UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca

Alex Roberto Melgar Figueroa

RIBEIRÃO PRETO

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Alex Roberto Melgar Figueroa

Orientador: Prof. Dr. Erikson Felipe Furtado

RIBEIRÃO PRETO

2012

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Melgar Figueroa, Alex Roberto

Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca.
Ribeirão Preto, 2012.

118p.:18il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de
Concentração: Toxicologia.

Orientador: Furtado, Erikson Felipe

1. Ayahuasca; 2. Neurotoxicidade; 3. Apoptose Neuronal;
4. Estresse Oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Alex Roberto Melgar Figueroa

Título: Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

À minha esposa Edna e aos meus filhos
Stephanie Ariadne e Pierre Alejandro Melgar
Espreáfico. Com todo meu Amor.

Aos meus pais Juan Melgar Galiano e Carmen
Figueroa de Melgar (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - pelo apoio para a realização do Curso de Doutorado no Brasil como parte do Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de participar em seu conceituado Programa de Pós-Graduação em Toxicologia.

Ao Professor Doutor Erikson Felipe Furtado. Mestre nas Ciências e na Arte da vida.

À Universidade de San Carlos de Guatemala, por facilitar o intercâmbio cultural com o Brasil e, assim, permitir ampliar meus conhecimentos profissionais.

A todas as pessoas que me brindaram com sua valiosa colaboração nas diversas etapas deste trabalho, especialmente:

- À Professora Doutora Elaine Aparecida Del Bel, Coordenadora do Laboratório do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) e à técnica desse laboratório, Célia Aparecida da Silva, pelo treinamento que recebi em técnicas de manuseio, tratamento farmacológico, sacrifício e dissecções neuro-anatômicas em ratos Wistar.
- Ao Professor Doutor Mauricio Yonamine, Coordenador do Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LATFCFRP-USP), pela facilitação do chá ayahuasca.
- À Juliana Serafim David e Fabiana Spinetti dos Santos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), pela valiosa ajuda na realização dos experimentos, das análises das amostras e na obtenção dos resultados.
- Ao Professor Doutor Manoel Jorge Nobre, do Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Departamento de Psicologia e Educação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), pelo treinamento em procedimentos de tratamento e observação sistemática de ratos Wistar.

- À Professora Doutora Catarina Satié Takashi, do Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), pela orientação para a realização de testes em apoptose neuronal, principalmente o teste do COMETA.
- Ao Professor Doutor Bruno Espinosa de Martinis, na época pesquisador do Centro de Medicina Legal (CEMEL) do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP, pela colaboração na tentativa das análises cromatográficas do chá ayahuasca em amostras biológicas de ratos Wistar.
- Ao Professor Doutor Alceu Jordão Jr., Coordenador do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP-USP e à técnica desse Laboratório, Paula Payão, pelo apoio na realização dos estudos experimentais e na análise laboratorial de todas as amostras de tecidos e fluidos.
- Aos funcionários do Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP: Adalberto Verzeze, Roni Fabbris e Maurício Arantes, pela ajuda no cuidado, manuseio, tratamento e sacrifício dos animais.
- Ao Professor Doutor Antonio Cardozo dos Santos, Coordenador do Laboratório de Toxicodinâmica do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP e à Doutoranda desse Departamento, Maria Augusta Carvalho Rodrigues, pela colaboração na análise de apoptose neuronal pelo sistema de caspases.
- Ao Professor Doutor Amilton Antunes Barreira, Coordenador do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP-USP e à técnica desse Laboratório Aracy Vieira da Silva Dias, pela colaboração na preparação dos tecidos para análises de apoptose neuronal.
- À Professora Doutora Leandra Náira Zambelli Ramalho do Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP, pela colaboração na realização do ensaio do TUNEL.
- Ao Especialista do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP, Antonio Renato Meirelles, pela colaboração nos procedimentos

microscópicos e de software para a interpretação dos resultados do ensaio do TUNEL

- A todo o pessoal do Programa de Ações Integradas para a Prevenção do uso de Álcool e Drogas na Comunidade - PAI-PAD/FMRP-USP, especialmente a: Maria Lucia Trevilato Naccarato e Elisandra Meireles, pelo apoio administrativo e de secretariado; Allan Patrick Leite e Guilherme Bernardo van der Geest pela ajuda na formatação do texto.

Epígrafe

“El hombre es algo que debe ser superado. El hombre es un puente y no un fin”.

“Criar é a verdadeira emancipação da dor e o alívio da vida; mas para que o criador nasça, são necessárias muitas dores e muitas metamorfoses”.

“Não há fatos eternos como não há verdades absolutas... temos a arte para não morrer da verdade”.

Friedrich Nietzsche

“Muitas coisas têm que ser destruídas para edificar a nova ordem....minha carne pode ter medo; eu, não”.

Jorge Luis Borges (“El Aleph” - Deutsches Requiem)

“O falso juízo e o erro residem sempre no que as opiniões acrescentam às sensações”.

Epicuro (“Carta a Heródoto”)

RESUMO

Melgar Figueroa, A. R. **Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca**, 2012. 118f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O chá ayahuasca é uma bebida psicotrópica que tem provocado polêmica devido ao uso indiscriminado por alguns grupos de pessoas e pela facilidade de compra pela internet. A bebida é feita por meio da decocção conjunta das plantas *Banisteriopsis Caapi* e *Psychotria Viridis*. Contém alcaloides beta-carbolínicos (β -carbolínicos) como harmina (HRM), harmalina (HRL) e harmalol, que possuem efeitos inibidores da monoaminooxidase A (MAO-A), sendo considerados protetores contra o dano oxidativo neuronal, além de ter ações anticonvulsivantes e efeitos ansiolíticos. Por outro lado, esses alcaloides, conjuntamente com a N,N-dimetiltriptamina, principal componente alucinógeno da *P. Viridis*, também têm sido descritos como neurotoxinas endógenas que podem participar no início de doenças neurodegenerativas. No presente estudo, a neurotoxicidade do chá ayahuasca foi estudada por meio da determinação da ocorrência de apoptose neuronal pelo método de fluorescência da Caspase-3 e pelo ensaio do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay). Foram administrados, diariamente, durante vinte e um dias, por meio de gavagem gástrica, 2 ml de água a um grupo de ratos Wistar machos, controle (n=12) e 2 ml do chá ayahuasca 50% a outro grupo similar (n=12). Foram realizadas análises de glutathiona (GSH), malonaldeído (MDA) e vitamina E séricas e hepáticas para avaliar a peroxidação lipídica (LPO), assim como análises urinárias de creatinina e ureia para avaliar o funcionamento renal dos animais. Os resultados nas análises do TUNEL mostraram significância estatística no grupo ayahuasca em relação ao grupo controle. A análise de Caspase-3 não mostrou diferenças entre os dois grupos. Os valores de MDA e GSH sérica, assim como da vitamina E hepática, apresentaram redução estatisticamente significativa no grupo tratado com o chá ayahuasca. Os resultados desta investigação apontam para a presença de um processo de estresse oxidativo nos ratos tratados com este chá, com achados estatisticamente significativos de apoptose neuronal com o ensaio do TUNEL. É recomendável a realização de outros estudos para elucidar os mecanismos neurotóxicos do chá ayahuasca.

Palavras-Chave: Ayahuasca, Neurotoxicidade, Apoptose Neuronal, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Melgar Figueroa, A. R. **Evaluation of the neurotoxic effects of ayahuasca tea.** 2012. 118f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Ayahuasca tea is a psychotropic beverage that has caused controversy due to the fact of being used indiscriminately by some group of people and the ease of purchase in the worldweb. The tea is derived by boiling the bark of the liana *Banisteriopsis Caapi* (*B. Caapi*) together with the leaves of *Psychotria Viridis* (*P. Viridis*). *B. Caapi* contains alkaloids as harmine, harmaline and harmalol, highly active reversible inhibitors of monoamine oxidase A and MAO-B. These compounds have been described as protecting neuronal mitochondria against oxidative damage, besides having anticonvulsant and anxiolytic actions. On the other hand, these alkaloids, together with dimethyltryptamine (DMT), the main hallucinogenic component of *P. Viridis*, also had been described as endogenous neurotoxins that could participate in neurodegenerative diseases. In this work, the neurotoxicity of ayahuasca was studied by the method of fluorescence of Caspase-3 and the TUNEL assay. By gastric gavage, was administered in a daily regime during twenty-one days, 2 ml of water to a group of rats (control n=12) and 2 ml of 50% ayahuasca tea to another similar group (n=12). Analysis of reduced glutathione (GSH), malonaldehyde (MDA) and vitamin E was made, to assess lipid peroxidation and also analysis of urinary urea and creatinine, to assess kidney function of animals. The results of the TUNEL assay, showed statistical significant values in the ayahuasca group. No differences were found in Caspase-3 analysis. The values of serum MDA and GSH as well as hepatic vitamin E, showed a statistically significant reduction in the group treated with ayahuasca. The results of this investigation indicate the presence of oxidative stress in rats treated with ayahuasca tea, with statistical significant values of neuronal apoptosis measured by TUNEL assay. It is advisable to conduct further studies to elucidate the neurotoxic effects of ayahuasca tea.

Keywords: Ayahuasca, Oxidative Stress, Neurotoxicity, Neuronal Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da Harmina. (Fonte: Merck Index 12th Ed. copiado do site erowid.org em 28/04/2011).....	31
Figura 2.	Estrutura química da harmalina. (Fonte: Merck Index 12th Ed. copiado do site erowid.org em 28/04/2011).....	31
Figura 3.	Estrutura química da Dimetiltryptamina (5-metoxi-N,N-dimetiltryptamina). (Fonte: Merck Index 12th Ed. copiado do site erowid.org em 28/04/2011)	32
Figura 4.	Via extrínseca da apoptose. (Fonte: Gewies, 2003, p.8, tradução do autor)	43
Figura 5.	(A) Via intrínseca ou mitocondrial da apoptose. (B) Formação e ativação do apoptosoma. (Fonte: Gewies, 2003, p.9, tradução do autor)	44
Figura 6.	Representação esquemática de algumas das principais vias sinalizadoras de apoptose. (Fonte: Gewies, 2003, p. 11, tradução do autor)	45
Figura 7.	Amostra do chá ayahuasca utilizada durante o estudo (foto do autor)	52
Figura 8.	Esquema do procedimento de aclimação dos ratos Wistar utilizados no estudo	53
Figura 9.	Esquema das condições e procedimentos com os ratos Wistar durante o período de tratamento do estudo	54
Figura 10.	Condições de alojamento e alimentação dos ratos Wistar no Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. (A) ratos do grupo ayahuasca; (B) ratos do grupo controle; (C) distribuição dos ratos em três caixas cada grupo com ração e água <i>ad libitum</i> ; (D) condições físicas da sala do biotério onde ficaram alojados os animais. (Fotos do autor)	55
Figura 11.	Administração do chá ayahuasca por gavagem gástrica em ratos Wistar. Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. (Foto do autor)	56

Figura 12.	Coleta de amostras urinárias dos ratos Wistar dos grupos ayahuasca e controle nas gaiolas metabólicas. Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. (Foto do autor)	57
Figura 13.	Extração cirúrgica do cérebro dos ratos Wistar. Biotério do Departamento de Clínica Médica FMRP-USP. (Foto do autor) ..	58
Figura 14.	Extração cirúrgica do fígado de ratos Wistar. Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. (Foto do autor)	59
Figura 15.	Células neuronais de ratos Wistar do grupo ayahuasca. Com apoptose	88
Figura 16.	Células neuronais de ratos Wistar do grupo ayahuasca. Com apoptose	88
Figura 17.	Células neuronais de ratos Wistar do grupo controle. Sem apoptose	89
Figura 18.	Células neuronais de ratos Wistar do grupo controle. Sem apoptose	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores dos pesos dos ratos dos grupos ayahuasca e controle durante seis semanas, expressos em gramas.	68
Tabela 2 -	Valores do ganho de peso e ganho percentual dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em gramas.	69
Tabela 3 -	Valores dos pesos do fígado e cérebro dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em gramas.	71
Tabela 4 -	Valores dos níveis de ureia em três amostras de urina dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em mg/dL.	74
Tabela 5 -	Valores dos níveis de creatinina em três amostras de urina dos ratos dos grupos Ayahuasca e Controle, expressos em mg/dL.	78
Tabela 6 -	Valores hepáticos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos Ayahuasca e Controle, expressos em nmol/g proteína; μ mol/g proteína e mmol/g tecido, respectivamente.	80
Tabela 7 -	Valores séricos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos Ayahuasca e Controle, expressos em nmol/ g proteína, μ mol/g proteína e nmol/mL.	82
Tabela 8 -	Valores dos resultados das análises de Caspase-3 e TUNEL dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em nível de fluorescência e número de células positivas, respectivamente.	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Ganho comparativo de peso em gramas (g) entre os grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10), após 21 dias de tratamento.....	70
Gráfico 2.	Ganho percentual de peso em gramas. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10).	71
Gráfico 3.	Comparação do peso do cérebro em gramas. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).....	72
Gráfico 4.	Comparação do peso do fígado em gramas. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).....	73
Gráfico 5.	Comparação dos níveis de ureia em mg/dL. Primeira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12).	75
Gráfico 6.	Comparação dos níveis de ureia em mg/dL. Segunda coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12).	76
Gráfico 7.	Comparação dos níveis de ureia em mg/dL. Terceira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10).	77
Gráfico 8.	Comparação dos níveis de creatinina urinária em mg/dL. Primeira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12). ...	78
Gráfico: 9.	Comparação dos níveis de creatinina urinária em mg/dL. Segunda coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12). ...	79
Gráfico 10.	Comparação dos níveis de creatinina urinária em mg/dL. Terceira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10). ...	79
Gráfico 11.	Comparação dos níveis de malonaldeído hepático (MDA) em nmol/gP. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).	81
Gráfico 12.	Comparação dos níveis de glutathiona reduzida hepática (GSH) em $\mu\text{mol/gP}$. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).	81
Gráfico 13.	Comparação dos níveis de vitamina E hepática em mmol/gT. Grupos Ayahuasca (n=11) e controle (n=10).	82
Gráfico 14.	Comparação dos níveis de malonaldeído sérico (MDA) em nmol/gP. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).	83
Gráfico 15.	Comparação dos níveis de Glutathiona Reduzida sérica (GSH) em $\mu\text{mol/gP}$. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).	84

Gráfico 16.	Comparação dos níveis de vitamina E sérica em nmol/mL. Grupos Ayahuasca (n=11) e controle (n=10).....	84
Gráfico 17.	Níveis comparativos de Caspase-3 expressos em valores de fluorescência. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).....	86
Gráfico 18.	Comparação dos valores do TUNEL expressa em número de células apoptóticas (nº) Grupo Ayahuasca (n=6) e Controle (n=6).	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT-	5 hidroxitriptamina (Serotonina)
5-MeO-DMT-	5 metoxi-N,N-dimetiltriptamina
AGPI-	ácidos graxos poliinsaturados
ANVISA-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apaf-	Fator ativador da protease apoptótica (Apoptotic activator factor)
CEMEL-	Centro de Medicina Legal
CONAD-	Conselho Nacional Antidrogas
d-ATP-	Dioxi-Adenosina-Trifosfato
DIMED-	Divisão de Medicamentos do Ministério da Saúde
DISC-	Complexo Sinalizador Indutor de Morte (Death Inductor Signaling Complex)
DL50-	Dose letal
DMT-	Dimetiltriptamina
DNA-	Ácido desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)
DU-	Dose usual
DU10-	Dose dez vezes maior do que a dose usual
DU35-	Dose trinta e cinco vezes maior do que a dose usual
ERN-	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO-	Espécies Reativas de Oxigênio
FCFRP-USP-	Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FORP-USP-	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da universidade de São Paulo

