



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EVIDÊNCIAS DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO RÁPIDO DA AYAHUASCA EM UM
MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO MAIOR**

FRANCISCO CID COELHO PINTO

**FORTALEZA - CE
2021**

FRANCISCO CID COELHO PINTO

**EVIDÊNCIAS DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO RÁPIDO DA AYAHUASCA EM UM
MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO MAIOR**

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará.

Orientador: Dr David Freitas de Lucena.

FORTALEZA - CE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P728e Pinto, Francisco Cid Coelho Pinto.
EVIDÊNCIAS DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO RÁPIDO DA AYAHUASCA EM UM MODELO
ANIMAL DE DEPRESSÃO MAIOR / Francisco Cid Coelho Pinto Pinto. – 2021.
55 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza,
2021. Orientação: Prof. Dr. David Freitas de Lucena. .

1. Depressão Maior. 2. Ayahuasca. 3. Harmina. 4. Antidepressivo. 5. Banisteriopsis. I. Título.

Resumo

O transtorno depressivo maior (TDM) é caracterizado por alterações afetivas, cognitivas e psicomotoras, a OMS prevê que até 2030 o TDM apareça como principal causa de dias não trabalhados no mundo. Estima-se que 50 a 60% dos pacientes com depressão inicialmente tratados com um antidepressivo não irão apresentar melhora clínica significativa nas primeiras 8-12 semanas, e apenas 20 a 35% irão apresentar remissão completa, necessitando de uma nova alternativa para o tratamento. Em estudos clínicos e pré-clínicos da Ayahuasca está sendo bem promissor, atualmente empregado no Brasil em diversos contextos religiosos. Trata-se da união de 2 plantas; *P. viridis* que contém N,N-dimetiltriptamina (DMT) e a planta *B. caapi* que contém β -carbolinas potentes inibidores reversíveis da monoaminoxidase. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos comportamentais e bioquímico da Ayahuasca em camundongos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por corticosterona. A pesquisa foi conduzida na Universidade Federal do Ceará e o chá utilizado foi cedido pelo Centro Espírita Beneficente União do Vegetal. Foram utilizados camundongos machos e foram expostos ao modelo animal de depressão induzida por corticosterona (0,1ml/10g) administrado via subcutânea durante 21 dias, tratados com Ayahuasca nas doses de 26,4 ml/kg e 13,2 ml/kg por gavagem, após o tratamento os animais passaram pelos testes comportamentais, nado forçado, suspensão de calda, campo aberto e labirinto em Y análises histológicas e bioquímicas e os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 7.0. Após a administração crônica da corticosterona foi observado a diminuição do peso dos animais, diminuição da zona fasciculadas e do peso nas adrenais, diminuição do tempo de imobilidade nos testes de suspensão de calda e nado forçado, aumento no número de exploração vertical no teste de campo aberto, diminuição de alternâncias espontâneas no y-maze, aumento dos níveis de corticosterona em níveis plasmáticos, diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo. Após o tratamento agudo com a Ayahuasca na dose de 13,2 ml/kg e 26,4 ml/kg reverteu o tempo de mobilidade em ambos os testes, número de exploração vertical, os níveis plasmáticos de corticosterona, níveis de BDNF. No entanto, apenas na maior dose foi revertido o número de alternâncias espontâneas, após o tratamento com o controle positivo cetamina (10mg/kg) foi revertido o tempo de mobilidade em ambos os testes, os níveis plasmáticos de corticosterona. Concluímos neste estudo que a AYA em diferentes doses conseguiu reverter de forma aguda o fenótipo depressivo ocasionado pela administração prolongada de corticosterona.

Palavras-chave: Depressão Maior; Ayahuasca; Harmina; Antidepressivo; Banisteriopsis.

EVIDENCE OF AYAHUASCA'S FAST ANTIDEPRESSIVE EFFECT IN AN ANIMAL MODEL OF GREATER DEPRESSION

Abstract

Major depressive disorder (MDD) is altered by affective, cognitive and psychomotor changes, a WHO predicts that by 2030, MDD will appear as the main cause of unworked days in the world. It is estimated that 50 to 60% of patients with formulas eliminated with an antidepressant do not show clinical improvement in the first 8-12 weeks, and only 20 to 35% will show complete remission, requiring a new treatment alternative. In clinical and preclinical studies of Ayahuasca it is very promising, currently calculated in Brazil in different religious contexts. It is the union of 2 plants; *P. viridis* that contains N, N-dimethyltryptamine (DMT) and the *B. caapi* plant that contains potent β -carbolines reversible monoamine oxidase inhibitors. The aim of the study was to evaluate the behavioral and biochemical effects of Ayahuasca in mice. The research was conducted at the Federal University of Ceará and the tea used was provided by the Beneficent Spiritist Center União do Vegetal. Male mice were used and were exposed to the animal model of corticosterone-induced depression (0.1ml / 10g) administered subcutaneously for 21 days, treated with Ayahuasca at doses of 26.4 ml / kg and 13.2 ml / kg by gavage, after the treatment the animals passed the behavioral tests, forced swimming, suspension of syrup, open field and Y-maze analyzes histological and biochemical and the results were obtained using the software GraphPad Prism version 7.0. After the chronic administration of corticosterone, a reduction in the weight of the animals was observed, a decrease in the fasciculated zone and in the adrenal glands, a decrease in the immobility time in the suspension and forced swimming tests, an increase in the number of vertical exploration in the field test. open, decreased spontaneous alternations in the y-maze, increased levels of corticosterone in plasma levels, decreased levels of BDNF in the hippocampus. After acute treatment with Ayahuasca at a dose of 13.2 ml / kg and 26.4 ml / kg, the mobility time was reversed in both tests, number of vertical exploration, plasma levels of corticosterone, BDNF levels. However, only at the highest dose was the number of spontaneous alternations reversed, after treatment with the positive ketamine control (10mg / kg) the mobility time was reversed in both tests, the plasma levels of corticosterone. We concluded in this study that AYA in different doses managed to acutely reverse the depressive phenotype caused by the prolonged administration of corticosterone.

Key words: Depressive Disorder, Major; Ayahuasca; Harmine; Antidepressive Agents; Banisteriopsis

AGRADECIMENTOS

Sou grato primeiramente a Deus, criador de tudo, aos meus pais Francisco Fernando Brito Pinto e Evelyne Coelho Pinto, pois é por conta deles que estou aqui na Terra, a minha família, irmão e tias, minha noiva Iásly Costa Lima que está sempre ao meu lado,

Ao meu Orientador David Freitas de Lucena e minha co-orientadora Daniele Macêdo Gaspar, pois graças aos seus conselhos e dedicação esse trabalho foi realizado.

Aos membros do laboratório de Neuropsicofarmacologia pois sem o auxílio deles não teria realizado este trabalho sozinho.

Ao Centro Espírita Beneficente União do Vegetal – Núcleo Fortaleza, pelo apoio e disponibilização do chá e das amostras das plantas usadas na preparação do chá para serem identificadas e depositadas como exemplares no Herbarium da UFC

Ao professor Claudio e a Vilmara do laboratório de Química Medicinal da UFC, onde realizaram a liofilização do chá, a Gabriela de Oliveira Silveira e Mauricio Yonamine do departamento de análises clínicas e toxicológicas, faculdade de ciências farmacêuticas, universidade de São Paulo, São Paulo (Brasil), onde realizaram a caracterização do chá.

A CAPES e PROEX pelo fomento dos estudos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR	7
1.2 LACUNAS DO CONHECIMENTO E BAIXA RESPOSTA TERAPÊUTICA AOS FÁRMACOS	14
1.3 O CHÁ AYAHUASCA	15
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 GERAL	22
3.2 ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 MATERIAIS	23
4.2 MÉTODOS	26
4.2.5 Testes Comportamentais	29
4.2.5.1 Teste do nado forçado	29
4.2.5.2 Teste de suspensão de cauda	29
4.2.5.3 Teste do campo aberto.....	29
4.2.5.4 Teste labirinto em Y	30
5. RESULTADOS	33
5.1 NÃO HOUVE DIFERENÇAS SIGNIFICATIVA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ENTRE OS CHÁS	33
5.2 USO PROLONGADO DE CORTICOSTERONA ALTERA PESO DOS ANIMAIS E MORFOLOGIA DAS ADRENAIS.	33
5.3 O TRATAMENTO COM AYAHUASCA MODIFICA O COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS APÓS O USO	37
5.4 O TRATAMENTO COM AYAHUASCA REVERTE AS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DECORRENTE AO USO PROLONGADO DE CORT	40
6. DISCUSSÃO	42
6.1 TRABALHOS PUBLICADOS UTILIZANDO O CHÁ AYAHUASCA TEM OS MESMOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS	42
6.2 TRATAMENTO DA AYAHUASCA NA DEPRESSÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA.....	43
7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

1. Transtorno depressivo Maior (TDM);

O TDM é caracterizado por sentimentos de tristeza, autodepreciação, culpa, desesperança, ideias de suicídio, apatia, anedonia, angústia e alterações físicas como insônia, anorexia e fadiga, podendo o quadro variar de acordo com o paciente (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

A Organização Mundial de Saúde – OMS (2016), vem observando aumento ao longo das últimas décadas da incidência de casos de TDM, ocasionando grandes prejuízos sociais e econômicos. Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas, em todo o mundo tenham TDM, e que até o ano de 2030 esta patologia seja a principal causa de perda de produtividade entre pessoas até os 50 anos de idade. Este cenário é preocupante e vários países já adotam políticas de saúde onde o foco é prevenir ou identificar casos precocemente. (RIBEIRO; COUTINHO; NASCIMENTO, 2010; OMS, 2016).

Estima-se que 50 a 60% dos pacientes com depressão inicialmente tratados com um antidepressivo não irão apresentar melhora clínica significativa nas primeiras 8-12 semanas de tratamento, e apenas 20 a 35% irão apresentar remissão completa dos sintomas (FAVA; DAVIDSON, 1996; GAYNES *et al.*, 2005; GAYNES *et al.*, 2009).

O tratamento do TDM apresentou uma evolução na década de 1950 quando duas classes de fármacos foram descobertas ao acaso como antidepressivos efetivos: os agentes tricíclicos, como a imipramina, que originalmente surgiram a partir da pesquisa com anti-histamínicos, e os inibidores da enzima monoaminoxidase, como a iproniazida, que foi originalmente usada para tratar a tuberculose (NESTLER *et al.*, 2002). Desde então o conceito de fármaco antidepressivo mudou pouco, embora novos fármacos sucessivamente diminuíssem os efeitos colaterais dos pacientes. Porém, as taxas de resposta terapêutica não seguiram a mesma evolução, e na prática clínica por vezes observamos que fármacos mais antigos ainda são os indicados para tratar episódios graves e refratários. Este dado clínico demonstra o estado incongruente da psicofarmacologia (RUSH *et al.*, 2006). Em 2006, foi iniciado um grande estudo (STAR*D- The Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression Study), um ensaio clínico prospectivo com mais de 4.000 participantes, com o intuito de orientar o tratamento da depressão resistente, bem como sanar muitas das dúvidas acerca da evidência de resposta do tratamento com os

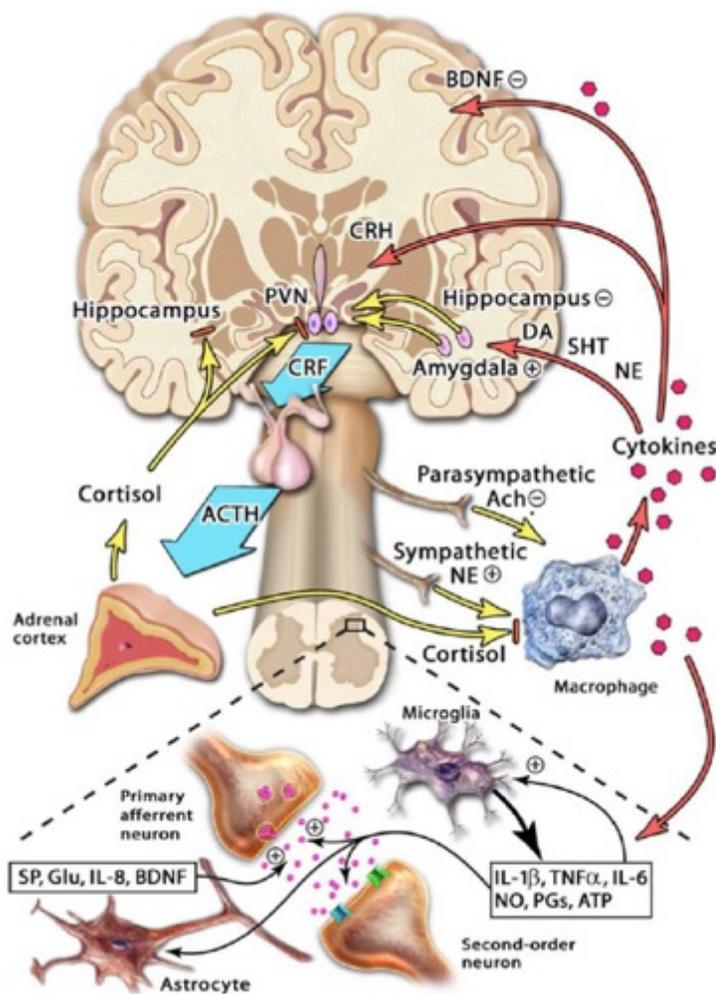
antidepressivos naqueles pacientes que não responderam ao primeiro ensaio clínico, avaliando estratégias de potencialização versus troca de medicação, custos de tratamento e efeitos colaterais, em um setting sem cegamento do paciente ou do médico assistente, o que aproxima o ensaio das condições reais de tratamento (GAYNES *et al.*, 2005; GAYNES *et al.*, 2009). Neste estudo, mesmo após 4 ensaios diferentes naqueles pacientes refratários, a taxa de remissão não ultrapassou os 70%, o que aponta a necessidade de novas estratégias de tratamento para o TDM (GAYNES *et al.*, 2008).

Por conta dessa grande quantidade de pacientes refratários ao tratamento disponível, bem como do tempo elevado de resposta destas drogas, é imperativo o desenvolvimento e descoberta de antidepressivos com mecanismos de ação diferentes dos atuais.

1.1 Mecanismos fisiopatológicos do TDM: inflamação, estresse oxidativo, neuroplasticidade e desequilíbrio do eixo hipocampo-hipófise-adrenal.

Embora o TDM venha sendo objeto de escrutínio científico recente, suas causas neurofisiológicas permanecem desconhecidas. No entanto, estudos indicam a existência de alterações anatômicas e fisiológicas, como alterações de citocinas inflamatórias e danos oxidativos em pacientes como representado na figura 1.

