ao SNC e exerça sua ação serotoninérgica (DOS SANTOS, 2013).



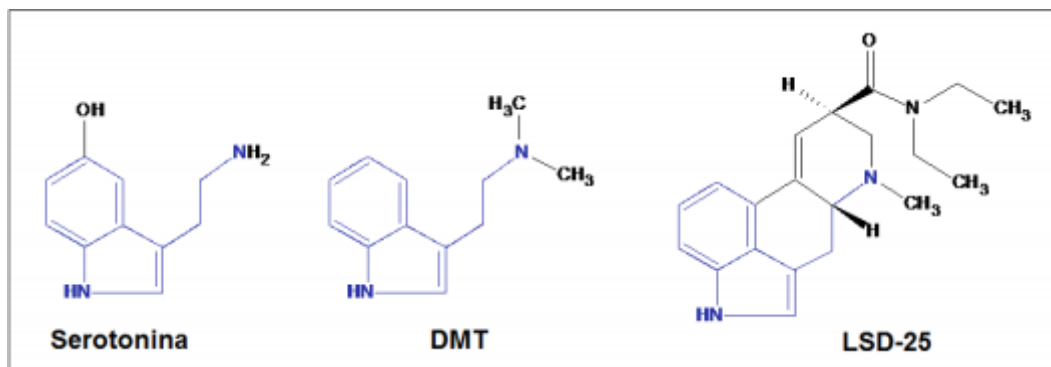
**Figura 10.** Cipó mariri (*Banisteriopsis caapi*).



**Figura 11.** Estrutura química dos componentes do chá e sua comparação com a serotonina.

Quando a ayahuasca é ingerida, as  $\beta$ -carbolinas presentes inibem a enzima MAO a ponto de evitar a degradação da DMT, possibilitando a sua absorção e penetração na corrente sanguínea e chegada ao SNC. O efeito serotoninérgico do DMT gera uma hiperestimulação das funções cerebrais perceptivas, cognitivas e mnemônicas, que desencadeia uma liberação de emoções reprimidas, recordação de memórias remotas e geração de imagens arquetípicas (CALLAWAY e GROB, 1998; SMITH et al., 1998). Efeitos purgativos e eméticos podem ocorrer (VEDOVATO et al., 2014).

O DMT é constantemente produzido pelo corpo e está provavelmente envolvido no processo do sonho. É também uma das poucas substâncias que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica (CARBONARO e GATCH, 2016). Em maiores níveis de concentração, o DMT é capaz de provocar distorções de percepção da realidade, com padrões característicos de outros alucinógenos como a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), desenvolvida pelo químico suíço Albert Hofmann em 1938, também agonista do 5-HT<sub>2A</sub> (Figura 12) (GAUJAC, 2013). Os níveis de concentração de DMT e  $\beta$ -carbolinas na ayahuasca podem ter grande variação dependendo da forma de preparo e proporção das plantas que a compõem (CALLAWAY, 2005; MOTTA et al., 2018).



**Figura 12.** Estruturas moleculares da serotonina, DMT e LSD-25 (GAUJAC, 2013).

A ayahuasca parece ter um potencial terapêutico na psiquiatria. Os transportadores de 5-HT são significativamente elevados nos usuários do chá de ayahuasca e especula-se que o uso da infusão possa reverter os déficits de 5-HT e assim controlar a depressão, além de promover positivas mudanças comportamentais (MCKENNA, 2004).

Recentemente, efeitos antidepressivos de início rápido foram relatados após a administração de uma dose única em pacientes diagnosticados com depressão recorrente (SANCHES et al., 2016). Palhano-Fontes et al. (2018) conduziram um estudo duplo cego placebo-controle com 29 pacientes com tratamentos resistentes à depressão, que receberam dose de 1 mL/kg pc de placebo ou ayahuasca (contendo 0.36 mg/kg DMT), o que corresponde a um pouco mais de 1X a dose usual utilizada nos estudos realizados no nosso grupo de pesquisa (150 mL por um indivíduo de 70 kg; PIC-TAYLOR et al., 2015; MOTTA et al., 2018). Os autores observaram efeitos antidepressivos significantes da ayahuasca comparado com o controle utilizando escalas de depressão Hamilton (HAM-D) e Montgomery-Åsberg (MADRS).

Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia mostraram ação antidepressiva da ayahuasca em ratos tratados agudamente (uma vez) em doses de 1, 5, 15 e 30 vezes a dose usual utilizada em rituais religiosos da UDV no teste comportamental de natação forçada (PIC-TAYLOR et al., 2015; MELO JUNIOR. et al., 2016). Porém este efeito não ficou evidente quando os animais foram tratados a cada dois dias por 70 dias com 1 a 8X a dose usual (SANTOS, 2016). Pic-Taylor et al. (2015) mostraram também o aumento da atividade neural de ratos tratados na dose de 30X. Schennberg et al. (2015) avaliaram nove estudos de caso (oral ou

escrito) em humanos que reportam o uso da ayahuasca no tratamento de câncer, incluindo de próstata, ovário e cérebro. Oliveira et al. (2010) demonstraram que a administração oral do chá de ayahuasca na dose de 1X (100mL/70 kg) durante a gestação e lactação produziu diminuição da ansiedade e da motivação social na prole das mães expostas ao chá de ayahuasca.

Estudo realizado por Castro-Neto et al. (2013) mostrou que o nível de 5-HT aumentou no complexo amigdalóide de encéfalos de ratos que receberam uma dose de 500 ou 800 mg/kg de ayahuasca. Também foi observado um aumento da taxa de utilização de todas as monoaminas após a administração de ayahuasca em doses de 250 a 800 mg/kg.

Uma revisão da literatura sobre ayahuasca sugere que o consumo de preparações tradicionais em ambientes sociais acarreta em um risco mínimo de potencial de abuso ou formação de dependência (GABLE, 2007). Na verdade, as limitadas evidências disponíveis sugerem que a ayahuasca pode ser benéfica no tratamento da dependência associada ao álcool ou outras drogas de abuso, com relatórios publicados de usuários em ambientes tradicionais e urbanos mantendo a abstinência da dependência prévia de substâncias com mais sucesso do que os controles socioeconômicos (THOMAS et al., 2013; FÁBREGAS et al., 2010).

Tem sido demonstrado que o uso da ayahuasca no contexto religioso é seguro. Em usuários de longo prazo, uma avaliação psicológica demonstrou que as funções cognitivas tais como a habilidade matemática e fluência verbal não foram alteradas (GROB et al., 1996; BARBOSA et al., 2016; DA SILVEIRA et al., 2005).

Estudo realizado com o objetivo de determinar a toxicidade oral aguda da ayahuasca em ratas fêmeas Wistar, identificou que a DL50 de uma infusão de ayahuasca cedida pela UDV foi acima de 50X a dose usada em um ritual religioso, sugerindo baixa toxicidade oral aguda da infusão vegetal (PIC-TAYLOR et al., 2015). O mesmo estudo avaliou a neurotoxicidade da ayahuasca em regiões do cérebro ricas em receptores serotoninérgicos como amígdala, núcleo da rafe e hipocampo. Foi identificada uma forte atividade neuronal, evidenciada pela marcação de neurônios reativos a c-fos nos animais expostos a ayahuasca em uma dose única de 30X a dose usual. A quantificação da densidade neuronal pela coloração de Nissl não indicou danos cerebrais permanentes

que resultassem em alteração na morfologia e quantidade celular, apesar de haver alguma neurodegeneração indicada pela coloração com Fluoro-Jade.

Estudo conduzido por Brito et al. (1994) concluiu que uma dose de 500 mg/kg pc de chá de ayahuasca administrado em ratos não produz dano neurológico, e que os efeitos observados nos animais foram similares àqueles produzidos por fármacos que elevam os níveis de 5-HT no SNC. Estudo conduzido por Melo Junior et al. (2016) mostrou que as doses administradas de 1X e 5X não provocaram citotoxicidade ou danos no DNA. Porém, os animais tratados com a dose de 15X apresentaram um aumento na incidência de micronúcleos, indicando danos citogenéticos.

Estudo realizado por Motta et al. (2018) com o objetivo de avaliar a toxicidade crônica da ayahuasca administrada durante 15 dias consecutivos em ratas prenhas mostrou que 48% dos animais tratados com 4X e 8X a dose usual foram a óbito, após 96h e 48h do início do tratamento, respectivamente. No mesmo estudo foi identificado um aumento do peso do estômago nos animais tratados com as doses de 1X, 2X e 8X, bem como uma dilatação do estômago e intestino nos animais tratados com a maior dose (8X). Além disso, foram verificadas alterações histopatológicas significativas no baço, fígado e rins dos animais tratados, embora tenham sido consideradas de grau leve. Este estudo sugere que a ayahuasca possui um potencial neurotóxico importante quando administrada cronicamente em doses altas, evidenciado por uma diminuição significativa da densidade neuronal em regiões do hipocampo e núcleo da rafe.

Estudo de neurotoxicidade conduzido por Figueroa (2012) com ratos Wistar machos, tratados oralmente com chá de ayahuasca durante três semanas com dose ritual diluída (50% a dose usual) revelou aumento significativo nos valores de ureia urinária, podendo ser um indicativo de dano renal nos animais tratados. Santos et al. (2013) verificou um aumento significativo nos níveis de TGO (transaminase glutâmica oxalacética) em animais tratados com ayahuasca cronicamente em dose usual diária (100 ml/kg pc), demonstrando haver algum grau de comprometimento da função hepática desses animais.

## 2.5. Testes de Comportamento

Conceitos como depressão e ansiedade patológica no homem são altamente subjetivos, e o vasto espectro de distúrbios torna difícil a reprodução dessa enfermidade no laboratório. De fato, pensamentos recorrentes de morte ou suicídio e culpa que caracterizam a doença são impossíveis de modelar em animais de laboratório (CRYAN et al., 2002). Uma estratégia utilizada com este fim é avaliar modelos comportamentais, que são o resultado da integração do sistema nervoso nos seus vários níveis de organização (molecular, celular, tecidual) (MOSER, 2011).

Existe um consenso de que nenhum dos testes comportamentais que avaliam a depressão e a ansiedade patológica fornece uma medida do perfil emocional do animal, pois cada teste avalia apenas uma parte desse perfil (RAMOS, 2008). Portanto, para uma avaliação sistemática dos efeitos de substâncias psicoativas sobre o sistema nervoso é recomendado o uso de diferentes testes comportamentais (STEIMER, 2011).

Os testes de comportamento realizados em ambiente desconhecido permitem identificar traços do comportamento emocional dos ratos frente ao desconhecido. A neofobia pode ser definida como a reação comportamental de ratos submetidos à um ambiente novo e estressante (WING et al., 1990). Essa reação é constituída por um conjunto de alterações caracterizado por pouca atividade motora, baixos níveis de preparação/autolimpeza (*grooming*) e exploração (*rearing*), também pelo comportamento de evitar a área central do campo (tigmotaxia). Nessa situação, o comportamento é considerado passivo e limitado (KATZ et al., 1981). A administração de substâncias alucinógenas com ação agonista sobre receptores 5HT-2 é tida como potencializadora da neofobia inicial, pois suprime atividade locomotora e comportamento exploratório no campo aberto. Por outro lado, esse efeito não é observado após a administração dos agonistas serotoninérgicos quando em ambiente familiar ou após acomodação (WING et al., 1990). Os padrões comportamentais e as reações fisiológicas ativadas em decorrência do contato com essas fontes sinalizadoras de perigo em potencial são utilizados como medidas de ansiedade e geralmente apresentam grande correspondência com as medidas de ansiedade em humanos (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

O teste do campo aberto (TCA) é um modelo animal comportamental bastante utilizado na investigação da atividade locomotora, bem como no comportamento

associado a ansiedade. É baseado na aversão natural do roedor a lugares abertos, quando o animal tende a ter um comportamento de tigmotactismo, no qual ele anda próximo às paredes do aparato (LAMPREA et al, 2008). Em geral, o teste consiste em colocar o animal no centro do aparato (Figura 13) e avaliar durante 5 minutos sua atividade locomotora (número de quadrantes percorridos), frequência de elevação (atividade vertical, *rearing*), frequência de *grooming* ou autolimpeza (movimento das patas anteriores em direção à boca e cabeça), quantidade de bolos fecais (defecação) e frequência de micção (PRUT e BELZUNG, 2003). A ansiedade pode ser caracterizada pelo aumento da excitação, expectativa, ativação autonômica e neuroendócrina e padrões específicos de comportamentos. O efeito ansiolítico é caracterizado por aumento na deambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central. Portanto, tratamento com ansiolíticos não aumenta a exploração do campo, mas diminui o estresse induzido no comportamento de exploração. Tratamentos clássicos com benzodiazepínicos ou com agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> em sua maioria são capazes de induzir um efeito ansiolítico no TCA (PRUT e BELZUNG, 2003).



**Figura 13.** Aparato utilizado no Teste do Campo Aberto.

A atividade locomotora dos sujeitos de teste é importante para discernir qualquer confusão/desorientação do animal. Se a capacidade locomotora está comprometida pelos efeitos do tratamento, então a medição de atividades que dependem da capacidade do sujeito de se mover é confundida (SEIBENHENER e WOOTEN, 2015).

Estudo conduzido no nosso grupo por Melo Junior (2014), com o objetivo de investigar os efeitos neurocomportamentais agudos da ayahuasca em ratos Wistar mostrou que os animais (fêmeas e machos) tratados com 15X a dose usual da bebida no contexto religioso (150 mL por um indivíduo de 70 kg) apresentaram um comportamento exploratório significativamente menor avaliado no TCA 1 hora após a administração, comparado ao grupo controle e ao grupo de 1X. Porém a locomoção na área central do campo não diferiu estatisticamente dos outros grupos. Resultado semelhante foi observado em estudo conduzido também pelo nosso grupo com ratas tratadas com ayahuasca nas doses de 30X e 50X, onde houve uma diminuição significativa na locomoção e exploração de animais desses grupos, assim como no grupo tratado com fluoxetina, quando comparados aos controles (PIC-TAYLOR et al., 2015).

Durand et al. (1999) não demonstraram a ocorrência de efeito ansiolítico da fluoxetina em ratos na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal durante 21 dias no campo aberto. A paroxetina, outro ISRS, e os ATCs amitripitilina e clomipramina também não demonstram tal efeito em estudo de Prut e Belzung (2003). Já estudo de Bernabé (2013) demonstrou uma diminuição significativa dos quadrantes percorridos no centro do TCA por ratos com isolamento social neonatal tratados com 2mg/kg/dia (ip) de fluoxetina por 21 dias.

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) também é largamente utilizado como modelo de ansiedade animal e mobilidade. Este teste se baseia em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos, onde o animal é confrontado pelo impulso de explorar ambientes novos e desconhecidos e a tendência em evitar áreas potencialmente perigosas (como lugares mais altos). Handley e Mithani (1984) observaram que em um labirinto elevado a 70 cm do chão contendo dois braços abertos e dois braços fechados dispostos de formas opostas, os ratos evitam os braços abertos (Figura 14). A esquivas aos braços abertos é reduzida com agentes ansiolíticos e reforçada com agentes ansiogênicos. Portanto, os determinantes críticos inversamente relacionados com a ansiedade são o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos. O tempo gasto na área central do labirinto é correlacionado com um comportamento referido como avaliação de risco. Os eventos de micção, autolimpeza, elevação (apoio nas patas traseiras, *rearing*) e defecação também são quantificados (HOGG, 1996).





**Figura 14.** Aparato utilizado no Teste de Cruz Elevado.

Gomes et al. (2009) verificaram que camundongos tratados com dose única de fluoxetina (5, 10, 20 ou 40 mg/kg i.p) obtiveram um comportamento de evasão inibitória aos braços abertos no LCE, sugerindo atividade ansiolítica. Quando os animais foram tratados de forma crônica com as mesmas doses por 15 dias consecutivos, verificou-se um comportamento contrário, evidenciando um efeito ansiogênico. O *rearing* é caracterizado como um comportamento exploratório observado em estado de baixa ansiedade, quando não há comprometimento de mobilidade (ALVES et al., 2012).

O teste de nado forçado (TNF) em roedores foi descrito inicialmente por Porsolt et al. (1978). Este teste é a ferramenta mais amplamente utilizada para avaliar a atividade antidepressiva em estudos não clínicos de fármacos, principalmente devido à facilidade de uso, reprodutibilidade entre os laboratórios e capacidade de detectar um amplo espectro de agentes antidepressivos (NUNES e HALLAK, 2014). O teste consiste na observação da imobilidade ou do comportamento ativo do rato. Duas sessões de natação foram propostas por Porsolt - uma primeira sessão de treinamento de 15 minutos com ratos não expostos, e uma segunda sessão de teste de 5 minutos, 24 horas depois. Os ratos, após inicial movimentação orientados à uma fuga, desenvolvem uma postura imóvel quando colocados em um cilindro de água inescapável (Figura 15). Se são recolocados no aparato de teste 24 horas depois, eles retomam essa postura

imóvel rapidamente. A mudança comportamental entre o pré-condicionamento e teste no TNF pode refletir uma mudança de humor devido à exposição, mas também poderia envolver um elemento de aprendizagem e memória e ser indicativo de aspectos cognitivos da depressão maior em humanos (NAUDON e JAY, 2005). Para eliminar esse fator, uma única sessão de 5 minutos pode ser usada (OVERSTREET, 2012; TAIWO et al., 2012). Alguns autores analisam o comportamento do animal em períodos de 5 segundos ao longo do 5 minutos de duração do teste, distinguindo os comportamentos de natação, imobilidade e *climbing* (SLATTERY e CRYAN, 2012).



**Figura 15.** Aparato utilizado no Teste de Natação Forçado

O potencial antidepressivo do fármaco no TNF é caracterizado pelo aumento da mobilidade. A imobilidade observada em animais controle ou expostos a substâncias sem atividade antidepressiva pode ser vista como meio de conservar energia, falha na persistência em escapar e desespero comportamental (CRYAN et al., 2002). ISRS como a fluoxetina diminuem o tempo de imobilidade e aumentam o tempo de natação, enquanto agentes catecolaminérgicos diminuem imobilidade e aumentam o tempo de *climbing* (CRYAN et al., 2002). No estudo de Pic-Taylor et al. (2015), ratas tratadas com ayahuasca nas doses de 30X e 50X mostraram atividade de natação significativamente maior e imobilidade significativamente menor comparado aos grupos controle e fluoxetina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Gerais**

Avaliar o potencial antidepressivo da ayahuasca em ratos Wistar expostos por 28 dias.

#### **Específicos**

- Avaliar a toxicidade crônica da ayahuasca.
- Avaliar o potencial ansiolítico e antidepressivo da ayahuasca por meio de testes comportamentais – campo aberto, elevado em cruz elevada e natação forçada.
- Otimizar um método por HPLC-FL para analisar os níveis de dopamina, norepinefrina, serotonina e seus metabólitos no encéfalo dos ratos.
- Analisar os níveis de dopamina, norepinefrina, serotonina e seus metabólitos no encéfalo.
- Avaliar os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na formação hipocampal dos ratos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados 85 ratos da linhagem *Wistar*, sendo 43 machos e 42 fêmeas com idade de cinco semanas e uniformes quanto ao peso ( $180 \pm 15$ g os machos e  $140 \pm 15$ g as fêmeas), provenientes do Instituto de Biologia da USP, São Paulo.

Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da UnB em gaiolas de polipropileno com grade zincada em estante ventilada da Alesco® e passaram por um período de aclimação de 10 dias antes do início do experimento. Durante todo o período, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade (45-60%), ciclo de claro/escuro de 12h/12h, e receberam ração comercial para roedores (Purina®) e água filtrada *ad libitum*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBdoc n° 66693/2016 (Anexo I). As condições ambientais, manejo e cuidado dos animais seguiram as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e do *Guideline for the Testing of Chemicals* (OECD, 2003). Também foram seguidas recomendações do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB/IB e observada a Lei Arouca 11794/2008.

### 4.2. Preparo e aquisição do chá ayahuasca

O chá ayahuasca utilizado nesse estudo foi cedido em 2011 pelo Núcleo Luz do Oriente da União do Vegetal, com sede em Brazlândia-DF, e foi feito a partir da cocção do *B. caapi* colhido em Águas Lindas de Goiás ( $15^\circ 46' 17''$  S,  $48^\circ 14' 56''$  W) e da *P. viridis* proveniente de Sobradinho, DF ( $15^\circ 75' 23''$  S,  $47^\circ 72' 92''$  W). Espécimes das plantas utilizadas no preparo foram depositadas no herbário da Universidade de Brasília com os respectivos números de referência - Azevedo EP 149880 BRAHMS e Trieto B 149879 BRAHMS.

Durante o preparo o material foi depositado em grandes recipientes em camadas alternadas e recobertos com água. O material foi fervido por 5 horas atingindo uma coloração marrom, coado e armazenado em garrafas esterilizadas de 1 litro. Cerca de 30 litros foram cedidos para a pesquisa, sendo armazenados no Laboratório de Toxicologia da UnB em freezer  $-20^\circ\text{C}$ . O chá foi liofilizado no liofilizador K105 (LIOBRAS) a

temperatura abaixo de  $-70^{\circ}\text{C}$  e pressão inferior a  $100\ \mu\text{Hg}$  (Figura 16), e o liofilizado mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até momento do uso. A densidade do chá foi estimada em  $0,1615\ \text{g/mL}$ .



**Figura 16.** Ayahuasca sendo liofilizada em nosso laboratório.

### 4.3. Caracterização química

Os padrões de harmalina e harmina, 99,2% e 98% de pureza, respectivamente, foram obtidos da Sigma Aldrich. O DMT foi sintetizado conforme descrito por Qu et al. (2011), e a tetrahydroharmina sintetizada a partir da harmalina, segundo Callaway et al. (1996). A identidade e pureza dos compostos sintetizados foram determinadas por LC-MS/MS (Shimadzu LC sistema acoplado a um espectrofotômetro de massas 4000 QTRAP, Applied Biosystem),  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR (Varian Mercury Plus spectrometer 7.05 operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$  and at 75.46 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) e LC-MSD TOF (Agilent 1100 Series).

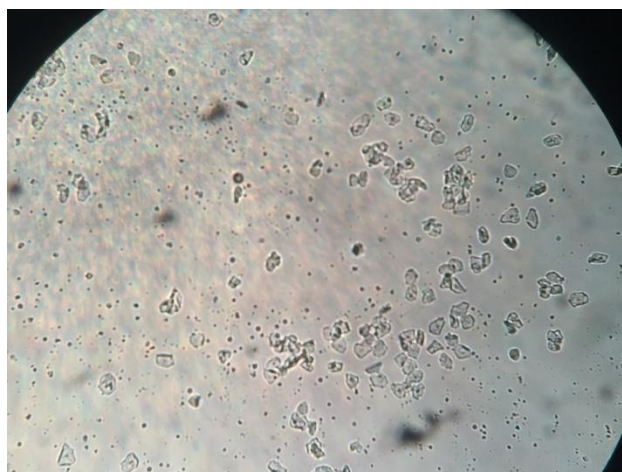
Os níveis de DMT, harmina, harmalina e tetrahydroharmina presentes no chá ayahuasca foram determinados por CG-MS/MS (Trace Ultra coupled with a TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole; Thermo Scientific) pouco antes do experimento. A análise quantitativa indicou a presença de  $0,12\ \text{mg/mL}$  de DMT,  $1,19\ \text{mg/mL}$  de harmina,  $0,08\ \text{mg/mL}$  de harmalina e  $0,15\ \text{mg/mL}$  de tetrahydroharmina.

### 4.4. Delineamento experimental

O protocolo do estudo seguiu os parâmetros gerais recomendados pelo *Guidelines for the Testing of Chemicals* No. 407/95 da OECD (*Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents*). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco

grupos, com no mínimo 6 animais de cada sexo por grupo: utilizou-se três grupos tratados com a ayahuasca, um grupo controle negativo (água) e um grupo controle positivo (fluoxetina). Cada caixa de polipropileno acomodou apenas um animal.

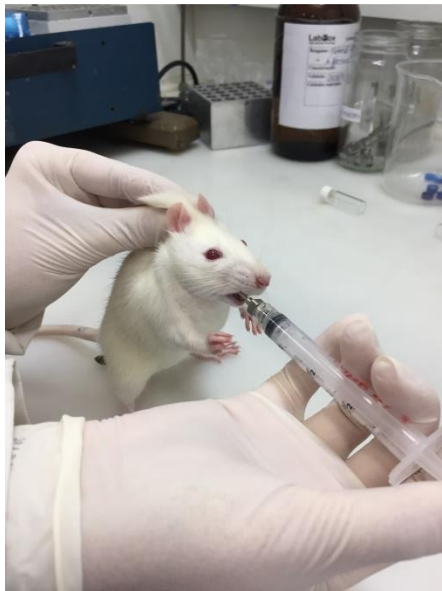
Antes do início dos tratamentos, a secreção vaginal das ratas foi coletada e o lavado vaginal não corado foi observado a fresco, em microscópio ótico, para o reconhecimento da fase estral em que cada rata se encontrava (Figura 17). O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (MARCONDES et al., 2002). O objetivo era obter um grupo de ratas mais homogêneo possível, que estivessem no mesmo ciclo estral quando iniciassem o experimento.



**Figura 17.** Lâmina da secreção vaginal das fêmeas.

Os grupos experimentais foram tratados por gavagem (Figura 18) com ayahuasca nas doses de 0,5X, 1X e 2X a dose utilizada em um ritual religioso da União do Vegetal, aproximadamente 150 mL para um indivíduo de 70 kg (1X), pelo peso corpóreo (pc), mantendo um volume final de 2 mL, preparado a partir do material liofilizado. A dose ritual desta infusão (1X) corresponde a 0,26 mg/kg pc DMT, 2,58 mg/kg pc harmina, 0,171 mg/kg pc harmaline e 0,33 mg/kg pc de tetrahydroharmina. O grupo controle negativo foi tratado com água filtrada e o grupo controle positivo com fluoxetina (FLX, 10 mg/kg pc – manipulada pela farmacotécnica®), ambos também por gavagem. O tratamento para todos os grupos foi realizado diariamente durante 28 dias, no início da manhã. Foi feita a avaliação clínica diária dos animais e o peso corpóreo foi

verificado a cada três dias. Os animais foram pesados em balança calibrada da Marca Camry, modelo EK9333.



**Figura 18.** Gavagem dos ratos.

#### **4.5. Testes Comportamentais**

Os testes neurocomportamentais foram realizados cerca de uma hora após a última dose do tratamento. Todos os testes foram filmados e depois analisados pelo software PlusMZ v1.0, disponível gratuitamente na internet.

O Teste de Campo Aberto (TCA) foi realizado em uma arena circular branca de madeira, com área de 0,72 m<sup>2</sup>, raio de 0,48 m e uma contenção lateral com 0,34 m de altura. O piso dessa arena é dividido em 18 quadrantes de locomoção e um quadrante central onde o animal iniciava o teste (Figura 13). Durante 5 minutos foram quantificados o número de quadrantes percorridos pelo animal, o número de vezes em que o animal retorna ao círculo central e o tempo que ele permanece no centro, a quantidade de bolos fecais e micção, o número de elevações (apoio nas patas traseiras), o número de execuções de autolimpeza e o tempo gasto em cada uma dessas atividades. Ao final de cada sessão o aparato foi limpo com álcool 5%.

No teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), os animais foram colocados na área central (10 cm x 10 cm) do labirinto, que consiste em um aparato marrom de

madeira em forma de cruz, elevado a 38 cm do chão. Este possui dois braços abertos e dois braços fechados, ambos com 50 cm de comprimento e os braços fechados possuem paredes com 43 cm de altura (Figura 14). Durante 5 minutos foram quantificados o número de entradas e o tempo de permanência em cada braço, bem como na área central. Foram quantificados também o número de elevações, autolimpeza, micção e defecação. Ao final do teste o aparato foi limpo com álcool 5%.

O Teste da Natação Forçada foi realizado por último, após os outros dois testes, em um cilindro de acrílico transparente com 50,5 cm de altura e 39 cm de diâmetro, com água (23 - 25°C) a uma profundidade de 30 cm (Figura 15). Durante o teste foram quantificados os comportamentos predominantes de natação, imobilidade ou *climbing* a cada 5 segundos, conforme protocolo modificado de Detke et al. (1995), perfazendo um total de 60 escores, bem como o número de bolos fecais (defecação). Ao final do teste o animal foi retirado da água e seco com pano limpo.

#### **4.6. Eutanásia e coleta de material biológico**

Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina especializada, em torno de 3 horas depois do último tratamento e o sangue foi imediatamente colhido por punção cardíaca. Foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue de cada animal, dos quais, aproximadamente 1,5 mL de soro foi armazenado a - 20°C para posterior análise bioquímica.

O encéfalo foi retirado, lavado com tampão fosfato-salino (PBS) e pesado (Figura 19). Em seguida, foram seccionados ao meio para a retirada da formação hipocampal de cada hemisfério, que foram transferidas para gral, macerados com nitrogênio líquido e armazenados em Eppendorf a -80°C para posterior análise de BDNF (Figura 20). A porção remanescente do encéfalo foi tratada da mesma maneira para posterior análise das monoaminas (Figura 21).





**Figura 19.** Encéfalo dos animais eutanasiados.



**Figura 20.** Encéfalo (sem a formação hipocampal) e formação hipocampal, respectivamente, no nitrogênio líquido antes da maceração.



**Figura 21.** Encéfalo macerado em nitrogênio líquido.

## **4.7. Avaliação hematológica e bioquímica**

A amostra de sangue foi encaminhada para análise em hematómetro automatizado Sysmex Poch 100iVDiff™ calibrado para ratos, em torno de cinco horas após a coleta. As amostras ficavam armazenadas no -20°C nesse período. Devido ao tempo transcorrido entre as coletas e a análise, não foi possível a análise do plaquetograma (PLT). Foram analisados os seguintes parâmetros: hemoglobina (HGB), hematócrito total (HCT), eritrograma (RBC), leucograma (WBC), volumes corpusculares e seus índices de variação. Aproximadamente 1,5 mL de soro de cada animal foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C para análise bioquímica. Foram avaliadas a função hepática pelos parâmetros enzima transaminase glutâmico oxalacética (TGO), enzima transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina (FAL); a função renal pelos parâmetros ureia e creatinina sérica, e danos teciduais pela lactato desidrogenase (LDH). As análises foram feitas no analisador bioquímico automático Chemwell-t Labtest.

## **4.8. Análise de monoaminas no encéfalo (ausência da formação hipocampal)**

### **4.8.1. Preparo das soluções padrão**

Os padrões analíticos serotonina (5-hidroxitriptamina) (pureza 99%), dopamina, 5-HIAA (ácido 5-hydroxiindol-3-acético) (pureza 98,2%), MHPG (sulfato de 4-hydroxy-3-methoxifenilglicol) (pureza 98,4%), DOPAC (ácido 3,4-diidroxiifenilacético) (pureza 99,5%) e HVA (ácido homovalínico) (pureza 99,5%) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®, e o padrão analítico norepinefrina (pureza 99,8%) foi adquirido da USP (Farmacopeia Americana).

Soluções estoque de cada padrão analítico foram preparadas em água ultrapura (Millipore®) com concentração de 1 mg/mL. A massa necessária de cada padrão foi pesada em balança analítica calibrada Shimadzu® AUW220D (5 casas decimais) e então dissolvida em água ultrapura e o volume completado para 10 mL em balão volumétrico calibrado (Laborglass®). A solução resultante foi armazenada em vial âmbar a -20 °C.

A partir da diluição da solução estoque, obtiveram-se as soluções trabalho de cada analito preparada diariamente, e a partir dessas foram preparadas as soluções mistas, contendo todos os analitos em estudo. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se pipetas automáticas calibradas de volumes variados e balões calibrados de 10 mL.

#### 4.8.2. HPLC-FL

Foi utilizado sistema HPLC-FL da marca Shimadzu®, modelo LC20AT, com injetor automático modelo SIL-20SA, sistema quaternário de bombas LC, 20AT, forno de coluna modelo CTO-20SAC, módulo comunicador CBM-20A, forno de reação pós-coluna modelo CRB-6A, e detector de fluorescência modelo 10AXL conectado ao software LC Solution® (Figura 22). A temperatura da caixa de reação química foi estabelecida em 35°C e a fluorescência foi monitorizada na excitação e comprimentos de onda de emissão de 279 nm e 320 nm, respectivamente.

Foi utilizada coluna analítica C18 Gemini (150 × 4,6 mm, 5 µm) precedida por uma pré coluna de segurança C18 (4.0 × 3.0 mm, 5 µm), ambas da Phenomenex® (Torrance, CA, EUA).



**Figura 22.** Sistema cromatográfico Shimadzu® do Laboratório de Toxicologia: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) injetor; d) coluna; e) detector; f) módulo comunicador; e g) resíduos.

A fase móvel aquosa foi preparada diluindo-se 0,0968 g Na<sub>2</sub>EDTA (Vetec®) em água ultrapura no balão volumétrico de 1000 mL (0,26 mM), o pH ajustado para aproximadamente 3,2 com adição de 0,68 mL de ácido acético (J.T.BAKER®) em pHmetro (AJ Micronal®, modelo AJX-512), a solução filtrada a vácuo em membrana PTFE 0,45 µm (Millipore®) e levada ao ultrassom (Unique®, Modelo USC – 3300) por 10 minutos para retirada de bolhas. Metanol grau HPLC (pureza 98%; Merck®) foi usado como fase orgânica.

Diferentes fluxos, volumes de injeção e razão das fases móvel foram testados para separar os analitos no menor tempo de corrida possível. As condições cromatográficas otimizadas neste estudo foram:

- ✓ Sistema de eluição e fase móvel em gradiente onde: até o minuto 7,5 o fluxo permanece constante em 0,5 mL/min, e a concentração de metanol em 5% ; no minuto 7,5, o fluxo sobe para 1 mL/min e a concentração de metanol para 16%; no minuto 9, a concentração de metanol sobe para 25%; no minuto 20 a concentração de metanol sobe de novo para 30% e no minuto 25 vai para 80%; no minuto 35 o fluxo cai novamente de 1 mL/min para 0,5 mL/min; e por fim, no minuto 40, a concentração de metanol volta para 5% ficando assim por 10 minutos até o início da nova injeção;
- ✓ Tempo de corrida: 50 min;
- ✓ Volume de injeção: 20 µL;

O padrão de 5-HT apresentou tempo de retenção no sistema HPLC-FL muito menor que o reportado na literatura, maior que dos outros neurotransmissores. O padrão foi então analisado no TOF (espectrômetro de massa por tempo-de-voo) e foi observada uma possível degradação do padrão. A empresa Sigma-Aldrich foi contatada e nos enviou um novo padrão, que apresentou o tempo de retenção muito próximo ao anterior. A identidade de todos os padrões foi confirmada por LC-MS/MS (sistema Shimadzu LC acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo de 4000 Qtrap, equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização Turbo Ion Spray (ESI) e operação do sistema/aquisição de dados controlados pelo software Analyst®).

Para o padrão DOPAC, foram observados dois picos distintos no cromatograma, nos tempos de retenção de aproximadamente 8 e 12,5 minutos em todas as injeções, inclusive na solução mãe recém-preparada. Na literatura, o esperado é encontrar apenas um pico (CASTRO-NETO et al., 2013; CAVALHEIRO et al., 2004; BENEDETTO et al., 2014). Para este metabólito, decidiu-se somar as áreas dos dois picos para a quantificação.

#### **4.8.3. Extração das monoaminas das amostras de encéfalo (sem formação hipocampal)**

Diferentes pesos de encéfalo, volumes de extração, e parâmetros da centrífuga foram testados, chegando ao seguinte procedimento: aproximadamente 50 mg de encéfalo (pesados quantitativamente) foram transferidos para tubo eppendorf, 100 µL de uma solução de extração 0,2 M de ácido perclórico (IMPEX®) e 3 mM de cisteína (SIGMA®) foram adicionados, o tubo vortexado por 20 segundos e posteriormente centrifugado por 20 minutos (5000RPM, 4°C). O sobrenadante foi injetado no HPLC-FL. Para cada amostra, foram pesadas três subamostras que foram submetidos ao processo de extração e análise. Os *outliers* foram desprezados quando o CV das subamostras foi superior a 50%, a subamostra mais discrepante foi excluída, sendo, portanto, analisada em duplicata.

#### **4.8.4. Validação do método otimizado**

A seletividade é a capacidade do método de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2017). Nesse estudo, a seletividade foi avaliada pela análise de um extrato de encéfalo fortificado com todos os analitos de interesse e de um extrato de encéfalo sem fortificação.

O efeito matriz pode ser avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a solução de extração e uma curva de calibração construída em um extrato da matriz (encéfalo) (ANVISA, 2017).

A linearidade do método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). O coeficiente de correlação de uma curva analítica deve ser idealmente acima de 0,99. Nesse estudo, a linearidade foi avaliada por meio de 5 curvas analíticas de soluções trabalho mistura (STM) nos níveis 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 ng/μL para NE; 0,05; 0,2; 1; 2 e 4 ng/μL para DA; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 ng/μL para 5-HT; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 e 1 ng/μL para 5-HIAA; 0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2 ng/μL para DOPAC; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 e 1 ng/μL para HVA e 2; 4; 8; 10 e 15 ng/μL para MHPG.

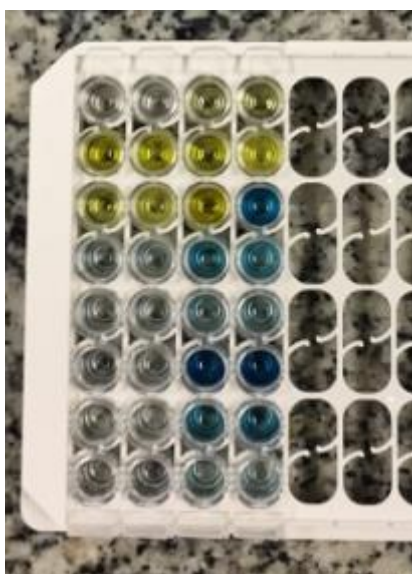
A precisão de um método analítico avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra e, usualmente, é expressa como o desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas (BRITO et al., 2003). A repetitividade foi avaliada pela análise dos cinco níveis das curvas analíticas em solvente em 5 dias diferentes.

A sensibilidade de um método analítico pode ser avaliada pelo seu Limite de Quantificação (LOQ), que pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (valores de  $CV \leq 20\%$ ).

#### **4.9. Quantificação de BDNF**

Os níveis de BDNF na formação hipocampal foram determinados utilizando o kit ChemiKine™ BDNF sandwich-ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (Milipore, USA). Neste kit, os 96 poços da placa são revestidos com anticorpo monoclonal BDNF anti-humano de rato. A região foi homogeneizada em 20 vezes sua massa em tampão contendo 100mM Tris/HCl, pH 7, 2% de albumina sérica bovina (BSA), 1M NaCl, 4mM EDTA.Na<sup>2</sup>, 2% Triton X-100, 0,1% de azida sódica e inibidores de protease (Promega, USA). As amostras foram diluídas 1:2 e depois 1:4 no diluente do kit e a curva padrão variou de 15,63 a 1000 pg/ml de BDNF. Após as soluções de amostras e a curva ficarem no agitador a 2-8°C durante a noite, os poços foram lavados quatro vezes com o tampão de lavagem e o anticorpo monoclonal biotilado anti-bdnf de camundongo, diluído 1:1000 no diluente, foi adicionado em cada poço e a placa deixada por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem com

tampão, a solução diluída 1:1000 do conjugado de estreptavidina-HRP (enzima peroxidase de rábano) foi adicionada em cada poço e a placa incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Depois de nova lavagem, foi adicionado TMB/E (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) em cada poço e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente para que os poços fossem atingindo coloração azul. Ao acrescentar a solução de parada (solução de ácido clorídrico que vem no kit), a coloração azul muda para amarela (Figura 23) e a concentração de BDNF foi determinada por meio da leitura imediata da absorbância no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro FlexStation 3. A curva padrão apresentou linearidade satisfatória ( $R^2=0,99$ ).



**Figura 23.** Transição da coloração azul para a amarela no Elisa.

As análises foram feitas em duplicata (duas subamostras da formação hipocampal) e a concentração média de BDNF foi expressa em proteínas totais, em peso de encéfalo e em peso de formação hipocampal.

As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry modificado, utilizando soro bovino (Sigma-Aldrich®) 1 mg/mL como padrão. A curva padrão foi realizada com 7 pontos: 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ (branco); 390  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ + 10  $\mu$ L de BSA; 380  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ + 20  $\mu$ L de BSA; 360  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ + 40  $\mu$ L de BSA; 320  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ + 80  $\mu$ L de BSA; 240  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ + 160  $\mu$ L de BSA; e 80  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ + 320  $\mu$ L de BSA. 20  $\mu$ L da amostra foram transferidos para tubo eppendorf de 2 mL ao qual foram acrescentados 360  $\mu$ L da solução A (2,7 g de

tartarato de sódio e potássio tetrahidratado + 100 g de carbonato de sódio + 500mL de hidróxido de sódio 1N para um volume de 1000 mL de água miliQ). O tubo foi incubado a 50°C por 10 minutos, esfriado em água corrente, e adicionou-se 40 µL da solução B (2,7 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado + 2 g de sulfato de cobre pentahidratado + 10 mL de hidróxido de sódio 1 M para um volume de 1000 mL de água miliQ). O tubo foi agitado, deixado em temperatura ambiente por 10 minutos, e adicionou-se 1200 µL da solução C [1mL de Folin (Sigma-Aldrich®) para cada 15mL de água destilada]. Após agitação, o tubo foi novamente incubado a 50°C por 10 minutos, deixado esfriar até temperatura ambiente. A absorvância no comprimento de onda 650 nm, medida no espectrofotômetro FlexStation 3.

#### **4.10. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences) ou Graphpad Prism 7.4. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (epm). Para comparação entre os grupos controle e tratados foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para tomada de decisão (teste paramétrico ou não-paramétrico). Para as amostras com distribuição normal foi utilizado Anova One-Way com teste de múltiplas comparações post-hoc Tukey e Bonferroni. Para amostras com distribuição não-normal utilizou-se teste não paramétrico Kruskal-Wallis e Man-Whitney. A significância foi estabelecida no nível de 95% ( $p < 0.05$ ).



## 5. RESULTADOS

Ao longo de todos os ensaios experimentais, nenhum óbito dos animais foi observado. A Tabela 3 mostra o peso médio dos animais de cada grupo do estudo e dos órgãos avaliados. Não houve diferença estatística significativa em relação ao peso corporal entre os grupos de tratamento para cada sexo. Porém, o ganho de peso ao longo do tratamento das fêmeas do grupo FLX foi significativamente menor em comparação com os outros grupos (Tabela 4).

**Tabela 3.** Peso total e dos órgãos (g) de animais dos grupos H<sub>2</sub>O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm.

Grupo	H <sub>2</sub> O	FLX	Aya0,5	Aya1	Aya2
Fêmeas					
N	8	9	9	8	8
Total	224,1 ± 7,4	206,8 ± 5,6	228,9 ± 5,4	221,9 ± 7,4	220,8 ± 5,2
Rins <sup>a</sup>	1,74 ± 0,06	1,64 ± 0,07	1,77 ± 0,04	1,74 ± 0,05	1,72 ± 0,04
Baço	0,59 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,55 ± 0,02	0,56 ± 0,04
Fígado	7,74 ± 0,24	7,39 ± 0,39	8,36 ± 0,30	7,91 ± 0,40	8,13 ± 0,29
Coração	0,87 ± 0,05	0,80 ± 0,05	0,88 ± 0,03	0,85 ± 0,04	0,82 ± 0,04
Pulmão	1,54 ± 0,07	1,47 ± 0,10	1,59 ± 0,08	1,46 ± 0,03	1,52 ± 0,06
Encéfalo	1,89 ± 0,02	1,83 ± 0,03	1,88 ± 0,06	1,96 ± 0,07	1,85 ± 0,03
Encéfalo (peso relativo)	0,85 ± 0,03	0,89 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,89 ± 0,04	0,84 ± 0,02
Machos					
N	8	9	7	10	9
Total	383,8 ± 11,4	376,6 ± 16,6	380,4 ± 16,8	371,6 ± 9,61	371,4 ± 12,0
Rins <sup>a</sup>	2,85 ± 0,09	2,73 ± 0,10	2,82 ± 0,14	2,76 ± 0,09	2,88 ± 0,08
Baço	0,80 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,90 ± 0,07	0,85 ± 0,04	0,83 ± 0,04
Fígado	13,4 ± 0,74	14,2 ± 0,81	13,8 ± 0,92	13,6 ± 0,58	13,0 ± 0,36
Coração	1,25 ± 0,04	1,28 ± 0,09	1,37 ± 0,08	1,26 ± 0,05	1,32 ± 0,07
Pulmão	2,28 ± 0,14	2,25 ± 0,11	2,30 ± 0,19	2,07 ± 0,11	2,11 ± 0,05
Encéfalo	2,05 ± 0,03	2,01 ± 0,03	2,07 ± 0,04	2,00 ± 0,03	2,02 ± 0,02
Encéfalo (peso relativo)	0,54 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,55 ± 0,02

<sup>a</sup>soma dos pesos dos rins.

**Tabela 4.** Ganho de peso durante o tratamento de animais dos grupos H<sub>2</sub>O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm.

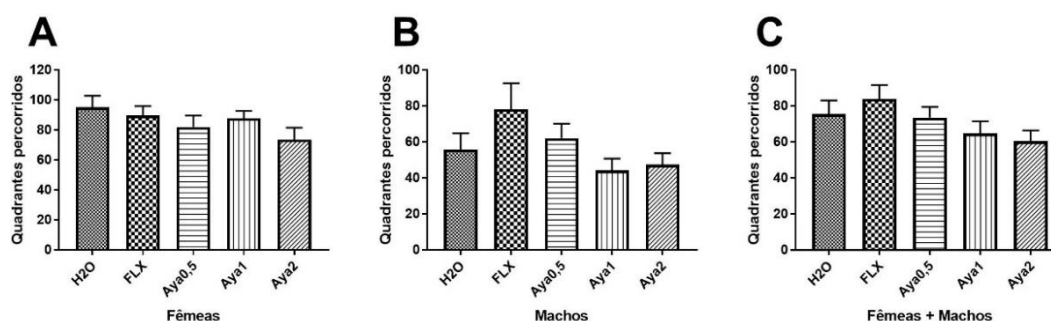
Grupo	N	Ganho de peso (g)
Fêmeas		
H <sub>2</sub> O	8	37,9 ± 2,0
FLX	9	25,1 ± 2,8 *
Aya0,5	9	36,7 ± 3,2
Aya1	8	39,8 ± 2,9
Aya2	8	37,2 ± 3,5
Machos		
H <sub>2</sub> O	8	109,2 ± 8,3
FLX	9	92,3 ± 7,1
Aya0,5	7	113,4 ± 10,5
Aya1	10	102,5 ± 6,2
Aya2	9	97,1 ± 10,3

\* indica diferença estatística significativa em relação aos outros grupos, p = 0,0134

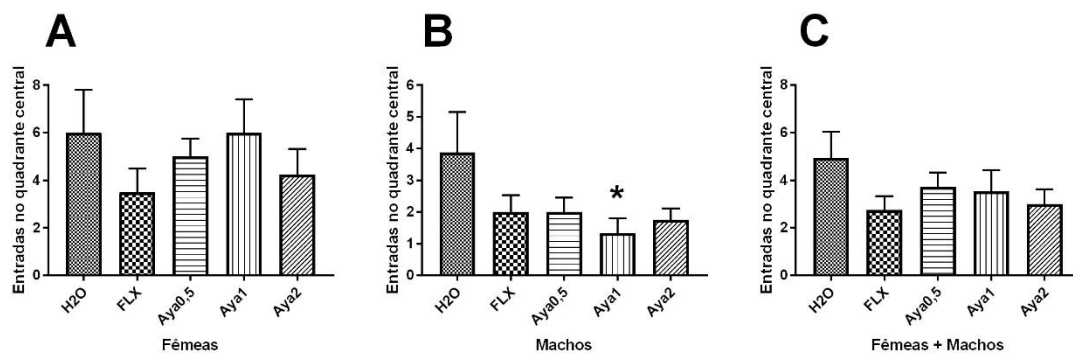
## 5.1. Testes de Comportamento

### 5.1.1. Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora no TCA foi avaliada pelo número de quadrantes percorridos na arena circular (Figura 24) e pelo número de vezes que o animal entra na área central (Figura 25). Apesar de o número de quadrantes percorridos ser aparentemente maior para os machos do grupo FLX em comparação aos outros grupos (Figura 24B), esse aumento não foi significativo.

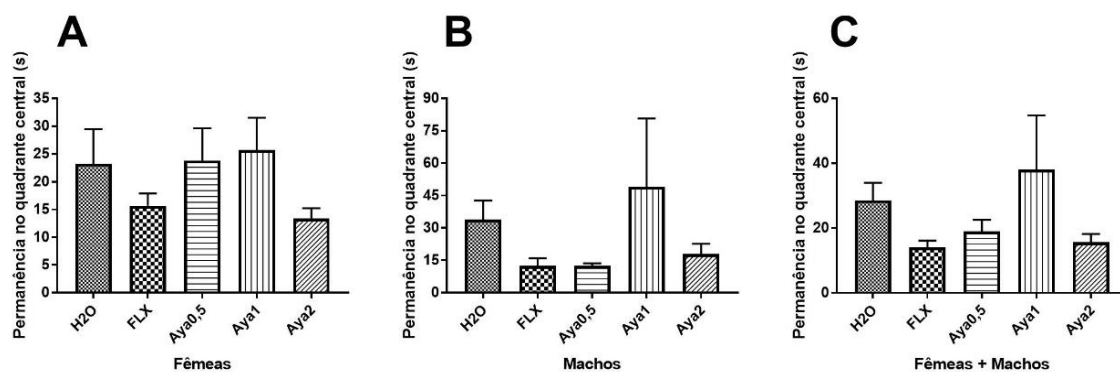


**Figura 24.** Atividade locomotora no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.



**Figura 25.** Exploração da área central do campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. \* significativo em relação à água, p = 0,0446.

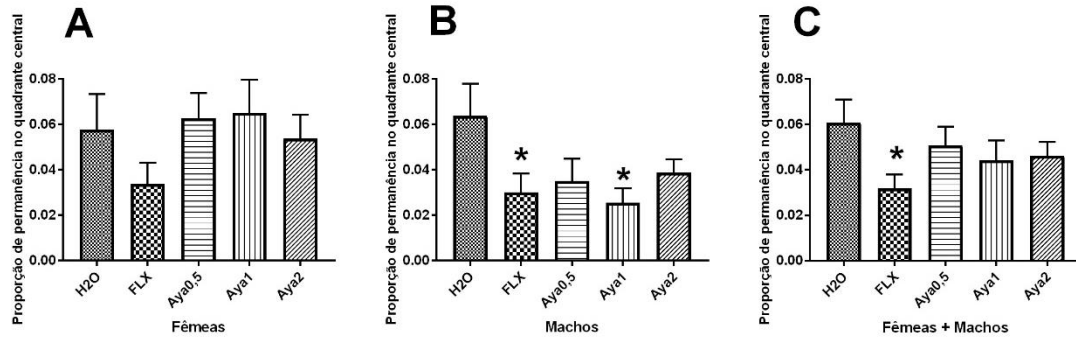
Em geral os animais machos tratados foram menos vezes ao quadrante central comparados com o grupo H<sub>2</sub>O, mas esta diminuição foi significativamente menor apenas para o grupo Aya1 (Figura 25B). Os machos tratados tiveram o tempo de permanência nesse quadrante aumentado, apesar de não significativo estatisticamente (Figura 26B).



**Figura 26.** Tempo de permanência em segundos no quadrante central. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.

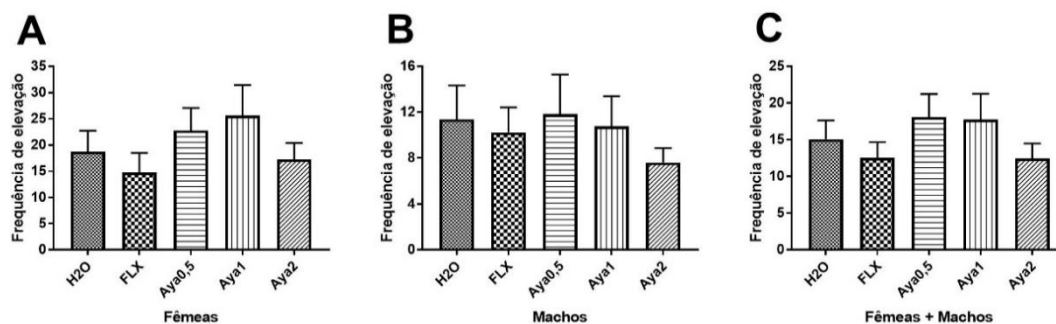
A relação entre a locomoção na área central e a locomoção total foi avaliada na Figura 27 (PRUT e BELZUNG, 2003). Essa razão foi significativamente reduzida para os machos do grupo tratado com fluoxetina e do grupo Aya1 quando comparados ao

grupo H<sub>2</sub>O (Figura 27B). E foi também significativamente reduzida para o grupo tratado com fluoxetina quando fêmeas e machos são considerados juntos (Figura 27C).

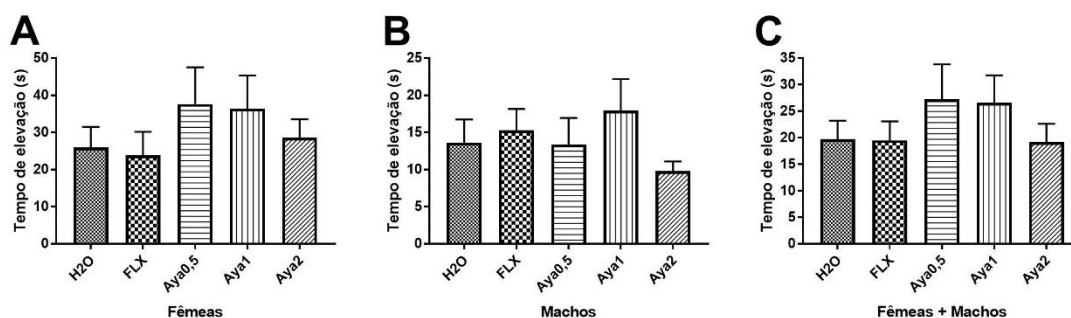


**Figura 27.** Razão entre a locomoção na área central (entradas) e a locomoção total (quadrantes percorridos). Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm. \* significativo em relação à água, p < 0,05.

A atividade exploratória foi mensurada pelo comportamento de elevação do tórax com apoio nas patas traseiras (*rearing*). Uma alta frequência e tempo desses comportamentos indica alto comportamento exploratório e baixos níveis de ansiedade (ALVES e DE SOUZA, 2014). O comportamento exploratório não variou significativamente entre os grupos tanto em relação à frequência quanto ao tempo de *rearing* (Figuras 28 e 29).

