UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

LUANA GONÇALVES ZAMARRENHO

Efeito do chá de ayahuasca sobre o comportamento de ratos Wistar no campo aberto e labirinto em cruz elevado e sobre a expressão do transportador de EAAC1 no hipocampo e córtex pré-frontal

Ribeirão Preto

2014

LUANA GONÇALVES ZAMARRENHO

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

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Ribeirão Preto

2014

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

Zamarrenho, Luana Gonçalves

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.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Brandão, Marcus Lira.

1. Ayahuasca. 2.LCE. 3. Campo Aberto. 4. EAAC1. 5. Hipocampo. 6. Córtex Pré-frontal.

Nome: ZAMARRENHO, Luana Gonçalves

Título: 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.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha querida avó Alzira, que apesar de iletrada me ensinou com muito amor valiosos conceitos existenciais que contribuem até os dias atuais para a minha formação moral e intelectual.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Isidoro e Thereza e ao meu irmão André que me dedicam o seu amor da forma mais simples e sincera, que sempre me acompanham e mesmo à distância incentivam carinhosamente cada passo da minha caminhada, que me ensinaram desde nova os preciosos valores da vida, auxiliando na construção dos meus conhecimentos e preenchendo a minha vida com uma felicidade imensurável.

À minha avó Claudinéia que me acompanha sempre, com quem posso compartilhar momentos maravilhosos e que mesmo à distância é capaz de fazer com que o seu amor imenso chegue até mim.

Aos meus avós: Marino, João e Alzira, que estiveram ao meu lado durante muito tempo com o amor e a dedicação de pais de coração.

Aos meus amigos mais antigos de José Bonifácio: Poliana, Matheus e Bruninha com quem compartilho minha história e que me fortalecem a cada dia, especialmente à Poliana, que como uma irmã que escolhi, me acompanha incansavelmente em todos os momentos da minha vida dedicando todo o seu amor e compreensão.

A todos os amigos que tive o prazer de conhecer e conviver enquanto morei em São José do Rio Preto e Ilha Solteira, com quem pude e posso compartilhar conhecimentos e cumplicidade: Brunão, Elton, Juliana, Luiz Orlando, Raphael, Eliza, Diego, Marcelo, Bruna, Danitielle, Rafael, Mamute e por último, mas não menos importante: Lilian e Glauber.

A todos os amigos que encontrei em Ribeirão Preto, que me apresentaram e descobriram comigo os novos conhecimentos, e que por um curto ou longo período formamos juntos uma nova família. São eles que muito contribuíram e ainda contribuem: Adriana, Carol, Jean, Paulinho, Helene, Lucas, Rafael, Fernando, Amanda, Adriano, Laura, Rui, Thiago, Gabi e Vitor.

Aos meus sogros Marcos e Maria Alice, à minha cunhada Alinne e aos meus avós de coração Ires e Manoel, que me acolheram generosamente no seu lar como um novo membro da família, com quem tenho o prazer de compartilhar momentos maravilhosos.

A todos os alunos, funcionários e professores da Faculdade de Medicina de Catanduva, que contribuíram para este trabalho e com quem pude conviver e aprender, especialmente à Melina que me ensinou com tanta paciência e dedicação e com quem pude construir uma profunda amizade e à Mariane, que carinhosamente me cedeu um lugar na sua casa.

A todos os funcionários da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP), que contribuem para fazer o nosso ambiente mais agradável com seu trabalho e com sua simpatia, especialmente à nossa querida secretária da Pós-graduação em Psicobiologia: Renata, que sempre me acolheu e aconselhou com toda paciência e dedicação, com quem tive o imenso prazer de conviver durante todo o mestrado.

A todos os professores da USP pelas suas aulas maravilhosas, por compartilharem seus conhecimentos tão valiosos com dedicação e respeito, especialmente ao Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre, que acompanha esse trabalho desde o início, supervisionando e corrigindo de maneira impecável cada linha e conceito que escrevemos ao longo desses dois anos, que sempre me recebeu em sua sala com um respeito inigualável e a Prof. Dra. Claudia Maria Padovan, que me recebeu sempre com muita simpatia, disponibilizando seu valioso tempo em seu laboratório sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Jaime Hallak do Departamento de Neurociência e Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, por contribuir com o presente trabalho nos doando o chá de ayahuasca e moldando nossas ideias com seus conhecimentos de altíssimo nível.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão por me dar a oportunidade de fazer esse mestrado, por ceder o seu precioso tempo, com muita dedicação me recebendo em sua sala e respondendo carinhosamente às minhas dúvidas e aos meus e-mails, além de compartilhar em suas aulas e palestras o seu conhecimento espetacular.

À minha querida e admirada Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Nunes Mamede Rosa, por contribuir com a ideia que norteia o presente trabalho, por me acolher carinhosamente no seu laboratório, me orientando e compartilhando o seu conhecimento durante inúmeras reuniões, almoços e jantares ao longo desses dois anos.

Às Instituições CNPq, FAPESP e FIPA que financiaram o presente trabalho.

E por último, mas não menos importante, ao meu amado companheiro de todas as horas, meu namorado Diego, que há longos anos me acompanha em todos os momentos, com incansáveis conselhos e inúmeras discussões filosóficas. E que independente da situação me dedica seu imenso amor e paciência.

RESUMO

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.** 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se ratos tratados com chá de ayahuasca apresentam i) alterações comportamentais no campo aberto e labirinto em cruz elevado (LCE); ii) alterações na expressão do transportador de glutamato (EAAC1) no córtex pré-frontal (CPF) e no hilus do giro denteado do hipocampo (HDG). Doze grupos de ratos Wistar machos (250g, n=10/cada) foram usados. Eles receberam 2 ou 4ml/Kg de chá de ayahuasca ou água: dose única (agudo), 3 vezes/dia por 3 dias alternados (subcrônico) e 1 vez/dia por 15 dias (crônico). Trinta minutos após a última ingestão os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Vinte e quatro horas após eles foram anestesiados, perfundidos e seus encéfalos seccionados (40- μ m) no hipocampo e CPF para os experimentos de imunoistoquímica para EAAC1. Comparações estatísticas entre cada grupo tratado com ayahuasca e seu respectivo controle foram feitas utilizando o teste t de Student e consideradas significantes quando $p \leq 0,05$. Apenas a ingestão subcrônica de ayahuasca induziu redução significativa na atividade locomotora (27%) no campo aberto. No LCE nenhum dos tratamentos com ayahuasca induziu alterações significantes em ambos número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos. A ingestão subcrônica ou crônica de chá de ayahuasca induziu aumento significativo na expressão de EAAC1 no HDG (20-67%). Em contraste, no CPF a expressão de EAAC1 foi significativamente reduzida em ratos tratados com 2 ou 4ml/Kg subcronicamente ou 4ml/Kg cronicamente (17-25%). A ingestão aguda de 2ml/Kg induziu discreto aumento na expressão de EAAC1 (16%). Estes resultados sugerem que i) Ayahuasca induz alterações nas atividades locomotora e exploratória de forma dependente da dose e frequência de ingestão; ii) Ayahuasca não tem efeito no nível de ansiedade; iii) A ingestão aguda, subcrônica e crônica de ayahuasca disparam distintos mecanismos no hipocampo e CPF envolvendo a modulação da neurotransmissão glutamatérgica.

Palavras-chave: Ayahuasca, Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado (LCE), EAAC1, Hipocampo, Córtex Pré-frontal.

ABSTRACT

ZAMARRENHO, L. G. **Effect of ayahuasca beverage on the behavior of Wistar rats in the open field and elevated plus maze and on the expression of EAAC1 in the hippocampus and in the prefrontal cortex.** 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

This work aimed at investigating whether rats treated with Ayahuasca beverage show i) behavioral alterations in the open field and elevated plus maze (EPM); ii) alterations in the expression of glutamate transporter (EAAC1) in the prefrontal cortex (PFC) and in the hilus of dentate gyrus of the hippocampus (HDG). Twelve groups of male Wistar rats (250g, n=10/each) were used. They received 2ml/Kg or 4ml/Kg of ayahuasca beverage or water: only once (acute), 3 times/day for 3 days (sub-chronic) or once/day for 15 days (chronic). Thirty minutes after the last ingestion the animals were submitted to behavioural tests. After 24 hours they were anaesthetized, perfused and their brains sectioned (40- μ m) in the hippocampus and PFC for immunohistochemistry (IH) detection of EAAC1. Comparisons between ayahuasca and control groups used Student t test. Significance was set at $p \leq 0.05$. Only sub-chronic ingestion of Ayahuasca induced a decrease in locomotor (27%) activity in the open field. On the EPM all treatments with Ayahuasca induced no significant increase in both number of entries and time spent in the open arms. The sub-chronic and chronic treatments with Ayahuasca induced a significant increase in EAAC1 expression in the HDG (20-67%). In contrast, in the PFC the expression of EAAC1 was significantly decreased in rats treated with 2 or 4ml/Kg sub-chronically or 4ml/Kg chronically (17-25%). Acute ingestion of 2ml/Kg induced a smaller increase in EAAC1-IC (16%). These results suggest that i) Ayahuasca changes the locomotor and exploratory activities in a way depending the dose and frequency of ingestion; ii) Ayahuasca does not have effect on the level of anxiety; iii) Acute, sub-chronic or chronic ingestion of Ayahuasca beverage trigger distinct mechanisms in the PFC and hippocampus involving the modulation of glutamate neurotransmission.

Keywords: Ayahuasca, Open field, Elevated Plus Maze (EPM), EAAC1, Hippocampus, Prefrontal Cortex.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. O chá de ayahuasca.....	13
1.1.1. Expansão do uso do chá de ayahuasca.....	13
1.2. Mecanismo de ação do chá de ayahuasca.....	15
1.2.1. Interação entre os componentes do chá de ayahuasca.....	15
1.2.2. Efeitos subjetivos do chá de ayahuasca.....	16
1.2.3. Efeitos do chá de ayahuasca sobre o comportamento.....	16
1.2.4. Efeitos fisiológicos.....	18
1.3. Ayahuasca e sua ação neuroquímica.....	19
1.3.1. Ação da DMT.....	19
1.3.2. Ação das β-carbolinas.....	20
1.4. Ayahuasca e o Sistema Nervoso Central.....	21
1.4.1. Formação hipocampal.....	23
1.4.2. Amígdala.....	24
1.4.3. Córtex pré-frontal (CPF).....	25
1.5. O chá de ayahuasca e as monoaminas.....	26
1.5.1. Serotonina, harmina e DMT.....	27
1.5.1.2. Serotonina e glutamato.....	27
1.6. O chá de ayahuasca e o glutamato.....	29
1.6.2. Transportadores de glutamato.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivo geral.....	34

2.2. Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Animais.....	35
3.2. O chá de ayahuasca.....	35
3.2.1. <i>Origem e composição</i>	35
3.2.2. <i>Volume administrado</i>	36
3.3. Procedimentos experimentais.....	37
3.3.1. <i>Tratamento dos animais</i>	37
3.3.2. <i>Testes comportamentais</i>	38
3.3.2.1. <i>Campo aberto (arena)</i>	39
3.3.2.2. <i>Labirinto em cruz elevado (LCE)</i>	39
3.3.2.3. <i>Análise dos resultados comportamentais</i>	40
3.3.3. <i>Sacrifício e perfusão</i>	40
3.3.4. <i>Seccionamento dos encéfalos</i>	41
3.3.5. <i>Procedimento de imunoistoquímica</i>	41
3.3.6. <i>Quantificação dos neurônios imunopositivos</i>	42
3.3.6.1. <i>Análise dos resultados</i>	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Campo Aberto (Arena).....	44
4.1.1. <i>Atividade locomotora de ratos tratados com Ayahuasca</i>	44
4.1.2. <i>Atividade exploratória em ratos tratados com Ayahuasca</i>	51
4.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	58

4.2.1. Níveis de ansiedade em ratos tratados com Ayahuasca.....	58
4.3. Imunoistoquímica.....	60
4.3.1. Expressão de EAAC1 no HGD de ratos tratados com Ayahuasca.....	60
4.3.2. Expressão de EAAC1 no CPF de ratos tratados com Ayahuasca.....	65
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1. Variabilidade entre os estudos que utilizam o chá de ayahuasca.....	70
5.2. Efeitos do chá de ayahuasca sobre as atividades locomotora e exploratória de ratos Wistar.....	72
5.3. Efeitos do chá de ayahuasca sobre os níveis de ansiedade de ratos Wistar.....	78
5.4. Efeito do chá de ayahuasca sobre a expressão de EAAC1 no HGD e CPF.....	80
6. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. O chá de ayahuasca

O chá, cujo nome mais utilizado é ayahuasca também é conhecido como *caapi*, *yage* e *hoasca* (sua tradução para o português) e o seu significado é “vinho das almas” ou “vinho dos mortos”. Ele é feito a partir da decocção de várias espécies vegetais, mas principalmente das folhas da espécie *Psychotria viridis*, que contém N,N-dimetiltriptamina (DMT) e do cipó da espécie *Banisteriopsis caapi*, que contém β -carbolineas (MCKENNA et al., 1984; SPRUCE, 1873). Não se sabe exatamente quando o chá começou a ser utilizado, porém artefatos encontrados no Equador apontam para épocas relativamente antigas, próximas de 2000 a.C. (NARANJO, 1986). Outra evidência de sua antiguidade é a sua utilização por inúmeras tribos amazônicas endêmicas e por populações indígenas mestiças no Peru, Colômbia e Equador (SCHULTES, 1957). Os indígenas e as populações mestiças utilizam o chá em rituais xamânicos como uma importante ferramenta para o diagnóstico de doenças. Seus rituais são relacionados à cura, à libertação, ao encontro com espíritos ancestrais, magia e contato com o sobrenatural (LUNA, 1984; MCKENNA et al., 1998). Durante a década de trinta, o uso do chá foi adotado por três movimentos religiosos sincréticos no Brasil: a União do Vegetal (UDV), a Barquinha e o Santo Daime, nas quais a forma de utilização do chá é mais parecida com a eucaristia cristã (CALLAWAY et al., 1999; GROB et al., 1996; MCKENNA et al., 1998).

1.1.1. Expansão do uso do chá de ayahuasca

Até meados da década de trinta, o uso ritualístico do chá se restringia a pequenas comunidades indígenas e mestiças (MCKENNA et al., 1998). No entanto, a partir de 1930 o chá começou a se tornar mais conhecido a partir da fundação da primeira doutrina ayahuasqueira, chamada “Santo Daime”. Da mesma forma que o “Santo Daime”, a

“Barquinha” e a “União do Vegetal” também foram fundadas na cidade Rio Branco, capital do Acre.

As três religiões ayahwasqueiras foram fundamentais para o processo de expansão do uso do chá de ayahwasca e para o crescimento do interesse científico pelo mesmo. A “Barquinha” se originou em 1945, como uma vertente do “Santo Daime” e dentre as três foi a que menos se expandiu, com seus templos ocupando ainda hoje regiões apenas de Rio Branco, onde seus seguidores constituem no máximo 1000 indivíduos. Os pesquisadores acreditam que sua pouca expansão se deve ao caráter do seu ritual, muito próximo aos rituais indígenas xamans, diferente dos rituais do “Santo Daime”, mais vinculado ao cristianismo; e da UDV, que incorporou o espiritismo europeu (MACRAE, 2004).

Por outro lado, as outras duas doutrinas se expandiram não somente para todo o Brasil, como também para o exterior. Na década de 80 a doutrina de “Santo Daime” foi fundada em várias metrópoles do sudeste como Rio de Janeiro, São Paulo, Florianópolis e Belo Horizonte, além de alguns distritos rurais. Na década de 90 se expandiu para a Europa, Estados Unidos e Japão. Hoje a maior igreja do Santo Daime (Centro Eclético Fluente Luz Universal Raimundo Irineu Serra -CEFLURIS), que segue os ensinamentos do Mestre Irineu (fundador da doutrina), é constituída por pelo menos 5000 seguidores ao redor do mundo. A UDV foi a última doutrina a ser fundada, em 1961, porem a que mais se expandiu. Inicialmente para os centros urbanos do Brasil e mais tarde para a América do Norte e para a Europa, atingindo por volta de 8000 seguidores ao redor do mundo (MACRAE, 2004).

Com a difusão das doutrinas o chá de ayahwasca começou a atrair a atenção de pesquisadores e autoridades. Dessa forma, em 1985 no Brasil, a *B. caapi* (uma das espécies vegetais que constituem o chá de ayahwasca) foi classificada como uma substância proibida pela Divisão Nacional de Medicamentos (DIMED). Após encontros extensivos com as comunidades ayahwasqueiras brasileiras, um Grupo de Trabalho (GT), proposto pelo Conselho Federal de Entorpecentes (CONFEN), recomendou a suspensão

definitiva da proibição da *B. caapi* e a autorização de seu “uso ritual e religioso”. Essas recomendações foram aprovadas em uma reunião oficial do CONFEN em 1987 (LABATE; FEENEY, 2012). A aprovação teve implicações importantes não somente no Brasil, mas globalmente, uma vez que é a primeira vez em mais de 1600 anos de história, que um governo autorizou a utilização de uma droga alucinógena para religiões constituídas por indivíduos que não são indígenas (GROB, et al., 1996; MCKENNA et al., 1998).

1.2. Mecanismo de ação do chá de ayahuasca

1.2.1. Interação entre os componentes do chá de ayahuasca

O chá de ayahuasca é preparado a partir da decocção de várias espécies vegetais, geralmente com a casca da espécie *Banisteriopsis caapi* e a adição de uma mistura de outras espécies vegetais, que na maioria das vezes são rubiáceas (família Rubiaceae) do gênero *Psychotria*. As folhas da espécie *Psychotria viridis* são comumente utilizadas, sendo raramente substituídas por espécies da mesma família, as quais contêm exatamente os mesmos princípios ativos. Dependendo do tipo de ritual outras espécies podem ser adicionadas a estas, como as do gênero Solanaceae, exemplificado pelo tabaco (MCKENNA et al., 1998).

