Willian Melo Júnior

Estudo do perfil genotóxico, citotóxico, neurocomportamental e bioquímico da ayahuasca em ratos *Wistar* tratados com dose única

BRASÍLIA, 2014.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

WILLIAN MELO JÚNIOR

Estudo do perfil genotóxico, citotóxico, neurocomportamental e bioquímico da ayahuasca em ratos *Wistar* tratados com dose única

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília.

Orientadora: Aline Pic-Taylor
Co-Orientadora: Eloisa Dutra Caldas

Brasília, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, BRASÍLIA
WILLIAN MELO JÚNIOR

Estudo do perfil genotóxico, citotóxico, neurocomportamental e bioquímico da ayahuasca em ratos *Wistar* tratados com dose única

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 25 de Novembro de 2014.
BANCA EXAMINADORA

Drª. Aline Pic-Taylor- (Presidente)
Universidade de Brasília

Dr. Cesar Koppe Grisolia
Universidade de Brasília

Drª. Vânia Maria Moraes Ferreira
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Drª. Aline Pic-Taylor, e co-orientadora, Drª. Eloisa Dutra Caldas. É importante ter em quem se espelhar. Sinto-me honrado por terem depositado em mim a confiança para realizar este estudo.

Ao professor Dr. Cesar Koppe Grisolia pela parceira, por suas ponderações e por manter seu laboratório sempre de portas abertas.

Ao professor José de Souza Filho, por ser muito mais do que um suporte, um companheiro e uma inspiração.

As colegas de projeto e de laboratório, Alana, Juliana, Halinna e Luciana, que compartilharam as dificuldades, as angustias, os experimentos e principalmente os conhecimentos.

Um agradecimento especial aos colegas Matheus, Laíse, Cesar Romero, Janaina, Wânia e Luiz Ramirez sempre prestativos e presentes.

Aos alunos de iniciação científica, Ana Paula, Ana Flávia, Raquel e Thales pela dedicação e pelos momentos de descontração. Sem vocês o caminho seria longo e árduo.

A todos os estagiários que passaram pelo Laboratório de Embriologia e Biologia do Desenvolvimento e foram tantos que corro o risco de esquecer algum nome, mas tenho plena convicção que as trocas de experiências desde as mais breves as mais duradouras foram capazes de nos transformar.

Aos parceiros do Instituto de Biologia por compartilharem seu espaço e conhecimento em especial os professores e técnicos do GEM.

Aos servidores e técnicos do biotério e do CiEX da Faculdade de Saúde pelo suporte essencial na manutenção dos animais.

A União do Vegetal (UDV) que gentilmente cedeu a ayahuasca utilizada nesse estudo.

Ao Instituto Sabin pelas analises séricas.

Ao CNPq, à FAP/DF, a CAPES pelo fomento dos estudos.

Aos meus pais e minha família.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para realização desse estudo e para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem: Por quê? Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo: Por que não?”

(George Bernard Shaw)

Sumário

I. INTRODUÇÃO 1

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

1. Histórico e expansão de consumo da ayahuasca 3

2. Ayahuasca: extrato natural e composição química 5

2.1 *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae).....5

2.2 *Psychotria viridis* (Rubiaceae) 6

3. Mecanismo de ação dos componentes da ayahuasca e seus efeitos 8

4. Serotonina, receptores serotoninérgicos e seu papel regulatório.....9

5. Toxicidade da ayahuasca.....10

5.1 Toxicidade aguda.....10

5.2 Toxicidade Crônica 11

5.3 Toxicidade reprodutiva.....12

5.4 Genotoxicidade.....13

5.5 Potencial terapêutico da ayahuasca 14

6. Bioensaios de genotoxicidade.....16

6.1 Fragmentação de DNA por análise visual no Ensaio Cometa 17

6.2 Fragmentação de DNA por analise em citometria de fluxo.....18

6.3 Teste do Micronúcleo *in vivo* 19

7. Avaliação Comportamental 22

8. Avaliação hematológica (eritrograma, leucograma, plaquetograma e bioquímica sérica).....24

III. OBJETIVOS: 26

Objetivo Geral: 26

Objetivos Específicos:.....26
IV. MATERIAIS E MÉTODOS 27
1. Animais 27
2. Ayahuasca 27
3. Delineamento experimental 28
4. Testes comportamentais.....30
5. Eutanásia e coleta das amostras biológicas 32
6. Ensaio Cometa.....33
7. Teste de micronúcleo.....34
8. Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo 36
9. Avaliação hematológica e bioquímica 37
10. Análises Estatísticas 38
V. RESULTADOS.....39
1. Peso corporal e de órgãos 39
2. Testes comportamentais.....40
2.1 Teste do Campo Aberto.....40
2.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) 43
2.3 Teste de Natação Forçada (TNF) 49
3. Genotoxicidade 52
3.1 Ensaio Cometa 52
3.2 Fragmentação de DNA por Citometria de Fluxo 53
3.3 Teste do Micronúcleo.....53
4. Análises Hematológicas.....55
4.1 Eritrograma 55
4.2 Leucograma 58
4.3 Plaquetograma.....60

5. Análise bioquímica 61
VI. DISCUSSÃO 63
VII. CONCLUSÃO 72
X. REFERÊNCIAS 73
XI. ANEXOS 86

Lista de Figuras

Figura 1. *Banisteriopsis caapi* conhecido como mariri.....6

Figura 2. *Psychotria viridis* também conhecida como chacrona.....7

Figura 3. Estrutura química: serotonina (5-hidroxitriptamina), n,n dimetil-triptamina (DMT), psilocibina, mescalina, harmina, harmalina, tetra-hidro-harmalina.....8

Figura 4. Síntese de serotonina a partir do aminoácido essencial triptofano.....10

Figura 5. Nucleóides ao microscópio de fluorescência (100X).....18

Figura 6. Processo de eritropoiese *in vivo* e mecanismos de formação de micronúcleos.....20

Figura 7. Eritrócitos de rato *Wistar*. À direita eritrócito policromático micronucleado e a esquerda eritrócito policromático normal. Imagem captura em microscópio de luz, aumento de100X.....21

Figura 8. Gavagem com sonda flexível.....29

Figura 9. Arena circular usada no Teste de Campo Aberto.....30

Figura 10. Labirinto em Cruz Elevado.....31

Figura 11. Cilindro para teste de natação forçada.....32

Figura 12. Classificação visual de níveis de dano.....34

Figura 13. Filtro em coluna de celulose.....35

Figura 14. População eritrocítica isolada por centrifugação entre camadas de Percoll® (halo vermelho entre as camadas).....35

Figura 15. Filtro com tamanho de poro 50 µm CellTrics®.....37

Figura 16**.** Atividade Locomotora na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo Aberto.....41

Figura 17. Exploração da Área Central no Teste de Campo Aberto na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo Aberto.....41

Figura 18. Comportamento Exploratório por Elevação de Tórax na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo Aberto.....42

Figura 19. Comportamento de Autolimpeza no Teste de Campo Aberto na primeira hora (A) e na segunda (B).....43

Figura 20. Comportamento emocional por defecação no Teste de Campo Aberto na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....43

Figura 21. Tempo de permanência no braço fechado no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....44

Figura 22. Tempo de permanência no braço aberto no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B) 45

Figura 23. Tempo de permanência no quadrante central no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....46

Figura 24. Número de entradas nos braços fechados no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....46

Figura 25. Número de entradas nos braços abertos no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....47

Figura 26.Comportamento exploratório por número de elevações de tórax no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....48

Figura 27.Comportamento de Autolimpeza no Teste do Labirinto em Cruz Elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....48

Figura 28. Comportamento emocional por defecação na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo aberto.....49

Figura 29. Tempo de observação do comportamento ativo do tipo “escalada” no teste de natação forçada na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Natação Forçada.....50

Figura 30. Tempo de observação do comportamento ativo do tipo natação no teste de natação forçada na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Natação Forçada.....50

Figura 31. Tempo de observação do comportamento passivo ou flutuação no teste de natação forçada na primeira hora (A) e na segunda hora (B).....51

Figura 32. Comportamento emocional por defecação na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Natação Forçada.....51

Figura 33. Danos total ao DNA por análise em escala de classificação visual no ensaio cometa.....53

Figura 34. Fragmentação de DNA por citometria de fluxo.....53

Figura 35. Citotoxicidade analisada pela proporção de EPC/ENC no teste do micronúcleo.....54

Figura 36. Hematócrito total (HCT).....55

Figura 37. Contagem total de eritrócitos (RBC).....56

Figura 38. Concentração hemoglobínica (HGB).....56

Figura 39. Volume corpuscular das hemácias (MCV).....57

Figura 40. Hemoglobina corpuscular média (MCH).....57

Figura 41. Concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC).....57

Figura 42. Variação dos volumes dos eritrócitos (RDW-SD) e a distribuição da variação dos tamanhos dos eritrócitos (RDW-CV).....58

Figura 43. Contagem total de leucócitos (WBC).....59

Figura 44. Contagem diferencial de leucócitos. Linfócitos (W-SCC).Neutrófilos e monócitos (W-LCC).....59

Figura 45. Percentual das linhagens de leucócitos. W- SCR: percentual de células brancas pequenas. W- LCR: Percentual de Células brancas grandes.....60

Figura 46. Contagem total de Plaquetas (PLT).....60

Figura 47. Volume plaquetário médio (MPV – *Mean Platelet Volume),* variação do tamanho das plaquetas (PDW – *Platelet Dimensions Width*), percentual de plaquetas gigantes ou plaquetas de estress (P-LCR).....61

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros analisados em Citometria de fluxo.....19

Tabela 2 - Peso absoluto em gramas, do corpo e dos órgãos dos animais controles e tratados.....39

Tabela 3 - Índice de Dano ao DNA pelo Ensaio Cometa.....52

Tabela 4 - Incidência de Eritrócitos Policromáticos micronucleados por grupo e por sexo.....54

Tabela 5 - Análise bioquímica sérica por grupo experimental.....62

Siglas e abreviaturas

BHE - barreira hematoencefálica

CEUA - Comitê de Ética no uso de Animais

COFEN – Conselho Federal de Entorpecentes

CONAD – Comissão Nacional de Políticas sobre Drogas

CHCM - concentração hemoglobínica corpuscular média

CN - controle negativo

CNEA - Cadastro Nacional de Entidades usuárias da Ayahuasca

CP - controle positivo

DOX - cloridrato de doxorrubicina

EDTA - ácido etileno-diamino tetra-acético

ENC - eritrócitos normocromáticos

EPC - eritrócitos policromáticos

Fl2 – fluorescência relativa ao comprimento de onda≅ 570 nm que corresponde à luz laranja.

HBSS - *Hank´s Balanced Salt Solution*

HRL – harmalina

HRM - harmina

HCM - hemoglobina corpuscular média

HCT– hematócrito total

HGB– concentração de hemoglobina

iMAO – inibidor de monoaminaoxidase

LCE – labirinto em cruz elevado

MAO – enzima monoaminaoxidase

Mn-ENC - micronúcleo em eritrócito normocromáticos

Mn-EPC - micronúcleo em eritrócitos policromáticos

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PBS - *Phosphate Buffered Saline*(solução tampão fosfato)

PDW - amplitude da distribuição das plaquetas

P-LCR - porcentagem de plaquetas gigantes

RDW - amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos

SBF - soro bovino fetal

TCA – teste do campo aberto

THH –tetra-hidro-harmalina

TGO – enzima transaminase glutâmico oxalacética

TGP – enzima transaminase glutâmico pirúvica

TNF – Teste de Natação Forçada

UDV – Centro Espírita Beneficente União do Vegetal

Resumo

A bebida psicoativa conhecida como ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) é um sacramento incorporado a religiões não indígenas oriundas da região amazônica. Essa cocção sagrada tem propriedades de cura alardeadas em rituais xamânicos e um corpo de evidências crescente indica que o uso é seguro no contexto ritualístico. A perspectiva de uso da ayahuasca extrapolando o uso religioso seja em um contexto terapêutico ou recreacional ainda carece de dados pré-clínicos que atestem sua segurança. Esse estudo avaliou os perfis genotóxico, mutagênico, citotóxico e neurocomportamental da ingestão aguda de ayahuasca em ratos *Wistar*. Os bioensaios realizados foram análise de fragmentação de DNA por citometria de fluxo (CF), Ensaio Cometa (EC), teste do Micronúcleo (MN), análise das séries hematológicas (eritrograma, leucograma e plaquetograma) e avaliação sérica das funções renais, hepática e pancreática. Para avaliação neurocomportamental utilizaram-se os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e natação forçada, que além de avaliar a locomoção e mobilidade são também modelos preditivos de ação ansiolítica e antidepressiva. Cinqüenta ratos *Wistar*, de ambos os sexos, foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais: grupo controle negativo (GC-) que recebeu água filtrada, grupo controle positivo que recebeu doxorrubicina (DOX) e grupos tratados (GT) com diferentes doses de ayahuasca (1X, 5X e 15X a dose ritualística). A observação comportamental mostrou redução da atividade locomotora geral nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. No teste de natação forçada, animais tratados do grupo 15X mostraram significativa redução do tempo de flutuação, animais tratados com as doses 1X, 5X e 15X mostraram comportamento ativo do tipo escalada aumentado, sugerindo uma possível ação antidepressiva da infusão. Ayahuasca mostrou baixo potencial genotóxico em doses 1X e 5X, ocorrendo aumento na incidência de eritrócitos micronucleados apenas na dose mais elevada (15X). Além disso, a bebida não mostrou ação citotóxica nas condições testadas e as funções hepática, renal e pancreática se mantiveram sem alterações significativas em todas as doses testadas. Esses resultados indicam que ratos tratados com ayahuasca nas doses até 5X a dose ritualística não apresentaram alterações genotóxicas ou citotóxicas, e o potencial antidepressivo observado é um efeito que deve ser investigado mais detalhadamente.

Palavras-chave: ayahuasca, genotoxicidade, teste do micronúcleo, ensaio cometa, citometria de fluxo, neurotoxicidade, depressão

Abstract

The psychoactive brew known as ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) is a sacramental beverage incorporated by non-indigenous religions originated from the Amazon region. This sacred cooking has touted healing properties in shamanic rituals and an increasing body of evidence indicates that its use is safe in ritualistic context. The prospect of use of ayahuasca in a therapeutic context or in a recreational context still lacks of preclinical data about its safety. This study evaluated the genotoxic, mutagenic, cytotoxic and neurobehavioral profiles of ayahuasca. Bioassays were: analysis of DNA fragmentation by flow cytometry (FC), comet assay (CA), the micronucleus test (MN), hematological analysis (erythrogram, leukogram and thrombogram) and serum evaluation of renal, hepatic and pancreatic functions. For neurobehavioral assessment were used the open field test, elevated plus maze test and forced swimming test. These tests evaluate locomotion and mobility as well as are also predictive of anxiolytic and antidepressant action. 50*Wistar* rats of both sexes were randomly distributed into five experimental groups: negative control group (GC-) that received filtered water, Positive Control Group who received doxorubicin (DOX) and treated groups (GT) with different doses of ayahuasca (1X, 5X and 15X). Behavioral evaluation showed reduction in general locomotor activity in the open field and elevated plus maze tests. In water animals of 15X treated group showed significant reduction in the fluctuation, treated animals of 1X, 5X e 15X showed active behavior like climbing increased, suggesting a possible antidepressive effect. Ayahuasca showed low genotoxic potential at the 1 X and 5X doses; causing increase in the incidence of micronuclei erythrocytes only at the highest dose (15X). In addition, the beverage showed no cytotoxic effect in the tested conditions and hepatic, renal and pancreatic functions remained without significant changes at all tested doses. These results indicate that treated rats with doses up to 5X ritualistic dose showed no genotoxic or cytotoxic changes, and the antidepressant potential observed is an effect that should be investigated further.

Keywords: ayahuasca, genotoxicity, micronucleus test, comet assay, flow cytometry, neurotoxicity, depression

I. INTRODUÇÃO

O uso de plantas e extratos naturais em medicina popular e rituais de cura é observado desde a antiguidade (Martinez et al., 2009). Várias plantas com potencial alucinógeno são usadas milenarmente por grupos xamânicos em várias regiões do mundo. Por exemplo, o peiote, cactos (*Lophophora Williamsii)* a partir do qual se extrai a mescalina, é utilizado por grupos tribais nos Estados Unidos e México, e hoje é utilizada em tratamento de drogadição (Anderson et al., 2012). Da mesma forma, a psilocina e psilocibina, extraídas do cogumelo do gênero *Psilocybe,* também tem seus efeitos psicoativos estudados com intuito de serem aproveitados em terapia (Escobar & Roazzi, 2010).

Pesquisas científicas sobre as potencialidades farmacológicas de substâncias provenientes de plantas e classificadas como alucinógenas alia a intenção de identificar uma utilização terapêutica dessas substâncias à preocupação em estabelecer os limites de segurança do uso (Johnson et al., 2008).

A ayahuasca é um extrato vegetal alucinógeno incorporado pelo sincretismo religioso como bebida sacramental em rituais de comunidades da região amazônica que unem elementos indígenas e não-indígenas. Essa bebida é produzida pela cocção de plantas facilmente encontradas na América do Sul e sua utilização nesses rituais religiosos e xamânicos está associada a relatos de cura e propósitos terapêuticos. No Brasil a liberdade de culto e religião contribuiu decisivamente para resoluções favoráveis ao uso ritual da ayahuasca e desde 2008 existe pedido de incorporação do “uso da ayahuasca em rituais religiosos” como Patrimônio Imaterial da Cultura Brasileira (dos Santos, 2010).

Os relatos de cura e elevação espiritual que cercam o uso religioso da ayahuasca estimulam também o surgimento de formas mercantilizadas de xamanismo e uso recreacional. Os “novos xamãs ou pseudoxamas” aliam etno-turismo e turismo de aventura ao consumo de ayahuasca, e por vezes esse uso se

distancia do uso religioso tradicional (Davidov, 2010) que até então vem se mostrando seguro (McKenna, 2004).

A mercantilização do ritual promovida pelos “pseudoxamãs” é objeto de denúncia da mídia e casos de morte associada ao uso de ayahuasca começam a ser relatados. O uso abusivo vem se mostrando eminentemente perigoso principalmente quando associado a outras substâncias, ou outras plantas, como o toé (Hearn, 2013; Allen, 2014). O toé (*Brungmansia spp*) é uma planta com propriedades alucinógenas rica em alcalóides tóxicos (em especial escopolamina) (Mejía, 2008; Tupper, 2009).

O potencial toxicológico e terapêutico da ayahuasca precisa ser avaliado em estudos pré-clínicos em modelos animais (McKenna, 2004; Pires et al., 2010). Estudos recentes realizados por este grupo avaliou a toxicidade aguda da ayahuasca em ratos *Wistar*, bem como a possível ação antidepressiva desta infusão em doses agudas elevadas (30 e 50 vezes a dose ritual) (Motta, 2013). Adicionalmente, foi observado que não há alterações histológicas significativas de baço, fígado e rins em exposição aguda elevada (Morais, 2014). Em exposição crônica de dose moderada (4X e 8X), foi observada perda neuronal indicando que o uso continuado requer mais estudos a respeito de sua segurança (Morais, 2014).

Dando continuidade a esta linha de pesquisa, o estudo aqui apresentado visa avaliar a genotoxicidade, citotoxicidade e neurotoxicidade da ayahuasca administrada em dose única (1, 5 e 15X) a partir da avaliação da fragmentação do DNA, de testes bioquímicos e de estudos comportamentais.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Histórico e expansão de consumo da ayahuasca

A palavra “ayahuasca”, ou “hoasca”, que na língua do povo quéchua significa “cipó das almas” ou também “vinho das almas”, é o nome dado a uma cocção de ação psicoativa feita principalmente a partir de duas plantas, a *Banisteriopsis caapi* e o *Psychotria viridis*. Evidências arqueológicas na região da bacia amazônica remontam a um possível uso pré-histórico de substâncias alucinógenas, mas não é possível afirmar inequivocamente que se trata da ayahuasca (Naranjo, 1986; McKenna, 1998). Os colonizadores europeus foram os primeiros não-indígenas a ter contato com essa bebida (Liester & Prickett, 2012).

Na década de 30, a incorporação da ayahuasca a rituais sincréticos como bebida sagrada serviu como base para surgimento de novas comunidades religiosas, sendo então disseminada pelo Brasil. Esses movimentos religiosos incorporaram elementos do espiritismo africano, liturgia cristã e tradições indígenas em práticas que se expandiram nos grandes centros urbanos (Labate et al., 2010). No Brasil, três comunidades religiosas se destacam pelo uso e difusão da ayahuasca: o Santo Daime, a Barquinha e a União do Vegetal (UDV) (Cazenave, 1996; Costa et al., 2005; Martinez et al., 2009).

O Santo Daime é a mais antiga das religiões ayahuasqueiras brasileiras, fundada em 1930 no Acre. Seu fundador foi o seringueiro Raimundo Irineu Serra conhecido como Mestre Irineu. O Santo Daime consolidou os rituais de preparação da ayahuasca, associando-o a doutrinas espirituais e hinos cantados por membros da igreja durante a cerimônia (MacRae, 2004). Nessa comunidade a ayahuasca é conhecida como chá do Santo Daime. Mesmo após a morte do Mestre Irineu em 1971, o Santo Daime manteve vigorosa atividade sendo uma das responsáveis pelo fenômeno transnacional de consumo de ayahuasca pelo mundo. Nas tradições desta comunidade, a ayahuasca é considerada como sacramento, mas pode ser usado também como um tratamento para uma variedade de doenças. Os membros do Santo Daime podem inclusive fazer uso da ayahuasca durante a gravidez e parto,

bem como em fase terminal de doenças, sendo utilizado como parte dos cuidados paliativos (Tupper, 2009).

A Barquinha, surgida em 1945 no Acre, é uma vertente criada a partir da igreja Santo Daime, possuindo hoje várias comunidades estabelecidas no Brasil. Seu fundador, o ex-marinheiro Daniel Pereira de Matos, enfatizava o valor dos rituais da ayahuasca como instrumento de tratamento e cura para uma variedade de doenças (MacRae, 2004).

O Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (UDV) é a mais nova das religiões ayahuasqueiras, com o maior número de associados, e considerada a mais organizada institucionalmente (MacRae 2004). Fundada em 1961 por José Gabriel da Costa, em Rondônia, a UDV possui um caráter mais sóbrio, não sendo permitido a seus membros o uso de bebidas alcoólicas, tabaco e outras drogas (Costa et al., 2005; Pires et al., 2010). A UDV promove e incentiva ativamente pesquisas com ayahuasca. O Projeto Hoasca, por exemplo, envolveu esforços interdisciplinares com cientistas do Brasil, Estados Unidos e Finlândia para avaliar os efeitos dessa bebida na vida dos frequentadores da igreja e usuários de ayahuasca de longa data comparando-os com controles pareados de não usuários (MacRae, 2004; McKenna, 2004; Tupper, 2009).

Essas três entidades religiosas contribuíram para expansão do consumo da ayahuasca e hoje o uso da infusão atingiu um alcance mundial com representantes na América do Sul, América do Norte e Europa e Ásia (Halpern, 2004; Tupper, 2008; Martinez et al., 2009; Pires et al., 2010).

No Brasil, o uso ritualístico da ayahuasca está aprovado pelo Conselho Federal de Entorpecentes desde 1986 (Resolução nº 06/CONFEN, 04 Fevereiro 1986). Esta permissão foi reafirmada pela Resolução Nº 1 Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas (CONAD), de 25 de janeiro de 2010. Essa última resolução, não só legitima o uso religioso da ayahuasca, como proíbe sua comercialização, aborda a definição do que vem a ser seu possível uso terapêutico e reforça a necessidade de estudos científicos. Também propôs a elaboração de um Cadastro Nacional de Entidades usuárias da Ayahuasca (CNEA), de caráter facultativo. Até

2010, o CNEA contava com quase uma centena de entidades ayahuasqueiras cadastradas.

Apesar da Resolução nº 1 do CONAD vetar a comercialização da ayahuasca, o uso da bebida para fins de recreação é oferecido na internet em pacotes de turismo. Também se encontra facilmente produtos sintéticos (“farmauasca”) e similares (anahuasca) que prometem apresentar os mesmos efeitos alucinógenos (Ott, 1999; Dalgarno, 2008; Brierley & Davidson, 2012). Sites internacionais oferecem pacotes com “terapias ayahuasqueiras” e atraem jovens de outros continentes em busca de aventuras alucinógenas na floresta tropical: (http://www.ericadventures.com/portugues/machupicchu/retiros_ayahuasca_cusco_vale_sagrado.html;http://triadenossaumbanda.org/retiro-de-ayahuasca-e-umbanda-2015/).

2. Ayahuasca: extrato natural e composição química

Não há uniformidade nos rituais de preparo e uso da ayahuasca dentre as diversas comunidades ayahuasqueiras. O ponto comum no preparo é a cocção da *Banisteriopsis caapi* e da *Psychotria viridis* misturadas em quantidades estabelecidas pelo xamã durante cerimônia de preparo. A *B. caapi* é um cipó nativo da região Amazônica, conhecido como mariri, ou jagube. A *P. viridis* é uma planta arbustiva conhecida como chacrona, ou rainha.

2.1 *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae)

O mariri é um cipó pertencente à família Malpighiaceae, nativo da Amazônica e dos Andes, e disseminado por quase toda a América do Sul (Figura 1). Nesse cipó estão contidos os alcalóides β-carbolínicos harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetra-hidro-harmalina (THH) (Figura 3).



Figura 1. *Banisteriopsis caapi* conhecido como mariri. Fonte: <http://sitiodasaguias.blogspot.com.br/p/fotos.html>.

É possível encontrar esses alcalóides em outras plantas, como a *Passiflora spp*. (Passifloraceae), conhecida como maracujá (Gaujac et al., 2012). Os alcalóides β-carbolínicos agem como inibidores da enzima monoaminaoxidase (MAO), responsável pela degradação dos neurotransmissores noradrenalina, dopamina e serotonina; a inibição do subtipo MAO-A resulta em elevação dos níveis de serotonina. As β-carbolinas presentes na ayahuasca se encontram em concentração variável, entre 0,05% a 1,95% de peso seco (McKenna et al., 1984; McKenna, 2004).

Segundo Brito (2004), as quantidades de β-carbolinas presentes em uma dose usual de ayahuasca estão abaixo do limiar de sua atividade alucinógena, que são de 300 a 500 mg para HRL e THH e de 100 mg para HRM, e por outro lado, estão acima do limiar para atividade como inibidora da MAO (Brito, 2004; McKenna, 2004; Santos, 2007).