FDA-	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-NPD-	Cromatografia em fase Gasosa com Detector Nitrogênio-Fósforo
GSH-	Glutathione
HPLC-	<i>High Pressure Liquid Chromatography (cromatografia líquida de pressão elevada. tradução do autor)</i>
HRL-	Harmalina
HRM-	Harmina
IAPs-	Inibidores da Apoptose
IMAO-	Inibidor da Monoamino-Oxidase
LAT-	Laboratório de Análises Toxicológicas
LDL-	Lipoproteína de baixa densidade (Low-density-lipoprotein)
LPO-	Lipo-peroxidação / peroxidação lipídica
MAO-	Monoamino-oxidase
MAO-A-	Monoamino-oxidase A
MAO-B-	Monoamino-oxidase B
MDA-	Malonaldeído
MPP-	Metilfenilpiridínio
MPTP-	Metilfeniltetraidropiridínio
NGF-	Fator de crescimento neural (Neural Growth Factor)
PARP-	Poly polimerase (ADP- ribose)
pH-	Potencial hidrogeniônico
pHi-	Potencial hidrogeniônico intracelular
RL-	Radicais livres
RPM-	Revoluções por minuto

SMAC-	Segundo ativador de Caspase diretamente mitocondrial (Second mitochondrial-direct activator of caspase)
SPSS-	<i>Statistical package for the Social Science</i>
β-carbolinas-	Beta carbolinas
TBARS-	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (ThioBarbituric Acid Reactive Substances)
THH-	Tetraidro-armina
TUNEL-	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay</i>
α-tocoferol-	Alfa tocoferol

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Abreviaturas e Siglas

REVISÃO DE LITERATURA	27
1.1. Ayahuasca	29
1.2. Efeitos Neuroprotetores.....	33
1.3. Efeitos Neurotóxicos.....	36
1.4. Peroxidação Lipídica	38
1.5. Apoptose Neuronal.....	40
 2- OBJETIVO.....	 46
2.1. Principal	47
2.2. Específicos.....	47
 3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	 48
3.1. Materiais.....	50
3.1.1. Obtenção, composição e dosagem do chá Ayahuasca	50
3.1.2. Amostra de animais e condições experimentais	52
3.1.2.1. Perdas amostrais.....	59
3.2. Métodos	60
3.2.1. Análises laboratoriais	60
3.2.1.1. Quantificação de proteínas totais	60
3.2.1.2. Quantificação de glutathiona reduzida.....	60
3.2.1.3. Quantificação de malonaldeído	61
3.2.1.4. Quantificação de Vitamina E	62
3.2.1.5. Quantificação de creatinina urinária.....	63
3.2.1.6. Quantificação de ureia urinária	64
3.2.1.7. Método laboratorial para a análise da apoptose neuronal.....	64
3.2.1.7.1. Ensaio Caspase-3	64
3.2.1.7.2. Ensaio do TUNEL.....	65
3.3. Análise Estatística	66
 4- RESULTADOS.....	 67
4.1. Valores das Pesagens dos Animais e dos Órgãos	68
4.2. Valores dos Resultados das Análises Urinárias.....	73
4.3. Valores das Análises de Peroxidação Lipídica	80
4.4. Valores das Análises de Apoptose Neuronal.....	85

5- DISCUSSÃO.....	91
6- CONCLUSÕES.....	104
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
8- ANEXOS.....	117
ANEXO DE REVISÃO	

1. REVISÃO DE LITERATURA

Historicamente, o uso do chá Ayahuasca tem apresentado diversas conotações e contextos, desde os de tipo religioso, visionário ou introspectivo (COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005), passando pelo uso terapêutico contra o abuso de drogas (CARLINI, 2003; McKENNA, 2004; McKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a,b), até o meramente psicodélico ou recreativo pelos seus efeitos alucinógenos. Também cabe ressaltar o uso médico de alguns dos seus componentes, pois nas décadas de 1920-1930 as beta-carbolinas (β -carbolinas) foram utilizadas durante um curto período de tempo, no tratamento da doença de Parkinson (SCHWARZ et al., 2003). Apesar da longa história e tradição do uso em contextos xamânicos, o uso liberado da ayahuasca já provocou muita polêmica, pois desde 1982 vem sendo discutida a sua segurança toxicológica. Em 1984, o chá ayahuasca figurava na lista de substâncias proscritas pela Divisão de Medicamentos do Ministério da Saúde (DIMED), cuja competência foi transferida para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2002. Em 1987, a substância foi legalizada oficialmente e em 2004, o Conselho Nacional Antidrogas (CONAD) autorizou seu uso religioso e para pesquisas científicas (OLIVEIRA, 2010). Vale ressaltar que o CONAD proíbe a comercialização do chá ayahuasca ou dos seus componentes, o turismo com fins de lucro e a propaganda sensacionalista ou com falsidade ideológica.

No Relatório final do Grupo Multidisciplinar de Trabalho do Ayahuasca (CONAD, 2006. p. 10), fica estabelecido que:

“Qualquer prática que implique utilização de Ayahuasca com fins estritamente terapêuticos, quer seja da substância exclusivamente, quer seja de sua associação com outras substâncias ou práticas terapêuticas, deve ser vedada, até que se comprove sua eficiência por meio de pesquisas científicas realizadas por centros de pesquisa vinculados a instituições acadêmicas, obedecendo às metodologias científicas. Desse modo, o reconhecimento da legitimidade do uso terapêutico da Ayahuasca somente se dará após a conclusão de pesquisas que a comprovem”.

Atualmente, existem poucos estudos publicados que avaliem e determinem o risco toxicológico do chá ayahuasca no sistema nervoso em animais de experimentação, especificamente nos processos apoptóticos e

existe muita controvérsia entre os efeitos neuroprotetores e os neurotóxicos das β -carbolinas e da dimetiltryptamina (DMT), principais componentes psicotrópicos do chá ayahuasca.

A apoptose é um processo fisiológico que determina o crescimento e desenvolvimento celular no sistema nervoso, já que neurônios imaturos ou defeituosos morrem em grandes quantidades desde o período do nascimento, e a morte celular excessiva é a principal característica das doenças neurodegenerativas agudas e crônicas (YUAN; YANKNER, 2000). Algumas circunstâncias traumáticas, assim como o uso de determinadas substâncias tóxicas, aceleram seus mecanismos de funcionamento, podendo levar a lesões neuronais irreversíveis. Outros estudos apontam diretamente o estresse oxidativo e especificamente a glutathione (GSH) como mediadores de apoptose neuronal (NICOLE; SANTIARD-BARON; CEBALLOS-PICOT, 1998).

A comercialização indiscriminada do chá Ayahuasca pela Internet e a existência de clínicas ou “*spas*” que oferecem sessões de consumo da substância em pacotes turísticos, pode incrementar o risco pelo uso indevido da substância e facilita a sua utilização por grupos mais amplos da população. (DALGARNO, 2008; TUPPER, 2008).

A liberação deste chá, amparada por lei no Brasil, representa a liberdade de culto, mas também pode acarretar aumento significativo dos adeptos ao consumo. Algumas seitas religiosas que utilizam o chá ayahuasca em seus rituais praticam um conjunto de técnicas, denominado “técnicas do consumo”, em mulheres grávidas, recém-nascidos, infantes e adolescentes; que consiste na administração regular da substância em diversas doses, podendo continuar a recebê-la ao longo da vida. (COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005).

1.1. Ayahuasca

O ayahuasca, que também é conhecido com os nomes de Hoasca, Daime, Yajé, Jagé, Natema e Vegetal, é um termo derivado da língua Quéchua, onde “aya” significa: alma, pessoa morta ou espírito e “waska”: liana,

corda ou cipó; portanto poderia ser traduzido como: “Corda da Alma”, “Corda dos Espíritos”, ou “Corda dos Mortos”. É uma bebida composta, resultado da decocção dos caules do cipó *Banisteriopsis Caapi* (família *Malpighiaceae*) com folhas da planta *Psychotria Viridis* (Chacrona, família *Rubiaceae*). O chá ayahuasca é utilizado amplamente em contextos ritualísticos xamânicos por povos indígenas de diversos países da região amazônica e também por pessoas não-indígenas em seitas urbanas com características religiosas, principalmente no Brasil. (COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005). Ele pertence a um grupo de substâncias utilizadas ao longo dos séculos em diversas regiões do planeta às quais são atribuídas propriedades que permitem uma experiência amplificadora da consciência. São denominadas enteogênicas (“Deus dentro de si próprio”), termo introduzido pelo filólogo Carl A.P. Ruck, no final da década de 1970, para designar as plantas que produzem experiência divina quando ingeridas por seres humanos (ILLANA, 2007). Algumas outras plantas que podem ser incluídas nessa categoria são os cogumelos: *Psilocibe mexicana* (“Passarinhos” e “Santo Isidro”); *Panaeolus Campanulatus* (“Teonanácatl” ou “Carne de Deus”) ricos em psilocibina; o fungo *Claviceps Purpúrea* (“esporão ou cravagem do centeio”), precursor do ácido lisérgico; a *Brugmansia Salveolens* (“Datura”, “Trombeta”, “Saia-branca”, “Zabumba” ou “Figueira do Diabo”) com toxicologia similar ao estramônio; e o cactus *Lophophora Williamsii* (“Peyote” ou “Peiote”), rico em mescalina.

O chá ayahuasca é uma bebida psicotrópica, alucinógena, rica em β -carbólicos do tipo harmala e alcaloides derivados indólicos. Seus principais componentes são a harmina (HRM), a harmalina (HRL), a tetraidro-armina (THH) e a N,N-dimetiltriptamina (DMT) (AGURELL et al., 1968; FREEDLAND; MANSBACH, 1999; McKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a,b; OLIVEIRA, 2010; OLIVEIRA, et al., 2010) (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 1 - Estrutura química da Harmina.
Fonte: Merck Index 12th Ed.

Figura 2 - Estrutura química da harmalina
Fonte: Merck Index 12th Ed.

Figura 3 - Estrutura química da Dimetiltryptamina (5-metoxi-N,N-dimetiltryptamina).
Fonte: Merck Index 12th Ed.

Tem sido descrito que a HRM e HRL obtidas do *B. caapi* funcionam, primariamente, como inibidores reversíveis da enzima monoaminoxidase tipo A (MAO-A), enquanto a THH contribui na atividade neuronal por meio da inibição da captação de serotonina em sítios pré-sinápticos, proporcionando aumento desse neurotransmissor. Esta inibição da MAO torna biodisponível a imetiltryptamina (DMT), já que sem essa ação sinérgica é praticamente inativa pela via oral. A DMT é um potente agente psicodélico obtido das folhas do *P. viridis*, que se liga a sítios serotoninérgicos no cérebro e tipicamente facilita alterações na percepção da realidade com complexa formação mental de imagens (CALLAWAY et al., 1999; CARLINI, 2003; McKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984a,b).

Outros efeitos neurofisiológicos das β -carbolinas incluem: inibição competitiva da dopamina, epinefrina e norepinefrina nos sinaptossomas, inibição na síntese de aminas biogênicas e possível atuação nos receptores benzodiazepínicos (McKENNA, 2004).

A ingestão do chá ayahuasca está associada com profundas alterações da experiência têmporo-espacial incluindo expansão no espaço e sensação

lentificada do tempo. O uso do ayahuasca também está associado com estados emocionais positivos, altos níveis de inclinação à fantasia, absorção psicológica e ampla abertura para experiências místicas. Os principais efeitos subjetivos consistem em: visão de imagens coloridas e geométricas com os olhos fechados, alucinações (“mirações”) com visões de animais, “seres da floresta”, divindades, demônios, sensação de voar, substituição do corpo pelo de outro ser (homem ou animal), delírios parecidos com sonhos e sensação de vigilância e estimulação (BRESNICK; LEVIN, 2006; COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005; SHANON, 2002). Do ponto de vista toxicológico, o uso do chá pode provocar desidratação devida aos frequentes episódios de náusea, vômitos e diarreia que sofrem os consumidores, assim como a síndrome serotoninérgica, que é a consequência mais grave. É comum ocorrer hipertensão, palpitação, taquicardia, tremores, midríase, euforia e, às vezes, excitação agressiva (CALLAWAY et al., 1999; COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005). Logo após a descoberta da DMT endógena, que é gerada a partir do aminoácido essencial triptofano, alguns autores associaram o aumento nos níveis de DMT em fluidos humanos com a esquizofrenia (PIRES; OLIVEIRA; YONAMINE, 2010).

As concentrações de alcaloides contidas no chá ayahuasca podem variar de acordo com alguns autores. Callaway et al. (1999) reportaram que uma dose padrão de 100 ml contém 24 mg de DMT; 107 de THH; 20mg de HRL e 170 mg de HRM. Oliveira et al. (2010), descreve que em uma amostra de ayahuasca foram encontrados os seguintes alcaloides expressos em mg/ml: DMT= 0,42; HRM=1,37; HRL= 0,62; THH= 0,35. Pires, Oliveira e Yonamine (2010), também determinaram as concentrações de alcaloides em diferentes preparações de ayahuasca, obtendo os seguintes teores: 0,31 a 0,73 mg/mL de DMT; 0,21 a 0,67 mg/mL de THH; 0,64 a 1,72 mg/mL de HRL e 0,37 a 0,83 mg/mL de HRM. Cabe ressaltar que as concentrações e proporções dos alcaloides podem variar consideravelmente em diferentes amostras, dependendo do método de preparação do chá, assim como das quantidades e proporções das plantas utilizadas (McKENNA, 2004).

Sheng, Jiang e Yu (2011), em estudo recente sobre farmacocinética da 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) aplicada por via intravenosa e intraperitoneal em camundongos afirmam que a 5 MeO-DMT possui propriedades de farmacocinética não linear, sugerindo que o risco de intoxicação pode ser incrementado desproporcionalmente com altas doses. Referem que os poucos estudos farmacocinéticos utilizando modelos com ratos, descrevem rápida absorção e eliminação da 5 MeO-DMT e que a desaminação mediada pela MAO-A constitui sua principal via metabólica e que a N-oxigenação, N-desmetilação e O-desmetilação também têm sido reportadas. Outro autor relata que a dose letal (DL50) da DMT em camundongos foi de 47 mg/kg intraperitonealmente e de 32 mg/kg por via intravenosa, considerando esses valores altamente tóxicos (GABLE, 2007).

Um estudo de farmacologia humana (RIBA et al., 2003), utilizando cápsulas liofilizadas de ayahuasca com 0.6 e 0.85 mg de DMT/Kg de peso corporal, revelou que o composto produz notáveis efeitos subjetivos com pico entre 1,5 a 2 horas após a ingestão, incluindo um incremento nos escores de humor positivo e ativação. Os autores sugerem que o principal sítio de ação da HRM seja periférico e que a inibição da MAO a este nível preveniria a primeira passagem do metabolismo da DMT e permitiria seu acesso à circulação sistêmica e ao sistema nervoso central.

Em outro estudo clínico utilizando duas doses repetidas de ayahuasca em intervalo de 4 horas, foram encontradas alterações fisiológicas e psicológicas significativas em relação ao placebo, tais como: alteração dos efeitos subjetivos positivos, intensificação dos efeitos psicotrópicos e aumento dos efeitos secundários negativos (atribuídos a aumento nos níveis de DMT); alteração no eletroencefalograma com aumento da atividade cerebral espontânea, principalmente na banda de frequência beta; aumento nos níveis de prolactina e cortisol e diminuição nos níveis de hormônio do crescimento; este último fenômeno foi atribuído a mudanças nos receptores serotoninérgicos (SANTOS et al., 2011).