Baseado nas principais espécies utilizadas foi constatado que, as folhas da *Psychotria viridis* contém a substância psicoativa N,N-dimetiltriptamina (DMT), com efeito agonista nos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C} e 5-HT_{1A} (RIBA et al., 2002) e a casca do cipó da *Banisteriopsis caapi* é rica em alcalóides derivados da β-carbolina: a harmina, a harmalina e tetrahydroharmina (THH), com propriedades inibidoras da enzima monoamina oxidase (MAO) (MCKENNA et al., 1984; SPRUCE, 1873).

A DMT é inativa via oral, já que é degradada rapidamente pela MAO-A periférica. Sendo assim, evidências tem demonstrado que os efeitos alucinógenos do chá de

ayahuasca se devem em parte à ação dos alcalóides β -carbolinas (harmina, harmalina e tetrahydroharmina-THH) presentes na espécie *Banisteriopsis caapi* (YRITIA et al., 2002), uma vez que eles agem primariamente inibindo a MAO periférica, o que permite a ação da DMT administrada por via oral. Este composto atravessa a barreira hematoencefálica atuando no Sistema Nervoso Central, onde provoca efeitos alucinógenos (MCKENNA, 2004; RIBA et al., 2003).

1.2.2. Efeitos subjetivos do chá de ayahuasca

O chá de ayahuasca é considerado alucinógeno por causar efeitos subjetivos em seus usuários. Dentre eles, alterações na sensibilidade somática, como aumento da sensibilidade da pele; alterações na percepção visual, como distorções no campo visual com os olhos abertos e visões mais ou menos elaboradas com os olhos fechados; alterações na percepção auditiva, caracterizadas por modificações de sons externos; flutuações de humor, com sentimentos que variam de tristeza a excitação; prejuízos cognitivos, como dificuldade em focar a atenção; alterações nos estados de consciência, entre outros (MCKENNA et al., 1998; RIBA et al., 2001, 2002, 2003, 2006; STRASSMAN, 1996). O conjunto destes efeitos dura em média de 4 a 6 horas e atinge seu pico aproximadamente entre 90 e 120 minutos após a ingestão do chá (MCKENNA et al., 1998). Apesar dos efeitos psicoativos descritos, estudos com voluntários que utilizam o chá por longo prazo não detectaram danos cognitivos ou psiquiátricos (BOUSO et al., 2012; RIBA et al., 2003).

1.2.3. Efeitos do chá de ayahuasca sobre o comportamento

Avaliações psicológicas e psiquiátricas demonstraram efeito benéfico do chá de ayahuasca em participantes da UDV que apresentavam histórico de uso de drogas ilícitas, ansiedade patológica, depressão maior e agressividade antes de sua filiação à seita. Estes

usuários, entrevistados em estado de abstinência destas drogas e sem recaídas, relataram que o uso do chá levou à perda de interesse pelo uso de álcool, tabaco e mesmo cocaína, além de mudanças comportamentais significativas. Os mesmos não apresentavam mais o perfil de ansiedade patológica e depressão e estavam menos agressivos e autodestrutivos, demonstrando um comportamento mais reflexivo e gregário. De acordo com os autores, apesar de estas observações não serem desvinculadas do aspecto religioso da UDV, a possibilidade da ação do chá ser relevante por si só não pode ser descartada, uma vez que os indivíduos estudados na pesquisa utilizaram o chá sistematicamente durante 14 anos, o que pode sugerir ainda que o chá não apresenta efeito deletério sobre as funções psicológicas (GROB et al., 1996). Entretanto, os autores enfatizam a importância da realização de estudos mais aprofundados sobre os efeitos da ayahuasca.

Santos et al. (2007) descreveram o poder ansiolítico do uso crônico do chá, observado em frequentadores do Santo Daime, e apontaram para a possibilidade do uso terapêutico dessa substância. Mais recentemente Bouso et al. (2012) estudaram, durante um ano, o efeito da ayahuasca em usuários de longo prazo sobre vários aspectos como personalidade, psicopatologias, neuropsicologia, atitudes de vida e bem-estar psicossocial e não obtiveram evidências de alterações patológicas. Observaram ainda que os participantes que utilizaram o chá obtiveram escores maiores em testes psicológicos positivos quando comparados aos controles, o que indica maior capacidade adaptativa ao seu ambiente. Apesar dos resultados encontrados, os autores afirmam a existência de uma necessidade crescente de estudos que investiguem participantes que utilizaram o chá durante muito tempo e abandonaram seu uso recentemente.

Estudos experimentais em ratos Wistar demonstraram que a administração crônica do chá de ayahuasca via gavagem resultou em uma diminuição na quantidade de nicotina ingerida pelos animais adictos a esta substância, além de efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado (LCE), capaz de anular o efeito ansiogênico da abstinência de nicotina (COUTINHO DA SILVA; GODINHO, 2009). No mesmo estudo os autores observaram os

animais no campo aberto (arena) e não encontraram alterações na locomoção e exploração, provavelmente pelo fato de suas observações neste teste terem duração de apenas três minutos. Castro-Neto et al. (2013) observaram ratos Wistar no campo aberto logo após a administração do chá, durante 60 minutos. Os autores observaram que 10 minutos após a administração houve aumento no comportamento exploratório e, logo após esse período, um aumento na locomoção acompanhado de movimentos orais e mastigatórios. Esse aumento na locomoção, observado também por Fontanilla et al. (2009), evoluiu para a perda de força nos pés, base alargada e olhos semi-fechados, 30 minutos após a administração de ayahuasca. Essas alterações foram reduzindo progressivamente até que 60 minutos após a administração todos os animais tinham seus comportamentos normalizados.

1.2.4. Efeitos fisiológicos

Adicionalmente aos efeitos psicoativos da ayahuasca, podem ocorrer náuseas, vômito e diarreia, efeitos fisiológicos interpretados como “purificadores” no contexto religioso (MCKENNA et al., 1998). Estes efeitos purgativos do chá podem ser causados pelo aumento dos níveis de serotonina (5-HT) não metabolizada como consequência da inibição da MAO-A pela harmina e harmalina. O vômito pode ser devido à estimulação excessiva do nervo vago pela 5-HT presente no SNC, enquanto a diarreia pode ser devida ao aumento da motilidade intestinal causada pela 5-HT periférica em excesso (CALLAWAY et al., 1999). Diferentes estudos relatam ainda efeitos cardiovasculares como aumento nos batimentos cardíacos e da pressão arterial, também em resposta ao acúmulo de catecolaminas não metabolizadas (CALLAWAY et al., 1999; STRASSMAN, 1996). Entretanto, os estudos de Riba et al. (2003) demonstraram apenas moderada elevação dos parâmetros cardiovasculares, enquanto a pressão sanguínea apresentou aumento significativo em relação ao controle. Adicionalmente, foram descritas alterações neuroendócrinas com o uso

crônico do chá de ayahuasca como o aumento dos níveis de prolactina, hormônio de crescimento e cortisol (CALLAWAY et al., 1999; STRASSMAN, 1996).

1.3. Ayahuasca e sua ação neuroquímica

1.3.1. Ação da DMT

A DMT é uma substância endógena encontrada em vários tecidos do organismo e na urina de mamíferos, inclusive do homem (RAISANEN; KARKKAINEN, 1979; STRASSMAN, 2001). Recentemente a DMT foi encontrada na glândula pituitária de ratos machos Wistar (BARKER et al., 2013), onde seria produzida e liberada em pequenas quantidades e de forma cíclica, participando da fase REM do sono (CALLAWAY, 1988).

Ainda não é conhecido o receptor natural ao qual a DMT se liga, mas alguns autores acreditam que esta substância, quando sintetizada em condições adequadas, seria capaz de produzir efeito ansiolítico natural através da interação com os chamados receptores *trace amine* (TA), uma vez que esses receptores são ativados por triptaminas endógenas presentes em baixas concentrações no SNC (JACOB; PREST, 2005). Segundo estes autores a DMT apresenta afinidade pelos receptores TA. Recentemente Fontanilla et al. (2009) demonstraram afinidade entre a DMT e os receptores sigma-1 e argumentam que este composto seria um agonista natural desses receptores e responsável pela modulação da sua atividade. Segundo Mavlyutov et al. (2013), os receptores sigma-1 estão relacionados à modulação da atividade de motoneurônios em ratos.

Com o objetivo de conhecer os receptores aos quais a DMT exógena se ligaria, vários estudos deram início a investigações sobre uma possível afinidade da DMT pelos receptores serotoninérgicos e discutiram sua ação como agonista pleno (SMITH et al., 1998), agonista parcial (CORY et al., 1987; RABIN et al., 2002) ou até mesmo antagonista nestes receptores (DELIGANIS et al., 1991). Posteriormente, Riba et al., (2002)

demonstraram interação da DMT como agonista nos receptores 5-HT_{2A/2C} e 5-HT_{1A} (autoreceptores) de forma equilibrada, uma vez que a redução da ligação de DMT em 5-HT_{1A} ocorreu paralelamente ao aumento de sua ligação em 5-HT_{2A}. Embora de acordo com essa hipótese, Jacob e Prest (2005) reforçam o fato de que os efeitos induzidos pela administração exógena de DMT se devem em parte pela ativação dos receptores TA.

A partir da associação dos efeitos alucinógenos da DMT à sua interação com receptores 5-HT, iniciaram-se estudos na busca de modelos experimentais de psicose, nos quais a DMT foi utilizada como agonista 5-HT_{2A} e a S-Ketamina como antagonista NMDA (HEEKEREN et al., 2008). Os autores observaram que ambas as substâncias podem ser utilizadas para induzir um quadro psicótico como a esquizofrenia, sendo os efeitos da DMT mais relacionados aos sintomas positivos da doença, enquanto os efeitos da S-Ketamina relacionados aos sintomas negativos. Estas observações são reforçadas pelos achados anteriores de Riba et al. (2002) demonstrando que a DMT possui efeito agonista em receptores dopaminérgicos do tipo D₂. Mais recentemente tem sido discutido que os efeitos psicoativos da DMT não podem ser explicados apenas por sua ação direta em receptores serotoninérgicos ou dopaminérgicos, mas também por sua ação em cascata desencadeada por mecanismos intracelulares complexos (COZZI et al., 2009). Os achados obtidos até o momento mostram a importância de estudar as interações ainda desconhecidas da DMT no SNC.

1.3.2. Ação das β -carbolinas

No chá de ayahuasca estão presentes os alcaloides harmina, harmalina e tetrahydroharmina (THH), derivados das β -carbolinas (MCKENNA et al., 1984; SPRUCE, 1873). Estes alcalóides, com propriedades inibidoras da enzima monoamina oxidase (MAO), inibem preferencialmente a MAO-A (WANG et al., 2010), cujos principais substratos são as monoaminas incluindo a serotonina, a dopamina e a noradrenalina (BRIERLEY; DAVIDSON,

2012; SCHWARZ et al., 2003). Dessa forma, no SNC as β -carbolinas presentes no chá são responsáveis pelo aumento dos níveis destas monoaminas na fenda sináptica (CALLAWAY et al., 1999).

Dentre as três β -carbolinas encontradas no chá a harmina é a mais abundante (CALLAWAY et al., 1999; WANG et al., 2010). Evidências experimentais tem demonstrado que este composto inibe preferencialmente a MAO-A (WANG et al., 2010), possui afinidade moderada pelos receptores 5-HT_{2A} (GLENNON et. al., 2000) e alta afinidade pelos sítios I₁ e I₂ dos receptores imidazoline (HUSBANDS et. al., 2001). Devido às suas propriedades farmacológicas no SNC a harmina se tornou foco de vários estudos terapêuticos, nos quais foi demonstrada sua ação antidepressiva atenuando vários comportamentos relacionados a esta patologia (FARZIN; MANSOURI, 2006; FORTUNATO et al., 2010). Adicionalmente, evidências experimentais tem demonstrado sua ação antioxidante no córtex pré-frontal e hipocampo diminuindo a peroxidação lipídica e protéica pelo aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase (RÉUS et al., 2010), além de aumentar os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) nestas regiões encefálicas (FORTUNATO et al., 2010). Recentemente, através de testes *in vitro* e *in vivo*, Li et al. (2011) verificaram que a harmina atua regulando a expressão gênica de transportadores de glutamato gliais aumentando a expressão de EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1. Este efeito torna a harmina um composto com potencial terapêutico visando a modulação das concentrações de glutamato na fenda sináptica, as quais estão alteradas nas doenças neurológicas e psiquiátricas (LI et al., 2011).

1.4. Ayahuasca e o Sistema Nervoso Central

A partir das observações dos efeitos gerais produzidos pela ayahuasca verificou-se que atua sobre o sistema de percepção, a expressão das emoções e os processos cognitivos (MCKENNA et al., 1998; RIBA et al., 2001, 2002, 2003, 2006), além de produzir

alterações endócrinas, cardiovasculares e gastrointestinais (CALLAWAY et al., 1999; MCKENNA et al., 1998).

O chá de ayahuasca parece atuar em diversas estruturas encefálicas. Utilizando tomografia eletromagnética de baixa resolução (LORETA) Riba et al. (2004) verificaram que a ingestão do chá de ayahuasca alterou a atividade da junção temporo-parieto-ocipital, do córtex temporo-medial e de regiões fronto-mediais. Estas observações sugerem que os efeitos da ayahuasca envolvem a ativação de áreas corticais de associação unimodal relacionadas à percepção somatosensorial, auditiva e visual; do córtex associativo heteromodal; e de regiões do sistema límbico envolvidas na integração de informações sensoriais multimodais, nos processos relacionados à memória e às emoções. Evidências experimentais recentes reforçam o envolvimento do sistema límbico nos efeitos centrais da ayahuasca ao demonstrarem que a administração aguda do chá em ratos aumenta a concentração de monoaminas em estruturas límbicas, principalmente na amígdala (CASTRO-NETO et al., 2013). Assim, estas estruturas podem responder por alguns dos efeitos do chá sobre o SNC, uma vez que o sistema límbico desempenha grande papel na integração de informações extero e interoceptivas atuando na conexão entre as áreas corticais sensitivas de associação, os centros endócrinos e autônomos subcorticais e o córtex pré-frontal, mediando respostas comportamentais e fisiológicas relacionadas às emoções (AFIFI; BERGMAN, 2008). As estruturas do sistema límbico estão também relacionadas a aspectos cognitivos complexos como a aprendizagem e a memória (MACHADO, 2006). Neste contexto a formação hipocampal e a amígdala são consideradas estruturas-chave que medeiam as principais funções do sistema límbico, uma vez que recebem projeções do córtex límbico associativo, área relacionada ao processamento de informações provenientes de regiões encefálicas superiores, de outras áreas corticais associativas e de áreas sensoriais superiores (MARTIN, 2003).

1.4.1. Formação hipocampal

A formação hipocampal consiste em três regiões: o hipocampo, o giro denteado e o subículo. Essas regiões são contínuas e seguem a seguinte sequência quanto à localização espacial: hipocampo, giro denteado e subículo. (AFIFI; BERGMAN, 2008; MACHADO, 2006; MARTIN, 2003). A formação hipocampal possui conexão recíproca com o córtex entorrinal, sendo que as informações que chegam a esta estrutura são enviadas ao giro denteado, de onde se projetam para a área CA3 e CA1 do hipocampo e então para o subículo. Desta região as informações são levadas de volta ao córtex entorrinal. As vias eferentes do córtex entorrinal divergem para regiões superiores como o córtex pré-frontal, córtex orbito-frontal, giro para-hipocampal, giro cingulado e córtex insular (AFIFI; BERGMAN, 2008; MARTIN, 2003). Assim, a partir de sua conexão com o córtex entorrinal o hipocampo recebe e integra informações provenientes de várias regiões encefálicas, inclusive do córtex pré-frontal, participando da modulação comportamental (BRANDÃO, 2004).

Os neurônios localizados no hipocampo e no subículo originam também o fórnix, um feixe de fibras que se projeta para outras regiões subcorticais telencefálicas e diencefálicas. Dentre elas podemos evidenciar o núcleo septal do mesencéfalo por ser uma região que, em ratos, parece regular comportamentos motivados a partir de projeções colinérgicas e GABAérgicas que chegam ao hipocampo e modulam sua atividade (MARTIN, 2003). Tem sido descrito que o sistema septo-hipocampal está envolvido na ansiedade relacionada a estímulos aversivos. Através de ligações diretas com o hipocampo, a amígdala exerce influência sobre o sistema septo-hipocampal desempenhando um importante papel sobre a expressão de aspectos relacionados à ansiedade (BRANDÃO, 2004).

Acredita-se que a formação hipocampal esteja envolvida na consolidação da memória explícita (declarativa), no reconhecimento consciente de fatos e na formação da memória espacial (MARTIN, 2003). Além disso, a estimulação do hipocampo produz alterações comportamentais, endócrinas e viscerais, e de funções relacionadas à atenção e

à exploração visual associada à ansiedade (AFIFI; BERGMAN, 2008). Esta região tem sido um dos principais focos dos estudos sobre os efeitos do chá de ayahuasca, tanto em um contexto geral (CASTRO-NETO et al., 2013) quanto específico, na ação da harmina (FORTUNATO et al., 2010; RÉUS et al., 2010).

1.4.2. Amígdala

Da mesma forma que o hipocampo, a amígdala também recebe informações complexas de áreas corticais associativas. Os circuitos da amígdala estão preferencialmente envolvidos na modulação de comportamentos emocionais. A amígdala, por ser constituída por um complexo de núcleos que diferem em morfologia e função, é muitas vezes referida como complexo amigdalóide. Estes núcleos podem ser divididos em três grupos principais: basolateral, central e corticomedial (MARTIN, 2003).