2.2 *Psychotria viridis* (Rubiaceae)

A família Rubiaceae abrange uma grande variedade de espécies vegetais (cerca de 1400 espécies de angiospermas) com as mais variadas formas e composições. O maracujá, o café e a chacrona são exemplos de representantes dessa família. A chacrona ou rainha, nomes populares dados à *Psychotria viridis* é uma planta arbustiva descrita inicialmente em 1779 por Ruíz & Pavón (Figura 2) (Queiroz, 2013).



Figura 2. *Psychotria viridis,* também conhecida como chacrona. Fonte: http://www.aguiadourada.com/2011/instrucoes.php

As folhas da chacrona usadas na preparação da ayahuasca possuem em sua composição a indolamina N, N-dimetiltriptamina (DMT) (Figura 3). Quando administrada por via subcutânea, intramuscular ou por inalação, o DMT produz rápidos efeitos alucinógenos. Entretanto, quando consumido por via oral, o DMT sofre degradação pela MAO intestinal e hepática (desaminação e inativação), não atingindo o sistema nervoso (Riba et al., 2003; dos Santos, 2011).

O DMT é um potente alucinógeno que apresenta similaridade estrutural com a serotonina (Figura 3). Essa similaridade estrutural resulta em alta afinidade com receptores serotoninérgicos, em especial o subtipo 5-HT2 (Smith et al., 1998). Em seu estado purificado, o DMT é substância de uso proscrito e classificada nos termos da Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971 (UN, 1971). Na ayahuasca, por ser um extrato vegetal a concentração de DMT pode variar de 0,1% a 0,66% de peso seco (McKenna et al., 1984; McKenna, 2004).

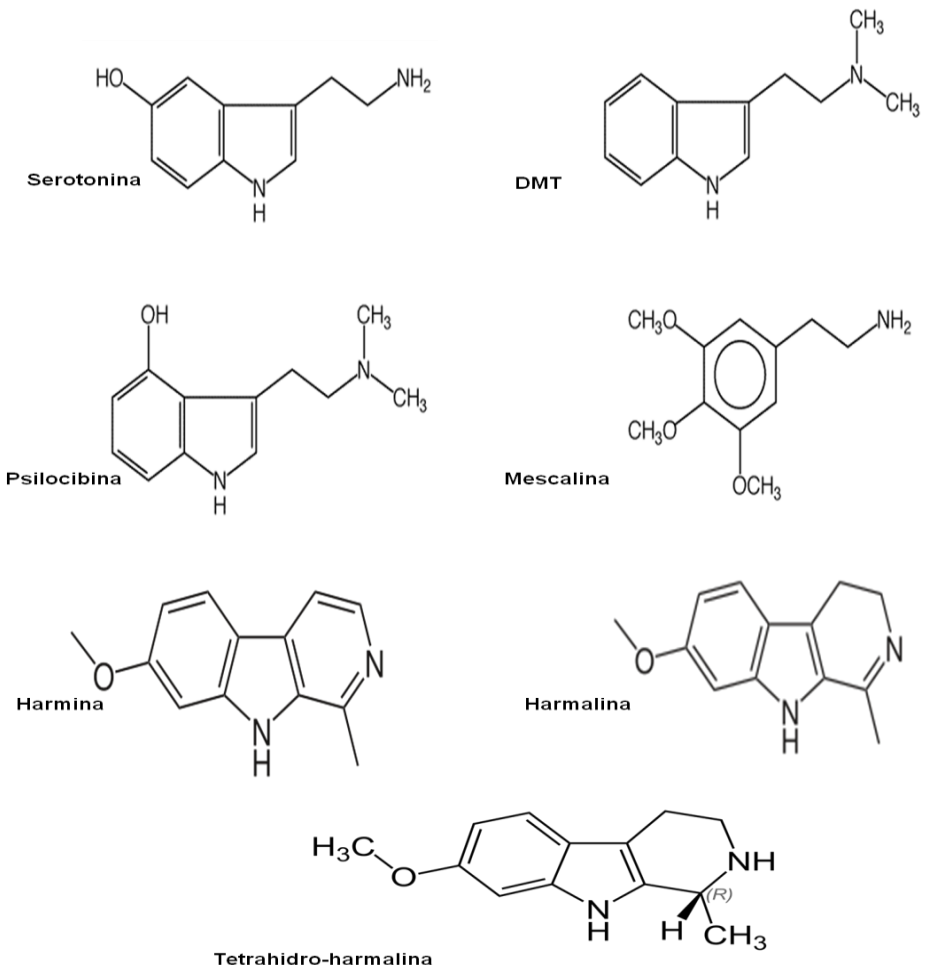


Figura 3. Estrutura química: serotonina (5-hidroxitriptamina), n, n dimetil-triptamina (DMT), psilocibina, mescalina, harmina, harmalina, tetra-hidro-harmalina.

3. Mecanismo de ação dos componentes da ayahuasca e seus efeitos

O efeito psicotrópico da ayahuasca ocorre principalmente devido à sua ação nos receptores serotoninérgicos e se dá graças à atividade sinérgica entre os principais constituintes encontrados na cocção: as β-carbolinas e o DMT. As β-carbolinas agem como inibidores da MAO, aumentando os níveis de serotonina nos terminais nervosos (Cazenave, 1996; McKenna et al., 1998; Oliveira et al., 2010), e têm efeito protetor sobre o DMT no trato gastrintestinal, possibilitando a chegada deste ao sistema nervoso central (SNC) e potencializando a estimulação serotoninérgica (Callaway et al., 1999).

A ativação serotoninérgica produz inúmeros efeitos relatados por usuários da ayahuasca incluindo náuseas, vômitos, diarreia, aumentos leves da pressão arterial e dos batimentos cardíacos, falta de coordenação motora, tremores, sudorese, agitação passageira, prostração e sonolência. Há também relatos de alterações comportamentais, labilidade emocional (variando de êxtase ao desespero), perda de contato com a realidade, alterações na percepção temporal e corporal; alucinações, sinestesias, “insights”, alterações na atenção, concentração, memória, julgamento e hiper-sugestionabilidade (Callaway & Grob, 1998). No contexto religioso, muitos desses efeitos adquirem um significado transcendental como, por exemplo, o vômito e a diarreia estão intimamente associados à purgação e limpeza do corpo e da alma (Anderson et al., 2012).

4. Serotonina, receptores serotoninérgicos e seu papel regulatório

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (Figura 3) é o principal neurotransmissor envolvido com o mecanismo de ação da ayahuasca. A serotonina (5-HT) é uma indolamina produzida a partir da hidroxilação e carboxilação do aminoácido essencial triptofano, obtido da dieta (Figura 4).

A serotonina pode ser encontrada em vários alimentos, incluindo queijos, carnes, frutas e legumes. Apesar de estar presente nesses alimentos, a serotonina não é facilmente acessível ao SNC, devido à existência de barreira hematoencefálica (BHE). No entanto, o triptofano, bem como a vitamina B6 (importante na síntese de 5-HT), atravessa a BHE para ser utilizado na síntese deste neurotransmissor (Friedman & Cuq, 1988; Hulsken et al., 2013; Shabbir et al., 2013). A disponibilidade de triptofano é fator limitante da velocidade na síntese. O triptofano é transportado do sangue para o cérebro por um sistema carreador, recolhido pelos terminais dos nervos serotoninérgicos e convertido pela triptofano-hidroxilase a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), um intermediário de vida curta. 5-HTP é então rapidamente convertido em 5-HT por ação da descarboxilase ácida L-aromático relativamente inespecífica (Owens & Nemeroff, 1994).

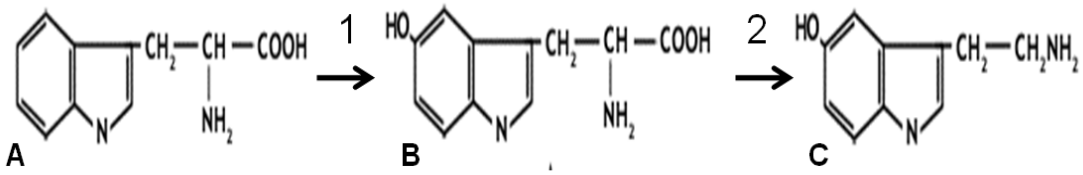


Figura 4. Síntese de serotonina a partir do aminoácido essencial triptofano. A – Triptofano, B – 5-hidroxitriptofano (5-HTP), C – 5-hidroxitriptamina (5-HT). 1- hidroxilase, 2- descarboxilase. Fonte: <http://www.orgone.com.br/a_thumor1.html >

A 5-HT exerce efeito modulador geral da atividade psíquica, influenciando quase todas as funções cerebrais, incluindo regulação do sono, humor, atividade sexual, apetite, ritmo circadiano, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e cognição (Hulsken et al., 2013; Shabbir et al., 2013). A serotonina possui uma superfamília de receptores serotoninérgicos que acrescenta complexidade considerável à compreensão da neurotransmissão serotoninérgica.

Os receptores serotoninérgicos estão divididos em sete tipos e quatorze subtipos distribuídos pelo organismo com funções e localizações específicas (5-HT1A-F, 5-HT2A-C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5A-B 5-HT6, e 5-HT7) (Hoyer et al., 1994; Fantegrossi et al., 2008). Dentre esses, acredita-se que os receptores 5HT-2A e 5HT-1A estão envolvidos com a ação central da ayahuasca (McKenna et al., 1990; Carlini, 2003; Fantegrossi et al., 2008).

5. Toxicidade da ayahuasca

5.1 Toxicidade aguda

A ayahuasca enfrenta o estigma de ser classificada como um entorpecente (Anderson et al., 2012). Porém, o uso continuado da ayahuasca não mostrou efeitos psicossociais deletérios observados em outras drogas, sendo seu potencial como droga de abuso considerado baixo (Gable, 2007; Fábregas et al., 2010; Thomas et al., 2013). O baixo risco de letalidade da ayahuasca em doses rituais é confirmado em estudos com roedores (Callaway et al., 1999; Anderson et al., 2012). Estima-se, a partir de uma extrapolação de dados obtidos com camundongos, que a dose letal de ayahuasca em humanos seja pelo menos 20 vezes a dose ritual (Gable, 2007).

Em estudo realizado por este grupo visando classificar a toxicidade oral, foi determinado que a DL50 da ayahuasca em ratas é superior a 50X a dose ritual adotada na União do Vegetal (Motta, 2013; Pic-Taylor et al., 2014).

Embora haja apenas o registro de um único e controverso caso de intoxicação fatal por suposta ingestão unicamente de ayahuasca (Sklerov et al., 2005), e que esse registro tenha sido contestado (Callaway et al., 2006), acredita-se que a exacerbação dos efeitos por um consumo inadequado pode levar a um quadro clínico potencialmente fatal conhecido como síndrome serotoninérgica (Pires et al., 2010). Esse quadro estaria ligado à associação indevida com outras drogas, em especial antidepressivos da classe de inibidores da recaptação de serotonina (Callaway & Grob, 1998). Não existem relatos de óbitos entre os usuários dessa infusão no contexto ritualístico (Costa et al., 2005; Gable, 2007).

Estudo conduzido por Brito et al. (1994) concluiu que uma dose de 500 mg/kg pc de chá de ayahuasca administrado em ratos não produz dano neurológico e que os efeitos observados nos animais foram similares aqueles produzidos por drogas que elevam os níveis de serotonina no sistema nervoso central (Brito, 1994; Figueroa, 2012).

Em Pic-Taylor et al. (2014), análise imunohistoquímica pela marcação do proto-oncogenec-fos em regiões cerebrais ricas em receptores de serotonina mostrou forte ativação neural específica nas áreas do núcleo da Rafe, amídala e hipocampo em animais tratados com uma única dose correspondente a 30 X a dose ritual. Entretanto a utilização da coloração de Nissl para quantificação da densidade neuronal (número de neurônios/μm^2), não mostrou morte neural que resultasse em lesões definitivas nestas regiões (Motta, 2013; Pic-Taylor et al., 2014).

5.2 Toxicidade Crônica

Estudo de neurotoxicidade conduzido por Figueroa (2012) com ratos *Wistar* machos tratados oralmente com chá de ayahuasca durante três semanas com dose ritual diluída (50% a dose usual) revelou aumento significativo nos valores de ureia urinária, podendo ser um indicativo de dano renal nos animais tratados. O autor

observou também em cortes histológicos de cérebro da região hipocampal uma diferença significativa de células apoptóticas por ensaio TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), quando comparado com controle, sugerindo apoptose neural; porém estes dados não foram confirmados pela imunoreatividade da Caspase 3 (Figueroa, 2012). O autor sugere que essa alteração pode representar indício de dano renal nos ratos tratados com ayahuasca. Esse possível dano renal, bem como a desidratação, ou estresse dos animais poderiam iniciar um processo apoptótico.

Morais (2014), em estudo com ratas *Wistar* prenhes, observou óbitos em animais tratados cronicamente com doses equivalentes a 4X e 8X a dose ritual. Verificou-se também alterações histológicas estatisticamente significativas nos rins dos animais desses grupos, apesar destas alterações serem leves e reversíveis. No mesmo estudo, utilizando coloração de Nissl, observou-se perda neuronal em áreas do hipocampo e núcleos da rafe em animais tratados do grupo 2, 4 e 8X. Em animais tratados com doses 1X esses achados não foram encontrados (Morais, 2014).

5.3 Toxicidade reprodutiva

A toxicidade materna, embriotoxicidade e os efeitos neurotóxicos da infusão durante a gestação e lactação foi estudada por Oliveira et al (2010) em ratos *Wistar* expostos cronicamente a ayahuasca. As concentrações de alcalóides encontrados na ayahuasca estudada foram 0.42 mg/mL de DMT; 1.37mg/mL de harmina; 0,62 mg/mL de harmalina e 0.35mg/mL de tetrahidroharmalina. Nesse estudo adotou-se a dose ritual (DR) com sendo 100 ml de ayahuasca consumida por um indivíduo adulto de 70 kg e foram utilizadas três diferentes doses (DR, 5DR e 10DR). Este estudo mostrou uma redução inicial no consumo de alimentos e peso corporal das ratas prenhas do grupo de maior dose, mas essa alteração foi revertida ao longo dos 15 dias de tratamento. A redução de peso está diretamente ligada ao risco de toxicidade materna e consequentemente à embriotoxicidade e embrioletalidade (Oliveira et al., 2010).

Estudo recente realizado por Motta (2013) mostrou que a administração de ayahuasca durante quinze dias em ratas *Wistar* prenhes, em doses 4X e 8X a dose ritual (150 mL/70 kg no homem) apresentou toxicidade materna com óbitos de animais, potencial efeito embriofetotóxico, além de embrioletalidade. Foram também relatadas malformações viscerais e esqueléticas nos fetos das maiores doses de tratamento, indicando que o tratamento com ayahuasca induz a toxicidade fetal.

5.4 Genotoxicidade

Macromoléculas biológicas como o DNA estão sujeitas a agressões por agentes endógenos e exógenos. Estima-se que no corpo humano ocorra diariamente cerca de 2×10^4 eventos danosos ao DNA (Barzilai & Yamamoto 2004). Essas agressões podem ocorrer por estresse oxidativo, pelo próprio processo natural de envelhecimento bem como pela interação com xenobióticos. Essas interações podem resultar em oxidação das bases nitrogenadas, quebras de fita dupla e fita simples (Slupphaug et al., 2003).

Dentre essas possíveis causas de danos ao DNA, o estresse oxidativo é um dos mais importantes. Esse estresse resulta da incapacidade dos mecanismos de reparo frente às alterações na oferta de oxigênio, que é essencial na produção de energia para realização de vários processos celulares. O desequilíbrio entre a oferta de O_2 (hiperóxia e hipóxia) pode oferecer riscos ao DNA e desencadear mecanismos intrínsecos de reparo (Zhou & Elledge, 2000), levando a instabilidade genômica e citotoxicidade, ou iniciando processo carcinogênico (Finkel & Holbrook, 2000; Norbury & Hickson, 2001; Barzilai & Yamamoto, 2004).

Resultados contraditórios em estudos de genotoxicidade com β-carbolinas presentes na ayahuasca foram encontrados em testes realizados em linhagens celulares *in vitro* e *in vivo* (Schenberg, 2013). Até o presente momento não existem dados publicados sobre a genotoxicidade da ayahuasca sobre as células da medula óssea e sangue. Estudos de genotoxicidade com o DMT isolado são inexistentes, possivelmente devido ao fato de ser uma substancia proscrita. Entretanto, a molécula de DMT possui em sua estrutura molecular o radical N di-alquil, que está

ligado a efeitos genotóxicos em uma série de fármacos conhecidos (Snyder, 2010). Acredita-se que esse radical é capaz de se ligar de forma não covalente ao DNA, intercalando-se a ele conferindo aos compostos em que está presente uma ação genotóxica (Snyder, 2010).

No estudo realizado por Figueroa (2012) descrito anteriormente, a fragmentação de DNA neuronal foi avaliada em ratos *Wistar* machos tratados com ayahuasca utilizando técnica de imunohistoquímica. Nesse experimento foram encontrados resultados que indicam tendência a apoptose neuronal em grupo tratado com chá ayahuasca.

5.5 Potencial terapêutico da ayahuasca

O uso terapêutico da ayahuasca é definido pelo CONAD (Resolução nº1, 2010) como o "uso por profissional habilitado baseado em evidências científicas para promover a saúde e fora do contexto ritualístico". Evidências científicas que asseguram o uso terapêutico da ayahuasca fora do contexto religioso ainda são limitadas, apesar de haver evidências empíricas favoráveis.

A serotonina esta intimamente implicada no mecanismo de ação da ayahuasca. A conjugação de vários possíveis efeitos mediados pela serotonina e, portanto implicados com o mecanismo de ação da ayahuasca faz com que essa bebida possa ser considerada útil no tratamento em uma diversidade de transtornos, tais como transtorno depressivo maior e doença de Parkinson (Liester & Prickett 2012).

Os alcalóides β-carbolínicos presentes na ayahuasca são inibidores da MAO (IMAO), uma classe de fármacos tradicionalmente utilizados pela medicina (Hindmarch, 2002; Krishnan & Nestler, 2008). Entre os IMAO destacamos a selegelina e a moclobemida. A selegelina também conhecida como L-deprenil é inibidor da MAO tipo B e é usada no tratamento de alguns tipos de depressão e no tratamento da doença de Parkinson (Birkmayer et al., 1977; Mendlewicz & Youdim, 1983). A moclobemida é um inibidor seletivo da MAO A, reversível e apresenta menos efeitos colaterais do que outros fármacos antidepressivos. A moclobemida

também é utilizada no tratamento do tabagismo (Berlin et al., 1995; Bonnet, 2003). O DMT, por sua vez, produz efeitos transitórios de curta duração e provoca neuroestimulação serotoninérgica. Dessa forma, condições patológicas como ansiedade, depressão, enxaqueca podem se beneficiar do uso da ayahuasca (Costa et al., 2005).

Um paralelo em relação ao uso terapêutico de alucinógeno com ação similar a ativação serotoninérgica produzida pela ayahuasca é o caso do uso terapêutico do peiote, um cacto usado milenarmente por tribos indígenas nos EUA e México que contém a mescalina, um alucinógeno estruturalmente similar à serotonina (Figura 3). As cerimônias de uso do peiote no tratamento de dependentes químicos se mostraram eficazes (Anderson et al., 2012). O uso da ayahuasca no tratamento da dependência química tem se mostrado promissor, principalmente em relação ao consumo de álcool e cocaína. Thomas et al. (2013) mostraram que o grupo que recebeu terapia assistida com ayahuasca reduziu significativamente o consumo de cocaína.

Estudo realizado por Samoylenko et al. (2010) com extrato do caule da *B. caapi* contendo inibidores de MAO e substâncias antioxidantes mostrou efeito neuroprotetor desse extrato, com potencial valor terapêutico no tratamento da doença de Parkinson e outras desordens neurodegenerativas.

Apesar de não haver dados suficientes que indiquem ação antitumoral da ayahuasca (Schenberg, 2013), estudos demonstram que as β-carbolinas inibem a angiogênese em tumores (Hamsa & Kuttan, 2010). Postula-se também um possível mecanismo de ação do DMT sobre o receptor intracelular Sigma I presente nas membranas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias. Os receptores Sigma I regulam canais de cálcio e o influxo de cálcio está implicado com modulação do ciclo celular e indução de apoptose (Schenberg, 2013). Portanto, a afinidade do DMT por esses receptores Sigma I pode ajudar a entender os relatos de melhora em estudos de caso de câncer associados ao uso de ayahuasca (Schenberg, 2013). Os efeitos específicos da ayahuasca nos diferentes tipos de câncer pode também variar dependendo do subtipo predominante da MAO. Sendo assim, além da inibir a MAO em diferentes tecidos permitindo a ação sinérgica β-carbolinas e DMT sobre o

sistema serotoninérgico a inibição da MAO pode também interferir em vias apoptóticas e ter ação antitumoral. É possível também que a experiência psicodélica por si ajude no alívio de sintomas psicológicos como ansiedade e depressão, e isto resulte então em melhora na qualidade de vida do paciente com câncer (Schenberg, 2013).

As principais limitações dos estudos das propriedades terapêuticas da ayahuasca no contexto ritualístico e religioso são: estudos de casos isolados, e principalmente amostras pequenas, não representativas da população, composta por frequentadores voluntários das comunidades religiosas além do negligenciamento de efeitos indesejáveis em longo prazo (McKenna, 2004). Por exemplo, uma revisão bibliográfica realizada por Schenberg (2013) utilizando revistas e jornais científicos indexados na base de dados Pubmed resultou em apenas 9 relatos publicados de uso de ayahuasca em tratamento de câncer. O Projeto Hoasca, realizado com usuários regulares há pelo menos 10 anos, e que mostrou a manutenção do funcionamento neurocognitivo normal, envolveu apenas 15 indivíduos (Callaway et al., 1999; Anderson et al., 2012).

Estudos pré-clínicos em modelos biológicos animais, com grupos controles, e número de amostra estatisticamente viável são necessários para minimizar fatores de confundimento presentes no uso ritualístico.

6. Bioensaios de genotoxicidade

Segundo Brambila (2009) a avaliação de risco/benefício de produtos de uso contínuo como antidepressivos e antipsicóticos não pode negligenciar possíveis efeitos adversos como a genotoxicidade e mutagenecidade. Para acessar os efeitos genotóxicos de inúmeros compostos, os testes do cometa e do micronúcleo estão bem estabelecidos e indicam a extensão e gravidade da interação dos compostos estudados com DNA (Wong et al., 2005). Recomendações atuais de agências reguladoras indicam o estudo de potencial genotóxico e mutagênico como bateria inicial de testes para possíveis fármacos. Dentre essa bateria de testes são

recomendados testes *in vitro* com células de mamíferos bem como testes *in vivo* em células hematopoiéticas de roedores.

6.1 Fragmentação de DNA por análise visual no Ensaio Cometa

O ensaio cometa (EC), também conhecido como *single cell gel electrophresis assay*, é um teste de genotoxicidade empregado internacionalmente. Idealizado por Ostling & Johanson (1984), este método foi adaptado para meio alcalino, aumentando sua sensibilidade (Singh et al., 1988). O pH elevado facilita a desnaturação e o desempacotamento do DNA, assim como expõe as quebras decorrentes de lesões em sítios alcali-lábeis (Fairbairn et al., 1995).

O método é baseado na migração da molécula de DNA e seus fragmentos em gel de agarose submetido a uma corrente eletroforética. Esses fragmentos podem ser resultantes tanto da ação genotóxica direta ou indireta do agente teste. A molécula de DNA e seus fragmentos apresentam cargas negativas e migram no campo elétrico em direção ao ânodo (Collins et al. 1995, Collins, 2004; Olive & Banáth, 2006).

Nesse ensaio, células individualizadas são imobilizadas em suporte sólido neste caso o gel de agarose. Essas células são rompidas e após a remoção das membranas celulares, citoplasma, organelas membranosas, restará apenas uma matriz nuclear composta de ácidos nucléicos e poucas histonas. Essa estrutura residual, com aspecto semelhante a um núcleo é conhecida por nucleóide (Figura 5) (Collins, 2004). O DNA presente em cada nucleóide ao ser submetido a tratamento em meio alcalino sofre desnovelamento, e em campo elétrico os fragmentos se organizam de acordo com seu tamanho, tendo em vista que todos são carregados negativamente. Quando observados no microscópio de fluorescência, esses nucleóides apresentam formato semelhante a um cometa. Sendo que a cabeça corresponde ao DNA integro enquanto a cauda é formada de seus fragmentos. O deslocamento dos fragmentos no gel de agarose será inversamente proporcional ao seu peso, e quanto maior a cauda do cometa maior foi o deslocamento e, portanto, maior foi a fragmentação da molécula de DNA (Tice et al., 2000; Olive & Banáth, 2006).

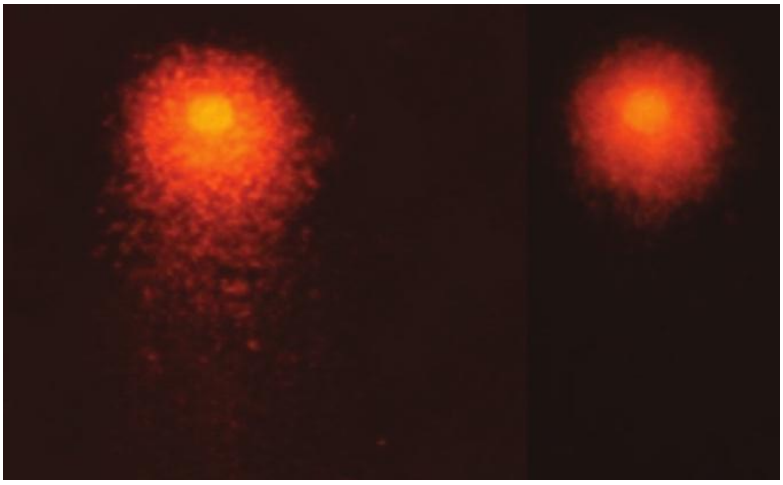


Figura 5. Nucleóides ao microscópio de fluorescência (100x). Coloração com brometo de etídio. Nucleóide a direita apresenta DNA integro, e o nucleóide a esquerda apresenta dano no DNA, com fragmentos evidentes formando uma cauda.

6.2 Fragmentação de DNA por analise em citometria de fluxo

A citometria de fluxo é apresentada como alternativa a análise visual da fragmentação de DNA, permitindo uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão submetidas em um fluxo laminar (Faldyna et al,. 2001). As células da amostra em suspensão são marcadas com um agente fluorescente específico, permitindo sua identificação e quantificação pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência.

No citômetro de fluxo, um laser diodo azul (488 nm) incide sobre uma suspensão de células numa câmera de fluxo laminar. A luz que incide sobre as células é captada por detectores selecionados com base nos parâmetros morfológicos e fluorescentes que se deseja discriminar. A Tabela 1 traz os principais tipos de detectores-padrão (canais) e os parâmetros morfológicos associados.