1.2. Efeitos Neuroprotetores

Diversos autores têm descrito as propriedades neuroprotetoras das β -carbolinas contra os efeitos citotóxicos dos derivados oxidativos da dopamina e os efeitos excitotóxicos do glutamato e do metilfeniltetraidropiridínio (MPTP) (KIM et al., 2001; LEE et al., 2000; MOURA et al., 2007; PARK et al., 2003). Estas propriedades poderiam ser devidas ao fato de que as β -carbolinas exercem ação moduladora das funções neuronais, alterando a regulação do potencial hidrogeniônico intracelular (pHi) e reduzindo as espécies reativas de oxigênio (ERO) (BONNET; SCHERBAUM; WIEMANN, 2008). Outros autores mencionam seus efeitos antitumorais, antioxidantes e protetores contra a radiação (CHEN et al., 2005; HOU et al., 2004; LI; LIANG; PAN, 1995). Também lhes são atribuídos efeitos ansiolíticos, antiparkinsonianos, anticonvulsivantes e de incremento da memória a curto e longo prazo (LEE et al., 2000; MOURA et al., 2006; SCHWARZ et al., 2003).

Segundo Bonnet et al. (2008), a HRM pode modular as funções neurais por meio da alteração reduzida do pHi, produzindo diminuição da atividade neuronal que é considerada como um sinal neuroprotetor, e essa acidificação neuronal também poderia estar associada ao efeito inibitório da IMAO-A.

De acordo com Lee et al. (2000), as β -carbolinas HRL, harmalol e HRM atenuam o dano cerebral em ratos tratados com MPTP e metilfenilpiridínio (MPP) e podem prevenir, tanto o dano mitocondrial induzido por dopamina, como também a morte neuronal. Esses efeitos neuroprotetores se dariam por meio de ações recicladoras sobre ERO, por inibição da MAO e por oxidação de tiois. Por esse motivo, os autores sugerem que a presença de níveis elevados de β -carbolinas endógenas em pacientes com doença de Parkinson pode exercer efeito protetor contra o dano oxidativo neuronal em vez de efeitos citotóxicos.

Park et al. (2003), realizaram estudos neurotóxicos utilizando MPP e também concluíram que as β -carbolinas HRL e harmalol podem reduzir a morte celular provocada por estresse oxidativo devido à atenuação dos danos da

membrana mitocondrial. Neste caso, os autores afirmam que a inibição da MAO não teria intervenção direta nessa redução citotóxica.

1.3. Efeitos Neurotóxicos

As β -carbolinas têm sido propostas como neurotoxinas endógenas e exógenas. Vários autores encontraram níveis elevados destes compostos no plasma e fluido cérebro-espinhal de pacientes com doença de Parkinson, provocando dano no complexo mitocondrial do sistema dopaminérgico (ALBORES et al., 1990; HAMAN et al., 2006; KUHN et al., 1996; YAMAKAWA; OTHA, 1999;).

Apresentando semelhança estrutural com a neurotoxina MPTP, alguns resultados apontam que a norharmalina induz apoptose em cultura de células, assim como neurodegeneração precoce, ativação glial e deficiências motoras sustentadas em animais de experimentação (ÖSTERGREN; FREDRIKSSON; BRITTEBO, 2006). Outros autores reportam a neurotoxicidade dos componentes β -carbólicos em diversos cultivos celulares, principalmente por danos à mitocôndria. (CHEN et al., 2005; SONG et al., 2006; UEZONO et al., 2001).

Em estudos oncológicos realizados com camundongos portadores de tumor pulmonar que receberam dosagens intravenosas de HRM e diversos derivados, verificou-se que as β -carbolinas possuem considerável atividade antitumoral, mas também produzem notáveis efeitos neurotóxicos agudos. Nos camundongos se observaram tremores, contrações musculares e pulos. Esses efeitos neurotóxicos foram atribuídos à inibição da MAO, provavelmente atuando em vias serotoninérgicas, em receptores benzodiazepínicos e da imidazolina. (CHEN et al., 2005).

A DMT, alucinógeno com atividade agonista serotoninérgica (5-hidroxitriptamina 2-A - 5-HT) tem sido considerada neurotóxica e desde 1971 está incluída no nível I da Convenção das Nações Unidas para Substâncias Psicotrópicas. Tem semelhança estrutural com a neurotoxina MPTP, envolvida

na destruição de neurônios dopaminérgicos na doença de Alzheimer. Pode ser utilizada por diversas vias de administração: fumada, injetada e oral; e dependendo da dose ingerida e do ambiente em que é consumida, pode produzir severas reações psicológicas adversas (GABLE, 2007). No entanto, também existe polêmica a respeito da sua ação no sistema nervoso, já que poderia preencher as características de um neurotransmissor e constituir um ansiolítico endógeno com efeitos protetores contra sintomas psicóticos (JACOB; PRESTI, 2005).

Realizando testes de toxicidade aguda, Oliveira (2010) observou morte das ratas Wistar prenhes, submetidas a doses de ayahuasca concentrada 35 vezes (DU35) em relação à dose usual (DU). Foram descritas alterações histopatológicas em diversos órgãos, principalmente no cérebro onde encontraram micro-hemorragias em córtex, meninges e tronco encefálico, vacuolização na região do cerebelo e do tronco encefálico, assim como perda neuronal por degeneração moderada na região do tronco encefálico. Na avaliação da embriotoxicidade em fetos provenientes de ratas expostas a diferentes doses de ayahuasca durante o período da gestação, todos os grupos de tratamento com a substância apresentaram maior incidência de fetos com os ventrículos cerebrais dilatados, com diferenças significativas comparados com o grupo controle. Nesse mesmo estudo também foram analisados diversos parâmetros bioquímicos como: alanina-aminotransferase; aspartato-aminotransferase; gamaglutamiltransferase; fosfatase alcalina; proteínas totais; albumina; glicose; colesterol total; ureia e creatinina, sendo observada diferença significativa apenas nos níveis de ureia de animais dos grupos que receberam a dose média e a maior dose, quando comparados com os animais do grupo controle.

Em outro estudo de toxicidade materna e do desenvolvimento com ayahuasca em ratos Wistar, Oliveira et al. (2010) reportam que um grupo de animais que recebeu uma dose de ayahuasca dez vezes maior (DU10) do que a DU, calculada nos ratos em equivalência a 100 ml, utilizada por humanos em cerimônias religiosas, apresentaram anorexia, diminuição de peso corporal e

aumento do peso do fígado, considerado um sinal de hepatotoxicidade devida ao fato de esse órgão ser o principal metabolizador da DMT. Nos fetos dos animais tratados foi encontrado aumento na incidência de malformações viscerais e esqueléticas, tais como: dilatação dos ventrículos cerebrais; dilatação da pélvis renal; ossificação incompleta dos ossos cranianos; retardo no crescimento e desenvolvimento. Esses achados foram interpretados como indicativos de toxicidade geral induzida pelo chá ayahuasca.

1.4. Peroxidação Lipídica

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos são resultantes de oxidação de componentes celulares como tios, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediada por ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL). A reação destas espécies com os AGPI presentes nas membranas celulares e lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como indicador do estresse oxidativo celular (ANTUNES et al., 2008; LIMA; ABDALLA, 2001).

A LPO consiste em uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos RL sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular. Os RL (moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados) e as ERO podem contribuir para o aparecimento de doenças ou estarem presentes em situações de toxicidade. O câncer, as doenças inflamatórias ou neurodegenerativas como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer, o envelhecimento, o alcoolismo e a deficiência de Vitamina E, assim como de outros minerais, são alguns exemplos de situações onde se acredita existir o envolvimento de RL (JORDÃO et al., 1998; LEE et al., 2000).

A LPO, talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do ácido desoxirribonucléico (DNA), oxidação da Lipoproteína de baixa densidade (LDL) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular como proteoglicanos, colágeno e elastina (LIMA; ABDALLA, 2001).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos e sofre mais alterações na sua estrutura e permeabilidade pela LPO. Essa decomposição de peróxidos lipídicos produz ampla variedade de produtos finais, um dos quais é o malonaldeído (MDA - $C_3H_4O_2$), que possui atividade genotóxica e citotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo, portanto é considerado um marcador confiável de LPO (ANTUNES et al., 2008; TURGUTA et al., 2006). A GSH é um tripeptídeo, contendo cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos. Concentrações baixas de GSH têm sido encontradas em algumas doenças, como Alzheimer e AIDS e estão associadas ao maior risco de estresse oxidativo e à ocorrência de infecções oportunistas. Portanto, a GSH atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos. Variações nos níveis de GSH afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA. A oxidação ou a depleção de GSH pode diminuir a síntese protéica, e esta também pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (JORDÃO et al., 1998; WU et al., 2004).

Outros autores (NICOLE; SANTIARD- BARON; CEBALLOS-PICOT, 1998; WU et al., 2004) consideram a GSH mais do que um antioxidante, propondo que pode exercer funções do tipo neuromodulador/neurotransmissor. Seus estudos confirmam que a depleção da GSH contribui para o

aparecimento de estresse oxidativo, representando uma causa primária de neurodegeneração e apoptose, devida a alterações nas funções redox da mitocôndria. Franco e Cidlowski (2009) consideram que a depleção do GSH e as modificações posteriores das proteínas devidas à glutatilonilação não são apenas um subproduto do estresse oxidativo produzido durante a morte celular, mas constituem reguladores críticos do processo apoptótico.

A vitamina E determina a susceptibilidade das membranas microssomais da LDL dos hepatócitos e outros órgãos, em resposta ao dano provocado pelos radicais hidroxila, alcoxila, peroxila e oxigênio singlete. Os tocoferóis atuam, principalmente, na proteção aos lipídios contra os radicais peroxila, sendo o alfa-tocoferol (α -tocoferol) o mais ativo biologicamente, constituindo o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares (JORDÃO et al., 1998).

1.5. Apoptose Neuronal

A apoptose, termo de origem grego, que teria o significado de “cair, declinar ou diminuir”, em analogia à queda das folhas das árvores ou pétalas das flores, é considerada um tipo de morte celular programada e constitui importante processo fisiológico, determinante no desenvolvimento do sistema nervoso. Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência. A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De modo geral, a apoptose é um fenômeno que acontece em pouco tempo: ocorre retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e as células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação (picnose) e se concentra junto à membrana nuclear, que não perde a sua integridade. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (blebs) e o núcleo do DNA se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (cariorrhexis)

(HAEBERLEIN, 2004; VON BERNHARDI, 2004). Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas com conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

O programa da apoptose neuronal, incorporado no material genético de cada célula, só pode ser ativado naquelas células destinadas a morrer em certo momento. Longe de ser prejudicial, a morte celular apropriada é essencial para o desenvolvimento adequado. Um fato curioso é que mais da metade dos neurônios que nascem estão destinados a morrer (EKSHYYAN; AW, 2004a,b; NAEGELE; LOMBROSO, 1998). Existe forte evidência genética que a insuficiência de morte celular pode produzir câncer e transtornos linfoproliferativos e, contrariamente, o excesso de morte celular está geneticamente associado a traumatismos e doenças neurodegenerativas (THORNBERRY, 1999).

A morte celular inapropriada é a destruição antecipada de uma célula que não estava destinada a morrer em condições normais, pode ter múltiplas formas com características necróticas e apoptóticas. Mesmo que a necrose seja a forma de morte celular inapropriada mais característica, também o início errôneo da apoptose, em condições anormais ou estressantes, resulta no detrimento do organismo (SASTRY; RAO, 2000). A necrose é considerada um tipo de morte celular como resposta a um dano tóxico ou físico esmagador, caracterizada pela inflamação da mitocôndria e do retículo endoplasmico, dano aleatório do DNA e outras macromoléculas e perda da integridade da membrana plasmática (HAEBERLEIN, 2004).

A morte celular pode ser iniciada por sinais extrínsecos ou extracelulares, (também denominada via citoplasmática ou dependente de receptores de morte), por exemplo: diminuição de fatores tróficos, depleção de energia ou sobrecarga de ERO (HAEBERLEIN, 2004), e por sinais intrínsecos ou intracelulares, a denominada via mitocondrial, por exemplo: mutações

genéticas, exposição a substâncias tóxicas (álcool e outras drogas, hormônios, óxido nítrico), ou a ambientes nocivos (estresse ou doença psíquica, radiação, traumatismos, etc.). Essas condições podem produzir lesão ao material genético e morte celular. Os detergentes, ácidos e oxidantes, frio ou calor extremo e dano mecânico também têm efeitos nocivos sobre a viabilidade celular (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009; VON BERNHARDI, 2004). São decisivos na morte celular os seguintes fatores: alterações do metabolismo energético, excitotoxicidade e estresse oxidativo (LIPTON, 1999); incremento do cálcio intracelular (MATSON et al., 2000); agregação protéica e regulação do pH celular (EKSHYYAN; AW, 2004a,b; PASCHEN; MENGENDORF, 2005). A despolarização da membrana mitocondrial também pode ativar vias de apoptose neuronal (YUAN; YANKNER, 2000).

Várias das condições descritas previamente podem induzir, tanto apoptose quanto necrose, dependendo da intensidade do estímulo. Na via extrínseca estão envolvidos receptores de morte na membrana celular como Fas/CD95 e o TNFR1 por ligantes específicos. Esta via participa, principalmente, em condições patológicas nas quais a inflamação é predominante. Atualmente, estão sendo avaliadas as medidas terapêuticas dirigidas à via extrínseca, desde que a inflamação se faça proeminente nas patologias neurodegenerativas, (VILA; PRZEDBORSKI, 2003) (Figura 4).

Figura 4 - Via extrínseca da apoptose
 Fonte: Gewies (2003, p. 8).

A via intrínseca se ativa pela translocação de moléculas pró-apoptóticas à mitocôndria, induzindo a liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais (citocromo C) ao citosol, ativando a caspase iniciadora e, posteriormente, a cascata efetora. O estresse do retículo endoplasmático, incluindo a alteração da homeostase do cálcio e acumulação de proteínas mal dobradas, também pode resultar em morte programada por meio da ativação da caspase-12 (NAEGELE; LOMBROSO, 1998; SASTRY; RAO, 2000; VON BERNHARDI, 2004) (Figura 5A).

A sinalização apoptótica mitocondrial inclui a liberação de citocromo c do espaço mitocondrial transmembranaral para o citosol que contribui para a formação do apoptosoma, que é formado por citocromo c, Fator Ativador da Protease Apoptótica (Apaf-1) e dioxiadenosintrifosfato (dATP). O apoptosoma ativa a caspase-9 que é outra caspase iniciadora e, assim, é capaz de mediar a cascata de caspases por ativação da caspase-3. Outro ativador mitocondrial é o Ativador de Caspases derivado da Segunda Mitocôndria (Smac-pelas siglas em inglês) que atua desativando os Inibidores de Proteínas da Apoptose (IAPs)

prevenindo o bloqueio da atividade das caspases (HAEBERLEIN, 2004; GEWIES, 2003; HÄCKER, 2000; YUAN; YANKNER, 2000) (Figura 5B).

Figura 5 - (A) Via intrínseca ou mitocondrial da apoptose; **(B)** Formação e ativação do apoptosoma.

Fonte: Gewies (2003, p.9).