O núcleo basolateral está envolvido na atribuição de significado a um estímulo, uma vez que recebe informações sobre características particulares deste estímulo por meio de fibras aferentes provenientes de áreas corticais sensoriais e associativas. A maioria de suas fibras eferentes se projeta direta ou indiretamente ao córtex cerebral sendo que suas fibras diretas chegam ao córtex pré-frontal, córtex límbico associativo e também ao hipocampo, originando uma via importante no processo de aprendizagem emocional de um estímulo complexo ou na aprendizagem em relação ao contexto no qual o estímulo emocional foi experimentado (MARTIN, 2003). Suas projeções corticais indiretas ocorrem a partir da via amígdalafugal ventral, a qual faz conexões com núcleos talâmicos como o núcleo dorsomedial, que se projeta para o córtex pré-frontal e para o hipotálamo. Esta via também faz conexões com neurônios colinérgicos mesencefálicos (núcleo basal ou de Meynert) de onde partem fibras para regiões corticais. Os neurônios do núcleo basolateral se projetam ainda para o núcleo central da amígdala, responsável pela mediação de respostas comportamentais por suas conexões diretas com núcleos parassimpáticos do tronco

encefálico. O núcleo basolateral também está envolvido na mediação do sistema nervoso autônomo por meio de suas conexões com o hipotálamo lateral, núcleo relacionado ao abuso e dependência de drogas (MARTIN, 2003; MACHADO, 2006).

Dessa forma, o complexo amigdalóide recebe grande número de aferências exteroceptivas (olfatórias, somatossensitivas, auditivas e visuais), que se integram aos estímulos interoceptivos provenientes de diversas áreas. A maioria de suas conexões é recíproca e a maior parte de suas fibras eferentes termina em núcleos que regulam funções endócrinas e autônomas, enquanto uma porção destas fibras estabelece conexões eferentes com regiões do neocórtex (AFIFI; BERGMAN, 2008). Assim, a amígdala atua de forma conjunta com várias regiões importantes do sistema límbico como o córtex cerebral, mediando aspectos emocionais relacionados a experiências e memórias. A amígdala também está relacionada à depressão, ansiedade e ao abuso de drogas, a partir de suas conexões com o hipotálamo e o estriado ventral (MACHADO, 2006).

Considerando o contexto do presente estudo, achados experimentais demonstraram que a administração do chá de ayahuasca induziu alterações significantes na concentração de monoaminas no complexo amigdalóide (CASTRO-NETO et al., 2013).

1.4.3. *Córtex pré-frontal (CPF)*

O CPF pode ser dividido em três regiões: dorsolateral, ventromedial e medial superior. Acredita-se que esta estrutura desempenhe um importante papel no julgamento, nas decisões e em comportamentos afetivos. Especificamente, a região dorsolateral está associada à memória de trabalho, distribuição da atenção e velocidade de processamento; enquanto a área ventromedial está associada principalmente às decisões e à emoção; e a área medial superior à motivação, iniciação do comportamento e também à emoção (AFIFI; BERGMAN, 2008).

O CPF recebe aferências dos córtices de associação do lobo oposto, do hipotálamo, tálamo medial e amígdala. Assim, recebe informações de todas as modalidades sensitivas, dos estados emocionais e motivacionais (AFIFI; BERGMAN, 2008). As vias eferentes se convergem no córtex límbico associativo e são direcionadas à amígdala e ao hipocampo. A amígdala associa as informações recebidas do CPF a um estímulo emocional particular e organiza a resposta comportamental a este estímulo. O hipocampo recebe informações sensoriais mais integradas e participa da aprendizagem relacionada ao contexto em que o estímulo foi apresentado (MACHADO, 2006; MARTIN, 2003).

Considerando o envolvimento do CPF nas alterações cerebrais que ocorrem nas doenças neurológicas e psiquiátricas e o contexto do presente estudo, esta estrutura vem sendo amplamente investigada com relação à sua participação nos efeitos centrais do chá de ayahuasca, principalmente devido aos efeitos antidepressivo e antioxidante da harmina (FORTUNATO et al., 2010; RÉUS et al., 2010).

1.5. O chá de ayahuasca e as monoaminas

São conhecidas as seguintes monoaminas: dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina, melatonina e histamina. As três primeiras pertencem ao grupo das catecolaminas; a serotonina, assim como a melatonina, pertence ao grupo das triptaminas e a histamina é um derivado do aminoácido histidina. Os neurônios monoaminérgicos são constituídos por uma rede extremamente ramificada de terminais que podem se estender a regiões muito distantes do corpo celular. Assim, apesar do número relativamente pequeno de neurônios monoaminérgicos, seus terminais se distribuem por quase todo o SNC (MACHADO, 2006).

Como mencionado anteriormente, uma vez que a ayahuasca possui em sua composição os compostos β -carbólicos (IMAO), os quais contribuem para o aumento das monoaminas na fenda sináptica (CALLAWAY et al., 1999), e a DMT, com ação agonista em

receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos (RIBA et al., 2002), as vias monoaminérgicas podem estar diretamente relacionadas aos efeitos do consumo do chá de ayahuasca. Especificamente as conexões para o sistema límbico e regiões corticais parecem ser extremamente relevantes em manter a homeostasia das percepções, das emoções e das respostas comportamentais, além de exercer papel modulador sobre as funções superiores (MARTIN, 2003).

1.5.1. Serotonina, harmina e DMT

As projeções serotoninérgicas que chegam ao sistema límbico são provenientes dos núcleos dorsal e medial da rafe, localizados na formação reticular do tronco encefálico (da região medial do bulbo ao mesencéfalo), de onde ascendem e estabelecem sinapses com neurônios da amígdala, formação hipocampal, córtex cerebral e áreas do estriado. Drogas que atuam no bloqueio dos mecanismos de recaptação de serotonina são comumente utilizadas no tratamento da depressão (MARTIN, 2003). A harmina, por exemplo, começou a ser estudada visando esta aplicação terapêutica devido ao seu efeito como potente inibidor da MAO-A e consequentemente aumentando os níveis de serotonina na fenda sináptica (FORTUNATO et al., 2010; RÉUS et al., 2010). Adicionalmente, a harmina possui afinidade moderada pelos receptores 5-HT_{2A}, cuja natureza ainda é desconhecida (GLENNON et. al., 2000). A DMT, também presente no chá de ayahuasca, atua diretamente na neurotransmissão serotoninérgica por seu efeito agonista nos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (RIBA et al., 2002).

1.5.1.1. Serotonina e glutamato

Várias evidências tem demonstrado uma relação recíproca entre a serotonina e o glutamato. A estimulação do córtex pré-frontal medial (CPFm) ativando a liberação de

glutamato nos neurônios piramidais leva à liberação de serotonina no núcleo dorsal da rafe. O aumento da serotonina extracelular neste núcleo inibe a neurotransmissão serotoninérgica pela ação deste neurotransmissor em auto receptores pré-sinápticos 5-HT_{1A}, diminuindo a liberação de serotonina em áreas como o hipocampo e o CPFm. Contrariamente, a falha na ativação dos receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos nas células piramidais do CPFm aumenta a liberação de serotonina e consequentemente do glutamato extracelular, levando a uma liberação excessiva de serotonina no núcleo dorsal da rafe (ALTIERI et al., 2012; COPLAN et al., 2014; TAO et al., 1997; VALENTINO et al., 2003). Estudos adicionais desta interação demonstraram que a ativação dos receptores 5-HT_{1A} inibe a ação do glutamato nos receptores NMDA presentes nas células piramidais do CPF, enquanto a ativação dos receptores 5-HT_{2A} atenua essa inibição, uma vez que aumenta a liberação de glutamato nessa região (YUEN et al., 2008). As observações de Calcagno et al. (2009) reforçam esta relação uma vez que enfatizam que o efeito inibitório da ativação de 5-HT_{1A} sobre 5-HT_{2A} é fundamental para a diminuição da concentração do glutamato extracelular.

A interação entre as neurotransmissões serotoninérgica e glutamatérgica tem sido demonstrada em vários mecanismos fisiológicos e patológicos. O estresse crônico, por exemplo, leva à dessensibilização dos receptores 5-HT_{2A} no CPF e consequentemente à hipofunção dos receptores NMDA, que resulta na diminuição da excitabilidade desta área cerebral (ZHONG et al., 2008). A relação entre estas neurotransmissões levando ao aumento da atividade glutamatérgica no CPF e hipocampo tem sido descrita ser fundamental para a aquisição e armazenamento da memória espacial (VAN WAARDE et al., 2011).

O conjunto das evidências relacionadas às interações entre as neurotransmissões serotoninérgicas e glutamatérgicas sobre as estruturas do sistema límbico sugerem que as vias serotoninérgicas parecem exercer uma função moduladora sobre as vias glutamatérgicas em algumas áreas cerebrais como o CPF, amígdala e hipocampo (AFIFI;

BERGMAN, 2008). Assim, é pertinente inferir que o efeito final do consumo do chá de ayahuasca nestas regiões pode estar associado a alterações na concentração de glutamato.

1.6. O chá de ayahuasca e o glutamato

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central de mamíferos (DANBOLT, 2001). É liberado a partir de neurônios pré-sinápticos e exerce seu efeito através da interação com diferentes tipos de receptores, os quais são divididos em dois grandes grupos, os receptores metabotrópicos (mGluRs) e os ionotrópicos (iGluRs). Os receptores metabotrópicos foram primeiramente descritos por Sadek et al. (1985), são acoplados a proteínas G e participam dos mecanismos de resposta intracelulares através da ativação de segundos mensageiros (KUBO; ITO, 2004). Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com seus agonistas em N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA). São proteínas transmembranas constituídas por um complexo de diferentes subunidades, em diferentes combinações, que conferem ao receptor maior ou menor permeabilidade ao influxo de íons (HOLLMANN; HEINEMANN, 1994).

A partir da ativação dos seus receptores, o glutamato participa de importantes funções fisiológicas desde o desenvolvimento cerebral, processo no qual está envolvido na migração e na diferenciação neuronal, gênese axonal e sobrevivência de neurônios (BORTOLOTTTO et al., 1999; DANBOLT, 2001); contribui para o processo de aprendizagem, no qual desempenha uma função decisiva na potenciação de longo prazo (LTP) aumentando a magnitude do potencial de ação de neurônios pós-sinápticos pelo aumento no influxo de cálcio nesses neurônios (BRANDÃO, 2004).

Em adição à sua participação em processos fisiológicos, quando em concentrações excessivas esse neurotransmissor atua como uma neurotoxina, como foi observado por Olney (1978) a partir da utilização de injeções sistêmicas de glutamato, as quais foram

capazes de causar lesões encefálicas em camundongos. Por meio de sua interação com AMPA, NMDA ou KA, a estimulação excessiva por glutamato pode resultar em morte neuronal principalmente devido ao influxo excessivo de íons cálcio, ativando cascatas intracelulares complexas que levam à formação de oxigênios reativos (ROS), compostos intermediários tóxicos para a célula (DEUTSCH et al., 2001; SATTLER et al., 1998). Vários compostos formados a partir destas cascatas, como o óxido nítrico (NO), podem ser liberados e atuar sobre as células vizinhas aumentando ainda mais a liberação de glutamato (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001).

É amplamente conhecido que a hipo ou hiperestimulação dos receptores glutamatérgicos, está envolvida em diversas doenças neurodegenerativas como epilepsia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington e Alzheimer; e transtornos psiquiátricos como depressão e esquizofrenia (AL-NUAIMI et al., 2010; PETR et al., 2014; ROTHSTEIN et al., 2009). Assim, é imprescindível dar continuidade às investigações com foco na mediação glutamatérgica com o objetivo de encontrar novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de drogas mais eficazes para o tratamento destas doenças (CHAVES et al., 2009).

Investigações a respeito dos efeitos do uso do chá de ayahuasca sobre a neurotransmissão glutamatérgica estão ainda iniciando, uma vez que a serotonina sempre foi o foco principal dos estudos já realizados. Entretanto, foi demonstrado que a morte neuronal induzida pela toxicidade glutamatérgica pode ser prevenida pelo uso da harmina, tanto por sua ação como IMAO, especificamente da MAO-A (MAHER; DAVIS, 1996), como por sua ação intracelular (HAN et al., 2005).

Considerando a importância em manter as concentrações extracelulares de glutamato em níveis fisiológicos e assim controlar sua neurotoxicidade, estudos com foco nos transportadores de glutamato são de grande importância, uma vez que estes transportadores são os principais responsáveis por regular a concentração extracelular

deste neurotransmissor (LI et al., 2011). Assim, investigar os efeitos da ayahuasca sobre os transportadores de glutamato pode ser um contexto interessante para estudar a interação das mediações serotoninérgica e glutamatérgica no complexo efeito do uso do chá.

1.6.2. Transportadores de glutamato

Existem duas famílias de transportadores de glutamato: os transportadores do tipo vesiculares (VGLUTs), os quais atuam no armazenamento do glutamato nas vesículas sinápticas; e os transportadores de amino ácidos excitatórios (EAATs), localizados na membrana plasmática de astrócitos (EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT1) e neurônios (EAAT3/EAAC1), os quais realizam a recaptação do glutamato extracelular como um mecanismo de término de ação do neurotransmissor (BENARROCH, 2010; DANBOLT, 2001). Os EAATs são proteínas transmembranas com peso molecular de aproximadamente 64 kDa e possuem mais de uma subunidade (YANG; KILBERG, 2002). Tem sido demonstrado que os EAATs são provavelmente trímeros, com 8-10 domínios transmembrana e possuem as extremidades C-terminal e N-terminal intracelulares (GRUNEWALD et al., 2002; HAUGETO et al., 1996).

Os EAAT2/GLT1 são os predominantes no encéfalo e contribuem para uma rápida remoção do glutamato liberado no meio extracelular. Embora as células da glia, especialmente os astrócitos circundantes, possuam um papel chave na recaptação do glutamato, os neurônios também contribuem para este mecanismo. Nos astrócitos o glutamato recaptado pelos EAAT2/GLT1 é convertido em glutamina, a qual é transportada de volta ao neurônio pré-sináptico e utilizada na síntese de um novo neurotransmissor (DANBOLT, 2001). Os EAATs do tipo GLT1 em ratos são os principais responsáveis por controlar as concentrações extracelulares de glutamato no SNC. Estudos sugerem que drogas capazes de aumentar a expressão de GLT1 pelos astrócitos podem ter um efeito terapêutico eficaz para várias doenças associadas ao excesso de glutamato no SNC

(REAGAN et al., 2004; ZINK et al., 2010). Neste contexto, Li et al. (2011) verificaram que a harmina possui habilidade em regular a expressão gênica dos transportadores de glutamato, aumentando a expressão dos transportadores gliais EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1.

Quanto aos transportadores neuroniais, estudos recentes verificaram que os EAAT3/EAAC1 possuem um papel fundamental no hipocampo. Eles se ligam ao glutamato liberado nas sinapses ativas atrasando sua recaptação pelos astrócitos, consequentemente modulando o tempo de ação do neurotransmissor. Adicionalmente, estes transportadores parecem modular a ativação de receptores NMDA peri-sinápticos e os processos de neuroplasticidade (SCIMEMI et al., 2010). Foi também descrito que a partir da recaptação de glutamato, o EAAC1 parece fornecer substrato para a formação de GABA em neurônios GABAérgicos (SEPKUTY et al., 2002).

Além do transporte de glutamato, o EAAC1 também atua no transporte de cisteína para o interior da célula levando à produção do antioxidante fisiológico glutathione. Ratos com deficiência de EAAC1 apresentaram atrofia cerebral progressiva (dependente de idade) devido à maior vulnerabilidade das células ao estresse oxidativo, além de apresentarem déficits comportamentais relacionados à motivação e à aprendizagem (AOYAMA et al., 2006).

Evidências experimentais têm demonstrado que alterações nos transportadores de glutamato estão envolvidas na patofisiologia de várias doenças neurológicas e psiquiátricas como epilepsia (CRINO et al., 2002), isquemia (GOTTLIEB et al., 2000) e doença de Alzheimer (MASLIAH et al., 2000). Foi observado acúmulo anormal de EAAC1 no hipocampo e no córtex pré-frontal na doença de Alzheimer (DUERSON et al., 2009). Em contraste, deficiência em EAAC1 parece estar relacionada à doença de Parkinson (AOYAMA et al., 2008).

É crescente o número de trabalhos, experimentais ou clínicos, que investigam a participação dos diversos tipos de transportadores de glutamato nas alterações cerebrais

que ocorrem nas diferentes patologias (AOYAMA et al., 2006; DUERSON et al., 2009; SCIMEMI et al., 2010). O objetivo é a busca de novos alvos terapêuticos e novos fármacos capazes de controlar estas alterações (LI et al., 2011).

No contexto do presente trabalho, o chá de ayahuasca parece alterar a expressão dos transportadores de glutamato tanto diretamente, a partir da ação da harmina sobre os transportadores GLT-1; como indiretamente, através da modulação das vias serotoninérgicas pela harmina e DMT. Assim, é provável que os mecanismos de regulação da neurotransmissão glutamatérgica pelos transportadores de glutamato estejam também envolvidos nas respostas cerebrais à ingestão do chá de ayahuasca. Entretanto, um estudo experimental mais abrangente dos efeitos do chá administrado em diferentes doses e frequência não foi ainda realizado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo geral estudar alterações comportamentais e moleculares induzidas pela administração aguda, crônica e subcrônica do chá de Ayahuasca em ratos Wistar.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos dos tratamentos agudo, crônico e subcrônico com chá de ayahuasca administrado nos volumes de 2 ml/Kg e de 4 ml/Kg sobre:

- As atividades locomotora e exploratória de ratos Wistar. Estas avaliações foram realizadas utilizando o campo aberto (arena);
- Os níveis de ansiedade de ratos Wistar. Estas avaliações foram realizadas utilizando o labirinto em cruz elevado (LCE).
- A expressão do transportador de glutamato neuronal EAAT3/EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) e hilus do giro denteado do hipocampo (HGD) de ratos Wistar. Estas avaliações foram realizadas utilizando o método de imunistoquímica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 120 ratos machos Wistar (250g), procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram devidamente transportados para a Faculdade de Medicina de Catanduva (FIPA), onde passaram por sete dias de habituação no biotério, acondicionados em caixas de polietileno (34 x 41 x 17 cm – largura x comprimento x altura), 5 animais/caixa, mantidos em sala com temperatura controlada ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12h e livre acesso a água e ração. A limpeza das caixas foi realizada três vezes por semana.

A manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos da Experimentação animal – Colégio Brasileiro da Experimentação Animal (COBEA, 1991). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Campus da USP de Ribeirão Preto (protocolo: 12.1.1847.53.1) e da Faculdade de Medicina de Catanduva (FIPA) (protocolo: 11.02.21-05).

3.2. O chá de ayahwasca

3.2.1. Origem e composição

O chá de ayahwasca utilizado neste estudo foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak, do Departamento de Neurociência e Ciência do Comportamento, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O chá foi preparado seguindo os métodos tradicionais e ritualísticos da organização religiosa “Santo Daime” de Ribeirão Preto (SP) e quimicamente analisado pela empresa THC - Pharm, Frankfurt, Alemanha, que apresentou sua composição: N, N-dimetiltriptamina (DMT) = 0,8 mg/ml e harmina (HRM) = 0,21 mg/ml.

3.2.2. Volume administrado

O volume de chá de 2 ml/Kg utilizado no presente trabalho foi baseado em artigos que utilizaram o mesmo volume em voluntários humanos (CALLAWAY et al., 1999) e em ratos Wistar (OLIVEIRA et al., 2010). Utilizamos também um volume 2x maior (4 ml/Kg) com o objetivo de verificar a ocorrência de efeitos dose dependente. É importante ressaltar que o volume de 2 ml/Kg é o mais estudado para verificar a segurança da utilização da bebida, independente das concentrações dos princípios ativos, uma vez que estas concentrações variam de acordo com a região onde o chá é preparado (CASTRO-NETO et al., 2013; MCKENNA et al., 2004).

Diante das evidências, foi estabelecido para o presente estudo a utilização de um volume padrão de chá de ayahuasca de 2 ml/Kg e um volume duas vezes maior, 4 ml/Kg, administrado via gavagem em ratos machos Wistar. A tabela 1 mostra a variação das concentrações dos principais compostos presentes no chá de ayahuasca de acordo com sua origem.

Tabela 1 – Concentrações dos principais componentes do chá de ayahuasca de acordo com sua origem, descritos na literatura. As concentrações de N,N-dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetrahydroharmina (THH) estão representadas em mg/ml.

Referência	Local	DMT	HRM	HRL	THH
Presente Estudo	Ribeirão Preto (SP)	0,8	0,21	-	-
Castro-Neto et al. (2013)	Campo Grande (MS)	0,59	5,09	0,19	0,99
Oliveira et al. (2010)	Araçoiaba da Serra (SP)	0,42	1,37	0,62	0,35
Callaway et al. (1999)	Manaus (AM)	0,24	1,7	0,2	1,07

3.3. Procedimentos experimentais

3.3.1. Tratamento dos animais

Os animais foram divididos em 12 grupos contendo 10 animais cada, sendo 6 grupos tratados e 6 grupos controles. Estes grupos foram subdivididos em grupos tratados 1 e 2 (agudos), os quais receberam uma única dose de chá de ayahuasca; grupos tratados 3 e 4 (crônicos), os quais receberam uma dose por dia do chá, durante 15 dias; e os grupos tratados 5 e 6 (subcrônicos), os quais receberam 3 doses diárias do chá com intervalo de 1 hora, em 3 dias alternados (segunda, quarta e sexta-feira), por uma única semana.

Os animais de todos os grupos experimentais foram pesados anteriormente aos tratamentos. Em seguida os animais dos grupos tratados com ayahuasca receberam, via gavagem, o chá, enquanto os animais dos grupos controle receberam, também via gavagem, o mesmo volume de água. As administrações foram realizadas da seguinte forma:

- Grupos Agudos: uma única administração, 30 minutos antes do teste.
- Grupos Crônicos: todos os dias às 11h, durante quinze dias;
- Grupos Subcrônicos: Em 3 dias alternados às 8h, 9h e 10h;

Observação: Os animais dos grupos crônicos e subcrônicos também receberam a última administração 30 minutos antes de serem submetidos aos testes comportamentais.

A tabela 2 apresenta a concentração de DMT e harmina (HRM) em mg/Kg administrada por dia em cada grupo experimental. Os grupos subcrônicos receberam três doses diárias.

Tabela 2 – Concentrações de DMT e HRM (mg/Kg) administradas em cada dia de tratamento.

Grupo	Tratamento	DMT	HRM
1	Agudo de 2 ml/Kg	1,6	0,42
2	Agudo de 4 ml/Kg	3,2	0,84
3	Crônico de 2 ml/Kg	1,6	0,42
4	Crônico de 4 ml/Kg	3,2	0,84
5	Subcrônico de 2 ml/Kg	4,8	1,44
6	Subcrônico de 4 ml/Kg	9,6	2,52

3.3.2. Testes comportamentais

O teste no campo aberto (ou arena) foi utilizado com o objetivo de avaliar o efeito dos tratamentos sobre a atividade locomotora (número de cruzamentos) e exploratória (número de levantamentos) dos animais;

O teste no labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado com o objetivo de avaliar o efeito dos tratamentos sobre o nível de ansiedade dos animais.

Foram submetidos aos testes comportamentais 20 ratos por dia (1 grupo controle e 1 grupo tratado, com 10 animais/cada), sendo que os animais foram testados de forma alternada (1 controle, 1 tratado...). Trinta minutos após a administração do chá, os animais eram colocados na arena durante 15 minutos. Ao término deste teste os animais retornavam à caixa por 5 minutos e em seguida eram submetidos ao teste no LCE durante 5 minutos. Vinte e quatro horas após o dia de teste os animais foram perfundidos.

3.3.2.1. *Campo aberto (arena)*

O teste foi realizado com o mesmo protocolo experimental utilizado previamente por Rosa et al. (2005).

Foi utilizada uma arena circular de acrílico transparente de 75 cm de diâmetro com a base dividida em 12 áreas iguais. Os animais foram colocados na região central da arena e as respostas comportamentais observadas e registradas a cada minuto durante 15 minutos:

- Para a atividade locomotora foi registrado o número de cruzamentos, quando os animais cruzavam qualquer uma das áreas da base (delimitadas por linhas) com as quatro patas (*crossings*);

- Para 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*).

3.3.2.2. *Labirinto em cruz elevado (LCE)*

O teste foi realizado com o mesmo protocolo experimental utilizado por Carvalho et al. (2005).

Para avaliar os níveis de ansiedade os animais foram testados em um labirinto em cruz com dois braços abertos e dois braços fechados, elevado a 50 cm do chão (LCE). Os animais eram colocados na região central do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e as respostas comportamentais observadas e registradas durante 5 minutos:

- O número de entradas nos braços abertos ou fechados era registrado quando o animal entrava com as quatro patas em um dos braços do labirinto;

- O tempo de permanência nos braços abertos ou fechados era cronometrado a partir do momento em que o animal entrava em um dos braços e o cronômetro era desligado quando o animal deixava o braço.

3.3.2.3. *Análise dos resultados comportamentais*

As comparações estatísticas para os comportamentos observados no campo aberto e no LCE foram feitas utilizando o teste *t Student* para amostras independentes, contido no programa *Sigma Plot*. O teste comparou a diferença entre os grupos tratados com ayahuasca e seus respectivos controles. Os resultados estão apresentados como Média + EPM para cada grupo experimental e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3.3.3. **Sacrifício e perfusão**

Ao término dos testes comportamentais todos os animais dos grupos controles ou tratados com ayahuasca foram profundamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de Uretana 25% (0,5ml/100g de peso corporal). Em seguida foi realizada a perfusão intracardiaca para a lavagem e fixação do encéfalo. Este procedimento consistiu em fazer uma incisão na região do tórax do animal, expondo seu interior. A seguir foram perfundidos com 300 ml de PBS 0,1 M (salina tamponada com fosfato - *phosphate-buffered saline*, pH 7,4) pelo ventrículo esquerdo e, simultaneamente, foi feita uma incisão no átrio direito para permitir a saída da solução de salina e a lavagem do sangue de todo o tecido perfundido. Ao final do processo foram perfundidos 200 ml de paraformaldeído 4% (PFA 4%) em PBS 0,2 M com o objetivo de fixar o tecido. Ao término desta etapa os encéfalos foram cuidadosamente retirados da caixa craniana e colocados em frascos contendo a mesma solução de PFA 4% em PBS 0,2 M por 2 horas adicionais (pós-fixação). Em seguida foram imersos em solução de sacarose (concentrações crescentes de 10%, 20% e 30% em PBS 0,1 M) por 48 a 72

horas a 4°C (crioproteção). Após este período os encéfalos foram congelados em isopentana resfriada em gelo seco e mantidos em freezer a -70°C até o seccionamento.

3.3.4. Seccionamento dos encéfalos

Vinte e quatro horas antes do seccionamento os encéfalos foram transferidos para o freezer -20°C. Em seguida foram embebidos em *Tissue Tek*® e fixados na base apropriada do criostato (*Leica*), calibrado entre -19 e -21°C. Foram retiradas secções coronais de 40 µm ao longo de todo o encéfalo (sentido ântero-posterior) e armazenadas a -20°C, em tubos *ependorf* contendo solução anticongelante (10 secções/tubo). Com o auxílio do atlas de Paxinos (1995), os tubos foram catalogados de acordo com os *plates* correspondentes às secções armazenadas.

3.3.5. Procedimento de imunoistoquímica

Para este experimento foram utilizadas secções do córtex pré-frontal (CPF) e do hilus do giro denteado (HGD) do hipocampo (3 secções/região/animal). As secções foram selecionadas de acordo com o catálogo previamente organizado e retiradas dos tubos *ependorf* correspondentes às áreas encefálicas desejadas. As secções foram colocadas em placas de acrílico contendo poços, adequadas para a realização do procedimento de imunoistoquímica *free-floating*.

Inicialmente as secções foram lavadas (6x) em solução tampão (PBS 0,01 M + *Triton* 0,15%) para a retirada da solução anticongelante. Em seguida, os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,6% em solução tampão por 10 minutos, com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena existente no tecido e impedir a marcação inespecífica e *background*. Os cortes foram lavados (5x) com solução tampão e incubados por 1 hora com soro albumina bovina (BSA, *Sigma* - A9647) a 2% em solução tampão.

Posteriormente, as secções foram lavadas em solução tampão e incubadas *overnight* com o anticorpo primário *mouse anti EAAC1* (MAB1587, *Millipore*, 1: 200).

No dia seguinte as secções foram lavadas em solução tampão (5x) e incubadas com o anticorpo secundário *anti-mouse* (*Dako*, 1: 250) por 30 minutos, novamente lavadas em tampão (5x) e incubadas com o complexo avidina-biotina (ABC, 1: 125 em solução tampão) por 1 hora para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase-biotinilada. As secções foram então lavadas (5x) e incubadas em tampão *Tris* (TB, 0,25 M) por 5 minutos e, após nova lavagem, a reação foi revelada com 3,3 - diaminobenzidina (DAB, *Sigma* D5905) diluída em TBS 0,1 M com H₂O₂ (10 g DAB: 20 ml de TBS 0,1 M: 0,3 µl H₂O₂), que precipita na cor marrom-caramelo. Após a reação as secções foram lavadas novamente em solução tampão (3x). Como controle da especificidade de ligação, uma secção de cada área foi ensaiada com a omissão do anticorpo primário.

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, diafanizadas e cobertas com *permount* e lamínula. Após a secagem foi feita a análise histológica das secções em microscópio óptico (*Axioskop 40: Carl Zeiss* - Alemanha) e fotografadas as regiões do CPF e do HGD utilizando uma câmera conectada ao microscópio (*Axiocam ICc3*) e a um computador com um *software* de aquisição e análise de imagens (*Axiovision Rel. 4.8*). As imagens foram posteriormente utilizadas para a quantificação do número de células imunopositivas (IC) para EAAC1 (EAAC1-IC) utilizando o *software Image J 1.45s* (*Rasband, W., National Institute of Health – NIH: USA, s/d*).

3.3.6. Quantificação dos neurônios imunopositivos

A quantificação das células imunopositivas foi realizada nas três secções de cada área cerebral, bilateralmente, para cada animal dos grupos controles e tratados (6 valores). Foram quantificadas as seguintes áreas: CPF e HGD. Esta contagem foi realizada utilizando o recurso ferramenta *pincel* do programa *Image J* para marcar as células imunopositivas em

todo o campo de visão, em um aumento de 200x, correspondendo a uma área fixa de 566µm x 424µm (0.24mm²). Foi calculada a média dos 6 valores encontrados.

3.3.6.1. *Análise dos resultados*

As comparações estatísticas entre as médias de células imunopositivas para EAAC1 dos grupos tratados com ayahuasca e seus respectivos controles foram feitas para cada área encefálica estudada (CPF e hilus do giro denteado, HGD), utilizando o teste *t Student* para amostras independentes, contido no programa *Sigma Plot*. Os resultados estão apresentados como Média + EPM para cada grupo experimental e as diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Campo Aberto (Arena)

4.1.1. Atividade locomotora de ratos tratados com Ayahuasca

Os gráficos 1-4 representam a atividade locomotora (exploração horizontal) registrada nos grupos controle e de animais que receberam tratamento agudo, subcrônico e crônico com 2 ml e 4 ml de chá de ayahuasca. Esta atividade foi registrada a cada minuto durante 15 minutos na arena. O gráfico 1 mostra o número total de cruzamentos registrados ao longo dos 15 minutos de teste e podemos observar que, embora o número de cruzamentos tenha sido reduzido nos animais que receberam tratamento agudo (28,4%; $t = 1,903$; $gl = 16$; $p > 0,05$) e subcrônico com 4ml/Kg (26,3%; $t = 2,36$; $gl = 18$; $p < 0,05$) de ayahuasca, esta redução foi significativa apenas no grupo subcrônico. Em contraste, o tratamento crônico com 4 ml/Kg induziu aumento não significativo em relação ao controle (17,7%; $t = -0,804$; $gl = 17$; $p > 0,05$). Nenhuma alteração foi observada nos grupos tratados com 2 ml/Kg ($p > 0,05$).

Gráfico 1 - Efeito dos tratamentos agudo, subcrônico e crônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca sobre a atividade locomotora na arena. Estão representadas as médias + EPM do número total de cruzamentos durante os 15 minutos de teste. N=8-10; * $p < 0,05$.

Estas observações foram evidenciadas quando o número de cruzamentos entre os grupos tratados e controles foram comparados em cada minuto durante os 15 minutos de teste e em blocos de tempo de 5 minutos (BTs) (gráficos 2-4). No tratamento agudo com 2 ml/Kg houve redução significativa no número de cruzamentos apenas no 1^o minuto de teste ($t = 5,184$; $gl = 16$; $p < 0,005$) e aumento no 9^o ($t = -2,237$; $gl = 16$; $p < 0,05$) e 14^o ($t = -3,613$; $gl = 16$; $p < 0,005$) minutos (gráfico 2A), o que resultou em uma redução significativa apenas nos primeiros 5 minutos na arena quando a análise foi feita em BTs (BT1: 22,6%; $t = 2,128$; $gl = 16$; $p < 0,05$) (gráfico 2C). O tratamento com 4ml/Kg reduziu o número de cruzamentos ao longo de 11 minutos na arena, embora esta tenha sido significativa apenas no 10^o ($t = 2,267$; $gl = 16$; $p < 0,05$) e 11^o ($t = 2,768$; $gl = 16$; $p < 0,05$) minutos (gráfico 2B). A análise em BTs mostrou um perfil temporal discretamente reduzido da atividade locomotora, embora não significativa (gráfico 2D).

Gráfico 2 - Efeito do tratamento agudo com 2 ml/Kg (A e C) ou 4 ml/Kg (B e D) de chá de ayahuasca sobre a atividade locomotora na arena. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do número de cruzamentos: (A e B) em cada minuto durante os 15 minutos de teste; (C e D) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos durante os 15 minutos de teste. N=8-10; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$.

O gráfico 3 mostra a atividade locomotora apresentada pelos animais dos grupos que receberam tratamento subcrônico. Podemos observar que a dose de 2 ml/Kg levou a uma redução significativa no número de cruzamentos também apenas no 1º minuto de teste ($t = 2,301$; $gl = 18$; $p < 0,05$), enquanto nenhuma alteração foi registrada em qualquer outro tempo ao longo dos 15 minutos de teste (gráfico 3A). A redução observada no 1º minuto não se refletiu em alteração significativa em BT1 na análise feita em BTs (BT1: 17%; $t = 1,305$; $gl = 18$; $p > 0,05$) (gráfico 3C). Em contraste, a dose de 4 ml/Kg de chá reduziu o número de cruzamentos nos 7 primeiros minutos na arena e esta redução foi significativa em relação aos controles no 3º ($t = 2,388$; $gl = 18$; $p < 0,05$), 4º ($t = 2,143$; $gl = 18$; $p < 0,05$) e 7º ($t = 2,652$; $gl = 18$; $p < 0,05$) minutos (gráfico 3B). A análise em BTs mostrou uma redução significativa em BT1 (24%; $t = 2,308$; $gl = 18$; $p < 0,05$) e BT2 (50%; $t = 2,649$; $gl = 18$; $p < 0,05$) (gráfico 3D).

Gráfico 3 - Efeito do tratamento subcrônico com 2 ml/Kg (A e C) ou 4 ml/Kg (B e D) de chá de ayahuasca sobre a atividade locomotora na arena. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do número de cruzamentos: (A e B) em cada minuto durante os 15 minutos de teste; (C e D) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos durante os 15 minutos de teste. N=8-10; * $p < 0,05$.