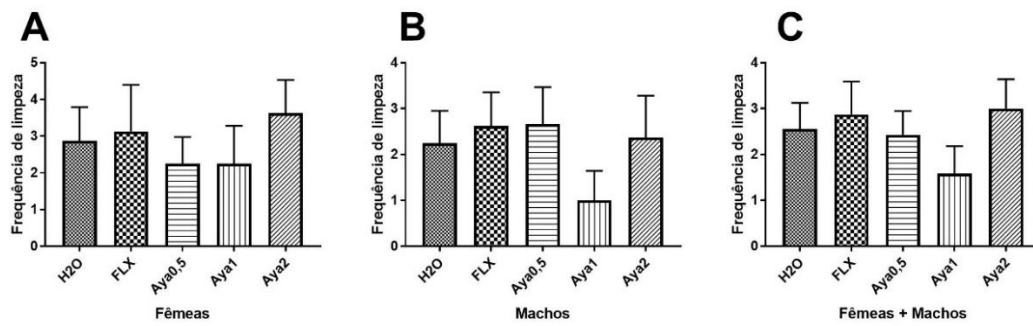


**Figura 28.** Comportamento exploratório por elevação de tórax (rearing). Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 6 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.

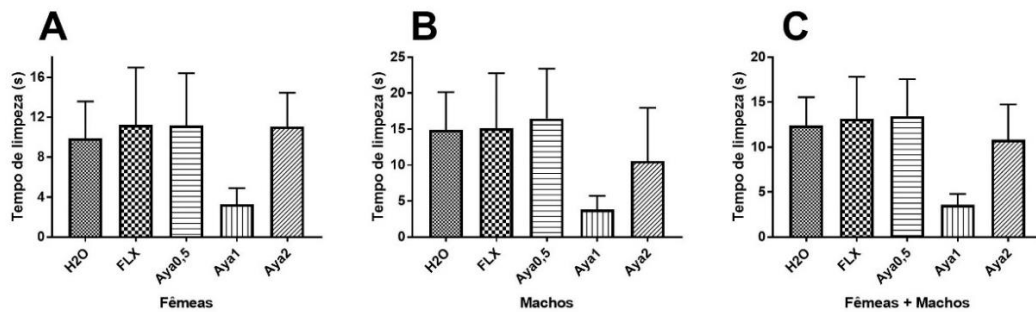


**Figura 29.** Tempo de permanência em segundos com o tórax elevado (rearing). Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.

O comportamento de autolimpeza normalmente se reflete em um movimento de lambidas em direção céfalo-caudal, e normalmente é diminuído em animais expostos a fármacos benzodiazepínicos (ansiolíticos) (JOLLES et al., 1979; VAN ERP et al., 1994; CUNHA, 2009). Nesse estudo, apesar de não significativo, a frequência de autolimpeza apresentou-se diminuído nos animais machos do grupo Aya1 (Figura 30B). Fêmeas e machos desse grupo ficaram menos tempo nesta atividade comparado aos outros grupos (Figura 31).

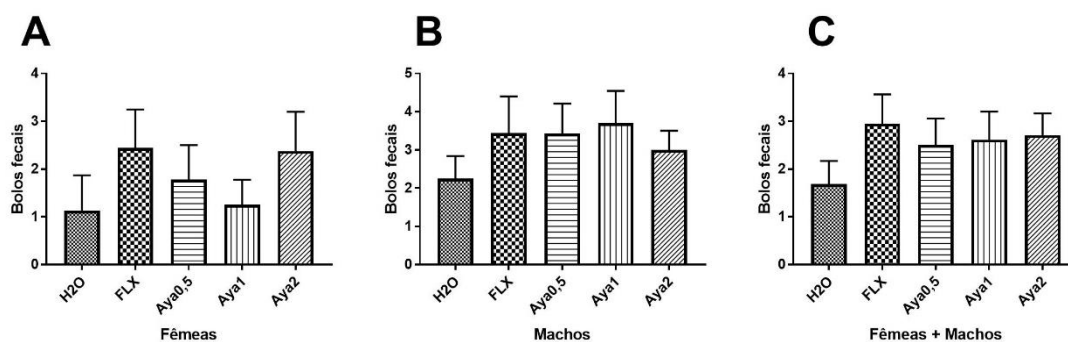


**Figura 30.** Frequência de autolimpieza no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm.

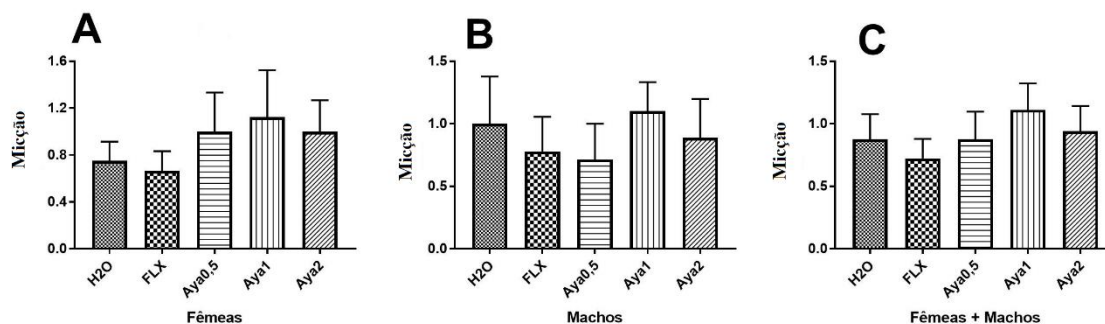


**Figura 31.** Tempo gasto com autolimpieza no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=8 fêmeas e 8 machos; Aya0,5: n=8 fêmeas e 6 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 9 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm.

Nesse estudo, não houve diferença significativa nos parâmetros de defecação e micção entre os grupos (Figuras 32 e 33).



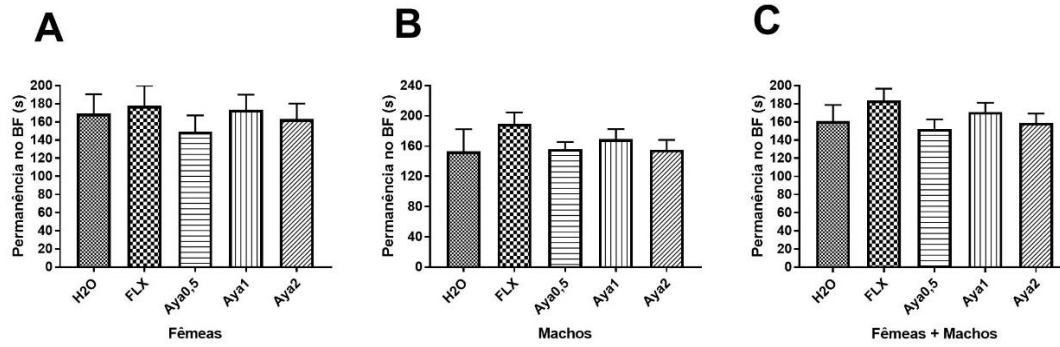
**Figura 32.** Comportamento emocional por defecação no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.



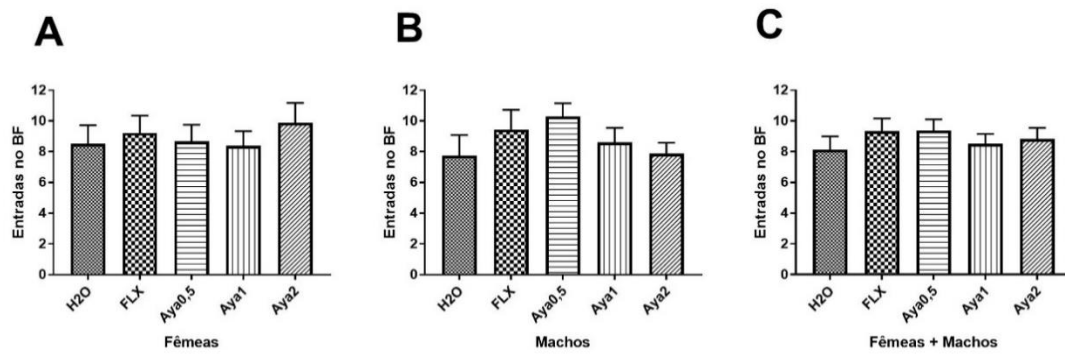
**Figura 33.** Comportamento emocional por micção no campo aberto. Resultados analisados pela ANOVA seguido de Tukey e Dunnett; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.

### 5.1.2. Labirinto em Cruz Elevado

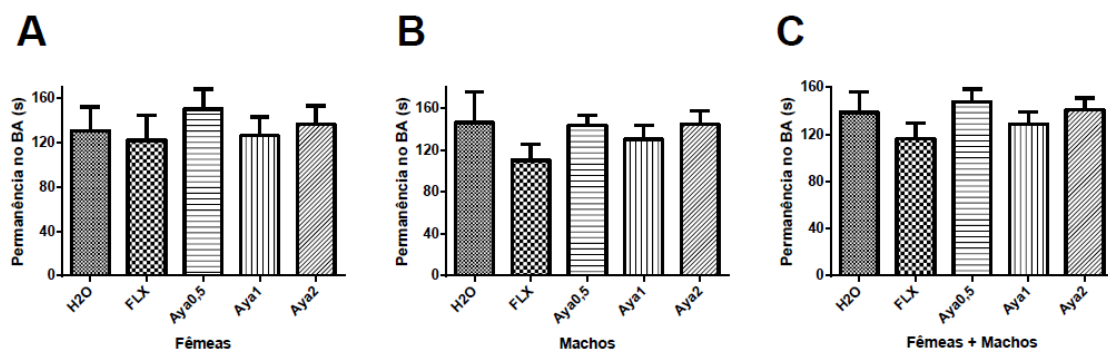
O labirinto em cruz elevado (LCE) se baseia em observações iniciais de que os ratos tendem a explorar mais as regiões fechadas e normalmente evitam aquelas sem paredes quando são confrontados com uma escolha (RODGERS et al., 1997). Um aumento no número de entradas, bem como um tempo de permanência aumentado nos braços abertos do aparelho indica ação ansiolítica (HOGG, 1996). No presente estudo, não houve diferença significativa no número de entradas ou tempo de permanência nos braços fechados (BF) e abertos (BA e área central) entre os grupos (Figuras 34 a 37).



**Figura 34.** Tempo de permanência no braço fechado no teste do Labirinto em Cruz Elevado. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

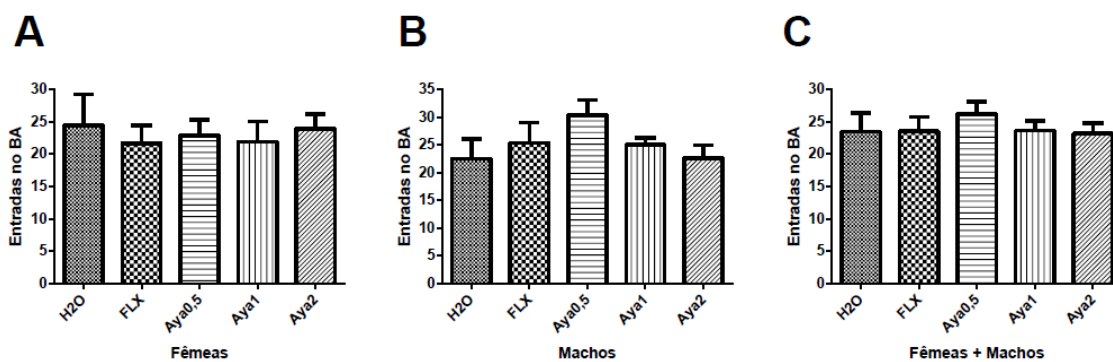


**Figura 35.** Número de entradas nos braços fechados no teste do Labirinto em Cruz elevado. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.



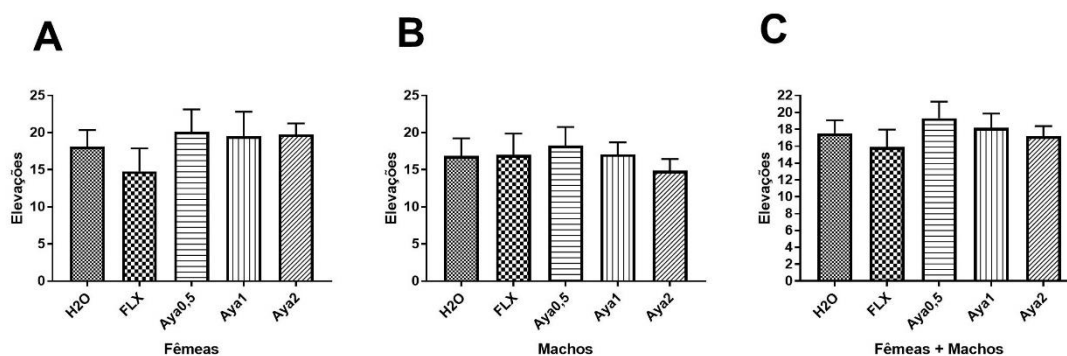
**Figura 36.** Tempo de permanência no braço aberto no teste do Labirinto em Cruz Elevado. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.



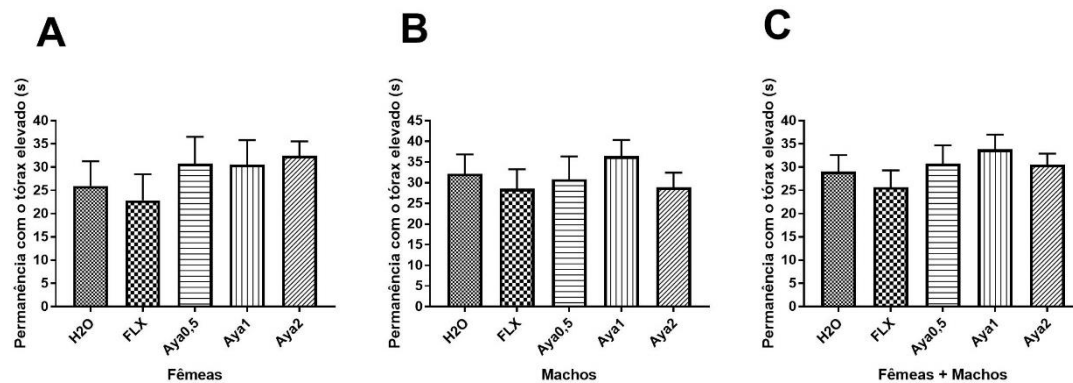


**Figura 37.** Número de entradas nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz elevado. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

A atividade exploratória dos animais no LCE mensurada pelo comportamento de *rearing* está mostrada nas Figuras 38 e 39. Não houve diferença significativa nesses parâmetros entre os grupos do estudo.

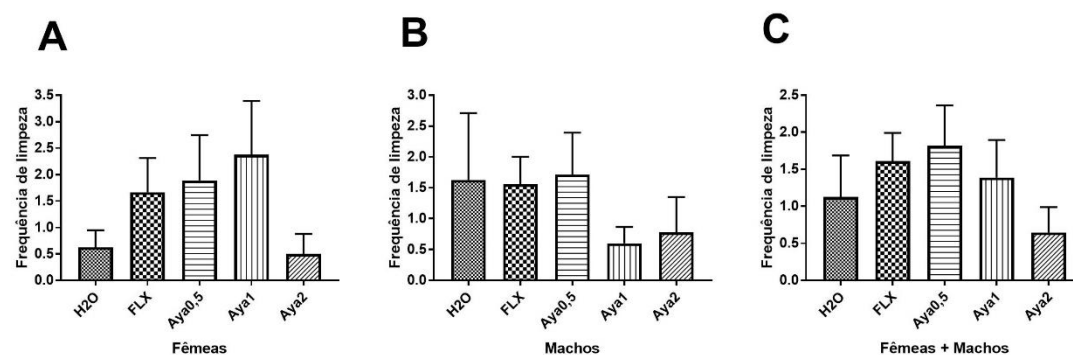


**Figura 38.** Comportamento exploratório por número de elevações de tórax no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

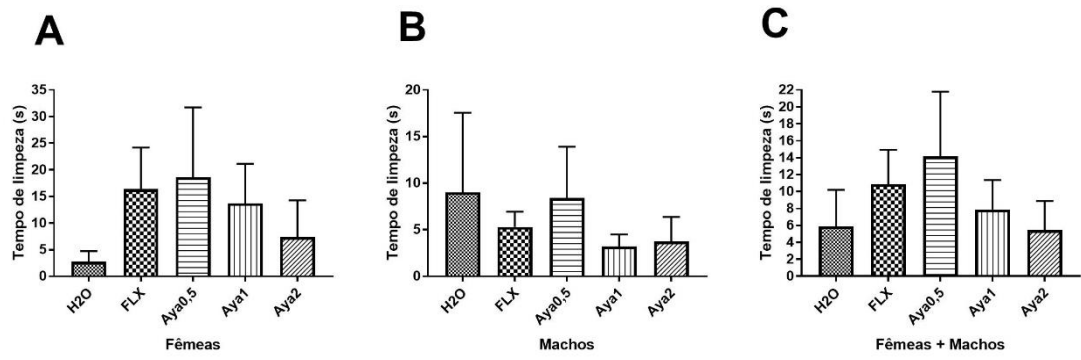


**Figura 39.** Comportamento exploratório por tempo de permanência com o tórax elevado no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

O comportamento de autolimpeza observado no LCE está apresentado nas Figuras 40 e 41. Não houve diferença significativa neste comportamento entre os grupos.

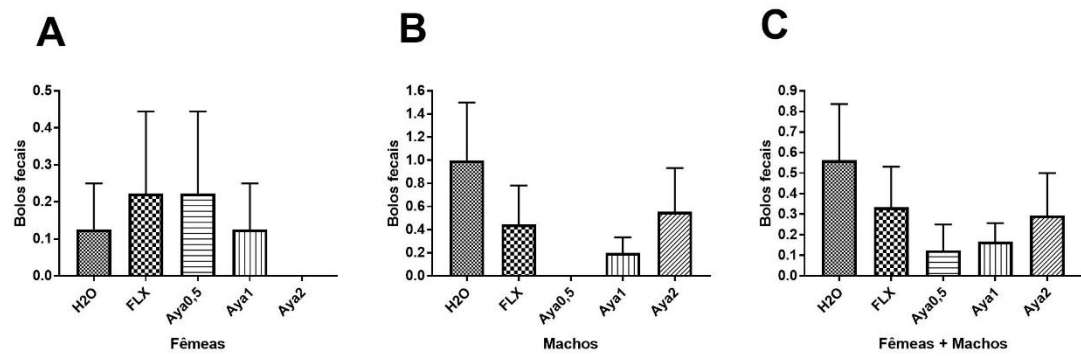


**Figura 40.** Comportamento de Autolimpeza no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

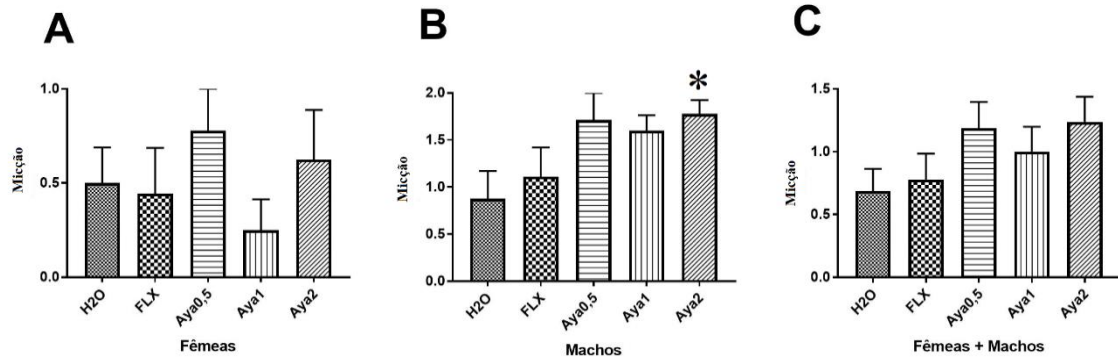


**Figura 41.** Tempo de Autolimpeza no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

O comportamento de defecação e micção mostrou-se bem variado entre os grupos e entre os gêneros (Figuras 42 e 43). Houve um aumento significativo na micção dos ratos machos do grupo Aya2 quando comparado ao grupo H<sub>2</sub>O (Figura 43B).



**Figura 42.** Comportamento emocional por defecação no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

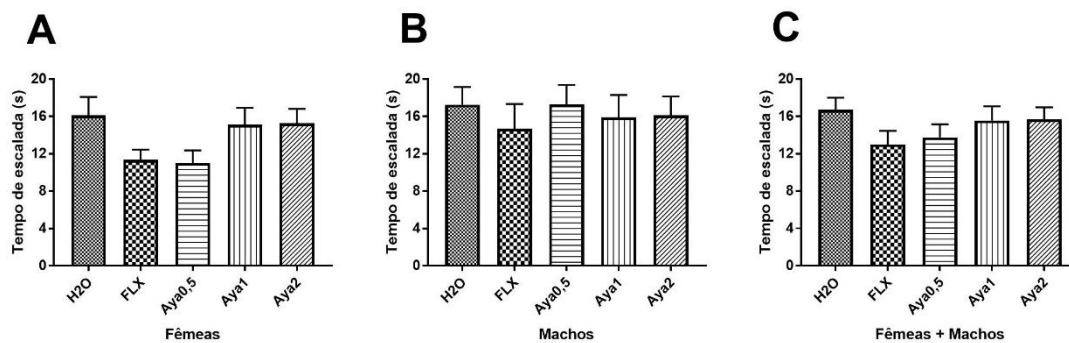


**Figura 43.** Comportamento emocional por micção no Teste do Labirinto em Cruz. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação à água,  $p = 0,0426$ .

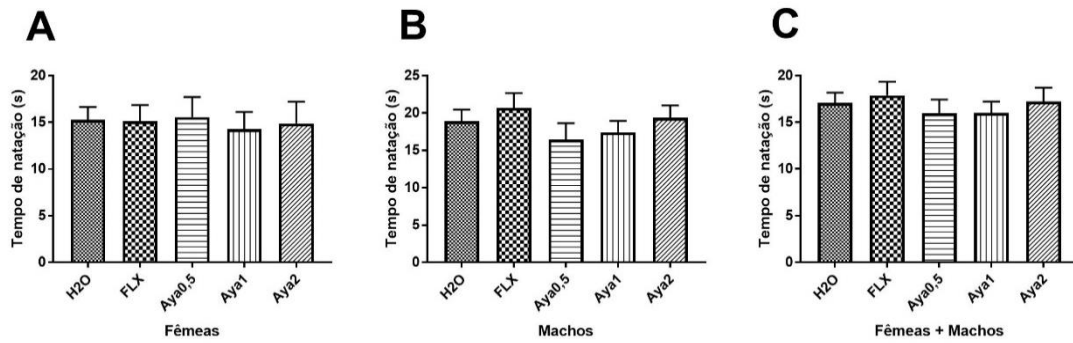
### 5.1.3. Natação Forçada

A natação no TNF consiste no deslocamento na superfície da água e também mergulhos, com uso intenso das patas traseiras. Os vídeos foram gravados na horizontal, de modo que foi possível ver as patas dos animais embaixo d'água e contar os bolos fecais à medida que iam surgindo na água.

Não houve diferença significativa entre os grupos ao observar os comportamentos ativos do tipo escalada e do tipo natação (Figuras 44 e 45).

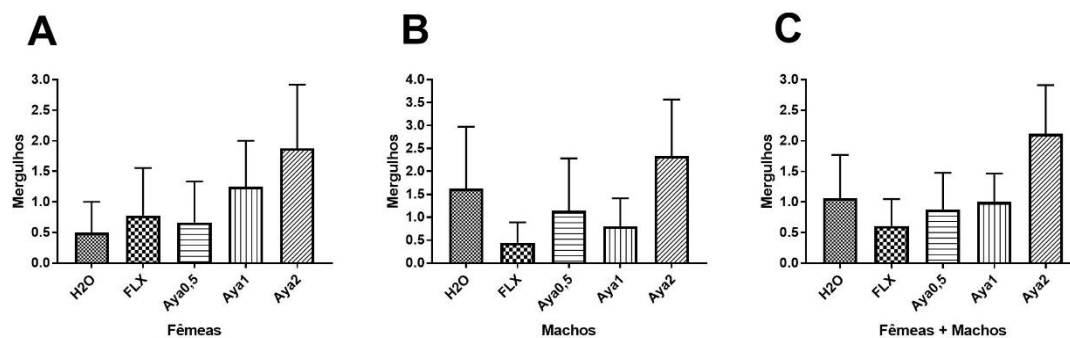


**Figura 44.** Tempo de observação do comportamento ativo do tipo escalada no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.



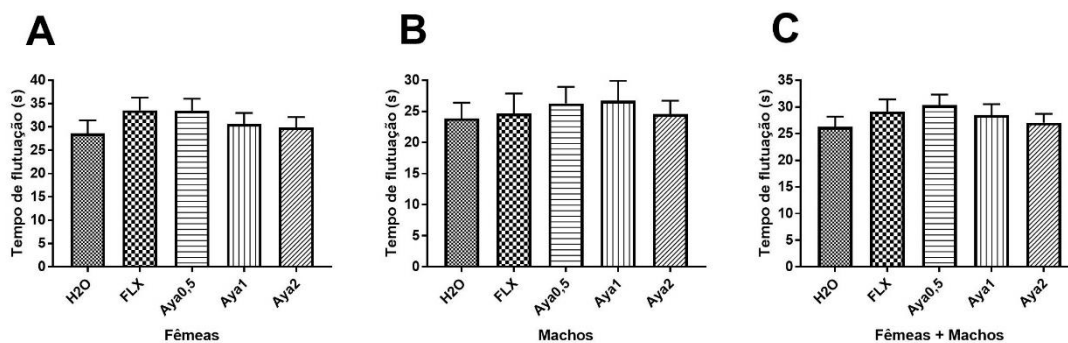
**Figura 45.** Tempo de observação do comportamento ativo do tipo natação no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.

Os grupos Aya2 apresentaram maior quantidade de mergulhos quando comparados aos outros grupos, e alguns animais desse grupo nadaram por alguns segundos embaixo d'água. Porém, essa maior atividade não foi significativa (Figura 46).



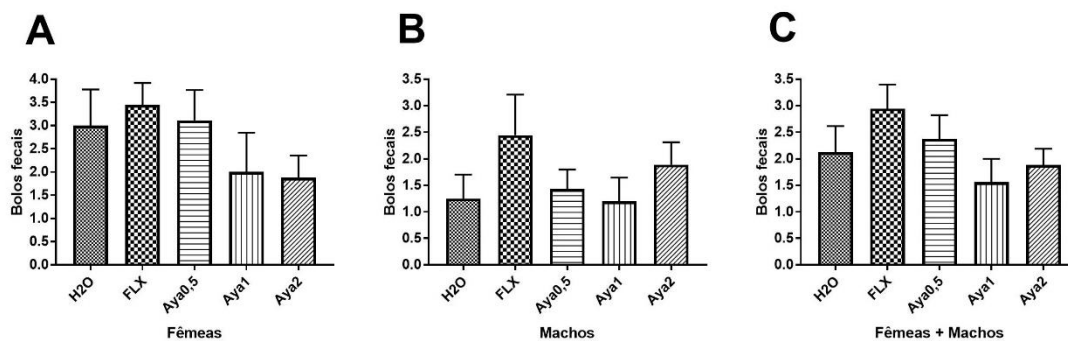
**Figura 46.** Quantidade de mergulhos no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.