A apoptose nos mamíferos é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), pelo adaptador de proteínas Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) e pela família de proteases de cistina Caspases. Os neurônios compartilham o mesmo programa básico de apoptose com todos os outros tipos de células. Porém, diferentes tipos de neurônios e neurônios em diferentes estágios de desenvolvimento expressam combinações diversas de Bcl-2 e membros da família das caspases, que é uma forma de fornecer a especificidade da regulação. A Bcl-2 tem papel fundamental nos sinais apoptóticos intracelulares, incluindo proteínas de ambos os tipos: pró-apoptóticas e antiapoptóticas, desempenhando papel importante na escultura

2. OBJETIVOS

2.1. Principal

Desenvolver estudo exploratório a fim de avaliar o potencial de toxicidade do chá ayahuasca em ratos Wistar quanto aos efeitos sistêmicos sinalizadores de estresse oxidativo e a relação com a apoptose neuronal.

2.2. Específicos

- a) Determinar as diferenças de ocorrência de apoptose neuronal nos cérebros dos ratos Wistar submetidos à administração do chá ayahuasca em comparação com o grupo controle.
- b) Determinar marcadores bioquímicos hepáticos e séricos de estresse oxidativo (MDA, GSH, vitamina E) dos ratos Wistar submetidos à administração do chá ayahuasca em comparação com o grupo controle.
- c) Determinar os valores de creatinina e ureia urinárias como parâmetro do funcionamento renal dos grupos de ratos Wistar submetidos à administração do chá ayahuasca em comparação com o grupo controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Antes de proceder à descrição dos materiais e da metodologia utilizada no presente trabalho, considero oportuno comentar de forma sucinta a preparação técnica que foi necessária para poder realizar os experimentos. Inicialmente, realizei um estágio de 12 semanas (dois dias por semana), no Laboratório do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) onde recebi um treinamento em manipulação, administração de líquidos por gavagem e em técnicas de sacrifício e de dissecação encefálica em ratos Wistar. Também realizei outro estágio (conjuntamente com outra aluna da graduação da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), envolvida em estudos de neurotoxicidade animal por uso de etanol), no Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Departamento de Psicologia e Educação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), onde recebemos treinamento em técnicas de organização, cuidados e observação sistemática de três grupos de ratos Wistar (um grupo tratado com ayahuasca, outro grupo tratado com etanol e o grupo controle), assim como em diversas formas de administração do chá ayahuasca. É interessante relatar que os animais não aceitaram o chá em regime *ad libitum*, mesmo quando lhe foi adicionada sacarose ou foi modificado em diversas diluições. Também foi descartada a administração por via parenteral do chá ayahuasca, por ser um produto orgânico e não esterilizado. No Centro de Medicina Legal (CEMEL) do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) tentamos fazer a quantificação dos alcaloides do chá ayahuasca presentes em amostras biológicas de ratos Wistar por meios cromatográficos, mas não foi possível por motivos de mudanças laborais do nosso colaborador nesse Centro. No Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da FMRP-USP, recebemos orientações técnicas na realização e interpretação do teste do COMETA para avaliação de apoptose neuronal. No Laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP-USP tive a oportunidade de

acompanhar a realização das análises para a determinação de estresse oxidativo e função renal com as amostras biológicas dos ratos tratados com ayahuasca e o grupo controle. No Laboratório do Dr. Antonio Cardozo dos Santos, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP foi possível acompanhar a realização da análise de caspase 3 e no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP-USP se realizou a análise microscópica para a avaliação do teste do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay), recebendo orientação por parte de um especialista desse laboratório para a interpretação no sistema *software* Axio- Vision 4.7.2.

Com esta breve descrição tentei ilustrar uma importante etapa da minha capacitação, assim como as diversas possibilidades metodológicas que devem ser ponderadas na realização de um estudo científico.

3.1. Materiais

3.1.1. Obtenção, composição e dosagem do chá Ayahuasca

O chá ayahuasca utilizado neste trabalho foi obtido junto ao Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) da FCFRP-USP no ano de 2008 (Figura 7). A amostra adquirida possuía a mesma qualidade da que a equipe do LAT vinha utilizando nas suas pesquisas na época e tinha sido submetida a análises que garantiam a qualificação, mas não a quantificação exata dos componentes. Em estudos posteriores, uma equipe de pesquisadores desse laboratório (PIRES et al., 2009) extraiu os alcaloides em fase sólida e utilizando cromatografia em fase gasosa com detector nitrogênio-fósforo (GC-NPD), reportaram a determinação dos constituintes do chá ayahuasca, sendo: DMT = 0,42mg/mL; HRM = 1,37 mg/mL; HRL = 0,62 mg/mL; THH = 0,35 mg/mL. Devido à presença de leve odor de álcool no chá ayahuasca, também realizaram análises para a determinação do conteúdo alcoólico, e foi verificada

concentração de 0,37%, considerado um valor muito baixo e improvável causador de influência nos estudos.

Dentre os poucos estudos prévios que utilizaram animais de experimentação para verificar os efeitos do chá ayahuasca, um trabalho com ratos tratados com essa substância e submetidos a testes de campo aberto e *rotarod*, concluiu que a administração de uma dose 500 mg/Kg não produziu dano neurológico e que os efeitos observados nos animais foram similares aos produzidos por drogas que elevam os níveis de serotonina no sistema nervoso central (BRITO et al., 1994). Esse grupo definiu a DL50 do chá ayahuasca em ratos em 5.83 g/Kg. Essa mesma dosagem e os parâmetros equivalentes determinados pela equipe de Carvalho foram utilizados no presente estudo na administração deste chá no grupo de ratos tratados. Seguindo esses parâmetros, as dosagens e as quantidades administradas aos ratos foram calculadas de forma equivalente às utilizadas pelos usuários humanos de grupos religiosos, que variam de 100 a 200 ml por sessão (COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005).

Neste estudo, as dosagens do chá ayahuasca foram diluídas a 50%, pois em estudo piloto conduzido previamente com ratos Wistar com as mesmas características dos utilizados neste experimento, foi observada elevada mortalidade (morreram 4 de 10 ratos) no grupo tratado com o chá puro em dosagens de 3 ml por gavagem, por dia, em regime agudo (5 dias).

Figura 7 - Amostra do chá ayahuasca utilizada durante o estudo (Foto do autor).

3.1.2. Amostra de animais e condições experimentais

Um total de vinte e quatro ratos machos da linhagem Wistar foram separados aleatoriamente em dois grupos com doze animais cada. Os animais foram alojados em seis caixas brancas de plástico com grade metálica, devidamente identificadas, sendo colocados quatro ratos do mesmo grupo em cada caixa, seguindo a ordem da numeração da cauda. O grupo tratado com ayahuasca recebeu uma dose oral diária do chá a 50%, enquanto o grupo controle recebeu uma dose oral diária de água potável.

Os animais tinham peso inicial de aproximadamente 200 g e idade aproximada entre 30 a 45 dias pós-natal, equivalendo ao período de amadurecimento sexual puberal. Ficaram alojados no Biotério do Departamento de Nutrição da FMRP-USP sob um ciclo de luz-escuridão de 12 horas, desligando a luz às 18:00 horas, com temperatura constante controlada de 24-26°C.

Por dois dias, os animais passaram por adaptação ao novo ambiente, recebendo água potável e ração comercial para roedores fornecida pela USP-RP, em regime *ad libitum*. Nas três semanas que se seguiram, tanto o chá ayahuasca quanto a água foram administrados uma vez ao dia, sempre no mesmo horário e na mesma quantidade de 2 ml, utilizando uma sonda flexível de gavagem gástrica. A alimentação com ração padrão e hidratação com água potável foram mantidas nos dois grupos em regime *ad libitum*. (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Figura 8 - Esquema do procedimento de aclimação dos ratos Wistar utilizados no estudo.

Figura 9 - Esquema das condições e procedimentos com os ratos Wistar durante o período de tratamento do estudo.

Figura 10 - Condições de alojamento e alimentação dos ratos Wistar no Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. **(A)** ratos do grupo ayahuasca; **(B)** ratos do grupo controle; **(C)** distribuição dos ratos em três caixas cada grupo com ração e água *ad libitum*; **(D)** condições físicas da sala do biotério onde ficaram alojados os animais (Fotos do autor).

Figura 11 - Administração do chá ayahuasca por gavagem a ratos Wistar. Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP (Foto do autor).

Foi seguida uma rotina de pesagem, marcação na cauda de acordo com o grupo e número do rato, troca de maravalha e coleta de urina, assim descritas: nas segundas, quartas e sextas-feiras eram realizadas a troca de maravalha e limpeza das caixas; às segundas e sextas feiras, as pesagens e a marcação das caudas para acompanhar o desenvolvimento dos ratos; e uma vez por semana (na quarta-feira) era coletada a urina, sendo que os ratos permaneciam na gaiola metabólica individual por 24 horas, até que sua urina fosse coletada em uma proveta, transferida para um tubo de polipropileno e congelada. Estas amostras de urina foram centrifugadas a 4000 rpm, por dez minutos, e utilizadas para a quantificação de creatinina, indicativo da função renal destes animais (Figura 12).

Figura 12 - Coleta de amostras urinárias dos ratos Wistar dos grupos ayahuasca e controle nas gaiolas metabólicas. Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP (Foto do autor).

Ao final da terceira semana de tratamento, trinta minutos após a administração do chá ayahuasca ou de água, os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina, em sala própria para procedimentos cirúrgicos no mesmo biotério. Imediatamente após o sacrifício, houve a extração do cérebro, fígado e sangue total de cada animal (Figuras 13 e 14). Após a pesagem dos cérebros, foi realizado um corte coronal na região do hipocampo (aproximadamente bregma-3,80 mm) e a secção obtida foi colocada em paraformaldeído a 4% para fixação do tecido. As amostras de tecido cerebral foram levadas ao Laboratório de Neurologia Experimental da FMRP-USP, onde se realizou o procedimento de inclusão em parafina histológica, cortes de 5 μ m em micrótomo, coradas com hematoxilina-eosina e feita a montagem das lâminas com lamínulas de vidro com meio Entellan (Merck®). O restante do tecido cerebral foi colocado em um meio de homogeneização para cérebro, triturado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos e congelado a -18°C.

Ao decapitar o animal, o sangue total foi retirado, centrifugado a 3500 rpm, por dez minutos, e o soro obtido congelado em *eppendorf*, para posterior análise de GSH, MDA e vitamina E. Também foram coletados os fígados dos ratos e estas amostras biológicas foram levadas ao Laboratório de Nutrição da Clínica Médica da FMRP-USP.

Figura 13 - Extração cirúrgica do cérebro dos ratos Wistar. Biotério do Departamento de Clínica Médica FMRP (Foto do autor).

Figura 14 - Extração cirúrgica do fígado de ratos Wistar. Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. (Foto do autor).

3.1.2.1. Perdas amostrais

A amostra (n) do grupo controle na sexta pesagem diminuiu para dez, devido à morte de dois ratos deste grupo. Os dois animais começaram a mostrar anorexia, apatia e leves sinais de secreção nasal aproximadamente um dia antes de morrer. Na necropsia realizada, além de hiperemia nasal nos dois ratos, não se encontraram achados significativos em nenhum órgão. A mesma situação aconteceu com um rato do grupo ayahuasca no dia do sacrifício, motivo pelo qual o n desse grupo aparece como doze em algumas análises (por ex. pesagens e medições urinárias) e onze em outras (por ex. medições de PLO e Caspase 3 cerebral). Na avaliação do TUNEL o n de ambos os grupos é de seis devido à inviabilidade do restante das amostras cerebrais para a análise de apoptose neuronal.

3.2. Métodos

3.2.1. Análises laboratoriais

3.2.1.1. Quantificação de proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais das amostras utilizou-se o método do Biureto devido à sua relativa simplicidade e exatidão. Esta quantificação foi necessária, pois os resultados foram expressos em mol de GSH ou de MDA por grama de proteína, minimizando, assim, eventuais erros interpretativos.

Foi utilizado o Kit para dosagem de proteínas totais da Labtest, que permite a determinação colorimétrica das proteínas totais de amostras baseado no princípio de que íons cobre (Cu^{2+}), em meio alcalino (reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, com absorbância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

3.2.1.2. Quantificação de glutathiona reduzida

A GSH reduzida é um dos principais antioxidantes presentes no meio intracelular, e está implicada na prevenção de danos celulares ocasionados pelo excesso de ERO, uma vez que este antioxidante protege o DNA de lesões provocadas por estas espécies (JORDÃO et al., 1998). Foi quantificada por método colorimétrico, que consiste na reação desta molécula com o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) e posterior leitura em espectrofotômetro (SEDLACK; LINDSAY, 1968), seguindo o protocolo resumido a seguir: foram adicionados 2 ml de EDTA 0,02 M a 100 mg de tecido hepático em um tubo plástico acondicionado no gelo; macerou-se a mistura no *Potter*, e adicionaram-se mais 2 ml de EDTA 0,02 M. Foram transferidos para um tubo de ensaio 2,5 ml do homogenato, com posterior adição de 2 ml de água mili-Q e 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Após quinze minutos, com agitação de cinco em cinco minutos, as amostras foram centrifugadas por quinze minutos a 4000

rpm, à temperatura ambiente, e 1 ml do sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro, adicionando-se 2 ml de Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 50 µl de DTNB a cada tubo; e após cinco minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 412 nm, contra um branco composto por 1 ml de EDTA 0,02 M, 2 ml de Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 50 µl de DTNB.

Para a quantificação da GSH em soro, adicionou-se 1 mL de Tris-EDTA em 25 µL de soro de cada amostra, em um tubo de ensaio acondicionado no gelo; homogeneizou-se a amostra e foi realizada a leitura das absorbâncias no comprimento de onda 412 nm, para que, posteriormente, fossem descontadas das absorbâncias da segunda leitura, a fim de eliminar as interferências do soro. Em seguida, verteram-se as amostras em seus respectivos tubos de ensaio e foram acrescentados 25 µL de DTNB. Após agitá-las, as absorbâncias foram lidas a 412 nm. O mesmo procedimento foi feito com o branco, que não apresentava os 25 µL de soro. A concentração foi calculada por meio de uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M), com concentrações conhecidas de GSH a cada leitura.

3.2.1.3. Quantificação de malonaldeído

O MDA é a principal molécula formada no processo de LPO pelo ataque de ERO e é considerado um importante biomarcador do estresse oxidativo (ANTUNES et al., 2008).

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrita por Buege e Aust (1978), consiste em um método colorimétrico capaz de detectar o produto formado pela reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico, em meio ácido.

As amostras de tecido foram tratadas da seguinte maneira: adicionou-se 1 ml de KCl 1,15% em 100 mg de tecido; macerou-se a mistura com o auxílio de um *Potter*; foram acrescentados 2 ml da solução de TCA-TBA-HCl (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e 0,25 N de ácido clorídrico); a mistura foi aquecida por quinze minutos em banho de água fervente, resfriada e centrifugada por dez minutos a 3000 rpm à temperatura

ambiente, e utilizou-se o sobrenadante para leitura a 535 nm em um espectrofotômetro.

Para 100 µL de soro foram adicionados 200 µL de TCA-TBA-HCl a. Em seguida, a mistura foi aquecida por quinze minutos em banho de água fervente, resfriada e centrifugada a 1000 g por dez minutos à temperatura ambiente. Dessa forma, obteve-se o sobrenadante que foi utilizado para a determinação da absorbância a 535 nm. O branco utilizado era constituído apenas por solução de TCA-TBA-HCl.

Para a definição da concentração de MDA foi aplicado o coeficiente de absorvidade molar do produto ($E_{535}=1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Uma curva padrão foi realizada, utilizando-se soluções estoque de MDA. As concentrações encontradas nas amostras apresentaram-se dentro desta curva, mostrando boa linearidade com o padrão.