Tabela 1 - Parâmetros analisados em Citometria de fluxo

Canal	Parâmetro Analisado	Emissão de Luz
FL1	Comprimento de onda 530nm	verde
FL2	Comprimento de onda 570 a 620 nm	laranja
FL3	Comprimento de onda 650nm	vermelha
Forwardscatter (FSC)	Tamanho – 488nm	Dispersão frontal da luz azul
Sidescatter (SSC)	Granulosidade – 488nm	Dispersão lateral da luz azul

O iodeto de propídeo é um agente fluorescente inespecífico de ácido nucléico e emite luz alaranjada quando excitado com o laser diodo azul (488 nm). A análise da fluorescência relativa no comprimento de onda de 580 a 620nm permite quantificar a fragmentação do DNA das células em suspensão.

6.3 Teste do Micronúcleo *in vivo*

Os micronúcleos descritos originalmente em eritrócitos, também conhecidos por corpúsculos de Howell-Jolly, são utilizados como marcadores de dano citogenético (Schmid, 1975), ou seja, dano na estrutura do cromossomo ou no fuso mitótico. Esses micronúcleos podem resultar de fragmentos cromossômicos acêntricos, fragmentos cêntricos da cromátide ou cromossomos inteiros que não se ligaram ao fuso mitótico durante o processo de segregação na anáfase, ficando separado do núcleo principal na célula-filha (Krishna & Hayashi, 2000; Fenech et al., 2011). O teste do micronúcleo *in vivo* está relacionado ao processo contínuo de eritropoiese (Figura 6).

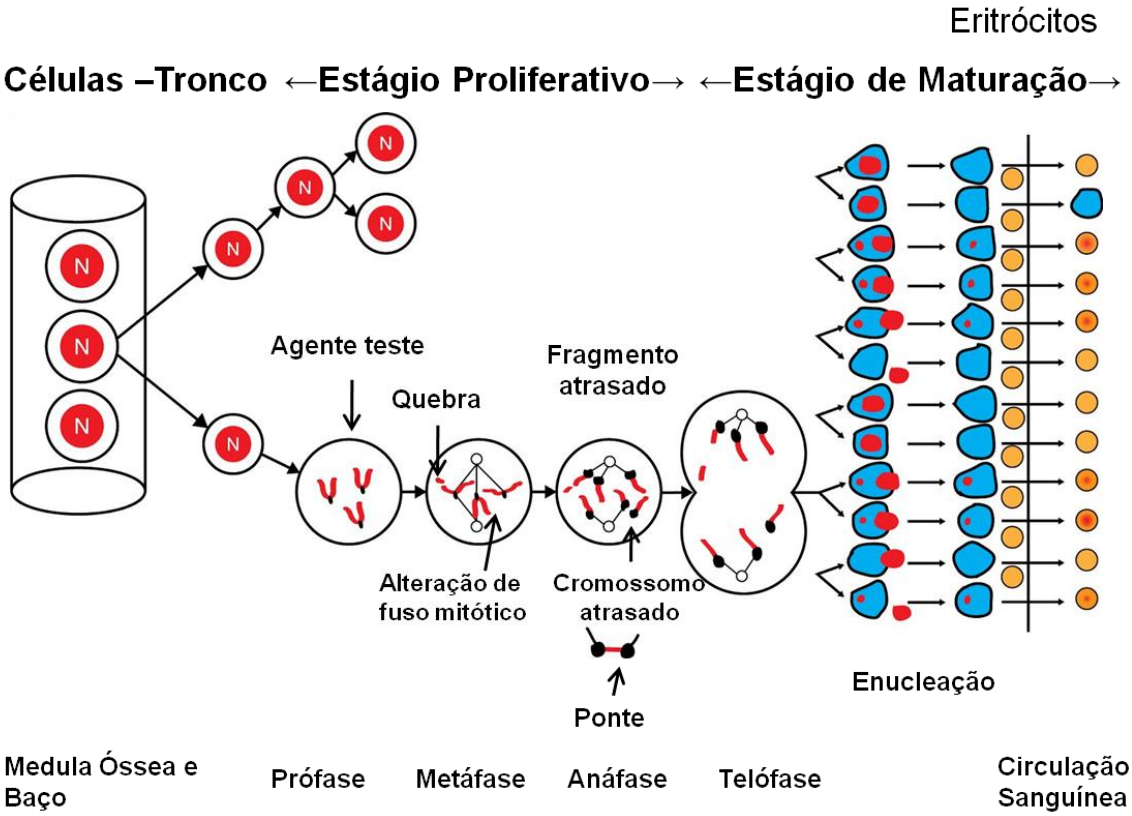


Figura 6. Processo de eritropoiese *in vivo* e mecanismos de formação de micronúcleos. Adaptado de Krishna & Hayashi (2000).

Em roedores adultos, a medula óssea e o baço são órgãos hematopoiéticos, onde estão presentes células-tronco responsáveis por iniciar os estágios de proliferação e maturação celular (Krishna & Hayashi, 2000). Se durante o estágio de proliferação, as células são submetidas ao agente tóxico, podem ocorrer danos nos cromossomas, como quebras e trocas, mas também alterações em proteínas relacionadas com a disjunção das cromátides, como a tubulina, causando disfunção do fuso mitótico (ter Haar et al., 1996; Krishna & Hayashi, 2000).

Essas alterações cromossômicas se atrasam durante a divisão celular e não se integram ao núcleo das células-filha, formando os micronúcleos, que são visíveis no citoplasma. Esses cromossomos, ou fragmentos de cromossomos não agregados ao núcleo principal, apresentam as mesmas características morfológicas do núcleo principal, mas em tamanho reduzido. São arredondados, possuem cromatina revestida por membrana nuclear, apresentam-se deslocados do centro e com mesma coloração do núcleo principal (Jagetia & Reddy, 2002)(Figura 07).

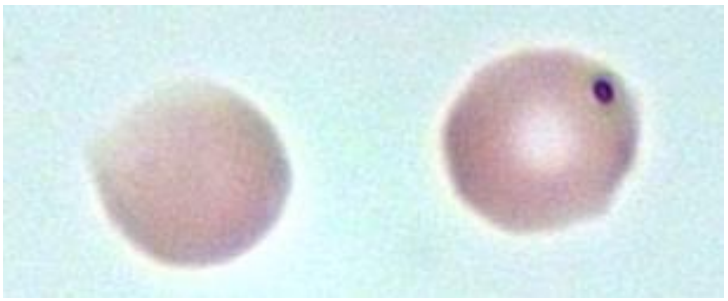


Figura 7. Eritrócitos de rato *Wistar*. À direita eritrócito policromático micronucleado e a esquerda eritrócito policromático normal. Imagem capturada em microscopia de luz, aumento 100X.

A citotoxicidade da substância teste sobre o tecido eritropoiético é um aspecto adicional importante que pode ser aferido durante o teste do micronúcleo. Normalmente, a medula óssea apresenta maior proporção de eritrócitos jovens (eritrócito policromático, EPC) em relação aos eritrócitos maduros (eritrócito normocromático, ENC). Entretanto, em condições hipoplásicas ou hiperplásicas, essa proporção pode estar alterada, uma indicação de citotoxicidade sobre as células da medula óssea (Criswell et al., 1998). À medida que sofre perda do RNA residual e aumenta a concentração de hemoglobina no citoplasma, é possível diferenciar estágios de maturação do eritrócito por diferença na coloração (Krishna & Hayashi, 2000). O EPC apresenta citoplasma basófilo e se cora mais intensamente com Giemsa (arroxeado), enquanto o ENC tem citoplasma acidófilo e apresenta coloração pálida, transparente e rosa (Krishna & Hayashi, 2000).

A realização de ensaio *in vivo* em medula óssea de roedores para avaliar danos cromossômicos é recomendada para produtos farmacêuticos (Brambilla et al., 2009) podendo ser utilizado como modelo rato ou camundongo. A utilização de sangue periférico é possível em camundongos, mas não em ratos, uma vez que em ratos, assim como no ser humano, o baço sequestra eritrócitos micronucleados da circulação sanguínea. Embora seja preferível a utilização de camundongos para realização deste teste, existe alta concordância de resultados entre os modelos (cerca de 88%) (Wakata et al., 1998).

7. Avaliação Comportamental

A complexidade do sistema nervoso se revela na diversidade de estruturas com configurações estruturais e funcionais diferentes, bem como nas diversas possibilidades de mediação química (neurotransmissores) e sinapses (inibitória ou excitatória). Sendo assim, o sistema nervoso está vulnerável à ação de xenobióticos, que podem atuar em vários sítios (Moser, 2011).

Alterações histopatológicas do sistema nervoso foram por muito tempo consideradas o "padrão ouro" em estudos de neurotoxicologia, mas hoje acredita-se que a avaliação das alterações funcional e histopatológica são complementares. Uma forma de aferição da função do sistema nervoso é pela avaliação do comportamento, que é o resultado da integração do sistema nervoso nos seus vários níveis de organização (molecular, celular, tecidual). Efeitos comportamentais podem ser reflexos de mudanças na comunicação das células nervosas e representam a integração e integridade do sistema nervoso, sendo, portanto indicador sensível da função neuronal (Moser, 2011).

Vários testes para avaliar o efeito de substâncias psicoativas no comportamento de animais de experimentação foram desenvolvidos. Existe uma concordância entre autores que nenhum dos testes que avaliam a ansiedade e depressão fornecem uma medida indiscutível da reatividade emocional animal. Conceitos como depressão e ansiedade possuem uma natureza humana altamente subjetiva e cada teste individual avalia apenas uma fração do perfil emocional de um animal (Ramos, 2008; Ramos et al., 2008; Steimer, 2011). Por exemplo, no teste de natação forçada é possível avaliar enfrentamento de estresse alterado pela substância teste, mas não avaliar ideação suicida, ambas as características também presentes na depressão maior (Slattery & Cryan, 2012). Portanto, para uma avaliação sistemática dos efeitos de substâncias psicoativas sobre o sistema nervoso é recomendado o uso de diferentes testes comportamentais.

O teste de Campo Aberto (TCA) é amplamente utilizado como parâmetro de atividade locomotora e de ansiedade animal, esse descrito como um estado comportamental induzido por uma ameaça ao bem-estar ou sobrevivência real ou

potencial (Steimer, 2011). A ansiedade pode ser caracterizada pelo aumento da excitação, expectativa, ativação autonômica e neuroendócrina e padrões específicos de comportamentos. Hall (1934) foi o primeiro a descrever o TCA para estudos de emotividade em ratos.

O efeito ansiolítico é caracterizado por aumento na deambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central. Na arena do campo aberto, a ansiedade é desencadeada por dois fatores, o isolamento (o teste é realizado individualmente, sendo o animal separado do seu grupo) e a agorafobia (a arena é grande em relação ao animal). Esses fatores geram estresse e influenciam diretamente no comportamento desses animais, visto que, eles vivem em pequenos grupos e em túneis (Prut & Belzung, 2003). Portanto, tratamento com ansiolíticos não aumentam a exploração do campo, mas diminui o estresse induzido no comportamento de exploração. O teste em campo aberto foi eficaz na predição de efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos e de agonistas do receptor 5-HT 1A, mas não foi sensível à ação ansiolítica de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, indicando que esse modelo não se aplica a todo tipo de ansiolíticos (Prut & Belzung 2003).

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) também é largamente utilizado como modelo de ansiedade animal e nos permite também avaliar mobilidade. Este teste se baseia em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos, onde o animal é confrontado pelo impulso de explorar ambientes novos e desconhecidos e a tendência em evitar áreas potencialmente perigosas. Montgomery (1958) foi o primeiro a comprovar esse fato em testes com labirinto em Y, em que conseguiu mostrar que os animais saudáveis preferiam permanecer nos braços fechados (Montgomery, 1955). Os estudos iniciais com o LCE envolveram investigação de uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos (Handley & Mithani, 1984).

O teste de Natação Forçado em roedores foi descrito inicialmente por Porsolt et al. (1978), e também é conhecido como *behavioral despair test*. Este teste tem valor preditivo para ação antidepressiva de fármacos e consiste na observação da imobilidade ou do comportamento ativo do rato.O potencial antidepressivo da droga

é caracterizado pelo aumento da mobilidade. A imobilidade observada em animais controle ou expostos a substâncias sem atividade antidepressiva pode ser vista como meio de conservar energia, falha na persistência em escapar e desespero comportamental (Cryan et al., 2002; Petit-Demouliere et al., 2005; Castagné et al., 2009).

Alguns autores modificaram o protocolo de Porsolt, analisando o comportamento do animal em períodos de 5 segundos ao longo de 5 minutos de duração do teste distinguindo os comportamentos de natação, imobilidade e *climbing* (Cryan et al., 2002; Slattery & Cryan 2012). Outra modificação do protocolo de Polsolt consiste na eliminação de uma fase pré-teste (treinamento) realizado 24 horas antes da sessão teste. Nesse protocolo, consideram-se os dois minutos iniciais do teste como período de acomodação e avaliam-se os três últimos minutos em sessão única (Lucena et al., 2010; Taiwo et al., 2012). O consenso entre os protocolos é que animais tratados com substâncias com potencial antidepressivo nadam por mais tempo e persistem na tentativa de fuga (*climbing*).

Em estudos comportamentais realizados por Motta (2013) com ratas *wistar* tratados com doses únicas aguda de 30 e 50X a dose ritual observou diminuição da locomoção e diminuição do interesse exploratório em testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada. No teste de natação forçada, observou-se aumento do tempo de nado e redução do tempo de imobilidade indicando comportamento preditivo de ação antidepressiva.

8. Avaliação hematológica (eritrograma, leucograma, plaquetograma e bioquímica sérica)

A análise hematotoxicológica e a análise de indicadores bioquímicos séricos permitem uma aferição sistêmica da interferência de um xenobiótico testado nas funções fisiológicas do organismo modelo (Bloom & Brandt, 2012).

O leucograma, ou estudo da série branca, inclui a contagem total e diferencial de leucócitos. Esses dados nos permitem avaliar a condição geral de saúde do

organismo bem como do sistema imunológico, ausência de infecções, reações alérgicas e resposta a fármacos. No eritrograma são calculados os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), e a variação do tamanho das células vermelhas (RDW). A informação obtida a partir do eritrograma nos permite verificar alterações como anemia e citotoxicidade sobre o tecido hematopoiético eritróide. A citotoxicidade pode se revelar alterações de número e volume do eritrócito e na concentração de hemoglobina. O plaquetograma inclui, além da contagem total de plaquetas, a variação de tamanho das plaquetas e a contribuição desses tamanhos na constituição (distribuição), sendo que plaquetas gigantes são frutos de uma acelerada produção pela exposição a algum agente estressante (Failace, 2009; Bloom & Brandt, 2012).

III. OBJETIVOS:

Objetivo Geral:

Determinar os possíveis efeitos genotóxicos, citotóxicos, hematológicos, bioquímicos e neurocomportamentais da ayahuasca em ratos *Wistar* após exposição aguda em três diferentes concentrações

Objetivos Específicos:

a) Investigar os possíveis efeitos genotóxico da ayahuasca em células da medula óssea de ratos *Wistar* pelo teste do micronúcleo e em citometria de fluxo;

b) Observar os possíveis danos da ayahuasca ao DNA em células sanguíneas de ratos *Wistar* pelo ensaio cometa;

c) Avaliar efeitos neurocomportamentais da ayahuasca em ratos *Wistar* utilizando os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e natação forçada;

d) Identificar as possíveis alterações hematológicas agudas em séries eritrocíticas, leucocíticas e plaquetárias em ratos;

e) Avaliar as funções hepática, renal, pancreática e o metabolismo energético através de análise bioquímica sérica.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 50 ratos (*Rattus novergicus*) albinos da linhagem *Wistar*, saudáveis, de ambos os sexos (25 de cada), com idade de 9 a 12 semanas, provenientes da Granja RG, São Paulo.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com grade zincada e mantidos em estante refrigerada da Alesco®, localizada no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB a temperatura de 23± 2°C. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12h/12h. As instalações, condições ambientais, manejo e cuidados com os animais seguiram os padrões recomendados pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e em conformidade com as leis aplicáveis ao bem-estar animal de uso e cuidado de animais de laboratório (Lei Federal Brasileira Nº 6.638 de 08 de Maio de 1979). O experimento foi realizado após aprovação do projeto pelo Comitê de Éética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBDoc número 38469/2012 (Anexo A).

Antes da realização do experimento os animais passaram por um período de aclimatação de 15 dias. Na semana anterior ao teste os animais foram manipulados diariamente, conforme recomendação para minimizar a possível ocorrência de estresse induzido pelos procedimentos de tratamento a serem iniciados (injeções e gavagem) (Slattery & Cryan, 2012). Os animais receberam ração comercial para roedores Purina® e água filtrada *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais foram pesados em balança calibrada da Marca Marte, modelo AS5500C, com função específica para pesar animais vivos.

2. Ayahuasca, aquisição e caracterização

A ayahuasca necessária para a realização desse experimento foi cedida pela UDV com sede em Brasília e preparada durante ritual único. A infusão recebida foi congelada e liofilizada. O pó resultante foi armazenado em congelador até o

momento da exposição. 100 ml da infusão produziram 0,1615g de pó liofilizado correspondendo a 16% de matéria(w/v). A quantificação dos constituintes principais da infusão utilizada foi realizada em estudo prévio do mesmo grupo e encontrou os seguintes valores: 1.56 mg/mL de harmina, 0.122 mg/mL de harmalina e 0.141 mg/mL de DMT (Motta, 2013).

3. Delineamento experimental

No delineamento deste experimento utilizamos as recomendações do Protocolo 474 da OECD, para realização do teste de micronúcleo *in vivo* (OECD, 1997). Esse protocolo recomenda a utilização de um número mínimo de cinco animais por grupo, que também atende as recomendações atuais para a realização do Ensaio cometa (EC). Por se tratar de um estudo inédito a respeito da genotoxicidade da ayahuasca e não haver dados conhecidos a respeito da diferença de genotoxicidade entre machos e fêmeas, ambos os sexos foram empregados conforme recomendação do referido protocolo.

Os animais foram aleatoriamente alocados em cinco grupos, com 5 indivíduos de cada sexo: Grupo Controle Negativo (GC-), que recebeu água filtrada, Grupo Controle Positivo, que recebeu cloridrato de doxorrubicina (Dox) e três grupos tratados com diferentes doses de ayahuasca proporcionais a dose ritual da UDV, que corresponde a 150 ml de ayahuasca consumida por um indivíduo adulto de 70 kg (1X). Cada caixa de polipropileno acomodou no máximo três animais do mesmo grupo.

O tratamento dos grupos controle negativo e tratados foi em dose oral única, administrada por gavagem com sonda flexível de silicone (Figura 8) no período matutino (início do período claro), 12 horas antes de iniciar o tratamento, a alimentação dos animais foi retirada, porém foi mantida água *ad libidum*. O grupo Dox recebeu injeção intraperitoneal.



Figura 8. Gavagem com sonda flexível.

Foram empregadas três doses nos grupos tratados (GT): 1X (uma dose ritual), 5X (cinco vezes a dose ritual) e 15X (quinze vezes dose ritual). A massa do liofilizado administrada foi então calculada em função do peso do animal e do grupo de tratamento, dissolvida em 2 mL de água filtrada e administrado por gavagem de modo que o volume total ingerido por animal respeitou o limite de 10ml/kg p.c. (10 mililitros por quilograma de peso corporal), conforme preconizado.

Os animais do grupo Dox receberam injeção intraperitoneal de cloridrato de doxorrubicina (30 mg de cloridrato de doxorrubicina por quilograma de peso corpóreo, solubilizado em solução salina NaCl 0,9%). A doxorrubicina é uma antraciclina utilizada no tratamento de câncer, possui um efeito citotóxico e é intercalante do DNA, sendo amplamente utilizada como controle positivo em testes de genotoxicidade (Bhuyan et al., 1983; Lähdetie, 1983; Criswell et al., 2003; Venkatesh et al., 2007).

4. Testes comportamentais

Os testes neurocomportamentais foram realizados uma hora após o tratamento e repetido na segunda hora, na seguinte ordem: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Natação Forçada. A realização do teste na segunda hora procurou avaliar a persistências dos efeitos ou um possível efeito de acomodação (aprendizagem, habituação, evocação da memória de aprendizado espacial).

O teste de Campo Aberto (TCA) foi realizado numa arena circular de madeira com área de 0,72 m^2, raio de 0,48 m e uma contenção lateral com 0,34 m de altura. O piso dessa arena foi dividido em 18 quadrantes de locomoção e um quadrante central onde o animal foi colocado no início do teste (Figura 9).



Figura 9. Arena circular usada no Teste de Campo aberto.

Durante 5 minutos, foram quantificados o número de quadrantes percorridos, o número de vezes que o animal foi ao quadrante central, o número de vezes que o animal se eleva (eleva o tronco ficando apoiado nas patas traseiras), bem como o comportamento de autolimpeza e defecação.

O teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foi realizado em um aparato de madeira em formado de cruz, elevado a uma altura de 38 cm do piso, com um

quadrante central (0,1m x 0,1m) e 4 braços, sendo dois abertos e dois fechados, cada um com 0,5m de comprimento (Figura 10). O comportamento do animal foi avaliado por 5 min e quantificou-se o número de entrada e o tempo de permanência em cada braço e na área central assim como o número de levantamentos do tórax, gestos de autolimpeza e defecação.



Figura 10. Labirinto em Cruz Elevado

O teste de Natação Forçada (TNF) foi realizado em cilindro de acrílico transparente (0,50 cm de altura e 0,39 cm de diâmetro) com água a 25°C e profundidade de 30 cm (Figura 11). Este teste foi realizado segundo protocolo descrito por Lucena et al. (2010) onde a sessão teste teve duração de 5 minutos. Essa sessão foi cronologicamente dividida em: 2 minutos que correspondem a um período inicial de aclimatação, seguido de 3 minutos de avaliação do comportamento dos ratos. Foi quantificado o tempo em que o animal permanece efetivamente nadando e o tempo em que o animal fica tentando escapar escalando as bordas do

cilindro (*climbing*). Esses comportamentos se distinguiram do comportamento passivo, em que o animal ficou imóvel ou realizando movimentos mínimos para manter a cabeça acima da água Como nos outros testes, o comportamento emocional evidenciado pela defecação também foi avaliado pela quantificação do número de bolos fecais.



Figura 11. Cilindro para teste de natação forçada

5. Eutanásia e coleta das amostras biológicas

Os animais foram submetidos à eutanásia por inalação de gás carbônico medicinal (CO_2), 30 horas após receberem o tratamento. Após a laparotomia, cerca de 3 a 5 ml de sangue de cada animal foi coletado por punção cardíaca com seringa estéril e aliquotado em microtubos com EDTA 20% (na proporção de 1:10 de sangue coletado). Durante a necropsia, cérebro, baço, fígado e rins foram retirados, lavados em solução salina NaCl 0,9%. Os órgãos foram analisados macroscopicamente, pesados e fixados em formalina tamponada 10%. Para coleta da medula óssea, os fêmures foram excisados, tiveram as epífises cortadas e, com auxílio de uma seringa com agulha, a medula foi coletada em 3 ml soro fetal bovino (SFB) contendo EDTA 20%.

6. Ensaio Cometa

Para esse ensaio realizado em meio alcalino (Singh et al., 1988) foram realizadas alterações a partir de recomendações descritas por Tice et al (2000) e Smith et al.(2008). Células brancas do sangue foram separadas por centrifugação e coletadas com micropipeta. A amostra de leucócitos foi ressuspendida e homogeneizada em agarose de baixo ponto de fusão 0,8% e gotejada em lâminas previamente preparadas recobertas com agarose normal 1,5%. A uniformização da distribuição da amostra de leucócitos homogeneizados e gotejados na lamina foi feita com uma lamínula descartada após resfriamento e solidificação do gel.

Após o período de solidificação em geladeira, as lâminas foram imediatamente acondicionadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, n-lauroylsarcosine 1%, pH 10, Triton X-100 1% e DMSO 10%) por um período de 12 horas (*overnight*). Em seguida, foi realizada a eletroforese em solução alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13), por um período de 20 minutos, a 25v, 300mA.

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas em 3 banhos de 5 minutos em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) com intervalos de 5 minutos entre eles. Depois de retirada das cubas de neutralização e secagem, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e mantidas a 4°C até o momento da análise.

Para análise em microscopia de fluorescência, as lâminas foram tratadas com brometo de etídio a 20 µg/mL, que intercala o DNA e emite fluorescência. Para análise dos nucleóides, foi utilizado microscópio de fluorescência (ZEISS Axioskop 2 - HAL 100) em aumento de 400X.

A análise visual de 100 nucleóides por animal seguiu classificação em níveis de danos que vão de zero (score 0/ausência de dano) até nível de dano quatro (score 4/dano elevado) de acordo com intensidade de fragmentação e proporção entre tamanho de cabeça e cauda do nucleóide. Score 0 corresponde a nucleóide com DNA íntegro. No score 1 existe fragmentação sendo o comprimento da cauda bem menor do que a cabeça do nucleóide, no score 2 o comprimento da cauda é aproximadamente do tamanho da cabeça do nucleóide, enquanto no Score 3 o

comprimento da cauda do núcleóide é maior do que o comprimento da cabeça desse nucleóide. Score 4 a cauda é bem evidente e os contornos da cabeça do nucleóide estão bastante reduzidos . (Jałoszyński et al.,1997)(Figura 12).

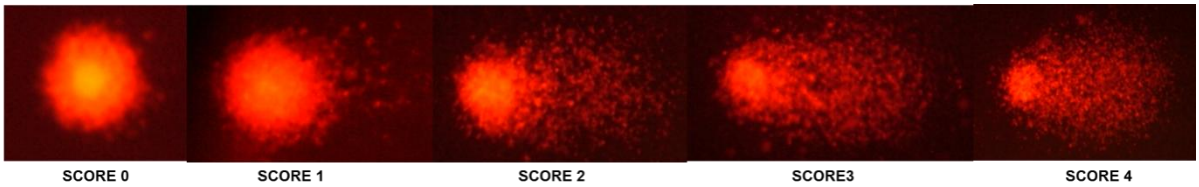


Figura 12. Classificação visual de níveis de dano.

Os resultados foram expressos na forma de índice de dano (ID). O ID é um indicador de genotoxicidade total calculado atribuindo-se um peso correspondente a cada classe de nível de dano: para score 0 que corresponde a ausência de dano ao DNA é atribuído peso 0 na composição do ID; da mesma forma o score 1 que corresponde a um dano leve ao DNA é atribuído peso equivalente a 1; para score 2 é atribuído peso 2; para score 3 é atribuído equivale a peso 3 e para score 4 é atribuído peso 4, conforme fórmula abaixo (Palus et al., 1999; Jałoszyński et al.,1997).

$$Indice\ de\ dano = \frac{\{(score\ 1\ x\ 1) + (score\ 2\ x\ 2) + (score\ 3\ x\ 3) + (score\ 4\ x\ 4)\}}{Total\ de\ nucleóides\ analisados} x\ 100$$

O score total do ID pode variar de 0 – 400, onde 0 (zero) indica uma situação hipotética em que todas os 100 “cometas” analisadas tiveram dano 0, isto é, não apresentaram dano,e 400 em que todos os “cometas” tiveram dano 4.