Figura 01 - Representação dos mecanismos fisiopatológicos da TDM



(MALETIC, RAISON, 2009)

Fig. 1. Transtornos do humor, podem ter consequências sistêmicas compartilhadas. A função homeostática comprometida do circuito cortical-límbico pré-frontal em MDD, FM e NeP parece interromper a regulação autonômica, neuroendócrina e neuroimune. Estresse, dor e depressão levam à liberação excessiva e prematura do hormônio liberador de corticotropina (CRH), hormônio adenocorticotrópico (ACTH) e glicocorticóides. A hiperatividade simpática, combinada com o tônus parassimpático diminuído, contribui para a ativação imune e liberação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF-alfa, IL-1, IL-6) de macrófagos e outras células imunes. As citocinas inflamatórias interferem ainda mais na sinalização monoaminérgica e neurotrófica. Eles também podem diminuir a sensibilidade do receptor de glicocorticoide central, levando a uma maior interrupção do controle de feedback do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema imunológico. Em estados de depressão e dor, distúrbios de transmissão de serotonina (5HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA) podem prejudicar os loops de feedback regulatório que desligam a resposta ao estresse, com um comprometimento resultante na função das vias modulatórias descendentes da dor. Os mediadores elevados da resposta inflamatória, combinados com o tônus simpático excessivo, podem impactar ainda mais o processamento da coluna dorsal dos sinais de dor, contribuindo para a ativação da microglia e da astroglia. Sinais de troca de microglia ativados com astrócitos e neurônios nociceptivos, amplificando a transmissão relacionada à dor de glutamato (Glu), substância P (SP), trifosfato de adenosina (ATP), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa, óxido de nitrogênio (NO) e prostaglandinas (PGs)). PVN = Núcleo paraventricular do hipotálamo; IL = interleucina; TNF-alfa = Fator de necrose tumoral-alfa; Ach = acetilcolina (MALETIC, RAISON, 2009).

1. Inflamação e TDM

Evidências apontam para a ativação microglial (BAUER *et al.*, 2007) e processos neuroinflamatórios (NINOMIYA-TSUJI *et al.*, 1999) relacionados à fisiopatologia do TDM devido ao fato deste transtorno ser progressivo e apresentar um componente neurodegenerativo em pacientes que não realizam tratamento. Estudos com modelos animais mostraram que ambos os processos estão associados ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, radicais livres como o óxido nítrico (NO) no cérebro, e podem ser acompanhados por uma super-regulação de marcadores da via de sinalização do ácido araquidônico no cérebro (RAO *et al.*, 2007). De fato foi encontrado aumento na expressão das enzimas envolvidas com o metabolismo do ácido araquidônico, incluindo a fosfolipase A2 citoplasmática (cPLA2), secretória (sPLA2), e cicloxigenase (COX)-2, no córtex frontal *post-mortem* de pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) quando comparado aos controles (RAO *et al.*, 2010, KIM *et al.*, 2011).

Uma revisão da literatura realizada por Goldstein *et al.* (2009) sugeriu que o TAB e o TDM têm a inflamação como ponto de ligação. Este ocorre pelo compartilhamento de polimorfismos genéticos e expressão genética. Esta interligação foi posteriormente evidenciada pela alteração dos níveis de citocinas no plasma de pacientes durante os intervalos sintomáticos (mania e depressão) e assintomáticos da doença. Certos componentes do processo inflamatório no TDM podem ser expressos de uma maneira estado-dependente. Por exemplo, na depressão grave psicótica a elevação dos níveis plasmáticos de IL-6 normaliza com a remissão clínica, enquanto o TNF- α parece não alterar na remissão (KIM *et al.*, 2007). No TDM responsivo a medicações, os níveis de TNF estão reduzidos durante o tratamento apenas no grupo respondedor (GULOXSUZ *et al.*, 2010). De modo geral estes dados evidenciam que alterações nos níveis de TNF- α no sistema nervoso central (SNC) estão associadas a sintomas de transtorno de humor em humanos.

2. Estresse Oxidativo e TDM

Estresse oxidativo (EO) é um estado celular no qual existe um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade celular de eliminá-las através de mecanismos antioxidantes. As EROs destroem ou alteram biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídios o que pode levar a morte celular (BIEWENGA *et al.* 1997). No TDM, pesquisadores

constatarem um aumento do EO a partir do aumento da peroxidação lipídica e da atividade da superóxido dismutase (SOD), bem como no dano ao DNA (KULOGLU *et al.*, 2002, FREY *et al.*, 2007). Adicionalmente, Kapczinski *et al.* (2008) associam o TAB e TDM a uma elevação patológica da carga alostática, termo que se refere à decorrência do esforço do organismo para adaptar seus parâmetros internos à diferentes situações em prol de manter sua função normal. No caso do TAB e TDM, os mesmos genes envolvidos neste transtorno estão vinculados a uma maior predisposição ao estresse, o que aumenta a carga alostática, causando comprometimento cognitivo e aumento das taxas de comorbidades físicas e psiquiátricas (KAPCZINSKI *et al.*, 2008b). Além do mais, estudos *post-mortem* têm demonstrado aumento do EO (GIGANTE *et al.* 2011) e diminuição das defesas antioxidantes (GAWRYLUK *et al.*, 2011) no córtex pré-frontal de pacientes com TAB e TDM, o que pode em ultimamente acarretar dano neuronal (GIGANTE *et al.*, 2011).

3. Neuroplasticidade e TDM

Plasticidade é a habilidade de sofrer modificações e mantê-las, sendo esta propriedade essencial para o funcionamento apropriado do sistema nervoso. Esta capacidade de sofrer modificações permite ao organismo se adaptar a alterações complexas do meio-ambiente interno e externo, uma propriedade extremamente importante para sobrevivência e reprodução. Todos os fenômenos comportamentais complexos – incluindo regulação do humor e emoção – são dinâmicos e se apoiam em circuitos de plasticidade neural (MCCLUNG AND NESTLER 2008; SCHLOESSER *et al.*, 2008).

Neuroplasticidade é o termo mais amplo que relaciona alterações em cascatas de sinalização intracelular e regulação genética, modificações do número e força das sinapses, variações na liberação de neurotransmissores, modelação na arquitetura axonal e dendrítica e, em algumas áreas do SNC, a geração de novos neurônios (NESTLER *et al.*, 2002; KRISHNAN; NESTLER, 2008; MCCLUNG AND NESTLER 2008). Recentemente, as pesquisas têm associado transtornos de humor com prejuízos estruturais e funcionais relacionados à neuroplasticidade em várias regiões do SNC. Além do mais, drogas psicotrópicas comumente usadas para o tratamento destas condições têm como alvo moléculas e cascatas de sinalização implicadas no controle da neuroplasticidade (SCHLOESSER *et al.*, 2008).

Uma das organelas intracelulares envolvida na neuroplasticidade é a mitocôndria. Esta organela tem um importante papel na regulação intracelular de cálcio e citoproteção. A captação do cálcio do citosol e sua liberação têm importantes consequências para a atividade neuronal e glial, modulando respostas intracelulares fisiológicas e fisiopatológicas (SIMPSON; RUSSELL, 1998) em uma variedade de circuitos neuroanatômicos e regiões que fazem mediação de comportamentos complexos, incluindo aquelas implicadas na fisiopatologia dos transtornos de humor.

Não existem até o momento evidências relacionando o TDM a uma desordem mitocondrial clássica, mas preferencialmente acredita-se que muitas anormalidades em mecanismos intracelulares (como o código genômico nuclear) convergem para a implicação da regulação mitocondrial no TDM relacionadas a: anormalidades da plasticidade sináptica induzida por neurotransmissores e resiliência celular a longo prazo (QUIROZ *et al.*, 2008). De fato, uma associação entre mutações/polimorfismos de DNA mitocondrial foi vista em pacientes com TDM e TAB. Alterações da função mitocondrial também foram reportadas em modelos animais de mania sendo prevenidas e revertidas por drogas estabilizantes do humor (VALVASSORI *et al.*, 2010). Também foi evidenciado um papel positivo do tratamento com fármacos antidepressivos clássicos e estabilizantes do humor, como o lítio, na função mitocondrial de pacientes com TDM (MAURER *et al.*, 2009).

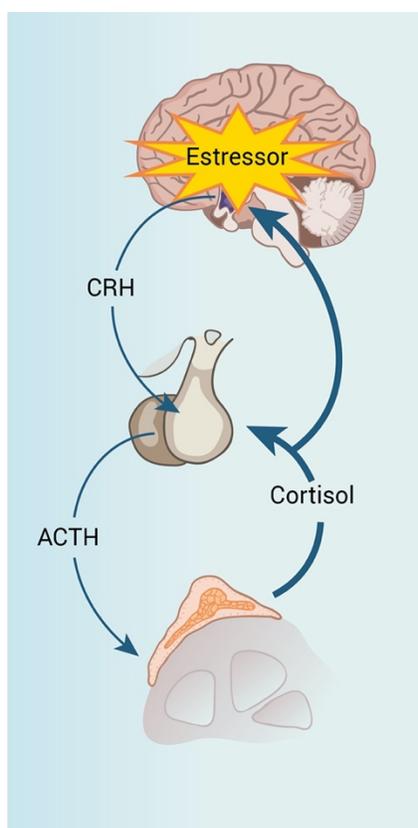
O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um membro da família dos fatores de crescimento denominada genericamente de “neurotrofinas”, cujos efeitos resultam da ativação do seu receptor cognato tirosina-quinase B (Trk B) (DUMAN, 2002). O BDNF tem influência marcante na eficácia sináptica, na conectividade neuronal e na neuroplasticidade (POST, 2007). Esta neurotrofina está expressa no córtex cerebral e no hipocampo, áreas cerebrais que regulam funções cerebrais complexas, como a memória declarativa e a emoção (GRANDE *et al.*, 2010). A expressão do BDNF é regulada por corticosteróides relacionados ao estresse e tal interação parece influenciar a vulnerabilidade à psicopatologia moderadas por estressores ambientais, dentre elas o TDM (MANJI *et al.*, 2003, KAUER-SANT'ANNA *ET AL.*, 2007). Os níveis de BDNF têm influência sobre o volume hipocampal (GRANDE *et al.*, 2010). Por exemplo, mulheres deprimidas com história de abuso sexual têm um volume hipocampal 18 % menor que mulheres que não sofreram abuso sexual (VYTHILINGAM *et al.*, 2002). Dessa forma, o BDNF pode mediar os

efeitos do estresse psicossocial no TDM e a disfunção cognitiva comumente relacionada a episódios afetivos repetidos (MURINOVÁ *et al.*, 2017).

1.1.4 Eixo hipocampo-hipofise-adrenal (HHA)

O eixo HHA é um sistema-chave de sinalização neuroendócrina envolvido na homeostase fisiológica em resposta ao estresse. Distúrbios desse sistema levam a desequilíbrios hormonais graves como representado na figura 2 (DU; PANG, 2015).

Figura 02 - Representação da alteração do eixo Hipocampo-Hipófise-Adrenal



(“Síndrome de Cushing | MedicinaNET”, 2018)

Fig. 2. A via biológica central envolvida na resposta ao estresse e o eixo Hipocampo Hipófise Adrenal, o estresse causa a liberação do CRH no hipotálamo, estimula liberação do ACTH pela hipófise, que estimula a produção do cortisol na suprarrenal. CRH: Fator de Liberação de Corticotropina, ACTH: Adrenocorticotrófico.

Neurônios presentes no núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o Fator de Liberação de Corticotropina (CRH), que estimula a síntese e liberação do Hormônio

Adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. O ACTH estimula a síntese e a liberação de glicocorticóides na região cortical da glândula suprarrenal (figura 2). A atividade do eixo HHA é controlada por diversas vias cerebrais, dentre elas o hipocampo, que tem efeito inibitório e a amígdala que possui efeito estimulatório. Acredita-se que níveis crônicos elevados de glicocorticóides podem levar à dano de neurônios hipocâmpais, mais especificamente na região CA3 (SCHMIDT *et al.*, 2004; MCEWEN, 2007).

Em estudos pré-clínicos a administração crônica de corticosterona em camundongos mostrou-se capaz de induzir comportamentos depressivo-símile, destacam-se aumento do tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão de cauda, bem como redução do consumo de sacarose, redução da interação social e prejuízo da memória de trabalho e alterações neuroquímicas como a redução dos níveis de BDNF no hipocampo (DE SOUSA *et al.*, 2018, 2015; SILVA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2008).

Estudos clínicos identificam pequenos aumentos nas concentrações séricas de glicocorticóides na depressão, despertando interesse significativo no papel de um eixo HHA disfuncional na fisiopatologia da depressão (GOURLEY *et al.*, 2008). O estresse físico ou psicológico aumenta as concentrações séricas de glicocorticóides, e alguns sintomas de depressão podem ser produzidos em roedores através da administração crônica de glicocorticóides (OLIVEIRA *et al.*, 2017; RAISON; MILLER, 2003).

A ativação de receptores de glicocorticóides, pelo excesso de glicocorticóides, pode reduzir as taxas de proliferação da zona sub-granular do hipocampo e ainda produzir alterações atróficas em sub-regiões do mesmo. Isso poderia contribuir para as reduções de volume do hipocampo visto na depressão (KAUFMAN *et al.*, 2000).

1.2. Lacunas no conhecimento e baixa resposta terapêutica aos fármacos

Apesar da neurobiologia dos transtornos do humor ter aumentando nos últimos anos como podemos evidenciar nas informações acima, isto não se refletiu no aparecimento de tratamentos mais eficazes para os pacientes portadores de TDM e depressão do TAB (OWENS 1994; DPHIL *et al.*, 2017). Os principais empecilhos enfrentados pelos clínicos são: a) Baixa resposta terapêutica mesmo após trocas sequenciais de 4-5 fármacos, b) demora para resposta antidepressiva após cada

troca, podendo chegar até 8 semanas, c) resposta terapêutica positiva, mas com permanência de alguns sintomas residuais.

Certamente isto ocorre pois os fármacos disponíveis não são capazes de tratar toda complexidade de sistemas alterados em cada grupo de pacientes. Se incluirmos que a TDM e o TAB apresentam fases de evolução, haverá necessidade de definir o melhor tratamento para cada momento (KRISHNADAS; CAVANAGH, 2012). Deste modo, o estudo dos componentes bioativos da Ayahuasca, pode nos fornecer novos insights para o desenvolvimento de fármacos e novas vias farmacodinâmicas. Ressaltamos, que o conhecimento molecular nesta área é praticamente nulo.

1.3 O chá Ayahuasca

A ayahuasca, também conhecida pelos nomes de caapi, daime, yajé, natema, vegetal e Ayahuasca, é uma bebida composta pela associação de duas plantas: o caule da *Banisteriopsis caapi* e as folhas da *Psychotria viridis* (SANTOS; MORAES; HOLANDA, 2006).

Mesmo que seu uso tenha origem indígena, a partir do fim do século XIX e início do século XX um grande número de trabalhadores, principalmente seringueiros, vindos de diversas regiões do Brasil, Peru e Colômbia entrou em contato com este psicoativo (MONTEIRO, 1983; COUTO, 1989). A partir deste encontro o chá Ayahuasca passou a ser utilizado em novos contextos caracterizados por influências culturais, como: catolicismo popular, espiritismo kardecista, magia/esoterismo europeus e cultos afro dando origem a novas e complexas maneiras de uso deste poderoso psicoativo (GOULART, 1996).

Originalmente, era utilizada por grupos indígenas associados ao xamanismo e por curandeiros que praticavam a medicina popular à base de extratos vegetais. A palavra ayahuasca é originária da língua quéchua e quer dizer: “aya”: “pessoa morta, espírito” e “waska” que significa “corda, liana, cipó”; logo, traduzindo-se para o português ficaria “corda dos mortos” (LUNA, 1986; TUPPER, 2002).