A imobilidade foi definida como a falta de movimento em pelo menos duas das quatro patas, com o movimento nas duas patas sendo apenas o que é necessário para o rato manter-se flutuando. Não foi observada diferença entre os grupos nesse parâmetro (Figura 47).



**Figura 47.** Tempo de observação do comportamento passivo ou flutuação no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.

Não foi observada uma diferença significativa de defecação entre os grupos de estudo (Figura 48).



**Figura 48.** Comportamento emocional por defecação no teste de natação forçada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm. H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 8 machos.

## 5.2. Hematologia

O eritrograma foi analisado pelos seguintes parâmetros: hematócrito (HCT), contagem total de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), volume corpuscular das hemácias (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC), variação dos volumes dos eritrócitos (RDW-SD) e a distribuição em valores percentuais desses tamanhos dos eritrócitos (RDW-CV) (Tabela 5).

A informação obtida a partir do eritrograma nos permite verificar alterações como anemia e citotoxicidade sobre o tecido hematopoiético eritróide. A citotoxicidade pode se revelar alterações de número e volume do eritrócito e na concentração de hemoglobina (HOFFBRAND e MOSS, 2013). Não houve diferença significativa em nenhum parâmetro entre os grupos do estudo.

**Tabela 5.** Análise do eritrograma dos grupos H<sub>2</sub>O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm.

Parâmetros	H <sub>2</sub> O	FLX	Aya0,5	Aya1	Aya2
Fêmeas					
HCT (%)	396 ± 26,2	406 ± 21,8	410 ± 31,4	365 ± 32,85	395 ± 15,0
RBC (x106µL)	665 ± 99,3	804 ± 24,9	604 ± 102,7	699 ± 70,4	700 ± 90,9
HGB (g/dL)	149 ± 9,8	162 ± 5,1	158 ± 11,0	140 ± 12,9	156 ± 4,0
MCV (fL)	535 ± 5,1	506 ± 23,3	514 ± 15,4	517 ± 20,9	502 ± 20,0
MCH (pg)	201 ± 1,4	201 ± 3,1	198 ± 2,2	201 ± 2,8	198 ± 1,5
MCHC (g/dL)	376 ± 2,6	403 ± 15,0	388 ± 11,0	378 ± 2,9	398 ± 15,6
RDW-SD (fL)	25,2 ± 0,5	25,0 ± 0,3	24,7 ± 0,3	24,7 ± 0,3	25,4 ± 0,6
RDW-CV (%)	11,5 ± 0,5	11,2 ± 0,5	11,5 ± 0,4	10,9 ± 0,5	11,5 ± 0,6
Machos					
HCT (%)	442 ± 18,7	466 ± 21,5	453 ± 18,5	423 ± 43,9	433 ± 20,3
RBC (x106µL)	750 ± 99,0	748 ± 126,3	871 ± 28,6	836 ± 72,8	777 ± 90,2
HGB (g/dL)	171 ± 5,8	184 ± 4,6	175 ± 5,9	166 ± 15,9	172 ± 4,6
MCV (fL)	523 ± 14,1	501 ± 18,3	521 ± 17,9	499 ± 19,7	505 ± 19,3
MCH (pg)	203 ± 2,1	198 ± 1,5	202 ± 2,0	197 ± 3,1	200 ± 2,4
MCHC (g/dL)	389 ± 11,2	400 ± 14,8	389 ± 16,4	398 ± 12,9	390 ± 11,4
RDW-SD (fL)	25,3 ± 0,3	24,7 ± 0,3	25,3 ± 0,2	24,9 ± 0,3	25,6 ± 0,3
RDW-CV (%)	11,6 ± 0,3	12,3 ± 0,2	12,0 ± 0,3	12,3 ± 0,4	12,1 ± 0,4
Fêmeas + Machos					
HCT (%)	419 ± 16,6	437 ± 16,6	429 ± 19,6	398 ± 28,6	415 ± 13,4
RBC (x106µL)	708 ± 68,6	774 ± 66,3	721 ± 66,9	776 ± 52,6	740 ± 62,8
HGB (g/dL)	160 ± 6,2	173 ± 4,3	166 ± 6,9	154 ± 10,8	164 ± 3,5
MCV (fL)	529 ± 7,4	503 ± 14,2	518 ± 11,3	507 ± 14,1	503 ± 13,4
MCH (pg)	202 ± 1,2	200 ± 1,7	200 ± 1,6	199 ± 2,1	199 ± 1,5
MCHC (g/dL)	383 ± 5,8	401 ± 10,2	389 ± 9,1	389 ± 7,6	394 ± 9,2
RDW-SD (fL)	25,2 ± 0,3	24,8 ± 0,2	25,0 ± 0,2	24,8 ± 0,2	25,5 ± 0,3
RDW-CV (%)	11,5 ± 0,3	11,8 ± 0,3	11,7 ± 0,3	11,7 ± 0,3	11,8 ± 0,3

HCT-hematócrito; RBC-contagem total de eritrócitos; HGB-concentração de hemoglobina; MCV-volume corpuscular das hemácias; MCH-hemoglobina corpuscular média; MCHC-concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW-SD-variação dos volumes dos eritrócitos; RDW-CV-distribuição em valores percentuais desses tamanhos dos eritrócitos.

O leucograma nos permite avaliar a condição geral de saúde do organismo, bem como do sistema imunológico. O percentual de linfócitos das fêmeas do grupo Aya0,5 deu significativamente inferior ao grupo controle H<sub>2</sub>O. O mesmo resultado, entretanto, não foi observado nos machos ou quando comparamos os grupos levando em consideração machos e fêmeas juntos. Os parâmetros do leucograma foram: contagem total de leucócitos (WBC), contagem de linfócitos (W-SCC), contagem de neutrófilos (W-LCC) e contagem de monócitos, eosinófilos e basófilos (W\_MCC), bem como o percentual dessas células (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise do leucograma dos grupos H<sub>2</sub>O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm.

Parâmetros	H <sub>2</sub> O	FLX	Aya0,5	Aya1	Aya2
Fêmeas					
WBC (x10 <sup>3</sup> µL)	18,9 ± 3,15	27,0 ± 5,13	15,0 ± 1,89	14,7 ± 3,28	22,4 ± 3,28
W-SCC (x10 <sup>3</sup> µL)	1,49 ± 0,24	2,05 ± 0,37	1,08 ± 0,14	1,09 ± 0,25	1,63 ± 0,21
W-LCC (x10 <sup>3</sup> µL)	0,40 ± 0,89	0,50 ± 0,18	0,39 ± 0,08	0,31 ± 0,08	0,33 ± 0,10
W-MCC (x10 <sup>3</sup> µL)	0,01 ± 0,01	0,15 ± 0,10	0,09 ± 0,06	0,10 ± 0,07	0,29 ± 0,19
W-SCR (%)	79,3 ± 1,80	77,7 ± 1,53	72,1 ± 1,61*	73,8 ± 2,01	74,5 ± 2,89
W-LCR (%)	20,8 ± 1,82	16,2 ± 3,77	24,8 ± 3,43	22,0 ± 3,89	17,2 ± 4,29
W-MCR (%)	3,00 ± 3,00	6,08 ± 3,98	6,06 ± 4,01	8,67 ± 5,69	8,35 ± 5,47
Machos					
WBC (x10 <sup>3</sup> µL)	21,1 ± 5,32	40,2 ± 5,21	28,7 ± 4,51	32,6 ± 8,65	28,0 ± 6,94
W-SCC (x10 <sup>3</sup> µL)	1,58 ± 0,38	2,70 ± 0,45	2,21 ± 0,40	2,54 ± 0,67	2,14 ± 0,51
W-LCC (x10 <sup>3</sup> µL)	0,35 ± 0,57	1,04 ± 0,31	0,53 ± 0,11	0,56 ± 0,21	0,40 ± 0,12
W-MCC (x10 <sup>3</sup> µL)	0,19 ± 0,19	0,28 ± 0,19	0,13 ± 0,13	0,16 ± 0,13	0,34 ± 0,22
W-SCR (%)	74,6 ± 3,01	65,9 ± 6,75	75,8 ± 2,81	77,7 ± 1,11	76,5 ± 2,10
W-LCR (%)	22,2 ± 4,25	26,8 ± 8,37	19,7 ± 4,10	17,2 ± 3,43	16,9 ± 3,49
W-MCR (%)	3,3 ± 3,28	7,2 ± 4,83	4,5 ± 4,50	5,2 ± 3,42	8,7 ± 4,47
Fêmeas + Machos					
WBC (x10 <sup>3</sup> µL)	20,0 ± 3,00	34,0 ± 3,92*	21,0 ± 2,78	24,8 ± 5,44	25,4 ± 3,93
W-SCC (x10 <sup>3</sup> µL)	1,53 ± 0,22	2,39 ± 0,30	1,58 ± 0,24	1,91 ± 0,42	1,90 ± 0,29
W-LCC	0,38 ± 0,05	0,79 ± 0,19*	0,45 ± 0,06	0,45 ± 0,12	0,36 ± 0,08



Parâmetros	H <sub>2</sub> O	FLX	Aya0,5	Aya1	Aya2
(x10 <sup>3</sup> µL)					
W-MCC (x10 <sup>3</sup> µL)	0,10 ± 0,09	0,22 ± 0,11	0,11 ± 0,06	0,13 ± 0,08	0,32 ± 0,14
W-SCR (%)	76,9 ± 1,80	71,5 ± 3,84	73,7 ± 1,55	76,0 ± 1,15	75,6 ± 1,72
W-LCR (%)	21,5 ± 2,24	21,9 ± 4,82	22,6 ± 2,63	19,3 ± 2,56	17,0 ± 2,65
W-MCR (%)	3,1 ± 2,15	6,7 ± 3,07	5,4 ± 2,90	6,7 ± 3,06	8,5 ± 3,38

WBC-contagem total de leucócitos; W-SCC-contagem de linfócitos; W-LCC-contagem de neutrófilos; W\_MCC-contagem de monócitos, eosinófilos e basófilos; W-SCR(%)-percentual de linfócitos; W-LCR(%)-percentual de neutrófilos; W-MCR(%)-percentual de monócitos, eosinófilos e basófilos. \* indica diferença estatística significativa em relação ao grupo controle H<sub>2</sub>O, p < 0,05.

A análise da bioquímica sérica avaliou a função hepática por meio dos parâmetros TGO (enzima transaminase glutâmico oxalacética), TGP (enzima transaminase glutâmico pirúvica) e FAL (fosfatase alcalina); a função renal por meio da ureia e creatinina; e dano celular/tecidual por meio da enzima LDH (lactato desidrogenase) (Tabela 7). A análise de parâmetros bioquímicos não evidenciou comprometimento das funções fisiológicas, embora os animais machos do grupo Aya1 tenham apresentado um aumento significativo da enzima transaminase glutâmico oxalacética quando comparado com os outros grupos.

**Tabela 7.** Análise bioquímica sérica dos grupos H<sub>2</sub>O, FLX e tratados com a ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm.

Parâmetros	H <sub>2</sub> O	FLX	Aya0,5	Aya1	Aya2
Fêmeas					
TGO	158 ± 30,2	124 ± 12,9	131 ± 15,4	146 ± 22,0	225 ± 68,8
TGP	35,8 ± 6,8	40,7 ± 3,9	40,6 ± 4,8	40,3 ± 3,8	47,8 ± 8,3
FAL	207 ± 34,9	196 ± 43,0	236 ± 73,7	235 ± 25,3	111 ± 14,5
LDH	1411 ± 547	4290 ± 3491	6885 ± 3535	9871 ± 5430	13694 ± 8772
Ureia	45,5 ± 2,9	40,7 ± 3,0	42,0 ± 4,2	38,8 ± 3,9	44,0 ± 2,2
Creatinina	41,5 ± 8,2	32,7 ± 4,5	48,1 ± 6,3	37,1 ± 4,4	34,0 ± 4,2
Machos					
TGO	121 ± 8,7	109 ± 5,3	133 ± 18,9	227 ± 45,3*	131 ± 11,6
TGP	46,6 ± 3,6	62,2 ± 16,3	40,1 ± 5,3	71,0 ± 16,1	47,6 ± 6,2
FAL	203 ± 22,9	271 ± 41,1	219 ± 30,8	283 ± 40,5	244 ± 34,4
LDH	853 ± 153	1070 ± 287	4965 ± 3999	1489 ± 428	1315 ± 120
Ureia	44,0 ± 2,1	44,9 ± 2,0	44,5 ± 4,7	48,2 ± 1,9	44,4 ± 2,3
Creatinina	41,0 ± 3,7	40,2 ± 4,5	44,5 ± 18,7	40,5 ± 3,9	40,8 ± 5,1
Fêmeas + Machos					

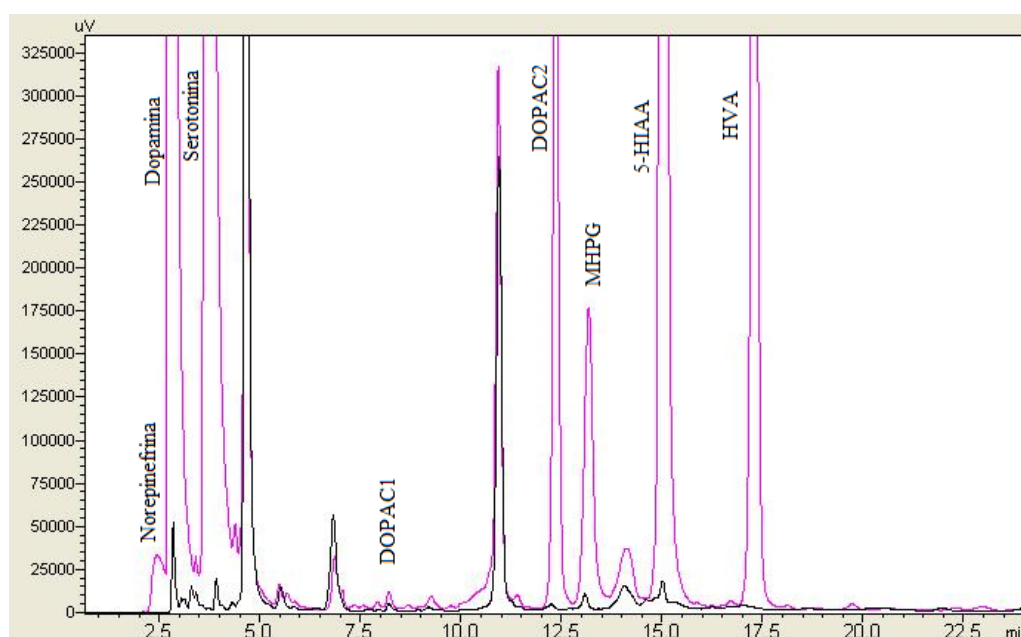
Parâmetros	H <sub>2</sub> O	FLX	Aya0,5	Aya1	Aya2
TGO	141 ± 16,8	116 ± 7,1	132 ± 11,6	191 ± 28,1	175 ± 33,9
TGP	40,8 ± 4,1	51,4 ± 8,5	40,4 ± 3,4	59,5 ± 10,7	47,7 ± 4,9
FAL	205 ± 20,6	233 ± 30,5	230 ± 48,5	261 ± 24,8	177 ± 26,8
LDH	1150 ± 300	2775 ± 1845	6045 ± 2571	5156 ± 2523	7504 ± 4529
Ureia	44,8 ± 1,7	42,7 ± 1,9	43,1 ± 3,0	44,5 ± 2,2	44,2 ± 1,5
Creatinina	41,3 ± 4,5	36,4 ± 3,2	52,2 ± 8,1	39,0 ± 2,9	37,6 ± 3,3

TGO-enzima transaminase glutâmico oxalacética; TGP-enzima transaminase glutâmico pirúvica; FAL-fosfatase alcalina; LDH-lactato desidrogenase. \* indica diferença estatística significativa em relação aos outros grupos (exceto quando comparado ao grupo tratado com ayahuasca 0,5 dose), p = 0,0250.

### 5.3. Monoaminas no encéfalo (sem a formação hipocampal)

#### 5.3.1. Validação do método analítico

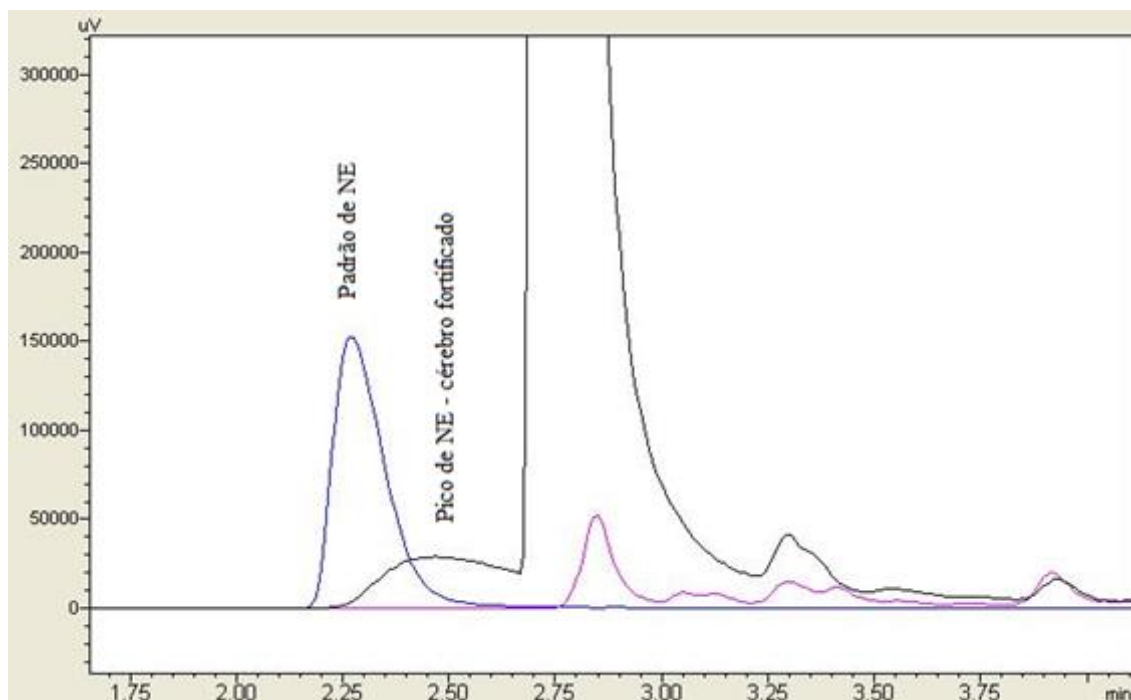
A Figura 49 mostra a seletividade do método cromatográfico por meio de um cromatograma do encéfalo sem fortificação com um cromatograma do mesmo encéfalo fortificado com os padrões. Os picos dos neurotransmissores de interesse aumentam quando as amostras foram fortificadas.



**Figura 49.** Encéfalo sem fortificar (em preto) e encéfalo fortificado (em rosa).

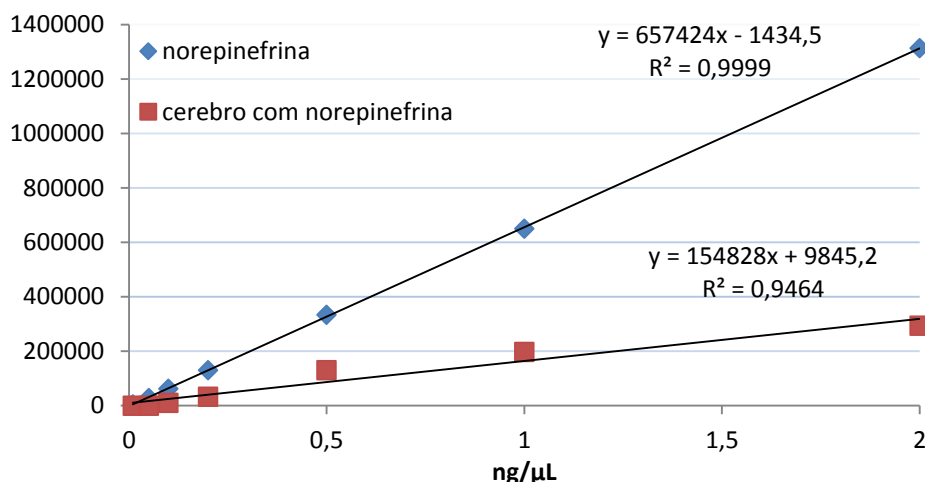
Não foi possível quantificar a norepinefrina no encéfalo, uma vez que não aparecia pico no seu tempo de retenção (Figura 50). Foi testado concentrar a amostra em até 6 vezes, aumentando o peso do encéfalo na extração e ou diminuindo o volume

da extração (aproximadamente 200mg de encéfalo extraídos em 50µL de branco) e, mesmo assim, nenhum pico de norepinefrina foi observado. Não seria possível concentrar mais devido à limitação de amostra (cada encéfalo tem aproximadamente 1g).



**Figura 50.** Pico do padrão de norepinefrina (NE, em azul) na concentração de 2ng/µL no tempo de retenção 2,25 min. Encéfalo fortificado com 2ng/µL de norepinefrina (em preto) e encéfalo sem fortificação (em rosa).

O efeito matriz neste estudo foi avaliado com uma curva analítica de norepinefrina, por ser o único neurotransmissor que não foi possível detectar no encéfalo. Esse efeito mostrou-se bastante proeminente na matriz encéfalo, onde se observa uma diminuição do sinal comparado ao padrão analítico preparado em solvente (Figura 51). Este resultado mostra que em princípio, a quantificação dos analitos deveria ser feita contra uma curva padrão em matriz encéfalo. Porém, isto não é possível neste estudo, pois não temos um encéfalo “branco”, sem monoaminas. Como o efeito matriz ocorrerá em todos os casos e o objetivo é identificar uma mudança nas concentrações nos grupos tratados com ayahuasca com relação ao controle, e não quantificar o valor absoluto desta concentração, a quantificação dos analitos foi feita com uma curva analítica dos padrões feita em solvente (água).



**Figura 51.** Efeito matriz da norepinefrina. Curva do padrão da norepinefrina em água e curva do encéfalo fortificado com norepinefrina de 0,01 a 2 ng/μL.

A linearidade das curvas analíticas mostra coeficientes de correlação ( $r \geq 0,99$ ) para todos os analitos (Tabela 8). Os resultados do estudo de precisão da medida no equipamento também estão na Tabela 8 e foram obtidos por meio da análise das STMs em solvente com os padrões em 5 níveis diferentes em 5 dias. A sensibilidade foi avaliada pelo Limite de Quantificação (LOQ), que foi definido como o menor nível no qual o método apresentou precisão aceitável ( $\leq 20\%$ ) para a maioria dos analitos.

**Tabela 8.** Coeficientes de Variação (%CV) e LOQ dos analitos (exceto norepinefrina).

Analito	Equação da Reta	R <sup>2</sup>	Concentração ng/μL	CV (%)
MHPG	$y = 22990x + 13568$	0,9959	2 <sup>@</sup>	18,4
			4	13,2
			8	5,9
			10	7,2
			15	6,0
DA	$y = 355430x - 1981,9$	0,9991	0,05 <sup>@</sup>	19,2
			0,2	8,5
			1	5,3
			2	5,2
			4	6,1
DOPAC	$y = 127599x + 39917$	0,9961	0,1 <sup>@</sup>	15,0
			0,2	10,0
			0,5	4,9
			1	1,7
			2	2,5

HVA	$y = 100002x + 1601,4$	0,9992	0,02 <sup>@</sup>	18,0
			0,05	6,9
			0,1	2,6
			0,2	5,6
			1	2,0
5-HT	$y = 636062x - 414,73$	0,9988	0,01 <sup>@</sup>	22,3
			0,02	11,3
			0,05	11,2
			0,1	5,1
			0,2	4,4
5-HIAA	$y = 779266x - 5055$	0,9997	0,02 <sup>@</sup>	5,5
			0,05	6,5
			0,1	5,7
			0,2	8,1
			1	12,8

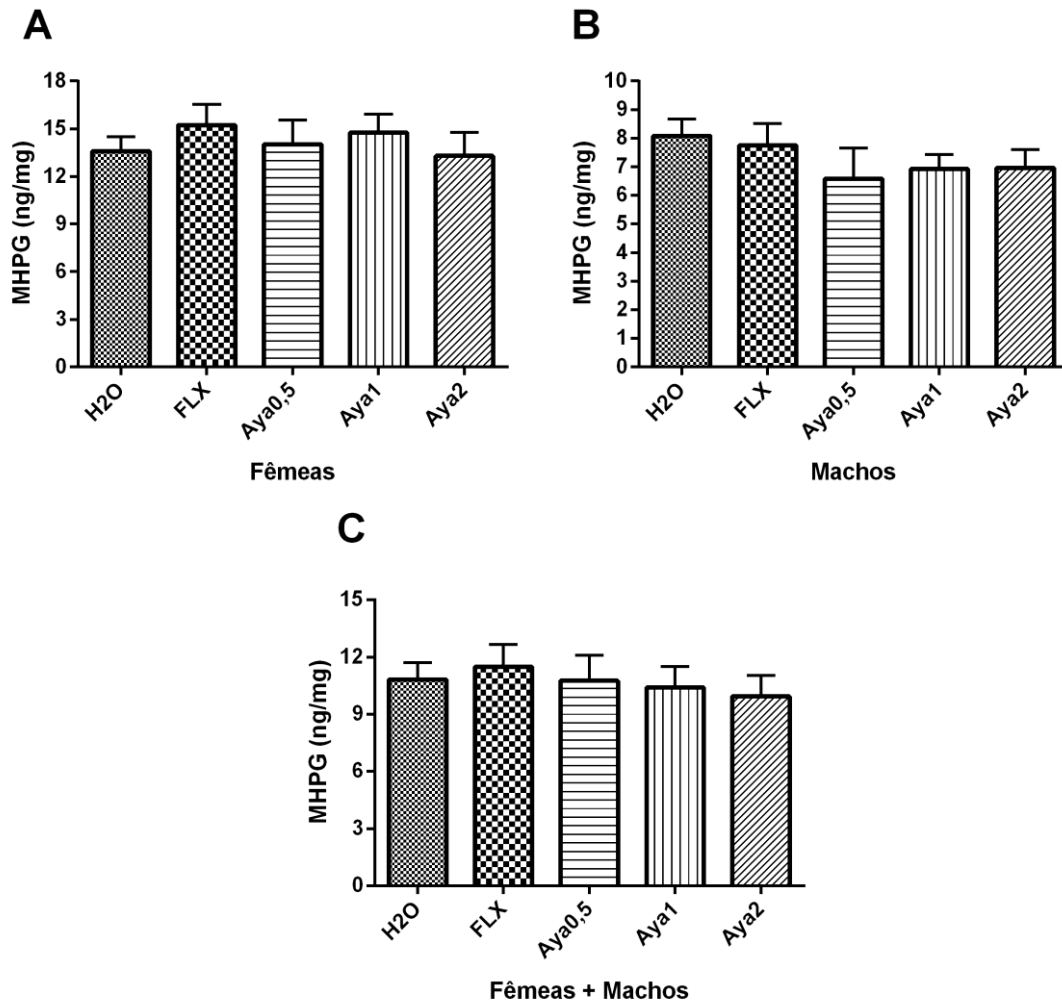
<sup>@</sup>LOQ

### 5.3.2. Análise de monoaminas nas amostras de encéfalo (sem a formação hipocampal)

Nesse estudo, as monoaminas e seus metabólitos foram analisadas no encéfalo após a retirada da formação hipocampal, mas os resultados foram expressos em relação ao peso do encéfalo.

### 5.3.3. (Sulfato de 4-hydroxy-3-methoxifenilglicol (MHPG), metabólito da norepinefrina

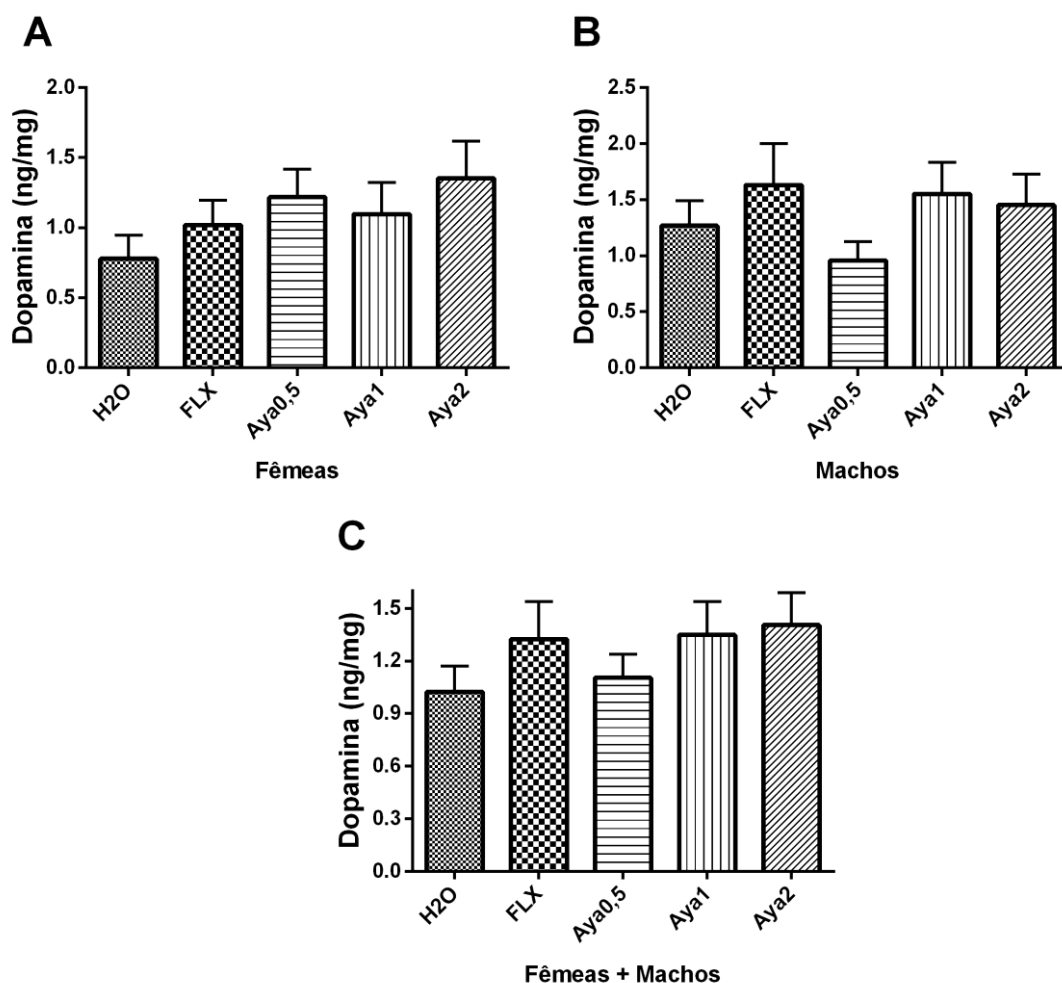
Como dito anteriormente, não foi possível quantificar os níveis de norepinefrina no encéfalo. Os níveis de seu metabólito MHPG estão mostrados na Figura 52, onde se pode observar que não houve diferença significativa entre os grupos. Foi observado no grupo controle um nível significativamente maior desse metabólito nas fêmeas em relação aos machos ( $13,58 \pm 2,55$  e  $8,09 \pm 1,67$ , respectivamente)



**Figura 52.** Quantificação de MHPG em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média  $\pm$  epm; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

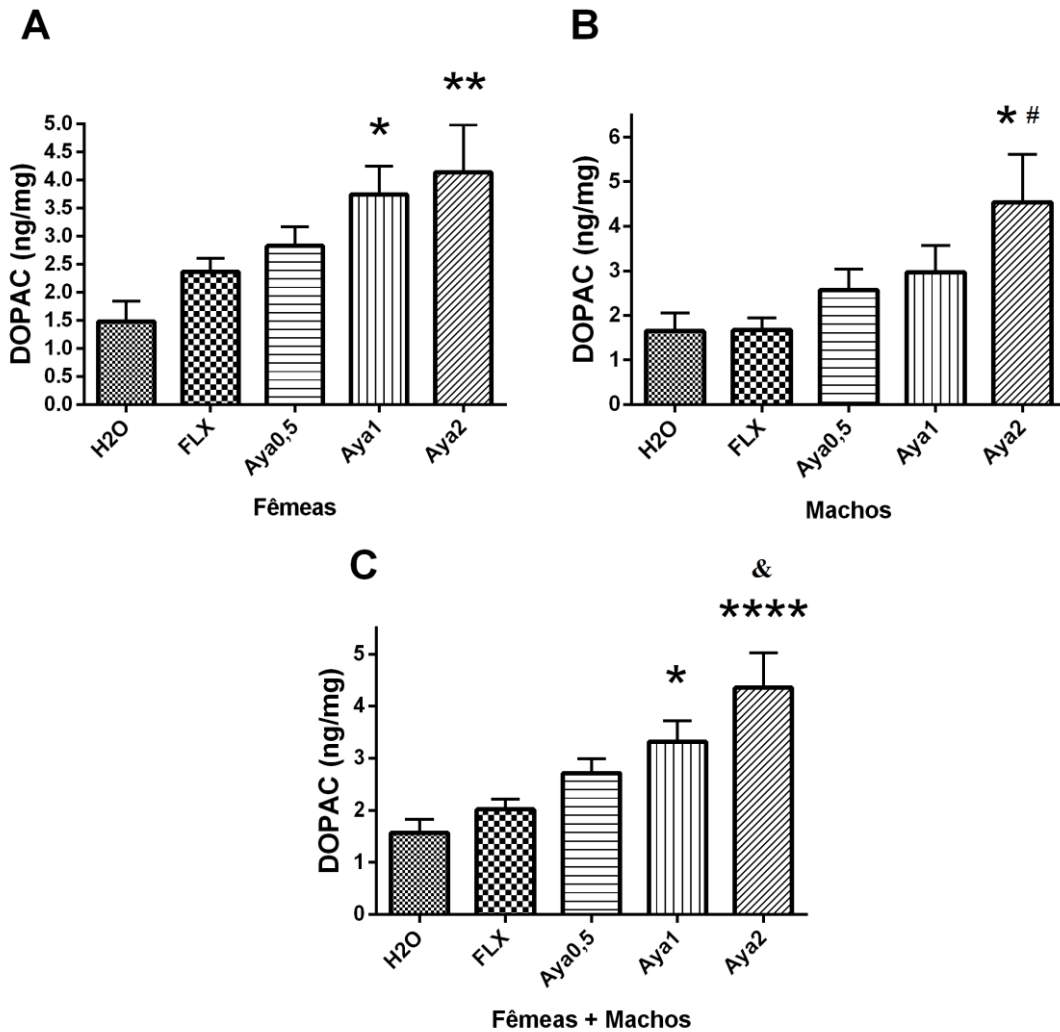
#### 5.3.4. Dopamina e seus metabólitos ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovalínico (HVA)

Neste estudo, os níveis de dopamina não se alteraram significativamente quando os ratos foram expostos à fluoxetina ou ayahuasca (Figura 53).



**Figura 53.** Quantificação de dopamina em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média  $\pm$  epm; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

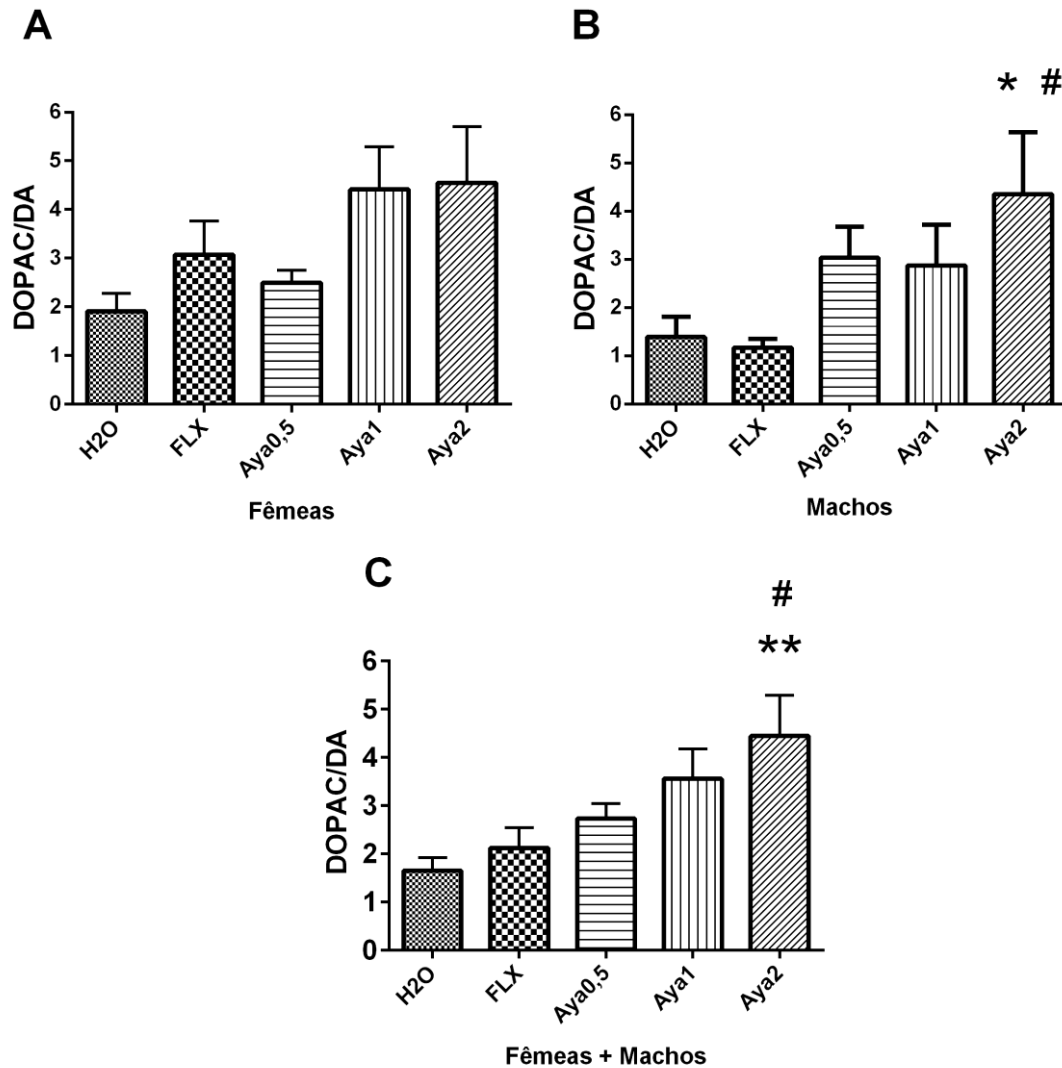
Porém, os níveis de DOPAC aumentaram gradativamente com o tratamento, sendo significativamente maior que o grupo H<sub>2</sub>O para fêmeas Aya1 e Aya2 (Figura 54A). O grupo Aya2 apresentou níveis de DOPAC significativamente maiores quando comparado ao grupo H<sub>2</sub>O e ao grupo FLX. Quando os gêneros são analisados juntos, o grupo Aya1 apresentou níveis de DOPAC significativamente maiores que os animais do grupo H<sub>2</sub>O enquanto o grupo Aya2 apresentou níveis de DOPAC significativamente maiores quando comparado com todos os outros grupos, exceto o grupo Aya1 (Figura 54C).



**Figura 54.** Quantificação de DOPAC em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média  $\pm$  epm; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação à água,  $p < 0,05$ ; \*\* significativo em relação à água,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação à água; # significativo em relação à fluoxetina,  $p < 0,05$ ; & significativo em relação a todos os outros grupos (exceto Aya1).

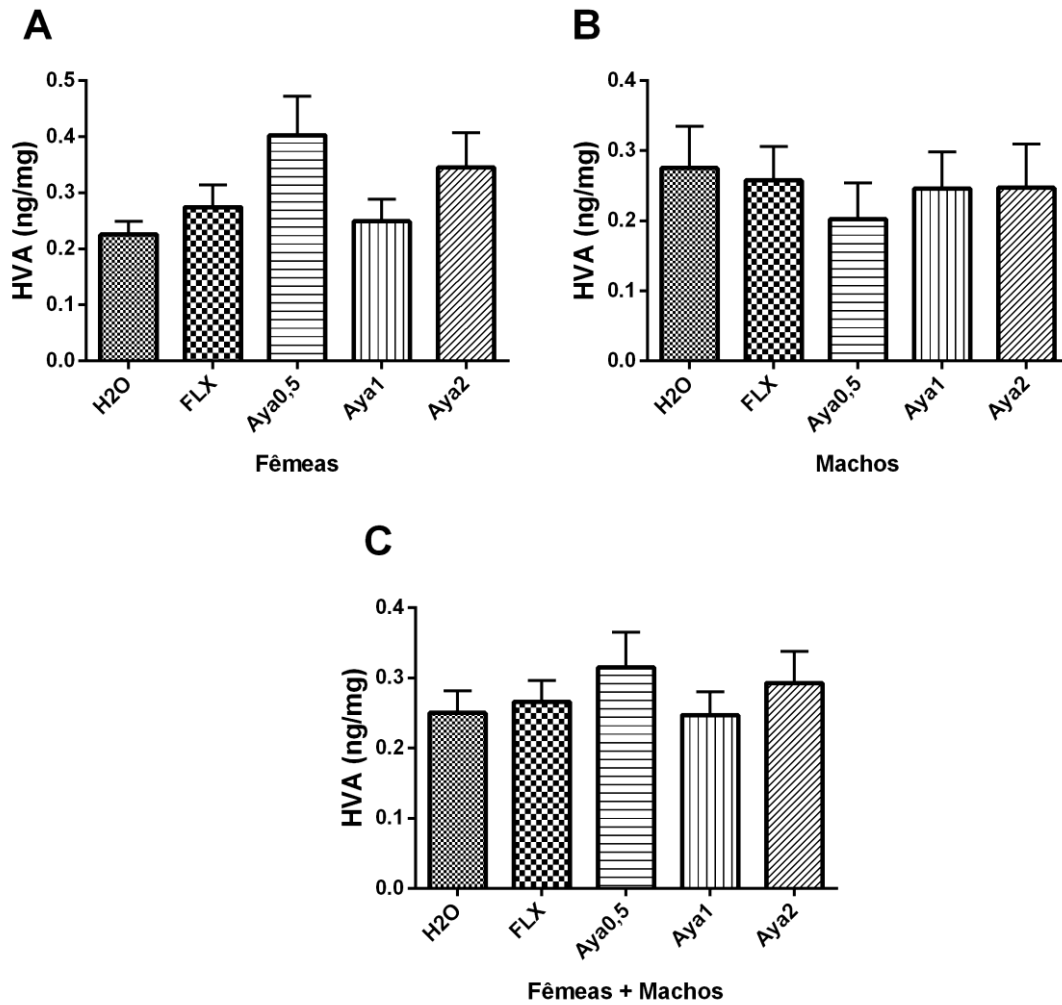
O *turnover* DOPAC/DA foi significativamente maior para o grupo Aya2 comparado ao grupo H<sub>2</sub>O e ao grupo FLX quando consideramos os dois gêneros juntos e também quando analisamos apenas os machos separadamente (Figura 55).



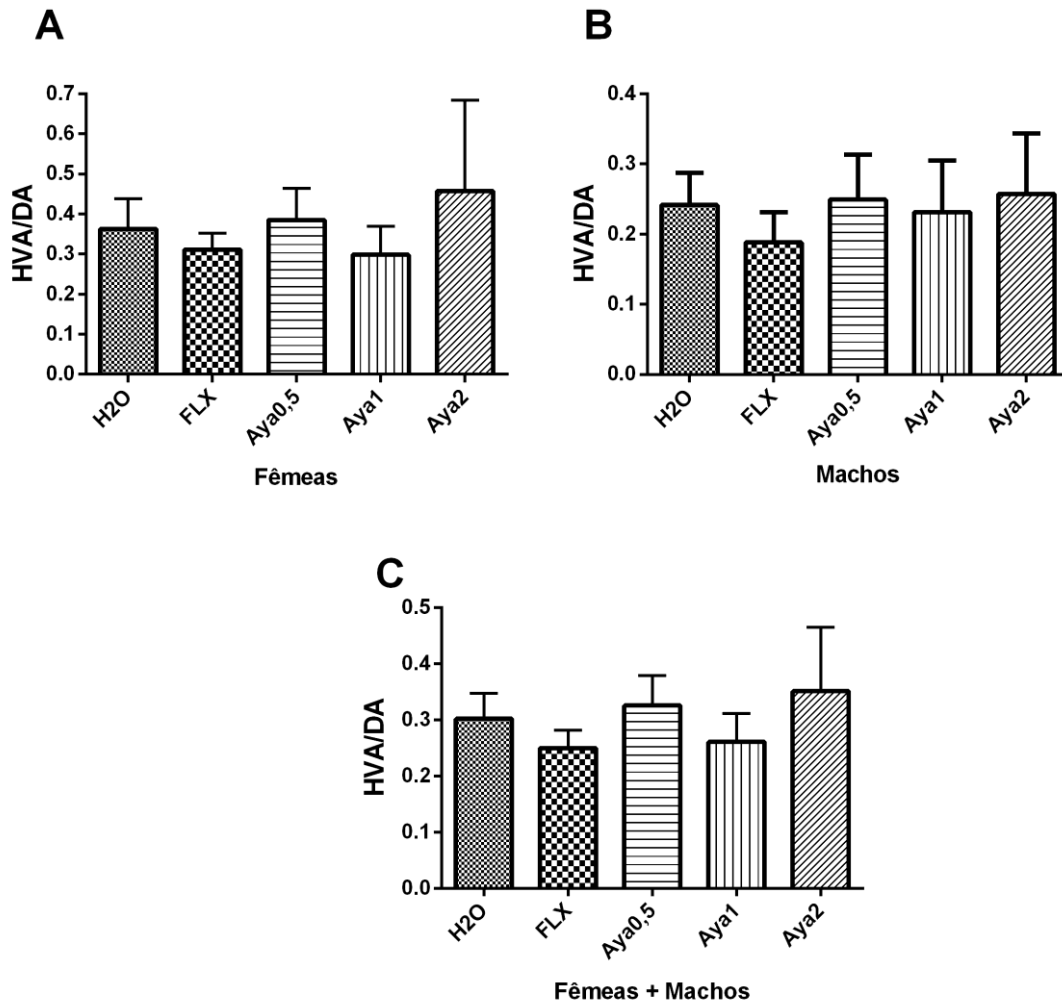


**Figura 55.** Razão entre DOPAC/DA em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média  $\pm$  epm; H2O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação à água,  $p < 0,05$ ; \*\* significativo em relação à água,  $p < 0,001$ ; # significativo em relação à fluoxetina,  $p < 0,05$ .

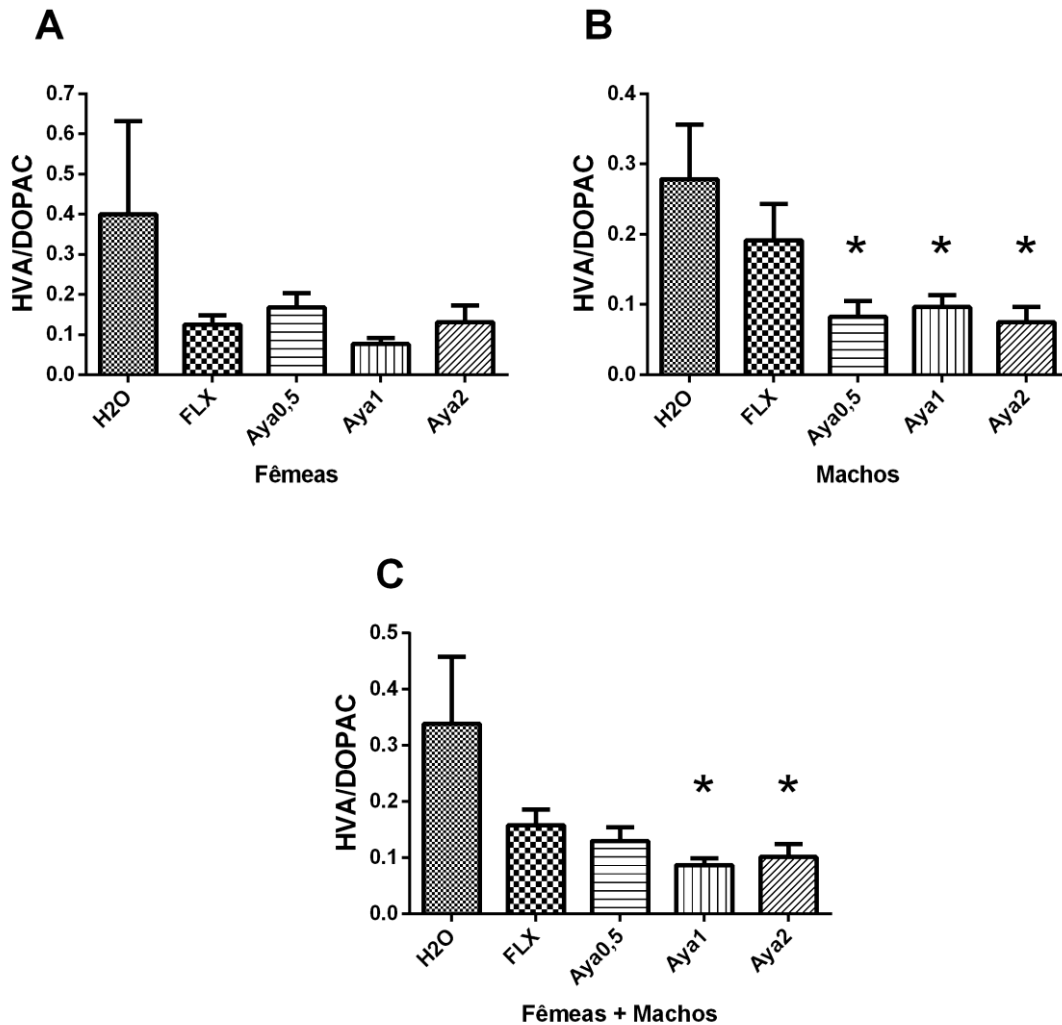
Não houve diferença significativa para os níveis de HVA no encéfalo dos ratos (Figura 56) nem para o turnover HVA/DA (Figura 57). Porém, o turnover HVA/DOPAC foi significativamente menor para os grupos Aya1 e Aya2 comparado ao grupo H2O quando consideramos os dois gêneros juntos e para todos os grupos Aya quando analisamos os machos separadamente (Figura 58).



**Figura 56.** Quantificação de HVA em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de encéfalo, expressos em média  $\pm$  epm; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.



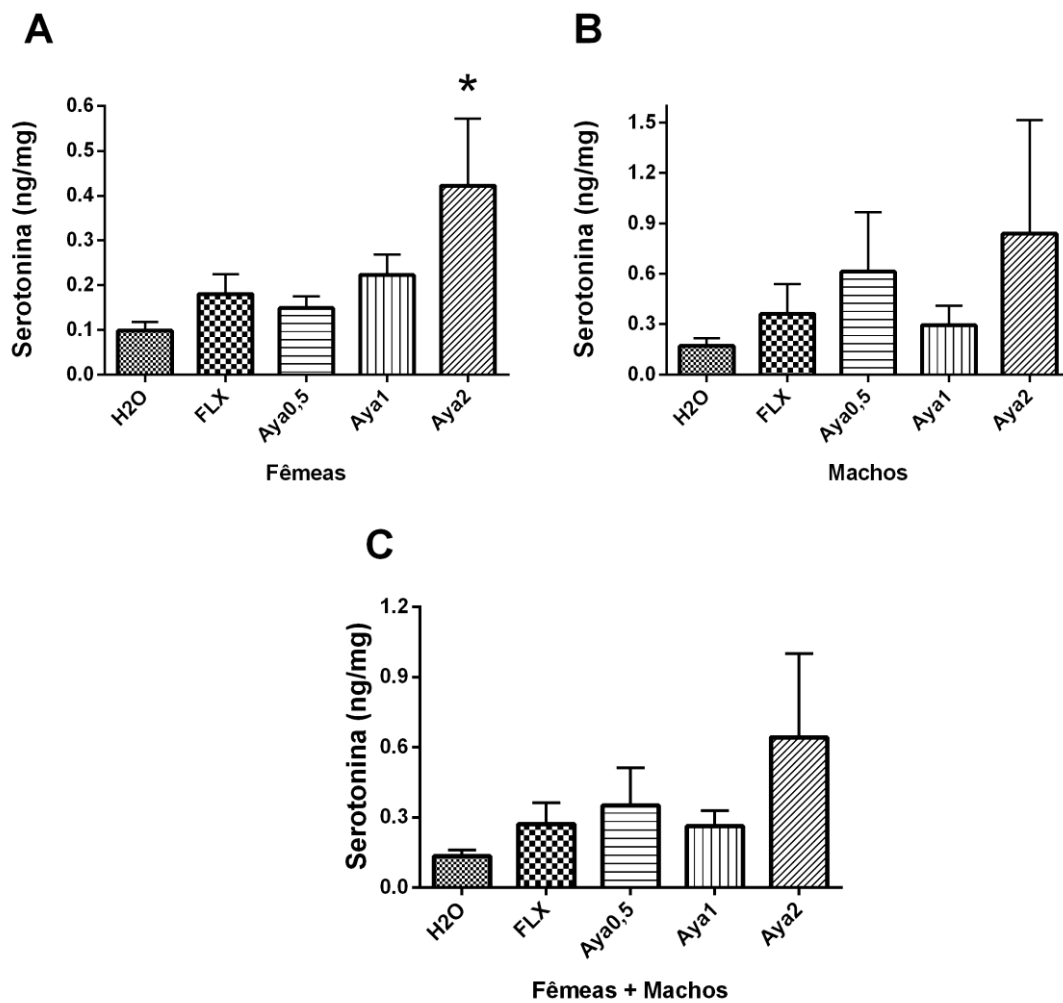
**Figura 57.** Razão entre HVA/DA em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média  $\pm$  epm; H2O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.