7. Teste de micronúcleo

Para minimizar a possibilidade de efeitos falso positivo neste ensaio foi utilizado protocolo de purificação e enriquecimento de amostra proposto por

Romagna & Staniforth (1989). Esse protocolo consiste na separação da população de eritrócitos obtidos da medula óssea por um processo de filtração em coluna de celulose (Figura 13) (adsorção) e membrana de policarbonato (seleção pelo tamanho do poro), seguido de um processo de centrifugação por diferença de densidade em gradiente de Percoll® (Hayashi et al., 1994).



Figura 13. Filtro em coluna de celulose

O Percoll® é uma solução coloidal (micropartículas de sílica recobertas com polivinilpiloridona) utilizada na obtenção de frações enriquecidas e purificadas de células (e partículas subcelulares). A centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll® permite a obtenção eritrócitos livres de grânulos a partir da diferença de densidade e da massa (Figura 14). O Percoll® foi diluído em duas concentrações (30% e 80%) usando solução tamponada contendo o antiagregante EDTA (Rennie et al., 1979).



Figura 14. População eritrocítica isolada por centrifugação entre camadas de Percoll® (halo vermelho entre as camadas).

As lâminas foram confeccionadas por esfregaço a partir da amostra da população eritrocítica pura e enriquecida (halo vermelho entre as camadas de Percoll na Figura 14). Após secagem de 24 horas, as lâminas foram fixadas em álcool metílico durante 10 minutos, e coradas com solução de Giemsa diluída em tampão fosfato de Sorensen (Solução A: KH2PO4 0,06M, Solução B: Na2HPO4.12H2O 0,06M, na proporção de 70% de A para 30% de B) durante 12 minutos. As lâminas coradas foram analisadas no microscópio de luz Olympus BH2 em aumento de 100x, sendo analisadas 2000 células (EPC) para cada animal com o auxílio de um contador manual (Hayashi et al., 2000; Krishna & Hayashi, 2000).

Para aferição de alterações no percentual de EPC foi utilizada a fórmula abaixo a partir da contagem adicional de 200 eritrócitos totais por animal, classificando-os em EPC e ENC (Krishna & Hayashi, 2000).

$$\%EPC = \frac{EPC}{EPC + ENC} x\ 100$$

8. Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo

Para análise da fragmentação de DNA foi utilizada amostra integral da medula óssea coletada em SFB conforme descrito no item 5. 100 µL da amostra foi fixada em 500 µL da solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2,5 %) e mantida a 4ºC até o momento da análise. A amostra foi lavada em tampão fosfato 0,1M (A=0,2M de fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4H_20$) e B=0,2M de fosfato de sódio dibásico Na_2HPO_4, na proporção de 51 ml de A para 49 ml de B,e volume final de 200 mL completado com água destilada. Para remover fragmentos de grandes dimensões, agrupamentos celulares ou de restos celulares, a amostra foi previamente filtrada em CellTrics® com poro de 50 µm (Figura 15) antes da leitura no citômetro de fluxo.



Figura 15. Filtro com tamanho de poro 50 µm CellTrics®.

O iodeto de propídeo (50 µg/ml) foi utilizado como marcador de fluorescência. Por se tratar de um marcador inespecífico de ácido nucléico (pode se ligar também ao RNA), a amostra de medula óssea fixada foi previamente incubada com RNAse (na concentração de 50 µg/ml diluída a partir de uma solução estoque de 20000 µg/ml) por 30 min a37 ºC.

No citômetro de fluxo, as células foram analisadas de acordo com suas características morfológicas de tamanho (FSC) e granulosidade (SCC), e intensidade de fluorescência (FL). A análise foi realizada em histogramas gerado sem escala logarítmica a partir da leitura do canal FL2 (fluorescência relativa ao comprimento de onda 570 nm), utilizando software para Windows TM FlowMax®.

9. Avaliação hematológica e bioquímica

Uma alíquota de 0,5 mL da amostra sanguínea coletada e homogeneizada em EDTA 20% foi imediatamente encaminhada para análise em hematímetro automatizado Sysmex Poch 100iVDiff™ calibrado para ratos. Foram analisados os seguintes parâmetros: hemoglobina (HGB), hematócrito total (HCT), eritrograma (RBC), leucograma (WBC), plaquetograma (PLT), volumes corpusculares e seus índices de variação.

1mL de soro de cada animal foi separado por centrifugação e armazenado a -80°C para posterior análise bioquímica. Foram avaliados a metabolização lipídica

pelo parâmetro triglicérides séricas; a função hepática pelos parâmetros enzima transaminase glutâmico oxalacética (TGO), enzima transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e bilirrubina (total, direta e indireta); a função renal pelos parâmetro uréia e creatinina sérica, e a função pancreática pelos parâmetros enzimáticos lipase e amilase sérica. As análises foram realizadas pelo Instituto Sabin.

10. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*). Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (epm). Para comparação estatística entre os grupos controle e tratados foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para tomada de decisão (teste paramétrico ou não-paramétrico). Para as amostras com distribuição normal foi utilizado Anova *One-Way* com teste de múltiplas comparações *post-hoc* Bonferroni. Para amostras com distribuição não-normal utilizou-se teste não paramétrico Man-Whitney. A significância foi estabelecida no nível de 95% ($p<0.05$). Para comparação do comportamento intragrupo observado em tempos de amostragem diferente (1ª e 2ª hora) foi utilizado teste t student pareada.

V. RESULTADOS

1. Peso corporal e de órgãos

Nenhum óbito foi observado durante o experimento. A análise macroscópica dos órgãos após laparotomia não mostrou alterações evidentes. A Tabela 2 mostra o peso médio dos animais de cada grupo do estudo e dos órgãos avaliados. Não houve diferença estatística significativa em relação ao peso corporal entre os grupos de tratamento para cada sexo.

Tabela 2 – Peso total e dos órgãos (g) de animais dos grupos controle (GC- e Dox) e tratados com a ayahuasca (1X, 5X e15X a dose usual). Os valores estão expressos em média ± epm; n = 5 animais por grupo*.

Grupo	Total	Cérebro	Rim D	Rim E	Fígado	Baço
			Fêmeas			
GC-	254,9±7,2	1,98±0,05	1,01±0,03	0,97±0,04	9,87±0,19	0,71±0,01[a]
Dox	252,5±7,6	1,94±0,03	0,89±0,04	0,85±0,05	9,77±0,49	0,50±0,02[b]
1X	262,2±6,4	2,03±0,07	1,03±0,06	0,97±0,06	10,21±0,39	0,69±0,01[a]
5X	262,0±8,5	1,95±0,04	1,00±0,02	0,94±0,35	9,86±0,41	0,67±0,03[a]
15X	266,4±5,4	2,05±0,02	1,16±0,11	1,16±0,17	10,26±0,50	0,70±0,02[a]
			Machos			
GC-	388,0±10,8	2,15±0,02	1,48±0,07[a]	1,37±0,07	14,86±1,22	0,91±0,09[a]
Dox	368,6±14,1	2,04±0,03	1,29±0,05[b]	1,27±0,04	14,14±0,80	0,62±0,04[b]
1X	377,8±12,0	2,06±0,06	1,35±0,01[c]	1,31±0,02	14,58±1,24	0,89±0,09[a]
5X	400,8±13,0	2,05±0,06	1,51±0,06[a]	1,45±0,05	15,66±0,64	0,79±0,09[a]
15X	370,7±12,2	2,00±0,06	1,55±0,20[a]	1,57±0,22	13,12±0,48	0,74±0,05[a]

* significância estatística entre as médias dos grupos é indicada por letras diferentes, $p \leq 0,05$.

O peso absoluto dos órgãos dos animais tratados com ayahuasca não apresentou alterações significativas em relação ao GC-. Houve redução significativa do peso do baço do Dox tanto em machos quanto em fêmeas. Nos machos, houve também redução do peso absoluto do rim direito nos animais do Dox. O rim direito dos machos do grupo 1X se mostrou significativamente menor que o do grupo 5X.

Não houve diferença no peso absoluto do cérebro de animais fêmeas e machos, mas o peso relativo do cérebro das fêmeas (em relação ao peso corpóreo) é proporcionalmente maior que o dos machos em todos os grupos (dados não mostrados). Esta diferença não foi observada para os outros órgãos.

2. Testes comportamentais

Logo após a administraçãoda ayahuasca, observou-se um comportamento padrão em alguns animais de todos os grupos, caracterizado por agitação passageira, rastejamento sob a maravalha, balançar a cabeça, tremores e piloereção. Nos animais do grupo de maior dose (15X), a agitação inicial foi seguida de hipocinesia ou *freezing*.

2.1 Teste do Campo Aberto

No teste de Campo Aberto, os seguintes parâmetros foram analisados1 e 2 horas após o tratamento: locomoção, exploração, auto-limpeza e defecção.

A atividade locomotora foi avaliada pelo número de quadrantes percorridos na arena circular (Figura 16) e pelo número de vezes que o animal entra na área central (Figura 17) do campo aberto. O número de quadrantes percorridos na primeira hora após a dosagem mostrou-se diminuída para fêmeas do grupo 15X em relação ao grupo 1X, mas não em relação ao controle. Quando fêmeas e machos são considerados, a diminuição da locomoção no grupo 15X foi significativamente menor que nos outros grupos. Quando o teste foi repetido uma hora depois (2 horas após a dosagem, Figura 16B), o número de quadrantes percorridos foi menor em relação à primeira hora sendo estatisticamente menor no grupo 15X. O grupo 15X continuou apresentando diferença significativa em relação aos demais grupos, principalmente para machos.

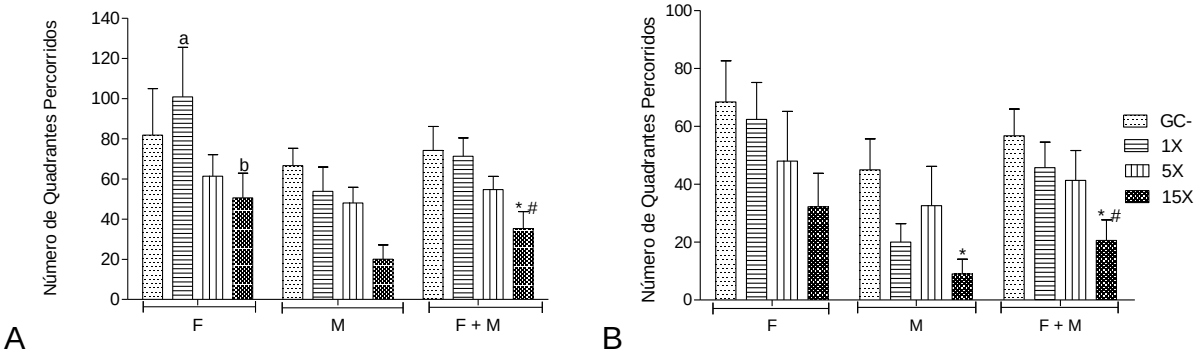


Figura 16. Atividade locomotora na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo aberto. F = Fêmeas; M = Machos. * indica diferença estatística com os demais grupos no mesmo tempo de amostragem, # indica diferença estatística no mesmo grupo com tempo de amostragem diferente; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos, $p \leq 0,05$; n =5 animais por grupo.

O número de vezes que o animal foi ao quadrante central não variou entre os grupos quando o teste foi realizado 1 ou 2 horas após o tratamento (Figura 17). Apesar de não significativo, notou-se que em geral os animais tratados vão menos vezes ao quadrante central e alguns animais testados na 2ª hora não apresentaram este comportamento (fêmeas 15X e machos 1X, Figura 17B). Na comparação pareada da segunda hora com a primeira houve uma redução significativa no número de idas ao quadrante central em todos os grupos.

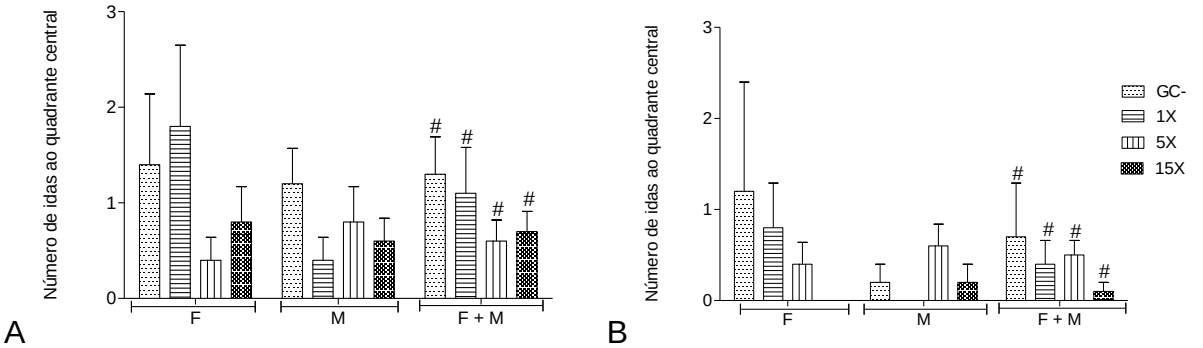


Figura 17. Exploração da área central na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo aberto. F = fêmeas; M = machos; # indica diferença significativa intragrupo em relação aos tempos de amostragem; n = 5 animais por grupo.

A atividade exploratória foi mensurada pelo comportamento de elevação do tórax com apoio somente nas patas traseiras (*rearing*) (Figura 18). Após

uma hora da dosagem, observou-se uma diminuição na atividade de *rearing* no grupo de maior dose (15X) em relação ao controle e ao grupo 1X, principalmente em fêmeas. Este resultado se confirmou quando o teste foi repetido 2 horas depois do tratamento, mas este comportamento foi mais claro para os machos, que mostraram diminuição de *rearing* em todos os grupos tratados em relação ao controle.

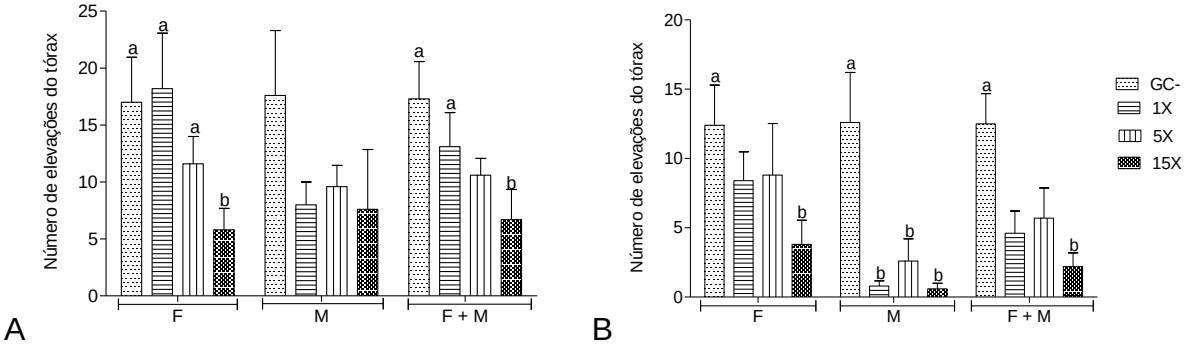


Figura 18. Comportamento exploratório por elevação de tórax (*rearing*) na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo aberto. F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, $p \leq 0,05$; n = 5 animais por grupo.

A Figura 19 mostra o comportamento de autolimpeza dos animais no campo aberto. Na primeira hora após o tratamento observou-se um aumento desta atividade em relação ao grupo controle, principalmente nas fêmeas do grupo 1X, onde esse efeito se mostrou estatisticamente significativo. Na segunda hora após dosagem, o comportamento dos animais se inverteu, com menor atividade nas maiores doses (5X e 15X), apesar de não ter sido estatisticamente diferente do controle.

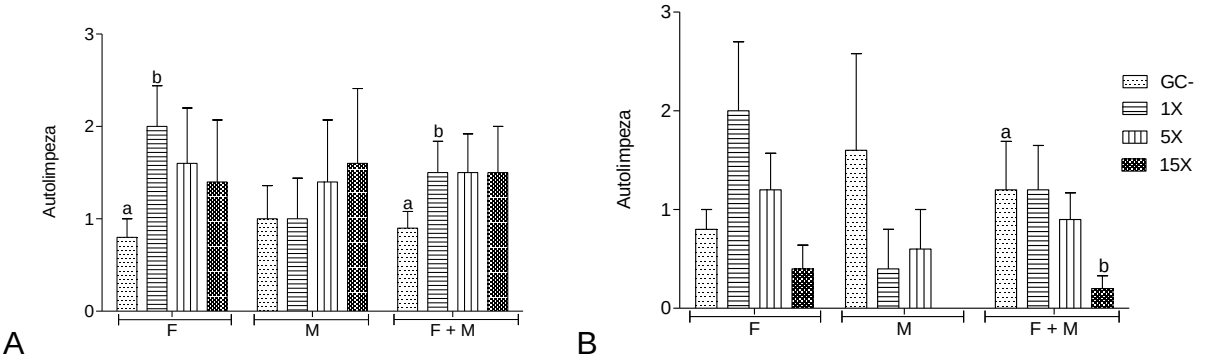


Figura 19. Comportamento de autolimpeza na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo aberto. F = fêmeas; M = machos; n = 5 animais por grupo.

Considerando ambos os sexos, animais tratados nas doses 5 e 15X defecaram significativamente menos que os animais do grupo controle quando o teste de campo aberto foi feito 1 hora após o tratamento (Figura 20A). Comportamento similar foi observado no segundo teste (2 horas após a dosagem), apesar das diferenças não terem sido significativas (Figura 20B).

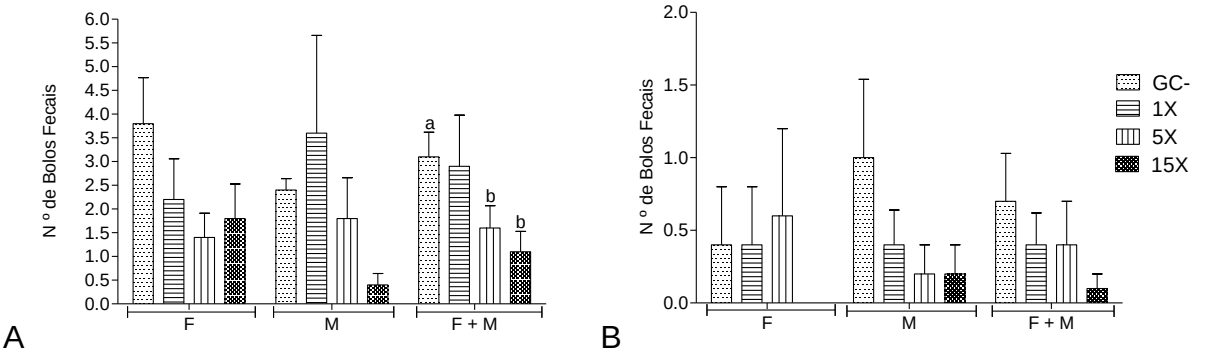


Figura 20. Comportamento emocional por defecação na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Campo aberto. F = Fêmeas; M = Machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, $p \leq 0,05$; n = 5 animais por grupo.

2.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

No teste de Labirinto em Cruz Elevado os seguintes parâmetros foram analisados: tempo de permanência nos braços fechados, tempo de permanência nos braços abertos, tempo de permanência na área central, número de entradas no

braço fechado, número de entradas no braço aberto, exploração, auto-limpeza e defecção.

O tempo de permanência nos braços fechados durante o teste no LCE está apresentado na Figura 21. Excluindo a variável gênero, observou-se que os animais dos grupos 15X ficaram significativamente mais tempo no braço fechado que os animais dos outros grupos, comportamento que foi mais claro entre as fêmeas em relação aos outros grupos de tratamento (Figura 21A). Na segunda hora, machos do grupo 15X mostraram redução significativa do tempo de permanência nos braços fechados em relação ao grupo 5X, mas quando os dois gêneros foram considerados juntos, este tempo aumentou significativamente nos grupos 1X e 5X em relação ao controle (Figura 21B). Comparando o tempo de permanência no braço fechado observado nos dois tempos de amostragem, os animais controle e dos grupos 1X e 5X ficaram mais tempo no braço fechado na segunda hora, sendo esses aumentos significativos. O grupo 15X inverteu seu comportamento, mas essa diferença não foi significativa.

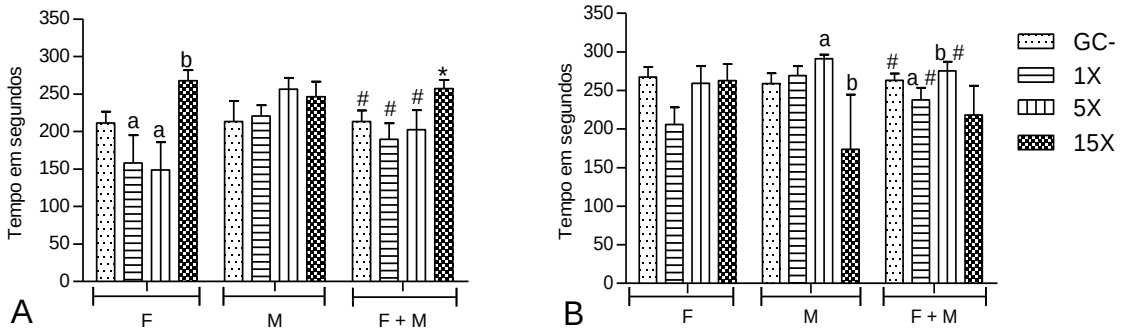


Figura 21. Tempo de permanência no braço fechado no teste do Labirinto em Cruz Elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B) após dosagem. F = fêmeas; M = machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, # indica diferença significativa intragrupo em relação aos tempos de amostragem, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

O tempo de permanência nos braços abertos no teste no LCE está apresentado na Figura 22. Na primeira hora após a dosagem, o tempo de permanência no braço aberto foi significativamente menor nos grupos de dose (15X) quando comparado aos demais grupos (Figura 22A). Quando somente as fêmeas são consideradas, observou-se aumento neste tempo nos grupos 1X e 5X em

relação ao controle, sendo significativo no grupo 5X, mas uma queda significativa no grupo 15X em relação aos outros grupos tratados.

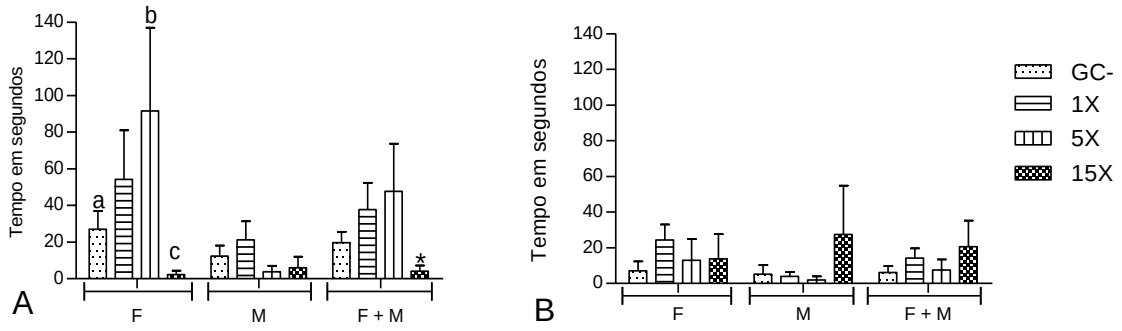


Figura 22. Tempo de permanência no braço aberto no teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B) após dosagem. F = fêmeas; M = machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

Os tempos de permanência dos animais na área central do LCE estão apresentados na Figura 23. Houve uma redução nesse tempo para os animais tratados no teste realizado na primeira hora, porém essa diferença só se mostrou significativa nas fêmeas do grupo de maior dose (15X).

Na segunda hora após a exposição (Figura 23B), os grupos apresentaram comportamento diferente em relação ao tempo de permanência na área central do LCE, não apresentando relação dose-dependente. Excluindo a variável sexo, animais do GT 1X permaneceram por mais tempo na área central do os animais do GT 5X, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Considerando o sexo como uma variável, machos do GT 15X permaneceram mais tempo na área central do LCE do que os demais animais, sendo essa diferença significativa em relação ao GT 5X. Fêmeas do GT 1X mostraram aumento da permanência na área central do LCE, significativamente maior que os demais grupos. As fêmeas dos demais grupos se mantiveram igual ao controle na segunda hora do teste.

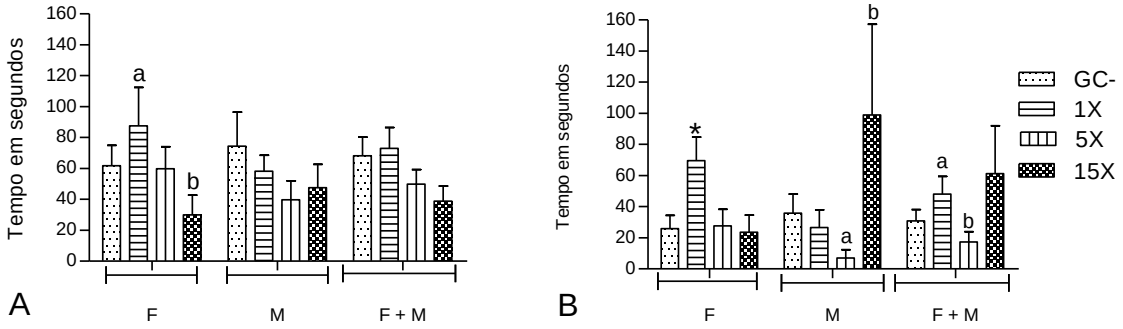


Figura 23. Tempo de permanência no quadrante central no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B) após dosagem. F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

O número de entradas nos braços fechados do LCE está apresentado na Figura 24. Na primeira hora de observação, animais dos grupos 15X entraram significativamente menos no braço fechado que os demais grupos, sendo esse comportamento significativo em machos e fêmeas (Figura 24A). Resultado similar foi obtido na segunda hora de observação quando se considera os grupos de ambos os sexos juntos. Quando observado em separado, machos tratados em todas as doses mostraram diminuição significativa no número de entradas no braço fechado em relação ao controle (Figura 24B). Mesmo não sendo estatisticamente significativo, o comportamento das fêmeas do grupo 1X foi distinto dos demais na segunda hora, mostrando um aumento no número de entradas no braço fechado.