É atualmente empregado no Brasil em diversos contextos religiosos, em intensa atividade de expansão, seja daqueles grupos religiosos considerados pioneiros da religiosidade ayahuasqueira brasileira como a Barquinha, o Santo Daime e a União do Vegetal, ou de grupos dissidentes recriados (BARBIER, 2009; LABATE, 2004; LABATE; ARAÚJO, 2002; MACRAE, 1992).

O uso da Ayahuasca é difundido em vários países da América do Sul, tais como Peru, Bolívia, Colômbia, Brasil, Venezuela e Equador e nos últimos anos, grupos de seguidores dessas

religiões brasileiras têm se estabelecido nos Estados Unidos e em vários países europeus, incluindo a Alemanha, Inglaterra, França e Espanha (RIBA *et al.*, 2003; TUPPER, 2008). Embora tenha existido toda essa expansão no consumo, é apenas no Brasil que se desenvolveu o uso ritualístico em populações não-indígenas, centralizadas em rituais religiosos.

Desde o ano de 1985, o governo brasileiro tem se esforçado em regulamentar da melhor maneira o uso ritual do chá Ayahuasca. Como modo de garantir o direito de liberdade religiosa, estudos clínicos, antropológicos e psicológicos (com predominância dos estudos antropológicos, e menor inserção dos estudos psicológicos) tem sido realizados desde a década de 90 em busca de desvendar e caracterizar possíveis benefícios/malefícios do uso agudo ou prolongado dessa bebida nos âmbitos clínico, psicológico e sociocultural (MOURA; COSTA, 2012).

A regulamentação mais recente é exposta no Relatório Final do Grupo Multidisciplinar de Trabalho do Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas/CONAD, que regulamenta o uso deontológico da Ayahuasca e prevê além de outras coisas o uso restrito em rituais, com proibição da venda e comercialização, bem como da propaganda da bebida. A aprovação em 25/01/2010 do Relatório Final do CONAD estabeleceu a regulamentação e legitimação do uso religioso da Ayahuasca, um embate que perdurou desde 1985. O consumo ritualístico da Ayahuasca é legal no Brasil e em outros países, inclusive por crianças e mulheres grávidas (Resolução 05/04 CONAD) (BRASIL, 2010; SILVEIRA-FILHO, *et al*, 2006).

Figura 03 – Fotos das plantas utilizadas Mariri, Chacrona e preparação do chá





(“Mariri e chacrona | Blog UDV”, 2019)

1.3 Farmacodinâmica do Chá Ayahuasca

A planta *P. viridis* contém o agente psicoativo N,N-dimetiltriptamina (DMT), enquanto que a planta *B. caapi* contém β -carbolicinas tais como: harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetrahydro-harmina (THH), que são potentes inibidores da monoamina oxidase (IMAO). O DMT possui pouca atividade com o consumo oral, já que é inativada pelas monoamina oxidase (MAO) periféricas (presentes no fígado e no intestino delgado) (MCKENNA *et al.*, 1998). Entretanto, a inibição da MAO pelas β -carbolicinas gera uma atividade na ingestão do DMT, permitindo que este chegue ao Sistema Nervoso Central inalterado. A interação sinérgica destes alcalóides constitui a base da ação psicotrópica do chá Ayahuasca. No início se atribuiu seu efeito ao aumento dos níveis de noradrenalina, serotonina e de dopamina na fenda sináptica (BALDESSARINI, 1996; MCKENNA *et al.*, 1998; CALLAWAY *et al.*, 1999; CAZENAVE, 2000; LUNA, 2005). Além de inibir a MAO, a THH tem a capacidade de inibir a recaptção de serotonina (MORENO; MORENO; SOARES, 1999; SANTOS, 2006). No entanto, evidências científicas apontam que este mecanismo simplório é incapaz de explicar toda ação terapêutica do DMT e β -carbolicinas.

O conteúdo do alcalóide DMT pode variar de 0.1% a 0.66% do peso seco nas folhas de *P. viridis*. De forma surpreendente, o conteúdo de DMT em amostras de folhas de uma única planta *P. viridis* variou de 3 mg/g a 9.5 mg/g peso seco no curso de apenas um dia. As concentrações dos alcalóides β -carbolicinas na *B. caapi* variam de 0,05% a 1,95% peso seco (MCKENNA *et al.*, 1984; MCKENNA, 2004). A variação substancial nas proporções dos constituintes da Ayahuasca pode ser explicada como uma variação da composição química dos solos e luminosidade de onde estas

plantas são obtidas, bem como pelos diferentes métodos de preparação utilizados (GARRIDO; SABINO, 2009).

Após a administração oral do chá Ayahuasca, os efeitos somáticos (ex. náusea, formigamento, aumento da temperatura corporal) aparecem em aproximadamente 20 minutos, seguido dos efeitos cognitivos e psicotrópicos que atingem um máximo entre 60 e 120 minutos. Os efeitos cognitivos e somáticos diminuem gradualmente em aproximadamente 4 horas (GROB *et al.*, 1996; RIBA *et al.*, 2001; RIBA *et al.*, 2003).

A sequência geral das respostas psicológicas e cognitivas a Ayahuasca é dose-dependente e previsível. Entretanto, as reações de um indivíduo particular a uma determinada sessão não podem ser previstas. Com uma dose média de DMT, os objetos no ambiente parecem vibrar e aumentam em brilho. Padrões de movimentos e cenas rapidamente emergem e são visíveis com os olhos abertos ou fechados. Esta experiência é tida como sendo um “estado visionário”. Deve-se notar que estas alterações na percepção e na cognição, em geral, não impedem os usuários de se localizar no tempo e no espaço ou de falar de forma coerente (SCHVARTSMAN, 1992; CAZENAVE, 1996; CALLAWAY; GROB, 1998; RIBA *et al.*, 2001; RIBA *et al.*, 2003; SHANON, 2003; SANTOS, 2006).

O DMT parece se ajustar às características das chamadas drogas psicodélicas ou psicoativas, que, de acordo com Hollister compartilham as seguintes características em relação à farmacologia humana: 1) as modificações nos processos de pensamento, percepção e humor predominam sobre outras alterações; 2) a capacidade intelectual e a memória são minimamente afetadas; 3) estupor, narcose ou estimulação excessiva não são os efeitos predominantes; 4) os efeitos colaterais autonômicos são moderados; 5) a tendência à dependência é mínima ou não existe (GARRIDO; SABINO, 2009). Esta classificação do DMT também é confirmada por sua estrutura química e sua afinidade por receptores, já que de acordo com Glennon *et al.*, (2000) os alucinógenos clássicos são agentes que se enquadram: a) ligam-se a receptores serotoninérgicos 5-HT₂, e b) são reconhecidos por animais treinados que discriminam 1-(2,5-dimethoxy-4-metilfenil)-2-aminopropano (DOM) quando comparados com veículos, dois critérios adicionais nos quais o DMT se enquadra.

O DMT mostra similaridade estrutural marcante com a serotonina, a noradrenalina e a dopamina, os principais neurotransmissores aminérgicos endógenos, através dos anos, a interação com estes sistemas de neurotransmissor foi tida como sendo o mecanismo de ação deste fármaco

(RIBA *et al.*, 2003). Entretanto, enquanto há poucos dados que confirmem uma ação direta deste agente psicoativo na neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica, os dados bioquímicos e comportamentais sugerem os receptores serotoninérgicos como sendo os alvos clássicos desta molécula no organismo humano. Entre os receptores serotoninérgicos, o candidato mais provável de mediar os efeitos psicoativos deste medicamento é o 5-HT_{2a} (SANTOS, 2007).

Outros subtipos de receptores que também podem ser alvos incluem o 5-HT_{2C}, que mostra uma grande homologia com o receptor 5-HT_{2A}, e o 5-HT_{1A}. Os receptores 5-HT_{2A} mostram maior densidade no neocórtex, enquanto que os receptores 5-HT_{2C} predominam no plexo coróide e o subtipo 5-HT_{1A} é encontrado principalmente no hipocampo, amígdala, sistema límbico e principalmente no núcleo da rafe, onde age como auto receptor somatodendrítico (SANTOS, 2007).

As β -carbolinas, como a harmalina e a harmina, são compostos tricíclicos e são os alcalóides mais abundantes no chá Ayahuasca, representando a principal contribuição da *B. caapi* a este chá (BALDESSARINI, 1996). Apesar de a harmalina ter sido considerada a responsável pelas propriedades psicotrópicas da Ayahuasca (NARANJO, 1986), a capacidade das β -carbolinas de interagir com o receptor 5-HT_{2A} receptor e/ou sua habilidade de gerar efeitos análogos aos das triptaminas e feniletilaminas psicodélicas até hoje ainda não está bem estabelecida.

Os estudos de ligação a receptores e a discriminação farmacológica por drogas mostraram resultados inconsistentes, não permitindo gerar conclusões definitivas em relação à capacidade dessas drogas, que mostram afinidades variáveis pelo receptor 5-HT_{2A}, de promover efeitos similares aos dos psicodélicos clássicos. Esta questão se mantém controversa já que a farmacologia das β -carbolinas está pobremente caracterizada nos humanos (STRAUSS; JÚNIOR, 2005)

Já está bem estabelecido que as β -carbolinas no chá Ayahuasca são inibidores reversíveis e altamente seletivos da MAO. Este bloqueio da MAO presumivelmente permite o acúmulo de uma grande quantidade de serotonina nas terminações nervosas. O acúmulo excessivo pode raramente produzir uma variedade de efeitos fisiológicos adversos, conhecidos como “síndrome serotoninérgica”, que incluem tremor, diarreia, instabilidade do Sistema Nervoso Autônomo, hipertermia, sudorese, espasmos musculares e até a morte (MCKENNA *et al.*, 1998; CALLAWAY *et al.*, 1999; CAZENAVE, 2000; LUNA, 2005).

O uso terapêutico do chá Ayahuasca e sua segurança embasam-se principalmente no histórico de uso ancestral por tribos indígenas na cura de inúmeras doenças, incluindo doenças

parasitárias e gastrointestinais comuns nos trópicos (DESMARCHELIER *et al.*, 1996; POMILIO *et al.*, 1999).

Propriedades antioxidantes, antimutagênica, antitumorais, mas principalmente efeitos psicoterapêuticos que atenuam problemas relativos ao abuso de drogas, humor e ansiedade tem sido o foco de vários estudos (LABATE, 2006; STUCKEY; LAWSON; LUNA, 2005; SCHENBERG, 2013).

Nessa perspectiva, estudos mostraram que a administração da Ayahuasca liofilizada em doses terapêutica, uso crônico em doses mais alta que a utilizada em rituais religiosos é segura, (COLAÇO *et al.*, 2020; RIBA *et al.*, 2001), não produz dependência, ou mudanças crônicas no organismo. (SHANON, 2003; LUNA, 1986; MCKENNA, 2004; GROB *et al.*, 1996). Dados do Projeto Ayahuasca (Hoasca Project) mostram a inexistência de distúrbios psiquiátricos entre os afiliados da União do Vegetal, maior capacidade de concentração em processos diários e melhor resposta de memória auditiva quando comparados ao controle (GROB *et al.*, 1996; CALLAWAY *et al.*, 1999; CALLAWAY, 2004; GROB *et al.*, 2004; MCKENNA, 2004). Outros estudos indicam o potencial uso da Ayahuasca no tratamento do alcoolismo e com relação a comportamento violento e suicida (MCKENNA, 2004; GROB *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2006). Consumidores de Ayahuasca abandonaram a nicotina, cocaína e anfetamina quando adeptos do uso do Chá regularmente (MCKENNA, 2004). Também foi demonstrado que a utilização frequente de Ayahuasca não está associada com problemas psíquicos que as drogas de abuso provocam (FÁBREGAS *et al.*, 2010).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A Food and Drug Administration em 2009 recomendou que a indústria farmacêutica não apresentasse outros fármacos baseados nos princípios de recaptação de monoaminas, considerando a existência de dezenas destes no mercado e sua equidade de resposta terapêutica parcial (OWENS 1994; DATA-FRANCO *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2017). Em 2012 um novo entendimento sobre a psicofarmacologia do TDM foi descoberto com a publicação de um estudo mostrando efeito anti-depressivo imediato e sustentado após única administração endovenosa de cetamina durante 50 minutos em dosagens sub anestésicas. Este achado contrariou a ideia fundamental de como um anti-depressivo deveria funcionar no tratamento do TDM. Como efeito colateral este procedimento apresentava visões e estados dissociativos que incomodavam os pacientes. (RACAGNI AND POPOLI, 2010; SALVADORE AND SINGH, 2013; LUCKI; BROWNE, 2013). Em novembro de 2020 a Anvisa liberou o cloridrato de escetamina (análogo da cetamina), um antidepressivo na forma de spray inalável, esta via de investigação para anti-depressivos rápidos e com efeito sustentado passou a ser melhor considerada. Seguindo este entendimento, uma série de estudos vêm analisando o potencial farmacológico da Ayahuasca DMT/B-carbolinas e outras moléculas análogas no tratamento do TDM.

Um ensaio clínico foi publicado por um grupo brasileiro com resultados promissores, mostrando resposta farmacologia do chá Ayahuasca em pacientes com depressão resistente, e de forma análoga ao estudo da cetamina, os pacientes apresentaram uma resposta rápida e que durou por 14 dias.

Por ser uma substância que já tem seu uso disseminado na sociedade, com estudos mostrando ser seguro a saúde até em doses acima da utilizada em rituais, tendo apenas efeitos somáticos e cognitivos como adversos, mostra ser uma substância de grande potencial para tratar a TDM.

Apesar da esperança destes novos achados, não há no momento dados para explicar o mecanismo desta ação antidepressiva rápida, nem os possíveis desdobramentos crônicos desta nova abordagem. Este estudo se propõe a acrescentar uma contribuição nesta lacuna de informações, de forma que esta nova via terapêutica seja melhor explorada e aproveitada.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos do chá Ayahuasca em camundongos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por corticosterona

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da Ayahuasca como antidepressivo rápido nas alterações comportamentais e ponderais induzidas pelo modelo de estresse induzido por corticosterona em camundongos;
- Determinar a expressão da neurotrofina BDNF no hipocampo dos animais submetidos ao modelo de estresse induzido pela corticosterona e tratados com o Ayahuasca
- Avaliar as alterações na morfologia e peso das adrenais nos camundongos submetidos ao modelo de estresse induzido pela corticosterona e tratados com a Ayahuasca.
- Dosar os níveis de corticosterona no sangue dos animais submetidos ao modelo de estresse induzido por corticosterona e tratados com a Ayahuasca.
- Caracterização química do chá Ayahuasca

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Foram utilizados 112 camundongos *Swiss* adultos machos pesando 25 a 30 gramas oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram recebidos e ambientados por uma semana. Sempre mantidos a uma temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), com ciclos claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00 da manhã) e com alimento e água *ad libitum*, exceto durante os experimentos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA-UFC) sob número 3065091118 e os experimentos seguiram os requisitos legais e éticos fornecidos pelo Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (NIH, 1996) bem como de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA

4.1.2 DROGAS

4.1.2.1 Corticosterona

A corticosterona foi adquirida por meio da empresa SigmaAldrich, e dissolvida em solução salina, contendo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,1% de Tween 80 administrado via subcutânea por 21 dias na dose de 20mg/kg.

4.1.2.2 Cetamina

Foi utilizado cloridrato de cetamina 10 mg/kg (Syntec) diluída em soro fisiológico 0,9% em um volume de 0,1ml/10g de peso de animal administrado via intraperitoneal. (SILVA et al., 2013; ZHAO et al., 2008; MEDEIROS 2019).

4.1.2.3 O chá Ayahuasca (AYA)

O chá Ayahuasca utilizado neste estudo foi cedido pelo Centro Espírita Beneficente União do Vegetal. O chá foi preparado a partir da cocção do cipó mariri (*Banisteriopsis caapi*) e da folha do arbusto chacrona (*Psychotriavidis*). Amostras das plantas usadas na preparação do chá foram identificadas e depositadas como no Herbário Prisco Bezerra da UFC na página EAC 63872.

O chá foi preparado na coordenação do Mestre do Núcleo, seguindo o ritual de feitiço estabelecido, com participação dos outros membros do grupo. O material foi colocado em grandes panelas, dispostos em camadas alternadas de cipó e chacrona e recoberto por água. O material foi fervido por um período de 5 horas até atingir uma coloração marrom, coado em peneira e armazenado em recipientes esterilizados de vidro.

Após esse processo o chá foi liofilizado, seguindo uma metodologia já existente e aplicado em estudos prévios (Melo Junior *et al.*, 2016; Motta *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017 e PIC-TAYLOR *et al.*, 2015). O material liofilizado foi pesado ressuspensão em água filtrada e administrado por gavagem aos camundongos na dose de 26,4 ml/kg referente a quantidade utilizada no ritual religioso (150 ml por 70 kg) e 13,2 ml/kg referente a 75 ml por 70 kg (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015).

4.1.4.1 Caracterização Química

A caracterização foi realizada em 5 chás preparados em diferentes datas, no departamento de análises clínicas e toxicológicas, da faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo (Brasil).

Determinação dos alcaloides da *ayahuasca* em amostras de chá

O preparo da amostra consistiu em diluir a amostra de chá para uma proporção final de 1:7500 através de diluição seriada em três etapas (1:10 x 1:10 x 1:75). Primeiro diluiu-se 100 µL da alíquota de chá em 1000 µL de fase móvel A (tampão formiato de amônio com 0,1% ácido

fórmico). Desta, foram retirados mais 100 μL e diluídos com 1000 μL de fase móvel A e, finalmente, 100 μL da última foi diluído em 7500 μL da solução de fase móvel A. A cada etapa de diluição a solução era submetida a agitação em vórtex para melhor homogeneização. Em 100 μL da solução final adicionaram-se 10 μL do padrão interno (DMT-*d*₆ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para concentração final de 100 ng/mL. Por fim, 5 μL desta solução foram injetados no sistema de cromatografia líquida de ultra desempenho usando extração em fase sólida em espectrometria de massa (UPLC-ESI-MS/MS).

Após quantificação, o valor obtido com a equação da reta foi multiplicado por 5000 para correção da diluição.

Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS/MS)

As análises são realizadas em modo positivo (ESI+, $[\text{M}+\text{H}]^+$) para todos os analitos. São utilizados os seguintes os parâmetros otimizados: fluxo do gás do cone, 2 L/min; fluxo do gás de dessolvatação, 10 L/min; temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de dessolvatação, 350 °C. O seguinte sistema cromatográfico foi utilizado: Coluna Acquity UPLC BEH C18 2,1 mm x 100 mm, ID 1,7 μm (Waters Corporation, Milford, MA) eluída com um gradiente de tampão formiato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico (Solução A) e metanol 0,1% ácido fórmico (Solução B), a um fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, 40 °C, nas seguintes condições: 10%B de 0 a 0,5 min; 10 a 50%B de 0,5 a 7,0 min; de 7,0 a 7,1 50 a 10%B e mantém-se a 10%B até 8 minutos. As fragmentações utilizadas no MRM e os tempos de retenção de cada analito são descritas na **Tabela 2**.

Tabela 1. Descrição dos íons precursores, íons produto, tempo de retenção, voltagem do cone e energia de colisão no método por UPLC-ESI-MS/MS.

Analito	Tempo de Retenção (min.)	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íon produto (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone	Energia de colisão
DMT-d6 (PI)	2,87	195,1	63,9	15	14
		195,1	114,9	15	36
		195,1	143,8*	15	22
DMT	2,88	188,9	57,8	25	11
		188,9	116,7	25	29
		188,9	143,8*	25	17
THH	4,37	217,1	172,8	25	29
		217,1	187,9	25	17
		217,1	200,0*	25	13
HRL	5,27	215,2	130,4	50	41
		215,2	171,7	50	33
		215,2	199,9*	50	25
HRM	5,56	213,2	143,8	50	41
		213,2	169,8	50	33
		213,2	198,0*	50	25

* Transição utilizada para quantificação dos analitos. PI - padrão interno. *m/z* - razão massa/carga.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Modelo animal de estresse induzida por corticosterona

Os animais receberam corticosterona (corticosterona, 21 acetato, Sigma-Aldrich, U.S.A) durante 21 dias consecutivos, entre 09:00 e 11:30h, na dose de 20mg/kg por via subcutânea (s.c).

A corticosterona (CORT) foi suspensa em solução salina, contendo 0,1% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 0,1% Tween-80 e administrada em volume de 0,1ml/10g de peso de animal (SILVA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2008; MEDEIROS 2019).

4.2.2 Desenho Experimental

O protocolo experimental do modelo de estresse induzido por administração de corticosterona, foi baseado em um estudo anteriormente publicado que simula a etiologia da depressão em humanos baseado na hipersecreção de corticosterona e desregulação do eixo HHA (SILVA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2008, MEDEIROS 2019).

Nesse sentido, o estudo investigou inicialmente, os efeitos da administração da Ayahuasca no modelo de estresse induzido pela administração de CORT por meio de testes para avaliar diferentes fenótipos de comportamento-tipo depressivo. Para tanto, os 112 animais foram randomicamente distribuídos em 8 grupos experimentais, como segue na Tabela 1. Brevemente, os animais foram tratados durante 21 dias com corticosterona ou veículo (grupo controle), no 14º foi realizada uma sensibilização com o AYA (a mesma dose utilizada no dia do tratamento) ou veículo (grupo controle) por via oral (VO) e no 21º dia receberam a administração da Ayahuasca, cetamina ou veículo. Como controle positivo, grupos adicionais de animais receberam uma injeção intraperitoneal de cetamina diluída em salina na dose de 10 mg/kg de peso animal (figura 1). Devido os tratamentos estudados possuírem diferentes vias de administração e visando controlar o estresse induzido típico de cada via de administração, todos os grupos, experimentais e controles, serão submetidos à administração oral (Ayahuasca ou veículo), seguida por injeção intraperitoneal (cetamina ou veículo). O comportamento dos animais foi analisado 3 horas após a última administração das drogas por dois avaliadores treinados e cegados da distribuição dos grupos. Seguindo as determinações comportamentais, os camundongos foram rapidamente eutanasiados por decapitação em guilhotina e o cérebro, sangue e as adrenais foram coletados rapidamente armazenados em condições adequadas para as análises moleculares (figura 4) (OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2015).

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais e controles envolvidos no delineamento experimental do estudo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Controle	Exposto a Corticosterona
Controle	Controle
AYA (26,4 ml/kg)	AYA (26,4 ml/kg)
AYA (13,2 ml/kg)	AYA (13,2 ml/kg)
Cetamina (10 mg/kg)	Cetamina (10 mg/kg)

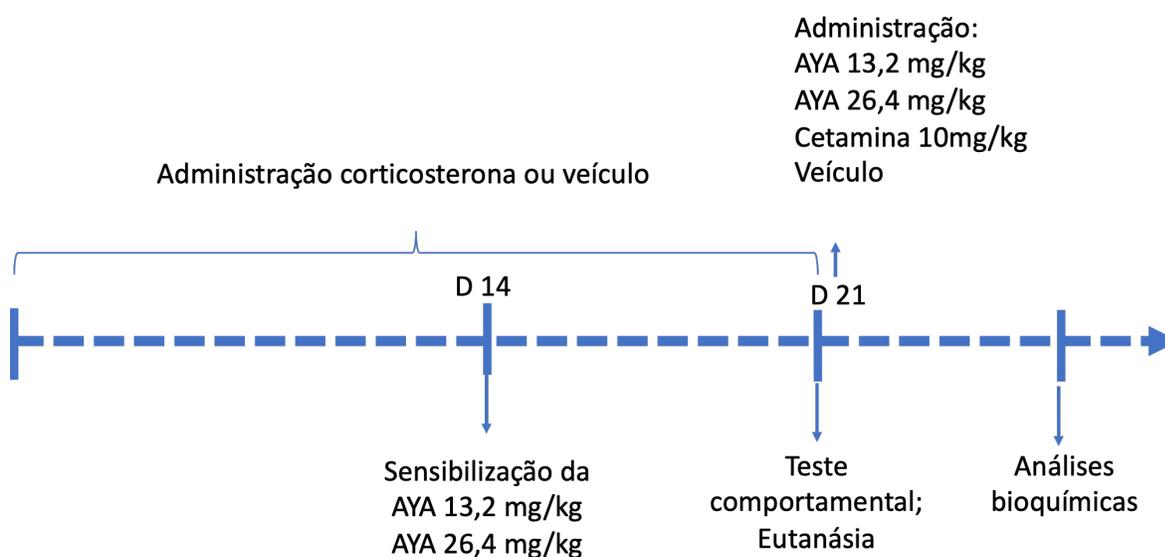


Figura 4. Delineamento experimental do estudo. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Pesagem

4.2.4.1 Pesagem dos Animais

Os animais foram pesados nos dias 1,7,14 e 21, em uma balança de precisão (Bel 0,01g, 2200g S2202H) devidamente calibrada. Foi realizado a diferença do peso dos animais do dia 01 e do dia 21.

4.2.4.2 Pesagem das Adrenais

As adrenais foram tiradas após a eutanásia dos animais, foi padronizada a retirada da adrenal direta para ser pesada, elas foram retiradas armazenadas em microtubos e pesada por uma balança de precisão (Bel 0,01g, 2200g S2202H) devidamente calibrada. Após a obtenção do peso das adrenais foi realizado a razão do peso do animal do dia da eutanásia, peso da adrenal / peso do animal X 100. Resultado foi expresso em porcentagem.

4.2.5 Testes Comportamentais

4.2.5.1 Teste do Nado Forçado

Após os protocolos experimentais, os animais foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico (40 cm de altura, 18 cm de diâmetro) contendo 16 cm de água mantida a 22-24 ° C. Após 1 minuto de habituação, o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais foi avaliado durante 5 minutos, em um tempo total de 6 minutos no interior do cilindro. Imobilidade foi definida como a ausência de ação, fuga orientada e comportamentos tais como: natação, salto, cheiro ou mergulho (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

4.2.5.2 Teste de Suspensão de cauda

O teste de suspensão da cauda (STERU *et al.*, 1985) é um outro método utilizado para avaliar o potencial antidepressivo de drogas. Nesse teste, cada camundongo foi suspenso pela cauda à beira de uma prateleira e colocado a 58 cm acima do topo da mesa. O camundongo foi fixado no seu lugar por meio de uma fita adesiva, colocada cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda. O tempo durante o qual os animais permaneceram imóveis, ao longo de um período de seis minutos, foi registrado. Cada animal foi submetido a este teste apenas uma vez (STERU *et al.*, 1985).

4.2.5.3 Teste do Campo Aberto

Com a finalidade de analisar os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora, os animais foram avaliados no teste do campo aberto. A arena para o teste é feita de acrílico (40 x 60 x 50 cm) com o chão dividido em nove quadrados iguais. A atividade exploratória do animal foi registrada durante 5 minutos (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados serão: o número de quadrados atravessados pelo animal, tempo no quadrado central, número de *groomings* (comportamento estereotipado) e *rearings* (atividade exploratória vertical) sem encostar nas paredes da arena de acrílico. Os experimentos serão realizados em uma sala de som atenuada, sob baixa intensidade de luz.

4.2.5.4 Avaliação da memória de trabalho - Teste Labirinto em Y (Y-maze)

Neste teste, avalia-se a memória operacional ou de trabalho (curto-prazo) visuoespacial, que tem como principal área envolvida, o córtex pré-frontal (SARTER; STEPHENS, 1988). O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento. Neste teste, o animal foi colocado em um dos braços e foi feita a contagem das alterações espontâneas as entradas nos outros braços durante 8 (oito) minutos. Os animais controles apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes sem repetição.

Todas as entradas em cada braço foram sequencialmente anotadas, havendo, assim, o registro do número total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas. As informações foram analisadas para determinar o número de entradas do braço sem repetição. Os dados foram expressos como a porcentagem de alternância nos braços sem repetição.

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem lembrar em qual braço eles entraram por último (LALONDE, 2002). O resultado é expresso em porcentagem.

4.2.6 Análises Bioquímicas

4.2.6.1 Dosagem de Corticosterona no Sangue

A determinação da corticosterona foi baseado na performance do método de fluorescência previamente descrito por (Mattingly 1962; Butte et al. 1978). Previamente, o sangue fresco foi

centrifugado (1700 xg, 10 min, 4°C) para separar o soro. Os corticosteroides livres de soro foram extraídos através da reação de diclorometano com uma rotação suave (33 rpm, 20 minutos, 4°C). A fase orgânica foi coletada e incubado com o reagente de fluorescência (7 volumes de ácido sulfúrico para 3 volumes de álcool etílico purificado) por 13 minutos, protegido da luz e mantendo a 4 °C. A fluorescência foi mensurada no Cytation™ 3 Plate Reader (Biotek, USA) utilizando o comprimento de onda de 470 µm para excitação e 540 µm para emissão. A corticosterona foi expressada em µg /ml de soro utilizando uma curva de corticosterona padrão, variando de 100 a 0.5 µg de corticosterona/ml de plasma.

4.2.6.2 Determinação dos níveis de BDNF

A determinação dos níveis de BDNF nas amostras de tecido cerebral foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (R&D Duoset-Humano). Alíquotas de 100µL das amostras foram incubadas com 100µL de anticorpos de detecção à temperatura ambiente por 2 horas em placas Nunc de 96 poços. Em seguida as placas foram lavadas 4x e subsequentemente adicionado 100 µL do conjugado Avidin-HRP por 30 minutos. Novamente as placas foram lavadas 4x e foi adicionado 100µL da solução substrato a cada poço. Deixamos a incubação em temperatura ambiente por 40 minutos para desenvolver a coloração. A leitura foi realizada em um leitor de placas a 405 nm e os resultados expressos em pg/ml de sobrenadante ou pg/g de tecido.

4.2.7 Análise histológica

4.2.7.1. Análise histológica de adrenais

As glândulas adrenais foram fixadas em formol a 10% por 24 horas. Em seguida, foram colocados em álcool a 70% por mais 24 h e processados para inclusão em parafina. Foram realizados corte seriados de 4 µm de espessura. Os cortes das glândulas adrenais foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histológica qualitativa e quantitativa.

As lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio (Leica DM 2000), com aumento de 400x (as tomadas das fotomicrografias foram com a objetiva de 40x) as fotos sempre foram em um dos polos mais homogêneo da glândula. Nas glândulas adrenais, foi realizada a

porcentagem da zona fasciculada em relação ao córtex da adrenal valores dados em porcentagem,

Formula: $\frac{\text{Área da zona fasciculada}}{\text{Área do córtex da adrenal}} \times 100$. A quantificação das áreas foi obtida através do software

Image J.

4.2.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio do teste ANOVA de duas vias, seguidos pelo teste de Bonferroni para os dados paramétricos e teste de Fisher LSD para os dados não-paramétricos. O software utilizado será o GraphPadPrism 7.0, San Francisco, USA. O critério de significância foi $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Não houve diferenças significativa na composição química entre os chás.

A caracterização química foi realizada em 5 amostras diferentes de chá. Estes foram preparados por Mestres e em datas diferentes, árvores da mesma espécie e plantadas no mesmo local, preparados da mesma forma. Foi observado que não houve diferença significativa ($P > 0,99$) quanto a composição entre os chás, mostrando um padrão químico do chá (Tabela 3).

Tabela 3 – Descrição da quantificação de alcalóides através do HPLC resultado expresso em mg/ml referente a 1 ml (HRL= Harmalina, HRM= Harmina, THH= Tetrahydroarmina, DMT= Dimetilriptamina).

Chá	Harmalina (HRL)	Harmina (HRM)	Tetrahydroarmina (THH)	Dimetilriptamina (DMT)
Utilizado	0,15 mg/mL	3,11 mg/mL	1,78 mg/mL	0,31 mg/mL
Controle 01	0,13 mg/mL	2,02 mg/mL	2,62 mg/mL	0,49 mg/mL
Controle 02	0,19 mg/mL	1,83 mg/mL	2,93 mg/mL	0,46 mg/mL
Controle 03	0,14 mg/mL	2,05 mg/mL	2,6 mg/mL	0,51 mg/mL
Controle 04	0,12 mg/mL	1,96 mg/mL	1,82 mg/mL	0,31 mg/mL

5.2 Uso prolongado de corticosterona altera peso dos animais e morfologia das adrenais.

Após a administração subcutânea diária durante 21 dias de corticosterona houve uma redução de peso nos animais tratados com CORT em relação aos animais controle ($P < 0,01$). Além disso foi possível observar uma redução de peso nos grupos tratados após a administração de CORT (CORT + CET, CORT + AYA 13,2 mg, CORT + AYA 26,4 mg) em relação aos grupos que não receberam CORT (SAL + CET, SAL + AYA 13,2 mg, SAL + AYA 26,4 mg), respectivamente: CET e AYA 13,2 mg $P < 0,0001$; AYA 26,4 mg $P < 0,01$ (Fig. 3)

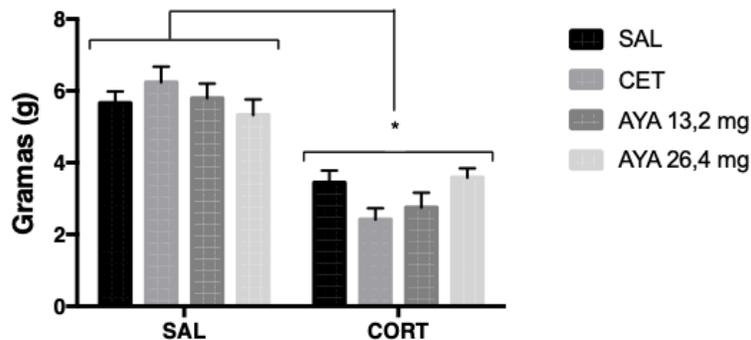


Fig. 3. Efeito da AYA sobre o peso corporal dos animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M (n=9 a 12 animais/grupo). $^*P < 0,05$ quando comparado com os grupos controles. A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

As adrenais foram pesadas após a eutanásia, sendo observado uma diminuição no peso das adrenais nos grupos tratados com CORT em relação aos animais controle ($P < 0,001$). Ademais foi possível observar uma redução de peso das adrenais nos grupos tratados com AYA e CET após a administração de CORT (CORT + CET, CORT + AYA 13,2 mg, CORT + AYA 26,4 mg) em relação aos grupos que não receberam CORT (SAL + CET, SAL + AYA 13,2 mg, SAL + AYA 26,4 mg), respectivamente: CET e AYA 13,2 mg $P < 0,01$; AYA 26,4 mg $P < 0,001$ (Fig.4).

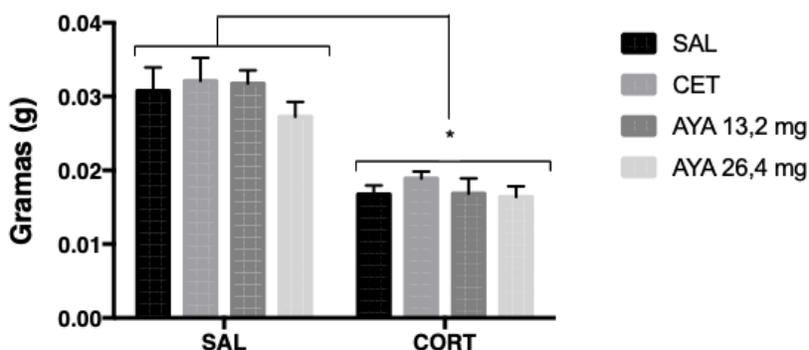


Fig. 4. Efeito da AYA sobre o peso das adrenais dos animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M (n=7 a 8 animais/grupo). $^*P < 0,001$ quando comparado com os grupos controles. A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

Os cortes das glândulas adrenais foram corados para análise histológica qualitativa e quantitativa. Na análise quantitativa foi observado uma redução da dimensão da zona fasciculada das adrenais em relação a dimensão total do córtex adrenal nos grupos tratados com CORT em relação aos animais do grupo controle ($P < 0,05$). Ademais foi possível observar uma redução da

zona fasciculada das adrenais nos grupos tratados com AYA e CET após a administração de CORT (CORT + CET, CORT + AYA 13,2 mg, CORT + AYA 26,4 mg) em relação aos grupos que não receberam CORT (SAL + CET, SAL + AYA 13,2 mg, SAL + AYA 26,4 mg), $P < 0,0001$ (Fig.5).

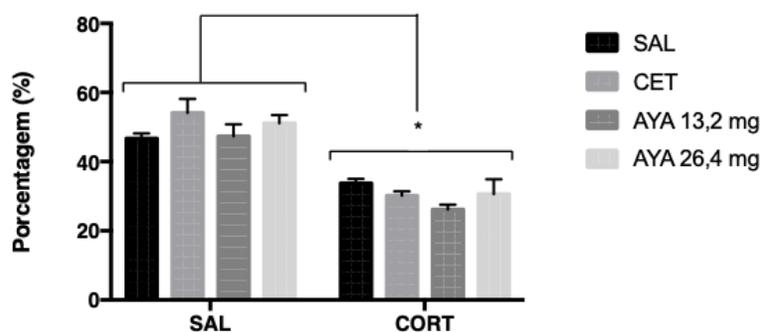


Fig. 5. Efeito da AYA sobre a zona fasciculada das adrenais dos animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M (n=4 a 6 cortes/grupo). $*=P < 0,05$ quando comparado com os grupos controles. A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

Na análise histológica qualitativa dos cortes da adrenal foi observada uma redução na zona fasciculada das adrenais nos grupos tratados com CORT (Fig.6)

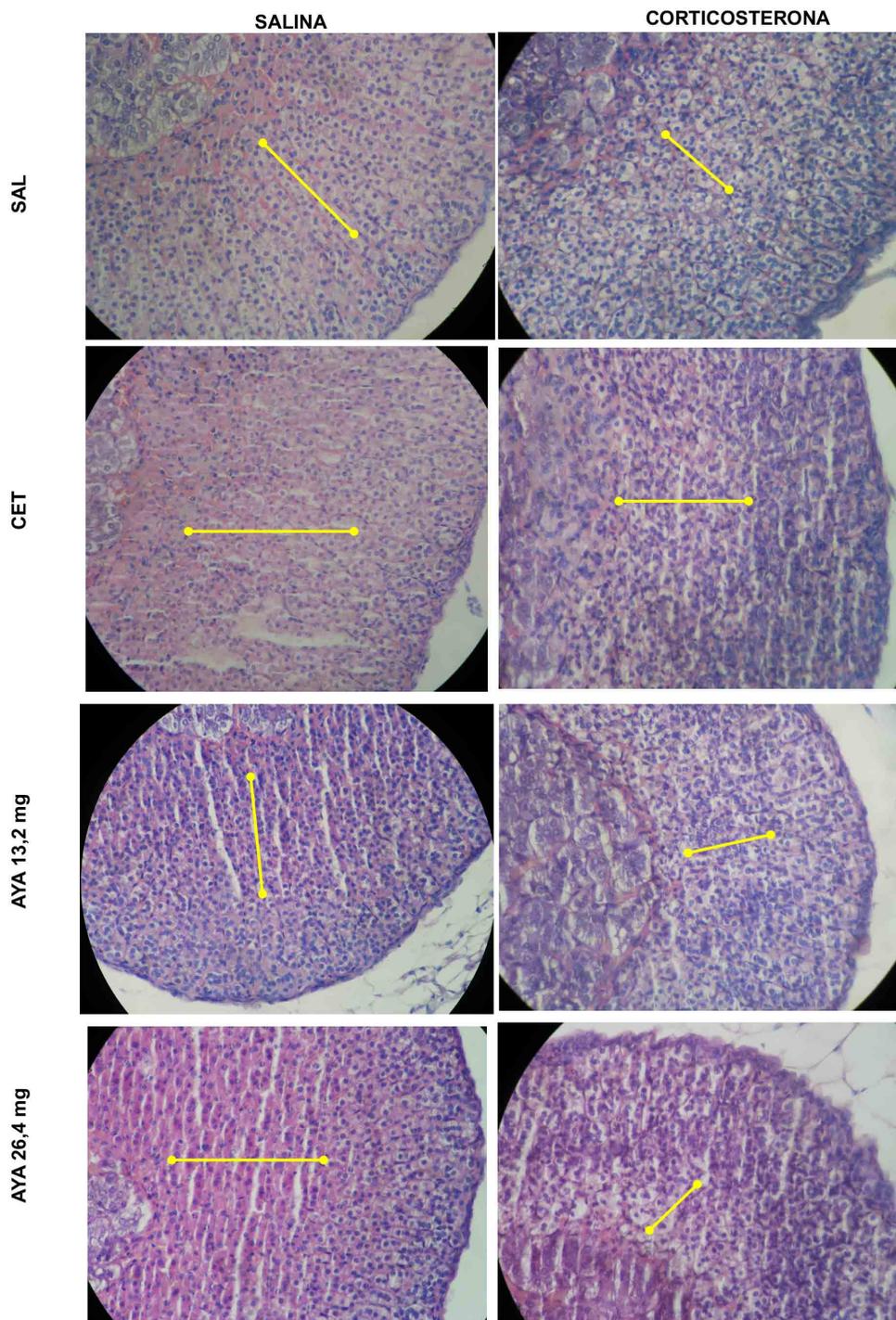


Fig. 6. Efeito da AYA sobre a zona fasciculada do córtex das adrenais dos animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras amarelas representam a área da zona fasciculada no córtex da adrenal (n=1 corte/grupo). As lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio, com aumento de 400x (as tomadas das fotomicrografias foram com a objetiva de 40x).

5.3 O tratamento com Ayahuasca modifica o comportamento dos animais após o uso prolongado de corticosterona

5.3.1 Nado Forçado

Para avaliar a ausência de fuga, foi realizada análise do tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Nesse sentido foi possível perceber que os animais do grupo modelo de estresse induzido por administração de CORT apresentaram um maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle ($P < 0,0001$). O tratamento com a AYA em ambas doses foi capaz de reverter as alterações induzidas pela CORT ($P < 0,0001$). O tratamento com AYA na maior dose no grupo controle obteve tempo de imobilidade menor que no grupo salina. Além disso, o tratamento com AYA obteve tempo de imobilidade menor em relação ao grupo controle positivo tratado com CET ($P < 0,0001$) (fig. 7).

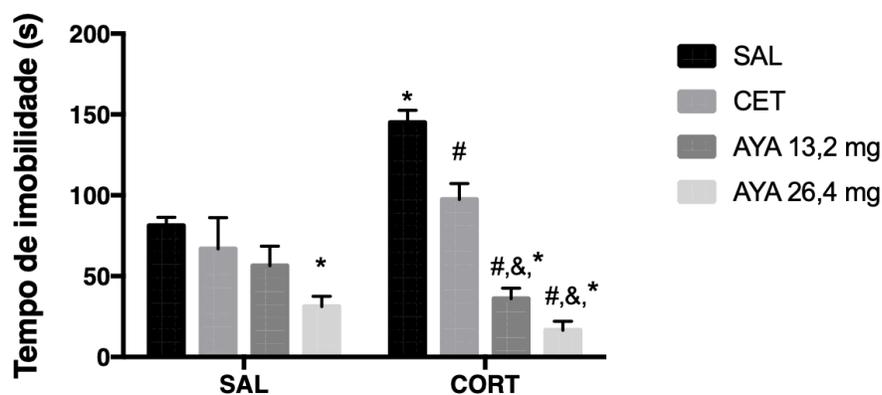


Fig. 7. Efeito da AYA sobre o tempo de imobilidade avaliado pelo teste do nado forçado em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M (n=8 a 12 animais/grupo). *= $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); #= $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (CORT); &= $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle positivo (CORT + CET). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

5.3.2 Suspensão de Cauda

O teste de suspensão da cauda é um outro método utilizado para avaliar o potencial antidepressivo de drogas (STERU et al., 1985) através do tempo de imobilidade, foi possível observar que os animais do grupo modelo apresentaram um maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento com a CET e AYA em ambas doses foi capaz de reverter as alterações induzidas pela CORT (CET $P < 0,001$; AYA $P < 0,0001$). Além disso, o tratamento com AYA na maior dose (26,4 mg) obteve tempo de imobilidade menor em relação ao

grupo controle positivo tratado com CET ($P < 0,0001$) (fig. 8)

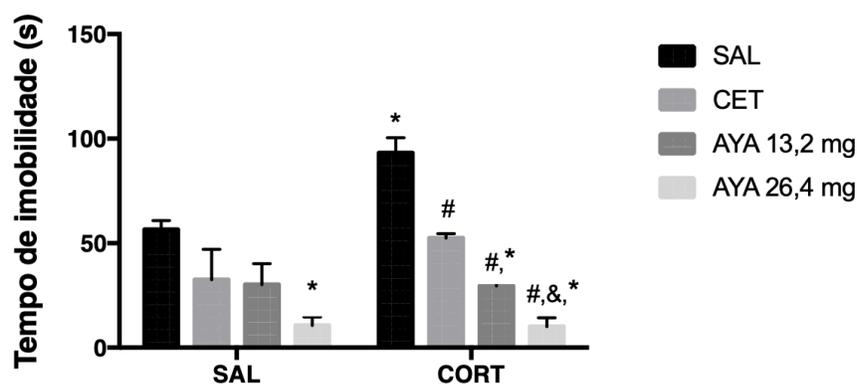


Fig. 8. Efeito da Ayahuasca sobre o tempo de imobilidade avaliado pelo teste de suspensão de calda em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M ($n=6$ a 12 animais/grupo). * = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); # = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (CORT); & = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle positivo (CORT + CET). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

5.3.4 Campo Aberto

Com a finalidade de analisar os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora, os animais foram avaliados no teste do campo aberto através do número de cruzamento. Visto isso, obtivemos como resultados a diminuição da atividade locomotora no grupo tratado com AYA 26,4 mg, após a administração de corticosterona em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (fig 9).

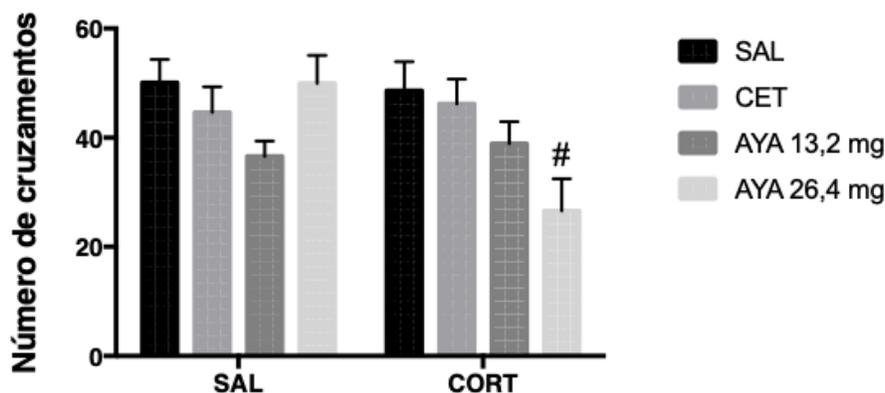


Fig. 9. Efeito da AYA sobre o número de cruzamentos avaliado pelo teste de campo aberto em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M ($n=10$ a 12 animais/grupo). # = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (CORT). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

Além disso no teste de campo aberto foi avaliado o número de rearings (número de exploração vertical), sendo possível observar que no grupo modelo houve um aumento de

exploração vertical em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Por outro lado, o tratamento com AYA em ambas as doses a reversão reverteu o número de exploração vertical (AYA 12,2 mg $P < 0,0001$; AYA 26,4 mg $P < 0,001$) (Fig 10).

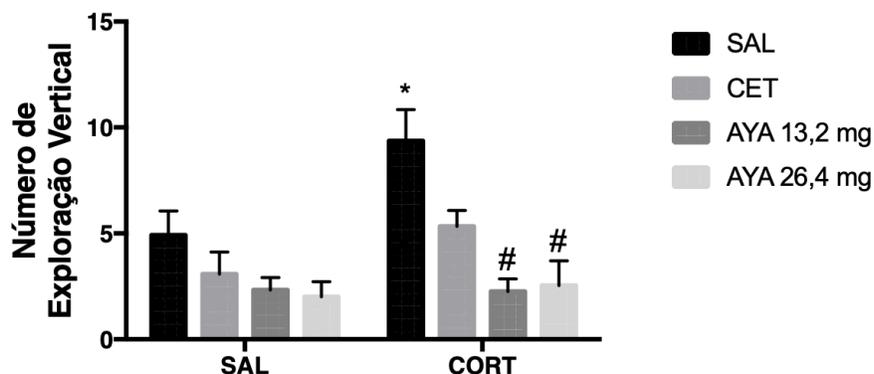


Fig. 10. Efeito da AYA sobre o número de exploração vertical avaliado pelo teste de campo aberto em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M ($n=11$ a 12 animais/grupo). * = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); # = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (CORT). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

Em relação ao comportamento estereotipado de autolimpeza, grooming e tempo no centro não foi observado nenhuma diferença significativa entre os grupos (fig 11).

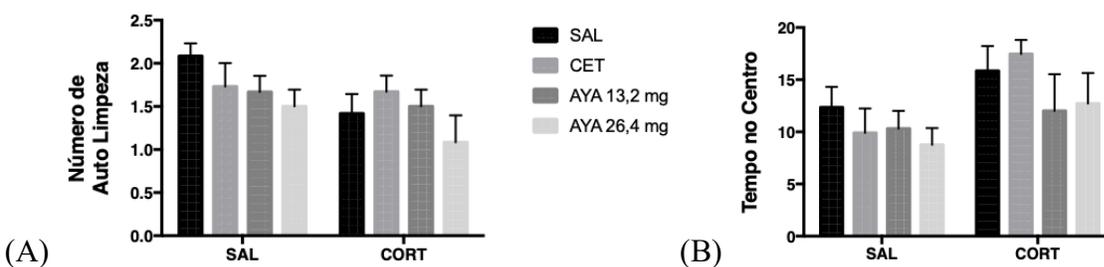


Fig. 11. Efeito da sobre o número de exploração vertical avaliado pelo teste de campo aberto em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M ($n=7$ a 12 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca (A) número de auto limpeza; (B) Tempo no centro.

5.3.4 Labirinto em Y

Em relação a memória de trabalho avaliada pela porcentagem de alternações corretas no teste de Labirinto em Y (Fig.10), foi possível observar que no grupo modelo houve uma diminuição da porcentagem de alternâncias espontânea em relação ao grupo controle ($P < 0,01$). O tratamento com AYA na maior dose (26,4 mg) revelou uma reversão na porcentagem de alternâncias espontâneas em relação ao grupo modelo ($P < 0,05$) (Fig 12).

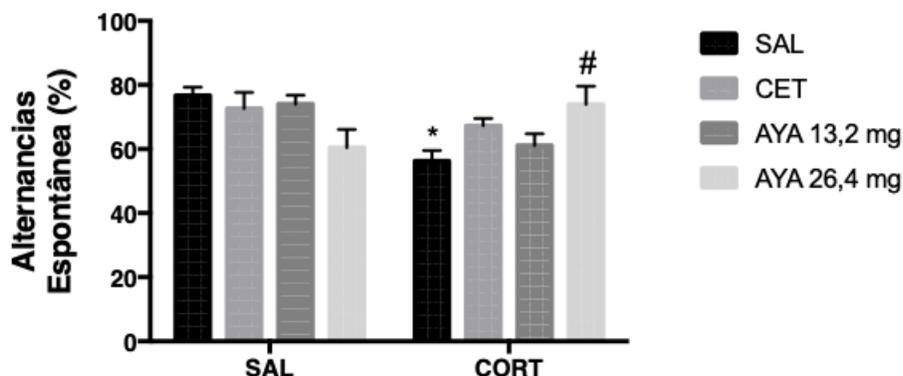


Fig. 12 . Efeito da AYA sobre o número de alternâncias espontânea avaliado pelo teste de labirinto em Y em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M (n=7 a 12 animais/grupo). * = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); # = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (CORT). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

5.4 O tratamento com Ayahuasca reverte as alterações bioquímicas decorrente ao uso prolongado de corticosterona

Foi realizado a dosagem da corticosterona no sangue através do método de fluorescência, sendo possível verificar que no grupo modelo houve um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona de em relação ao grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento com CET ou AYA em ambas as doses reduziu os níveis plasmáticos de corticosterona em relação ao grupo modelo (CET $P < 0,05$; AYA ambas doses $P < 0,01$) (Fig 13)

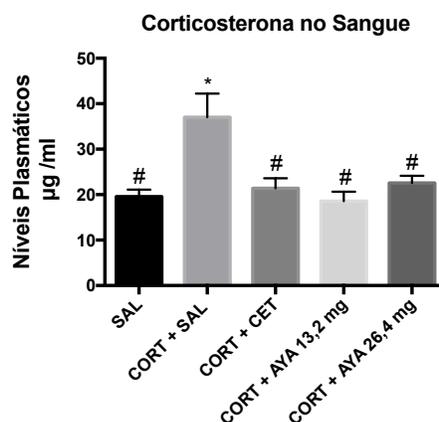


Fig. 13. Efeito da AYA sobre a expressão da corticosterona através da dosagem de corticosterona no sangue em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M (n=5 a 7 animais/grupo). * = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); # = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (CORT). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de uma vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

O BDNF tem influência marcante na eficácia sináptica, na conectividade neuronal e na neuroplasticidade (POST, 2007). Visto isso foi realizada a dosagem do BDNF no hipocampo, onde foi possível observar que no grupo modelo houve uma diminuição dos níveis de BDNF em relação ao grupo controle ($P < 0,05$), após o tratamento com AYA em ambas as doses, foi observado uma redução dos níveis de BDNF em relação ao grupo modelo (AYA 13,2 mg $P < 0,001$ AYA 26,4). No entanto, o grupo que foi exposto a CET apresentou um aumento desses níveis em comparação com o grupo modelo ($P < 0,001$) (fig 14).

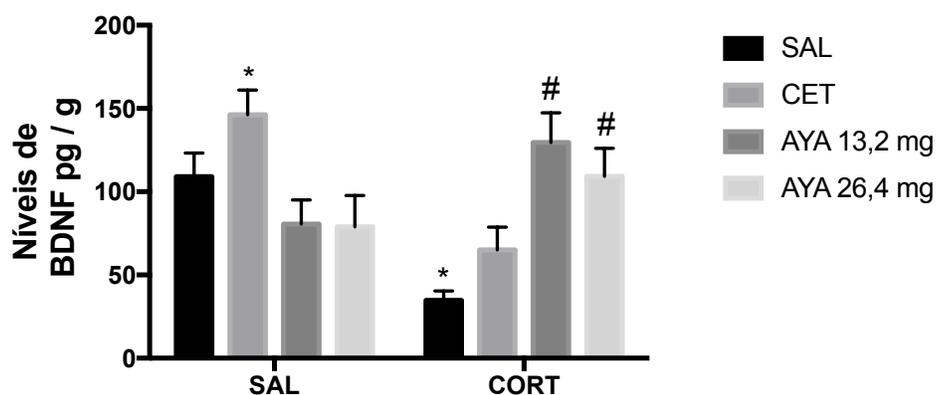


Fig. 14. Efeito da AYA na expressão do BDNF através da análise neuroquímica de imunoblot em animais submetidos ao modelo de estresse induzido por administração de corticosterona. As barras representam a média \pm E.P.M (n=4 a 4 animais/grupo). * = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (SAL); # = $P < 0,05$ quando comparado com o grupo modelo (CORT). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: SAL= salina; CORT= Corticosterona; CET = Cetamina; AYA= Ayahuasca.

6 DISCUSSÃO

Em suma, os resultados mostram que o modelo de estresse induzido por administração prolongada de corticosterona provocou alterações no peso dos animais, na zona fasciculada das adrenais, no tempo de imobilidade, na memória de trabalho, no número de exploração vertical, nos níveis de BDNF no hipocampo e alteração nos níveis de corticosterona. Diante disso podemos ver alguns fenótipos da depressão, como: alterações físicas como a perda de peso, déficits de memória, ideias de suicídio, diminuição dos níveis do BDNF no hipocampo e alteração do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal (GRAEFF; BRANDÃO, 1999; OMS, 2016).

No tratamento agudo com Ayahuasca foi possível reverter alguns desse fenótipos tipo depressivo e ansiolítico, como: o aumento da luta pela vida, melhora do déficit de memória, diminuição do tempo de imobilidade em animais não expostos ao protocolo de estresse induzido pela CORT, diminuição no número de cruzamentos, reversão do número de exploração vertical, aumento dos níveis de BDNF e retorno da corticosterona aos níveis basais. Porém em alguns dos resultados não foi possível observar a reversão com o tratamento agudo com Ayahuasca, como: peso dos animais, peso das adrenais e área da zona fasciculada da adrenal.

Trabalhos publicados utilizando o chá Ayahuasca tem os mesmos constituintes majoritários

Nossos resultados demonstram que as 5 amostras diferentes do chá não obtiveram diferenças significativas, tendo todas as amostras como constituintes majoritários HRM e THH, e em quantidades menores HRL e DMT. Esses achados foram confirmados em diversos estudos, como no de Castro-Neto *et al.* (2013) onde a composição foi, HRM = 5.09 mg/mL; THH = 0.99 mg/mL; HRL=0.19 mg/mL e DMT = 0.59 mg/mL. No estudo de Palhano *et al.*, (2018) foi obtido: HRM=1.86±0.11 mg/mL, THH=1.20±0.05 mg/mL; HRL= 0.24±0.03 mg/mL e DMT= 0.36±0.01 mg/mL. Em 2013, Favaro encontrou HRM=0,56 mg/mL; THH=0,44 mg/mL HRL=0,17 mg/mL e DMT=0,26 mg/mL. No de Silva; (2012) HRM=0,25 mg/mL; THH=0,58 mg/mL; HRL=0,18 mg/mL e DMT= 0,16; mg/mL e no estudo de Colaço *et al.* (2020) HRM=1,19 mg/mL; THH=0,15 mg/mL; HML=0,08 mg/mL e DMT= 0,12 mg/mL.

Desta forma, podemos observar que existe uma diferença na quantidade isolada de cada

constituente, justificado pelos diferentes ambientes (solo e clima) de plantio e colheita das plantas utilizadas na preparação do chá e diferentes forma de preparação, tempo de cozimento e proporção de cada planta utilizada para o preparo da Ayahuasca nas diversas religiões. Contudo, observa-se um padrão semelhante de HRM e THH em quantidade superior as de HRL e DMT.

Tratamento da Ayahuasca no estresse induzida por administração crônica de corticosterona

Através dos nossos resultados vimos que o modelo do uso prolongado da corticosterona alterou o ganho de peso durante 21 dias. A diminuição do peso mostra um possível fenótipo depressivo, onde pacientes depressivos tem uma perda de peso importante (STERNER; KALYNCHUK, 2010; OMS, 2016). Essa perda de peso após a administração crônica de CORT é evidenciada em outros trabalhos que utilizam este modelo. Em 2019, Medeiros obteve uma diferença significativa no grupo salina e no grupo exposto ao modelo de indução de CORT. Nos grupos SAL tratados com Ayahuasca e CET não foi visto uma alteração significativa no peso dos animais, concordando com o estudo de COLAÇO, CALDAS e MORTARI (2018) onde a administração de AYA em diversas doses durante 28 dias não alterou o peso dos animais comparado com o controle. Em nosso estudo após o tratamento com CET e AYA, não foi observado recuperação do peso nos animais. Possivelmente esse resultado não foi revertido, pois o tratamento foi realizado de forma aguda, sendo os animais eutanasiados 4 horas após o tratamento.

A morfologia da adrenal foi alterada após o uso prolongado de CORT e vimos uma diminuição na zona fasciculada, região onde se encontra as células beta adrenais responsáveis pela excreção de corticosterona (JURUENA, CLEAREA, PARIANTEA, 2004). O aumento exógeno de CORT decorrente da administração repetida de CORT durante 21 dias, provoca alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e se tem uma atrofia da região fasciculada, e peso da adrenal confirmado com estudo de GREGUS *et al.*, 2005 e JOHNSON *et al.*, 2006, porém não houve nenhuma alteração nos grupos tratados com AYA em relação ao controle.