A atividade locomotora registrada nos animais que receberam tratamento crônico com ayahuasca está representada no gráfico 4. O tratamento de 2 ml/Kg não induziu qualquer alteração no número de cruzamentos em relação aos controles ao longo dos 15 minutos de teste na arena ($p>0,05$), resultando em um perfil sobreposto de curvas tanto na análise realizada minuto a minuto (gráfico 4A) como na análise em BTs (gráfico 4C). Diferentemente dos tratamentos agudo e subcrônico, a dose de 4 ml/Kg administrada cronicamente aumentou o número de cruzamentos em relação aos controles no 1º e 2º minutos de teste (gráfico 4B). Uma vez que este aumento foi significativo apenas no 2º minuto ($t = -2,151$; $gl = 17$; $p<0,05$), a análise em BTs mostrou discreto aumento em BT1 (29,8%; $t = -0,417$; $gl = 17$; $p>0,05$), embora não significativo. A partir do 3º minuto até o 14º minuto de teste não foi registrada nenhuma alteração no número de cruzamentos, Entretanto, no último minuto foi observada discreta redução significativa ($t = 2,201$; $gl = 17$; $p<0,05$) (gráfico 4B), o que não interferiu na análise em BTs onde as curvas se sobrepõem em BT2 e BT3 (gráfico 4D).

Gráfico 4 - Efeito do tratamento crônico com 2 ml/Kg (A e C) ou 4 ml/Kg (B e D) de chá de ayahuasca sobre a atividade locomotora na arena. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do número de cruzamentos: (A e B) em cada minuto durante os 15 minutos de teste; (C e D) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos durante os 15 minutos de teste. N=8-10; * $p < 0,05$.

4.1.2. Atividade exploratória em ratos tratados com Ayahuasca

Os gráficos 5-8 representam a atividade exploratória (exploração vertical) registrada nos grupos controle e de animais que receberam tratamento agudo, subcrônico e crônico com 2 ml e 4 ml de chá de ayahuasca. Esta atividade foi registrada a cada minuto durante 15 minutos na arena. A análise geral da atividade exploratória mostra que, embora não significativa, o tratamento agudo na dose de 4 ml/Kg (42,2%; $t = 1,964$; $gl = 16$; $p > 0,05$) e os tratamentos subcrônicos de 2 ml/Kg (20%; $t = 1,09$; $gl = 18$; $p > 0,05$) e 4 ml/Kg (23,9%; $t = 1,45$; $gl = 18$; $p > 0,05$) induziram redução no número total de levantamentos ao longo dos 15 minutos de teste. Em contraste, o tratamento agudo na dose de 2 ml/Kg (36,2%; $t = -1,657$; $gl = 16$; $p > 0,05$) e os tratamentos crônicos de 2 ml/Kg (15,5%; $t = -1,125$; $gl = 16$; $p > 0,05$) e 4 ml/Kg (33,7%; $t = -1,163$; $gl = 17$; $p > 0,05$) apresentaram uma tendência não significativa ao aumento no número de levantamentos (gráfico 5).

Gráfico 5 - Efeito dos tratamentos agudo, subcrônico e crônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca sobre a atividade exploratória na arena. Estão representadas as médias + EPM do número total de levantamentos durante os 15 minutos de teste. N=8-10.

A atividade exploratória em cada minuto ao longo dos 15 minutos de teste e também em blocos de tempo (BTs) para os diferentes tratamentos estão representadas nos gráficos 6-8. A dose aguda de 2 ml/Kg produziu efeito heterogêneo no número de levantamentos, com redução não significativa apenas no 1º minuto ($t = 1,831$; $gl = 16$; $p > 0,05$) e aumento significativo no 9º ($t = -2,142$; $gl = 16$; $p < 0,05$) e 14º minutos ($t = -2,288$; $gl = 16$; $p < 0,05$). Embora não significativa, o perfil geral da curva nos outros tempos registrados mostra discreto aumento na atividade exploratória (gráfico 6A). Estas observações se refletem na análise em BTs onde observamos a curva dos animais tratados discretamente acima da curva apresentada pelos animais controle em BT1 e BT3. Como esperado, observamos ainda um aumento mais pronunciado em BT2, embora não significativa ($p < 0,05$) (gráfico 6C). Efeito oposto foi observado nos animais que receberam 4 ml/Kg, onde o número de levantamentos foi reduzido ao longo de todo o período na arena embora esta redução tenha sido significativa no 8º ($t = 2,225$; $gl = 16$; $p < 0,05$), 10º ($t = 2,574$; $gl = 16$; $p < 0,05$) e 11º minutos ($t = 2,172$; $gl = 16$; $p < 0,05$) (gráfico 6B). Estes resultados se refletiram no perfil da curva apresentado pela análise em BTs em que a atividade exploratória nos animais tratados com ayahuasca foi reduzida em BT1, BT2 e BT3 ($p > 0,05$) (gráfico 6D).

Gráfico 6 - Efeito do tratamento agudo com 2 ml/Kg (A e C) ou 4 ml/Kg (B e D) de chá de ayahuasca sobre a atividade exploratória na arena. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do número de levantamentos: (A e B) em cada minuto durante os 15 minutos de teste; (C e D) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos durante os 15 minutos de teste. N=8-10; * $p < 0,05$.

A atividade exploratória analisada minuto a minuto e em BTs para os animais que receberam tratamento subcrônico com ayahuasca está representada no gráfico 7. Podemos observar que a dose de 2 ml/Kg induziu discreta redução no número de levantamentos durante os primeiros 5 minutos na arena, sendo significativa apenas no 4º minuto ($t = 2,783$; $gl = 18$; $p < 0,05$). A partir do 6º minuto o número de levantamentos permaneceu inalterado até o final do teste (gráfico 7A). Como esperado, a análise em BTs mostra uma redução não significativa em BT1 (28%; $t = 2,049$; $gl = 18$; $p > 0,05$) para os animais que receberam ayahuasca, enquanto as curvas se sobrepõem em BT2 e BT3 (gráfico 7C). Semelhante à dose de 2 ml/Kg, a dose de 4 ml/Kg também induziu redução no número de levantamentos, mas esta se manteve desde o 2º até o 9º minuto e foi significativa no 3º ($t = 2,496$; $gl = 18$; $p < 0,05$) e 7º minutos ($t = 2,199$; $gl = 18$; $p < 0,05$) (gráfico 7B). Este perfil de atividade exploratória se refletiu na análise em BTs, que se mostrou reduzida em BT1 (22%; $t = 1,474$; $gl = 18$; $p > 0,05$) e BT2 (47%; $t = 2,242$; $gl = 18$; $p < 0,05$) para os animais tratados com ayahuasca em relação aos controles, porém significativa apenas em BT2 (gráfico 7D).

Gráfico 7 - Efeito do tratamento subcrônico com 2 ml/Kg (A e C) ou 4 ml/Kg (B e D) de chá de ayahuasca sobre a atividade exploratória na arena. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do número de levantamentos: (A e B) em cada minuto durante os 15 minutos de teste; (C e D) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos durante os 15 minutos de teste. N=8-10; *p<0,05.

No gráfico 8A, a análise em cada minuto mostra que o tratamento crônico com 2 ml/Kg de ayahuasca induziu discretos aumentos não significantes no número de levantamentos no 2º ($t = -1,985$; $gl = 16$; $p > 0,05$), 6º ($t = -2,036$; $gl = 16$; $p > 0,05$) e 8º minutos ($t = -1,670$; $gl = 16$; $p > 0,05$), permanecendo inalterado em todos os outros tempos registrados ao longo dos 15 minutos na arena. Este perfil resultou em uma curva paralela imediatamente acima da curva dos controles na análise em BTs (gráfico 8C). A dose de 4 ml/Kg administrada cronicamente induziu aumento no número de levantamentos no 1º ($t = -2,069$; $gl = 17$; $p > 0,05$), 2º ($t = -2,145$; $gl = 17$; $p < 0,05$) e 3º minutos ($t = -1,754$; $gl = 17$; $p > 0,05$), embora significativa apenas no 2º minuto. A partir do 4º minuto o número de levantamentos não apresentou qualquer alteração em relação aos controles até o final dos 15 minutos de teste (gráfico 8B). Este comportamento se refletiu no perfil de atividade exploratória apresentado na análise em BTs, com aumento não significativo apenas em BT1 (64,3%; $t = -1,727$; $gl = 17$; $p > 0,05$) (gráfico 8D).

Gráfico 8 - Efeito do tratamento crônico com 2 ml/Kg (A e C) ou 4 ml/Kg (B e D) de chá de ayahuasca sobre a atividade exploratória na arena. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do número de levantamentos: (A e B) em cada minuto durante os 15 minutos de teste; (C e D) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos durante os 15 minutos de teste. N=8-10; * $p < 0,05$.

4.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

4.2.1. Níveis de ansiedade em ratos tratados com Ayahuasca

O gráfico 9 representa os níveis de ansiedade nos grupos controle e de animais que receberam tratamento agudo, subcrônico e crônico com 2 ml e 4 ml/Kg de chá de ayahuasca, determinados pelo número de entradas e pelo tempo de permanência nos braços abertos do LCE. A análise global dos resultados mostra que, com exceção do tratamento crônico com 4 ml/Kg de ayahuasca, onde não observamos qualquer alteração, todos os outros tratamentos induziram aumento na média do número de entradas nos braços abertos (50 a 67%) (gráfico 9A). Entretanto, estes aumentos não foram significantes em relação aos seus respectivos controles ($p>0.05$). A análise do tempo de permanência nos braços abertos (gráfico 9B) também mostra aumento nos animais tratados com ayahuasca, embora estes aumentos tenham sido observados apenas nos animais que receberam a dose de 2 ml/Kg (47 a 78%) e não sejam significantes quando comparados aos controles ($p>0.05$). Para ambos os parâmetros registrados o tratamento crônico com 2 ml/Kg induziu o efeito mais pronunciado (número de entradas: 59%; $t = -1,623$; $gl = 16$; $p>0.05$; tempo de permanência: 78%; $t = -1,934$; $gl = 16$; $p>0.05$).

Gráfico 9 - Efeito dos tratamentos agudo, subcrônico e crônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca sobre o número de entradas (A) e tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE. Estão representadas as médias + EPM dos parâmetros registrados durante 5 minutos de teste. N=8-10.

4.3. Imunoistoquímica

4.3.1. *Expressão de EAAC1 no HGD de ratos tratados com Ayahuasca*

As figuras 1 a 3 e o gráfico 10 mostram a expressão dos transportadores de glutamato do tipo EAAC1 no HGD de animais dos grupos controle ou que receberam tratamento agudo, subcrônico ou crônico com 2 ml ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca. A densidade de células imunopositivas para EAAC1 (EAAC1-IC) nesta região está qualitativamente demonstrada nas figuras 1 a 3 para todos os grupos experimentais, enquanto o número de EAAC1-IC está quantitativamente demonstrado no gráfico 10. Observamos que, embora a distribuição destas células possa ser vista de forma bastante heterogênea entre os tratamentos (figuras 1 a 3), a quantificação registrou níveis semelhantes de EAAC1-IC em todos os grupos controle (gráfico 10). A análise dos grupos que receberam ayahuasca demonstrou que os tratamentos subcrônicos ou crônicos induziram aumento significativo na expressão de EAAC1 quando comparados aos seus respectivos controles. Este aumento foi de 50% ($t = -5,346$; $gl = 14$; $p < 0,005$; subcrônico 2 ml/Kg), 70% ($t = -7,132$; $gl = 14$; $p < 0,0005$; subcrônico 4 ml/Kg), 51% ($t = -8,628$; $gl = 14$; $p < 0,0005$; crônico 2 ml/Kg) e 20% ($t = -2,969$; $gl = 14$; $p < 0,05$; crônico 4 ml/Kg). Nenhuma alteração na expressão de EAAC1 foi induzida pelos tratamentos agudos com ayahuasca ($p > 0,05$) (gráfico 10).

Figura 1 - Imunoistoquímica para o transportador de glutamato EAAC1 no hilus do giro denteado (HGD) de ratos controle (A e C) ou que receberam tratamento agudo com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (B e D). Secções incubadas com o anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*, 1: 200) e com o anticorpo secundário anti-mouse (*Dako*, 1: 250). Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 100μm.

Figura 2 - Imunoistoquímica para o transportador de glutamato EAAC1 no hilus do giro denteado (HGD) de ratos controle (A e C) ou que receberam tratamento subcrônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (B e D). Secções incubadas com o anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*, 1: 200) e com o anticorpo secundário anti-mouse (*Dako*, 1: 250). Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 100μm.

Figura 3 - Imunoistoquímica para o transportador de glutamato EAAC1 no hilus do giro denteado (HGD) de ratos controle (A e C) ou que receberam tratamento crônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (B e D). Secções incubadas com o anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*, 1: 200) e com o anticorpo secundário anti-mouse (*Dako*, 1: 250). Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 100 μ m.

Gráfico 10 - Número de células imunopositivas para EAAC1 no hilus do giro denteado (HGD) de ratos controle ou que receberam tratamento agudo, subcrônico e crônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (n=8). Os dados representam a média + EPM do número de células imunopositivas, quantificadas bilateralmente, em 3 secções/animal. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,0005 (teste *t* Student).

4.3.2. Expressão de EAAC1 no CPF de ratos tratados com Ayahuasca

As figuras 4 a 6 mostram a densidade de células imunopositivas para EAAC1 (EAAC1-IC) no CPF de animais dos grupos controle ou que receberam tratamento agudo, subcrônico ou crônico com 2 ml ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca. A análise qualitativa das figuras mostra um padrão uniforme para a expressão do transportador nesta região, com alta densidade de células marcadas em todos os grupos experimentais. A análise quantitativa do número de EAAC1-IC no CPF (gráfico 11) mostra aumento significativo da expressão de EAAC1 apenas no tratamento agudo com 2 ml/Kg de ayahuasca (16%; $t = -6,75$; $gl = 14$; $p < 0.0005$). A expressão deste transportador foi significativamente reduzida pelos tratamentos subcrônicos com 2 ml/Kg (17%; $t = 3,085$; $gl = 14$; $p < 0.005$) e 4 ml/Kg (25%; $t = 9,932$; $gl = 14$; $p < 0.0005$) e crônico com 4 ml/Kg (25%; $t = 4,998$; $gl = 14$; $p < 0.0005$) quando os grupos foram comparados aos seus respectivos controles. O tratamento agudo com 4 ml/Kg e crônico com 2 ml/Kg não induziram qualquer alteração na expressão de EAAC1 no CPF ($p > 0.05$).

Figura 4 - Imunoistoquímica para o transportador de glutamato EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle (A e C) ou que receberam tratamento agudo com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (B e D). Secções incubadas com o anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*, 1: 200) e com o anticorpo secundário anti-mouse (*Dako*, 1: 250). Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 100μm.

Figura 5 - Imunoistoquímica para o transportador de glutamato EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle (A e C) ou que receberam tratamento subcrônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (B e D). Secções incubadas com o anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*, 1: 200) e com o anticorpo secundário anti-mouse (*Dako*, 1: 250). Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 100μm.

Figura 6 - Imunoistoquímica para o transportador de glutamato EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle (A e C) ou que receberam tratamento crônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (B e D). Secções incubadas com o anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*, 1: 200) e com o anticorpo secundário anti-mouse (*Dako*, 1: 250). Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 100μm.

Gráfico 11 - Número de células imunopositivas para EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle ou que receberam tratamento agudo, subcrônico e crônico com 2 ou 4 ml/Kg de chá de ayahuasca (n=8). Os dados representam a média + EPM do número de células imunopositivas, quantificadas bilateralmente, em 3 secções/animal. **p<0,005 e ***p<0,0005 (teste *t* Student).

A omissão do anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*) resultou em completa ausência de sinal em ambas as áreas analisadas (figura 7).

Figura 7 - Secções do hipocampo (A) e do córtex pré-frontal (B) incubadas na ausência do anticorpo primário anti-EAAC1 (*Millipore*). Barra = 200µm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Variabilidade entre os estudos que utilizam o chá de ayahuasca

Há três anos, por ocasião da concepção do projeto que deu origem a este trabalho com o objetivo central de investigar alguns dos efeitos do chá de ayahuasca, os estudos experimentais disponíveis na literatura eram escassos. Por se tratar de um objeto de estudo recente e que seria realizado em animais, as perguntas e as dúvidas tiveram início já no estabelecimento dos métodos a serem utilizados. Por exemplo, as doses do chá, a frequência e a forma de administração, o intervalo entre as doses e o intervalo entre a administração e as avaliações comportamentais, entre outras dúvidas. Este seria mais um estudo a contribuir com a linha de investigação sobre os efeitos da ayahuasca.

Os métodos utilizados nos estudos já realizados sobre a ayahuasca são diversificados em vários aspectos. Alguns pesquisadores utilizam o chá da forma em que é preparado para as cerimônias religiosas e também fazem sua administração por via oral, tanto em animais (COUTINHO DA SILVA; GODINHO, 2009) como em humanos (CALLAWAY et al., 1999). Outros pesquisadores liofilizam o chá originalmente preparado e o administram também por via oral. Para estudos em animais é feita a diluição no volume desejado e este administrado por gavagem (CASTRO-NETO et al., 2013), enquanto para estudos em humanos a dose pré-estabelecida é colocada dentro de cápsulas (RIBA et al., 2004). Ainda, alguns estudos utilizam os compostos isolados do chá, administrados por via intraperitoneal em animais (FONTANILLA et al., 2009) ou por via intravenosa em humanos (STRASSMAN, 1996). Tem também sido descritos diferentes intervalos entre o horário da administração e as avaliações realizadas tanto em humanos (BOUSO et al., 2012; CALLAWAY et al., 1999) como em animais (CASTRO-NETO et al., 2013; COUTINHO DA SILVA; GORDINHO, 2009; FONTANILLA et al., 2009). Assim, além das diferenças na concentração dos compostos presentes no chá na dependência de sua origem, a

diversidade dos métodos de investigação utilizados podem responder pela variabilidade dos resultados encontrados.