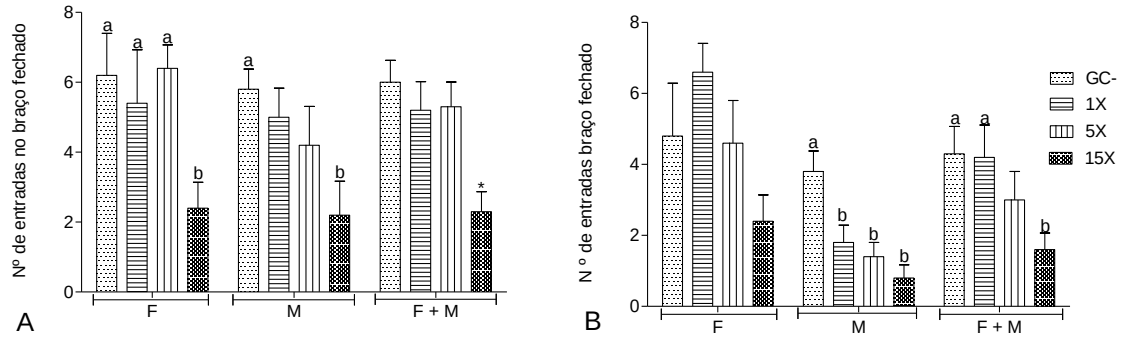


Figura 24. Número de entradas nos braços fechados no teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B) após dosagem. F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

O comportamento dos animais quanto ao número de entradas nos braços abertos do LCE (Figura 25) foi similar ao número de entradas nos braços fechados (Figura 24), mostrando pouca mobilidade nos animais de maior dose (15X) quando consideramos machos e fêmeas em separado ou compondo um mesmo grupo de tratamento. Fêmeas tratadas com doses 1X e 5X na primeira hora (Figura 25A) e 1X na segunda hora (Figura 25B) apresentaram aumento no número de entradas no braço aberto, embora essa diferença também não seja significativa.

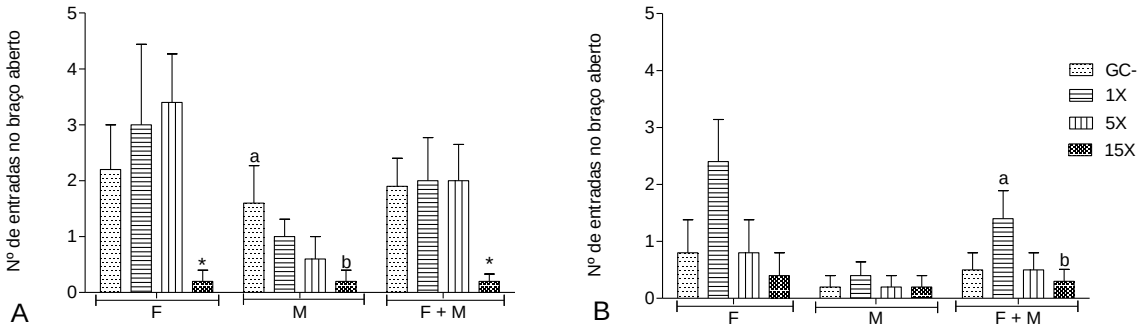


Figura 25. Número de entradas nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B) após dosagem. F = Fêmeas; M = Machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

A atividade exploratória dos animais no LCE mensurada pelo comportamento de *rearing* está mostrada na Figura 26. Na primeira hora, os animais tratados mostraram menor atividade de *rearing* que o grupo controle, mas que foi significativa somente quando os grupos de macho e fêmea foram considerados juntos, para o grupo 15X em relação aos outros grupos (Figura 26A). Na segunda hora, a diminuição desta atividade no grupo 15X foi estatisticamente menor que o controle para ambos os sexos avaliados separadamente (Figura 26B).

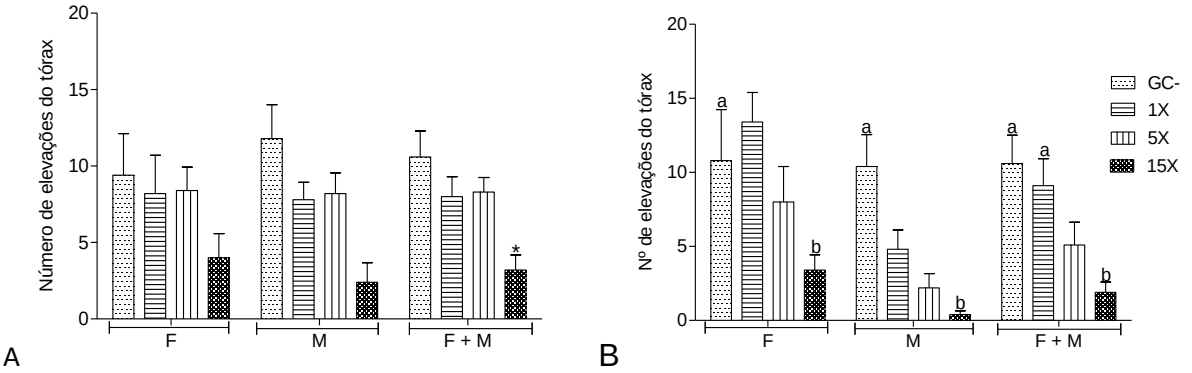


Figura 26. Comportamento exploratório por número de elevações de tórax no Teste do Labirinto em Cruz elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B) após dosagem. F = fêmeas; M = machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

O comportamento de autolimpeza observado no LCE está apresentado na Figura 27. Na primeira hora após o tratamento, animais dos grupos 15X se limparam, em média, menos que os animais do grupo 1X (Figura 27A), quando ambos os sexos foram considerados juntos. Este comportamento se confirmou na segunda hora, mas a diminuição foi significativa apenas no grupo 15X em relação aos outros grupos de tratamento e ao controle. Apesar de não significativo, fêmeas dos grupos 1X se limparam mais vezes que o grupo controle nos dois testes.

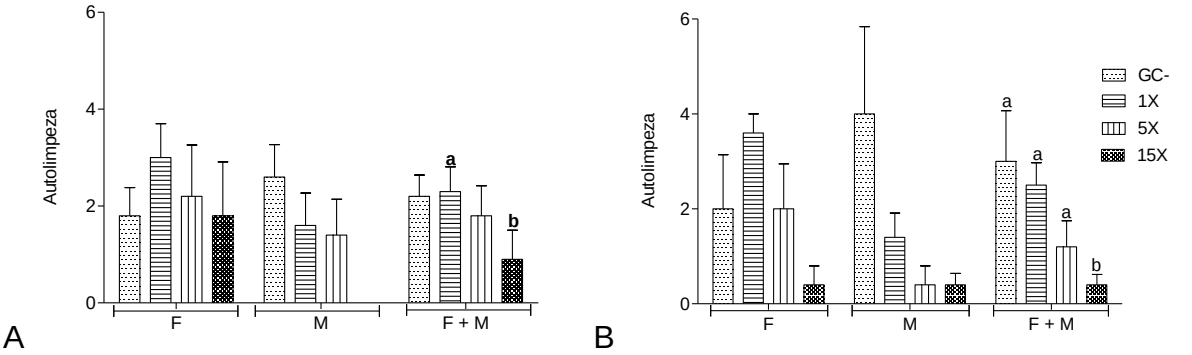


Figura 27. Comportamento de Autolimpeza no teste do Labirinto em Cruz Elevado na primeira hora (A) e na segunda hora (B). F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤ 0,05; n = 5 animais por grupo.

Não houve diferença significativa entre o número de bolos fecais dos animais controle e tratados no LCE em ambos os testes (Figura 28).

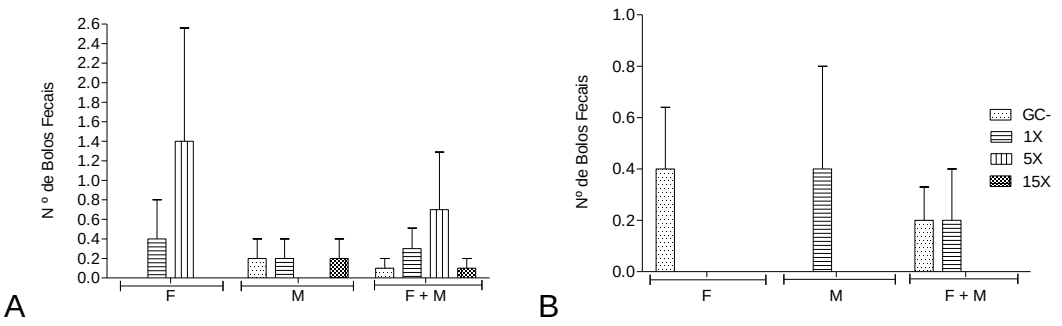


Figura 28. Comportamento emocional por defecação na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste do Labirinto em Cruz Elevado. F = fêmeas; M = machos; n = 5 animais por grupo.

Foram avaliados o percentual do tempo de permanência nos braços abertos, o percentual do tempo de permanência no braço fechado, o percentual de tempo na área central, bem como os percentuais de entradas nos braços abertos e o percentual de entradas no braço fechado. Os resultados dos valores percentuais foram similares aos resultados do tempo de permanência e número de entradas em valores absolutos (Anexo B).

2.3 Teste de Natação Forçada (TNF)

No TNF foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo em que o animal passa tentando escalar as paredes do recipiente com água (*climbing*), tempo de natação e tempo de comportamento passivo ou flutuação.

Na primeira hora após a dosagem e considerando machos e fêmeas em conjunto, os animais tratados tiveram uma atividade de *climbing* maior que os animais controle, apesar de não haver uma relação dose x resposta (Figura 29A). Este aumento foi significativo em machos dos grupos 1X e 5X. No geral, fêmeas se mostraram menos ativas na água na primeira hora. Na segunda hora, nenhuma mudança significativa foi observada entre os grupos tratados e controle, apesar de ter ocorrido uma inversão no comportamento quando considerada a variável sexo: fêmeas tratadas que escalaram menos que os machos na primeira hora passaram a escalar mais que os machos na segunda hora. Na segunda hora os machos escalaram menos do que as fêmeas e do que o controle, mas essa diferença não foi significativa (Figura 29B).

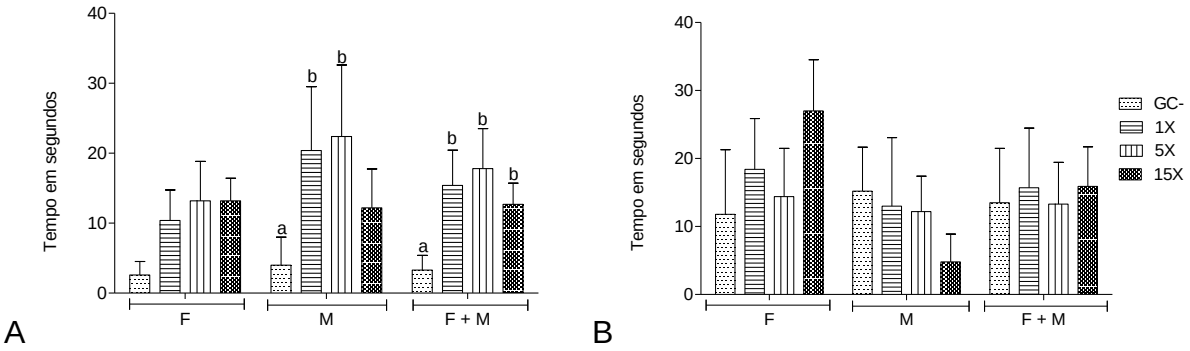


Figura 29. Tempo de observação do comportamento ativo do tipo “escalada” no teste de natação forçada na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Natação Forçada. F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤ 0,05; n = 5 animais por grupo.

A natação propriamente dita no TNF consiste no deslocamento na superfície da água e também mergulhos, com uso intenso das patas traseiras. O tempo de natação se mostrou aumentado nos animais tratados com ayahuasca quando consideramos machos e fêmeas no mesmo grupo, sendo que o grupo 15X mostrou aumento significativo quando comparado ao controle (Figura 30A). Considerando a variável sexo, fêmeas e machos mostraram aumento não significativo do tempo de natação em relação ao controle.

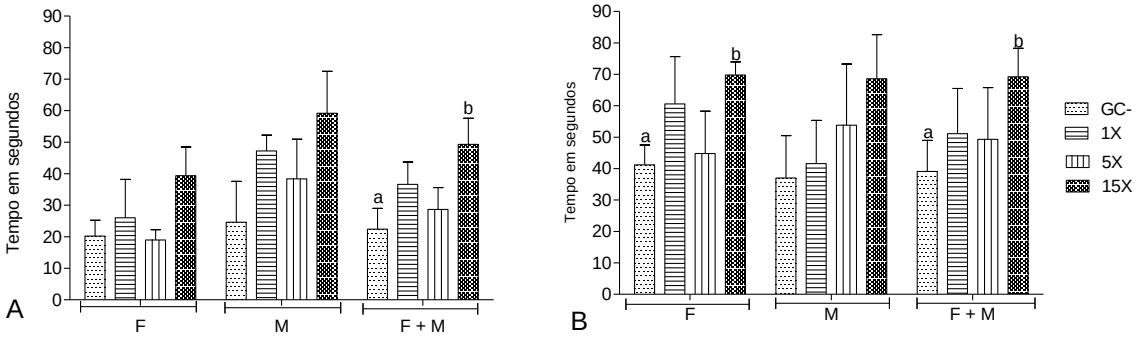


Figura 30. Tempo de observação do comportamento ativo do tipo natação no teste de natação forçada na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Natação Forçada. F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

No teste realizado na segunda hora, o tempo de natação de fêmeas do grupo 15X se mostrou aumentado em relação ao controle, persistindo a diferença significativa quando considerado grupo formado por machos e fêmeas (Figura 30B).

O comportamento passivo analisado no TNF consiste na imobilidade ou flutuação com esforço mínimo para se manter com a cabeça acima do nível da água. Considerando machos e fêmeas no mesmo grupo, o tempo de flutuação observado no TNF na primeira hora se mostrou menor do que controle, sendo essa diminuição significativa no grupo 15X (Figura 31A). Este resultado se manteve na segunda hora e também foi observado quando se considerou apenas as fêmeas (Figura 31B).

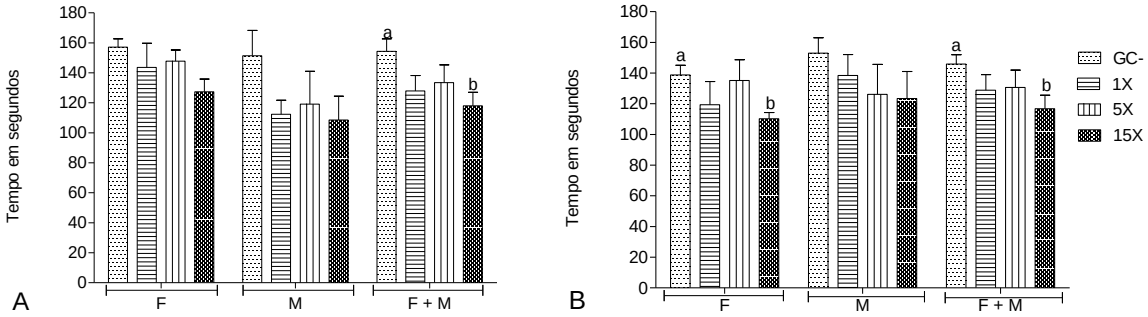


Figura 31. Tempo de observação do comportamento passivo ou flutuação no teste de natação forçada na primeira hora (A) e na segunda hora (B). F = Fêmeas; M = Machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

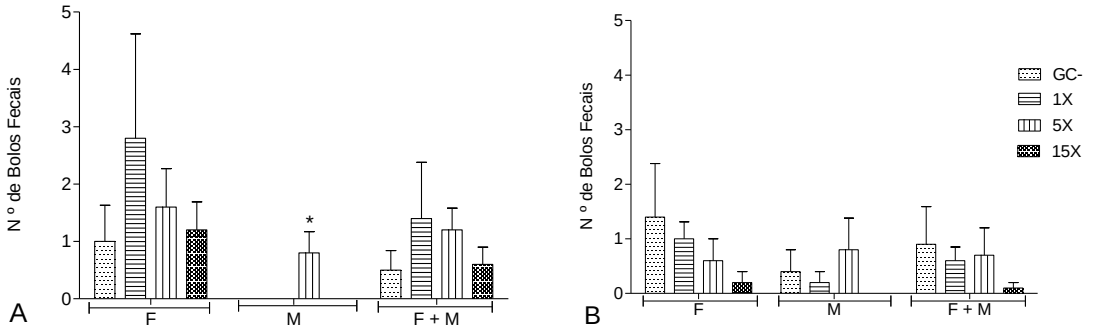


Figura 32. Comportamento emocional por defecação na primeira hora (A) e na segunda hora (B) no Teste de Natação Forçada. F = Fêmeas; M = Machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

No geral, observou-se uma menor quantidade de bolos fecais no TNF para os animais tratados (Figura 32), apesar de ter sido observado um aumento significativo de bolos fecais em machos do grupo 5X na primeira hora após a exposição (Figura 32A).

Um resumo com as tendências de alterações comportamentais observadas durante a bateria de testes (TCA, LCE e TNF) realizada em dois momentos de análise (1ª e 2 ª hora), por sexo e por grupo está apresentado em tabela em anexo (Anexo C).

3. Genotoxicidade

3.1 Ensaio Cometa

A fragmentação de DNA de grupos tratados com ayahuasca (1X, 5X e 15X) e grupos controle (GC- e Dox) foi mensurada pelo parâmetro índice de danos ao DNA (ID) e percentual de Dano Total ao DNA, determinados após análise microscópica usando escala visual de classificação de nucleóides no ensaio cometa.

Tabela 3 – Índice de Danos ao DNA dos grupos controle (GC- e Dox) e tratados com a ayahuasca (nas doses 1X, 5X e 15X a dose ritual). Valores expressos em média ± erro padrão

Grupos Experimentais	Fêmeas	Machos	Fêmeas e Machos
GC-	155,6 ± 24,05	181,4 ± 31,76	168,5 ± 19,27
Dox	258,4 ± 18,58*	238,8 ± 8,75*	248,6 ± 10,22 *
1X	122,6 ± 33,16	189,8 ± 22,01	156,2 ± 21,85
5X	156,2 ± 22,81	145,4 ± 32,60	150,8 ± 18,84
15X	197,2 ± 15,10	147,2 ± 23,74	172,2 ± 15,66

Diferença estatística com demais grupos quando p≤0,05 esta representada por *

O ID calculado para grupos tratados (em todas as doses) não mostrou diferença significativa com o ID do GC- (Tabela 3). A efetividade da doxorrubicina como controle positivo esta evidenciada no aumento do ID com diferença estatística em relação a todos os demais grupos.

O percentual de dano total ao DNA não mostrou diferença significativa entre GC- e grupos tratados com ayahuasca, indicando baixo risco de ação genotóxica da ayahuasca nas condições testadas.

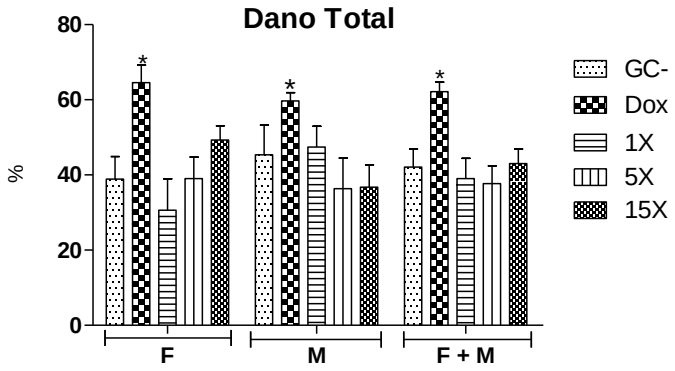


Figura 33. Dano total ao DNA por análise em escala de classificação visual no ensaio cometa. F = Fêmeas; M = Machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

3.2 Fragmentação de DNA por Citometria de Fluxo

A fragmentação de DNA por citometria de fluxo, mensurada pelo parâmetro de fluorescência relativa e expressa em valores percentuais, mostrou elevação significativa no grupo 1X (nas fêmeas em separado e no grupo fêmeas e machos juntos) quando comparadas ao controle, mas não os grupos 5X e 15X, não indicando uma relação dose x resposta (Figura 34).

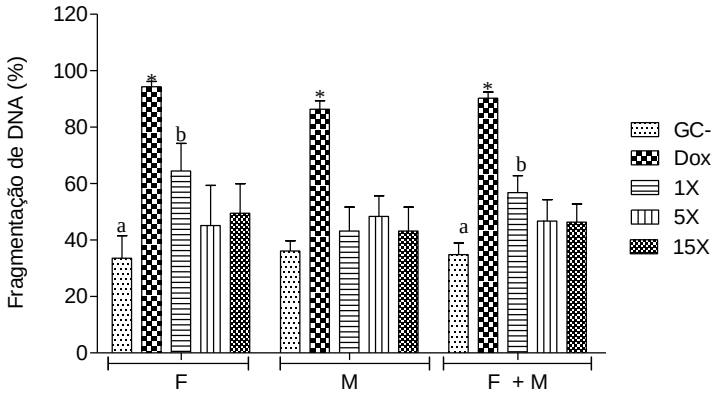


Figura 34. Fragmentação de DNA por citometria de fluxo. F = Fêmeas; M = Machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

3.3 Teste do Micronúcleo

No teste do Mn foram analisadas a incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados (Tabela 4) e citotoxicidade pela proporção de eritrócitos jovens (Figura 35). O grupo 15X mostrou um aumento significativo na incidência de EPC

Mn, indicando um potencial mutagênico da ayahuasca nesta doses elevadas. Não houve diferença significativa deste parâmetro entre os sexos.

Tabela 4 - Incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPC Mn) nos grupos controle (GC- e Dox) e tratados com a ayahuasca (nas doses 1X, 5X e 15X a dose ritual). Os valores estão expressos em média ± erro padrão

	EPC Mn (fêmeas)	EPC Mn (machos)
GC -	1,8 ± 0,8[a]	1,6 ±0,81[a]
Dox	27,2 ± 1,39 *	28 ±1,58 *
1X	1,8 ±0,58[a]	2 ±0,83
5X	2,2 ± 0,8	1,8 ±0,66
15X	3,6 ±0,51[b]	4,2 ±0,73[b]

* diferença significativa em relação aos outros grupos para cada gênero, Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles.

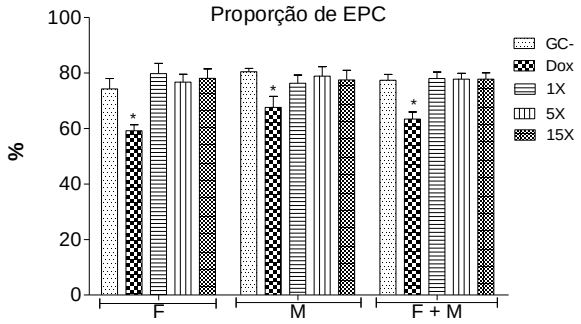


Figura 35 – Citotoxicidade analisada pela proporção de EPC/ENC no teste do micronúcleo. F = Fêmeas; M = Machos. * indica diferença estatística com os demais grupos, p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

A avaliação da citotoxicidade pelo parâmetro proporção de eritrócitos jovens (EPC) por eritrócitos maduros (ENC) no teste do Mn está apresentada na Figura 35. Os grupos 1X, 5X e 15X mostraram similaridade nas proporções de eritrócitos em relação com GC-. Grupo Dox apresentou diminuição estatística significativa, indicando a citotoxicidade do controle positivo.

4. Análises Hematológicas

Os parâmetros hematológicos observados nos animais do grupo controle negativo e tratados com ayahuasca em doses baixas foram comparados com padrões de referência estabelecida pelo Laboratório Charles River para ratos *Wistar* (Charles, 1982) e de modo geral se mantiveram dentro da faixa de esperada.

4.1 Eritrograma

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

A análise do hematócrito (HCT), em percentual do volume ocupado por eritrócitos sobre o volume total do sangue, não mostrou haver diferença estatística entre grupos tratados e controle negativo (Figura 36). O grupo Dox apresentou aumento HCT em relação ao grupo 5X.

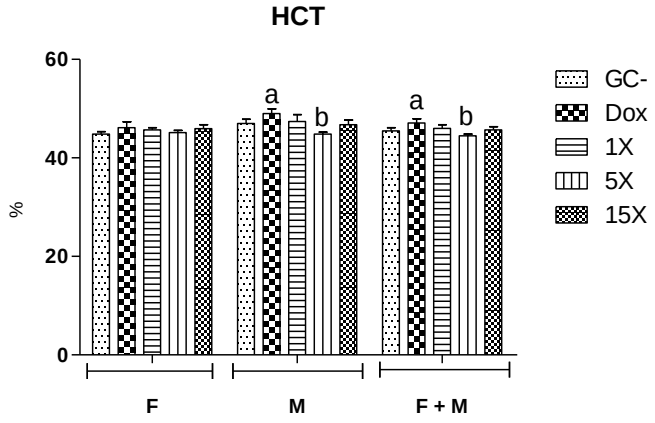


Figura 36. Hematócrito total (HCT). F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p≤0,05. n = 5 animais por grupo.

Não houve diferença significativa da contagem de eritrócitos totais (RBC) entre os grupos tratados e controle (Figura 37). O grupo Dox apresentou aumento da quantidade de eritrócitos em relação aos demais grupos, mas essa

alteração só foi significativa em relação aos machos do GT 5X. Excluindo a variável sexo, essa diferença significativa entre Dox e GT 5X persistiu.

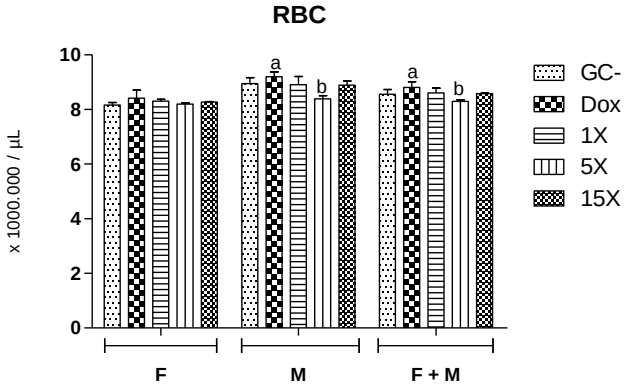


Figura 37. Contagem total de eritrócitos (RBC). F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo

Os resultados da avaliação da concentração de hemoglobina (HGB) estão apresentados na Figura 38, não mostrando diferença estatísticamente significante entre os grupos tratados com o controle. Nos machos do grupo Dox houve um aumento significativo em relação aos demais grupos, e quando os dois sexos foram considerados em conjunto, este aumento foi observado somente em relação ao controle e 5X.