Outro resultado importante para validar o protocolo de depressão através do uso prolongado de CORT é o aumento do tempo de imobilidade dos animais nos testes de nado forçado e suspensão de cauda, visto no presente estudo no grupo SAL x CORT. Nestes testes a avaliação

da ausência de fuga, que é contabilizado através do tempo de imobilidade, é indicativo ou de comportamento depressivo-símile já vistos em diversos trabalhos (LUCKI, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2013).

O aumento do tempo de imobilidade nos animais tratados com CORT como indicativo de comportamento depressivo, foi revertido após o tratamento agudo com AYA em ambas as doses no teste do nado forçado. Os estudos de Lima *et al.* (2007) e Pic-Taylor *et al.* (2015), estão de acordo com nossos resultados, no de Lima o tratamento com AYA diminuiu o tempo de imobilidade com uma inversão proporcional à dose, ou seja, quanto maior a dose menor o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. No estudo de Pic-Taylor *et al.* (2015) foi realizado um ensaio de toxicidade onde ratas tratadas com AYA em doses 30x e 50x maiores do que é utilizado em rituais religiosos, mostraram um tempo de imobilidade significativamente menor quando comparado aos grupos controle e fluoxetina. Porém nos estudos de COLAÇO, (2018) os resultados vão ao encontro com o nosso onde não foi identificado diferença no nado forçado em animais tratados com AYA ou fluoxetina.

Corroborando nossos resultados, estudos anteriores que trabalharam com a HRM, um dos constituintes majoritário isolado do chá AYA também apresentaram diminuição no tempo de imobilidade (Fortunato *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2017). No estudo de Fortunato *et al.* (2010), em animais com depressão símile tratados com a administração intraperitoneal por 14 dias de imipramine (10 - 30 mg/kg) e HRM (5- 15 mg/kg) reduziram de maneira significativa o tempo de imobilidade. De forma semelhante, no estudo de LIU *et al.*, (2017), onde os animais foram exposto ao estresse crônico imprevisível (modelo de indução da depressão símile em animais) o tratamento com a HRM (15 mg/kg), teve como resultado a diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado foçado e suspensão de cauda. Ademais no estudo foi utilizado o L- Alpha- Aminoacidipic Acid (L-AAA) um inibidor específico de funções do astrócitos, em um grupo tratado junto com a HRM, teve como resultado o aumento do tempo de imobilidade em ambos os testes, demonstrando uma possível reversão dos efeitos da Harmina.

No teste de campo aberto os nossos resultados mostraram que os animais tratados com AYA na dose de 26,4 mg, apresentaram uma redução da atividade locomotora. Em concordância com nossos dados, o estudo anterior realizado por Lima *et al.* (2007) também demonstrou que o tratamento com AYA obteve uma diminuição na locomoção dos animais. Porém, esse resultado

vai de encontro com outros estudos de CORREA-NETTO (2017) que utilizou uma dose de 1.5 mL/kg, avaliou a ingestão do chá na infância, adolescência e na fase adulta dos camundongos não encontrando nenhuma diferença na locomoção dos animais. Nos estudos de Colaço *et al.* (2020) e NOLLI, (2017) não foi encontrada diferença no número de cruzamentos.

Para avaliar a atividade exploratória foi registrado o número de levantamentos, quando os animais erguiam o corpo e permaneciam sustentados pelas duas patas traseiras, com as duas patas dianteiras levantadas (rearings ou exploração vertical) (ZAMARRENHO, 2014), na avaliação mostramos que em animais tratados com a CORT (depressão símile) tem o aumento da exploração vertical, foi revertido após o tratamento agudo com AYA (ambas doses) apresentando retorno a normalidade. Em 2007, Lima *et al.* obteve em seus resultados a diminuição da exploração vertical em animais saudáveis tratados com AYA. No entanto, o estudo de Colaço *et al.* (2020) ao avaliar animais após a administração de AYA durante 28 dias, não encontrou diferença significativa quando ao número de exploração vertical.

Na avaliação do tempo de permanência no centro, onde avalia uma possível ansiedade no animal não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos, divergindo com o estudo de Colaço *et al.* (2020) em que o grupo tratado com AYA durante 28 dias obteve um tempo no centro menor do que o controle.

Na fisiopatologia da depressão o BDNF tem influência marcante onde regula funções cerebrais complexas, como a memória declarativa e a emoção, na eficácia sináptica, na conectividade neuronal e na neuroplasticidade (POST, 2007; GRANDE *et al.*, 2010). Em concordância com a fisiopatologia da depressão nossos dados revelam que os animais tratados com CORT, grupo modelo apresentam uma redução dos níveis de BDNF, indicando efetividade no modelo de estresse induzido por administração repetida de CORT. Em relação aos animais, obtivemos em nossos resultados o aumento do BDNF no hipocampo do grupo SAL + CET, uma diminuição no grupo SAL + CORT, A CET em 2019 foi aprovada pela FDA como a nova droga para tratar depressão resistente, tendo um efeito antidepressivo rápido (KIM *et al.*, 2019). Ademais o tratamento com AYA reverteu a diminuição nos níveis de BDNF após a indução da depressão símile com a administração de CORT, concordando com Colaço *et al.* (2020) onde em seus resultados em animais saudáveis após a administração de AYA não foi observado o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo, sendo observado um aumento apenas no grupo feminino na maior

dose dos níveis do BDNF (COLAÇO *et al.*, 2020). Em voluntários humanos com depressão resistente tratados com AYA obtiveram os níveis de BDNF mais elevado dos que foram tratados com placebo concordando com o presente estudo (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Ao utilizar apenas HRM para o tratamento dos animais, Fortunato *et al.* (2010) demonstrou que na dose maior de HRM foi visto um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo. Liu *et al.* (2017) observou um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo em animais saudáveis, porém o resultado em animais com depressão símile vai de acordo com o nosso, pois houve o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo. Além disso Liu *et al.* (2017) realizou um grupo tratado com HRM e com L-AAA nesse grupo não houve o aumento dos níveis do BDNF nem em animais saudáveis e com depressão símile, ademais Liu *et al.* (2017) realiza a fluorescência e o western blot do marcador da expressão de astrócito (GFAP) obtendo como resultado o aumento da expressão do GFAP em animais tratados com HRM, e no grupo tratado com HRM e L-AAA não foi evidenciado essa expressão, mostrando a região dos astrócitos um possível mecanismo de ação da HRM.

Acredita-se que níveis crônicos elevados de glicocorticóides podem levar à dano de neurônios hipocampais, mais especificamente na região CA3 (SCHMIDT *et al.*, 2004; MCEWEN, 2007).

Estudos clínicos identificam pequenos aumentos nas concentrações séricas de glicocorticóides na depressão, despertando interesse significativo no papel de um eixo HHA disfuncional na fisiopatologia da depressão (BRUNEI, 1987; GOURLEY *et al.*, 2008). De forma semelhante, nossos achados demonstraram aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona aumentaram em animais depressivos e houve uma reversão após o tratamento com CET e AYA. Entretanto esse achado é bastante conflitante na psiquiatria, pois um significativo percentual de pacientes com depressão maior apresenta: concentrações aumentadas de cortisol (glicocorticóide endógeno em humanos) no plasma, urina e líquido cefalorraquidiano, sendo considerado um endofenótipo da depressão. Nos últimos anos, muitos estudos sobre o eixo HPA em pacientes deprimidos foram publicados e há uma nova perspectiva para os antigos achados que relacionavam hipercortisolemia à depressão levando a crer que está ligada a alguns casos específicos de depressão (GREGUS *et al.*, 2005 JOHNSON *et al.*, 2006)

O estudo de Silva *et al.* (2018) mostra que os animais depressivos com o modelo de isolamento social, tiveram uma diminuição nos níveis de corticosterona, a qual foi revertida após o tratamento com AYA. No estudo de Galvão *et al.* (2018) obteve como resultado a diminuição do cortisol em humanos depressivos, esse achado foi revertido após um tratamento agudo com AYA, indo de encontro com o presente estudo.

7 CONCLUSÃO

Concluimos neste estudo que a AYA em diferentes doses conseguiu reverter de forma aguda o fenótipo depressivo ocasionado pela administração prolongada de corticosterona, sendo revertido a diminuição do tempo de imobilidade nos testes de suspensão de cauda e nado forçado, os níveis de corticosterona no sangue de forma parecida como a CET, a AYA em ambas as doses conseguiu reverter o número de exploração vertical, os níveis de BDNF, e apenas na maior dose reverteu a diminuição das alternâncias espontâneas no Y-maze.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.N., *et al.* Modulation of Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor by a Single Dose of Ayahuasca: Observation From a Randomized Controlled Trial. **Front Psychol.**, v. 4, n. 10, 2019.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animbehav**, v. 21, p. 205-235, 1973.

BARBIER, R. A. *Panteísmo: a religiosidade do presente*. Olinda: livro rápido. 2009. NÚMERO PAGINAS

BALDESSARINI, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: depression and mania. In the pharmacological basis of therapeutics, edshardman jg, limbird le. *New york: mcgraw-hill*; 9 ed. 431–459, 1996.

BAUER, S. *et al.* The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 221–232, 2007.

BRASIL. (2010). Resolução nº 1, 25 de janeiro 2010. Retrieved from <http://www.universomistico.org/s/25012010-resolucao-no-1-conad.html>.

BEAULIEU, J.M., *et al.* Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proc Natl Acad Sci**, v.101, n. 14, 5099-104, 2004.

BEAULIEU, J. M. *et al.* Not only lithium: regulation of glycogen synthase kinase-3 by antipsychotics and serotonergic drugs. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 10, n. 1, p. 3-6, 2007.

BIEWENGA, G. P., *et al.* The pharmacology of the antioxidante lipoic acid. **General Pharmaceuticals**, v. 29, n. 3, p. 315–331, 1997.

BROWNE CA, LUCKI I. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. **Front Pharmacol.**, v. 4, p. 161, 2013.

BUTTE, J.C., *et al.* The fluorometric assay of rat plasma corticosterone: evaluation of nonspecific fluorescence. **Steroids**. , v. 32, n. 5, p. 607-14, 1978.

CALLAWAY, J.C., *et al.* Pharmacokinetics of hoasca alkaloids in healthy humans. **Journal of ethnopharmacology**, v.65, 243-256, 1999.

CALLAWAY, J.C.; GROB, C.S. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse reactions. **Journal of psychoactive drugs**, v.30, p.367-369, 1998.

CALLAWAY, R. M. *et al.* Soil biota and exotic plant invasion. **Nature**, v.427, n. 6976, 731-733,2004.

CAZENAVE, S.O.S. *Banisteriopsis caapi*: ação alucinógena e uso ritual. **Revista de psiquiatria clínica**, São Paulo, 27: 32-35, 2000.

CAZENAVE, S.O.S. Alucinógenos. In: Olga, S. Fundamentos De Toxicologia, Atheneu, São Paulo. 329-343, 1996.

CASTRO-NETO, E.F., *et al.* Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. **World J Biol Chem.** , v. 4, n. 4, p. 141-7 ,2013.

COLAÇO, C.S., *et al.* Toxicity of ayahuasca after 28 days daily exposure and effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in brain of Wistar rats. **Metab Brain Dis.** , v. 35, n. 5, p. 739-751, 2020.

COLAÇO, C.S. **Avaliação do potencial antidepressivo da ayahuasca em ratos – comportamento, quantificação e monoaminas e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)** / Camila Schourei Colaço – Brasília, 2018 103p.

CORREA-NETTO, N.F. *et al.* Chronic intermittent exposure to ayahuasca during aging does not affect memory in mice. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 50, n. 7, 2017.

COUTO, F.L.R. **Santos e xamãs**. Dissertação de mestrado em antropologia. Universidade de Brasília, Brasília – DF, 1989.

DATA-FRANCO, J., *et al.* Beyond the therapeutic shackles of the monoamines: New mechanisms in bipolar disorder biology. **Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 72, p. 73-86, 2017.

DE SARNO, P. *et al.* Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1158-1164, 2002.

DESMARCHELIER, C. *et al.* Ritual and medicinal plants of the ese'ejas of the amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). **Journal ethnopharmacology**, v.52, n.1, 45-51,1996.

DE SOUSA, C. N. S. *et al.* Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. **Psychiatry research**, v. 230, n. 2, p. 211–9, 2015.

DE SOUSA, C. N. S. *et al.* Neuroprotective evidence of alpha-lipoic acid and desvenlafaxine on memory deficit in a neuroendocrine model of depression. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, v. 391, n. 8, p. 803–817, 2018.

DOBLE, B.W.; WOODGETT, J.R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **J Cell Sci**, v. 1, n. 116, p. 1175-86, 2003.

DOS SANTOS, RAFAEL G *et al.* “antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies.” **revista brasileira de psiquiatria** (sao paulo, brazil : 1999) vol. 38,1 (2016): 65-72. doi:10.1590/1516-4446-2015-1701

DU, X.; PANG, T. Y. Is dysregulation of the hpa-axis a core pathophysiology mediating co-morbid depression in neurodegenerative diseases?. **Frontiers in psychiatry**, v. 6, p. 1–33, 2015.

DUMAN, R.S. Synaptic plasticity and mood disorders. **Mol Psychiatry**, v. 7, 29-34, 2002.

EMBI, N., *et al.* Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. **Eur J Biochem**, v. 107, n.2, p. 519-27, 1980.

FÁBREGAS, J.M. *et al.* Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. **Drug and alcohol dependence**, v. 111, n.3, 257-61,2010.

FAVA, M., DAVIDSON, K. G. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. **Psychiatric clinics of North America**, v.19, n.2, p. 179–198, 1996.

FAVARO, V.M. **Efeito da administração crônica de ayahuasca em modelos pré-clínicos de memória e ansiedade** - São Paulo, 2013.

FORTUNATO, J.J., *et al.* Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1425-30, 2009.

FREY, B.N. *et al.* Increased oxidative stress and dna damage in bipolar disorder: a twin-case report. **Prog neuropsychopharmacol biol psychiatry**, v. 31, p. 283-285, 2007.

- GALVÃO, A.C.M., *et al.* Cortisol Modulation by Ayahuasca in Patients With Treatment Resistant Depression and Healthy Controls. **Front Psychiatry**, v. 9, n. 185, 2018.
- GARRIDO, R.G., SABINO, B.D. Ayahuasca: entre o legal e o cultural. *Saúde, ética & justiça*, v. 14, n. 2, p. 44-53, 2009.
- GAYNES, B. N., *et al.* THE AIMS AND DESIGN OF THE SEQUENCED TREATMENT ALTERNATIVES TO RELIEVE DEPRESSION (STAR*D) STUDY. **Primary psychiatry**, v. 12, n.2, p. 36–41, 2005.
- GAYNES, B. N., *et al.* The star*d study: treating depression in the real world. **Cleve clin j med.**, v. 75, n.1, p. 57-66, 2008.
- GAYNES, B. N., *et al.* What did star*d teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. **Psychiatric services**, v. 60, n.11, 1439–1445, 2009.
- GAWRYLUK, J.W. *et al.* Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **Int j neuropsychopharmacol**, v. 14, p. 123-130, 2011.
- GIGANTE, A.D. *et al.* Morphometric post-mortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. **Int j neuropsychopharmacol**, v. 14, p. 1075-1089, 2011.
- GROB, C.S. *et al.* Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in brazil. **Journal of nervous and mental disease**, v.184, p. 86-94, 1996.
- GROB, C.S. *et al.* “Farmacologia humana da Hoasca, planta alucinógena usada em contexto ritual no Brasil: Efeitos psicológicos”. **O uso ritual da ayahuasca**. 2ª ed. Campinas: Mercado de Letras, 2004. pp. 653–669.
- GOLDSTEIN, B.I., *et al.* Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. **The journal of clinical psychiatry**, v. 70, p. 1078-1090, 2009.
- GOULD, T.D. Targeting glycogen synthase kinase-3 as an approach to develop novel mood-stabilising medications. **Expert opin ther targets**, v. 10, n. 377-392, 2006.
- GOULD, T.D., *et al.* Strain differences in lithium attenuation of d-amphetamine-induced hyperlocomotion: a mouse model for the genetics of clinical response to lithium. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 1321-1333, 2007.
- GOURLEY, S. L. *et al.* Regionally specific regulation of erk map kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. **Biological psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 353–359, 2008.
- GLENNON, R.A., *et al.* Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂ AND 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors. **Drugalcoholdepend**, v. 60, 121-32, 2000.
- GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos editorial, 1999.
- GRANDE, I., *et al.* The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. **Psychiatry investig**, v. 7, p. 243-250, 2010.
- GREGUS, A. *et al.* Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 105- 114, 2005.
- GOULART, S. **As raízes culturais do santo daime**. Dissertação de mestrado em antropologia, USP, São Paulo, 1996.
- GULOKSUZ, S., *et al.* Cytokine levels in euthymic bipolar patients. **J affect disord**, v. 126, p. 458-462, 2010.

HUANG, J., *et al.* Recruitment of irak to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America**, v. 94, p. 12829-12832, 1997.

JOHNSON, S.A. *et al.* Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. **Behavioural Brain Research**, v. 168, n. 2, p. 280-288, 2006.

JOHNSON-FARLEY, N.N., *et al.* Cumulative activation of AKT and consequent inhibition of glycogen synthase kinase-3 by brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 in cultured hippocampal neurons. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 316, n.3,1062-9, 2006.

JOPE, R.S.; JOHNSON, G.V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 2, 95-102, 2004.

JOPE, R.S.; ROH, M.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. **Curr Drug Targets**, v.7,n.11, 1421-34, 2006.

JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo , v. 26, n. 3, p. 189-201, 2004.

KAPCZINSKI, F., *et al.* Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. **Neurosci Biobehav**, v. 32, n. 4, 675-92, 2008.

KAUER-SANT'ANNA, M. *et al.* A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks D-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. **Peptides**, v. 28, n.7, 1447-52, 2007.

KAUFMAN, J. *et al.* Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. **Biol. Psychiatry**, v. 48, n. 0006-3223, p. 778-790, 2000.

KIM, Y.K., *et al.* Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 5, p. 1044-53, 2007.

KIM, J.M., *et al.* Associations of cytokine gene polymorphisms with post-stroke depression. **World J Biol Psychiatry**, v. 13, p. 579-587, 2011.

KIM, J., *et al.* Esketamine for Treatment-Resistant Depression - First FDA-Approved Antidepressant in a New Class. **N Engl J Med.**, v. 4, n. 1, 1-4, 2019.

KRISHNADAS, R.; CAVANAGH, J. Depression: an inflammatory illness?. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v. 83, n. 5, 495-502, 2012.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KULOGLU, M., *et al.* Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. **Neuropsychobiology**, v. 46, n. 4, p. 186-189, 2002.

LABATE, B. C. A reinvenção da ayahuasca nos centros urbanos. Campinas, São Paulo: mercado de letras, FAPESP, 2004.

LABATE, B. C., ARAÚJO, W. S. O uso ritual da ayahuasca. São Paulo, SP: MERCADO DAS LETRAS, FAPESP, 2002.

LABATE, B. A reinvenção do uso da ayahuasca nos centros urbanos. Campinas, São Paulo: mercado de letras, 2006.

- LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 26, n. 1, 91-104, 2002.
- LI, X. *et al.* Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. **The International Journal of Neuropsychopharmacology.**, v. 10, n. 1, p. 7-19, 2007.
- LIMA, R.R. *et al.* Degeneração neuronal secundária e excitotoxicidade. **Rev. Para. Med.**, v. 21, n. 1, p. 27-31, 2007.
- LIU, F., *et al.* Harmine produces antidepressant-like effects via restoration of astrocytic functions. **Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 3, p. 258-267, 2017.
- LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav Pharmacol**, v.8, p. 523- 5321, 1997.
- LUNA, L.E. Vegetalismo:shamanism among the mestizo population of the peruvian amazon. **Stockholm**, 202 p., 1986.
- LUNA, L.E. Narrativas da alteridade: a ayahuasca e o motivo de transformação em animal. IN: LABATE, B.C. & GOULART, S.L. O uso ritual das plantas de poder. Campinas, São Paulo: mercado de letras, 2005.
- MCCLUNG, C.; NESTLER, E. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 3-17, 2008.
- MCEWEN, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol rev**, p. 873-904, 2007.
- MCEWEN, B.S., *et al.* The brain as a target for steroid hormone action. **Annu Rev Neurosci.**, v. 2, p. 65-112,1992.
- MCKENNA, D.J., *et al.* Monoamine oxidase inhibitors in south american hallucinogenic plants: tryptamine and betacarboline constituents of ayahuasca. **Journal of ethnopharmacology**, v.10, 195-223, 1984.
- MCKENNA, D.J., *et al.* The scientific investigation of ayahuasca: a review of past and current research. **The heffer review os psychedelic research**,v.1, p. 65-76, 1998.
- MCKENNA, D. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. **Pharmacolther**, v. 102, n.1, p.111-29, 2004.
- MACRAE, E. Guiado pela lua: xamanismo e uso ritual da ayahuasca no cultodo santo daime. São paulo: editora brasiliense,1992.
- MANJI, H.K., *et al.* Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 8, 707-42, 2003.
- MATTINGLY, D. A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma. **J Clin Pathol.**, v.15, n. 4, p. 374-9, 1962.
- MAURER, I.C., *et al.* Lithium-induced enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylation in human brain tissue. **Bipolar Disord.** , v. 11, n. 5, 515-522, 2009.
- MEDEIROS, I.S. **Estudo do efeito do aripiprazole sobre alterações comportamentais e neuroquímicas provocadas pelo modelo animal de depressão induzida por corticosterona.** Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Dissertação – 2019. 67 f.
- MONTEIRO, C.O. Palácio juramidam – santo daime: um ritual de transcendência e despoluição. Dissertação de mestrado em antropologia cultural, UFPE, Pernambuco, 1983.

MORENO, R. A. *et al.* Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

MOURA I. G.; COSTA, J. B. Hoasca: ciência, sociedade e meio ambiente. *Revista sociedade e estado*, v. 27, n.1, p. 199-2015, 2012.

MURÍNOVÁ, J., *et al.* The Evidence for Altered BDNF Expression in the Brain of Rats Reared or Housed in Social Isolation: A Systematic Review. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 11, p. 101, 2017.

NARANJO, P. El ayahuasca en la arqueología ecuatoriana. **América indígena**, v. 46, n.1, p. 115-127, 1986.

NESTLER, E. J. *et al.* Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals- Institute of Laboratory Animal Research- National Research Council. **National Academies Press**, 1996.

NINOMIYA-TSUJI, J., *et al.* The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. **Nature**, v. 398, p. 252-256, 1999.

NOLLI, L.M. **Ayahuasca – potencial terapêutico na dependência ao álcool e atividade neural da proteína CFOS em modelo experimental.** Dissertação, BRASÍLIA, 2018, 83f.

OLIVEIRA, T. Q. *et al.* Brain antioxidant effect of mirtazapine and reversal of sedation by its combination with alpha-lipoic acid in a model of depression induced by corticosterone. **Journal of Affective Disorders**, v. 219, p. 49–57, 2017.

OLIVEIRA-LIMA, A. J. *et al.* Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. **Physiology & behavior**, v. 142, p. 28–36, 2015.

OMS (2016). World health organization. Depression. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>.

PALHANO-FONTES, F., *et al.* Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. **Psychol Med.**, v. 49, n. 4, p. 655-663, 2019.

PIC-TAYLOR, A. *et al.* Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female wistar rat. **Processes**, v.118, p.102–110, 2015.

POMILIO, A.B., *et al.* Ayahuasca: an experimental psychosis that mirrors the transmethylation hypothesis of schizophrenia. **Journal of ethnopharmacology**, v.65, n.1, p.29-5, 1999.

POST, R.M. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. **J psychiatr res**, v. 41, p. 979-990, 2007.

PORSOLT, R.D., *et al.* Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v.266, 730-732, 1977.

QUIROZ, J.A., *et al.* Molecular effects of lithium. **Mol Interv.**, v. 4, n.5, 259-72, 2004.

QUIROZ, J.A., *et al.* Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n.11, 2551-65, 2008.

- RACAGNI, G.; POPOLI, M. The pharmacological properties of antidepressants. **Int Clin Psychopharmacol.**, v. 25, n.3, 117-31, 2010.
- RAISON, C. L.; MILLER, A. H. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. **American journal of psychiatry**, v. 160, n. 9, p. 1554–1565, 2003.
- RAO, J.S. *et al.* Chronic NMDA administration to rats up-regulates frontal cortex cytosolic phospholipase a2 and its transcription factor, activator protein-2. **Journal of neurochemistry**, v. 102, p. 1918-1927, 2007.
- RAO, J.S. *et al.* Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. **Mol psychiatry**, v. 15, p. 384-392, 2010.
- RIBA, J., *et al.* Subjective effects and tolerability of the south american psychoactive beverage ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v.154, 85–95, 2001.
- RIBA, J., *et al.* Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. **Journal pharmacology experimental therapeutics**, v.306, n.1, 73-83, 2003.
- RIBEIRO, K.C.S., *et al.* Representação social da depressão em uma instituição de ensino da rede pública. **Psicologia ciência e profissão**, v. 30, n.3, 448-463, 2010.
- RUSH, A. J. *et al.* Acute and Longer-Term Outcomes in Depressed Outpatients Requiring One or Several Treatment Steps: A STAR*D Report. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 11, p. 1905–1917, 2006.
- SALVADORE, G.; SINGH, J.B. Ketamine as a fast acting antidepressant: current knowledge and open questions. **CNS Neurosci Ther**, v. 19, n. 6, p. 428-36, 2013.
- SARTER, M.; STEPHENS, D.N. Beta-carbolines as tools in memory research: animal data and speculations. **Psychopharmacol Ser.**, v. 6, p. 230-45, 1988.
- SANTOS, R.G., *et al.* Pharmacology of ayahuasca administered in two repeated doses. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 4, p. 1039-53, 2012.
- SANTOS, R.G., *et al.* Ayahuasca e redução do uso abusivo de psicoativos: eficácia terapêutica? **Psicol teor pesqui**, v.22,n.3,363-7, 2006.
- SANTOS, R.G. Efeitos da ingestão de ayahuasca em estados psicométricos relacionados ao pânico, ansiedade e depressão em membros do culto do santo daime. 2006. 118 f., il. Dissertação (mestrado em psicologia)-universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- SANTOS, A.L.S., *et al.* Reproductive effects of the psychoactive beverage ayahuasca in male wistar rats after chronic exposure, **braz. J. Phamacog.** V.27 253–260, 2017.
- SANTOS, R.G. Ayahuasca: neuroquímica e farmacologia. **SMAD, Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog.** v. 3, n. 1, 2007 .
- SCHENBERG, E. E. Ayahuasca and cancer treatment. **Sage open medicine**, v. 1, p. 205031211-3508389, 2013.
- SCHLOESSER, R.J., *et al.* Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.33,p.110-133, 2008.
- SCHMIDT, M. *et al.* The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. **Journal of neuroendocrinology**, v. 16, n. 1, p. 52–57, 2004.
- SHANON, B. Os conteúdos das visões da ayahuasca. **Mana**, v. 9, n. 2, p. 109-152, 2003.

SILVA, M. C. C., *et al.* Augmentation therapy with alpha-lipoic acid and desvenlafaxine: a future target for treatment of depression?. **Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 386, n. 8, p. 685–95, 2013.

SILVA, D. A. **Efeitos da ayahuasca na memória emocional de ratos**/ Daiana Aparecida da Silva. São Paulo, 2012. 65 f.

SILVA, J.V. G. **Efeitos terapêuticos da ayahuasca em indivíduos com sintomas de stress pós-traumático**. Dissertação, 2018, Porto – Portugal. 66 f.

SILVEIRA-FILHO, D. X., *et al.* **GRUPO MULTIDISCIPLINAR DE TRABALHO - GMT - AYAHUASCA: RELATÓRIO FINAL**. (2006, 23/11). RETIRADO DE: [HTTP://WWW.OBID.SENAD.GOV.BR/PORTAIS/CONAD/BIBLIOTECA/DOCUMENTOS/327994](http://www.obid.senad.gov.br/portais/conad/biblioteca/documentos/327994)

SIMPSON, P.B.; RUSSELL., J.T. Mitochondrial CA²⁺ uptake and release influence metabotropic and ionotropic cytosolic ca²⁺ responses in rat oligodendrocyte progenitors. **The journal of physiology**, v. 508, p. 413-426, 1998.

Síndrome de Cushing | MedicinaNET. Disponível em:

<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/7365/sindrome_de_cushing.htm?_mobile=off>. Acesso em: 17 dez. 2019.

STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. **Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777–90, 2010.

STERU, L., *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STRAUSS C. V. A; JÚNIOR H.Z. efeitos da ativação de receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT1A E 5-HT2A/2C do complexo amigdalóide sobre a modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico .2005 (TESE DOUTORADO EM PSICOBIOLOGIA). Universidade De São Paulo Ffclrp – São Paulo, 2005.

STUCKEY, D.E., *et al.* EEG gamma coherence and other correlates of subjective reports during ayahuasca experiences. **J psychoactive drugs**, v. 37, n.2, 163-78, 2005.

TUPPER, K.W. *et al.* Entheogens and existential intelligence: the use of plant teachers as cognitive tools. **Can j contin med educ**, v.27, n.4,499-516, 2002.

TUPPER, K.W., *et al.* The globalization of ayahuasca: harm reduction or benefit maximization?. **Int j drug policy**, v.19,n.4, 297-303, 2008.

VALVASSORI, S.S., *et al.* Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. **J psychiatr res**, v.44, n. 903-909, 2010.

VYTHILINGAM, M. *et al.* Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. **Am j psychiatry**, v. 159, n. 2072-2080, 2002.

YAO, H.B., *et al.* Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. **J Chem Neuroanat**, v. 23, n. 4, 291-7, 2002.

ZAMARRENHO, L.G. Efeito do chá de ayahuasca sobre o comportamento de ratos wistar no campo aberto e labirinto em cruz elevado e sobre a expressão de EAAC1 no hipocampo e córtex pré-frontal. Ribeirão Preto, 2014. 92 p.

ZHAO, Y. *et al.* A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **European journal of pharmacology**, v. 581, n. 1–2, p. 113–120, 26 fev. 2008.