Estudos realizados em humanos demonstraram que a administração do composto DMT (0,40 mg/Kg) via intravenosa induziu efeitos subjetivos e fisiológicos mais rapidamente, embora de curta duração, aproximadamente 2 minutos (STRASSMAN, 1996), quando comparados aos efeitos induzidos pela associação de doses equivalentes de DMT (0,48 mg/Kg) e harmina (HRM; 3,4mg/Kg), contidas no chá de ayahuasca administrado via oral. Por este método os efeitos foram observados entre 60 e 120 minutos após a ingestão (CALLAWAY et al., 1999). Investigações já realizadas em humanos com administração intravenosa de DMT utilizaram doses com diferença de até oito vezes, mínima de 0,05 mg/Kg e máxima de 0,4 mg/Kg (STRASSMAN, 1996). Segundo Callaway et al. (1999), as diferenças entre os resultados observados, tanto relacionados aos efeitos induzidos pelo chá como por seus compostos isolados, como a DMT, se devem principalmente à via de administração utilizada, intravenosa ou oral. A DMT parece estar mais diretamente relacionada aos efeitos subjetivos e às respostas autonômicas e neuroendócrinas, uma vez que essas alterações foram observadas durante o pico da concentração sanguínea de DMT quando administrada por via intravenosa ou oral pela ingestão do chá de ayahuasca. Estes efeitos incluem estados de alerta e agitação, os quais foram mais rápidos e intensos quando o chá foi administrado por via intravenosa em relação à via oral (STRASSMAN, 1996; CALLAWAY et al., 1999).

Uma vez que para o presente estudo o chá de ayahuasca foi fornecido pela organização do culto religioso de Santo Daime, o mesmo foi utilizado na forma em que é rotineiramente preparado para o ritual. O volume e frequência de administração foram também estabelecidos de acordo com a ingestão do chá pelos frequentadores do culto. Portanto, as doses utilizadas dos principais compostos com ação farmacológica e suas proporções correspondem às concentrações de cada um destes compostos no chá.

Considerando este aspecto, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com alguns grupos de pesquisadores, mas em desacordo com outros.

5.2. Efeitos do chá de ayahuasca sobre as atividades locomotora e exploratória de ratos Wistar

Apesar da variabilidade dos efeitos da ayahuasca ou de seus compostos sobre o comportamento de ratos no campo aberto descritos na literatura, estes parecem induzir alterações semelhantes nas atividades locomotora e exploratória. Fontanilla et al. (2009) demonstraram que a administração intraperitoneal do agonista 5-HT, DMT (2 mg/Kg) 2 horas após a administração do IMAO, pargilina (75 mg/Kg) em ratos Wistar, na proporção aproximada de 1:37 (DMT:pargilina) induziu aumento considerável dos comportamentos locomotor e exploratório no campo aberto imediatamente após a administração de DMT, com duração de pelo menos 30 minutos (até o final do teste). As doses de DMT quando administradas via intraperitoneal associadas a um IMAO são baixas quando comparadas às doses utilizadas, deste mesmo composto, administradas via gavagem por meio do chá de ayahuasca. Neste caso as concentrações de DMT chegam a 12 mg/Kg e a do IMAO, harmina (HRM), a 104 mg/Kg, proporção aproximada de 1:9 (CASTRO-NETO et al., 2013). Entretanto, estes autores demonstraram que ambas as doses, mesmo administradas por vias diferentes, foram capazes de aumentar os comportamentos locomotor e exploratório dos animais no período inicial do teste no campo aberto. Quando os animais foram observados durante 60 minutos o aumento inicial foi seguido por uma queda na atividade geral, a qual se inicia a partir dos 30 minutos de teste, mesmo quando doses relativamente altas foram utilizadas via gavagem. A queda observada foi progressiva até a completa normalização dos comportamentos locomotor e exploratório aos 60 minutos de teste (CASTRO-NETO et al., 2013). Os achados sugerem que a DMT, quando associada a um IMAO, via intraperitoneal, produz efeito prolongado sobre o comportamento de animais no

campo aberto, com duração de pelo menos 30 minutos (FONTANILLA et al., 2009). Uma vez que a DMT, quando administrada pura nas doses de 0,5 a 2 mg/kg, pela mesma via, não foi capaz de alterar o comportamento locomotor dos animais neste teste, o aumento observado no tempo de duração do efeito da DMT quando administrada associada pode ser atribuído ao IMAO (ADAMS; GEYER, 1985).

Devido às concentrações de DMT e HRM presentes no chá originalmente preparado para o ritual do “Santo Daime” e fornecido para a realização deste estudo, as concentrações de DMT e HRM utilizadas foram relativamente baixas, uma vez que o volume administrado nos animais via gavagem foi também estabelecido com base no volume ingerido durante o ritual (DMT = 1,6 - 9,6 mg/Kg; HRM = 0,42 - 2,52 mg/Kg), proporção aproximada de 4:1 (DMT:HRM). Na análise comportamental deste estudo observamos diminuição significativa apenas na atividade locomotora total dos animais que receberam tratamento subcrônico com 4 ml/Kg. Além disso, a análise dos resultados em blocos de 5 minutos mostrou que esta diminuição ocorreu nos primeiros 10 minutos de teste, mais precisamente entre 6 e 10 minutos. Quando consideramos exclusivamente o tempo de avaliação do comportamento dos animais no campo aberto, nossos resultados são discrepantes em relação a vários achados da literatura demonstrando aumento das atividade locomotora e exploratória de ratos no período inicial do teste, mais precisamente nos primeiros 30 minutos após a administração do chá de ayahuasca ou seus compostos (CASTRO-NETO et al, 2013; FONTANILLA et al., 2009). Entretanto, nossos resultados são de fato coerentes com os achados da literatura, uma vez que neste estudo os animais foram colocados no campo aberto 30 minutos após a administração do chá, período em que os autores relatam o início da queda do comportamento locomotor e exploratório (CASTRO-NETO et al, 2013). Além disso, em nosso estudo a diminuição deste comportamento foi registrada apenas durante os 10 primeiros minutos de teste, ou seja, 30 a 40 minutos após a administração do chá, período em que outros estudos registraram também a queda na atividade dos animais, cuja

normalização se inicia aproximadamente 50 minutos após a administração (CASTRO-NETO et al, 2013).

Quando consideramos os diferentes tratamentos realizados neste estudo, no tratamento subcrônico o chá foi administrado três vezes em intervalos de uma hora. Além disso, como mencionado anteriormente, os compostos apresentam efeitos prolongados quando administrados conjuntamente, o que ocorre pela ingestão do chá devido à presença de ambos na preparação. Estas evidências sugerem que os resultados observados apenas nos animais tratados subcronicamente sejam, em parte, devido ao efeito cumulativo das doses administradas (3 doses de 4 ml/Kg contendo 3,2 mg/Kg de DMT e 0,84 mg/Kg de HRM). Esta possibilidade é reforçada considerando vários aspectos. Primeiro, o fato de não ter sido observado o mesmo efeito nos animais que receberam tratamento subcrônico com 2 ml/Kg. Neste caso, os animais receberam três doses contendo 1,6 mg/Kg de DMT e 0,42 mg/Kg de HRM cada, correspondendo a uma dose total de, no máximo, 4,8 mg/Kg de DMT e 1,26 mg/Kg de HRM, concentrações próximas àquelas administradas em uma única dose de 4 ml/Kg (3,2 mg/Kg de DMT e 0,84 mg/Kg de HRM). Segundo, os animais que receberam tratamento agudo com 4 ml/Kg de chá apresentaram apenas uma tendência não significativa à diminuição da atividade locomotora. Terceiro, a concentração total de DMT administrada nos animais tratados subcronicamente com 4 ml/Kg de chá (9,6 mg/Kg) é a que mais se aproxima da concentração utilizada por Castro-Neto et al. (2013) também por gavagem, 12 mg/Kg, a qual levou a alterações comportamentais no campo aberto. Considerando o provável metabolismo parcial dos compostos durante o tratamento subcrônico realizado em nosso estudo (3 horas), as concentrações plasmáticas destes compostos não devem atingir níveis suficientes para desencadear seus efeitos sobre estes comportamentos.

É importante ressaltar ainda que, a concentração de HRM presente na dose de chá utilizada por Castro-Neto et al. (2013) é consideravelmente mais alta (104 mg/Kg) que a utilizada em nosso grupo subcrônico de 4 ml/Kg (2,5 mg/Kg). Considerando a importante associação dos compostos DMT e IMAO nos efeitos da DMT (ADAMS; GEYER, 1985), seria

razoável pensar que diferenças na proporção de DMT e HRM presente nas doses de chá utilizadas nos diferentes estudos produziram efeitos distintos. Entretanto, os resultados encontrados em nosso estudo para o grupo subcrônico foram semelhantes aos encontrados nos estudos que utilizaram proporções significativamente diferentes destes compostos. Entre 30 e 40 minutos após a administração do chá registramos uma queda significativa na atividade locomotora dos animais em direção à normalização deste comportamento ao final das nossas observações, 45 minutos após a administração. Assim, embora a semelhança destes achados reforcem o fato de que a ação e a duração dos efeitos da DMT sobre os comportamentos locomotor e exploratório são dependentes de sua administração conjunta com um IMAO (ADAMS; GEYER, 1985), a proporção de DMT e HRM parece não influenciar de forma importante estes efeitos. Esta hipótese é reforçada por achados experimentais mencionados anteriormente nas concentrações de DMT:HRM na proporção de 1:9, via gavagem; ou 1:37, via intraperitoneal, induziram aumento semelhante no comportamento de animais no campo aberto, com duração de pelo menos 30 minutos (CASTRO-NETO et al., 2013; FONTANILLA et al., 2009).

O conjunto dos resultados permite sugerir que a DMT associada à HRM no chá de ayahuasca produz uma hiperatividade inicial, seguida por uma hipoatividade, em ratos avaliados no teste do campo aberto.

Considerando o mecanismo de ação da DMT e HRM sobre a neurotransmissão serotoninérgica no SNC, é importante discutir a participação desta neurotransmissão nas alterações comportamentais induzidas pela ayahuasca. Como mencionado anteriormente, a N,N-dimetiltriptamina (DMT) possui efeito agonista nos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C} e 5-HT_{1A} (RIBA et al., 2002) e as β -carbolinas como a harmina (HRM), a harmalina e tetrahydroharmina (THH), atuam como inibidoras da enzima monoamina oxidase (IMAO) (MCKENNA et al., 1984; SPRUCE, 1873).

No contexto comportamental, tem sido descrito que drogas que atuam como agonistas nos receptores 5-HT_{2A} usualmente levam a uma diminuição das atividades locomotora e exploratória em ratos. Entretanto, evidências experimentais tem demonstrado que doses elevadas desses agonistas podem aumentar estes comportamentos (HALBERSTADT et al. 2012). Os autores observaram que o composto 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT), um análogo da DMT, quando administrado via intraperitoneal em ratos Sprague Dawley nas doses de 0,01 a 1,0 mg/kg foi capaz de diminuir as atividades locomotora e exploratória. O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que quando os animais foram pré-tratados com harmalina (0,1 mg/kg), a administração de 5-MeO-DMT 20 minutos depois produziu um efeito bifásico sobre a atividade locomotora, caracterizado por uma redução inicial deste comportamento durante 30 minutos, seguido por um aumento ao longo dos 30 minutos seguintes. Os pesquisadores discutem que a hiperatividade tardia se deve à interação de 5-MeO-DMT com receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A} (HALBERSTADT et al., 2008). Mesmo considerando que o efeito bifásico observado seja resultante da associação dos dois compostos, este também pode estar relacionado à dose de 5-MeO-DMT utilizada, uma vez que este efeito foi observado apenas quando esta droga foi administrada na concentração de 1,0 mg/Kg. Doses inferiores não produziram qualquer alteração. Neste contexto, é de extrema importância destacar a contribuição da associação destes compostos no efeito final dos agonistas. Ao exercer sua ação inibitória sobre a enzima MAO periférica (MCKENNA, 2004; RIBA et al., 2003), os IMAO favorecem o acúmulo do neurotransmissor 5-HT na fenda sináptica, o qual, juntamente com a 5-MeO-DMT administrada contribui para a elevada concentração destes agonistas no meio extracelular, permitindo interações menos seletivas com os diferentes subtipos de receptores 5-HT.

Esta hipótese foi posteriormente confirmada por este mesmo grupo de pesquisadores quando apresentaram evidências de que outros receptores 5-HT estão também envolvidos nas alterações comportamentais observadas. Foi demonstrado, por

exemplo, que a psilocina (4-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina), droga alucinógena que atua como agonista nos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, induziu redução significativa da atividade locomotora em camundongos testados no campo aberto e este efeito parece ser ter sido mediado por receptores 5-HT_{1A} (HALBERSTADT et al., 2011). Portanto, embora o efeito alucinógeno da psilocina, assim como de vários outros alucinógenos sejam primariamente associados à ação agonista destas drogas em receptores 5-HT_{2A}, o mecanismo responsável pelos efeitos sobre o comportamento locomotor se deve à interação destas drogas com outros subtipos de receptores 5-HT, provavelmente 5-HT_{1A}.

Estudos realizados em humanos verificaram que quando a DMT foi administrada por via intravenosa em doses baixas (0,05 e 0,1mg/kg), consideradas sub alucinógenas, produziu apenas efeitos físicos e alterações de humor; e quando estas doses foram administradas associadas a um antagonista 5-HT_{1A}, o efeito da DMT foi potencializado (STRASSMAN, 1996).

Retornando às investigações experimentais, não podemos excluir evidências da literatura que sugerem outro mecanismo de ação para a hiperatividade tardia induzida pela interação de agonistas 5-HT e IMAO. Foi demonstrado que a administração intraperitoneal de DMT (2 mg/Kg) associada a um IMAO induziu hiperatividade em ratos e este efeito foi mediado pela ação agonista da DMT em receptores sigma-1 (FONTANILLA et al. (2009), os quais tem sido relacionados à modulação da atividade de motoneurônios em ratos (MAVLYUTOV et al. 2013). Fontanilla et al. (2009) também demonstraram que esta hiperatividade não foi revertida pelo bloqueio de receptores serotoninérgicos ou dopaminérgicos seletivos, mas foi bloqueada por haloperidol, a qual embora seja amplamente conhecida por seu efeito antagonista em receptores dopaminérgicos do tipo D₂, é também um potente inibidor de receptores sigma-1. Adicionalmente, os autores demonstraram que a DMT não foi capaz de causar hiperatividade em ratos com deficiência destes receptores (FONTANILLA et al., 2009).

Embora os estudos sobre os efeitos do chá de ayahuasca, de seus compostos ou análogos tenham se intensificado nos últimos anos, dispomos ainda de poucos artigos que investigaram estes efeitos sobre os comportamentos locomotor e exploratório de animais no campo aberto. Assim, com base no conjunto dos achados experimentais descritos na literatura e nos resultados do presente trabalho, é possível sugerir que os mecanismos neuroquímicos envolvidos na modulação destes comportamentos sejam influenciados por algumas variáveis. Entre elas, a natureza dos compostos utilizados; a via e a forma de administração destes compostos, isolados ou associados; a dose e a frequência de administração; além do período de observação dos comportamentos. Deve-se ainda considerar que, o chá de ayahuasca quando administrado em doses baixas, pode não provocar alterações significativas nos comportamentos locomotor e exploratório, como sugerem os estudos realizados em humanos.

5.3. Efeitos do chá de ayahuasca sobre os níveis de ansiedade de ratos Wistar

O teste comportamental no LCE é clássica e amplamente utilizado para medir os níveis de ansiedade em animais experimentais. Neste teste, principalmente o aumento no tempo de permanência nos braços abertos produzido por qualquer manipulação é um importante indicativo de efeito ansiolítico (CRUZ et al., 1994; BRANDÃO, 2004).

Neste estudo, nenhum dos tratamentos com o chá de ayahuasca foi capaz de causar alterações significativas no tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos do LCE durante os 5 minutos de teste, o qual foi realizado 50 minutos após a única ou última administração do chá. Entretanto, todos os tratamentos levaram a uma tendência ao aumento no número de entradas nos braços abertos e, especialmente os animais que receberam tratamento crônico com 2 ml/Kg de chá, dose diária de 1,6 mg/Kg de DMT e 0,42 mg/Kg de HRM, por 15 dias, apresentaram também forte tendência ao aumento no tempo de permanência nestes braços.

Vários estudos realizados em humanos sobre os efeitos produzidos pelo chá de ayahuasca indicam que este chá apresenta efeito ansiolítico. Membros da UDV que faziam uso do chá há pelo menos 10 anos foram submetidos a avaliações psicológicas e psiquiátricas. O uso do chá foi associado à remissão do transtorno de ansiedade fóbica em três participantes que apresentavam a doença antes da filiação à seita. Outros voluntários do estudo com histórico de uso de drogas ilícitas, ansiedade patológica, depressão maior e agressividade antes da filiação, relataram que o uso do chá levou a mudanças comportamentais importantes, além da perda de interesse pelo consumo de qualquer droga (GROB et al., 1996). O potencial ansiolítico da ayahuasca tem sido relacionado ao uso crônico do chá, uma vez que quando foi administrado agudamente apresentou efeito ansiogênico, semelhante ao observado durante o pico de ação da DMT (STRASSMAN, 1996). Esta hipótese foi reforçada por um estudo semelhante realizado em frequentadores do ritual do “Santo Daime” por aproximadamente 10 anos fazendo uso do chá. Estes voluntários apresentaram diminuição significativa na ansiedade, que foi atribuída à ação agonista da DMT em receptores 5-HT_{2A} por tempo prolongado, associada à inibição da MAO (SANTOS et al., 2007). Este mecanismo provocaria ao longo do tempo um aumento dos transportados de serotonina (MCKENNA et al., 2004). Outros autores atribuem parte do efeito ansiolítico do chá de ayahuasca à ação agonista da DMT nos receptores TA, estes autores argumentam que a DMT atuaria nesses receptores em doses mais baixas (JACOB; PREST, 2005).