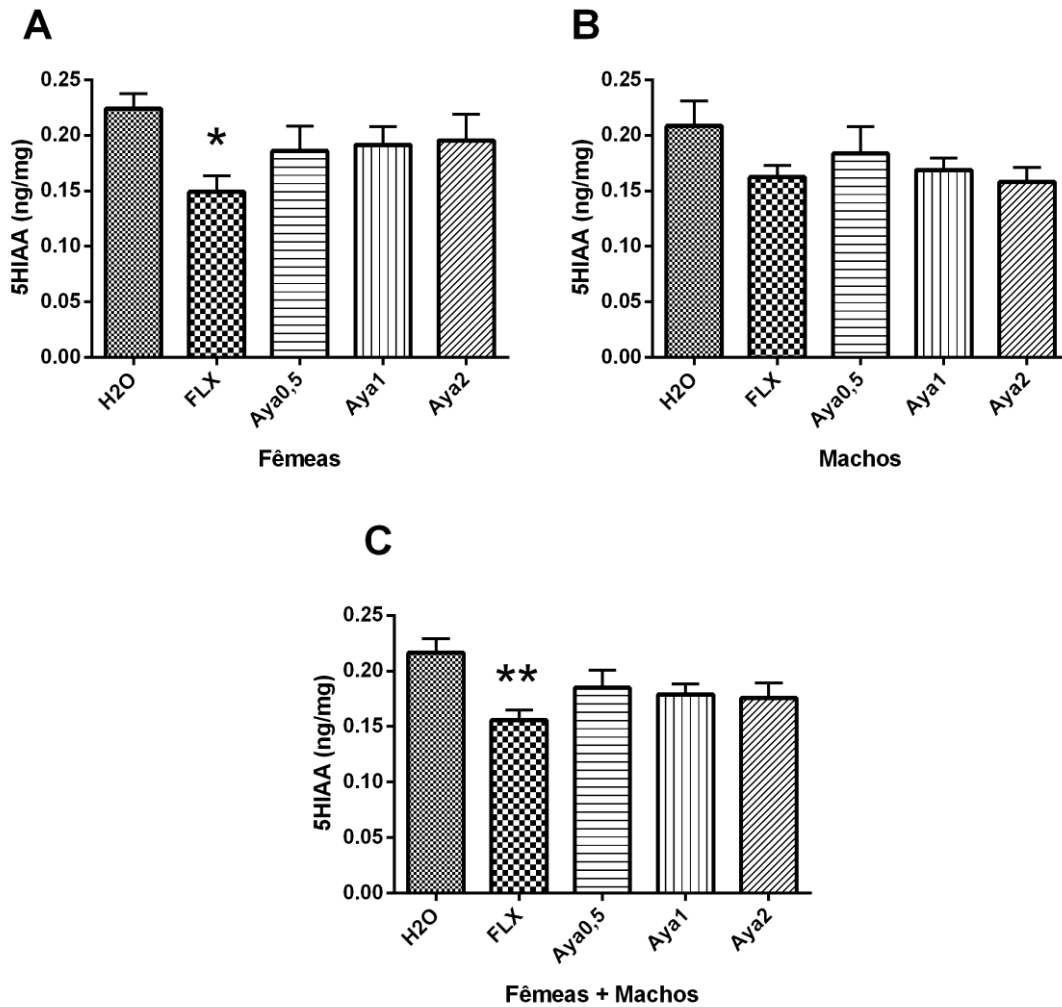
**Figura 58.** Razão entre HVA/DOPAC em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média  $\pm$  epm; H2O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação à água,  $p < 0,05$ .

### 5.3.5. Serotonina e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)

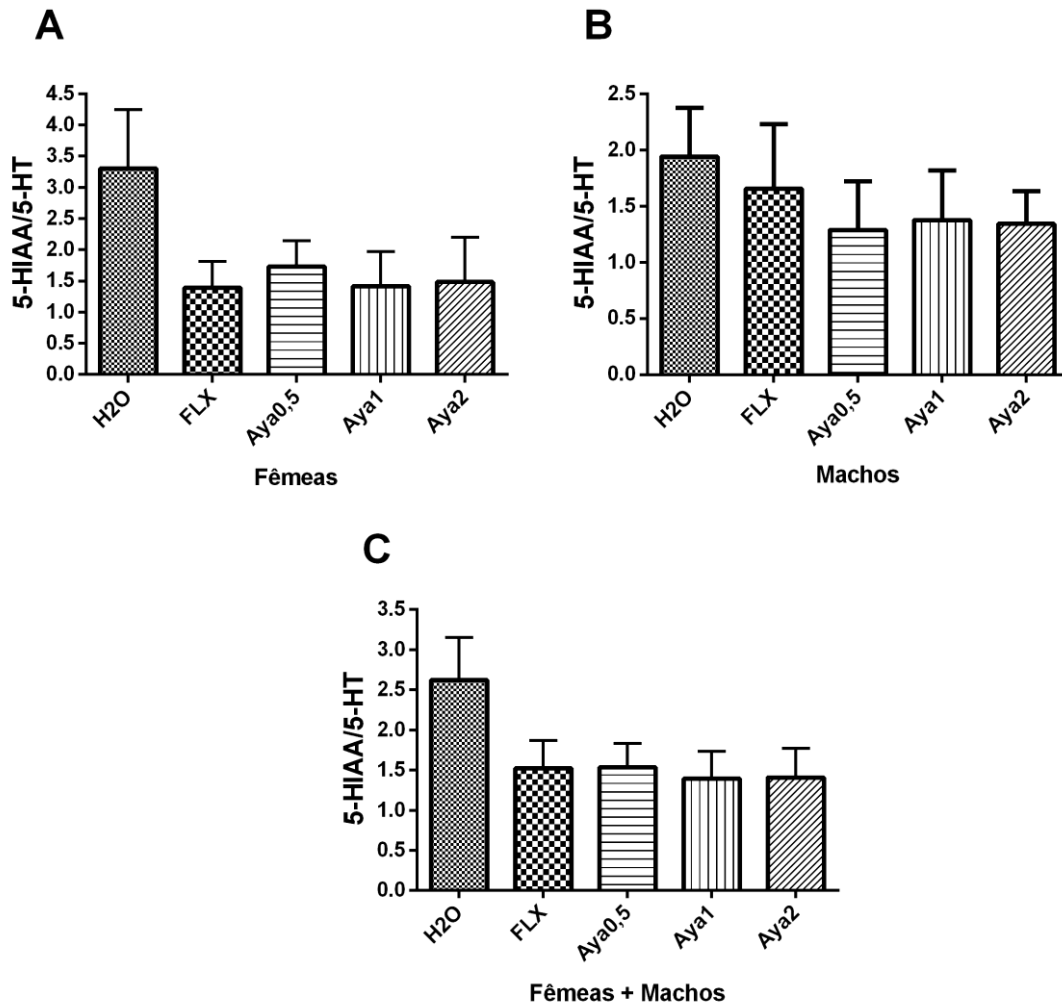
Neste estudo, os níveis de 5-HT foram significativamente maiores para o grupo Aya2 das fêmeas com relação ao grupo H<sub>2</sub>O (Figura 59). Observamos uma redução significativa dos níveis de 5-HIAA nos encéfalos dos ratos tratados com fluoxetina quando comparados ao grupo H<sub>2</sub>O tanto considerando machos e fêmeas juntos, quanto para as fêmeas quando consideradas a parte (Figura 60). O *turnover* 5-HIAA/5-HT não foi significativo para nenhum grupo (Figura 61).



**Figura 59.** Quantificação de serotonina em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de de encéfalo, expressos em média  $\pm$  epm; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação ao grupo H<sub>2</sub>O, p = 0,0120.



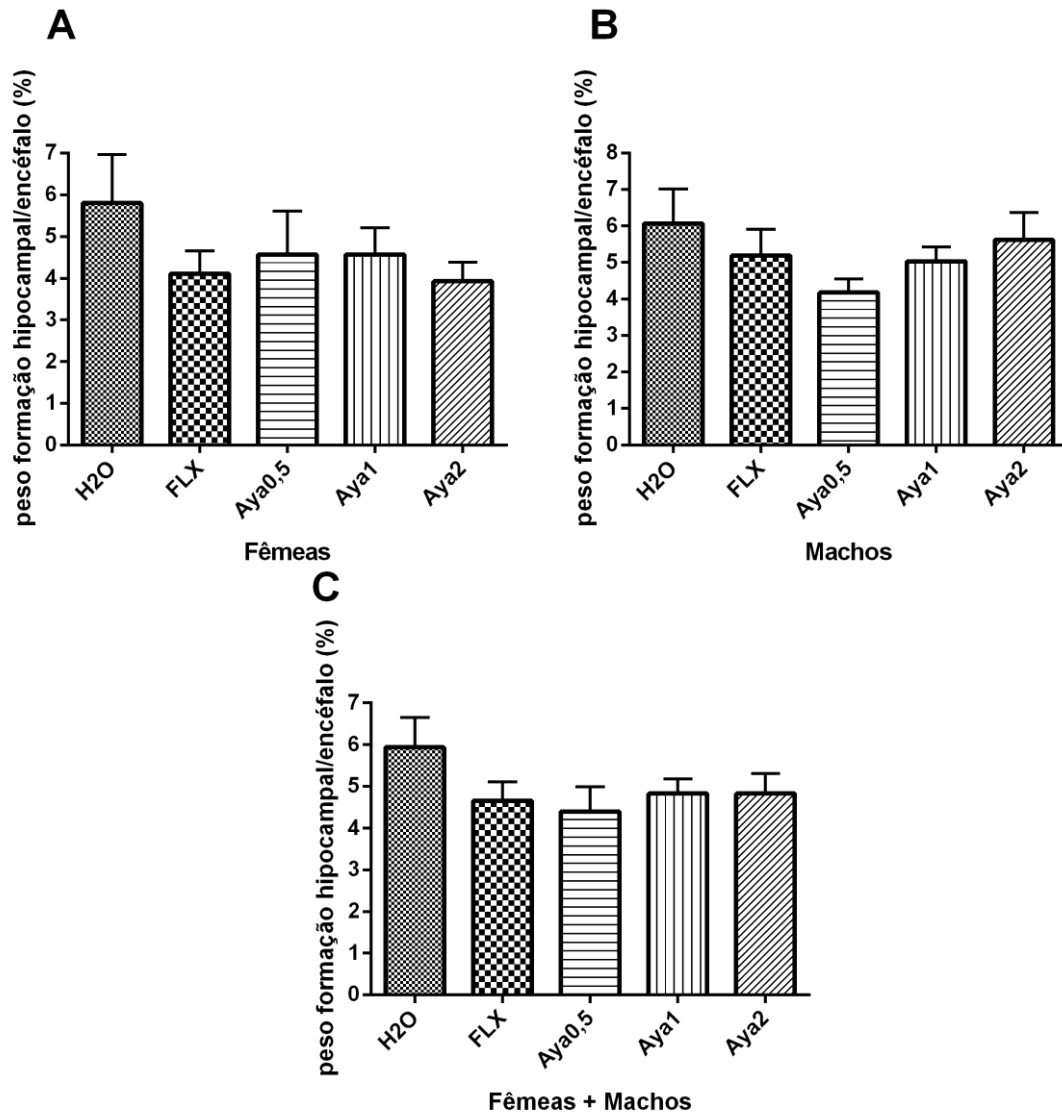
**Figura 60.** Quantificação de 5-HIAA em encéfalo de ratos. Resultados em ng/mg de de encéfalo, expressos em média  $\pm$  epm; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação ao grupo H<sub>2</sub>O, p = 0,0241. \*\* significativo em relação ao grupo H<sub>2</sub>O, p = 0,0028.



**Figura 61.** Razão entre 5-HIAA/5-HT em encéfalo de ratos. Resultados expressos em média  $\pm$  epm; H2O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos.

#### 5.4. BDNF na formação hipocampal

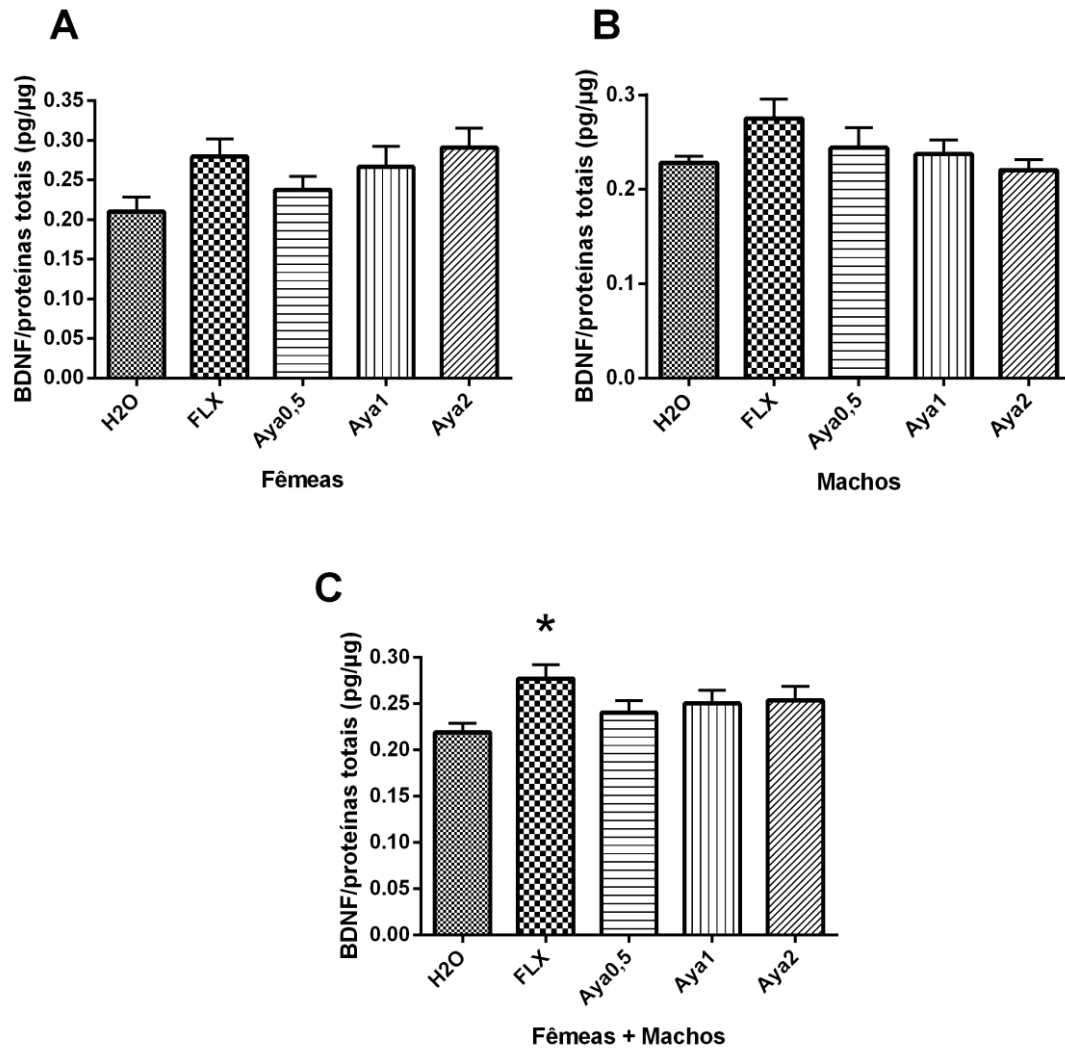
Os níveis de BDNF foram avaliados na formação hipocampal dos ratos. Não foi observada diferença significativa na razão entre o peso da formação hipocampal e o peso total de cada encéfalo entre os grupos do estudo, apesar dessa razão ter sido numericamente maior no grupo controle (Figura 62).



**Figura 62.** Razão entre o peso da formação hipocampal e o peso do encéfalo do rato (%); H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.

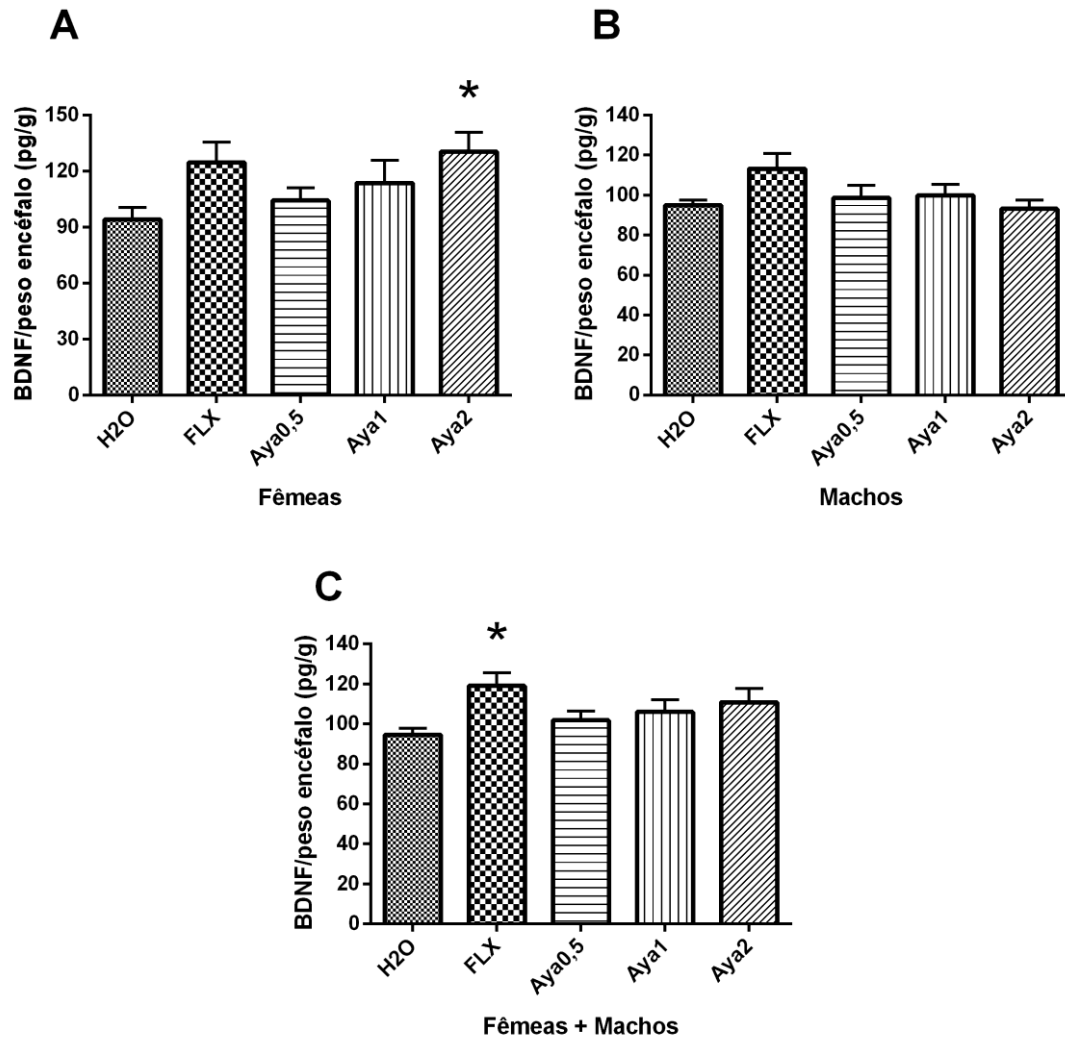
Os níveis de BDNF na formação hipocampal dos ratos foram estimados em relação às proteínas totais, ao peso úmido do encéfalo e da formação hipocampal (Figuras 63-65). Quando expressos em relação às proteínas totais, os níveis de BDNF foram significativamente maiores somente para o grupo FLX com relação ao grupo H<sub>2</sub>O, quando considerado machos e fêmeas juntos (Figura 63C).





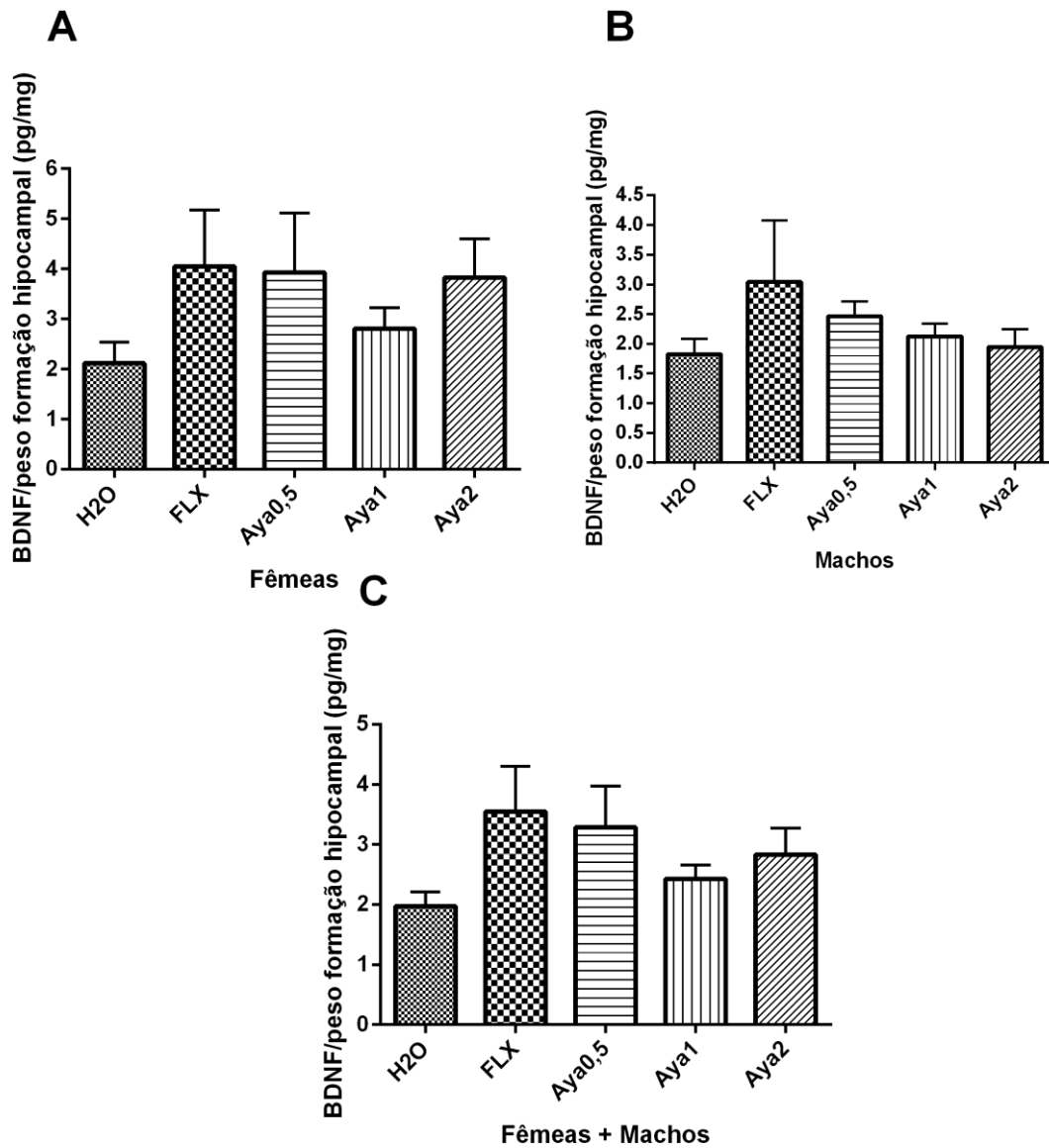
**Figura 63.** Níveis de BDNF na formação hipocampal dos ratos, em pg/µg proteínas totais; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação à água, p = 0,0136. Os valores estão expressos em média ± epm.

Quando expressos em relação ao peso do encéfalo, os níveis de BDNF foram significativamente maiores para as fêmeas do grupo Aya2 em comparação ao grupo H<sub>2</sub>O e para o grupo FLX em comparação ao grupo H<sub>2</sub>O quando analisamos os dois gêneros juntos (Figura 64).



**Figura 64.** Níveis de BDNF na formação hipocampal do rato, em pg/g encéfalo; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. \* significativo em relação à água,  $p < 0,05$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm.

Porém, ao analisarmos os níveis de BDNF em relação ao peso da formação hipocampal, não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos, apesar de os grupos tratados apresentarem essa razão um pouco maior em relação ao grupo H<sub>2</sub>O (Figura 65).



**Figura 65.** Níveis de BDNF da formação hipocampal, em pg/mg hipocampo; H<sub>2</sub>O: n=8 fêmeas e 8 machos; FLX: n=9 fêmeas e 9 machos; Aya0,5: n=9 fêmeas e 7 machos; Aya1: n=8 fêmeas e 10 machos; e Aya2: n=8 fêmeas e 9 machos. Os valores estão expressos em média ± epm.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, ratos Wistar machos e fêmeas foram tratados diariamente por gavagem com ayahuasca (0,5X, 1X e 2X a dose usual) por 28 dias, tendo como controle positivo a fluoxetina (FLX, 10 mg/kg pc) e água como controle negativo. A dose ritual desta infusão (1X) corresponde a 0,26 mg/kg pc DMT, 2,58 mg/kg pc harmina, 0,171 mg/kg pc harmalina e 0,33 mg/kg pc de tetrahydroharmina. A dose máxima de ayahuasca foi estabelecida a partir de estudo prévio realizado pelo nosso grupo que mostrou que a exposição diária a ayahuasca é letal aos ratos a partir de 4X a dose usual (Motta et al., 2018).

No desenvolvimento de um fármaco, é importante avaliar sua segurança (toxicidade), que neste estudo foi aferida pelos parâmetros de peso corpóreo e ganho de peso, peso dos órgãos e alterações macroscópicas, e avaliação hematológica. A ayahuasca não afetou o peso total, ganho de peso, e o peso dos órgãos dos animais após o tratamento crônico, e nenhuma alteração macroscópica foi observada nos órgãos. O ganho de peso das fêmeas do grupo fluoxetina foi significativamente menor em comparação com os outros grupos, resultado que não é surpreendente, dado que estudos demonstraram que o bloqueio da recaptção de 5-HT leva a uma resposta anorética via sinalização serotoninérgica (WURTMAN et al., 1993). Estudos do tratamento neonatal com fluoxetina mostraram reduções no peso corporal, não apenas durante o período de tratamento farmacológico, mas também mais tarde na vida (DA SILVA et al., 2018; PINHEIRO et al., 2017).

Na análise hematológica, fêmeas do grupo Aya0,5 tiveram o percentual de linfócitos significativamente inferior ao grupo controle H<sub>2</sub>O, e machos do grupo Aya1 apresentaram um aumento significativo da enzima transaminase glutâmico oxalacética, resultados que, isolados, não têm importância toxicológica. A contagem total de leucócitos e contagem de neutrófilos estavam aumentadas significativamente para o grupo tratado com fluoxetina em comparação com o grupo H<sub>2</sub>O quando consideramos os dois gêneros juntos. Melo Junior et al. (2016) mostraram que a ayahuasca (dose única 1X a 15X) não induziu alteração na proporção de eritrócitos jovens em relação à população total, o que também foi evidenciado nesse estudo pela análise das séries sanguíneas. Santos et al. (2017) não encontraram variações nos resultados bioquímicos

de ratos machos tratados a cada dois dias por 72 dias com ayahuasca em doses de 1X a 8X a dose usual.

Dos Santos et al. (2016) identificaram 21 estudos em humanos e animais que avaliaram os efeitos ansiolíticos e antidepressivos da ayahuasca ou de alguns dos seus alcaloides isolados (dimetiltriptamina, harmina, THH e harmalina). Apesar da heterogeneidade entre os resultados, os estudos mostram consistentemente que estes compostos têm propriedades ansiolíticas e antidepressivas.

No presente estudo, os efeitos neurocomportamentais da ayahuasca nos ratos foram avaliados uma hora após a última gavagem. No teste de campo aberto (TCA), a atividade de locomoção não foi alterada com o tratamento, mas a exploração da área central foi significativamente diminuída nos machos tratados com Aya1 e com FLX. Esses resultados foram diferentes daqueles encontrados previamente pelo nosso grupo com ratos tratados com dose única de ayahuasca. O tratamento com 15X e 30X a dose usual causaram uma diminuição significativa na locomoção e no comportamento exploratório dos animais no TCA (PIC-TAYLOR et al., 2015). Melo Junior (2014) também observou diminuição da locomoção e na atividade de *rearing* no grupo 15X em relação ao controle.