3.2.1.4. Quantificação de Vitamina E

Dentre todos os tocoferóis conhecidos, o α -tocoferol ou vitamina E tem sido considerado o biologicamente mais ativo, sendo o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares. Atua, principalmente, na proteção aos lipídios contra os radicais peróxila e como sequestrador de RL em altas pressões de oxigênio impedindo a propagação da cadeia radicalar (JORDÃO et al., 1998).

A quantificação da vitamina E foi realizada em amostras de fígado e soro por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (cromatógrafo Shimadzu equipado com detector UV/Visível). Amostras de 0,2 g de fígado foram pesadas e maceradas em um *Potter*, com adição de 100 µl de etanol absoluto. Obtido o homogenato, foi realizada a extração com 400 µl de hexano; após, este homogenato foi mantido sob agitação por dois minutos, centrifugado por dez minutos a 3000 rpm e uma alíquota de 200 µl da fase hexânica (sobrenadante) foi retirada e seca com o auxílio de fluxo de nitrogênio. O resíduo seco foi ressuspensionado em 200 µl de fase móvel (acetonitrila/diclorometano/ metanol,

70:10:20, v/v/v) e submetido à HPCL, com leitura no comprimento de onda de 292 nm.

Foram adicionados 100 µL etanol absoluto com BHT em 200 µL de soro, agitando-se a mistura no homogeneizador por cinco segundos. Em seguida adicionaram-se 400 µL de hexano e agitou-se por dois minutos, para a extração da vitamina E. Para a separação da fase hexânica das demais, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por cinco minutos. Posteriormente, foram transferidos 200 µL da fase hexânica para outro tubo e o resíduo seco foi ressuspenso em 200 µL de fase móvel, composta por acetonitrila/diclorometano/ metanol (70:10:20, v/v/v).

O equipamento foi calibrado com soluções padrões de α -tocoferol (Sigma®), e antes de cada leitura foi injetada uma solução padrão de α -tocoferol. A concentração de vitamina E nas amostras foi calculada utilizando a razão entre a área do analito e a do padrão interno, após obtenção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas.

3.2.1.5. Quantificação de creatinina urinária

A creatinina, subproduto do metabolismo muscular, é eliminada pelos rins em velocidade praticamente constante, por meio de filtração glomerular e excreção tubular ativa. Sua concentração independe da atividade física realizada, ingestão de proteínas na alimentação e do volume urinário (MARTINS, 1975).

Está demonstrado que ratos da linhagem Wistar apresentam maturidade funcional renal a partir de peso corporal de 150 gramas, que corresponde à idade de 35 a 40 dias (BEZERRA; TEIXEIRA; VATTIMO, 2008). O estudo dos níveis da creatinina urinária permitiu avaliar a função renal dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Para tanto, o kit Doles, sistema colorimétrico aplicado nas amostras, foi utilizado para a quantificação de creatinina, baseado no princípio de que esta reage com picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado.

3.2.1.6. Quantificação de ureia urinária

Para a determinação da ureia nas amostras de urina dos ratos utilizou-se o sistema Ureia CE Labetest enzimático-colorimétrico. O princípio deste método consiste hidrolisar a ureia é pela urease a íons amônio e CO₂. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar o azul de indofenol.

3.2.1.7. Método laboratorial para a análise da apoptose neuronal

3.2.1.7.1. Ensaio Caspase-3

A ativação da caspase-3 possui importante papel no mecanismo de apoptose, uma vez que esta enzima ativada é responsável pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo celular. Sendo assim, sua dosagem permite o estudo de mecanismos apoptóticos (PORTER; JANICKE, 1999). Para a realização deste ensaio foi necessário quantificar as proteínas totais presentes nos homogenatos de cérebro, pelo método do Biureto (descrito anteriormente). Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o kit Caspase-3 *fluorometric assay* (R&D Systems, Cat Nº BF1100).

O volume de homogenato correspondente a 4 mg de proteína foi colocado em um tubo cônico com o tampão de lise. Este tubo foi colocado no gelo por dez minutos, e em seguida, em outro tubo de ensaio, foram acrescentados 200 µL de células lisadas, 200 µL do tampão de reação, fornecido no kit (adicionou-se previamente neste tampão uma solução 1 molar de ditiotreitol), e 20 µL do reagente fluorescente (DEVD-AFC). As amostras foram incubadas a 37°C, por uma hora e meia, e, por fim, realizada a leitura em um fluorímetro, utilizando o comprimento de onda de excitação de 400 nm e o de onda de emissão de 505 nm. Dois controles foram preparados, sendo um sem lisado de células, e outro sem o substrato DEVC-AFC.

Os resultados foram expressos em valores de fluorescência, pois o kit não fornecia o padrão de Caspase-3.

3.2.1.7.2. Ensaio do TUNEL

Após o sacrifício dos animais, um corte frontal de cada tecido cerebral obtido foi prontamente fixado em paraformaldeído a 4%, durante cinco dias. Desta seção frontal, foi realizado um corte mais localizado na região hipocampal, visando concentrar as análises na região de interesse. Para cada corte, duas lâminas foram preparadas. Para a detecção de células neuronais com danos no material genético induzidos pelo uso do chá ayahuasca, foi utilizado o ensaio de TUNEL. Esta técnica tem sido amplamente empregada para a detecção de fragmentação de DNA (GAVRIELI; SHERMAN; BEN-SASSON, 1992).

O ensaio do TUNEL é baseado na ligação específica da enzima deoxinucleotidil transferase terminal às terminações 3'-OH do DNA, consequente da síntese de um polímero polideoxinucleótido gerado durante o processo de fragmentação desta macromolécula (GAVRIELI; SHERMAN; BEN-SASSON, 1992).

Para a aplicação desta metodologia, utilizou-se o Kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega®). Neste método, os nucleotídeos biotinilados são incorporados na extremidades 3'-OH do DNA fragmentado pela ação da enzima recombinante transferase deoxinucleotidil terminal. A avidina peroxidase (Horseradish peroxidase-labeled streptavidin) se liga ao nucleotídeo biotinilado, que é detectado pela adição do substrato da peroxidase e do cromogênio estável diaminobenzidina (IKEGAMI et al., 2003). A fragmentação de DNA pode ser analisada histoquimicamente com microscopia de luz pela coloração marrom presente no citoplasma e núcleo das células. Somente as células de corpos neuronais foram analisadas e os resultados expressos em número de células apoptóticas visualizadas por área. Dez campos microscópicos, em aumento 40x, foram observados e utilizados para a contagem de corpos neuronais apoptóticos. Para esta análise foi utilizado o programa AxioVision® (versão 4.7.2). Para a obtenção das imagens dos campos analisados foi utilizado um aparelho Zeiss com camara de captação JVC-TK 1270.

3.3. Análise estatística

As análises descritivas e inferenciais foram realizadas de maneira comparativa entre os dois grupos definidos em função do tratamento: chá ayahuasca e água.

Foram utilizadas estatísticas descritivas (frequências simples, porcentagens, médias e desvio-padrão) para caracterizar a amostra segundo o grupo (ayahuasca e controle) e as variáveis de mudanças de peso corporal e dos órgãos, provas de funcionamento renal (ureia e creatinina urinárias), neurotoxicidade (ensaio do TUNEL e Caspase-3) e LPO (GSH, MDA, vitamina E, séricas e hepáticas).

Para a análise entre as variáveis dependente (tratamento com chá ayahuasca) e independente (neurotoxicidade) foi utilizado o teste de Qui-quadrado na análise da diferença de proporções entre ambos os grupos, assim como para os parâmetros indicativos de estresse oxidativo. Para a avaliação da diferença de médias entre os grupos ayahuasca e controle foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para a análise de correlação entre as variáveis foi utilizado o teste de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes ($p \leq 0,05$).

Foi utilizado o programa *Statistical package for the Social Science* (SPSS) versão 15.0 para realizar as análises estatísticas.

4. RESULTADOS

Abaixo estão apresentadas as tabelas e os gráficos *Box and Whisker* com os resultados obtidos das diferentes análises descritas, sendo divididas em blocos correspondentes a: valores das pesagens dos animais e órgãos extraídos; valores das análises de função urinária; hepáticos e séricos, indicativos de LPO, e, por último, os valores correspondentes às análises de apoptose neuronal.

4.1. Valores das Pesagens dos Animais e dos Órgãos

A Tabela 1 apresenta os valores em gramas dos pesos dos ratos dos grupos ayahuasca e controle durante seis semanas (uma pesagem semanal), expressos pela média, desvio-padrão e valores mínimos e máximos para cada grupo. Observa-se que em ambos os grupos houve aumento gradual do peso semanal, sendo levemente menor nos animais do grupo ayahuasca sem diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 1: Valores dos pesos dos ratos dos grupos ayahuasca e controle durante seis semanas, expressos em gramas.

	Grupo Ayahuasca				Grupo Controle				p
	n	M	DP	Min. - Max.	n	M	DP	Min. - Max.	
PESO-1	12	202,25	11,54	185,00 - 219,00	12	204,75	10,58	189,00 - 219,00	0,62
PESO -2	12	216,67	17,04	182,00 - 237,00	12	220,08	18,79	176,00 - 246,00	0,64
PESO -3	12	247,50	17,42	220,00 - 274,00	12	248,08	19,96	202,00 - 274,00	0,79
PESO-4	12	265,67	21,52	232,00 - 298,00	12	266,67	17,66	227,00 - 292,00	0,91
PESO-5	12	297,00	33,91	207,00 - 341,00	12	299,25	28,64	236,00 - 334,00	0,91
PESO-6	12	315,08	32,24	252,00 - 373,00	10	323,80	18,28	301,00 - 346,00	0,34

Valores expressos em amostragem (n); Média (M); Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min.-Max.); p = significância estatística.

A Tabela 2 mostra os valores em gramas do ganho de peso corporal e percentual de peso dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Observa-se que a média do ganho de peso corporal e percentual foi menor no grupo ayahuasca; o desvio-padrão de ambas as variáveis foi maior no grupo ayahuasca. Não houve diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 2: Valores do ganho de peso e ganho percentual dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em gramas.

	Grupo Ayahuasca (n=12)			Grupo Controle (n=10)			U	p
	M	DP	Min. - Max.	M	DP	Min. - Max.		
Ganho de peso	112,83	28,45	67,00 - 169,00	118,60	15,15	99,00 - 148,00	52,00	0,60
Ganho percentual	55,82	13,90	35,62 - 82,84	57,91	7,94	46,70 - 74,75	54,00	0,69

Valores expressos em Média (M); Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min.-Max.); U= Coeficiente Mann-Whitney; p = significância estatística.

O Gráfico 1 demonstra o ganho comparativo de peso medido em gramas dos ratos dos grupos ayahuasca e controle após 21 dias de tratamento. Observa-se que no grupo ayahuasca os limites mínimo e máximo estão mais afastados em comparação ao grupo controle, porém a mediana é mais simétrica no grupo ayahuasca. Não houve valores estatisticamente significativos.

Gráfico 1 - Ganho comparativo de peso em gramas (g) entre os grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10), após 21 dias de tratamento.

O Gráfico 2 mostra o ganho percentual de peso, medido em gramas, dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Observa-se a diferença entre os limites mínimo e máximo e alguma dispersão na distribuição dos dados do grupo ayahuasca em comparação ao grupo controle, porém a mediana é mais simétrica no grupo ayahuasca. Não houve valores estatisticamente significativos.

Gráfico 2 - Ganho percentual de peso em gramas. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10).

A Tabela 3 apresenta os valores em gramas dos pesos dos fígados e cérebros dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. É possível observar pela média, pelo desvio-padrão e pelos valores mínimos e máximos, que os fígados demonstraram peso maior no grupo controle e os cérebros, peso maior no grupo ayahuasca, porém sem significância estatística.

Tabela 3: Valores dos pesos do fígado e cérebro dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em gramas.

	Grupo Ayahuasca (n=11)			Grupo Controle (n=10)			U	p
	M	DP	Min. - Max.	M	DP	Min. - Max.		
Peso fígado	13,53	1,83	10,43 - 17,59	14,64	1,37	12,34 - 16,72	34,00	0,14
Peso cérebro	2,08	0,12	1,81 - 2,20	2,00	0,08	1,85 - 2,14	31,00	0,09

Valores expressos em Média (M); Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min.-Max.); U = Coeficiente Mann-Whitney; p = significância estatística.

No Gráfico 3 está demonstrada a comparação do peso em gramas dos cérebros dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Observa-se que os valores dos pesos do grupo ayahuasca são maiores que os do grupo controle.

Gráfico 3 - Comparação do peso do cérebro em gramas. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).

O Gráfico 4 mostra a comparação do peso em gramas dos fígados dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Observa-se que os pesos dos fígados do grupo controle são maiores que os do grupo ayahuasca, sendo que este grupo apresentou valor superior atípico. Não houve significância estatística.

Gráfico 4 - Comparação do peso do fígado em gramas. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).

4.2. Valores dos Resultados das Análises Urinárias

A Tabela 4 mostra os valores em mg/dL de ureia urinária realizada em três medições (uma semanal) dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. De forma geral, as três medições apresentaram maiores valores de ureia na urina dos ratos do grupo ayahuasca, sendo o valor da terceira medição estatisticamente significativo.

Tabela 4: Valores dos níveis de ureia em três amostras de urina dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em mg/dL.

Medições semanais de Ureia urinária	Grupo Ayahuasca				Grupo Controle				p
	n	M	DP	Min. - Max.	n	M	DP	Min. - Max.	
1	12	93,33	32,38	35,00 - 140,00	12	74,01	29,35	30,62 - 131,25	0,18
2	12	82,14	22,40	35,00 - 131,25	12	69,27	48,14	26,25 - 201,25	0,09
3	12	88,59	32,75	35,00 - 131,25	10	43,75	26,41	8,75 - 96,25	< 0,01

Valores expressos em amostragem (n); Média (M); Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min.-Max.); p = significância estatística.

Os Gráficos 5, 6 e 7 mostram os níveis de ureia (em mg/dL) obtidos durante as três coletas de urina dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Nos três gráficos observa-se que os valores do grupo ayahuasca são maiores que os do grupo controle. No Gráfico 6 notam-se valores atípicos em ambos os grupos, sendo o valor do grupo controle mais elevado. No Gráfico 7, os valores do grupo ayahuasca estão notoriamente mais elevados do que os do grupo controle, representando significância estatística.

Gráfico 5 - Comparação dos níveis de ureia em *mg/dL*. Primeira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12).

Gráfico 6 - Comparação dos níveis de ureia em *mg/dL*. Segunda coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12).

Gráfico 7 - Comparação dos níveis de ureia em *mg/dL*. Terceira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10).

Na Tabela 5 estão demonstrados os valores em *mg/dL* de creatinina urinária em três medições (uma semanal) dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. De forma geral, as três medições revelaram valores maiores de creatinina na urina dos ratos do grupo ayahuasca, porém sem valores estatisticamente significativos.

Tabela 5: Valores dos níveis de creatinina em três amostras de urina dos ratos dos grupos Ayahuasca e Controle, expressos em mg/dL.

Medições semanais de Creatinina urinária	Grupo Ayahuasca				Grupo Controle				p
	n	M	DP	Min. - Max.	n	M	DP	Min. - Max.	
1	12	58,90	15,64	34,59 - 84,96	12	57,75	19,32	27,69 - 86,40	0,86
2	12	50,12	17,92	18,52 - 84,44	12	48,81	17,57	27,07 - 81,95	0,82
3	12	51,70	27,18	17,69 - 112,92	10	50,81	18,65	23,70 - 77,04	0,84

Valores expressos em amostragem (n), Média (M), Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min. - Máx.); p = significância estatística.