Estudos experimentais também tem contribuído com evidências para o efeito ansiolítico da ayahuasca. Ratos Wistar viciados em nicotina foram tratados cronicamente (durante 15 dias) com o chá, via gavagem, e avaliados no LCE 24 horas após a última administração. Foi observado que a ayahuasca reverteu completamente os efeitos ansiogênicos provocados pela abstinência à nicotina, embora os autores argumentam que esse efeito ansiolítico pode, na verdade, resultar da diminuição no consumo de nicotina, observada nos animais tratados com o chá (COUTINHO DA SILVA; GODINHO, 2009).

Adicionalmente, neste mesmo estudo os autores não encontraram diferenças no LCE entre os animais tratados com ayahuasca e os animais não adictos à nicotina. Outras evidências experimentais demonstram efeito ansiolítico de análogos da DMT. Por exemplo, o efeito ansiogênico produzido por estresse agudo em ratos foi atenuado pela administração de 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) no hipocampo dorsal, quando estes animais foram avaliados no LCE 24 horas após a administração (MENDONÇA NETTO; GUIMARÃES, 1996). Entretanto, estes autores não encontraram diferenças nos resultados do LCE entre os animais tratados com 5-MeO-DMT e os animais que não foram submetidos ao estresse agudo. Um outro estudo demonstrou real efeito ansiolítico em ratos avaliados no LCE 30 minutos após a administração intraperitoneal de DOI (10ml/Kg), o qual foi bloqueado pelo tratamento prévio com um antagonista 5-HT_{2A} (GARCIA et al. 2007).

O conjunto das evidências apresentadas pelos estudos realizados em humanos ou animais mostram que o efeito ansiolítico da ayahuasca é observado apenas com o uso crônico do chá, o que justifica a ausência deste efeito nos animais que receberam tratamento agudo neste estudo. Entretanto, considerando apenas uma tendência ao efeito ansiolítico observado nos animais que receberam tratamento crônico com o chá de ayahuasca, é possível que estes achados se devam ao fato de que o chá, na verdade, possua a propriedade de reverter o efeito ansiogênico induzido por outros estímulos e não sobre a ansiedade inata. Os achados de Coutinho da Silva e Godinho (2009) e de Mendonça Netto e Guimarães (1996) sustentam esta hipótese.

5.4. Efeito do chá de ayahuasca sobre a expressão de EAAC1 no HGD e CPF

No presente trabalho observamos que os tratamentos com chá de ayahuasca induziram diferentes alterações na expressão de EAAC1 tanto no HGD do hipocampo como no CPF. No HGD os tratamentos agudos com 2 ou 4ml/Kg não produziram qualquer alteração na expressão de EAAC1, enquanto os tratamentos subcrônico e crônico com

ambas as doses induziram aumento na expressão do transportador nesta região. No CPF os resultados foram mais discrepantes, uma vez que o tratamento agudo com a menor dose induziu aumento na expressão de EAAC1, enquanto os tratamentos subcrônicos e crônico de 4 ml/Kg levaram a uma redução na expressão deste transportador. Uma análise global dos resultados indica que apenas a ingestão subcrônica ou crônica de chá de ayahuasca produz alterações opostas na expressão de EAAC1 no HGD e CPF, onde a expressão do transportador é aumentada no HGD e reduzida no CPF.

Os transportadores de glutamato, gliais ou neuroniais, possuem papel fundamental de retirar o excesso de glutamato liberado nas sinapses do SNC e desta forma modular a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica e consequentemente a excitabilidade das células neuroniais (DANBOLT, 2001). Especificamente o transportador neuronal EAAC1 parece modular a atividade do glutamato nos receptores NMDA perisinápticos, uma vez que foi demonstrado que este transportador se liga ao glutamato liberado nas sinapses ativas levando à retenção desse neurotransmissor e consequentemente atrasando sua captação pelos transportadores GLT1 gliais (SCIMEMI et al., 2010). Dessa forma, o EAAC1 atua como principal regulador da difusão do glutamato liberado na fenda sináptica (BIANCHI et al., 2013). Adicionalmente ao transporte de glutamato, foi demonstrado que o EAAC1 está envolvido no transporte de cisteína para o interior da célula, utilizada na síntese de glutathione, composto que atua como antioxidante fisiológico (AOYAMA et al., 2006). Deficiência nos transportadores de glutamato neuroniais ou gliais tem sido associada a doenças neurodegenerativas, atrofia cerebral ou alterações cerebrais decorrentes da vulnerabilidade dos neurônios cerebrais à excitotoxicidade glutamatérgica e consequentemente ao estresse oxidativo (AOYAMA et al., 2006; 2008).

Evidências experimentais indicam que os níveis de glutamato extracelular são fundamentais para determinar os níveis dos transportadores locais. Tellez et al. (2012) discutem que um aumento rápido na expressão de EAAC1 pode ser desencadeado pelo aumento considerável no volume de glutamato extracelular. Vários estudos sugerem que as

drogas alucinógenas parecem aumentar a concentração extracelular de glutamato no CPF. Foi demonstrado, por exemplo, que o LSD, agonista do receptor 5-HT_{2A}, produziu aumento tempo-dependente na concentração de glutamato nesta região, e que este aumento foi bloqueado por antagonistas 5-HT_{2A}. De forma semelhante foi também demonstrado que o 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina (DOM), agonista dos receptores 5-HT_{2A/2C} foi capaz de aumentar a concentração de glutamato nesta região (MUSCHAMP et al. 2004). No contexto do presente trabalho, substâncias alucinógenas derivadas de estratos vegetais como a DMT, ou sintéticas como a psilocina e o LSD, as quais atuam como agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A}, foram capazes de aumentar a liberação de glutamato no SNC, especialmente em neurônios piramidais do CPF (AGHAJANIAN; MAREK, 1999). Este aumento parece ocorrer através da estimulação de receptores 5-HT_{2A} pós-sinápticos presentes em neurônios piramidais glutamatérgicos nas camadas corticais que enviam projeções para os neurônios piramidais da camada V, onde liberam altas concentrações de glutamato no meio extracelular (VOLLENWEIDER; KOMETER, 2010). Além da ativação direta destes receptores nos neurônios piramidais corticais, estes autores discutem que a estimulação dos receptores 5-HT_{2A} pelos alucinógenos pode ocorrer em regiões subcorticais. O tálamo tem sido apontado como uma das regiões subcorticais que poderia estar envolvida no aumento da neurotransmissão glutamatérgica no CPF, a partir da ativação de receptores pré-sinápticos do tipo 5-HT_{2A} localizados em aferentes glutamatérgicos tálamo-corticais (BÉIQUE et al., 2007).

Várias evidências tem demonstrado uma relação recíproca entre a serotonina e o glutamato. A estimulação do córtex pré-frontal medial (CPFm), por exemplo, ativando a liberação de glutamato nos neurônios piramidais leva à liberação de serotonina no núcleo dorsal da rafe. O aumento da serotonina extracelular neste núcleo inibe a neurotransmissão serotoninérgica pela ação deste neurotransmissor em auto receptores pré-sinápticos 5-HT_{1A}, diminuindo a liberação de serotonina em áreas como o hipocampo (ALTIERI et al., 2012; COPLAN et al., 2014; TAO et al., 1997; VALENTINO et al., 2003).

Castro-Neto et al. (2013) observaram que animais tratados agudamente com doses altas de chá de ayahuasca apresentaram aumento na concentração de serotonina no hipocampo, provavelmente como resultado da ação da harmina em inibir a MAO, o que favorece o acúmulo deste neurotransmissor na fenda. Uma vez que o aumento de serotonina leva à ativação do hipocampo, este efeito poderia também levar a um aumento na liberação de glutamato nesta região. Entretanto, os autores demonstraram que a administração aguda de doses altas ou baixas do chá de ayahuasca não induziu qualquer alteração nos níveis de glutamato extracelular no hipocampo. Considerando os achados do presente estudo, os tratamentos agudos com ayahuasca não foram capazes de alterar a expressão de EAAC1 no HGD do hipocampo. Nossos resultados estão coerentes com os resultados de Castro-Neto et al (2013), uma vez que tem sido descrito que a concentração de glutamato modula os níveis de seus transportadores (TELLEZ et al., 2012). Assim, a não alteração dos níveis de glutamato pela ayahuasca também não deve induzir alteração na expressão do transportador EAAC1.

Evidências adicionais contribuem para esta associação de mecanismos. Foi demonstrado que a DMT possui ação agonista também em receptores sigma-1 (FONTANILLA et al., 2009). Posteriormente, Van Waard et al. (2011) observaram que o tratamento crônico com agonistas dos receptores sigma-1 por pelo menos 7 dias, foi capaz de aumentar a liberação de glutamato no hipocampo. Neste contexto, os tratamentos crônicos com ayahuasca por 15 dias, assim como os tratamentos subcrônicos por 3 dias alternados, com 3 doses/dia realizados neste estudo, aumentaram a expressão de EAAC1 no HGD. O conjunto dos resultados sugere que o aumento observado na expressão de EAAC1 nesta região é consequência das alterações nos níveis de glutamato; e que estes efeitos são possivelmente dependentes da frequência de administração do chá e consequentemente do acúmulo de altas concentrações do agonista DMT.

Resultado semelhante foi observado no CPF apenas quando tratamento agudo com 2 ml/Kg de ayahuasca foi utilizado, o qual aumentou a expressão de EAAC1 nesta região.

Este achado corrobora alguns achados sobre os efeitos dos alucinógenos em aumentar a concentração de glutamato extracelular no CPF pela ativação de receptores 5-HT_{2A} (VOLLENWEIDER; KOMETER, 2010). Entretanto, embora os alucinógenos comumente induzam aumento da concentração de glutamato no CPF, a administração crônica desses compostos parece diminuir a concentração do neurotransmissor nesta região. Por exemplo, a administração crônica de doses elevadas de LSD por cinco dias foi capaz de promover *down-regulation* dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A} no CPF, sem alterar a concentração dos receptores do tipo 5-HT_{1A} localizados nos núcleos da rafe, o que consequentemente leva a uma redução na concentração de glutamato liberado nas regiões corticais (GRESCH et al., 2005). Estas evidências da literatura podem justificar os resultados opostos encontrados neste estudo para os tratamentos subcrônicos e crônico com 4 ml/Kg de ayahuasca, os quais induziram redução na concentração de EAAC1 no CPF.

6. CONCLUSÕES

- A administração subcrônica de chá de ayahuasca, via gavagem, induz redução da atividade locomotora em ratos Wistar avaliados no teste do campo aberto.
- A administração de chá de ayahuasca, via gavagem, não induz alterações nos níveis de ansiedade em ratos Wistar avaliados no labirinto em cruz elevado.
- A administração subcrônica ou crônica de chá de ayahuasca, via gavagem, induz aumento na expressão do transportador de glutamato neuronal EAAC1 no hilus do giro denteado do hipocampo de ratos Wistar .
- A administração subcrônica ou crônica de chá de ayahuasca, via gavagem, induz redução na expressão do transportador de glutamato neuronal EAAC1 no córtex pré-frontal de ratos Wistar .

REFERÊNCIAS

- ADAMS, L. M.; GEYER, M. A. Effects of DOM and DMT in a proposed animal model of hallucinogenic activity. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.9, n.2, p.121-32, 1985.
- AFIFI, A. K.; BERGMAN, R. A. Neuroanatomia Funcioanl: Texto e Atlas. **Editora Roca**, São Paulo, ed.2, p.526, 2008.
- AGHAJANIAN, G. K.; MAREK, G. J. Serotonin and Hallucinogens. **Neuropsychopharmacology**, New York, v.21, n.2, 1999.
- AL-NUAIMI, S.; CHAVES, C.; HALLAK, J. E. C.; BAKER, G. B.; DURSUN, S. New perspectives and directions in schizophrenia therapeutics: advances related to non-dopaminergic systems. **Revista Brasileira de Psiquiatria**; v. 32, n. 4, p. 333-335, dez. 2010.
- ALTIERI, S. C.; GARCIA-GARCIA, A. L.; LEONARDO, E. D.; ANDREWS, A. M. Rethinking 5-HT1A receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. **ACS Chem. Neurosci**, v.4, p.72–83, 2012.
- AOYAMA, K.; MATSUMURA, N.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 20–30, 2008.
- AOYAMA, K.; SUH, S. W.; HAMBY, A. M.; LIU, J.; CHAN, W. Y.; CHEN, Y.; SWANSON, R. A. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. **Nature Neuroscience**, San Francisco, v. 9, n.1, jan. 2006.
- BARKER, S. A.; BORJIGIN, J.; LOMNICKA, I.; STRASSMAN, R. LC/MS/MS analysis of the endogenous dimethyltryptamine hallucinogens, their precursors and major metabolites in rat pineal gland microdialysate. **Biomedical Chromatography**, v.27, p.1690-1700, jul. 2013.
- BÉIQUE, J. C.; IMAD, M.; MLADENOVIC, L.; GINGRICH, J. A.; ANDRADE, R. Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. **The National Academy of Sciences of the USA**, v.10, n.23, p.9870-9875, jun. 2007.
- BENARROCH, E. E. (2010) Implications of Glutamate transporters: Diversity, function, and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v.74, p.259-264, 2010.
- BIANCHI, M. G.; BARDELLI, D.; CHIU, M.; BUSSOLATI, O. Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, sep. 2013. DOI 10.1007/s00018-013-1484-0.
- BORTOLOTTO Z. A.; FITZJOHN S. M.; COLLINGRIDGE G. L. Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. **Curr. Opin. Neurobiol**, v.9, p.299–304, 1999.
- BOUSO, J. C.; GONZÁLEZ, D.; FONDEVILA, S.; CUTCHET, M.; FERNÁNDEZ, X.; BARBOSA, P. C. R.; ALCÁZAR-CÓRCOLES, M. A.; ARAÚJO, W. S.; BARBANOJ, M. J.; FÁBREGAS, J. M.; RIBA, J. (2012). Personality, Psychopathology, Life Attitudes and Neuropsychological Performance among Ritual Users of Ayahuasca: A Longitudinal Study. *PLoS ONE* 7(8): e42421. doi:10.1371/journal.pone.0042421
- BRANDÃO, M. L. As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à Neurociência. *Livro Eletrônico*; ISBN 85-12-40630-5. 2004.
- BRIERLEY, D. I.; DAVIDSON, C. (Developments in harmine pharmacology: implication for ayahuasca use and drug-dependence treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.39, p. 263-272, 2012.

CALCAGNO, E.; CARLI, M.; BAVIERA, M.; INVERNIZZI, R. W. Endogenous serotonin and serotonin 2C receptors are involved in the ability of M100907 to suppress cortical glutamate release induced by NMDA receptor blockade. **Journal of Neurochemistry**, v.108, p.521-532, 2009.

CALLAWAY, J. C.; MCKENNA, D. J.; GROB, C. S.; BRITO, G. S.; RAYMON, L. P.; POLAND, R. E.; ANDRADE, E. N.; ANDRADE, E. O.; MASH, D. C. Pharmacokinetics of *Hoasca* alkaloids in healthy humans. **Journal of Ethnopharmacology**, v.65, p.243-256, 1999.

CALLAWAY, J. C. A Proposed Mechanism for the Visions of Dream Sleep. **Medical Hypotheses**, v.31, p.119-124, 1988.

CALLAWAY, J. C.; AIRAKSINEN, M. M.; MCKENNA, D. J.; BRITO, J. S.; GROB, C. S. Platelet serotonin uptake sites increased in drinkers of ayahuasca. **Psychopharmacology**, v.116, p.385-387, 1994.

CARVALHO M. C.; ALBRECHET-SOUSA, L.; MASSON S.; BRANDÃO, M. L. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Braz J Med Biol Res**, v.38, p.1857-66, 2005.

CASTRO-NETO, E. F.; DA CUNHA, R. H.; DA SILVEIRA, D. X.; YONAMINE, M.; GOUVEIA, T. L. F.; CAVALHEIRO, E. A.; AMADO, D.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. **World Journal of Biological Chemistry**, v.4, n.4, p.141-147, nov. 2013.

CHAVES, C.; MARQUE, C. R.; TRZESNIAK, C.; MACHADO DE SOUSA, J. P.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A. S.; DURSUN, S. M.; HALLAK, J. E. Glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor modulation and minocycline for the treatment of patients with schizophrenia: an update. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n.11, p.1002-1014, nov. 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Editado em jun. 1991. In: www.cobea.org.br/estatuto.

COPLAN, J. D.; GOPINATH, S.; ABDALLAH, C. G.; BERRY, B. R. A neurobiological hypothesis of treatment-resistant depression – mechanisms for selective serotonin reuptake inhibitor non-efficacy. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.8, may. 2014.

CORY, R. N.; ROUOT, B.; GUILLON, G.; SLADECZEK, F.; BALESTRE, M. N.; BOCKAERT, J. The 5-hydroxytryptamine (5-HT₂) receptor stimulates inositol phosphate formation in intact and broken WRK1 cells: determination of occupancy-response relationships for 5-HT agonists. **J Pharmacol Exp Ther**, v.241, p.258-267, 1987.

COUTINHO DA SILVA, M.; GODINHO, A. F. Ayahuasca para o controle da ansiedade: um modelo experimental usando a adição à nicotina. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (CIC-UNESP), 2009, **Resumos...**, p.1221-1224, 2009.

COZZI, N. V.; GOPALAKRISHNAN, A.; ANDERSON, L. L.; FEIH, J. T.; SHULGIN, A. T.; DALEY, P. F.; RUOHO, A. E. Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter. **J Neural Transm**, v.116, p.1591-1599, 2009.

CRINO, P. B.; JIN, H.; SHUMATE, M. D.; ROBINSON, M. B.; COULTER, D. A.; BROOKS-KAYAL, A. R. Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neo- cortical epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p.211-218, 2002.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.49, p.171-176, 1994.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progr. Neurobiol**, v.65, p.1-105, 2001.

DELIGANIS, A. V.; PIERCE, P. A.; PEROUTKA, S. J. Differential interactions of dimethyltryptamine (DMT) with 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors. **Biochem Pharmacol**, v.41, p.1739-1744, 1991.