No estudo de Fortunato et al. (2009), o tratamento intraperitoneal agudo com harmina (5 a 15 mg/kg pc), componente da ayahuasca e inibidor da MAO, e com imipramina (10 – 30 mg/kg pc), um antidepressivo tricíclico inibidor de norepinefrina e de recaptação de serotonina, não modificou o número de cruzamentos dos ratos no TCA. Segundo Lacerda et al. (2000), o emprego do parâmetro de entrada na área central do campo aberto como índice de ansiedade é controverso, uma vez que medidas de ansiedade se confundem com medidas de locomoção. Esse autor observou que tanto o diazepam, um ansiolítico, quanto o pentilenotetrazol, um ansiogênico, causaram diminuição deste parâmetro e diminuiram a ambulação na periferia, o que sugere efeitos inespecíficos.

O único parâmetro com uma diferença significativa no labirinto em cruz elevada (LCE) foi o aumento da micção dos ratos machos do grupo Aya2 quando comparado ao grupo H<sub>2</sub>O. Hall (1934) atribuiu os parâmetros de defecação e micção como bons indicadores de reatividade emocional. Melo Junior (2014), porém, encontrou que ratos tratados com dose única de 15X mostraram menos mobilidade no LCE comparado ao

controle. Na primeira hora após a dosagem, animais dos grupos 15X entraram menos e ficaram significativamente mais tempo no braço fechado que os animais dos outros grupos. Adicionalmente, os animais do grupo 15X mostraram menor atividade de *rearing* que o grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Pic-Taylor et al. (2015) com ratos tratados com a ayahuasca com dose única de 30X também entrando menos nos braços abertos que os controles. Adicionalmente, ratos dos grupos 15X, 30X e fluoxetina (20 mg/kg pc) tiveram estatisticamente menos entradas nos braços fechados que o controle. Halberstadt e Geyer (2011) verificaram que ratos tratados com injeções de DMT, um dos componentes da ayahuasca, tiveram sua atividade locomotora e exploratória reduzidas.

Neste estudo, não observamos diferença significativa entre os grupos em nenhum parâmetro no teste de natação forçada (TNF). Santos (2016) mostrou que animais tratados com ayahuasca cronicamente nas doses de 1X a 8X a dose usual, em dias alternados, também não apresentaram diferenças significativas no TNF no 36° e no 70° dia de tratamento, com exceção do aumento do *climbing* na maior dose no 70°, dia. Ao contrário, estudos prévios com doses únicas, indicaram um potencial antidepressivo do chá neste teste. Pic-Taylor et al. (2015) observaram que ratas dos grupos 30X e 50X obtiveram um escore de imobilidade menor e de natação maior comparado aos grupos controle e FLX, enquanto o grupo FLX não apresentaram o mesmo efeito. Melo Junior (2014) também observou um comportamento mais ativo na água dos ratos nas doses 1X e 5X, evidenciado por um aumento significativo do tempo de *climbing*. Em fêmeas, a dose única de 15X foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade e aumentar o tempo de natação na avaliação realizada 2 horas após a administração. No estudo de Fortunato et al. (2010), a administração intraperitoneal por 14 dias de imipramina (10 - 30 mg/kg) e harmina (5- 15 mg/kg) reduziram de maneira significativa o tempo de imobilidade, aumentaram o tempo de *climbing* e o tempo de natação dos ratos no TNF.

Mezadri et al. (2011) verificaram que os efeitos antidepressivos do tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) foram detectados após várias sessões de reteste no TNF em ratos. O pré-teste foi utilizando nos estudos agudos de Pic-Taylor et al (2015) e Melo Junior (2014), 24 horas antes da exposição, porém, o pré-teste não foi realizado no presente estudo já que os animais foram expostos diariamente à bebida. Geralmente, o tratamento medicamentoso crônico produz uma mudança adaptativa no rato que o torna mais capaz para suportar o estresse da imersão em água (OVERSTREET, 2012). Os

resultados do estudo de Santos (2016) mostraram que a fluoxetina administrada cronicamente em dias alternados aumentou a atividade da natação e diminuiu a imobilidade no 36° dia. Mas esse efeito da fluoxetina não perdurou até o final do tratamento (70° dia), no qual foi observada uma diminuição significativa na natação e um aumento significativo na imobilidade. Detke et al. (1997) também observaram que alguns antidepressivos não mantêm sua ação no teste de natação forçada após um período longo de administração.

Segundo Bogdanova et al. (2013), os resultados falsos negativos mais importantes (em que não há nenhuma mudança na imobilidade depois de tratamento com uma droga com ação antidepressiva conhecida) para o TNF são produzidos pelos ISRS, mais comumente na versão clássica deste teste. No estudo de Suman et al. (2017), o tratamento agudo e crônico com altas doses de fluoxetina também não reduziu o tempo de imobilidade de camundongos no TNF, sugerindo que esse teste não é eficaz para indicar a ação antidepressiva da fluoxetina após administração oral.

Nesse estudo, um método por HPLC-FL para análise de serotonina, dopamina, e seus metabólitos (5-HIAA, DOPAC e HVA) e do MHPG, metabólito da norepinefrina, em encéfalo de ratos após remoção da formação hipocampal foi otimizado e validado. Os resultados foram expressos em peso do encéfalo. A norepinefrina não foi detectada no encéfalo dos ratos. Outros estudos, porém, reportaram concentrações entre 0,15 a 1,86 ng/mg dessa monoamina em várias regiões do cérebro (FONSECA et al., 2017; LAKSHMANA e RAJU, 1997; CASTRO-NETO et al., 2013; MARTINEZ et al., 2018), níveis que, em tese, poderiam ter sido detectados pelo método desenvolvido nesse estudo.

No estudo de Castro Neto et al. (2013), ratos machos foram tratados com ayahuasca em dose única de 250 a 800 mg/kg pc por gavagem (~ 6 a 20 mg/kg pc de harmina). A menor dose de harmina desse estudo é similar à maior dose utilizada cronicamente no presente estudo (5,2 mg/kg pc). Os animais foram sacrificados 40 minutos após tratamento e o hipocampo e amígdala foram retirados para análise. Os autores encontraram um aumento significativo de norepinefrina na amígdala dos animais em todas as doses do estudo, mas nenhuma alteração foi observada no hipocampo, e a razão entre o metabólito VMA (ácido 4-hidroxi-3-metoxi mandélico) e

norepinefrina foi menor nas duas regiões. Os níveis do metabólito MHPG não foram investigados nesse estudo.

O MHPG é um índice útil da taxa de utilização de norepinefrina central (GLAVIN, 1985). No presente estudo, o tratamento com ayahuasca e fluoxetina não alteraram significativamente os níveis de MHPG no encéfalo (com ausência da formação hipocampal). Os níveis de MHPG encontrados nos animais controle (~ 8 ng/mg em machos) estavam acima daqueles reportados pela literatura em várias regiões cerebrais (0,05-0,16 ng/mg; Wistar machos; MARTINEZ et al., 2018).

Não houve diferença significativa nos níveis de dopamina e seu metabólito HVA no encéfalo dos ratos. Porém, os níveis do metabólito DOPAC aumentaram significativamente após o tratamento com a ayahuasca nas maiores doses (Aya1 e Aya2) com relação ao grupo H<sub>2</sub>O, principalmente nas fêmeas. O grupo de machos só teve a DOPAC significativamente aumentada na maior dose, comparado aos grupos H<sub>2</sub>O e FLX.

A razão entre o metabólito e o neurotransmissor (*turnover*) pode ser usada como um índice do metabolismo de neurotransmissores; a redução do *turnover* indica uma desaceleração e seu aumento uma aceleração deste metabolismo (DONATO, 2013). Ebinger et al. (1987), entretanto, demonstraram quantidades significativas de DOPAC e HVA em estruturas cerebrais não previamente associadas à inervação dopaminérgica. A concentração de DA relativamente menor nessas estruturas sugere que nessas regiões, as concentrações de DOPAC e HVA não estariam relacionadas à neurotransmissão dopaminérgica. Resultado semelhante foi encontrado no presente estudo, onde a quantidade do metabólito DOPAC no encéfalo (sem a região hipocampal) foi maior que de seu precursor, DA. O *turnover* DOPAC/DA foi significativamente maior para o grupo Aya2 com relação aos grupos H<sub>2</sub>O e FLX, e o *turnover* HVA/DOPAC foi significativamente menor para os grupos Aya1 e Aya2 comparado ao grupo H<sub>2</sub>O quando consideramos os dois gêneros juntos e para os três grupos tratados com ayahuasca quando analisamos apenas os machos. Esses resultados indicam que a ayahuasca aumenta o metabolismo da dopamina a DOPAC, seu principal metabólito em ratos (HRDINA e SINGHAL, 1981), mas retarda a metilação do DOPAC à HVA.

Castro-Neto et al. (2013) observaram um aumento significativo de dopamina na amígdala dos animais tratados, porém, similar ao presente estudo, não houve alteração



na taxa de utilização HVA/DA. Iurlo et al. (2001) também reportaram um aumento nas concentrações de dopamina no estriado de ratos tratados com dose única de harmina (0,5 a 10 mg/kg pc, ip), e diminuição de DOPAC e HVA. Brierley e Davidson (2013) sugeriram que a harmina aumenta o efluxo de dopamina por meio de um mecanismo pré-sináptico específico para o receptor 5-HT<sub>2A</sub>, independente da atividade inibitória da MAO. Por outro lado, segundo Stahl (2008), o agonismo dos receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos pós-sinápticos ativa o GABA interneuronal e leva a uma ação inibitória indireta na liberação de dopamina. O DMT presente na ayahuasca é um agonista do receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Riba, 2013), mas no presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de dopamina nos animais tratados com a ayahuasca, mas foi observado um aumento do seu *turnover*. Apesar de existir uma tendência de que o *turnover* de dopamina seja menor nos estados depressivos, os resultados não são consistentes devido à complexidade da atividade neuronal da dopamina, que depende de sua liberação, metabolismo, sensibilidade dos diferentes receptores e equilíbrio com os outros neurotransmissores (ACKENHEIL, 2001).

A serotonina apresentou-se aumentada significativamente para o grupo Aya2 das fêmeas, enquanto observamos uma redução significativa do seu metabólito (5-HIAA) nos encéfalos dos ratos tratados com fluoxetina quando comparados ao grupo H<sub>2</sub>O considerando somente as fêmeas ou todos os animais. O *turnover* 5-HIAA/5-HT, apesar de não significativo, apresentou-se reduzido para os grupos tratados. Resultado semelhante foi observado no estudo de Castro-Neto et al. (2013), onde os níveis de 5-HT aumentaram tanto no hipocampo quanto na amígdala à medida que aumentavam as doses dos animais tratados, porém, seu *turnover* foi significativamente reduzido nestes animais. O aumento de serotonina do encéfalo de ratos tratados com a ayahuasca pode ser explicado pela ação das β-carbolinas como inibidores da MAO, o que leva a um aumento o nível de serotonina no cérebro (MCKENNA et al., 1984). Pic-taylor et al. (2015) observaram que os animais tratados com uma dose 30X apresentaram maior ativação neural em todas as áreas do cérebro envolvidas na neurotransmissão serotoninérgica. Carlsson e Carlsson (1988) demonstraram que há um aumento na atividade de 5-HT, aumento da síntese de 5-HT e aumento de metabólitos da 5-HT no cérebro de fêmeas Sprague-Dawley em relação aos machos, o que corrobora nosso achado de que as fêmeas são mais sensíveis que os machos no aumento dos níveis de serotonina.

Em todos os estudos publicados na literatura, as monoaminas foram determinadas em regiões específicas do encéfalo (Tabela 1). A norepinefrina e seu metabólito estão presentes em maiores concentrações no hipotálamo (FONSECA et al., 2017; LAKSHMARA E RAY, 1997; MARTINEZ et al., 2018), a dopamina e seus metabólitos na região estriada (PEAT e GIBB, 1983; MUREOLA et al., 2010; FONSECA et al., 2017; LAKSHMARA E RAY, 1997; MARTINEZ et al., 2018) e a serotonina e seu metabólito no hipotálamo e mesencéfalo (MARTINEZ et al., 2018). As maiores variações entre as regiões em um mesmo estudo são encontradas nos níveis de dopamina (0,07-3,9 ng/mg; FONSECA et al., 2017) e as menores nos níveis de serotonina (0,32-1,7 ng/mg; MARTINEZ et al., 2018). No presente estudo, as monoaminas e seus metabólitos foram analisadas no encéfalo, após a remoção da formação hipocampal, e os níveis encontrados refletem a média das regiões incluídas. É provável que isto explique as diferenças nos resultados encontrados nos outros estudos conduzidos com a ayahuasca ou harmina, principalmente na alteração dos níveis de dopamina.

O BDNF desempenha um papel crucial na depressão como regulador central da plasticidade neuronal no hipocampo (BOHLEN e BOHLEN, 2018), e seus níveis estão diminuídos na mania bipolar e na depressão bipolar em humanos (FERNANDES et al., 2011). O tratamento crônico com antidepressivos aumenta a expressão de BDNF no hipocampo de ratos adultos (MALBERG et al., 2000). Acredita-se que a ação antidepressiva da fluoxetina, um ISRS, seja resultado do sinergismo entre um aumento da ativação do receptor 5-HT e dos níveis de BDNF no cérebro (LI et al. 2017). No presente estudo, os níveis de BDNF na formação hipocampal foram significativamente maiores no grupo FLX comparado ao grupo H<sub>2</sub>O quando consideramos ambos os gêneros, tanto quando o BDNF foi expresso em relação às proteínas totais quanto em relação ao peso do encéfalo. O BDNF foi significativamente maior para as fêmeas do grupo Aya2, mas somente quando expressa em relação ao peso do encéfalo, resultado que tem relevância limitada. Apesar da razão peso formação hipocampal/peso encéfalo não ter sido significativamente diferente entre os grupos, ela foi numericamente maior no grupo H<sub>2</sub>O quando comparado aos grupos tratados, principalmente para fêmeas. É provável que esta diferença tenha impactado a significância estatística entre os grupos quando o BDNF foi expresso com relação ao peso da formação hipocampal.

No estudo de Abelaira et al. (2013), ratos tratados com harmina mostraram uma reversão da anedonia (perda da capacidade de sentir prazer, próprio dos estados gravemente depressivos) e normalidade dos níveis de ACTH (hormônio adreocorticotrófico) e de BDNF. Fortunato et al. (2009) observaram um aumento significativo nos níveis de BDNF no hipocampo de ratos com administração aguda de harmina na dose de 15 mg/kg, i.p. Em outro estudo do mesmo grupo, um aumento estatisticamente significativo nos níveis de BDNF no hipocampo foi observado em ratos tratados por 14 dias com harmina nas doses 10 e 15 mg/kg, i.p. quando em comparação com o controle (FORTUNATO et al., 2010). Os níveis de BDNF nos dois estudos ficaram na faixa de 0,02 a 0,07 pg/ $\mu$ g de proteínas totais. No presente estudo, a maior dose utilizada (2X) corresponde a aproximadamente 5,16 mg/kg pc harmina por via oral, onde os níveis de BDNF ficaram na faixa de 0,2 a 0,3 pg/ $\mu$ g de proteínas totais.

Os resultados desse estudo mostram que uso oral crônico da ayahuasca afeta de forma diferente machos e fêmeas. Machos apresentaram maior sensibilidade que as fêmeas nos testes comportamentais, e nos *turnovers* das monoaminas, enquanto as fêmeas se mostraram mais sensíveis nas quantificações de monoaminas e de BDNF. Trabalhos como a revisão de Kokras e Dalla (2014) sobre as diferenças sexuais em modelos animais de transtornos psiquiátricos reforçam a existência dessas diferenças e a importância de melhor estudá-las com a inclusão de fêmeas na pesquisa pré-clínica.

Este estudo possui algumas limitações que podem ter influenciado nos resultados. Primeiramente, durante a retirada da formação hipocampal, é possível que, em alguns casos, ela não tenha sido totalmente separada do encéfalo. Além disso, o processo de maceração do encéfalo e da formação hipocampal em nitrogênio líquido se mostrou difícil e a homogeneização total pode não ter sido totalmente alcançada.

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ Esse estudo mostrou que a administração crônica diária de ayahuasca nas doses de 0,5X, 1X e 2X, durante 28 dias, em ratos Wistar machos e fêmeas, não causou toxicidade para nenhum dos sexos, evidenciado pela análise das séries sanguíneas (eritrocítica e leucocítica) e pelos parâmetros bioquímicos, peso corpóreo e peso e avaliação macroscópica das vísceras.
- ✓ A administração crônica de ayahuasca, e do antidepressivo fluoxetina, não afetou a locomoção dos ratos no teste de campo aberto, confirmando a segurança da bebida.
- ✓ A administração crônica por gavagem de ayahuasca nas doses de 0,5X, 1X e 2X a dose usual não apresentou efeito antidepressivo e ansiolítico nos testes comportamentais. Resultados significativos também não foram observados para a fluoxetina, um antidepressivo clássico da classe dos ISRS.
- ✓ Um método por HPLC-FL foi otimizado e validado para a quantificação das monoaminas no encéfalo de ratos (após remoção da formação hipocampal).
- ✓ O tratamento com ayahuasca, ou fluoxetina, não alterou significativamente os níveis de dopamina, mas aumentou seu metabolismo, evidenciado pelo aumento dos níveis de DOPAC, principalmente nas fêmeas, e pelo seu *turnover* (em machos na maior dose). A ayahuasca também retardou a metilação do DOPAC à HVA nos machos nas três doses testadas, o que pode ter contribuído para o aumento dos níveis de DOPAC. Estas alterações não foram observadas para a fluoxetina. O tratamento de fêmeas com a ayahuasca na maior dose aumentou significativamente os níveis de serotonina no encéfalo, o que também não foi observado com fluoxetina.
- ✓ O tratamento com ayahuasca na maior dose (fêmeas) aumentou significativamente os níveis de BDNF na formação hipocampal em relação ao peso total do encéfalo. No grupo fluoxetina, este aumento também foi observado quando expresso em proteínas totais, resultado mais relevante.
- ✓ Em resumo, este estudo mostrou que o uso crônico da ayahuasca por 28 dias nas doses de 0,5 a 2X a dose ritual é seguro para os ratos. O tratamento com ayahuasca levou a um aumento do metabolismo de dopamina, aumento dos níveis de serotonina e de BDNF, indicando um potencial antidepressivo desta bebida. Porém, esse potencial antidepressivo não foi confirmado no teste de natação forçada.
- ✓ Estudos futuros para melhor investigar este potencial devem incluir a) outros testes comportamentais, como o de elevação de cauda, para avaliar potencial antidepressivo

e o da barra rotatória (Rotarod), para avaliar função motora; b) uma investigação mais detalhada da via dopaminérgica em regiões específicas do encéfalo; c) quantificação do BDNF em regiões específicas do cérebro, como o córtex pré-frontal; d) analisar o potencial antidepressivo dos compostos da ayahuasca separadamente, e não em forma de chá; e) outros protocolos de exposição; e f) utilizar modelos animais deprimidos .

## REFERÊNCIAS

- ABELAIRA, H.M.; RÉUS G.Z.; SCAINI G.; STRECK E.L.; CRIPPA J.A.; QUEVEDO J.  $\beta$ -Carboline harmine reverses the effects induced by stress on behaviour and citrate synthase activity in the rat prefrontal cortex. *Acta Neuropsychiatrica*. 2013, 25(6): 328-333.
- ACKENHEIL, M. Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis. *Journal of Affective Disorders*. 2001, 62(1-2): 101–111.
- AFSHAR, S; SHAHIDI, S.; ROHANI, A.H.; KOMAKI, A.; ASL, S.S. The effect of NAD-299 and TCB-2 on learning and memory, hippocampal BDNF levels and amyloid plaques in Streptozotocin-induced memory deficits in male rats. *Psychopharmacology*. 2018, 235: 2809-2822.
- ALTAR, C. A. Neurotrophins and depression. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1999, 20(2): 59–61.
- ALVES, R.; DE CARVALHO, J.G.B.; VENDITTI, M.A.C. High-and low-rearing rats differ in the brain excitability controlled by the allosteric benzodiazepine site in the GABA A receptor. *Journal of Behavioral and Brain Science*. 2012, 2: 315–325.
- ALVES, R.S.; DE SOUZA, A.S. The Open Field Test. *Igarss*. 2014, 1: 1–5.
- ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Ministério da Saúde. 2017: 1–21.
- BANSKOTA, S.; GHIA, J.-E.; KHAN, W. I. Serotonin in the gut: Blessing or a curse. *Biochimie*. 2018, pii: S0300-9084(18)30165-2.
- BARBOSA, P.C.; STRASSMAN. R.J.; DA SILVEIRA, D.X.; ARECO, K.; HOY, R.; POMMY, J.; THOMA, R.; BOGENSCHUTZ, M. Psychological and europsychological assessment of regular hoasca users, *Compr. Psychiatry*. 2016, 71: 95–105.
- BENEDETTO, G.E.; FICOA, D.; PENNETTAA, A.; MALITESTAB, C.; NICOLARDIC, G.; LOFRUMENTOC, D.D.; NUCCIOC, F.; LA PESACALABORATORY, V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, 98: 266–270.
- BERNABÉ, C.S. Efeitos agudos e crônicos da fluoxetina em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013: 152pp.
- BOGDANOVA, O.V.; KANEKAR, S.; D'ANCI, K.E.; RENSHAW, P.F. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & Behavior*. 2013, 118: 227–239
- BOHLEN, O. VON; BOHLEN, V. VON. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *V. Cell Tissue Res*. 2018, 373: 729.
- BREMNER, J.D.; NARAYAN, M.; ANDERSON, E.R.; Staib, L.H.; Miller, H.L.; Charney, D.S. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am. J. Psychiatry*. 2000, 157: 115–118.

- BRIERLEY, D.I.; DAVIDSON, C. Developments in harmine pharmacology - Implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012, 39(2): 263–272.
- BRIERLEY, D.I., DAVIDSON, C. Harmine augments electrically evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens shell. *J. Psychopharmacol.* 2013, 27: 98-108.
- BRITO, N.M.; DE AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. 2003, 13: 129–146.
- BRITO, A.R.M.S.A.; COSTA, M.A.M.; CARVALHO, J.E.; DIAS, P.C. Efeitos farmacológicos do decocto (hoasca) de *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* em camundongos. *In: IX Reunião anual da federação da sociedades de biologia experimental (fesbe), Caxambu, MG, 203, 1994.*
- BRUMMELTE, S.; GLANAGHY, E.M.C.; BONNIN, A.; OBERLANDER, T.F. Developmental changes in serotonin signaling: implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience*. 2017; 342: 212–231.
- BRUNIER, A.; CHAIB, F. Dementia: number of people affected to triple in next 30 years. *Alzheimer. Research & Science*, 2017.
- CALABRESE, F.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; RIVA, M.A. Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 2009, 34(1): 208–216.
- CALLAWAY, J.C.; AIRAKSINEN, M.M.; MCKENNA, D.J.; BRITO, G.S.; GROB, C.S. Platelet serotonin uptake sites increased in drinkers of ayahuasca. *Psychopharmacology*. 1994, 116(3): 385–387.
- CALLAWAY, J.C.; RAYMON, L.P.; HEARN, W.L.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, G.S.; MASH, D.C. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J Anal Toxicol*. 1996, 20(6): 492-497.
- CALLAWAY, J. C. Various alkaloid profiles in decoctions of *banisteriopsis caapi*. *Journal of Psychoactive Drugs*. 2005, 37(2): 151–155.
- CALLAWAY, J.C.; GROB, C.S. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors : A potential Combination for Severe Adverse Interactions. 1998, 30(4): 367-369.
- CARBONARO, T. M.; GATCH, M. B. Neuropharmacology of N,N-Dimethyltryptamine. *HHS Public Access*. 2016, 126(1): 74–88.
- CARLEZON, W.A.; THOMAS, M.J. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *NIH, Neuropharmacology*. 2009, 56(1): 122–132.
- CARLSSON, M.; CARLSSON, A. A regional study of sex differences in rat brain serotonin. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 1988, 12(1): 53–61.
- CASTRÉN, E.; RANTAMÄKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental Neurobiology*. 2010, 70(5): 289–297.

- CASTRO-NETO, E.F.; DA CUNHA, R.H.; DA SILVEIRA, D.X.; YONAMINE, M.; GOUVEIA, T.L.F.; CAVALHEIRO, E.A.; AMADO, D.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. *World Journal of Biological Chemistry*. 2013, 4(4): 141.
- CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia*. 2004, 35(1): 1-11.
- CHEN B.; DOWLATSHAHI, D.; MACQUEEN, G.M.; WANG, J.F.; YOUNG, L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 2001, 50(4): 260–265.
- CHEN, M. J.; NGUYEN, T.V.; PIKE, C.J.; RUSSO-NEUSTADT, A.A. Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. *Cellular Signalling*. 2007, 19(1): 114–128.
- COOKE, J. D.; CAVENDER, H.M.; LIMA, H.K.; GROVER, L.M. Antidepressants that inhibit both serotonin and norepinephrine reuptake impair long-term potentiation in hippocampus. *NIH Public Access*. 2015, 231(23): 4429–4441.
- COUTO, L.L.; DOS ANJOS, L.C.; ARAUJO, M.A.F.; MOURÃO, C.A.; SCHWARTZ, C.A.; FERREIRA, L.B.; MORTARI, M.R. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Pharmacogn Mag*. 2012, 8(32): 292–299.
- CRUZ, A. P. DE M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. *Métodos em Neurociência*. 2012, 192–217.
- CRYAN, J. F.; MARKOU, A; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences*. 2002, 23(5): 238–245.
- CUNHA, M.P. Interação do zinco com antidepressivos no teste de suspensão da cauda e no teste do campo aberto. *Dissertação de Mestrado em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009*.
- DA SILVA, A.I.; BRAZ, G.R.F.; SILVA, S.C.A.; PEDROZA, A.A.S.; LIMA-JÚNIOR, N.C.; SILVA, T.L.A.; LAGRANHA, C.J. Body composition, biochemical, behavioral and molecular alterations in overfed rats after chronic exposure to SSRI. *Behavioural Brain Research*. 2018, 356: 62-70.
- DA SILVEIRA, D.X.; GROB, C.S.; DE RIOS, M.D.; LOPEZ, E.; ALONSO, L.K.; TACLA, C.; DOERING-SILVEIRA, E. Ayahuasca in adolescence: a preliminary psychiatric assessment, *J. Psychoactive Drugs*. 2005, 37(2): 129–133, 2005.
- DE FOUBERT, G.; CARNEY, S.L.; ROBINSON, C.S.; DESTEXHE, E.J.; TOMLINSON, R.; HICKS, C.A.; MURRAY, T.K.; GAILLARD, J.P.; DEVILLE, C.; XHENSEVAL, V.; THOMAS, C.E.; O'NEILL, M.J.; ZETTERSTRÖM, T.S.C.. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience*. 2004, 128(3): 597–604.



- DETKE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*. 1995, 121(1): 66–72.
- DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*. 1997, 5(2): 107-112.
- DONATO, F. Envolvimento dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico no efeito tipo antidepressivo causado pelo fenilselenometil-1,2,3-triazol em camundongos. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, 2013.
- DOS SANTOS, R.G. Safety and side effects of ayahuasca in humans--an overview focusing on developmental toxicology. *Journal of psychoactive drugs*. 2013, 45(1): 68–78.
- DOS SANTOS, R.G.; OSÓRIO, F.L.; CRIPPA, J.A.; HALLAK, J.E. Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2016, 38(1): 65–72.
- DRYZYGA, Ł.R.; MARCINOWSKA, A.; OBUCHOWICZ, E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: A review of clinical and experimental studies. *Brain Research Bulletin*. 2009, 79(5): 248-57.
- DUMAN, R. S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *NeuroMolecular Medicine*. 2004, 5(1): 011–026.
- DURAND, M.; BERTON, O.; AGUERRE, S.; EDNO, L.; COMBOURIEU, I.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. Effects of repeated fluoxetine on anxiety-related behaviours, central serotonergic systems, and the corticotropic axis axis in SHR and WKY rats. *Neuropharmacology*. 1999, 38(6):893-907.
- DWIVEDI Y. Brain-derived neurotrophic factor in suicide pathophysiology. In: Dwivedi Y, editor. *The Neurobiological Basis of Suicide*. *Frontiers in Neuroscience*. Boca Raton (FL). 2012, Chapter 8.
- EBINGER, G.; MICHOTTE, Y.; HERREGODTS, P. The significance of homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations in human lumbar cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry*. 1987, 48(6): 1725–1729.
- EL MANSARI, M. et al. Relevance of norepinephrine-dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2010, 16(3): 1–17.
- FÁBREGAS, J.M.; GONZÁLEZ, D.; FONDEVILA, S.; CUTCHET, M.; FERNÁNDEZ, X.; BARBOSA, P.C.; ALCÁZARCÓRCOLES, M.A.; BARBANO, M.J.; RIBA, J.; BOUSO, J.C. Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. *Drug Alcohol Depend*. 2010, 111(3): 257-61.
- FERNANDES, B.S.; GAMA, C.S.; CERESÉR, K.M.; YATHAM, L.N.; FRIES, G.R.; COLPO, G.; DE LUCENA, D.; KUNZ, M.; GOMES, F.A.; KAPCZINSKI, F.; Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: A systematic review and meta-regression analysis. *Journal of Psychiatric Research*. 2011, 45(8): 995–1004.
- FIDALGO, S.; IVANOV, D. K.; WOOD, S. H. Serotonin: From top to bottom. *Biogerontology*. 2013, 14(1): 21–45.

- FIGUEROA, A. R. M. Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca. Tese de Doutorado em Toxicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- FONSECA, B.M.; RODRIGUES, M.; CRISTÓVÃO, A.C.; GONÇALVES, D.; FORTUNA, A.; BERNARDINO, L.; FALCÃO, A.; ALVES G. Determination of catecholamines and endogenous related compounds in rat brain tissue exploring their native fluorescence and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2017, 1049–1050: 51–59.
- FORTUNATO, J.J.; RÉUS, G.Z.; KIRSCH, T.R.; STRINGARI, R.B.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; PINTO, J.P.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.; QUEVEDO, J. Acute harmine administration induces antidepressant-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2009, 33(8):1425-30.
- FORTUNATO, J.J.; RÉUS, G.Z.; KIRSCH, T.R.; STRINGARI, R.B.; FRIES, G.R.; KAPCZINSKI, F.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.; QUEVEDO, J. Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. *J. Neural Transm.* 2010, 117(10):1131-7.
- FORTUNATO, J.J.; RÉUS, G.Z.; KIRSCH, T.R.; STRINGARI, R.B.; FRIES, G.R.; KAPCZINSKI, F.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.; QUEVEDO, J. Effects of  $\beta$ -carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: Further evidence of antidepressant properties. *Brain Research Bulletin*. 2010, 81(4-5):491-6.
- FRECSKA E, BOKOR P, WINKELMAN M. The therapeutic potentials of ayahuasca: possible effects against various diseases of civilization. *Front Pharmacol*. 2016, 7:35.
- GABLE, R.S. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction*. 2007, 102(1): 24–34.
- GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*. 2003, 4:1002–1012.
- GAUJAC, A. Estudos sobre o psicoativo N, N -dimetiltryptamina ( DMT ) em *Mimosa tenuiflora* ( Willd .) Poiret e em bebidas consumidas em contexto religioso. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- GELENBERG A.J.; CHESEN C.L. How fast are antidepressants? *J. Clin. Psychiatry*. 2000, 61(10):712-21.
- GIBB, J. W. High-performance liquid chromatographic determination indoleamines , dopamine, and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. *Anal Biochem*. 1983, 128(2):275-80.
- GILMAN, G. A., RALL, T. W., NIES, A. S., TAYLOR, P. Goodman e Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica, 1991. Mc Graw Hill. Artmed.
- GLAVIN, G.B. Stress and brain noradrenaline: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1985, 9(2): 233–243.
- GOMES, K. S., NETO, E. F. D. C., MONTE, K. C. D. S., ACCO, B., NOGUEIRA, P. J. D. C., SOUZA, R. L. N. D. Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin*, 2009, 78(6):323-7.

- GONDA, X.; FOUNTOULAKIS, K.N.; KAPRINIS, G.; RIHMER, Z. Prediction and prevention of suicide in patients with unipolar depression and anxiety. *Annals of General Psychiatry*. 2007, 6: 23.
- GONUL, A.S.; KITIS, O.; EKER, M.C.; EKER, O.D.; OZAN, E.; COBURN, K. Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with hippocampus volumes in drug-free depressed patients. *World Journal of Biological Psychiatry*. 2011, 12(2): 110–118.
- GROB, C. S.; McKENNA, D.J.; CALLAWAY, J.C.; BRITO, G.S.; NEVES, E.S.; OBERLAENDER, G.; SAIDE, O.L.; LABIGALINI, E.; TACLA, C.; MIRANDA, C.T.; STRASSMAN, R.J.; BOONE, K.B. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 1996, 184(2): 86–94.
- HAENISCH, B.; BÖNISCH, H. Depression and antidepressants: Insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacology and Therapeutics*. 2011, 129(3): 352–368.
- HALBERSTADT, A.L.; GEYER, M. A. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indolamine hallucinogens. *Neuropharmacology*. 2011, 61(3): 364–381.
- HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*. 1934, 18(3), 385-403.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1984, 327(1): 1–5.
- HAUBRICH, D. R.; WANG, P. F. L. N,N-dimethyltryptamine lowers rat brain acetylcholine and dopamine. *Brain Research*. 1977, 131(1): 158–161.
- HEALTH CANADA, Letter of Exemption n. 17-106067-547, June 5th, 2017, Ottawa, Canada.
- HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. *Fundamentos em Hematologia - 6ª Ed.* 2013. Artmed.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1996, 54(1): 21–30.
- HRDINA, PAVEL D.; SINGHAL, RADHEY L.. *Neuroendocrine Regulation and Altered Behaviour*. *Revista, New York And London*, 390-396, 1981. Springer US.
- HUANG, F.; LI, J.; SHI, H.L.; WANG, T.T.; MUHTAR, W.; DU, M.; ZHANG, B.B.; WU, H.; YANG, L.; HU, Z.B.; WU, X.J. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC–MS/MS. *Journal of Neuroscience Methods*. 2014, 229:8-14.
- IURLO, M.; LEONE, M.G.; SCHILSTRÖM, B.; LINNÉR, L.; NOMIKOS, G.G.; HERTEL, P.; SILVESTRINI, B.; SVENSSON, T.H. Effects of harmine on dopamine output and metabolism in rat striatum: role of monoamine oxidase-A inhibition. *Psychopharmacology*. 2001, 159: 98–104.
- JEON, S.; KIM, Y.-K. Molecular Neurobiology and Promising New Treatment in Depression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17(3): 381.

- JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2003, 25(2): 46–51.
- JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT, J.; GISPEN, W.H. Novelty and grooming behavior in the rat. *Behavioral and Neural Biology*. 1979, 25(4): 563–572.
- JONES J.S.; STANLEY, B.; MANN, J.J.; FRANCES, A.J.; GUIDO, J.R.; TRASKMAN-BENDZ, L. CSF 5-HIAA and HVA concentrations in elderly depressed patients who attempted suicide. *Am J Psychiatry*. 1990, 147(9): 1225–1227.
- KAREGE, F.; PERRET, G.; BONDOLFI, G.; SCHWALD, M.; BERTSCHY, G.; AUBRY, JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Research*. 2002, 109(2):143-8.
- KAREGE F.; VAUDAN, G.; SCHWALD, M.; PERROUD, N.; LA HARPE, R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol*. 2005, 136(1-2):29-37.
- KATOH-SEMBA, R.; TAKEUCHI, I.K.; SEMBA, R.; KATO, K.. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *Journal of neurochemistry*. 1997, 69(1): 34–42.
- KATZ, R.J.; ROTH, K.A.; CARROLL, B.J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1981, 5(2):247-51.
- KIM, Y.K.; LEE, H.P.; WON, S.D.; PARK, E.Y.; LEE, H.Y.; LEE, B.H.; LEE, S.W.; YOON, D.; HAN, C.; KIM, D.J.; CHOI, S.H. Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2007, 31(1): 78–85.
- KING, D.; FINLAY, J. M. Loss of dopamine terminals in the medial prefrontal cortex increased the ratio of DOPAC to DA in tissue of the nucleus accumbens shell: Role of stress. *Brain Research*. 1997, 767(2): 192–200.
- KLEIN, A.B.; WILLIAMSON, R.; SANTINI, M.A.; CLEMMENSEN, C.; ETTRUP, A.; RIOS, M.; KNUDSEN, G.M.; AZNAR S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2010, 14(3), 347-353.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008, 455(7215):894-902.
- KURITA, M.; NISHINO, S.; NUMATA, Y.; OKUBO, Y.; SATO, T.. The noradrenaline metabolite MHPG is a candidate biomarker from the manic to the remission state in bipolar disorder I: A clinical naturalistic study. *PLoS ONE*. 2014, 9(6): 100634.
- LABATE, B. C.; FEENEY, K. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: Implications and challenges. *International Journal of Drug Policy*. 2012, 23(2): 154–161.
- LACERDA, R.B., SOUZA-FORMIGONI, M.L.O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties?. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2000, 67(2):225-32.
- LAKSHMANA, M. K.; RAJU, T. R. An isocratic assay for norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine using their native fluorescence by high-performance liquid

- chromatography with fluorescence detection in discrete brain areas of rat. *Analytical biochemistry*. 1997, 246(2): 166–170.
- LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; SETEM, J.; MORATO, S. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008, 41(2) 135-140.
- LEE, B.; KIM, Y. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investigation*. 2010, 7(4):231-235.
- LI, G.; JING, P.; LIU, Z.; LI, Z.; MA, H.; TU, W.; ZHANG, W.; ZHUO, C. Beneficial effect of fluoxetine treatment against psychological stress is mediated by increasing BDNF expression in selected brain areas. *Oncotarget*. 2017, 41(8): 69527–69537.
- LOGAN, A.C. Omega-3 fatty acids and major depression: A primer for the mental health professional. *Lipids in Health and Disease*. 2004, 3(1): 25.
- MACRAE, E. The ritual use of Ayahuasca by three Brazilian religions. *American Anthropologist*. 2004, 106: 624.
- MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2000, 20(24):9104-10.
- MANJI, H.K.; QUIROZ, J.A.; SPORN, J.; PAYNE, J.L.; DENICOFF, K. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult to treat depression. *Biol Psychiatry*. 2003, 53(8):707-42.
- MANJI, H.K.; DREVETS, W.P.; CHARMEY D.S. The cellular neurobiology of depression. *Nature Medicine*. 2001, 7(5):541-7.
- MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. 2002, 62(4): 609–614.
- MARTÍNEZ, M.A.; ARES, I.; RODRÍGUEZ, J.L.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.-R.; ANADÓN, A. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environmental Research*. 2018, 161: 212–219.
- MASSON, J.; SAGNÉ, C.; HAMON, M.; EL MESTIKAWY, S. Neurotransmitter transporters in the central nervous. *Pharmacological reviews*. 1999, 51(3): 439–459.
- MCKENNA, D. J.; CALLAWAY, J.C.; GROB, C.S. The scientific investigation of ayahuasca: a review of past and current research. *review literature and arts of the americas*. 1998, 1: 65–76.
- MCKENNA, D.J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics*. 2004, 102(2): 111–129.
- MCKENNA, D. J.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and  $\beta$ -carboline constituents of Ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984, 10(2): 195–223.
- MELO, R.V. Encantamento e disciplina na União do Vegetal. *Anuário Antropológico/2012-I*, 2013: 217-237.

- MELO JUNIOR, W. Estudo do perfil genotóxico, citotóxico, neurocomportamental e bioquímico da ayahuasca em ratos Wistar tratados com dose única. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014.
- MELO JUNIOR, W.; SOUZA FILHO, J.; GRISOLIA, C.G.; CALDAS, E.D.; PICTAYLOR, A. Genotoxic evaluations in Wistar rats of the hallucinogenic plant extract ayahuasca. *International Journal of Phytomedicine*. 2016, 8: 249-25.
- MEZADRI, T.J.; BATISTA, G.M.; PORTES, A.C.; MARINO-NETO, J.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. *Journal of Neuroscience Methods*. 2011, 195(2): 200–205.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1955, 48(4): 254–260.
- MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 1999, 21(1): 24–40.
- MORET, C.; BRILEY, M. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2011, 7(Suppl 1): 9–13.
- MOSER, V.C. Functional assays for neurotoxicity testing. *Toxicologic pathology*. 2011, 39(1):36-45.
- MOTTA, L.G.; MORAIS, J.A.; TAVARES, A.C.A.M.; VIANNA, L.M.S.; MORTARI, M.R.; AMORIM, R.F.B.; CARVALHO, R.R.; PAUMGARTEN, F.J.R.; PICTAYLOR, A.; CALDAS, E.D. Maternal and developmental toxicity of the hallucinogenic plant-based beverage ayahuasca in rats. *Reproductive Toxicology*. 2018, 77:143-153.
- MOURA, A.A.G. CARVALHO, E.F.; SILVA, N.J.C. Repercussão das doenças crônicas não-transmissíveis na concessão de benefícios pela previdência social. *Ciênc. Saúde coletiva*. 2007, 12(6): 1661-1672.
- MUSACCHIO, J.M. "Chapter 1: Enzymes involved in the biosynthesis and degradation of catecholamines". In Iverson L. *Biochemistry of Biogenic Amines*. Springer. 2013, pp. 1–35. ISBN [978-1-4684-3171-1](#)
- MUNEOKA, K.; KUWAGATA, M.; OGAWA, T.; SHIODA, S. Sex-specific effects of early neonatal progesterone treatment on dopamine and serotonin metabolism in rat striatum and frontal cortex. *Life Sciences*. 2010, 87 (23-26): 738–742.
- NADAL-VICENS, M.; CHYUNG, J. H.; TURNER, T. J. Farmacologia da neurotransmissão serotoninérgica e adrenérgica central. *In: Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia*. 2009, 186–202.
- NARANJO, P. El ayahuasca in la arqueología ecuatoriana. *America Indígena*. 1986, 46(1): 115-127.
- NAUDON, L.; JAY, T.M. Opposite behaviours in the forced swimming test are linked to differences in spatial working memory performances in the rat. *Neuroscience*. 2005, 130(2): 285–293.
- NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat

- hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996, 16(7): 2365–2372.
- U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, NIH Publication No. TR 16-3561. Depression. Overview, 2018.
- NUNES, M.A. Avaliação do papel do lítio, em microdoses, sobre o comportamento e estereologia cerebral de um modelo transgênico da doença de alzheimer (appswind), em camundongos. Tese de Doutorado em Medicina, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2014.
- NUNES, E.A.; HALLAK, J.E.C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. *Revista latinoamericana de psicopatologia fundamental*. 2014, 17(3): 528-543.
- OLIVEIRA, C.D.R.; MOREIRA, C.Q.; DE SÁ, L.R.M.; SPINOSA, H.S.; YONAMINE, M.. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in wistar rats. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*. 2010, 89(3): 207–212.
- OVERSTREET, D. H. Modeling Depression in Animal Models. *Psychiatric Disorders. Methods Mol Biol*. 2012, 829: 125-44.
- PACHER, P.; KECSKEMETI, V. Trends in the Development of New Antidepressants. Is there a Light at the End of the Tunnel? *National Institute of Health*. 2004, 6(9): 2166–2171.
- PALHANO-FONTES, F.; BARRETO, D.; ONIAS, H.; ANDRADE, K.C.; NOVAES, M.M.; PESSOA, J.A.; MOTA-ROLIM, A.S.; OSÓRIO, F.L.; SANCHES, R.; DOS SANTOS, R.G.; TÓFOLI, L.F.; DE OLIVEIRA, S.G.; YONAMINE, M.; RIBA, J.; SANTOS, F.R.; SILVA-JUNIOR, A.A.; ALCHIERI, J.C.; GALVÃO-COELHO, N.L.; LOBÃO-SOARES, B.; HALLAK, J.E.C.; ARCOVERDE, E.; MAIA-DE-OLIVEIRA, J.P.; ARAÚJO, D.B. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebocontrolled trial. *Psychol Med*. 2018: 1-9.
- PEAT, M.A; GIBB, J.W. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Indoleamines, Dopamine, and Norepinephrine in Rat Brain with Fluorometric Detection. *Analytical Biochemistry*. 1983, 128(2):275-80.
- PIC-TAYLOR, A.; DA MOTTA, L.G.; DE MORAIS, J.A.; MELO JUNIOR, W.; SANTOS, A.F.A.; CAMPOS, L.A.; MORTARI, M.R.; VON ZUBEN, M.V.; CALDAS, E.D. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behavioural Processes*. 2015, 118: 102–110.
- PINHEIRO, I.L.; DA SILVA, A.I.; REGINATO, A.; FILHO, R.C.S.; GALINDO, L.C.M.; MATOS, R.J.B.; JUNIOR, J.C.S.F.; DA SILVA, A.E.T.M.; FERREIRA, M.M.; DE CASTRO, R.M.; DE SOUZA, S.L. Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb inhibitory action of serotonin on food intake. *Behavioural Brain Research*. 2017, pii: S0166-4328(17)30268-1.
- PORSOLT, R.D.; ANTON, G. et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology*. 1978, 47(4):379-91.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*. 2003, 463(1–3): 3–33.

- QU, S. J., WANG, G. F., DUAN, W. H., YAU, S. Y., ZUO, J. P., TAN, C. H., ZHU, D. Tryptamine derivatives as novel non-nucleosidic inhibitors Bioorg Med Chem. 2011, 19(10):3120-7.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends in Pharmacological Sciences. 2008, 29(10): 493–498.
- RANG, H.P., RITTER, J.M., FLOWER, R., HENDERSON, G. "Chapter 14: Noradrenergic transmission". Rang & Dale's Pharmacology. Elsevier Health Sciences. 2014, pp. 177–196. ISBN 978-0-7020-5497-6
- REVIN, S. B.; JOHN, S. A. Simultaneous determination of two important dopamine metabolites at physiological pH by voltammetry. Analytical Methods. 2012, 4(2): 348–352.
- RIBA, J. Human Pharmacology of Ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2003, 306(1): 73–83.
- RIEDERER, P.; BIRKMAYER, W.; SEEMANN, D.; ST. WUKETICH. Brain-noradrenaline and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in Parkinson's syndrome. Journal of Neural Transmission. 1977, 41(4): 241–251.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.-J.; DALVI, A.; HOLMES A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1997, 30(3):289-304.
- ROMBALDI A. J.; SILVA, M. C.; KRATZ, F., AZEVEDO, M. R.; HALLAL P. C. Prevalência e fatores associados a sintomas depressivos em adultos do sul do Brasil: estudo transversal de base populacional. Rev. Bras. Epidemiol. 2010, 13(4): 620-9.
- RUHÉ, H. G.; MASON, N. S.; SCHENE, A. H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: A meta-analysis of monoamine depletion studies. Molecular Psychiatry. 2007, 12(4):331-59.
- SANCHES, R.F.; OSÓRIO, F.L.; DOS SANTOS, R.G.; MACEDO, L.R.H.; MAIA-DE-OLIVEIRA, J.P.; WICHERT-ANA, L.; DE ARAUJO, D.B.; RIBA, J.; CRIPPA, J.A.S.; HALLAK, J.E.C.. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression. Journal Clinical Psychopharmacology. 2016, 36(1): 77–81.
- SANTOS, A.C.; SANTOS, B.R.M.; AZEVEDO; PEREIRA, N.K.; IRULEGUI, R.S.C.; BARACHO, N.C.V. Efeitos cardiovasculares, renais e hepáticos produzidos pela administração crônica de ayahuasca em ratos hipertensos/cardiovascular, renal and hepatic effects produced by chronic administration of ayahuasca in hypertensive rats. Revista Ciências Em Saúde. 2013, 3(4): 21.
- SANTOS, A.F.A. Avaliação toxicológica da ayahuasca em ratos wistar: comportamento e toxicidade reprodutiva em machos. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2016, 112pp.
- SANTOS, A.F.A.; VIEIRA, A.L.S.; PIC-TAYLOR, A.; CALDAS, E.D. Reproductive effects of the psychoactive beverage ayahuasca in male Wistar rats after chronic exposure. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2017, 27(3): 353–360.
- SANTOS, A.M.S.; KELLY, J.P.; DOCKERY, P.; DOYLE, K.M. Effect of a binge-like dosing regimen of methamphetamine on dopamine levels and tyrosine hydroxylase



- expressing neurons in the rat brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018, 89: 303–309.
- SARUTA, J.; FUJINO, K.; TO, M.; TSUKINOKI, K.. Expression and Localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in human submandibular gland. *Acta Histochemica Et Cytochemica*. 2012, 45(4): 211–218.
- SCHENBERG, E.E.; ALEXANDRE, J.F.; FILEV, R.; CRAVO, A.M.; SATO, J.R.; MUTHUKUMARASWAMY, S.D.; YONAMINE, M.; WAGUESPACK, M.; LOMNICKA, I.; BARKER, A.S.; DA SILVEIRA, D.X. Acute biphasic effects of ayahuasca. *PloS one*. 2015, 10(9):e0137202.
- SCHERER, E. A. Estudo de neurotransmissores relacionados à depressão e psicose em amostras de cérebro humano de pacientes submetidos à cirurgia por epilepsia de lobo temporal. Ribeirão Preto, 2008.
- SEIBENHENER, M.L.; WOOTEN, M.C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J. Vis. Exp.* (96), e52434, 2015.
- SHIMIZU, E.; HASHIMOTO, K.; OKAMURA, N.; KOIKE, K.; KOMATSU, N.; KUMAKIRI, C.; NAKAZATO, M.; WATANABE, H.; SHINODA, N.; OKADA, S.; IYO, M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*. 2003, 54(1): 70–75.
- SLATTERY, D.A.; CRYAN, J.F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*. 2012, 7(6): 1009–1014.
- SMITH, R.L.; CANTON, H.; BARRETT, R.J.; SANDERS-BUSH, E. Agonist properties of N,N-Dimethyltryptamine at serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> Receptors. 1998, 61(3): 323–330.
- STAHL, S.M. *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific basis and practical applications*. Cambridge, NY: Cambridge University Press, 2008.
- STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2011, 13(4): 495–506.
- SUMAN, P.R.; ZERBINATTI N.; THEINDL, L.C.; DOMINGUES, K.; DE OLIVEIRA, L.C. Failure to detect the action of antidepressants in the forced swim test in Swiss mice. *Acta Neuropsychiatrica*. 2018 Jun; 30(3): 158-167. doi: 10.1017/neu.2017.33. Epub 2017 Dec 5.
- SUOMINEN, T.; UUTELA, P.; KETOLA, R.A.; BERGQUIST, J.; HILLERED, L.; FINEL, M.; ZHANG, H.; LAAKSO, A.; KOSTIAINEN, R. Determination of serotonin and dopamine metabolites in human brain microdialysis and cerebrospinal fluid samples by UPLC-MS/MS: Discovery of Intact Glucuronide and Sulfate Conjugates. *PLoS ONE*. 2013, 8(6): 2–10.
- SYED, F.; AWASTHI, K.K.; CHANDRAVANSI, L.P.; VERMA, R.; RAJAWAT, N.K.; KHANNA, V.K.; JOHN, P.J.; SONI, I. Bifenthrin-induced neurotoxicity in rats: Involvement of oxidative stress. *Toxicology Research*. 2018, 7(1): 48–58.
- TAIWO, A.E.; LEITE, F.B.; LUCENA, G.M.; BARROS, M.; SILVEIRA, D.; SILVA, M.V.; FERREIRA, V.M. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender. *Indian Journal of Pharmacology*. 2012, 44(2):189-92.

- THOMAS, G.; LUCAS, P.; CAPLER, N.R.; TUPPER KW.; MARTIN,G. Ayahuasca-assisted therapy for addiction: results from a preliminary observational study in Canada. *Current drug abuse reviews*. 2013, 1(6): 30-42.
- TUPPER, K.W. Entheogens and existential intelligence: The use of plant teachers as cognitive tools. *Canadian Journal of Education*. 2002, 27(4): 499–516.
- TUPPER, K.W. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? *International Journal of Drug Policy*. 2008, 19(4): 297–303.
- VAN ERP, A.M.M.; KRUK, M.R.; MEELIS, W.; WILLEKENS-BRAMER, D.C. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: Handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research*. 1994, 65(1): 47–55.
- VAN DER VEGT, B.J. Brain serotonin homeostasis and the control of aggression in rats Groningen. 2002, 162.
- VEDOVATO, K.; TREVIZAN, A.R.; ZUCOLOTO, C.N.; BERNARDI, M.D.L.; ZANONI, J.N.; MARTINS, J.V.C.P. O eixo intestino-cérebro e o papel da serotonina. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*. 2014, 18(1): 33-42.
- VOS, T.; HABY, M.M; BARENDREGT, J.J; KRUIJSHAAR, M.; CORRY, J.; ANDREWS, G.. The burden of major depression avoidable by longer-term treatment strategies. *Archives of General Psychiatry*. 2004, 61(11): 1097–1103.
- WHITE, K.J; WALLINE, C.C.; BARKER, E.L. Serotonin transporters: implications for antidepressant drug development. *AAAP Journal*. 2005, 7(2):E421-E433.
- WING, L.L.; TAPSON, G.S.; GEYER, M.A. 5HT-2 mediation of acute behavioral effects of hallucinogens in rats. *Psychopharmacology*. 1990, 100(3):417-25.
- WOLF, W. A.; YODIM, M. B. H.; KUHN, D. M. Does brain 5-HIAA indicate serotonin release or monoamine oxidase activity? *European Journal of Pharmacology*. 1985, 109(3): 381–387.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing depression in the WHO European Region. WHO, 1, 2016.
- WURTMAN, J.; WURTMAN, R.; BERRY, E.; GLEASON, R.; GOLDBERG, H.; MCDERMOTT, J.; KAHNE, M.; TSAY, R.. Dexfenfluramine, fluoxetine, and weight loss among female carbohydrate cravers. *Neuropsychopharmacology*. 1993, 9(3): 201–210.
- WYATT, R. J.; KAROUM, F.; CASANOVA, M. F. Decreased DOPAC in the anterior cingulate cortex of individuals with schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 1995, 38(1): 4–12.
- YU, H.; CHEN, Z.-Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011, 32(1):3-11.
- ZOHAR, A. H.; EILAT, T.; AMITAI, M.; TALER, M.; BARI, R.; CHEN, A.; APTER, A.; WEIZMAN, A.; FENNIG, S.. An exploratory study of adolescent response to fluoxetine using psychological and biological predictors. *PeerJ*. 2018, 6: 4240.

# ANEXO I - APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO ANIMAL



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 1º de agosto de 2016.

## DECLARAÇÃO

Declarámos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA AYAHUASCA NO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO USANDO MODELO ANIMAL", UnBDoC n.º 66693/2016, sob responsabilidade da Professora Eloisa Dutra Caldas foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Wistar (48 fêmeas e 48 machos). A presente aprovação é válida pelo período de 1º/01/2017 a 30/12/2019.



*ufpaua*

Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB



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