Os Gráficos 8, 9 e 10 mostram as comparações dos níveis de creatinina (em mg/dL), obtidas em três coletas de urina dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Os valores do grupo ayahuasca foram maiores nas três medições. Não houve significância estatística.

Gráfico 8 - Comparação dos níveis de creatinina urinária em mg/dL. Primeira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12).

Gráfico 9 - Comparação dos níveis de creatinina urinária em *mg/dL*. Segunda coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=12).

Gráfico 10 - Comparação dos níveis de creatinina urinária em *mg/dL*. Terceira coleta. Grupos Ayahuasca (n=12) e Controle (n=10).

4.3. Valores das Análises de Peroxidação Lipídica

Na Tabela 6 encontram-se os valores hepáticos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em diferentes medidas, de acordo a substância avaliada. O MDA apresenta valores maiores no grupo controle; os valores de GSH estão mais elevados no grupo ayahuasca e a vitamina E está notoriamente diminuída no grupo ayahuasca, apresentando valor estatisticamente significativo.

Tabela 6: Valores hepáticos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos Ayahuasca e Controle, expressos em nmol/g proteína; μ mol/g proteína e mmol/g tecido, respectivamente.

	Grupo Ayahuasca (n=11)				Grupo Controle (n=10)				U	p
	M	Md	DP	Min. - Max.	M	Md	DP	Min. - Max.		
MDA	37,84	34,47	7,40	30,13 - 52,60	43,36	45,48	6,75	31,20 - 50,37	32,00	0,10
GSH	5,60	5,66	0,64	4,84 - 6,80	5,34	5,51	0,67	4,00 - 6,13	45,00	0,48
Vit. E	41,91	41,31	10,16	18,70 - 55,36	80,88	78,34	21,71	48,96 - 118,58	4,00	< 0,01

Valores expressos em Média (M); Mediana (Md); Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min. - Máx.); U = Coeficiente Mann-Whitney; p = significância estatística.

Os Gráficos 11, 12 e 13 apresentam as comparações dos valores hepáticos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. O Gráfico 11 demonstra que os valores de MDA são maiores no grupo controle, porém sem significância estatística. No Gráfico 12 observa-se que os valores de GSH do grupo ayahuasca são maiores do que os do grupo controle e no Gráfico 13 verifica-se que os valores de vitamina E do grupo ayahuasca estão notoriamente diminuídos em relação ao grupo controle, apresentando significância estatística.

Gráfico 11 - Comparação dos níveis de malonaldeído hepático (MDA) em *nmol/gP*. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).

Gráfico 12 - Comparação dos níveis de glutathiona reduzida hepática (GSH) em *µmol/gP*. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).

Gráfico 13 - Comparação dos níveis de vitamina E hepática em *mmol/gT*. Grupos Ayahuasca (n=11) e controle (n=10).

A Tabela 7 mostra os valores séricos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em diferentes medidas, de acordo a substância avaliada. Os três parâmetros estão diminuídos nos animais do grupo ayahuasca, existindo valores estatisticamente significativos para o MDA e a GSH. Os valores de vitamina E não apresentaram significância estatística.

Tabela 7: Valores séricos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos Ayahuasca e Controle, expressos em nmol/ g proteína, $\mu\text{mol/g}$ proteína e nmol/mL.

	Grupo Ayahuasca (n=11)				Grupo Controle (n=10)				U	p
	M	Md	DP	Min. - Max.	M	Md	DP	Min. - Max.		
MDA	26,60	25,35	4,50	21,12 - 33,08	30,70	29,95	4,60	25,60 - 38,46	27,00	0,05
GSH	0,61	0,71	0,35	0,04 - 1,30	1,20	1,18	0,32	0,81 - 1,80	9,50	< 0,01
Vit E	4,69	4,18	1,56	2,89 - 8,19	6,20	5,65	2,32	3,58 - 11,41	29,00	0,07

Valores expressos em Média (M); Mediana (Md); Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min. - Máx.); U = Coeficiente Mann-Whitney; p = significância estatística.

Os Gráficos 14,15 e 16 demonstram a comparação dos valores séricos de MDA, GSH e vitamina E dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. No Gráfico 14 observa-se que, mesmo com um limite superior elevado no grupo controle, os valores de MDA do grupo ayahuasca são menores, apresentando significância estatística. O Gráfico 15 mostra níveis de GSH notavelmente reduzidos no grupo ayahuasca, com valores estatisticamente significativos. No Gráfico 16 verifica-se a existência de valores atípicos em ambos os grupos, assim como valores menores de vitamina E no grupo ayahuasca, sem apresentar significância estatística.

Gráfico 14 - Comparação dos níveis de malonaldeído sérico (MDA) em *nmol/gP*. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).

Gráfico 15 - Comparação dos níveis de Glutathiona Reduzida sérica (GSH) em $\mu\text{mol/gP}$. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).

Gráfico 16 - Comparação dos níveis de vitamina E sérica em nmol/mL . Grupos Ayahuasca (n=11) e controle (n=10).

4.4. Valores das Análises de Apoptose Neuronal

A Tabela 8 mostra os resultados da média, do desvio-padrão e dos valores mínimos e máximos obtidos nas análises de Caspase-3 e o ensaio do TUNEL nos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Os valores de Caspase-3 são menores no grupo ayahuasca, mas sem significância estatística. Os valores do ensaio do TUNEL também são menores no grupo ayahuasca e apresentam valores estatisticamente tendenciais para apoptose neuronal.

Tabela 8: Valores dos resultados das análises de Caspase-3 e TUNEL dos ratos dos grupos ayahuasca e controle, expressos em nível de fluorescência e número de células positivas, respectivamente.

	Grupo Ayahuasca				Grupo Controle				p
	n	M	DP	Min. - Max.	n	M	DP	Min. - Max.	
Caspase-3	11	25,51	6,89	16,39 - 37,94	10	27,33	6,14	17,69 - 39,64	0,40
TUNEL	6	1,33	0,52	1,00 - 2,00	6	3,00	2,00	1,00 - 6,00	0,05

Valores expressos em amostragem (n); Média (M); Desvio-Padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min. - Máx.). p = significância estatística.

O Gráfico 17 apresenta a comparação dos níveis de caspase-3, expressos em níveis de fluorescência, dos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Observa-se limite superior elevado no grupo ayahuasca e valores atípicos no grupo controle. Os resultados indicam valores de caspase-3 reduzidos no grupo ayahuasca, sem apresentar significância estatística.

Gráfico 17 - Níveis comparativos de Caspase-3 expressos em valores de fluorescência. Grupos Ayahuasca (n=11) e Controle (n=10).

O Gráfico 18 mostra a comparação dos valores do ensaio do TUNEL expressa em número de células apoptóticas, nos ratos dos grupos ayahuasca e controle. Observa-se que os valores do grupo ayahuasca são menores do que os do grupo controle, com significância estatística.

Gráfico 18 - Comparação dos valores do TUNEL expressa em número de células apoptóticas (n°) Grupo Ayahuasca ($n=6$) e Controle ($n=6$).

As Figuras 15 e 16 mostram os resultados microscópicos de células apoptóticas neuronais de ratos Wistar tratados com chá ayahuasca, avaliados pelo ensaio do TUNEL (células marcadas com setas e linhas vermelhas são consideradas positivas para apoptose).

Figura 15 - Microfotografia de células neuronais de ratos Wistar do grupo Ayahuasca. Com apoptose (marcada com seta vermelha) Aumento 40 X.

Figura 16 - Microfotografia de células neuronais de ratos Wistar do grupo Ayahuasca. Com apoptose (marcada com setas vermelhas) Aumento 40 X.

Nas Figuras 17 e 18 estão demonstrados os resultados microscópicos de células neuronais de ratos Wistar do grupo controle, sem apoptose neuronal, avaliados pelo ensaio do TUNEL.

Figura 17 - Microfotografia de células neuronais de ratos Wistar do grupo Controle. Sem apoptose. Aumento 40 X

Figura 18 - Microfotografia de células neuronais de ratos Wistar do grupo Controle. Sem apoptose. Aumento 40 X

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho marca o início de um projeto de pesquisa toxicológica conduzido no Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP pelo Dr. Erikson Felipe Furtado e um grupo de estudantes de Mestrado e Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da FCFRP-USP, comparando os efeitos neuronais do chá ayahuasca e álcool.

Cabe ressaltar as limitações encontradas na realização deste estudo. Primeiro, porque no início da pesquisa (2008), houve dificuldade de se encontrarem publicações de estudos prévios sobre os efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca em animais de experimentações, pois os trabalhos reportados na literatura haviam utilizado apenas alguns dos princípios ativos presentes no chá ayahuasca. (ALBORES et al., 1990; BONNET; SCHERBAUM; WIEMANN, 2008; CHEN et al., 2005; HAMAN et al., 2006; HOU et al., 2004; KIM et al., 2001; KUHN et al., 1995, 1996; LEE et al., 2000; LI; LIANG; PAN, 1995; MOURA et al., 2006, 2007; ÖSTERGREN; FREDRIKSSON; BRITTEBO, 2006; PARK et al., 2003; SONG et al., 2006; UEZONO et al., 2001; YAMAKAWA; OHTA, 1999). Outros aspectos que também poderiam limitar os resultados da avaliação toxicológica foram: a inexistência de um modelo animal específico e reconhecido para este tipo de investigação; o fato de o estudo ter sido realizado com o composto natural sem quantificação dos componentes, ao invés da utilização de princípios ativos; a ausência de estudos comportamentais dos animais após o uso do chá ayahuasca; as técnicas de administração do composto, pois apesar da quantidade administrada, frequência diária, do horário e da via de administração terem sido padronizados, ainda não existe conhecimento exato da farmacocinética e farmacodinâmica do chá ayahuasca em ratos Wistar. Provavelmente, devido a essas diferenças entre cada animal e também pelas suas variações físicas e condições de saúde prévias ao experimento, houve perda de alguns ratos e de tecidos orgânicos, o que afetou o tamanho da amostra.

Enunciadas essas limitações e dificuldades, a seguir serão discutidos os resultados encontrados.

O sistema nervoso nos seres humanos é o encarregado de regular e manter em funcionamento diversos processos biológicos que são essenciais, tanto para a sobrevivência como para manter um nível aceitável na qualidade de vida. Seu adequado funcionamento permite ao organismo perceber, organizar e processar informações exógenas e endógenas, assim como criar respostas fisiológicas e comportamentais adequadas e adaptativas para esse propósito.

Está amplamente demonstrado que diversas substâncias podem alterar a estrutura e função do sistema nervoso em variedade de circunstâncias com notórias consequências deletérias para a saúde. Segundo os critérios da Administração de Drogas e Alimentos dos E.U.A., a neurotoxicidade refere-se a:

“qualquer efeito adverso de tipo bioquímico, morfológico, fisiológico ou comportamental na estrutura ou na integridade funcional do sistema nervoso em etapa adulta ou em desenvolvimento, devido à exposição a agentes químicos, biológicos ou físicos, cuja duração pode ser transitória ou persistente” (FDA, 2000).

Esses efeitos neurotóxicos podem ser devidos a um dano direto dos agentes nocivos no sistema nervoso ou atuando em outros sistemas biológicos que afetariam adversamente o sistema nervoso de forma indireta.

A busca do ser humano por experiências de tipo psicotrópico é milenar, pois existem registros do uso dessas substâncias desde a Mesopotâmia, o Egito faraônico, a Grécia antiga e em diversas culturas na América como os Maias, Astecas e Incas. Alguns movimentos religiosos ou filosóficos promovem o uso de plantas sacramentais para esse propósito (COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005). A partir da década de 1980 aumentou a proliferação de grupos de pessoas interessadas em experimentar substâncias que permitissem a expansão da consciência, devido, em parte, à publicidade e facilidade que lojas virtuais oferecem na internet para a compra de plantas e substâncias químicas destinadas a esse uso. Entre essas plantas está o chá ayahuasca, que vem sendo utilizado há séculos por tribos indígenas de diversos países da região amazônica em contextos xamânicos e de cura (McKENNA 2004). O

Brasil é, talvez, o único país a ter o uso do chá ayahuasca amparado por lei (CONAD, 2004). Atualmente é utilizado por milhares de pessoas em áreas urbanas e rurais brasileiras, principalmente associadas a religiões sincréticas (Santo Daime, Barquinha, União do Vegetal). As consequências do uso do chá ayahuasca em animais de experimentação em contraste com a relativa escassez de informações toxicológicas que mostrem os efeitos, principalmente no sistema nervoso central, constituem o principal interesse deste estudo.

O chá ayahuasca é uma bebida aquosa, de cor marrom, com cheiro levemente fermentado, preparada com caules do cipó *Banisteriopsis caapi* e folhas do arbusto *Psychotria viridis*. Seus principais componentes são derivados β -carbolínicos como a HRM, a HRL e a THH, assim como o derivado indólico DMT. O chá ayahuasca, utilizado neste estudo, foi obtido no LAT-FCFRP-USP e suas principais características foram descritas no item Metodologia.

Por meio de pesagens realizadas nos animais utilizados neste estudo, foi possível observar que os grupos controle e ayahuasca evoluíram de forma semelhante, uma vez que o ganho de peso corporal e seu percentual ficaram muito próximos nos dois grupos. Na última semana de tratamento verificou-se diferença na média de peso, já que os ratos que receberam o tratamento com o chá ayahuasca estavam mais debilitados e, portanto, perderam peso em comparação com os animais controle, porém não houve diferença estatisticamente significativa.

Um estudo toxicológico realizado com ratas Wistar prenhes tratadas com ayahuasca, encontrou resultados significativos nos valores de perda de peso materno, o que foi interpretado como sinal de toxicidade pelo uso da substância (OLIVEIRA, 2010). Pelo menos um artigo encontrado na literatura relaciona perda de peso e desnutrição à depleção de GSH e ao estresse oxidativo (WU et al., 2004).

Verificou-se também que o peso dos fígados dos ratos do grupo ayahuasca apresentou menores valores médios em relação ao grupo controle, contrariamente aos resultados descritos por Oliveira et al. (2010), em que

houve incremento no peso relativo dos fígados dos ratos tratados com ayahuasca; achado este que foi relacionado com indícios de hepatotoxicidade pelo uso do chá, já que o fígado é o principal metabolizador da DMT. Chama a atenção que os resultados obtidos no presente trabalho indicam maior peso dos fígados do grupo controle.

O peso dos cérebros foi levemente maior no grupo ayahuasca, apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas. Não existem estudos publicados que permitam explicar este resultado e não foram encontrados indícios macroscópicos nem microscópicos de edema cerebral que pudessem justificar essa diferença ponderal. Oliveira (2010) descreve a existência de lesões hemorrágicas e degenerativas no sistema nervoso central da progênie de ratas Wistar prenhes e expostas a uma dose trinta e cinco vezes maior (DU35) do que a DU de ayahuasca. No presente estudo não foram encontradas lesões desse tipo. Em relação às diferenças nos pesos dos órgãos, cabe mencionar a diferença existente nas amostras, já que a equipe de Oliveira trabalhou com ratas Wistar prenhes e no presente estudo trabalhamos com ratos Wistar machos.

Quanto aos parâmetros de funcionamento renal, neste estudo, em três medições de ureia urinária, somente a terceira apresentou valores mais elevados com significância estatística no grupo de ratos tratados com ayahuasca. Não foram encontrados outros estudos com modelos animais tratados com chá ayahuasca que validassem esses parâmetros bioquímicos.