DEUTSCH, S. I.; ROSSE, R. B.; SCHWARTZ, B. L.; MASTROPAOLO, J. A Revised Excitotoxic Hypothesis of Schizophrenia: Therapeutic Implications. **Clin Neuropharmacol.**, v.24, n.1, p.43-9, 2001.

DUERSON, K.; WOLTJER, R. L.; MOOKHERJEE, P.; LEVERENZ, J. B.; MONTINE, T. J.; BIRD, T. D.; POW, D. V.; RAUEN, T.; COOK, D. G. Detergent-Insoluble EAAC1/EAAT3 Aberrantly Accumulates in Hippocampal Neurons of Alzheimer's Disease Patients. **Brain Pathology**, v.19 p.267–278, apr. 2009.

FARZIN, D.; MANSOURI, N. Antidepressant-like effect of harmaline and other β -carbolines in the mouse forced swim test. **European Neuropsychopharmacology**, v.16, p.324–328, 2006.

FONTANILLA, D.; JOHANNESSEN, M.; HAJIPOUR, A. R.; COZZI, N. V.; JACKSON, M. B.; RUOHO, A. E. The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. **Science**, v. 323, feb. 2009.

FORTUNATO, J. J.; RÉUS, G. Z.; KIRSCH, T. R.; STRINGARI, R. B.; FRIES, G. R.; KAPCZINSKI, F.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; QUEVEDO, J. Chronic administration of harmaline elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. **Journal Neural. Transm.**, v.117, p.1131–1137, 2010.

GARCIA, E. E.; SMITH, R. L.; SANDERS-BUSH, E. Role of Gq protein in behavioral effects of the hallucinogenic drug 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane. **Neuropharmacology**, v. 52, n.8, p.1671–1677, jun. 2007.

GLENNON, R. A.; DUKAT, M.; GRELLA, B.; HONG, S.; COSTANTINO, L.; TEITLER, M.; SMITH, C.; EGAN, C.; DAVIS, K.; MATTSON, M. V. Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin 5-HT(2) and 5-HT(1A), dopamine D(2) and benzodiazepine receptors. **Drug Alcohol Depend.**, v.60, p.121–132, 2000.

GOTTLIEB, M.; DOMERCQ, M.; MATUTE, C. Altered expression of the glutamate transporter EAAC1 in neurons and immature oligodendrocytes after transient forebrain ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.20, p.678–687, 2000.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos de Psicofarmacologia. **Editora Atheneu**, São Paulo, p. 200–220, 2001.

GRESCH, P. J.; SMITH, R. L.; BARRETT, R. J.; SANDERS-BUSH, E. Behavioral Tolerance to Lysergic Acid Diethylamide is Associated with Reduced Serotonin-2A Receptor Signaling in Rat Cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p.1693–1702, 2005.

GROB, C. S.; MCKENNA, D. J.; CALLAWAY, J. C.; BRITO, G. S.; NEVES, E. S.; OBERLAENDER, G.; SAIDE, O. L.; LABIGALINI, E.; TACLA, C.; MIRANDA, C. T.; STRASSMAN, R. J.; BOONE, K. B. Human psychopharmacology of Hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. **J. Nerv. Ment. Dis.**, v.184, p.86–94, 1996.

GRUNEWALD, M.; MENAKER, D.; KANNER, B. I. Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1. **J. Biol. Chem.** v.277, p. 26 074–26 080, 2002.

HALBERSTADT, A. L.; BUELL, M. R.; MASTEN, V. L.; RISBROUGH, V. B.; GEYER, M. A. Modification of the effects of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine on exploratory behavior in rats by monoamine oxidase inhibitors. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 201, n.1, p.55–66, nov. 2008.

HALBERSTADT, A. L.; KOEDOOD, L.; POWELL, S. B.; GEYER, M. A. Differential contributions of serotonin receptors to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens in mice. **Journal of Psychopharmacol.**, v. 25, n.11, p.1548–1561, nov. 2011.

HALBERSTADT, A. L.; NICHOLS, D. E.; GEYER, M. A. Behavioral effects of $\alpha,\alpha,\beta,\beta$ -tetrahydro-5-MeO-DMT in rats: comparison with 5-MeO-DMT administered in combination with a monoamine oxidase inhibitor. **Psychopharmacology**, Berlin, v.221, n.4, p.709–718, jun. 2012.

HAN, Y. S.; KIM, J. M.; CHO, J. S.; LEE, C. S.; KIM, D. E. Comparison of the Protective Effect of Indole β -carbolines and R(-)-deprenyl Against Nitrogen Species-Induced Cell Death in Experimental Culture Model of Parkinson's Disease. **Journal of Clinical Neurology**, v.1, apr. 2005.

HAUGETO, O.; ULLENSVANG, K.; LEVY, L. M.; CHAUDHRY, F. A.; HONORE, T.; NIELSEN, M.; LEHRE, K. P.; DANBOLT, N. C. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.27 715–27 722, 1996.

HEEKEREN, K.; DAUMANN, J.; NEUKIRCH, A.; STOCK, C.; KAWOHL, W.; NORRA, C.; WABERSKI, T. D.; GOUZOUKIS-MAYFRANK, E. Mismatch negativity generation in the human 5HT_{2A} agonist and NMDA antagonist model of psychosis. **Psychopharmacology**, v.199, p.77–88, 2008.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu Rev Neurosci**, v.17, p.31–108, 1994.

HUSBANDS SM, GLENNON RA, GORGERAT S, GOUGH R, TYACKE R, CROSBY J, NUTT DJ, LEWIS JW, HUDSON AL. Beta-carboline binding to imidazoline receptors. **Drug Alcohol Depend.**, v. 64, p.203–208., 2001.

JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical Hypotheses**, X: xxx–xxx, 2005.

KUBO M.; ITO, E. Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. **Proteins**, v.15, p.411-9, 2004.

LABATE, B. C.; FEENEY, K. O processo de regulamentação da ayahuasca no Brasil e na esfera internacional: desafios e implicações. **Revista Periferia**, v.3, n.2, Traduzido por Silvia Pimenta Velloso Rocha; Artigo originalmente publicado no **International Journal of Drug Policy**, v.23 p.154– 161, 2012.

LI, Y.; SATTLER, R.; YANG, E. J.; NUNES, A.; AYUKAWA, Y.; AKHTAR, S.; JI, G.; ZHANG, P. W.; ROTHSTEIN, J. D. Harmine, A Natural Beta-Carboline Alkaloid, Upregulates Astroglial Glutamate Transporter Expression. **Neuropharmacology**, v. 60, p.1168–1175, jun. 2011.

LUNA, L. E. The Healing Practice of a Peruvian Shaman. **Journal of Ethnopharmacology**, v.11, p. 123-133, nov. 1984.

MACHADO, A. Neuroanatomia Funcional. **Editora Atheneu**, Rio de Janeiro, São Paulo e Ribeirão Preto; ed. 2, p. 275-385, (2006)

MACRAE, E. The ritual use of ayahuasca by three Brazilian religions. In: **Drug Use and Cultural Contexts**, COOMBER, R.; SOUTH, N., London, **Free Association Books**, p. 27-45, 2004.

MAHER, P.; DAVIS, J. B. The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity. **The Journal of Neuroscience**, v.16, n.20, p.6394–6401, oct. 1996.

MARTIN, J. H. Neuroanatomy: text and atlas. **The McGraw-Hill Companies**, New York, ed. 3, p. 377-406, 2003.

MASLIAH, E.; ALFORD, M.; MALLORY, M.; ROCKENSTEIN, E.; MOECHARS, D.; VAN LEUVEN, F. Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. **Exp. Neurol.** v.163, p.381–387, 2000.

MAVLYUTOV, T. A.; EPSTEIN, M. L.; LIU, P.; VERBNEY, Y. I.; ZISKIND- CONHAIM, L.; RUOHO, A. E. Development of the sigma-1 receptor in c-terminals of motoneurons and colocalization with the n,n'-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl transferase. **Neuroscience**, v.206, p.60–68, mar. 2012.

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

MCKENNA, D. J.; CALLAWAY, J. C.; GROB, C. S. The scientific investigation of Ayahuasca: a review of past and current research. **The Heffter Review of Psychedelic Research**, v.1, p.65-76, 1998.

MCKENNA, D. J.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and betacarboline constituents of Ayahuasca. **J. Ethnopharmacology**, v.10, p.195-223, 1984.

MENDONÇA NETTO, S.; GUIMARÃES, F. S. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus maze exploration after a single restraint experience. **Behavioural Brain Research**, v.77, p.215-218, 1996.

MUSCHAMP, J. W.; REGINA, M. J.; HULL, E. M.; WINTER, J. C.; RABIN, R. A. Lysergic acid diethylamide and [-]-2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine increase extracellular glutamate in rat prefrontal cortex. **Brain Research**, v.1023, n.1, p.134-140, oct. 2004.

NARANJO, P. El ayahuasca in la arqueologia ecuatoriana. **Am. Indig.**, v.46, p.117-128, 1986. In: MCKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v.102, p. 111 – 129, 2004.

OLIVEIRA, C. D. R.; MOREIRA, C. Q.; MARQUES DE SÁ, L. R.; SPINOSA, H. S.; YONAMINE, M. Maternal and Developmental Toxicity of Ayahuasca in Wistar Rats. **Birth Defects Research**, v. 89, p.207-212, 2010.

OLNEY, J. W. 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer, E. G.; Olney, J. W. Kainic Acid as a Tool in Neurobiology, **Ed. Raven**, New York pp. 95-171, 1978.

PAXINOS, G. The rat nervous system. **Academic Press**, Austrália. ed.2, 443p., 1995.

PETR, G. T.; BAKRADZE, E.; FREDERICK, N. M.; WANG, J.; ARMSSEN, W.; AIZENMAN, E.; ROSENBERG, P. A. Glutamate transporter expression and function in a striatal neuronal model of Huntington's disease. **Neurochem Int.**, v.62, n.7, p.973–981, jun. 2014.

PUIG, M. V.; CELADA, P.; DÍAZ-MATAIX, L.; ARTIGAS, F. In Vivo Modulation of the Activity of Pyramidal Neurons in the Rat Medial Prefrontal Cortex by 5-HT_{2A} Receptors: Relationship to Thalamocortical Afferents. **Oxford University Press**, v.13, p.870–882, aug. 2003.

RABIN, R. A.; REGINA, M.; DOAT, M.; WINTER, J. C. 5-HT_{2A} receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in the stimulus effects of hallucinogens. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 31, p. 29-37, 2002.

RAISANEN, M.; KARKKAINEN, J. Mass fragmentographic quantification of urinary N,N-dimethyltryptamine and bufotenine. **Journal of Chromatography**, v.162 p.579-584, 1979.

REAGAN, L. P., ROSELL, D. R., WOOD, G. E., SPEDDING, M., MUN, C., ROTHSTEIN, J. Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: Reversal by tianeptine. **Pnas**, v.101, n.7, p. 2179-2184, 2004.

RÉUS, G. Z.; STRINGARI, R. B.; DE SOUZA, B.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; QUEVEDO, J. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, n.5, p.325-331, sept./oct. 2010.

RIBA, J.; ANDERER, P.; MORTE, A.; URBANO, G.; FRANCESC, J.; SALETU, B.; BARBANOJ, M. J. Topographic pharmaco-EEG mapping of the effects of the South American psychoactive beverage ayahuasca in healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol**, v.53, p.613–628, 2002.

RIBA, J.; ANDERER, P.; JANÉ, F.; SALETU, B.; BARBANOJ, M. J. Effects of the South American Psychoactive Beverage Ayahuasca on Regional Brain Electrical Activity in Humans: A Functional Neuroimaging Study Using Low-Resolution Electromagnetic Tomography. **Neuropsychobiology**, v.50, p.89–101, 2004.

RIBA, J.; RODRÍGUEZ-FORNELLS, A.; URBANO, G.; MORTE, A.; ANTONIJOAN, R.; MONTERO, M.; CALLAWAY, J. C.; BARBANOJ, M. J. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v.154, p.85–95, 2001.

RIBA, J.; ROMERO, S.; GRASA, E.; MENA, E.; CARRÍO, I.; BARBANOJ, M. J. Increased frontal and paralimbic activation following ayahuasca, the pan-amazonian inebriant. **Psychopharmacology**, p. 6, febr. 2006.

RIBA, J.; VALLE, M.; URBANO, G.; YRITIA, M.; MORTE, A.; BARBANOJ, M. J. Human Pharmacology of Ayahuasca: Subjective and Cardiovascular Effects, Monoamine Metabolite Excretion, and Pharmacokinetics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p.73–83, 2003.

ROSA M. L.; SILVA R. C.; MOURA-DE-CARVALHO F. T.; BRANDÃO M. L.; GUIMARÃES F. S.; DEL BEL E. A. (2005). Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n.11, p. 1691-6, nov. 2005.

ROTHSTEIN, J. D. Current hypothesis for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. **Annals of Neurology**, v.65, p.3-9, 2009.

- SADEK, P. C.; CARR, P. W.; DOHERTY, R. M.; KAMLET, M. J.; TAFT, R. W.; ABRAHAM, M. H. Study of retention processes in reversed-phase high-performance liquid chromatography by the use of the solvatochromic comparison method. **Anal. Chem.**, v.57, p. 2971–2978, 1985.
- SANTOS, R. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; STRASSMAN, R. J.; MOTTA, V.; CRUZ, A. P. M. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 507–513, 2007.
- SATTLE, R.; CHARITON, M. P.; HAFNER, M.; TYMIANSKI, M. Distinct Influx Pathways, Not Calcium Load, Determine Neuronal Vulnerability to Calcium Neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v.71, p.2349-2364, 1998.
- SCHULTES, R. E. The identity of the malpighiaceae narcotics of the South America. **Bot. Mus. Leaf. Harv. Univ.**, p.1-56, 1957. In: MCKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v.102, p. 111 – 129, 2004.
- SCHWARZ, M. J.; HOUGHTON, P. J.; ROSE, S.; JENNER, P.; LEES, A. D. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. **Pharmacol Biochem Behav**, v.75, n.3, p.627-33, jun. 2003.
- SCIMEMI, A.; TIAN, H.; DIAMOND, J. S. Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA receptor activation and synaptic plasticity in the hippocampus. **Journal Neuroscience**, v. 29, n.46, p.14581-14595, nov. 2009.
- SEPKUTY, J. P.; COHEN, A. S.; ECCLES, C.; RAFIQ, A.; BEHAR, K.; GANEL, R.; COULTER, D. A.; ROTHSTEIN, J. D. A Neuronal Glutamate Transporter Contributes to Neurotransmitter GABA Synthesis and Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v.22, n.15, p.6372-6379, aug. 2002.
- SMITH, R. L.; CANTON, H.; BARRETT, R. J.; SANDERS-BUSH, E. Agonist properties of *N,N* dimethyltryptamine at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 61, p. 323-330, 1998.
- SPRUCE, R. A. On some remarkable narcotics of the Amazon Valley and Orinoco. *Ocean Highways*. **Geographical Magazine**, v.1, p.184-193, 1873.
- STRASSMAN, R. J. DMT: The Spirit Molecule. **Park Street Press**, Rochester, Vermont. p.358, 2001.
- STRASSMAN, R. J. Human psychopharmacology of *N,N*-dimethyltryptamine. **Behavioural Brain Research**, v.73, p.121-124, 1996.
- TAO, R.; MA, Z.; AUERBACH, S. B. Influence of AMPA/kainate receptors on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat midbrain raphe and forebrain. **Br. J. Pharmacol.**, v.121, p.1707–1715, 1997.
- TELLEZ, R.; GÓMEZ-VIQUEZ, L.; MENESES, A. GABA, glutamate, dopamine and serotonin transporter expression on memory formation and amnesia. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.97, p.189-201, 2012.
- VALENTINO, R. J.; BEY, V.; PERNAR, L.; COMMONS, K. G. Substance P Acts through local circuits within the rat dorsal raphe nucleus to alter serotonergic neuronal activity. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.7155–7159, 2003.
- VAN WAARDE, A.; RAMAKRISHNAN, N. K.; RYBCZYNSKA, A. A.; ELSINGA, P. H.; ISHIWATA, K.; NIJHOLT, I. M.; LUITEN, P. G. M.; DIERCKX, R. A. The cholinergic system, sigma-1 receptors and cognition. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 543–554, 2011.
- VOLLENWEIDER, F. X.; KOMETER, M. The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. **Nature Reviews/Neuroscience**, v.11, p.642-651, sep. 2010.
- WHANG, Y. H.; SAMOYLENKO, V.; TEKIWANI, B. F.; KHAN, I. A.; MILLER, L. S.; CHAURASIYA, N. D.; RAHMAN, M. M.; TRIPATHI, L. M.; KHAN, S. I.; JOSHI, V. C.; WIGGER, F. T.; MUHAMMAD, I. Composition, standardization and chemical profiling in *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p.662-671, 2010.

YANG W.; KILBERG M. S. Biosynthesis, intracellular targeting and degradation of the EAAC1 glutamate/aspartate transporter in C6 glioma cells. **J. Biol. Chem**, v. 277, n. 38, p. 350–38, 357, 2002

YRITIA, M.; RIBA, J.; ORTUNO, J.; RAMIREZ, A.; CASTILLO, A.; ALFARO, Y.; DE LA TORRE, R.; BARBANOJ, M. J. Determination of *N,N*-dimethyltryptamine and b-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. **Journal of Chromatography**, p. 271–281, 2002.

YUEN, E. Y.; JIANG, Q.; CHEN, P.; FENG, J.; YAN, Z. Activation of 5-HT_{2A/C} Receptors Counteracts 5-HT_{1A} Regulation of *N*-Methyl-D-aspartate Receptor Channels in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p.17194–17204, jun. 2008.

ZHONG, P.; YUEN, E. Y.; YAN, Z. Modulation of Neuronal Excitability by Serotonin-NMDA Interactions in Prefrontal Cortex. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 38, n. 2, p. 290–299, jun. 2008.

ZINK, M.; VOLLMAYR, B.; GEBICKE-HAERTER, P. J.; HENN, F. A. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 2, p. 465-473, 2010.