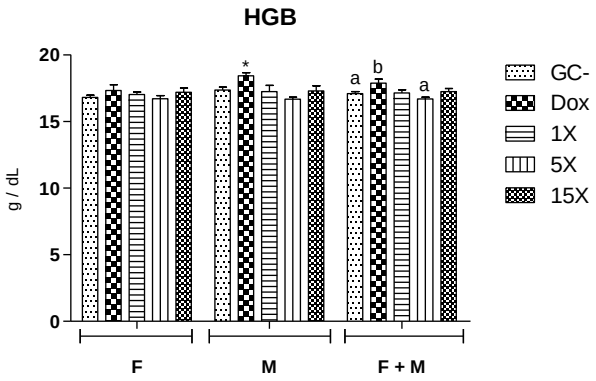


Figura 38. Concentração hemoglobínica (HGB). F = fêmeas; M = machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

Avaliação dos resultados do volume corpuscular das hemácias (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), e concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC) não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos

tratados e controle (Figuras 39, 40e 41). O grupo Dox mostrou um aumento significativo da MCHC em relaçao ao grupo 1X (Figura 41).

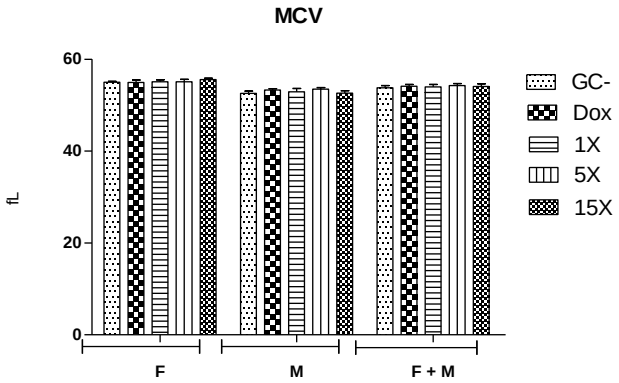


Figura 39. Volume corpuscular das hemácias (MCV). F = fêmeas; M = machos, n = 5 animais por grupo.

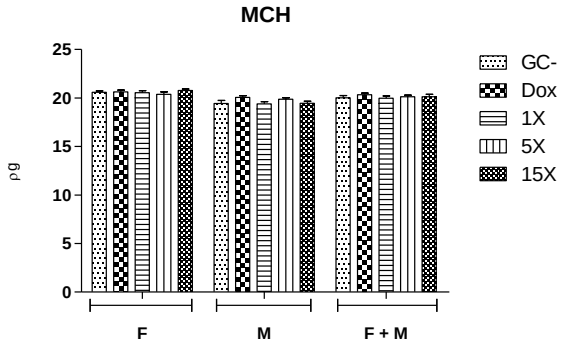


Figura 40. Hemoglobina corpuscular média (MCH). F = fêmeas; M = machos. n = 5 animais por grupo.

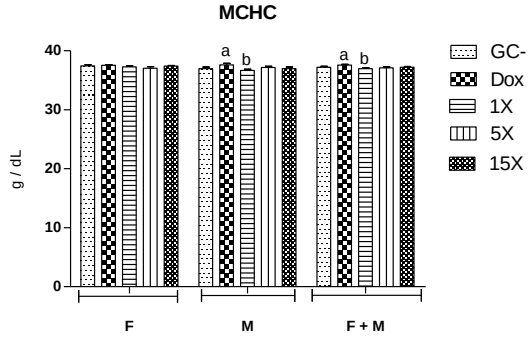


Figura 41. Concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC). F = fêmeas; M = machos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

Os parâmetros RDW-SD (variação dos volumes dos eritrócitos; *red cell distribution width*) e RDW-CV (distribuição desses volumes em valores percentuais) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos do estudo (Figura 42), indicando que não houve variação de tamanho das hemácias (anisocitose) que poderia ser um indicador de aumento da proliferação celular.

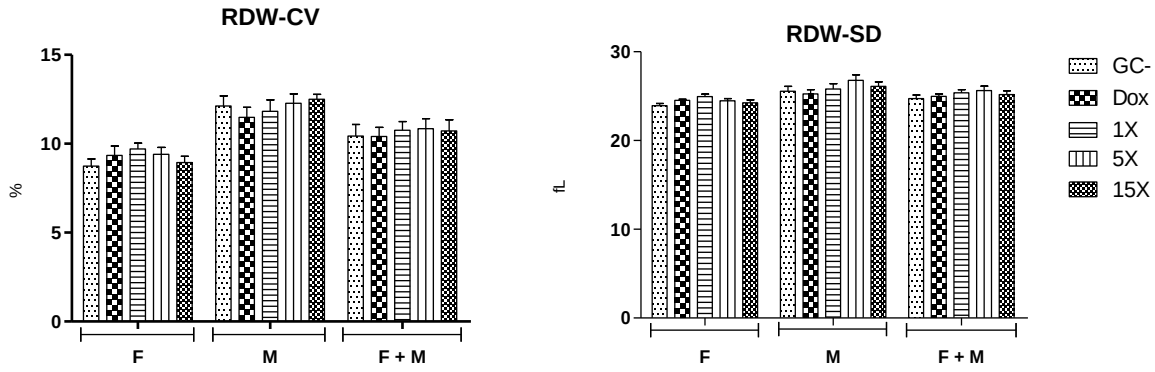


Figura 42. Variação dos volumes dos eritrócitos (RDW-SD) e a distribuição da variação dos tamanhos dos eritrócitos (RDW-CV). F = fêmeas; M = machos; p≤0,05; n = 5 animais por grupo.

4.2 Leucograma

O leucograma foi analisado pelos parâmetros: contagem total de leucócitos (WBC), contagem de linfócitos (W-SCC), contagem de neutrófilos e monócitos (W-LCC), percentual de células brancas pequenas (W-SCR) e percentual de células brancas grandes (W-LCR). A contagem total de leucócitos (WBC) apresentada na Figura 43 não indicou diferenças significativas entre os grupos tratados com ayahuasca e o controle, enquanto o grupo Dox apresentou leucopenia significativa.

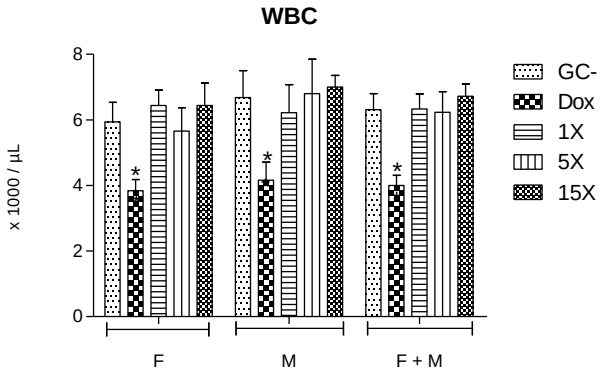


Figura 43. Contagem total de leucócitos (WBC). F = fêmeas; M = machos. * indica diferença estatística com os demais grupos, p ≤ 0,05. n = 5 animais por grupo.

A contagem automatizada permite diferenciar as populações de leucócitos quanto ao tamanho. Os resultados da contagem diferencial de leucócitos (W-SCC) e neutrófilos e monócitos (W-LCC) estão apresentados na Figura 44. Não houve diferença significativa nesses parametros entre os grupos tratados com ayahuasca e o grupo controle GC-. O grupo Dox mostrou redução significativa em relação aos demais grupos na contagem de linfócitos, tanto em machos quanto em fêmeas.

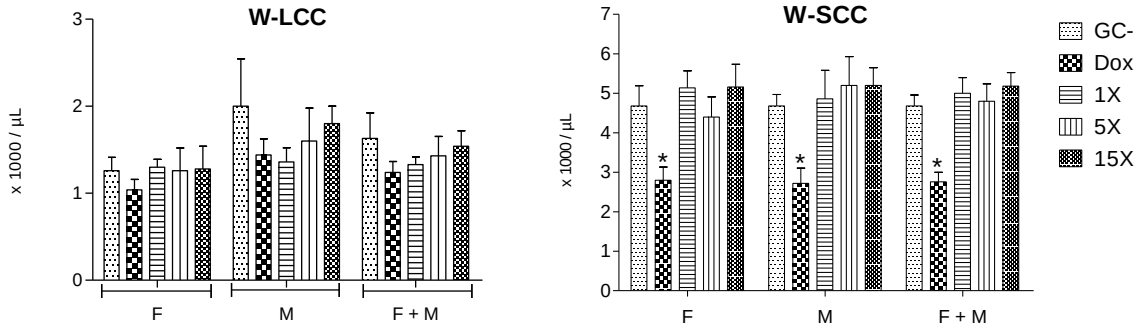


Figura 44. Contagem diferencial de leucócitos. Linfócitos (W-SCC). Neutrófilos e monócitos (W-LCC). F = fêmeas; M = machos. * indica diferença estatística com os demais grupos, p ≤0,05; n = 5 animais por grupo.

Os parâmetros W-SCR, que indica percentual de células brancas pequenas e W-LCR, que indica o percentual de células brancas grandes, nao mostraram diferenças significativas entre os grupos tratados com ayahuasca e controle (Figura 45). O grupo Dox, porém, apresentou maior W-LCR e menor W-SCR que os grupos tratados, signficativo para machos nas doses 1X e 5X.

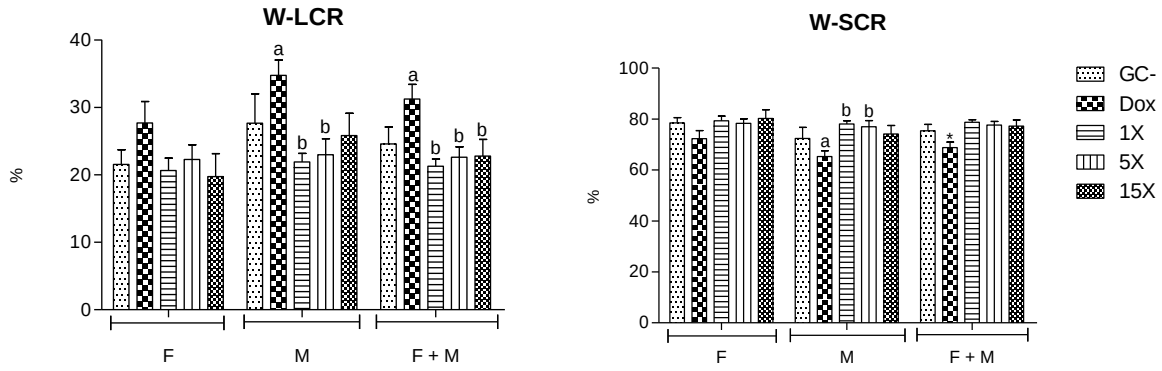


Figura 45. Percentual das linhagens de leucócitos. W- SCR: percentual de células brancas pequenas. W- LCR: Percentual de Células brancas grandes. F = fêmeas; M = machos. * indica diferença estatística com os demais grupos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p≤ 0,05; n = 5 animais por grupo.

4.3 Plaquetograma

O plaquetograma foi analisado através dos parâmetros: contagem total de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (MPV), variação do tamanho das plaquetas (PDW) (do inglês *platelet dimensions width*) e percentagem das plaquetas gigantes ou plaquetas de estress (P-LCR).

Os resultados da contagem total de plaquetas (PLT) estão apresentados na Figura 46. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com ayahuasca e controle. O grupo Dox mostrou PLT significativamente menor que o grupo de machos tratados, diferença que se manteve quando machos e fêmeas foram considerados juntos.

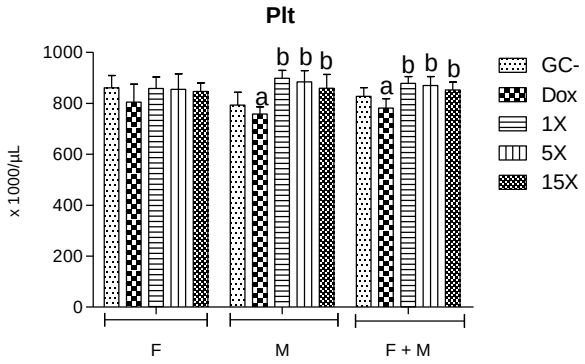


Figura 46. Contagem total de Plaquetas (PLT). F = fêmeas; M = machos; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre eles, p ≤ 0,05; n = 5 animais por grupo.

A avaliação do volume plaquetário médio (MPV), da variação do tamanho das plaquetas (PDW) e o percentual de plaquetas de estress (P-LCR) não revelou diferenças significativas entre os grupos do estudo (Figura 47).

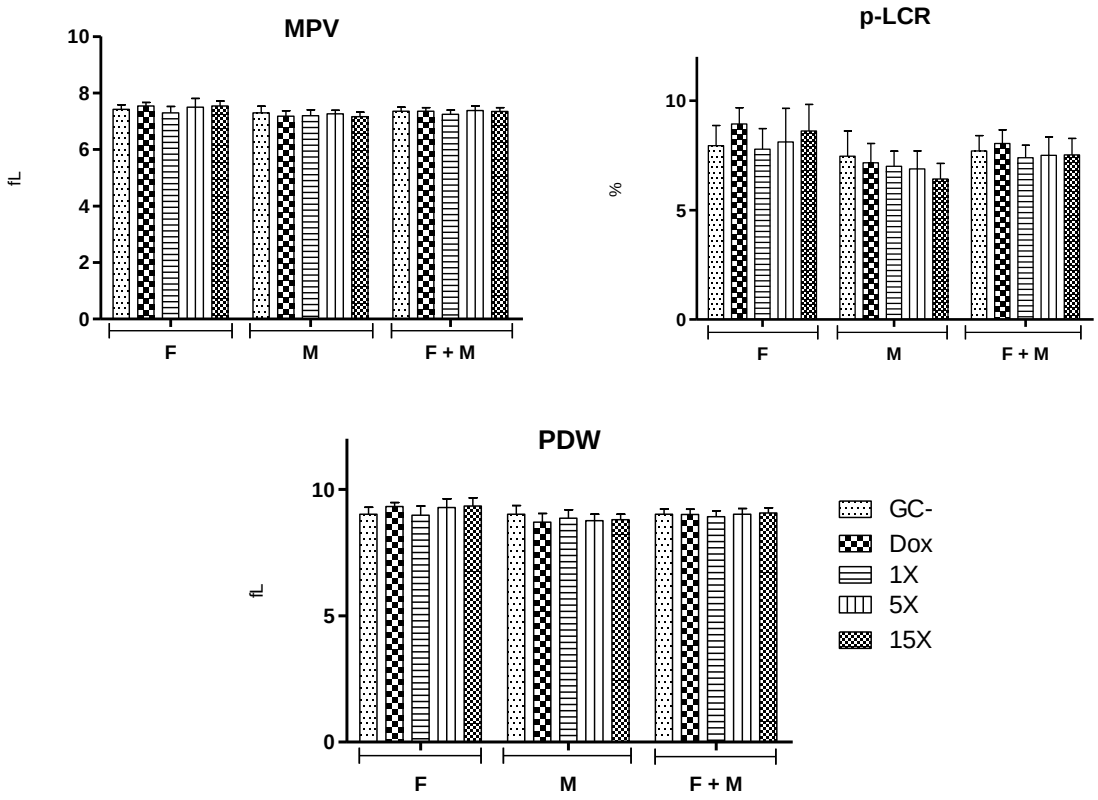


Figura 47. Volume plaquetário médio (MPV*),* variação do tamanho das plaquetas (PDW), percentual de plaquetas gigantes ou plaquetas de estress (P-LCR). F = fêmeas; M = machos. n = 5 animais por grupo.

5. Análise bioquímica

A análise da bioquímica sérica avaliou a função hepática por meio dos parâmetros TGO (enzima transaminase glutâmico oxalacética), TGP (enzima transaminase glutâmico pirúvica), bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta, a função renal por meio da uréia e creatinina; e a função pancreática por meio da lipase e amilase. A metabolização dos lipídios foi analisada pelas triglicérides séricas. A Tabela 5 mostra que o tratamento com a ayahuasca nas três doses testadas não afetou as funcões hepática, renal e pancreática dos animais tratados quando comparados ao controle.

Tabela 5 - Análise bioquímica sérica dos grupos controle (GC- e Dox) e tratados com a ayahuasca (nas doses 1X, 5X e 15X a dose ritual). Valores expressos em média ± erro padrão

Parâmetros	GC-	Dox	1X	5X	15X
TGO	111,4±11,6	209,2±37,1*	91,7±10,0	98,3±11,4	113,2±12,4
TGP	36,7±2,6	52,7±4,3 *	37,8±2,8	36,3± 3,5	36±5,2
Bilirrubina total	45±2,2	51,2±3,2	43±6,1	47,6±2,4	47,2±2,7
Bilirrubina direta	33,5±2,8	33,7±2,9	35,8±2,3	31± 1,7	34,55±2,7
Bilirrubina indireta	11,5±1,6	17,5±2,6	7,25±5,1	16,6±2,5	12,6±1,8
Uréia	39,38±3	40,38±2,5	44,6±3,2	39,6±2,4	110,3±42,4
Creatinina	24,6±0,9	27,7±1,5	25,6±1,73	25,5±1,2	104,8±50,7
Amilase	1524±149,	1527±113,	1699±81,	1619±61,	2781±1175
Lipase	19,5±0,4	17,2±2,0	17,5±1,4	18,2±0,9	18,3±0,8
Triglicerídeos	57,6±4,1[a]	88,6± 10,9[b]	79,4±9,5[b]	73,4±5,6[a]	52,5±5,1[a]

* significância estatística das médias em relação a todos os grupos; significância estatistiva entre grupos é indicada por letras diferentes, $p \leq 0,05$; n = 10 animais por grupo.

Porém, no grupo tratado 15X houve um aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina em alguns indivíduos indicando uma sensibilidade variável nessa concentração. A doxorrubicina levou a uma alteração hepática, indicada pelo aumento significativo de TGO e TGP. No GT 15X observou-se aumento na concentração de amilase, apesar de não significativo, sugerindo um possível efeito biológico requisitador de carboidratos. A metabolização dos lipídios foi analisada indiretamente pelas triglicérides séricas. O grupo Dox mostrou concentração de triglicerídeos significativamente aumentada em relação ao controle, assim como no grupo 1X esse parâmetro também se mostrou aumentado. Os demais grupos tratados não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

VI. DISCUSSÃO

Neste estudo, ratos *Wistar* foram expostos em dose única oral de ayahuasca nos níveis de 1X, 5X e 15X a dose usual, relacionada com o consumo de 150 mL do chá no contexto religioso por um indivíduo de 70 kg (2,14 mL/kg pc). Não foram observadas mortes, nem alterações macroscópicas significativas nas vísceras dos animais expostos. Não foi encontrado alteração no peso dos órgãos dos animais tratados em relação ao controle. Morais (2014) também não encontrou diferenças significativas no peso do cérebro, fígado, rins, baço e coração de animais tratados em doses agudas elevadas (30X e 50X). Nesse estudo, nenhuma alteração histopatológica significativa foi identificada nesses órgãos. Oliveira et al. (2010) observaram aumento do peso relativo do fígado em animais tratados com doses repetidas correspondente a 10 vezes a dose ritual.

Os efeitos comportamentais da ayahuasca foram avaliados neste estudo em dois momentos (1 e 2 horas após o tratamento) utilizando os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e natação forçada. O teste de campo aberto é uma medida comum de comportamento exploratório e da atividade geral em roedores, e foi inicialmente criado para avaliar o medo em ratos pelo aumento da defecação e micção (Hall, 1934). O modelo de campo aberto se baseia na aversão dos ratos a espaços abertos e por sua tendência em andar próximo de paredes, comportamento esse chamado de tigmotaxia (Lamprea et al., 2008). Esse modelo comportamental permite avaliar efeitos estimulantes ou ansiolíticos de um composto (Prut & Belzung, 2003).

Os testes de comportamento realizados em ambiente desconhecido na primeira hora após a dosagem, e repetidos na segunda hora em que o ambiente não é mais tão hostil, permitem identificar traços do comportamento emocional dos ratos frente ao desconhecido bem como a acomodação diante de uma situação revisitada. A neofobia pode ser definida como a reação comportamental de ratos submetidos à um ambiente novo e estressante (Wing et al., 1990). Essa reação é constituída por um conjunto de alterações caracterizado por pouca atividade motora, baixos níveis de preparação/autolimpeza (*grooming)* e exploração (*rearing*), também pelo

comportamento de evitar a área central do campo (tigmotaxia). Nessa situação o comportamento é considerado passivo e limitado (Katz et al., 1981).

A administração de substâncias alucinógenas com ação agonista sobre receptores 5HT-2 como a mescalina é tida como potencializadora da neofobia inicial, pois suprime atividade locomotora e comportamento exploratório no campo aberto (Wing et al., 1990). Por outro lado, a supressão do comportamento exploratório e da atividade locomotora não é observada após a administração dos agonistas serotoninérgico LSD ou 2,5-dimetoxy-4-metilamfetamina quando em ambiente familiar ou após acomodação (Wing et al., 1990). A diminuição da locomoção e capacidade exploratória foi observada nos animais tratados com ayahuasca principalmente em fêmeas do grupo 15X. Resultado semelhante foi verificado por Motta (2013) com fêmeas *Wistar* tratadas com ayahuasca nas doses 30X e 50X em comparação com os controles. A redução da locomoção no grupo 30X persistiu em segundo teste realizado 24 horas após o primeiro, corroborando com nossos resultados no teste de repetição (2ª hora).

Em relação à defecação observamos uma redução significativa na quantidade de fezes nos GT 5X e 15X em relação ao controle no TCA, diminuição que não foi significativa na segunda hora. Embora Motta (2013) e Pic-Taylor et al. (2014) não tenha encontrado diferenças estatísticas nesse parâmetro para o grupos de fêmeas tratadas com ayahuasca com doses de 15, 30 e 50X, nosso achado encontra paralelo com a administração da mescalina, agonista serotoninérgico, que também apresenta diminuição ou inibição da defecação emocional (Lush, 1975).

A exacerbação do comportamento neofóbico nos animais do grupo 15X pode ser também classificada de *freezing* (ausência de movimento) e está associada a um estado de estresse elevado, envolvendo taquipnéia e arritmias cardíacas (Walsh & Cummins, 1976). No TCA, o quadrante central é tido como uma região ansiogênica não sendo, portanto o local de primeira escolha para um animal com níveis de stress normal. Os animais com mobilidade mantida e com nível de ansiedade diminuído tendem a passar e/ou permanecer mais vezes nessa área. No presente estudo, com exceção de fêmeas do grupo 1X, o número de vezes que o animal vai ao quadrante central foi menor nos grupos tratados, apesar de não significativo. Resultado similar

ao encontrado por Motta (2013) e Pic-Taylor et al. (2014). Observou-se também uma diminuição significativa desse movimento para cada grupo quando o teste foi repetido na segunda hora.

Segundo Lacerda et al. (2006), o emprego do parâmetro de entrada na área central do campo aberto como índice de ansiedade é controverso, uma vez que medidas de ansiedade se confundem com medidas de locomoção. Esse autor observou que tanto o diazepam, um ansiolítico, quanto o pentilenotetrazol, um ansiogênico, causaram diminuição deste parâmetro e diminuíram a ambulação na periferia, o que sugere efeitos inespecíficos.

O teste LCE é baseado no comportamento exploratório de roedores e a sua aversão natural por espaços abertos, normalmente causadores de medo e ansiedade (Pellow et al., 1985; Walf & Frye, 2007). Nesse teste, o braço fechado é o local de escolha preferencial dos animais frente a uma situação hostil por conferir segurança e proteção. Por outro lado, um aumento no número de entradas, bem como um tempo de permanência aumentado nos braços abertos do aparelho indica um nível mais baixo de ansiedade (Pellow et al.,1985; Hogg, 1996), e a verificação da ação ansiolítica então se daria por uma preferência aumentada pelo braço aberto.

Nesse estudo, fêmeas tratadas com ayahuasca na dose 15X permaneceram um tempo significativamente maior no braços fechados que os outros grupos tratados, porém este aumento não foi significativo em relação ao controle. O tempo de permanência no braço aberto desse grupo tratado foi significativamente menor que o controle, e na área central significativamente menor que o grupo 1X. Femeas do grupo 15X também tiveram comportamento exploratório (*rearing*) significativamente menor que o controle, enquanto esta diminuição não foi significativa para os machos. O *rearing* é caracterizado como um comportamento exploratório observado em estado de baixa ansiedade, quando não há comprometimento de mobilidade. Juntos, estes resultados evidenciam uma menor mobilidade e capacidade exploratória das fêmeas tratadas na maior dose nesse aparelho, observação que não se mostrou clara nos machos. A diminuição da locomoção dos animais tratados na maior dose ficou clara também pelo número

significativamente menor de entradas nos braços aberto e fechado, tanto para machos (também observado na segunda hora) quanto para fêmeas.

File (2001) também observou que o comportamento dos animais com relação aos índices de ansiedade e locomoção em diversos aparelhos depende do sexo. Segundo este autor, enquanto para ratos machos a variável locomoção na porção central do Campo Aberto contribui para o mesmo fator no qual estão as medidas de ansiedade no LCE, para as fêmeas, estas mesmas variáveis pesaram mais no fator locomoção.

Pic-Taylor et al. (2014) também observaram que fêmeas tratadas com ayahuasca nas doses 15X e 30X entraram menos vezes nos braços fechados do LCE e permaneceram menos tempo na área central que o controle. Este efeito foi mais pronunciado que a fluoxetina, um ansiolítico. Halberstadt e Geyer (2011) verificaram quem ratos tratados com o DMT, presente na ayahuasca, tiveram tanto sua atividade locomotora quanto sua atividade exploratória reduzida.

O comportamento de autolimpeza (*grooming*) dos animais variou nos testes de campo aberto e LCE, apesar de não ter sido encontrado nenhuma diferença significativa com o controle. Na primeira hora para machos, enquanto no campo aberto houve um aumento dessa atividade, no LCE, os animais se limparam menos. Lacerda et al. (2006) observou que o tratamento com diazepam diminuía o tempo de *grooming*, enquanto que pentilenotetrazol aumentava este comportamento, o que faz com que estes resultados, quando avaliados isoladamente, são de difícil interpretação.

O comportamento dos animais no campo aberto e no LCE tratados nas doses mais baixas foram em alguns casos oposto aquele encontrado nos grupos de maior tratamento (15X), principalmente em fêmeas. Por exemplo, fêmeas do grupo 1X se locomoveram mais no campo aberto, cruzam mais o quadrante central e se autolimparam mais que o controle, e no LCE, permaneceram mais tempo e entraram mais no braço aberto e no quadrante central. Estes resultados podem sugerir que enquanto doses mais altas de ayahuasca têm efeito negativo na locomoção dos

animais nesses aparelhos, em doses mais baixas, esta infusão tem um potencial efeito ansiolítico.

O teste de natação forçada (TNF) é um dos testes mais usados para avaliar o potencial antidepressivo de uma substância em modelos animais. Nesse teste, o rato é colocado em um recipiente com água, e, sem suporte, sua reação inicial é nadar e tentar escapar do cilindro (Porsolt et al., 1978). Após um período de atividade vigorosa, o animal assume uma postura de flutuação, que pode ser revertida por substancias com ação antidepressiva (Detke et al., 1995). A utilização do TNF para avaliar o efeito antidepressivo dos inibidores da MAO foi descrito pela primeira vez por Loomer et al. (1957).

Inibidores seletivos da recaptação de serotonina como a fluoxetina diminuem o tempo de imobilidade e aumentam o tempo de natação enquanto agentes catecolaminérgicos diminuem imobilidade e aumentam o tempo de climbing (Cryan et al., 2002, Dulawa et al., 2004). No TNF, grupos tratados com ayahuasca mostraram-se mais ativos na água que os animais do grupo controle. Na primeira hora, foi evidenciado aumento do tempo de *climbing* em todas as doses, com diferença significativa para machos nas doses 1X e 5X.

O tempo de natação significativamente aumentado foi observado somente em fêmeas do grupo 15X na segunda hora, quando também apresentaram uma menor imobilidade em relação ao controle. Motta (2013), utilizando o mesmo protocolo usado neste estudo, também encontrou maior tempo de natação e atividade de *climbing* em fêmeas tratadas com ayahuasca nas doses 30X e 50X quando comparado ao controle. Pic-Taylor et al. (2014), utilizando um protocolo que inclui um período de adaptação no cilindro de água 24 horas antes do tratamento (Detke et al.,1995), também encontrou que fêmeas tratadas com ayahuasca nas doses de 15X e 30X nadaram significativamente por mais tempo e ficaram menos imóveis que os controles, efeitos que foram mais pronunciados que o ansiolítico fluoxetina

A redução do tempo de imobilidade é um efeito associado à ação de antidepressivos (Borsini, 1995), e os resultados conduzidos neste estudo e outros conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa indicam um potencial efeito

antidepressivo da ayahuasca. Essa ação antidepressiva foi observada por Farzin & Mansouri (2006) em camundongos e Fortunato et al. (2009) em ratos tratados com as β-carbolinas, substâncias presentes na ayahuasca. O aumento observado no comportamento ativo do tipo *climbing* reflete também a complexidade do mecanismo de ação da ayahuasca. O comportamento de *climbing* está associado a fármacos predominantemente de ação catecolaminérgica (dopamina) enquanto o comportamento de natação está associado à ação serotoninérgica (Borsini, 1995; Slattery & Cryan, 2012).

Os ensaios de genotoxicidade mostraram que ayahuasca mostrou baixo potencial genotóxico nos testes de fragmentação de DNA por citometria de fluxo e na análise microscópica de fluorescência no ensaio cometa. Curiosamente, o grupo 1X de fêmeas mostrou aumento significativo da fragmentação do DNA analisada em citometria de fluxo em relação ao controle e as demais doses (5X e 15X), porém essa fragmentação foi também significativamente menor que o grupo Dox e não se mostrou dose-dependente. É possível que o comportamento ativo estimulado pela ayahuasca nesse grupo possa ter produzido uma maior fragmentação de DNA. Vale ressaltar que as alterações genotóxicas observadas no ensaio cometa e na citometria de fluxo são passíveis de reparo dependendo da intensidade da lesão.

Embora Figueroa (2012) tenha utilizado imunohistoquímica para mensurar a fragmentação de DNA em neurônios para verificar a apoptose, este estudo utilizando o extrato *in natura* em roedores em condições semelhantes ao consumo humano tradicional é, um estudo pioneiro em genotoxicidade da ayahuasca. Estudos de genotoxicidade com β-carbolinas *in vitro* e *in vivo* mostraram resultados contraditórios (Schenberg, 2013). Meester (1995) afirma que as β-carbolinas harman e horhaman apresentam efeito genotóxico, entretanto essas substâncias não estão presentes na ayahuasca em quantidades significativas. Estudos com harmina demonstraram efeito genotóxico pelo ensaio cometa com células V79 (hamster chinês e fibroblastos), indicando danos significativos no DNA em todas as concentrações testadas (Meester, 1995; Boeira et al., 2001). Existem também relatos de indução de lesões no DNA em fungos pela harmina (Boeira et al., 2002).

Em outro estudo, a harmina não apresentou efeitos genotóxicos em fungos, bactérias e cultura celular (Picada et al., 1997).

Por outro lado, estudos recentes mostram que a harmina e harmalina possuem propriedades antigenotóxicas, antimutagênicas e inibidoras de tumores em culturas celulares (Chen et al., 2005; Moura et al., 2007).

Snyder (2010) mostra que a presença do grupo N-dimetil em estruturas moleculares de fármacos pode estar ligada a ação clastogênica. Esse tipo de grupamento, presente na molécula do DMT, teria num possível efeito genotóxico por intercalar ao DNA, se ligando de forma não-covalente ou por inibição da topoisomerase. Embora se tenha constatado que a presença desse grupo molecular está ligada a ação genotóxica, estudo de aberrações cromossômicas com DMT puro, não produziu efeito genotóxico, revelando que a presença do grupo n-dialquil é frequentemente necessário, mas não suficiente para causar genotoxicidade (Snyder, 2010).

Em relação a possíveis alterações citogenéticas provocadas pela ayahuasca, o teste de micronúcleos mostrou que as doses mais baixas (1X e 5X) não produziram aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPC Mn), efeito que foi observado somente na dose 15X. Em estudo conduzido por Picada et al. (1997) com camundongos utilizando harmina e harman (46 e 30 mg/kg pc, respectivamente; intraperitoneal) não induziram formação de micronúcleos nem alterações cromossômicas. Por outro lado, essas substâncias mostraram atividade mutagênica *in vitro* (Picada et al., 1997).

A ausência de ação citotóxica da ayahuasca nas células da medula óssea mostrada pela proporção de eritrócitos jovens por eritrócitos maduros é reforçada pelos resultados da analise hematológica que também não revelaram alterações significativas. Picada et al. (1997) também não encontraram diferença significativa na proporção de eritrócitos policromáticos por eritrócitos totais quando compararam grupos tratados com harmina e com harmam e grupo controle.

Boeira et al. (2002), usando *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) afirma que o efeito citotóxico e mutagênico da harmina depende da fase do crescimento e da

concentração da ß-carbolina. Boeira et al. (2001) em ensaio *in vitro* com células V79 com harmina, mostrou aumento significativo de aberrações cromossômicas nas concentrações de 20 a 40 µg/ml; a concentração de 50 µg/ml foi tóxica e não permitiu essa análise.

Estudos *in vitro* com células humanas realizado por Jiménez et al. (2008) indicaram que harmina e harmalina não foram capazes de induzir eventos relacionados à quebra de dupla fita, entretanto produziram necrose e apoptose nas concentrações mais altas. Além de a harmina ter se mostrado mais citotóxica do que a harmalina, mostrou também efeito inibidor da proliferação de células tumorais (Jimenez et al., 2008). A ligação de pequenas moléculas ao DNA está associada a respostas mutagênicas, carcinogênicas e antitumorais. A afinidade dessas moléculas e a estabilidade da ligação alcalóide-DNA determinam seu efeito biológico. Harmina tem uma constante de ligação com o DNA maior do que harmalina (Nafisi et al., 2010).

No presente estudo, não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com ayahuasca e o grupo controle nos parâmetros hematológicos analisados, indicando ausência de citotoxicidade sobre as células sanguíneas e tecido hematopoiético. Oliveira et al. (2010) também não encontraram alterações séricas dos parâmetros bioquímicos em animais tratados com doses repetidas correspondente a 10 vezes dose ritual. Riba et al. (2001) não encontrou alterações séricas significativas em 6 homens voluntários após o uso da ayahuasca numa sessão experimental.

Em relação às funções renal, hepática, pancreática e metabolismo de lipídios e carboidratos os parâmetros bioquímicos analisados não mostraram alterações significativas das funções analisadas. Estudo realizado com ratos *Wistar* machos em modelo terapêutico para hipertensão não encontrou diferenças significativas nas concentrações séricas de uréia, creatinina e TGP tanto em animais tratados semanalmente quanto diariamente, entretanto em animais tratados diariamente com ayahuasca houve alteração significativa na concentração de TGO, indicando potencial hepatotóxico nessas condições (Santos et al., 2014). Esse estudo mostrou

que ayahuasca não teve ação antipressórica esperada nas condições testadas, mas a análise histopatológica de rins e coração não revelou danos significativos.

O estudo aqui apresentado foi realizado utilizando cinco animais por grupo/sexo, seguindo o protocolo OECD 474 para os testes de genotoxicidade, que foi o objetivo primário do estudo. Seguindo as recomendações das comissões de ética de experimentação animal de um melhor aproveitamento do uso dos animais, decidiu-se por utilizá-los para realizar os testes de comportamento. Este número, porém, é menor que o sugerido pelos testes comportamentais (8 a 12 indivíduos por grupo), o que pode ter dificultado a identificação de algumas diferenças entre os grupos tratados e entre machos e fêmeas.

VII. CONCLUSÃO

1) O uso oral de ayahuasca afetou de forma diferente o comportamento de machos e fêmeas.
2) A atividade motora se mostrou reduzida nos grupos tratados 15X nos testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, não sendo possível predizer uma ação ansiolítica associada a uso de ayahuasca nesta dose. Porém, os resultados sugerem um comportamento ansiolitico nas fêmeas tratadas com doses baixas (1X).
3) No teste de Natação Forçada, os animais tratados com ayahuasca mostraram maior comportamento ativo evidenciando efeito preditivo de ação similar a antidepressivos. Esse resultado corrobora estudos anteriores realizados por este grupo utilizando doses agudas elevadas.
4) Animais tratados nas doses 1X e 5X não apresentaram efeito genotóxico, entretanto na dose 15X foram observados danos citogenéticos indicados pelo aumento da incidência de micronúcleos.
5) A ayahuasca não induziu alteração na proporção de eritrócitos jovens em relação à população total, não indicando, portanto citoxicidade.
6) A ausência de citoxicidade também foi evidenciada pela análise das séries sanguíneas (eritrocítica, leucocítica e plaquetária).
7) A análise de parâmetros bioquímicos não evidenciou comprometimento das funções fisiológicas de fígado, rins, pâncreas dos animais tratados, embora alguns indivíduos do grupo 15X tenham apresentado resultados discrepantes.

Em conjunto, o estudo mostrou que ayahuasca não é genotóxica nem citotóxica nas doses testadas e sugere um potencial efeito ansiolítico e antidepressivo nas doses mais baixas, o que abre a perspectiva de investigação de sua utilização ou de princípios ativos presentes em sua constituição em terapia humana. Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa irá investigar este potencial terapêutico em estudo crônico em doses baixas de ayahuasca.

X. REFERÊNCIAS

Allen, M. (2014). "Xamãs fajutos podem causar sua morte. 06/05/2014." Disponível em: <http://www.vice.com/pt_br/read/a-beginners-guide-to-ayahuasca>. Acessado em: 21/09/2014 as 10:45.15.

Anderson, B. T., Labate, B. C., Meyer, M., Tupper, K. W., Barbosa, P. C., Grob, C. S. e McKenna, D. (2012). Statement on ayahuasca.*International Journal of Drug Policy*, *23*(3), 173-175.

Barzilai, A. & Yamamoto, K.-I. (2004). "DNA damage responses to oxidative stress." DNA repair 3(8): 1109-1115.

Berlin, I., Saïd, S., Spreux-Varoquaux, O., Launay, J. M., Olivares, R., Millet, V. & Puech, A. J. (1995). "A reversible monoamine oxidase A inhibitor (moclobemide) facilitates smoking cessation and abstinence in heavy, dependent smokers*." Clinical Pharmacology & Therapeutics 58(4): 444-452.

Bhuyan, B., Zimmer, D., Mazurek, J. H., Trzos, R. J., Harbach, P. R., Shu, V. S., & Johnson, M. A. (1983). "Comparative genotoxicity of adriamycin and menogarol, two anthracycline antitumor agents." Cancer research 43(11): 5293-5297.

Birkmayer, W., Riederer, P. Ambrozi, L., & Youdim, M. B. H. (1977). "Implications of combined treatment with'madopar'and l-deprenil in parkinson's disease: A Long-term Study." The Lancet 309(8009): 439-443.

Bloom, J. C. & Brandt J. T. (2012). Respostas Tóxicas do Sangue. In:Curtis D. Klaassen; John B Watkins. Fundamentos de toxicologia de Casarett e Doull (Lange), Porto Alegre - RS. AMGC Editora. : p. 149-162.

Boeira, J. M., Da Silva, J., Erdtmann, B., & Henriques, J. A. (2001) "Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro." Pharmacology & toxicology 89(6): 287-294.

Boeira, J. M., Viana, A. F., Picada, J. N., & Henriques, J. A. P. (2002) "Genotoxic and recombinogenic activities of the two β-carboline alkaloids harman and harmine in Saccharomyces cerevisiae." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 500(1): 39-48.

Bonnet, U. (2003). "Moclobemide: therapeutic use and clinical studies." CNS drug reviews 9(1): 97-140.

Borsini, F. (1995). "Role of the serotonergic system in the forced swimming test." Neuroscience & Biobehavioral Reviews 19(3): 377-395.

Brambilla, G., Mattioli, F., & Martelli, A. (2009). "Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants." Toxicology 261(3): 77-88.

Brasil (1986). "Resolução nº 06/CONFEN, 04 Fevereiro 1986".

Brasil (2010). Resolução nº 01/CONAD, 25 Janeiro 2010.

Brierley, D. I.; Davidson, C. (2012). "Developments in harmine pharmacology — Implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 39(2): 263-272.

Brito, A. R. M. S. A., Costa, M. A.; M.; Carvalho, J. E.; Dias, P. C. (1994). "Efeitos farmacológicos do decocto (hoasca) de Banisteriopsis caapi ePsychotria 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 daFESBE, São Paulo, SP. (doc. nº V.V.2.41), p. 203.

Brito, G. d. S. (2004). "Farmacologia humana da Hoasca (chá preparado de plantas alucinógenas usado em contexto ritual no Brasil)." Labate, BC, Araújo, WS, organizadores. O uso ritual da ayahuasca. 2ª ed. Campinas: Mercado de Letras: 623-651.

Callaway, J., Grob, C. S., McKenna, D. J., Nichols, D. E., Shulgins, A., Tupper, K. W. (2006). "A demand for clarity regarding a case report on the ingestion of 5-methoxy-N, N-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) in an ayahuasca preparation." Journal of analytical toxicology 30(6): 406-407.

Callaway, J. C., McKenna, D., Grob, C. S., Brito, G. S., Raymon, L. P., Poland, R. E. & Mash, D. C. (1999). "Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans." Journal of Ethnopharmacology 65(3): 243-256.

Callaway, J. C. & Grob, C. S. (1998). "Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse interactions." Journal of Psychoactive Drugs 30(4): 367-369.

Carlini, E. (2003). "Plants and the central nervous system." Pharmacology Biochemistry and Behavior 75(3): 501-512.

Castagné, V., Porsolt, R. D., & Moser, P. (2009). "Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse." European journal of pharmacology 616(1): 128-133.

Cazenave, S. d. O. S. (1996). Alucinógenos. Fundamentos de toxicologia, Atheneu: 329-343.

Charles, R. (1982). "Baseline hematology and clinical chemistry values for Charles River Wistar rats (CRL (W) BR) as a function of sex and age." Charles River Technical Bulletin 1(2).

Chen, Q., Chao, R. Chen, H., Hou, X., Yan, H., Zhou, S., ... & Xu, A. (2005). "Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis." International journal of cancer 114(5): 675-682.

Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair." Molecular biotechnology 26(3): 249-261.

Collins, A. R., Ai-Guo, M., & Duthie, S. J. (1995). "The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells." Mutation Research/DNA Repair 336(1): 69-77.

Costa, M. C. M., Figueiredo, M. C., & Cazenave, S. D. O. S. (2005). "Ayahuasca: uma abordagem toxicológica do uso ritualístico." Revista de Psiquiatria Clínica 32(6): 310-318.

Criswell, K., Krishna, G., Zielinski, D., Urda, G. A., Juneau, P., Bulera, S., & Bleavins, M. R. (2003). "Validation of a flow cytometric acridine orange micronuclei methodology in rats." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 528(1): 1-18.

Criswell, K., Krishna, G, Zielinski, D., Urda, G. A., Theiss, J. C., Juneau, P., & Bleavins, M. R. (1998). "Use of acridine orange in: flow cytometric evaluation of erythropoietic cytotoxicity." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 414(1): 49-61.

Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs." Trends in Pharmacological Sciences 23(5): 238-245.

Dalgarno, P. (2008). "Buying Ayahuasca and other entheogens online: A word of caution." Addiction Research & Theory 16(1): 1-4.

Davidov, V. M. (2010). "Shamans and shams: The discursive effects of ethnotourism in Ecuador." The Journal of Latin American and Caribbean Anthropology 15(2): 387-410.

Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). (1995). "Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants." Psychopharmacology 121(1): 66-72.

dos Santos, J. O. (2010). "Diferentes contextos, múltiplos objetos: reflexões acerca do pedido de patrimonialização da Ayahuasca." 27ª. Reunião Brasileira de Antropologia. Bélem-Pará, Brasil.

dos Santos, R. G. (2011). Ayahuasca: Physiological and subjective effects, comparison with d-amphetamine, and repeated dose assessment, Doctoral thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Available at: https://www. educacion. gob. es/teseo/mostrarRef. do.

Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., & Hen, R. (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *29*(7), 1321-1330.

Escobar, J. A. C. & Roazzi, A. (2010). "Panorama Contemporâneo do Uso Terapêutico de Substâncias Psicodélicas: Ayahuasca e Psilocibina." Neurobiologia 73(3): 159-172.

Fábregas, J. M., González, D., Fondevila, S., Cutchet, M., Fernández, X., Barbosa, P. C. R., Bouso, J. C. (2010). "Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca." Drug and alcohol dependence 111(3): 257-261.

Failace, R. (2009). Hemograma: manual de interpretação, Artmed.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995). "The comet assay: a comprehensive review." Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology 339(1): 37-59.

Faldyna, M., Levá, L., Knötigová, P., & Toman, M. (2001). "Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs—a flow cytometric study." Veterinary immunology and immunopathology 82(1): 23-37.

Fantegrossi, W. E., Murnane K. S., Reissig, C. J. (2008). "The behavioral pharmacology of hallucinogens." Biochemical pharmacology 75(1): 17-33.

Farzin, D. & Mansouri, N. (2006). "Antidepressant-like effect of harmane and other β-carbolines in the mouse forced swim test." European neuropsychopharmacology 16(5): 324-328.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., & Thomas, P. (2011). "Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells." Mutagenesis 26(1): 125-132.

Figueroa, A. R. M. (2012). Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca, Universidade de São Paulo.

File, Sandra E (2001). Factors controling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. Behavioural Brain Research 125; 2001: 151- 157

Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6809): 239-247.

Fortunato, J. J., Réus, G. Z., et al. (2009). "Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 33(8): 1425-1430.

Friedman, M. & Cuq, J. L. (1988). "Chemistry, analysis, nutritional value, and toxicology of tryptophan in food. A review." Journal of Agricultural and Food Chemistry 36(5): 1079-1093.

Gable, R. S. (2007). "Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids." Addiction 102(1): 24-34.

Gaujac, A., Navickiene, S., Collins, M. I., Brandt, S. D., de Andrade, J. B. (2012). "Analytical techniques for the determination of tryptamines and b-carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices." Drug Testing and Analysis.

Halberstadt, A. L. & Geyer, M. A. (2011). "Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens." Neuropharmacology 61(3): 364-381.

Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, *18*(3), 385.

Halpern, J. H. (2004). "Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States." Pharmacology & therapeutics 102(2): 131-138.

Hamsa, T. & Kuttan, G. (2010). "Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro." European journal of pharmacology 649(1): 64-73.

Handley, S. L. & Mithani, S. (1984). "Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour." Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 327(1): 1-5.

Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., & Sutou, S. (2000). "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring." Environmental and molecular mutagenesis 35(3): 234-252.

Hayashi, M., Tice, R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., ... & Vannier, B. (1994). "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay."

Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 312(3): 293-304.

Hearn, K. (2013). "The dark side of Ayahuasca. Men's Journal, 03/2013." Disponível em <http://www.mensjournal.com/magazine/the-dark-side-of-ayahuasca-20130215>. Acessado em 21/09/2014 as 10: 47.30.

Hindmarch, I. (2002). "Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods." European Psychiatry 17: 294-299.

Hogg, S., (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. Pharmacology Biochemistry Behavior 54: 21–30.

Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Humphrey, P. P. (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacological reviews 46(2): 157-203.

Hulsken, S., Märtin, A., Mohajeri, M. H., & Homberg, J. R. (2013). "Food-derived serotonergic modulators: effects on mood and cognition." Nutrition research reviews 26(02): 223-234.

Jagetia, G. C. & Reddy, T. K. (2002). "The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 519(1): 37-48.

Jałoszyński, P., Kujawski M., Czub-Świerczek, M., Markowska, J., & Szyfter, K. (1997). "Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay." Mutation Research/DNA Repair 385(3): 223-233

Jimenez, J., Riveron-Negrete, L., Abdullaev, F., Espinosa-Aguirre, J., & Rodríguez-Arnaiz, R. (2008). "Cytotoxicity of the β-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro." Experimental and Toxicologic Pathology 60(4): 381-389.

Johnson, M. W., Richards, W. A., Griffiths, R. R. (2008). "Human hallucinogen research: guidelines for safety." Journal of Psychopharmacology.

Katz, R. J., Roth, K. A., & Carroll, B. J. (1981). "Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression." Neuroscience & Biobehavioral Reviews 5(2): 247-251.

Krishna, G. & Hayashi M. (2000). "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 455(1): 155-166.

Krishnan, V. & Nestler, E. J. (2008). "The molecular neurobiology of depression." Nature 455(7215): 894-902.

Labate, B. C., MacRae, E. & Goulart, S. L. (2010). "Brazilian ayahuasca religions in perspective." Ayahuasca, ritual and religion in Brazil: 1-20.

Lacerda, R. B., & Souza-Formigoni, M. L. O. (2000). Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties?. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *67*(2), 225-232.

Lähdetie, J. (1983). "Meiotic micronuclei induced by adriamycin in male rats." Mutation Research Letters 119(1): 79-82.

Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Setem, J., Morato, S., (2008). Thigmotactic responses in an open-field. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 41: 135-140.

Liester, M. B. & Prickett, J. I. (2012). "Hypotheses Regarding the Mechanisms of Ayahuasca in the Treatment of Addictions." Journal of Psychoactive Drugs 44(3): 200-208.

Loomer, H.P., Saunders, J.C., Kline, N.S., 1957. A clinic and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. Psychiatry Research Reports 8: 129–141.

Lucena, G. M., Porto, F. A., Campos, É. G., Azevedo, M. S., Cechinel-Filho, V., Prediger, R. D., & Ferreira, V. M. (2010). "Cipura paludosa attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development." Ecotoxicology and environmental safety 73(6): 1150-1158.

Lush, I. (1975). "A comparison of the effect of mescaline on activity and emotional defaecation in seven strains of mice." British journal of pharmacology 55(1): 133-139.

MacRae, E. (2004). "The ritual use of ayahuasca by three Brazilian religions." Drug use and cultural contexts_ beyond the West ‘: Tradition, change and post-colonialism: 27-45.

Martinez, S. T., Almeida M. R., e Pinto A. C. (2009). "Alucinógenos naturais: um voo da Europa Medieval ao Brasil." Quím Nova Vol. 32, No. 9: 2501-2507.

McKenna, D. J. (1998). Ayahuasca: An ethnopharmacologic history.

McKenna, D. J. (2004). "Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges." Pharmacology & therapeutics 102(2): 111-129.

McKenna, D. J., Callaway, J. C., Grob, C. S. (1998). "The scientific investigation of Ayahuasca: a review of past and current research." The Heffter Review of Psychedelic Research 1(65-77).

McKenna, D. J., Repke D. B., Lo, L., Peroutka, S. J. (1990). "Differential interactions of indolealkylamines with 5-hydroxytryptamine receptor subtypes." Neuropharmacology 29(3): 193-198.

McKenna, D. J., Towers, G. N., Abbott, F. (1984). "Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and β-carboline constituents of Ayahuasca." Journal of Ethnopharmacology 10(2): 195-223.

Meester, C. (1995). "Genotoxic potential of β-carbolines: a review." Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology 339(3): 139-153

Mejía, L. M. Á. (2008). "Borrachero, cacao sabanero o floripondio (*brugmansia spp*.) Un grupo de plantas por redescobrir en la biodiversidad latinoamericana." cult.drog. 13(15): 77-93, 2008.

Mendlewicz, J. & M. Youdim (1983). "L-Deprenil, a selective monoamine oxidase type B inhibitor, in the treatment of depression: a double blind evaluation." The British Journal of Psychiatry 142(5): 508-511.

Montgomery, K. (1955). "The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive." Journal of comparative and physiological Psychology 48(4): 254.

Morais, J. A. d. (2014). "Toxicidade aguda e crônica do chá ayahuasca (*Banisteriopsis Caap*i e *Psychotria Viridis*), por análise histológica em ratas *wistar*." Dissertação - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília.

Moser, V. C. (2011). "Functional assays for neurotoxicity testing." Toxicologic pathology 39(1): 36-45.

Motta, L. S. G. d. (2013). "Toxicidade aguda, neurotoxicidade reprodutiva e embriotoxicidade do chá ayahuasca (Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis) em ratas wistar." Dissertação - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília.

Moura, D. J., Richter, M. F., Boeira, J. M., Henriques, J. A. P., & Saffi, J. (2007). "Antioxidant properties of β-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities." Mutagenesis 22(4): 293-302.

Nafisi, S., Bonsaii, M. Maali, P., Khalilzadeh, M. A., & Manouchehri, F. (2010). "β-Carboline alkaloids bind DNA." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 100(2): 84-91.

Naranjo, P. (1986). "El ayahuasca in la arqueología ecuatoriana." America Indigena 46(1): 117-127.

Norbury, C. J. & Hickson, I. D. (2001). "Cellular responses to DNA damage." Annual review of pharmacology and toxicology 41(1): 367-401.

OECD (1997). 474, OECD Guideline for the Testing of Chemicals.

Olive, P. L. & Banáth, J. P. (2006). "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." Nature protocols 1(1): 23-29.

Oliveira, C. D. R., Moreira, C. Q., de Sá, L. R. M., Spinosa, H., & Yonamine, M. (2010). "Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in Wistar rats." Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology 89(3): 207-212.

Ostling, O. & Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and biophysical research communications, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

Ott, J. (1999). "Pharmahuasca: human pharmacology of oral DMT plus harmine." Journal of Psychoactive Drugs 31(2): 171-177.

Owens, M. J. & Nemeroff, C. B (1994). "Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter." Clinical chemistry 40(2): 288-295.

Palus, J., Dziubałtowska, E., & Rydzyński, K. (1999). "DNA damage detected by the comet assay in the white blood cells of workers in a wooden furniture plant." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 444(1): 61-74.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., (1985). Validation of open closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. Journal of Neuroscience Methods 14: 149-67.

Petit-Demouliere, B., Chenu, F., & Bourin, M. (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." Psychopharmacology 177(3): 245-255.

Pic-Taylor, A., Motta, L. G., Morais, J, A., Santos, A. F. A., Melo Jr, W., Campos, L. A., Mortari, M. R., von Zuben, M. V., & Caldas, E. D. (2014). "Acute oral toxicity, behaviour and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (Banisteropsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rats." em revisão.

Picada, J. N., da Silva, K. V., et al. (1997). "Genotoxic effects of structurally related β-carboline alkaloids." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 379(2): 135-149.

Pires, A. P., Oliveira, C. D., Yonamine, M. (2010). "Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos." Rev. ciênc. farm. básica apl v .31 n (1).

Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). "Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments." European journal of pharmacology 47(4): 379-391.

Prut, L. & C. Belzung (2003). "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review." European journal of pharmacology 463(1): 3-33.

Queiroz, M. M. F. (2013) . Identificação dos inibidores de acetilcolinesterase em Tetrapterys mucronata Cav.(Malpighiaceae) e comparação quali e quantitativa dos derivados triptamícos presentes na espécie em estudo e Ayahuasca. 179 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química de Araraquara.

Ramos, A. (2008). "Animal models of anxiety: do I need multiple tests?" Trends in Pharmacological Sciences 29(10): 493-498.

Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D., & Izídio, G. S. (2008). "Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial." Behavioural brain research 193(2): 277-288.

Rennie, C. M., Thompson, S., Parker, A. C., & Maddy, A. (1979). "Human erythrocyte fractionation in “Percoll” density gradients." Clinica Chimica Acta 98(1): 119-125.

Riba, J., Rodríguez-Fornells, A., Urbano, G., Morte, A., Antonijoan, R., Montero, M., & Barbanoj, M. J. (2001). "Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers." Psychopharmacology 154(1): 85-95.

Riba, J., Valle, M., Urbano, G., Yritia, M., Morte, A., & Barbanoj, M. J. (2003). "Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 306(1): 73-83.

Romagna, F. & Staniforth C. D. (1989). "The automated bone marrow micronucleus test." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 213(1): 91-104.

Samoylenko, V., Rahman, M. M., Tekwani, B. L., Tripathi, L. M., Wang, Y. H., Khan, S. I. & Muhammad, I. (2010). "Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to

neurodegenerative disorders and Parkinson's disease." Journal of Ethnopharmacology 127(2): 357-367.

Santos, A. C., Azevedo, B. R. M. S., Pereira, N. K., Irulegui, R. D. S. C., & Baracho, N. C. D. V. (2014). "Efeitos Cardiovasculares, Renais e Hepáticos Produzidos pela Administração Crônica de Ayahuasca em Ratos Hipertensos/Cardiovascular, Renal and Hepatic Effects Produced by Chronic Administration of Ayahuasca in Hypertensive Rats." Revista Ciências em Saúde 3(4): 21-38.

Santos, R. G. d. (2007). "Ayahuasca: neuroquímica e farmacologia." SMAD. Revista eletrônica saúde mental álcool e drogas 3(1): 00-00.

Schenberg, E. E. (2013). "Ayahuasca and cancer treatment." SAGE Open Medicine 1: 2050312113508389.

Schmid, W. (1975). "The micronucleus test." Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 31(1): 9-15.

Shabbir, F., Patel, A., Mattison, C., Bose, S., Krishnamohan, R., Sweeney, E., Sharma, S. (2013). "Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression." Neurochemistry international 62(3): 324-329.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Experimental cell research 175(1): 184-191.

Sklerov, J., Levine,B., Moore, K. A., King, T., & Fowler, D. (2005). "A fatal intoxication following the ingestion of 5-methoxy-N, N-dimethyltryptamine in an ayahuasca preparation." Journal of analytical toxicology 29(8): 838-841.

Slattery, D. A. & Cryan, J. F. (2012). "Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents." Nature protocols 7(6): 1009-1014.

Slupphaug, G., Kavli, B., & Krokan, H. E. (2003). "The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 531(1): 231-251.

Smith, C. C., Adkins, D. J., Martin, E. A., & O'Donovan, M. R. (2008). "Recommendations for design of the rat comet assay." Mutagenesis 23(3): 233-240.

Smith, R. L., Canton, H., Barrett, R. J., Sanders-Bush, E. (1998). "Agonist Properties of N, N-Dimethyltryptamine at Serotonin 5-HT2A and 5-HT 2C Receptors." Pharmacology Biochemistry and Behavior 61(3): 323-330.

Snyder, R. D. (2010). "Possible structural and functional determinants contributing to the clastogenicity of pharmaceuticals." Environmental and molecular mutagenesis 51(8-9): 800-814.

Steimer, T. (2011). "Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues." Dialogues Clin Neurosci 13(4): 495-506.

Taiwo, A. E., Leite, F. B., Lucena, G. M., Barros, M., Silveira, D., Silva, M. V., & Ferreira, V. M. et al. (2012). "Anxiolytic and antidepressant-like effects of Melissa officinalis (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender." Indian journal of pharmacology 44(2): 189.

ter Haar, E., Day, B. W., & Rosenkranz, H. S (1996). "Direct tubulin polymerization perturbation contributes significantly to the induction of micronuclei in vivo." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 350(2): 331-337.

Thomas, G., P, Lucas, P. Capler, N. R., Tupper, K. W., & Martin, G. (2013). "Ayahuasca-assisted therapy for addiction: results from a preliminary observational study in Canada." Current drug abuse reviews 6(1): 30-42.

Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., & Sasaki, Y. F. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environmental and molecular mutagenesis 35(3): 206-221.

Tupper, K. W. (2008). "The globalization of ayahuasca: harm reduction or benefit maximization?" Int J Drug Policy 19(4): 297-303.

Tupper, K. W. (2009). "Entheogenic healing: The spiritual effects and therapeutic potential of ceremonial ayahuasca use." The healing power of spirituality: How religion helps humans thrive 3: 269-282.

Venkatesh, P., Shantala, B., Jagetia, G. C., Rao, K. K., & Baliga, M. S. (2007). "Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study." Integrative cancer therapies 6(1): 42-53.

Wakata, A., Miyamae, Y., Sato, S. I., Suzuki, T., Morita, T., Asano, N., ... & Hayashi, M. (1998). "Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS· MMS." Environmental and molecular mutagenesis 32(1): 84-100.

Walf, A.A., & Frye, C.A., (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nature Protocols 2: 322–328.

Walsh, R. N. & Cummins, R. A. (1976). "The open-field test: A critical review." Psychological bulletin 83(3): 482.

Wing, L. L., Tapson, G. S., & Geyer, M. A. (1990). "5HT-2 mediation of acute behavioral effects of hallucinogens in rats." Psychopharmacology 100(3): 417-425.

Wong, V., Szeto, Y., Collins, A. R., & Benzie, I. F. F. (2005). "The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research." Curr Top Nutraceutical Res 3(1): 1-14.

Zhou, B.B. S. & Elledge, S. J. (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature 408(6811): 433-439.

XI. ANEXOS

Anexo A – Aprovação no Comitê de Ética no Uso Animal

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 05 de abril de 2012.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO GENETÓXICA E CITÓXICA DO CHÁ DE AYAHUASCA EM RATOS WISTAR**", UnBDOC n.º 38469/2012, sob responsabilidade da Profa. Eloisa Dutra Caldas foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. José Raimundo Corrêa
Coordenador da CEUA

Anexo B – Resultados teste do labirinto em cruz elevado em valores percentuais

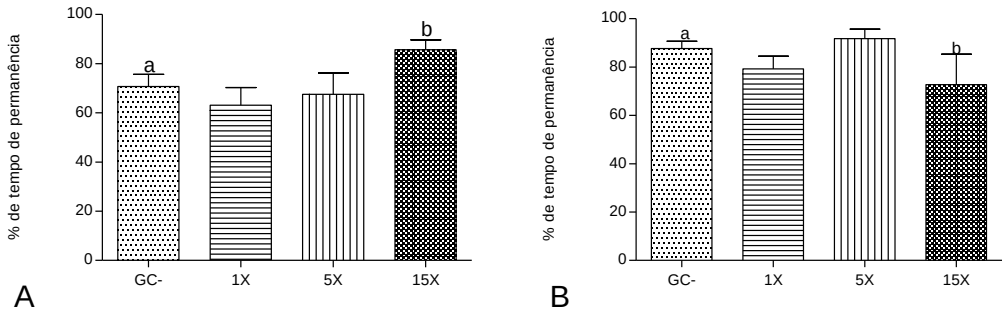


Figura 1. Percentual de permanência no braço fechado no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B), n = 10 (fêmeas e machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

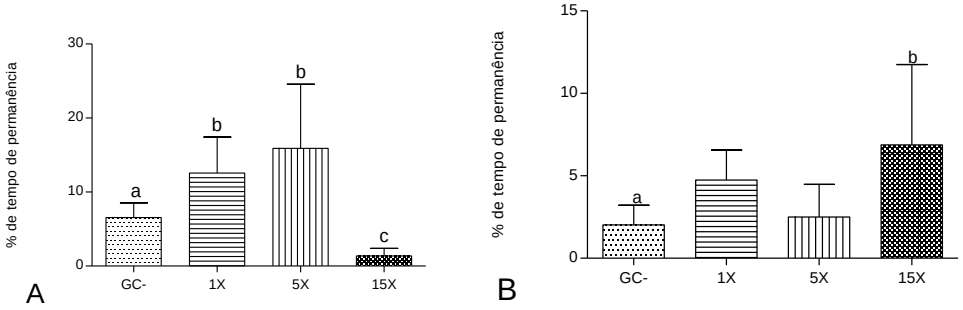


Figura 2. Percentual de permanência no braço aberto no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 10 (fêmeas e machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

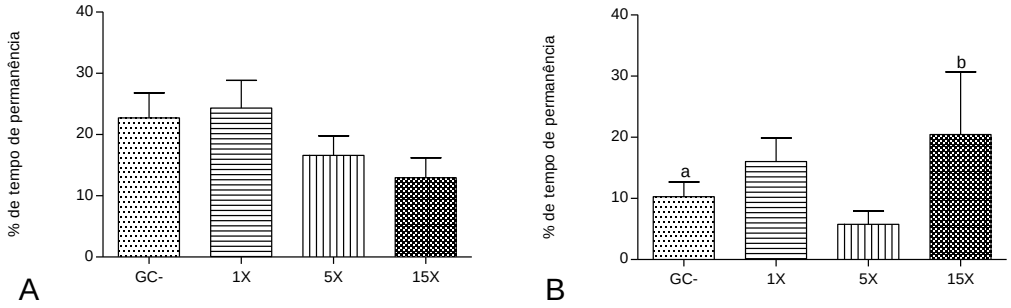


Figura 3. Percentual de permanência na área central no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 10 (fêmeas e machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

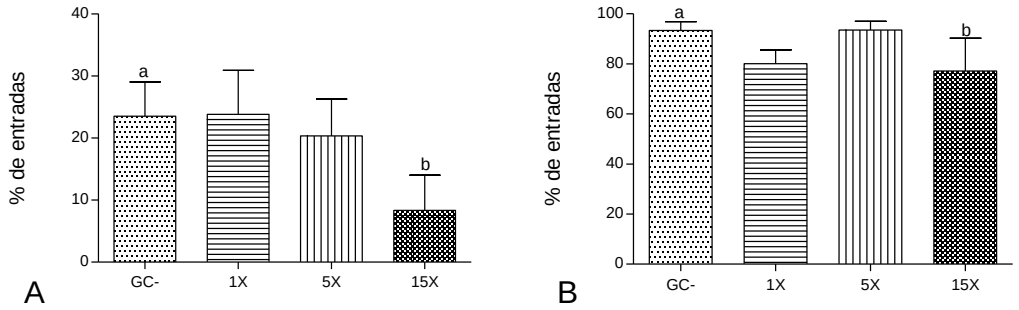


Figura 4. Percentual de entradas no braço fechado no LCE na 1ª hora (A) 2ª hora (B). n = 10 (fêmeas e machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

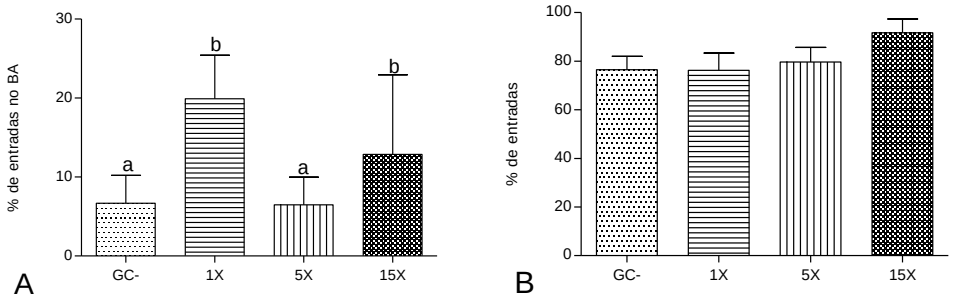


Figura 5. Percentual de entradas no braço aberto no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 10 (fêmeas e machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

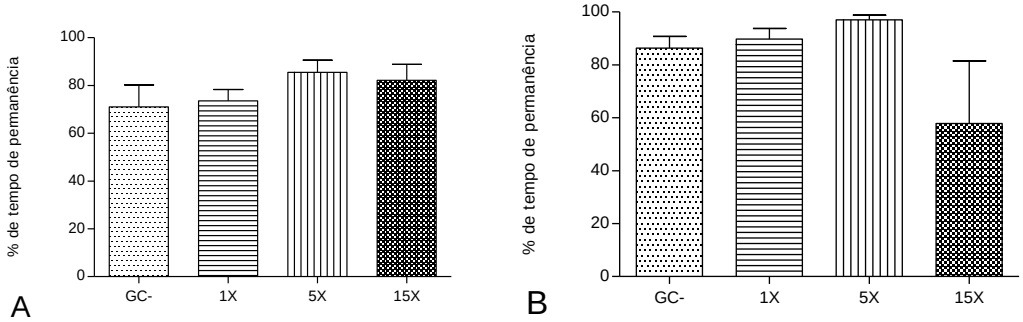


Figura 6. Percentual de permanência no braço fechado no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

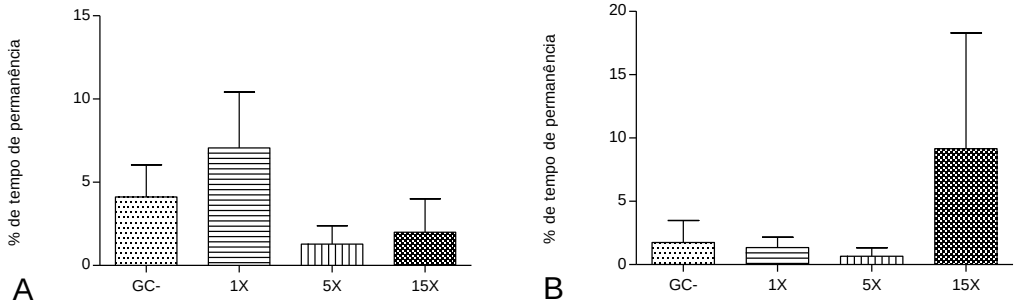


Figura 7. Percentual de permanência no braço aberto no LCE na 1ª hora (A)e na 2ª hora (B). n = 5 (machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

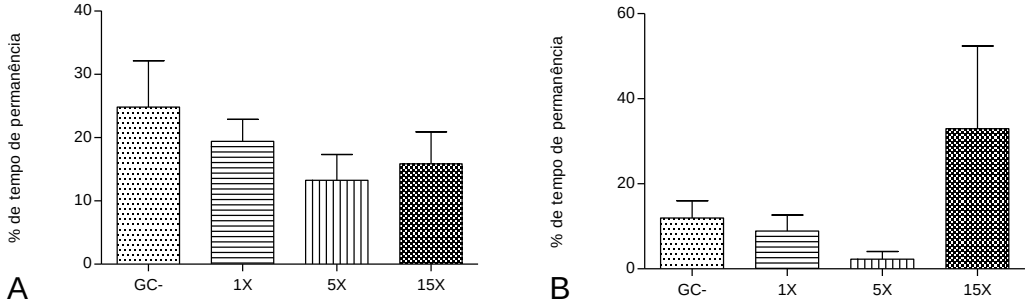


Figura 8. Percentual de permanência na área central no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

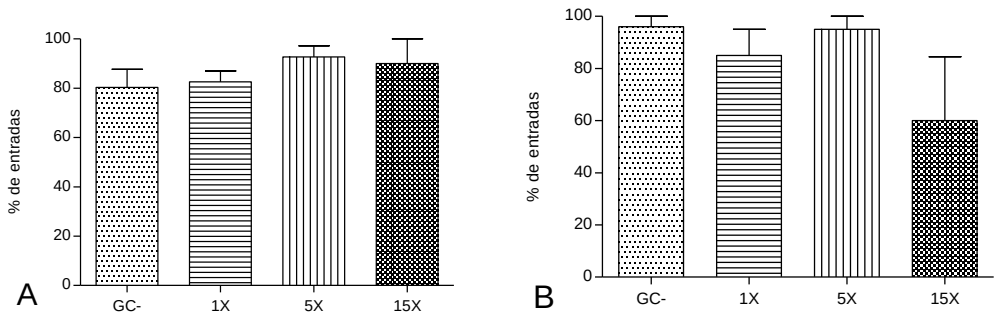


Figura 9. Percentual de entradas no braço fechado no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

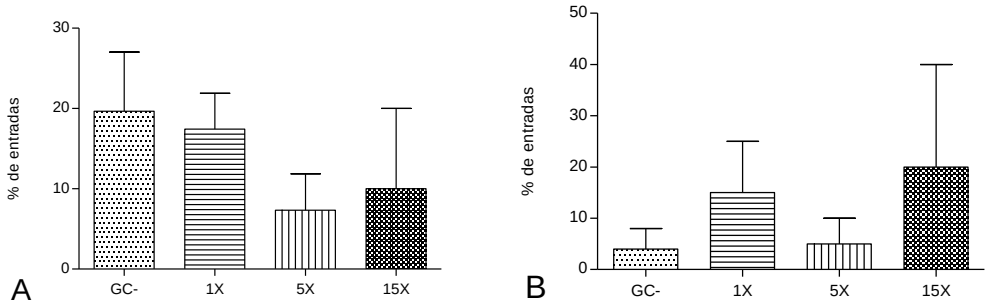


Figura 10. Percentual de entradas no braço aberto no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (machos). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

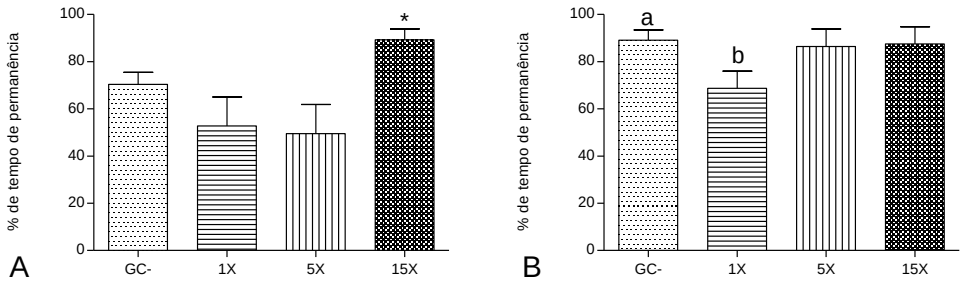


Figura 11. Percentual de permanência no braço fechado no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (fêmeas). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

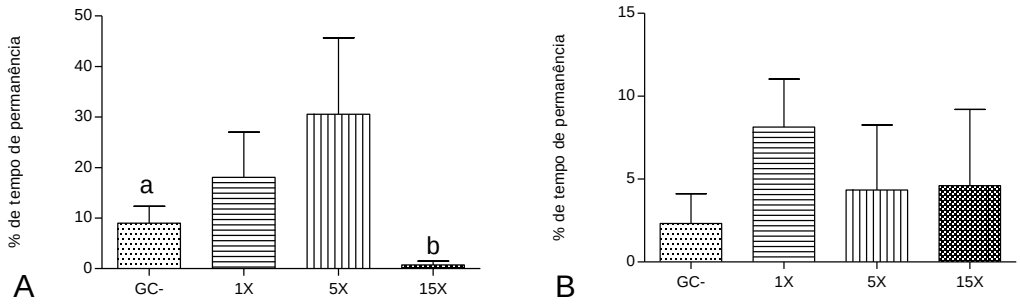


Figura 12. Percentual de permanência no braço aberto no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (fêmeas). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

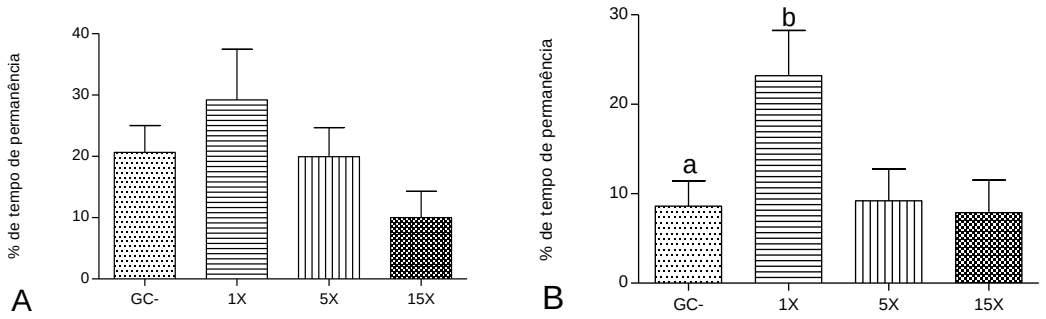


Figura 13. Percentual de permanência na área central no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (fêmeas). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

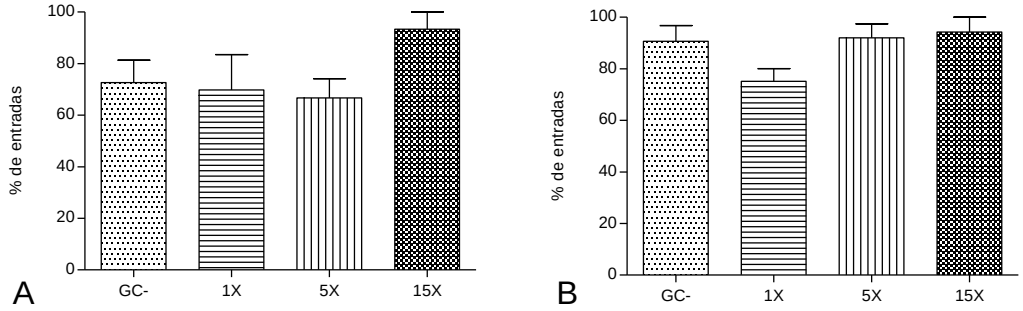


Figura 14. Percentual de entradas no braço fechado no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (fêmeas). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

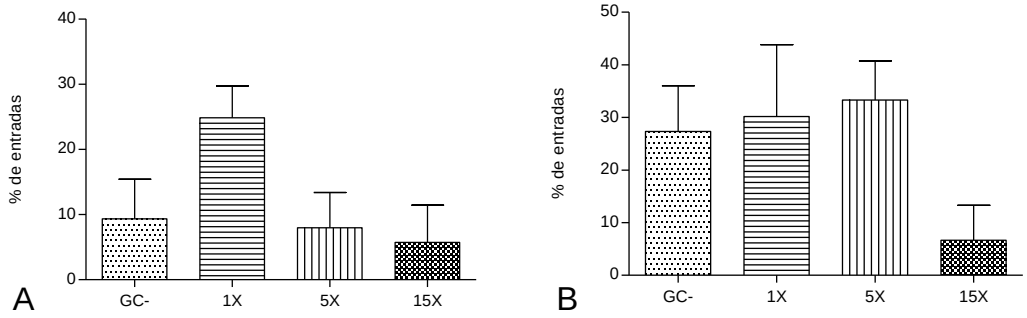


Figura 15. Percentual de entradas no braço aberto no LCE na 1ª hora (A) e na 2ª hora (B). n = 5 (fêmeas). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos * indica diferença estatística com os demais grupos; p ≤0,05.

Anexo C

Tabela 6 - Tendências de alterações comportamental na bateria de testes em Teste de Campo Aberto (TCA), Teste em Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Teste de Natação Forçada (TNF) na primeira e segunda hora por grupo e por sexo

		1ª hora						2ª hora					
Teste	Parâmetros	F1X	M1X	F5X	M5X	F15X	M15X	F1X	M1X	F5X	M5X	F15X	M15X
TCA	Quadrantes	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	QC central	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	**Ø**	↓	↑	**Ø**	↓
	Elevação	↑	↓	↓	↓	↓*	↓	↓	↓*	↓	↓*	↓*	↓*
	Autolimpeza	↑*	↔	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	**Ø**
	Defecação	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↔	↓	↑	↓	**Ø**	↓
LCE	Tempo BF	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓
	Tempo BA	↑	↑	↑*	↓	↓*	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑
	Tempo AC	↑	↓	↔	↓	↓	↓	↑*	↓	↔	↓	↔	↑
	Ent BF	↓	↓	↑	↓	↓*	↓*	↑	↓*	↔	↓*	↓	↓*
	Entr BA	↑	↓	↑	↓	↓*	↓*	↑	↑	↔	↔	↓	↔
	Elevação	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓*	↓*
	Autolimpeza	↑	↓	↑	↓	↔	**Ø**	↑	↓	↔	↓	↓	↓
	Defecação	↑	↔	↑	**Ø**	**Ø**	↔	**Ø**	↑	**Ø**	**Ø**	**Ø**	**Ø**
TNF	Climbing (s)	↑	↑*	↑	↑*	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓
	Natação (s)	↑	↑	↔	↑	↑*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	Flutuação (s)	↓	↓	↓	↓	↓*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Defecação	↑	**Ø**	↑	↑	↑	**Ø**	↓	↓	↓	↑	↓	**Ø**

↑ indica aumento em relação ao GC-, ↓ indica diminuição em relação ao GC-, ↔ igual ao GC-, Ø indica comportamento abolido, F = Fêmea, M = Machos, n = 5 por grupo de cada sexo, * indica diferença significativa em relação ao GC-, p ≤0,05.