Oliveira (2010) descreve os achados de congestão renal, tumefação celular e proteinúria, assim como valores reduzidos nos níveis séricos de ureia no grupo de ratas prenhes tratadas com ayahuasca. Cabe mencionar que a autora afirma que a redução da ureia não teve importância clínica no seu estudo.

Os valores de creatinina urinária, levemente mais elevados nos ratos do grupo tratado com chá ayahuasca não apresentaram significância estatística. Consideramos no presente estudo, que a elevação do valor de uma medição de ureia e creatinina urinária pode representar um indício de dano renal nos

ratos tratados com o chá. As análises do funcionamento renal constituem parâmetros de importância fundamental nos estudos de toxicidade em animais e em humanos, já que estados de desidratação, ou estresse dos animais poderiam, em algum momento, propiciar ou iniciar um processo apoptótico.

Em relação aos indicadores de estresse oxidativo, a análise comparativa dos valores de GSH, MDA e vitamina E em amostras séricas mostrou que houve diminuição estatisticamente significativa do MDA e da GSH nos ratos tratados com o chá ayahuasca. A GSH tem atuação importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos. Entre as funções da GSH na proteção contra a LPO, podem ocorrer três reações. 1) a GSH utilizada como substrato pela GSH peroxidase, na eliminação de peróxidos; 2) a GSH reduz a forma oxidada da vitamina C, que assim pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional; 3) a GSH, por meio da GSH-S-transferase, detoxificar aldeídos reativos (como o MDA) que são gerados durante a LPO. A GSH também pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (JORDÃO et al., 1998).

Estudos recentes ressaltam a importância de um meio intracelular permissivo para a regulação de apoptose por alterações no ambiente redox e consideram a depleção da GSH uma característica comum de morte celular apoptótica desencadeada por ampla variedade de estímulos incluindo ativação de receptores de morte, estresse, agentes ambientais e drogas citotóxicas. Essa depleção da GSH, considerada, inicialmente, apenas como um subproduto do estresse oxidativo gerado durante a morte celular, atualmente é vista como um regulador crítico de apoptose (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009).

Assim, a diminuição estatisticamente significativa dos valores séricos de GSH presente no grupo de ratos tratados com chá ayahuasca pode indicar a existência de estresse oxidativo, assim como pode estar contribuindo na regulação direta de um processo de apoptose neuronal. Níveis elevados de GSH têm sido associados com fenótipos resistentes à apoptose; e a depleção

de GSH tem sido observada, tanto na indução como na estimulação apoptótica (FRIESEN; KIESS; DEBATIN, 2004). A regulação e evolução da apoptose são realizadas por meio de cascatas sinalizadoras intrínsecas e extrínsecas. A via extrínseca é desencadeada, principalmente por Complexo Sinalizador Indutor de Morte (DISC), pela caspase iniciadora 8, que amplifica a ação de outra cascata de caspases executoras como a 3, 6 e 7. A via intrínseca envolve a mitocôndria, o retículo endoplasmático, dano ao DNA e outra série complexa de mecanismos bioquímicos já abordados no item revisão da literatura. Está demonstrado que a depleção de GSH pode ativar, tanto a via extrínseca quanto a intrínseca de sinalização apoptótica em diversos pontos de controle, predispondo as células à apoptose, ou desencadeando diretamente a morte celular pela modulação dos poros de transição da permeabilidade mitocondrial, assim como pela ativação das caspases executoras (FRANCO; CIDŁOWSKI, 2009).

A determinação dos níveis séricos de MDA continua a ser o método mais utilizado nas ciências biomédicas para a avaliação da LPO, já que o MDA é um dos principais aldeídos formados após a ruptura dos hidroperóxidos lipídicos (MATEOS et al., 2005). As ERO podem reagir com ligações duplas de AGPI para produzir hidroperóxidos lipídicos, e um dos principais produtos secundários da oxidação desses ácidos graxos é o MDA, que tem conhecidos efeitos mutagênicos e citotóxicos e, possivelmente participa no início da aterosclerose. Devido ao MDA se encontrar elevado em diversas doenças e intoxicações, tem sido relacionado ao dano provocado por RL (ANTUNES et al., 2008; MATEOS et al., 2005).

Ao contrário dos resultados apontados na literatura, no presente estudo foram encontrados níveis reduzidos de MDA séricos e hepáticos no grupo de ratos tratados com chá ayahuasca, o que poderia ser um indício da ação de algum mecanismo antioxidante próprio da substância, provavelmente pelo conteúdo de β -carbólinas que alteram a regulação do pHi e já foram descritas como substâncias neuroprotetoras (BONNET; SCHERBAUM; WIEMANN,

2008; KIM et al., 2001; LEE et al., 2000; MOURA et al., 2007; PARK et al., 2003).

Em estudo realizado com camundongos que receberam tratamento com MPTP e β -carbolinas (HRM e HRL) foram encontradas propriedades antioxidantes das β -carbolinas e os autores referem que os valores de MDA nos cérebros de camundongos tratados com esses compostos foram notavelmente menores em comparação com os valores dos animais tratados com MPTP (LEE et al., 2000).

Alguns autores consideram que, apesar de ainda ser o método laboratorial mais amplamente utilizado para a avaliação de LPO, a determinação do MDA após a TBARS apresenta importantes limitações, mesmo com a abordagem cromatográfica, devido ao falso aumento nos valores do MDA por uma errônea interpretação de TBARS (MATEOS et al., 2005).

Em relação à vitamina E, foram encontrados níveis notavelmente diminuídos e com significância estatística nas análises hepáticas dos ratos tratados com chá ayahuasca. A vitamina E constitui um importante antioxidante que é consumido na tentativa de evitar o desequilíbrio celular do estresse oxidativo e os valores diminuídos poderiam sugerir a presença de estresse oxidativo induzido pelo consumo do chá.

Um estudo recente sobre o metabolismo da DMT em camundongos revela a importância do metabolismo hepático do alcaloide e alguns dos seus derivados. Os autores explicam que o citocromo polimorfo P450 2D6 (CYP2D6) catalisa a 5-MeO-DMT por meio de O-desmetilação para produzir seu metabolito ativo bufotenina, enquanto a 5-MeO-DMT é inativada por desaminação pela MAO-A; e devido à farmacocinética não linear, o risco de intoxicação por 5-MeO-DMT pode ser incrementado desproporcionalmente com altas doses (SHENG; JIANG; YU. 2011). O estresse oxidativo hepático poderia ser devido ao metabolismo da DMT, um alcaloide psicotrópico considerado neurotóxico, que ocorre quase totalmente nesse órgão. No momento não existem outros estudos publicados da ocorrência desse fenômeno.

No ensaio do TUNEL realizado para avaliação da ocorrência de apoptose neuronal, o grupo de ratos tratado com ayahuasca apresentou valor médio maior de neurônios apoptóticos com significância estatística. Considerando o período de desenvolvimento dos animais, entre a sexta e nona semana pós-natal, que equivaleria, aproximadamente, ao período pós-puberal ou da adolescência, comparado com o ser humano, pode-se argumentar que esse período é caracterizado por aumento da atividade fisiológica apoptótica num processo conhecido como poda neuronal (NAEGELE; LOMBROSO, 1998), que pode ser estimulado pelo consumo de substâncias psicotrópicas que agem como neurotóxicos.

Outro aspecto a se levar em conta seriam as alterações dos fatores de crescimento neural (NGF), que nessa idade estão muito ativos. De acordo com Gewies (2003), a expressão dos IAPs pode apresentar efeito de *upregulation* em resposta a sinais de sobrevivência tais como os que chegam dos receptores dos NGF.

Em outra abordagem, Lee e Shacter (1999), apontam que o estresse oxidativo pode interferir na ativação de caspases e em todo o processo apoptótico por depleção do adenosina-trifosfato (ATP) intracelular, podendo até, derivá-lo para necrose. Com base nos achados das análises bioquímicas dos ratos tratados com chá ayahuasca, considera-se a possibilidade da existência de um processo de estresse oxidativo e por esse motivo esteja aumentada a apoptose neuronal nesse grupo de animais.

Outra forma de neurotoxicidade pelo uso do chá ayahuasca poderia ser a existência de microlesões celulares provocadas por isquemia/reperfusão cerebral (I/R). Esse tipo de lesão poderia iniciar uma complexa série de eventos bioquímicos e moleculares com prejuízo de funções pela ruptura da integridade celular, devida à excitotoxicidade glutamatérgica, ao desequilíbrio iônico, a reações de RL e à ativação da poli-polimerase (ADP-ribose) (PARP), (ZHANG, et al., 2009). A PARP é uma proteína que se liga ao DNA protegendo a sua integridade e facilitando a reparação de rupturas nas suas cadeias e está envolvida em importantes processos biológicos, tais como: vigilância da

integridade do genoma, iniciação da resposta ao dano do DNA e apoptose (ISABELLE et al., 2010).

Outros autores afirmam que as principais vias para a toxicidade dos órgãos e do sistema nervoso central estariam relacionadas com transtornos isquêmicos, assim como com o aumento no dano celular produzido por disfunção metabólica ou mitocondrial que favoreceria o aumento da excitotoxicidade, a diminuição na produção de energia e diminuição do potencial antioxidante (VIRMANI; ALI; BINIENDA, 2010).

A ingestão de chá ayahuasca no tratamento dos ratos pode ter interferido com o processo apoptótico por uma ou talvez várias vias, a saber: pela interferência na cascata efetora das caspases, mesmo que os valores de caspase-3 não tenham sido estatisticamente significativos; pela interferência com os NGF, ou por possíveis mudanças na estrutura celular, devidas à isquemia, ao estresse oxidativo pela diminuição da GSH e vitamina E, ou a outros mecanismos bioquímicos.

Em relação ao padrão de consumo, alguns autores afirmam que o risco potencial de dependência física ou psicológica pelo uso do chá ayahuasca é mínimo e que o padrão de uso pelos adeptos das religiões sincréticas pode ser classificado como recreativo (COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005; McKENNA, 2004). Já outros afirmam que esse fato ainda não está documentado de forma convincente, pois em modelos animais tem sido encontrada tolerância a respostas comportamentais e biológicas depois de um período de três a quatro semanas, considerando o uso de ayahuasca como reforçador positivo para potencial abuso de outras substâncias (GABLE, 2007).

Existem muitas pessoas que fazem uso da substância, pelo menos uma ou duas vezes por mês, e que tem mais de trinta anos de consumo (McKENNA, 2004). Não foram encontrados estudos de avaliação clínica psiquiátrica desse grupo de usuários e também não existem escalas nem outros instrumentos validados para determinar os níveis de consumo do chá ayahuasca em humanos. Por outro lado, as religiões sincréticas no Brasil consideram a bebida como instrumento de acesso ao mundo espiritual, objetivo

que só pode ser conseguido por meio do conjunto de técnicas que induzem efeitos previstos e prescritos pelo sistema. Estas técnicas vão desde o consumo do chá por mulheres grávidas como proteção e facilitador do parto (“técnicas do nascimento e da obstetrícia”) até a administração de gotas sublinguais do chá a recém-nascidos, que podem continuar a recebê-lo ao longo da vida, as chamadas “técnicas da infância”. As “técnicas da adolescência” e “técnicas do consumo” seriam outros exemplos que já foram considerados críticos pelos efeitos co-mutagênicos das β -carbolinas (COSTA; FIGUEREIDO; CAZENAVE, 2005).

Recentemente foram publicados os primeiros estudos que demonstram os efeitos tóxicos e teratogênicos provocados pela administração do chá ayahuasca (DU35) em ratas Wistar do 6º ao 20º dia da gestação, sendo os principais achados: alterações do ganho de peso corporal e do fígado, assim como alterações histológicas em diversos órgãos do sistema gastrointestinal das ratas prenhes. Nos fetos foram encontradas malformações ósseas e viscerais, destacando a abertura dos ventrículos cerebrais (OLIVEIRA et al., 2010).

No presente estudo não se encontraram alterações macroscópicas nos cérebros dos ratos tratados com chá ayahuasca e nem no grupo controle. Houve mais perdas amostrais no grupo controle do que no grupo ayahuasca, e nas necropsias realizadas nesses animais não se encontraram alterações macroscópicas em nenhum órgão vital.

O chá ayahuasca ocupa importante posição na etnomedicina cabocla e a natureza química dos seus componentes ativos, assim como a forma do seu uso, tornam seu estudo relevante para questões contemporâneas em neurofarmacologia, neurofisiologia, neurotoxicologia e psiquiatria (McKENNA, 2004).

Decidiu-se desenvolver um estudo exploratório que permitisse avaliar o potencial tóxico do chá ayahuasca em ratos Wistar quanto aos efeitos sistêmicos sinalizadores de estresse oxidativo, assim como em relação à apoptose neuronal. Os resultados deste estudo estão em concordância com os

achados descritos na literatura mundial, em que as conclusões sobre os efeitos neurotóxicos e neuroprotetores dos principais componentes químicos do chá ayahuasca estão bastante divididas. Na maioria dos estudos, as β -carbolicinas e, principalmente a DMT, são consideradas neurotóxicas por mecanismos que envolvem ambas as vias apoptóticas: a extrínseca e intrínseca, primordialmente por alterações mitocondriais e do sistema redox, assim como lhes são atribuídas ações celulares de tipo necrótico. Por outro lado, existem outros autores que afirmam o contrário e tentam demonstrar seus efeitos neuroprotetores, mormente por alterações do pH_i, mudanças na permeabilidade dos poros mitocondriais, efeitos antioxidantes sobre ERO, como também por inibição da MAO e oxidação de tiois neuronais.

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que existe um processo neurotóxico relacionado ao uso do chá ayahuasca no grupo de ratos que foram submetidos a tratamento subagudo (21 dias) com esta substância. Os valores diminuídos e estatisticamente significativos de GSH sérica e de vitamina E hepática encontrados nesse grupo de animais, assim como a diminuição do peso corporal e a elevação da ureia urinária, em relação aos valores do grupo controle podem ser indício de efeitos sistêmicos sinalizadores de estresse oxidativo e, como consequência disso, esteja repercutindo indiretamente no desencadeamento ou na estimulação de um processo apoptótico cerebral.

Os únicos achados do presente estudo que poderiam ser hipoteticamente indicativos de neuroproteção induzida pelo uso do chá ayahuasca seriam os valores diminuídos de MDA sérico e hepático, mas ainda são considerados pouco conclusivos, motivo pelo qual, não seria possível afirmar categoricamente que o uso do chá ayahuasca constitui uma substância com propriedades neuroprotetoras.

Um dos principais objetivos dos exames neurotoxicológicos é a avaliação integral e sistêmica dos efeitos da substância no organismo para determinar se o dano neurológico é direto ou indireto e também verificar a intensidade do dano em relação à dose consumida (FDA, 2000).

Em estudos toxicológicos deve se considerar que a toxicidade intrínseca de uma substância é um parâmetro extremamente variável que pode ser influenciado por uma série de fatores relacionados, principalmente ao agente químico, organismo e à exposição da substância e que, tão importante como conhecer a toxicidade dos agentes químicos, é conhecer e saber avaliar o risco tóxico de uma substância química.

Com base nos experimentos realizados e resultados obtidos, consideram-se necessários mais estudos científicos, principalmente nas fases toxicocinética e toxicodinâmica em animais de experimentação e também na fase clínica com humanos, com a finalidade de aprofundar os conhecimentos biomoleculares, histopatológicos, comportamentais e sócio culturais relacionados aos possíveis efeitos terapêuticos ou deletérios do chá ayahuasca.

6. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados, concluiu-se que:

- a) A administração subaguda de 2 ml de chá ayahuasca com diluição de 50% por via oral em ratos Wistar machos com peso inicial de 200 mg durante 21 dias produziu maior quantidade de células neuronais apoptóticas medidas pelo ensaio do TUNEL em comparação com o grupo controle.
- b) A análise da apoptose neuronal, por meio fluorimétrico do kit Caspase-3, não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os ratos Wistar machos tratados com chá ayahuasca e os do grupo controle.
- c) Os resultados dos valores de GSH séricos, assim como de vitamina E hepática, foram menores nos ratos Wistar machos tratados durante 21 dias com chá ayahuasca por via oral em comparação com o grupo controle. Esses parâmetros mostraram significância estatística, sendo indicativos de um processo de estresse oxidativo que poderia vir a desencadear indiretamente um processo apoptótico.
- d) Todas as medições de ureia urinária mostraram valores mais elevados no grupo de ratos Wistar tratados com chá ayahuasca em comparação com o grupo controle, uma delas apresentou significância estatística. Não houve diferenças significativas nos valores de creatinina urinária em ambos os grupos.
- e) Os resultados deste estudo exploratório apontam para a presença de um processo neurotóxico nos ratos Wistar tratados com chá ayahuasca em período subagudo, provavelmente desencadeado indiretamente por fatores de estresse oxidativo, o que deveria ensejar novos estudos para confirmar esses achados.

- f) Apesar do uso disseminado do chá ayahuasca, verifica-se a necessidade de se aprofundarem os estudos toxicológicos da substância com os componentes originais, já que atualmente predominam os com componentes sintéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGURELL, S.; HOLMSTEDT, B.; LINDGREN, J.E.; SCHULTES, R. E. Identification of two new beta-carboline alkaloids in South American hallucinogenic plants. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 2487-88, 1968.

ALBORES, R.; NEAFSEY, E. J.; DRUCKER, G.; FIELDS, J. Z.; COLLINS M. A. Mitochondrial respiratory inhibition by N-methylated β -carboline derivatives structurally resembling N-methyl-4-phenylpyridine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 23, p. 9368-9372, 1990.

ANTUNES, M. V.; LAZARETTI, C.; GAMARO, G. D.; LINDEN, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.

BEZERRA, J. S.; TEIXEIRA, W.; VATTIMO, F. F. Efeito protetor da *Vitis vinifera* na lesão renal aguda isquêmica em ratos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 99-104, 2008.

BONNET, U.; SCHERBAUM, N.; WIEMANN, M. The endogenous alkaloid harmaline: Acidifying and activity-reducing effects on hippocampal neurons in vitro. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 362-367, 2008.

BRESNICK, T.; LEVIN, R. Phenomenal qualities of Ayahuasca ingestion and its relation to fringe consciousness and personality. **Journal of Consciousness Studies**, England, v. 13, n. 9, p. 5-24, 2006.

BRITO, A. R. M. S.; ANTONIO, M. A.; COSTA, M.; CARVALHO, J. E.; DIAS, P. C. Efeitos farmacológicos do decocto (hoasca) de Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis em camundongos.. In: IX REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE), Caxambu, MG, 1994. **Resumos da IX Reunião Anual da FESBE**. Editora da FESBE, São Paulo, SP. (doc. nº V.V.2.41), p. 203, 1994.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310. 1978.

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 health humans. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausane, v. 65, n. 3, p. 243-251, 1999.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, New York, v. 75, n. 3, p. 501-512, 2003.

CHEN, Q.; CHAO, R.; CHEN, H.; HOU, X.; YAN, H.; ZHOU, S.; PENG, W.; XU, A. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. **International Journal of Cancer**, New York, v. 114, n. 5, p. 675-682, 2005.

CONAD. **Relatório Final do Grupo Multidisciplinar de Trabalho - GMT - Ayahuasca**, 2006. Disponível em: www.obid.senad.gov.br/portais/CONAD/biblioteca/documentos/327994.pdf. Acessado em: 19/06/2011.

COSTA, M. C. M.; FIGUEREIDO, M. C.; CAZENAVE, S. O. S. Ayahuasca: Uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 310-318, 2005.

DALGARNO, P. Buying Ayahuasca and other entheogens online: A word of caution. **Addiction Research and Theory**, London, v. 16, n. 1, p. 1-4, 2008.

EKSHYYAN, O.; AW, T. Y. Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders. **Current Neurovascular Research**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 355-371, 2004a.

EKSHYYAN, O.; AW, T. Y. Apoptosis in acute and chronic neurological disorders. **Frontiers on Bioscience**, New York, v. 9, p. 1567-1576, 2004b.

FDA (Food and Drug Administration). **Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients**. Redbook 2000, chapter IV. C.10 Neurotoxic Studies, sem paginação. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/foodingredientsandpackaging/redbook/ucm078323.htm>. Acessado em: 23/10/2011

FRANCO, R.; CIDLOWSKY, J. A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 16, p. 1303-1314, 2009.

FREEDLAND, C. S.; MANSBACH, R. S. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. **Drug and Alcohol Dependence**, Lausanne, v. 54, n. 3, p. 183-194, 1999.

FRIESEN, C; KIESS, Y.; DEBATIN, K. M. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. **Cell Death Differentiation**, London, v. 11, Supl. 1, p. S73-85, 2004.

GABLE, R. S. Risk assesment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. **Addiction**, Abingdon, v. 102, n. 1, p. 24-34, 2007.

GAVRIELI, Y; SHERMAN, Y; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GEWIES, A. **ApoReview, Introduction to Apoptosis**, p. 1-26, (2003). Disponível em: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>. Acessado em: 27/10/2010

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

HAEBERLEIN, S. B. L. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death. **Neurochemical Research**, New York, v. 29, n. 3, p. 521-530, 2004.

HAMAN, J.; ROMMELSPACHER, H.; STORCH, A.; REICHMAN H.; GILLE G. Neurotoxic mechanisms of 2,9-dimethyl-beta-carbolinum ion in primary dopaminergic culture. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 88, n. 4, p. 1185-1199, 2006.

HOU, X. R; CHEN, Q.; CAO, R. H; PENG, W. L; XU, A. L. A comparative molecular field analysis of cytotoxic beta- carboline analogs. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 25, n. 7, p. 959-965, 2004.

ILLANA, C. Robert Gordon Wasson, un pionero de la etnomicología. **Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid**, Madrid, v. 31, p. 273-277, 2007.

IKEGAMI, Y.; GOODENOUGH, S.; INOUE, Y.; DODD, P. R.; WILCE, P. A.; MATSUMOTO, I. Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 341, p. 201-205, 2003.

ISABELLE, M.; MOREEL, X.; GAGNÉ, J. P.; ROULEAU, M.; ETHIER, C.; GAGNÉ, P.; HENDZEL, M. J.; POIRIER, G. Investigation of PARP-1, PARP-2 and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. **Proteome Science**, London, v. 8, p. 22, 2010.

JACOB, M.; PRESTI, D. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical Hypotheses**, New York, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005.

JORDÃO, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S.; VANUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, 1998.

KIM, D. H.; JANG, Y. Y.; HAN, E. S.; LEE, C. S. Protective effect of harmaline and harmalol against dopamine-and 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes, and viability loss of PC12 cells. **European Journal of Neuroscience**, Paris, v. 13, n. 10, p. 1861-1872, 2001.

KUHN, W.; MULLER, T.; GROSSE, H.; ROMMELSPACHER, H. Plasma Harman and norharman in parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, Viena, p. 291-295, 1995, Supplement 46.

KUHN, W.; MULLER, T.; GROSSE, H.; ROMMELSPACHER, H. Elevated levels of Harman and norharman in cerebrospinal fluid of parkinsonian patients. **Journal of Neural Transmission**, Viena, v. 103, n. 12, p. 1435-1440, 1996.

LEE, C. S.; HAN, E. S.; JANG, Y. Y.; HAN, J. H.; HA, H. W.; KIM D. E. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and Dopamine Induced Damage of Brain Mitochondria and PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 75, n. 2, p. 521-531, 2000.

LEE, Y.; SHACTER, E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 28, p. 19792-19798, 1999.

LI, G. W.; LIANG, P. G.; PAN, G. Y. Radioprotective effect of gamma-harmin and its carboline analogues. **Acta Pharmaceutica Sinica**, Beijing, v. 30, n. 9, p. 715-717, 1995.

LIMA, P. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação Lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, Washington, v. 79, n. 4, p. 1431-1568, 1999.

MARTINS, I. S. Relação entre excreção de creatinina e dieta, atividade física e volume urinário em crianças de 5 a 12 anos de idade. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, São Paulo, v. 9, p. 295-302, 1975.

MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 827, n. 1, p. 76-82, 2005.

MATTSON, M. P.; LAFERLA, F. M.; CHAN, S. L.; LEISSRING, M. A.; SHEPEL, P. N.; GEIGER J. D. Calcium signaling in the ER: Its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 23, n. 5, p. 222-229, 2000.

McKENNA, D. J.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and β -carboline constituents of Ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 10, n. 2, p. 195-223, 1984a.

McKENNA, D. J.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants part 2: Constituents of orally-active myristicaceous hallucinogens. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 12, n. 2, p. 179-211, 1984b.

McKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential use of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 111-129, 2004.

MOURA, D. J.; RORIG, C.; VIEIRA, D. L.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BOEIRA, J. M. Effects of β -carboline alkaloids on the object recognition task in mice. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 79, n. 22, p. 2099-2104, 2006.

MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; BOEIRA, J. M.; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J. Antioxidant properties of β -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. **Mutagenesis**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 293-302, 2007.

NAEGELE, J.; LOMBROSO, P. J. Development of the cerebral cortex: VIII. Apoptosis: Neuronal Hari-Kari. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, Baltimore, v. 37, n. 8, p. 890-892, 1998.

NICOLE, A.; SANTIARD-BARON, D.; CEBALLOS-PICOT, I. Direct evidence for glutathione as mediator of apoptosis in neuronal cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 52, n. 9, p. 349-355, 1998.

OLIVEIRA, C. D. R. **Estudos de toxicologia do desenvolvimento de ratos expostos à ayahuasca**. 2010, 201p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, São Paulo, 2012.

OLIVEIRA, C. D. R.; MOREIRA, C. Q.; DE SÁ, L. R. M.; SPINOSA, H. S.; YONAMINE, M. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in Wistar rats. **Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology**, Hoboken, v. 89, n. 3, p. 207-212, 2010.

ÖSTERGREN, A.; FREDRIKSSON, A.; BRITTEBO, E. B. Norharman-induced motoric impairment in mice: neurodegeneration and glial activation in substantia nigra. **Journal of Neural Transmission**, Viena, v. 113, n. 3, p. 313-329, 2006.

PARK, T. H.; KWON, O. S.; PARK, S. Y.; HAN, E. S.; LEE, C. S. N-methylated β -carboline protect PC12 cells from cytotoxic effect of MPP⁺ by attenuation of mitochondrial membrane permeability change. **Neuroscience Research**, Limerick, v. 46, n. 3, p. 349-358, 2003.

PASCHEN, W.; MENGENDORF, TH. Cellular abnormalities linked to endoplasmic reticulum dysfunction in cerebrovascular disease-therapeutic potential. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 108, nº 3, p. 362-375, 2005.

PIRES, A. P. S.; OLIVEIRA, C. D. R.; MOURA, S.; DORR, F. A.; SILVA, W. A.; YONAMINE, M. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -Carboline alkaloids in Ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 20, n. 2, p. 149-153. 2009.

PIRES, A. P. S.; OLIVEIRA, C. D. R.; YONAMINE, M. Ayahuasca, uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas, Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 15-23, 2010.

PORTER, A. G.; JANICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1999.

RIBA, J.; VALLE, M; URBANO, G.; YRITIA, M.; MORTE, A.; BARBANOJ, M. Human Pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, Monoamine metabolite excretion, and Pharmacokinetics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 306, n. 1, p. 73-83, 2003.

SANTOS, R. G.; GRASA, E.; VALLE, M.; BALLESTER, M. R.; BOUSO, J. C.; NOMDEDÉU, J. F.; HOMS, R.; BARBANOJ, M. J.; RIBA, J. Pharmacology of Ayahuasca administered in two repeated doses. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 219, n. 4, p. 1039-53, 2011.

SASTRY, P. S.; RAO, K. S. Apoptosis and the nervous system. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 74, n. 1, p. 1-20, 2000.

SCHWARZ, M. J.; HOUGHTON, P. J.; ROSE, S.; JENNER, P.; LEES A. D. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to

parkinsonism. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, New York, v. 75, n. 3, p. 627-633, 2003.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SHANON, B. Ayahuasca visualizations - A structural typology. **Journal of Consciousness Studies**, England, v. 9, n. 2, p. 3-30, 2002.

SHENG, H. W.; JIANG, X. L.; YU, A. M. Nonlinear pharmacokinetics of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 39, n. 7, p. 1227-1234, 2011.

SONG, Z.; LIU, J.; LU, X.; WANG, L. Harmine induces apoptosis in Human SGC-7901 Cells. **Zhong Yao Cai**, Beijing, v. 29, n. 6, p. 571-573, 2006.

THORNBERRY, N. A. Caspases: A decade of death research. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 6, n. 11, p. 1023-1027, 1999.

TUPER, K. W. The globalization of Ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? **International Journal on Drug Policy**, Liperpool, v. 19, n. 4, p. 297-303, 2008.

TURGUTA, G.; ENLIB, Y.; KAPTANOĞLUB, B.; TURGUTA, S.; GENÇA, O. Changes in the levels of MDA and GSH in mice serum, liver and spleen after aluminum administration. **Eastern Journal of Medicine**, Van, v. 11, p. 7-12, 2006.

UEZONO, T.; MARUYAMA, W.; MATSUBARA, K.; NAOI, M.; SHIMIZU, K.; SAITO, O.; OGAWA, K.; MIZUKAMI, H.; HAYASE, N.; SHIONO, H. Norharman and indoleamine-derived β -Carboline, but not Trp-P-2, a γ -carboline, induces apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Journal of Neural Transmission**, Viena, v. 108, n. 8-9, p. 943-953, 2001.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews. Neuroscience**, London, v. 4, n. 5, p. 365-375, 2003.

VIRMANI, A.; ALI, S. F.; BINIENDA, Z. K. Neuroprotective strategies in drug abuse-evoked encephalopathy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1199, p. 52-68, 2010.

VON BERNHARDI, M.R. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria**, Santiago de Chile, v. 42, n. 4, p. 281-292, 2004.

WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, p. 489-492, 2004.

YAMAKAWA, T.; OHTA, S. Biosynthesis of a parkinsonism preventing substance, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, is inhibited by parkinsonism-inducing compounds in rat brain mitochondrial fraction. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 259, n. 3, p. 157-160, 1999.

YUAN, J.; YANKNER, B. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, London, v. 407, n. 6805, p. 802-808, 2000.

ZHANG, H. F.; HU, X. M.; WANG, L. X.; XU, S. Q.; ZENG, F. D. Protective effects of Scutellarin against cerebral ischemia in rats: evidence for inhibition of the apoptosis-inducing factor pathway. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 75, n. 2, p. 121-126, 2009.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, Bethesda, v. 19, p. 124-128, 2004.

8. ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 058/2007, sobre o projeto intitulado “*Verificação do efeito protetor do chá Ayahuasca contra os danos causados pelo Etanol*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Erikson Felipe Furtado**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **28 de maio de 2007**.

(We certify that the protocol nº 058/2007, about “*Verification of protective effect of Ayahuasca tea to the damage caused by ethanol*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 05/28/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2007.

Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal