

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOSISTEMAS

Dissertação de Mestrado

William Carvalho do Amaral

INTERAÇÕES DO CHÁ DE AYAHUASCA COM ANTIDEPRESSIVOS:
Estudo bioquímico e comportamental

Santo André - SP

2013

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOSISTEMAS

Dissertação de Mestrado

William Carvalho do Amaral

**INTERAÇÕES DO CHÁ DE AYAHUASCA COM ANTIDEPRESSIVOS:
Estudo bioquímico e comportamental**

Trabalho apresentado como requisito obrigatório
para obtenção do título de Mestre em
Biosistemas, sob orientação do Professor Doutor Fúlvio Rieli Mendes

Santo André - SP

2013

A minha MÃE, meu PAI e meus IRMÃOS,
ídolos de verdade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por proporcionar saúde e força em todos os momentos.

Minha MÃE Teresinha e meu PAI João pelo incentivo, aprendizado, carinho, amor e todo o apoio durante todos os momentos;

Meus irmãos Emerson, Juliana, Marcelo pelo apoio, incentivo e confiança;

Meu sobrinho Matheus que está a caminho (tomara que puxe ao tio aqui);

A Universidade Federal do ABC e a CAPES pelo apoio financeiro durante esse tempo dedicado a pesquisa;

Meu orientador Prof.º Dr. Fúlvio Rieli Mendes, por toda paciência, dedicação, ensinamento, apoio e confiança para que pudéssemos realizar esse estudo;

A Prof.ª Dra. Daniele Ribeiro de Araújo pela confiança, ensinamentos e apoio;

A Prof.ª Dra. Marcela Bermúdez Echeverry por todos os ensinamentos, atenção e conselhos;

A Prof.ª Dra. Maria Camila Almeida pela atenção, participação e sugestões para melhorar esse estudo;

Ao Prof.º Dr. Tiago Rodrigues pela atenção, confiança, ensinamentos e apoio;

Ao Prof.º Dr. Sérgio Sasaki pelos ensinamentos e apoio;

A Prof.ª Dra. Ana Carolina Galvão pelo apoio;

A Prof.ª Dra. Patricia Dantoni pelo incentivo e apoio a vida científica;

Aos professores dos programas de Pós-Graduação de Biossistemas, Neurociência e Engenharia Biomédica que compartilharam seus conhecimentos e contribuíram com esse estudo;

A aluna de Doutorado do programa de Química Adriana e seu orientador Vani pelo apoio;

Ao grupo de estudos de Plantas Naturais e Doenças Neurodegenerativas da UFABC pelo apoio e sugestões;

Ao Prof.º Dr. Ricardo Tabach pelo apoio durante essa jornada;

Ao Prof.º Dr. Roberto Andreatini pelas sugestões e ponderações para melhorar esse estudo;

Ao Prof.º Dr. Ricardo Augusto Lombello pelo apoio;

A Prof.ª Dra. Cristina da UFSM, pelo apoio;

As pessoas do Departamento de Psicobiologia da Unifesp e demais áreas que ajudaram na realização desse estudo, em particular, o Gilbertinho da Bioquímica, e o Lucas pelo incentivo e apoio;

A Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e a AFIP que contribuíram de forma significativa para a realização desse estudo;

Aos ratos e camundongos, que não tiveram a opção de escolher entre viver ou servir à Ciência, mas que foram os seres mais importantes para a realização deste trabalho.

Aos meus AMIGOS-IRMÃOS da GUAPI e suas respectivas famílias, pela eterna amizade, carinho, respeito, apoio nos momentos mais difíceis e por compartilhar histórias de vida que até Deus duvida;

Aos amigos da ETE Lauro Gomes, Itaotec, Esporte Clube Santo André e da Monday pelo incentivo, apoio e risadas compartilhadas;

Por fim, mas não menos importante....Aos amigos do Lab 503-3, Manoel, Deyse, Alisson, Pri, Joyce, Pri (chefa), Vi (Japa), Gemima, Sergiana, Vi, Adriana, Claudete. Pessoas realmente incríveis que conheci e convivi durante esses dois últimos anos, aprendendo a cada dia e compartilhando muitas histórias e aventuras....sempre com emoção!!!

OBRIGADO

“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados
insanos por aqueles que não podiam escutar a música”.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A ayahuasca é uma bebida preparada na forma de decocto empregando as folhas da *Psychotria viridis* e o cipó da *Banisteriopsis caapi*. O chá apresenta propriedades alucinógenas devido à presença de N, N-dimetiltriptamina (DMT) nas folhas da *Psychotria viridis*. A associação desta com a *Banisteriopsis caapi* aumenta consideravelmente a quantidade de DMT absorvida, já que as β -carbolinas harmina e harmalina presentes no cipó são potentes inibidores da monoaminoxidase (MAO), que metaboliza a DMT na luz intestinal. Estudos recentes revelam que usuários regulares do chá de ayahuasca apresentaram melhora em relação a problemas psiquiátricos. Entretanto, outros efeitos poderiam ser esperados da associação do chá com agentes utilizados na psiquiatria, uma vez que estas drogas comumente alteram os níveis das monoaminas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as possíveis interações entre o chá de ayahuasca e três antidepressivos: a imipramina (tricíclico), a sertralina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) e a moclobemida (um inibidor da MAO), por meio do teste da inibição da hipotermia induzida por apomorfina e pelo teste da natação forçada, *in vivo*, bem como pelo teste de inibição da MAO *in vitro*. Os resultados obtidos não indicaram interação do efeito de doses subefetivas de imipramina, sertralina e moclobemida pela ayahuasca no teste da natação forçada ao avaliar o comportamento de imobilidade. A avaliação do número de defecações no mesmo teste revela uma possível interação entre a ayahuasca e a sertralina, uma vez que essa associação induziu uma redução no número de defecações dos ratos. Por outro lado, os resultados do teste da inibição a hipotermia induzida pela apomorfina indicam que houve interação entre doses subefetivas de ayahuasca e dos antidepressivos imipramina e sertralina, uma vez que as associações reduziram a temperatura retal dos animais antes da apomorfina, mas preveniram a hipotermia após a administração desta droga. Não foi observada alteração da temperatura dos animais na associação com a moclobemida, mas a interação com pargilina se mostrou potencialmente tóxica. Os testes para avaliar a inibição da MAO *in vitro* sugerem que a ayahuasca tenha atividade inibitória seletiva para a MAO-A, com concentração inibitória 50% de aproximadamente 100 ng/ml.

Palavras-chave: Ayahuasca, antidepressivos, interações medicamentosas, beta-carbolinas, dimetiltriptamina, inibidor da MAO.

ABSTRACT

Ayahuasca tea is prepared by boiling the leaves of *Psychotria viridis* and the *Banisteriopsis caapi* liana. Ayahuasca has hallucinogenic properties due to the presence of N-N-dimethyltryptamine (DMT) in leaves of *Psychotria viridis*. Association of *Psychotria viridis* with *Banisteriopsis caapi* increases considerably the amount of DMT absorbed, since the β -carbolines harmine and harmaline present in *Banisteriopsis caapi* are strongest inhibitors of monoamine oxidase (MAO) which metabolizes DMT in the intestinal lumen. Currently studies report that regular users of ayahuasca presents better results related to psychiatric disorders. However, other effects could be expected from the association of ayahuasca with agents used in psychiatry, since these drugs usually alter the levels of monoamines. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible interactions between the ayahuasca tea and three antidepressants: imipramine (tricyclic), sertraline (selective inhibitor of serotonin reuptake) and moclobemide (selective and reversible inhibitor of MAO-A), through test of inhibition of apomorphine-induced hypothermia and the forced swimming test, *in vivo*, as well by the *in vitro* inhibition of MAO activity. The results indicated no interaction effect of inactive doses of imipramine, sertraline and moclobemide by ayahuasca in the forced swimming test when the immobility behavior was evaluated. Evaluation of defecation number in this test revealed a possible interaction between ayahuasca and sertraline, because this association diminished the defecations number of rats. On the other hand, the results in apomorphine-induced hypothermia test indicated interaction between inactive doses of ayahuasca and the antidepressants imipramine and sertraline, since these interactions decreased the rectal temperature of mice before the apomorphine, but inhibited the hypothermia after apomorphine administration. The moclobemide and ayahuasca association did not alter the mice's temperature, but the association of ayahuasca with pargiline seemed potentially toxic. The tests aimed to evaluate the *in vitro* MAO inhibition suggest that ayahuasca has inhibitory activity towards MAO-A, with 50% inhibitory concentration of approximately 100 ng/ml.

Keywords: Ayahuasca, antidepressants, drug interactions, beta-carbolines, dimethyltryptamine, MAO inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Plantas empregadas no preparo do chá de ayahuasca..... | 1 |
| Figura 2. Preparo do chá de ayahuasca por meio de decocção..... | 2 |
| Figura 3. Estrutura química das β -carbolinas harmina, harmalina e tetrahydroharmina THH e do alcaloide dimetiltriptamina (DMT)..... | 4 |
| Figura 4. Cromatograma indicando a presença de moclobemida no material extraído a partir do medicamento vendido comercialmente como Aurorix [®] | 18 |
| Figura 5. Caixa locomotora utilizada para o registro da atividade motora de camundongos..... | 22 |
| Figura 6. Formação de 4-hidroquinolina por meio da oxidação da quinuramina pela enzima MAO, conforme Sant'Anna (2008)..... | 24 |
| Figura 7. Efeito da administração oral de ayahuasca (aya) sobre a temperatura retal de camundongos administrados após 30 min com apomorfina..... | 27 |
| Figura 8. Efeito da administração i.p. de imipramina (imi) (A) e sertralina (ser) (B) sobre a temperatura retal de camundongos administrados após 30 min com apomorfina..... | 28 |
| Figura 9. Efeito da administração i.p. de moclobemida (moc) sobre a temperatura retal de camundongos administrados após 30 min com apomorfina..... | 29 |
| Figura 10. Efeito da administração de ayahuasca e de imipramina, isoladamente ou em associação, sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina dada após 30 min do antidepressivo..... | 31 |
| Figura 11. Efeito da administração de ayahuasca e de sertralina isoladamente ou em associação, sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina dada após 30 min do antidepressivo..... | 33 |
| Figura 12. Efeito da administração de ayahuasca e de moclobemida isoladamente ou em associação, sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina dada após 30 min do antidepressivo..... | 35 |
| Figura 13. Efeito da administração de pargilina isoladamente ou em associação com ayahuasca sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina ou salina 30 min depois..... | 37 |
| Figura 14. Tempo de imobilidade no teste da natação forçada de ratos tratados com ayahuasca..... | 38 |
| Figura 15. Tempo de imobilidade no teste da natação forçada de ratos tratados por via i.p. com diferentes doses de imipramina e sertralina..... | 39 |
| Figura 16. Tempo de imobilidade no teste da natação forçada de ratos tratados por via i.p. com diferentes doses de moclobemida..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Tempo de imobilidade na natação forçada de ratos tratados por via i.p. com diferentes doses de pargilina e da tranilcipromina..... | 43 |
| Figura 18. Tempo de imobilidade de ratos no teste da natação forçada. Associação da ayahuasca com a imipramina..... | 45 |
| Figura 19. Tempo de imobilidade de ratos no teste da natação forçada. (A) Associação de ayahuasca com a sertralina; (B) Associação de ayahuasca com a moclobemida..... | 48 |
| Figura 20. Tempo de imobilidade de ratos tratados com ayahuasca e tranilcipromina no teste da natação forçada..... | 49 |
| Figura 21. Registro da atividade locomotora de camundongos tratados com ayahuasca, sertralina, imipramina e moclobemida ou água- grupo controle (ctrl, v.o.)..... | 50 |
| Figura 22. Ensaios iniciais para a padronização da concentração de substrato, da concentração de enzima (fração mitocondrial, em mg/ml de proteína) e do tempo de reação..... | 52 |
| Figura 23. Ensaios iniciais para avaliar a inibição da atividade da MAO com a pargilina e com a selegilina. A leitura no fluorímetro foi realizada com excitação de 320/20 e emissão de 460/40 (nm)..... | 53 |
| Figura 24. Avaliação da fluorescência da ayahuasca isoladamente reproduzindo as mesmas condições de ensaio, exceto pela adição da fração enzimática e do substrato quinuramina. A leitura no fluorímetro foi realizada com excitação de 320/20 e emissão de 460/40 (nm)..... | 54 |
| Figura 25. Ensaios iniciais para avaliar a inibição da atividade da MAO com a ayahuasca isolada (A) e para avaliar a inibição da atividade da MAO-A pela associação da selegilina 250 nM + diferentes concentrações de ayahuasca (B). A leitura no fluorímetro foi realizada com excitação de 320/20 e emissão de 460/40 (nm)..... | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Resultado do doseamento do chá de ayahuasca..... | 16 |
| Tabela 2. Doses empregadas na avaliação do efeito dos antidepressivos e do chá de ayahuasca isoladamente no teste de hipotermia induzida pela apomorfina..... | 20 |
| Tabela 3. Doses utilizadas para avaliação do efeito dos antidepressivos e do chá de ayahuasca isoladamente no teste da natação forçada..... | 21 |
| Tabela 4. Número de defecações dos ratos tratados com ayahuasca ou com as drogas antidepressivas isoladamente no teste da natação forçada..... | 41 |
| Tabela 5. Número de defecações dos ratos tratados com a associação de ayahuasca e diferentes antidepressivos no teste da natação forçada..... | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|--|
| Δt | Diferença de temperatura |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |
| $\mu\text{g/ml}$ | Micrograma por mililitro |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| BDNF | Fato de crescimento derivado do cérebro |
| BSA | Soro albumina bovina |
| CI₅₀ | Concentração que inibe 50% da resposta |
| cm | Centímetro |
| C_{máx} | Concentração máxima |
| CYP | Isoenzimas da superfamília do citocromo P ₄₅₀ |
| D₂ | Receptor dopaminérgico tipo 2 |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| DMT | Dimetiltryptamina |
| g | Grama |
| <i>g</i> | Força centrífuga relativa |
| g/ml | Grama por mililitro |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IMAO | Inibidor da monoaminoxidase |
| IMAO-A | Inibidor da monoaminoxidase A |
| ISRS | Inibidor seletivo da recaptção de serotonina |
| KCl | Cloreto de potássio |
| kg | Quilograma |
| KH₂PO₄ | Fosfato de potássio monobásico |
| K_m | Concentração de substrato para que a enzima atinja metade da sua velocidade máxima |
| LSD | Dietilamida do ácido lisérgico |
| m/v | Massa por volume |
| MAO | Enzima monoaminoxidase |
| MAO-A | Enzima monoaminoxidase A |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligrama |
| mg/ml | Miligrama por mililitro |

| | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mol/l | Mol por litro |
| n.s. | Não significativo |
| Na₂HPO₄ | Fosfato de sódio dibásico |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| ng | Nanograma |
| ng/ml | Nanograma por mililitro |
| nm | Nanômetro |
| q.s.p | Quantidade suficiente para |
| s | Segundos |
| s.d. | Sem data |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| t_{1/2} | Tempo de meia-vida |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| THH | Tetrahydroharmina |
| v.o. | Via oral |
| v/v | Volume por volume |
| V_{máx} | Velocidade da reação máxima |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Histórico do Chá de Ayahuasca..... | 1 |
| 1.2 | Farmacologia do Chá de Ayahuasca..... | 3 |
| 1.3 | Depressão e os Antidepressivos..... | 6 |
| 1.4 | Modelos Animais de Depressão..... | 11 |
| 1.5 | Interações do Chá de Ayahuasca com Outras Drogas..... | 13 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 15 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 16 |
| 3.1 | Chá de Ayahuasca..... | 16 |
| 3.2 | Drogas..... | 17 |
| 3.3 | Animais..... | 18 |
| 3.4 | Inibição à Hipotermia Induzida pela Apomorfina..... | 19 |
| 3.4.1 | Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente..... | 19 |
| 3.4.2 | Teste da associação da ayahuasca com os antidepressivos..... | 20 |
| 3.5 | Teste da Natação Forçada..... | 20 |
| 3.5.1 | Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente..... | 21 |
| 3.5.2 | Teste da associação da ayahuasca com os antidepressivos..... | 22 |
| 3.6 | Medida da Atividade Motora..... | 22 |
| 3.7 | Avaliação da Inibição Sobre a Monoaminoxidase (MAO)..... | 23 |
| 3.7.1 | Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias..... | 23 |
| 3.7.2 | Padronização do ensaio para determinação da atividade da MAO..... | 24 |
| 3.7.3 | Ensaio iniciais da inibição da monoaminoxidase (MAO) total e MAO-A pela ayahuasca..... | 25 |
| 3.8 | Análise Estatística..... | 25 |
| 4 | RESULTADOS..... | 27 |
| 4.1 | Inibição à Hipotermia Induzida pela Apomorfina..... | 27 |
| 4.1.1 | Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente..... | 27 |
| 4.1.2 | Associação da ayahuasca com os antidepressivos..... | 30 |
| 4.1.3 | Associação da ayahuasca com a pargilina..... | 36 |
| 4.2 | Teste da Natação Forçada..... | 38 |
| 4.2.1 | Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente..... | 38 |
| 4.2.2 | Associação da ayahuasca com os antidepressivos..... | 44 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | Atividade Locomotora..... | 49 |
| 4.4 | Ensaio de Inibição da Monoaminoxidase (MAO)..... | 50 |
| 4.4.1 | Padronização das condições do ensaio..... | 50 |
| 4.4.2 | Ensaio inicial da inibição da monoaminoxidase (MAO)..... | 51 |
| 4.4.3 | Ensaio inicial da inibição da monoaminoxidase (MAO) total e MAO-A pela ayahuasca..... | 54 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 56 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 74 |
| | REFERÊNCIAS..... | 75 |
| | ANEXO A- Folha de aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal..... | 85 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do Chá de Ayahuasca

A ayahuasca é uma bebida preparada em um contexto tradicional na forma de decocto pela associação de duas plantas primordiais: o cipó (caule) da *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) Morton (família Malpigiaceae) e as folhas da *Psychotria viridis* Ruiz & Pav (família Rubiaceae) (figura 1) (Tupper, 2008). Embora sua preparação envolva o cozimento das partes das duas plantas, ou seja, como decocção (figura 2), seu preparado é chamado vulgarmente de chá (chá de ayahuasca). Ayahuasca é um termo de origem Quechua (língua do antigo Império Inca) derivado da sobreposição dos termos: Aya “alma”, “espírito morto” e Huasca “corda”, “videira”, e assim é traduzido livremente como “videira da alma” ou “cipó dos mortos”. No Brasil, a transliteração desse termo Quechua para o Português resultou no nome hoasca, sendo aceito também ayahuasca (McKenna, 2004), termo que foi empregado nesta dissertação.



Figura 1. Plantas empregadas no preparo do chá de ayahuasca: (A) *Banisteriopsis caapi* e (B) *Psychotria viridis*. Fonte: Google Images. Acesso em: 07/11/2012.



Figura 2. Preparo do chá de ayahuasca por meio de decocção. Fonte: Google Images. Acesso em: 07/11/2012.

A origem da utilização do chá ocorreu provavelmente em rituais de tribos indígenas associados ao xamanismo, bem como por vegetalistas curandeiros que praticavam a medicina popular a base de extratos vegetais nas regiões das bacias do rio Orinoco (Colômbia e Venezuela) e Amazonas (Bolívia, Brasil, Equador e Peru) em época muito anterior ao primeiro contato com os europeus (Tupper, 2008; Pires et al., 2010). Nos dias atuais, o chá de ayahuasca é um importante elemento na etnomedicina e xamanismo praticado entre as populações mestiças indígenas no Peru, Colômbia e Equador (de Souza, 2011; Bouso et al., 2012).

Particularmente no Brasil, após o início do ciclo da borracha em 1930, a ayahuasca começou a ser utilizada em um contexto diferente daquele usado nas tribos indígenas ligadas ao xamanismo. Isso se deve a um período de urbanização da região norte que permitiu a interação entre seringueiros e indígenas de tribos xamânicas. Em Rio Branco, capital do Acre, Raimundo Irineu Serra, ex-seringueiro, conhecido “curador” experimentou a bebida oferecida por pessoas que tiveram contato com costumes indígenas e começou a ter visões que mudaram seu comportamento e qualidade de vida (Mac Ray, 1994). Iniciava, então, o surgimento de movimentos religiosos sincréticos, isto é, a fusão das religiões indígenas com elementos do Cristianismo, como o Santo Daime, a Barquinha e a União do Vegetal (UDV). Esses movimentos se assemelham com relação ao preparo do chá, à cerimônia, às regras de

adesão dos membros, a busca de uma facilitação do autoconhecimento e introspecção, bem como da cura emocional, propósito de vida, e não raro, buscam o abandono de consumo de drogas de abuso (Winkelman, 2005), porém apresentam diferenças de contexto religioso e social entre si (Grob et al., 1996). Contudo, foi somente com a adoção da Resolução número 1, de 25 de Janeiro de 2010 do Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas (CONAD), que se estabeleceu um conjunto de regras, normas e princípios éticos a serem aplicados aos usos religiosos e rituais da ayahuasca. Dentre esses, o estímulo do desenvolvimento de pesquisa científica sobre os potenciais terapêuticos do uso da ayahuasca (Labate, Cavnar, 2011).

Atualmente, os membros desses grupos sincréticos pertencem a um amplo leque socioeconômico, que inclui profissionais da área médica e outros profissionais de saúde, bem como alguns membros com nível menor de instrução, que participam desses movimentos há mais de 30 anos, sem aparentes efeitos adversos à saúde. Particularmente, as igrejas da UDV e do Santo Daime são as maiores e as mais conhecidas entre os vários movimentos religiosos sincréticos que incorporaram o uso da ayahuasca em suas práticas religiosas, com um destaque ainda maior para a UDV, uma vez que possui uma estrutura organizacional mais forte, além de membros mais altamente disciplinados (McKenna, 2004). Além disso, segmentos do Santo Daime, bem como da UDV tem se expandido para além das fronteiras brasileiras para países como Austrália, Canadá, França, Alemanha, Japão, Holanda, Espanha e Estados Unidos. Contudo, somente Estados Unidos, Canadá e Holanda possuem leis federais que protegem o uso religioso da ayahuasca (Tupper, 2008; Bouso et al., 2012), como ocorre no Brasil.

A necessidade da regularização do consumo do chá de ayahuasca por agências controladoras de substâncias psicotrópicas, bem como leis federais é decorrente dos efeitos alucinógenos promovidos pela ação do chá no Sistema Nervoso Central (SNC). Dessa forma, considera-se fundamental abordar na próxima seção a farmacologia do chá para a compreensão desses efeitos.

1.2 Farmacologia do Chá de Ayahuasca

A atividade farmacológica da ayahuasca é particularmente interessante e depende do sinergismo entre as duas plantas: as folhas da *Psychotria viridis* que possuem o alucinógeno N,N-dimetiltriptamina (DMT) e o cipó da *Banisteriopsis caapi* que possui os alcaloides com estrutura β -carbolina harmina, harmalina e a tetrahydroharmina (THH) - ver figura 3 (Callaway et al., 1999; McKenna, 2004).

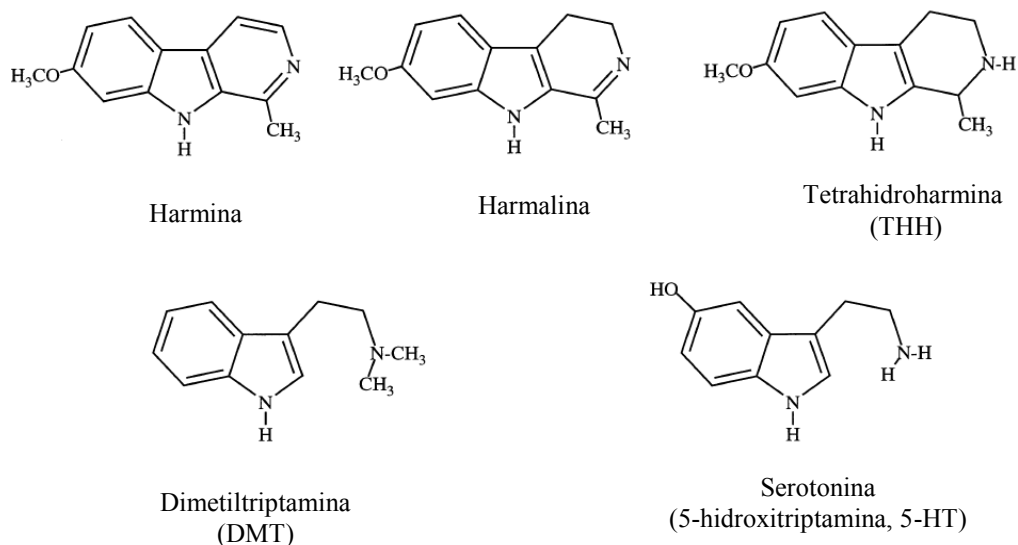


Figura 3. Estrutura química das β-carbolinas harmina, harmalina e tetrahydroharmina THH e do alcaloide dimetiltriptamina (DMT). Observar grupamento indólico da DMT e semelhança com o neurotransmissor serotonina (à direita), substrato da MAO. Adaptado de Callaway et al. (1999).

A DMT é considerada um potente alucinógeno quando administrada por via parenteral em humanos, pois provoca modificações intensas, embora de curta duração, no sentido de si mesmo e na percepção da realidade (Strassman et al., 1994). Em preparações contendo apenas a *Psychotria viridis* (ou outras plantas com teor de DMT) usadas por via oral o efeito alucinógeno é muito reduzido ou ausente devido a sua rápida metabolização pela enzima monoaminoxidase A (MAO-A) (Callaway et al., 1999). Por outro lado, os alcaloides da *Banisteriopsis caapi* harmina, harmalina e a THH atuam como inibidores reversíveis da monoaminoxidase A (MAO-A) (Herraiz et al., 2010; Wang et al., 2010). Assim, a atividade alucinógena do chá de ayahuasca ocorre em função do sinergismo entre os princípios ativos das duas plantas, sendo dependente da inibição da MAO-A na luz intestinal pelos alcaloides da *Banisteriopsis caapi*, principalmente a harmina e a harmalina. Essa ação impede a desaminação/oxidação da DMT, que irá ser absorvida, por conseguinte, aumentando sua biodisponibilidade por via oral, até alcançar seu local de ação no SNC de forma intacta e em concentrações que propiciam seus efeitos alucinógenos (Callaway, 2003; McKenna, 2004).

Os efeitos alucinógenos promovidos pela ingestão do chá foram avaliados por meio da Escala de HRS (Hallucinogen Rating Scale) que permite medir níveis de alucinação, além de um questionário de autoavaliação e da Escala Visual Analógica. Os efeitos alucinógenos subjetivos constatados incluem um estado alterado de consciência, variando entre visualizações de imagens coloridas com os olhos fechados, modificação de processos cognitivos, perceptivo-sensoriais e afetivos (Callaway et al. 1999; Riba et al., 2003). Estes

mesmos autores constataram que a duração do efeito alucinógeno coincidiu com os valores farmacocinéticos plasmáticos obtidos para a DMT e para as β -carbolinas. Especificamente, a concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) de DMT foi de 15,8 ng/ml e ocorreu 107 minutos após a ingestão do chá, com um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 259 minutos. Em relação aos alcaloides da *Banisteriopsis caapi* harmina e harmalina, a $C_{\text{máx}}$ foi de 114,8 e 6,3 ng/ml, obtidas após 102 e 145 minutos, respectivamente. Já os $t_{1/2}$ constatados foram de 115,6 minutos para a harmina enquanto para a harmalina não foi determinado, provavelmente por diferenças individuais na absorção e no metabolismo ou devido à êmese causada pela ingestão da ayahuasca (Callaway et al., 1999).

Os efeitos alucinógenos da DMT são atribuídos a sua ação agonista com o receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} (Pierce, Peroutka, 1989; Smith et al., 1998). Além disso, a DMT age como um potente agonista nos receptores de serotonina 5-HT_{1A} e também como um agonista parcial do receptor 5-HT_{2C} (Deliganis et al., 1991; Smith et al., 1998). Por outro lado, Glennon et al. (2000) constataram que as β -carbolinas ligam-se com uma afinidade modesta aos receptores 5-HT_{2A} e o 5-HT_{2C} e possuem afinidade muito baixa com o receptor 5-HT_{1A}. Segundo Pires et al. (2010), as β -carbolinas, por si só, poderiam contribuir com os efeitos alucinógenos induzidos pela ayahuasca, porém as quantidades de β -carbolinas presentes numa dose de ayahuasca estão bem abaixo do limiar de sua atividade alucinogênica própria, que correspondem a 100 mg para harmina e entre 300 e 500 mg para harmalina e para a THH.

Chama a atenção, que apesar dos efeitos alucinógenos induzidos pelo chá de ayahuasca, estudos clínicos sugerem que o consumo de chá possa reduzir a reincidência do uso de drogas de abuso, além de não comprometer a saúde mental e a cognição de adolescentes e adultos (Grob et al., 1996; Doering-Silveira et al., 2005; Barbosa et al., 2009; Bouso et al., 2012; dos Santos, 2013). Neste sentido, Fábregas et al. (2010) avaliaram dois grupos distintos que consumiam o chá de ayahuasca regularmente, e não constataram dependência ao aplicarem o *Addiction Severity Index* (ASI). Sabe-se que as drogas de abuso como a heroína, a cocaína, o álcool ou anfetaminas compartilham de um mecanismo comum denominado como “sistema de recompensa”, induzindo mudanças funcionais em estruturas cerebrais relacionadas ao prazer, como a área tegmental ventral, de transmissão dopaminérgica (Camí, Farré, 2003). Riba et al. (2002) apontam que o chá de ayahuasca possui ação no sistema dopaminérgico, entretanto, um estudo de neuroimagem realizado posteriormente pelo mesmo grupo constatou que a ayahuasca induziu uma ativação em estruturas paralímbicas e pré-frontais relacionadas à interocepção e processamento emocional, moduladas pelo sistema serotoninérgico (Riba et al., 2006). Corroborando com esses resultados,

de Araujo et al. (2012) constataram por meio de técnicas de neuroimagem aliadas a tarefas visuais que usuários regulares de ayahuasca, ao ingerirem 2,2 ml/kg do chá, apresentaram a ativação de um conjunto de áreas da região occipital, temporal e frontal relacionadas respectivamente com a visão, memória e intenção e que são mediadas pela ativação de receptores serotoninérgicos.

Apesar dessas evidências benéficas em relação ao consumo do chá de ayahuasca apresentadas por Grob et al. (1996), Doering-Silveira et al. (2005), Fábregas et al. (2010) e Bouso et al. (2012), ainda há uma carência de estudos pré-clínicos e clínicos em relação à segurança do uso agudo ou crônico do chá de ayahuasca (McKenna, 2004; dos Santos et al., 2011). Em particular, são carentes as informações sobre a potencial interação dos componentes ativos do chá com outras drogas (Callaway et al., 1999; McKenna, 2004; Pires, 2009). Este tipo de abordagem é essencial, considerando que o chá é rico em DMT e β -carbolinas IMAO-A, e pode ser utilizado por pessoas com problemas de humor, inclusive pacientes depressivos em tratamento farmacológico com drogas antidepressivas.

1.3 Depressão e os Antidepressivos

A depressão tem sido descrita pela humanidade há milênios. O diagnóstico dessa patologia, ao contrário de doenças como diabetes e câncer não se baseia em testes diagnósticos objetivos como exames de bioquímica sérica ou biópsias, e sim, pela avaliação de um conjunto de sintomas altamente variáveis (Nestler et al., 2002; Krishnan, Nestler, 2008). Esses sintomas se caracterizam por pelo menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse, acompanhados por pelo menos cinco sintomas adicionais de depressão, como: apatia, tristeza, irritabilidade, desesperança, distúrbios do sono e do apetite, sentimentos de culpa e inutilidade, e nos casos mais graves pensamento recorrente de morte (*Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders*, 1994). Atualmente, mais de 350 milhões de pessoas no mundo sofrem de depressão, a qual afeta mais as mulheres do que os homens. Em longo prazo e com uma intensidade de moderada a severa, a depressão é a principal causa de incapacidade no mundo, uma vez que afeta negativamente as pessoas no seu ambiente de trabalho, na escola e no convívio familiar (Organização Mundial da Saúde, 2012).

O tratamento da depressão foi revolucionado há 50 anos quando duas classes de agentes foram descobertas ao acaso como antidepressivos efetivos: os agentes tricíclicos, como a imipramina (inibidor não seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina), que

originalmente surgiram a partir da pesquisa de anti-histamínicos, e os inibidores da enzima monoaminoxidase (enzima de degradação da serotonina e noradrenalina), como a iproniazida, que foi originalmente usada para tratar a tuberculose (Nestler et al., 2002). Paralelamente, outros pesquisadores observaram que a reserpina, um agente usado para tratar a hipertensão, produzia uma série de sintomas depressivos nos pacientes, devido à depleção dos estoques de noradrenalina e serotonina no encéfalo (Krishnan, Nestler, 2008). Essas descobertas forneceram as primeiras pistas para o tratamento da depressão, pois trouxeram à tona as mudanças neuroquímicas que regulam os sintomas depressivos. Sendo assim, alguns pesquisadores propuseram a teoria monoaminérgica, na qual argumentavam que a depressão era uma consequência do déficit funcional das monoaminas noradrenalina e serotonina em locais específicos do encéfalo (Hindmarch, 2001).

A teoria monoaminérgica foi referência pelos anos subsequentes para o entendimento da neurobiologia da depressão, bem como serviu de base para a busca de novos medicamentos antidepressivos, de modo que, após o surgimento destes primeiros medicamentos antidepressivos ocorreu o desenvolvimento de vários medicamentos de segunda geração, como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) (Hindmarch, 2001; Nestler et al. 2002). De forma geral, os antidepressivos apresentam metabolismo de primeira passagem, o que faz com que sua biodisponibilidade fique em torno de 40 a 70%. Todos eles sofrem biotransformação no fígado, que pode resultar, em alguns casos, em metabólitos ativos. Além disso, os antidepressivos apresentam meia-vida longa, o que permite a sua utilização em dose única diária, de preferência à noite para aqueles com efeito sedativo e pela manhã para os que apresentam efeito de aumentar o estado de alerta (Rang et al. 2007).

Particularmente, os antidepressivos da categoria dos IMAOs promovem o aumento das concentrações citoplasmáticas das monoaminas endógenas serotonina, noradrenalina e dopamina, bem como da amina exógena proveniente da dieta, a tiramina. Isso ocorre, pois a MAO age na degradação dessas monoaminas, logo é uma enzima crítica na regulação dos níveis das mesmas (Wimbiscus et al., 2010). A MAO existe em duas formas moleculares semelhantes codificadas por genes separados, denominadas como MAO-A e MAO-B, e estas isoformas se distribuem de forma variada pelos tecidos corporais (Youdim et al. 2006). A MAO-B é encontrada principalmente no encéfalo e no fígado, enquanto a MAO-A é encontrada principalmente no trato intestinal, fígado e neurônios adrenérgicos periféricos (glândulas supra-renais, vasos arteriais e os nervos simpáticos), embora esteja presente também no SNC onde tem papel fundamental. Esta última metaboliza preferencialmente a serotonina e a noradrenalina e está relacionada mais diretamente com a atividade

antidepressiva dos IMAOs (Fiedorowicz, Swartz, 2004; Youdim et al., 2006). Os IMAOs irreversíveis, como a tranilcipromina e a iproniazida, estiveram entre os primeiros fármacos introduzidos clinicamente como antidepressivos. Entretanto, foram superados pelos tricíclicos e outros tipos de antidepressivos, cujas eficácias clínicas foram consideradas melhores e com efeitos colaterais, em geral, menores do que os dos IMAOs (Wimbiscus et al., 2010). Um dos grandes problemas do emprego dos IMAOs irreversíveis é a interação com aminas simpatomiméticas, particularmente a tiramina. Essa substância, presente em grandes quantidades nos queijos fortes, certas carnes e no vinho tinto, atua indiretamente, liberando a noradrenalina em seus terminais. Normalmente, a tiramina é degradada pela MAO, presente de forma abundante nas paredes intestinais e no fígado, mas com a inibição dessa enzima pelos IMAOs sua degradação é inibida e a grande quantidade de tiramina que atinge a circulação sistêmica pode causar ativação exagerada do sistema simpático, como o aparecimento de crises hipertensivas (Youdim et al., 2006; Wimbiscus et al., 2010). Estes efeitos indesejados puderam ser melhor controlados após o desenvolvimento dos inibidores reversíveis da MAO-A, como a moclobemida. Este composto tem ação curta e a meia-vida de recuperação da enzima após seu uso é de 16-20 horas. A dose terapêutica efetiva em estudos de fase mais aguda foi de 300 a 600 mg, divididos em 2 a 3 doses, sendo que nestas condições não foram relatadas reações significativas devido a dietas ricas em tiramina (Bonnet, 2003).

A escolha do antidepressivo adequado para cada paciente deve ser feita com cautela. Os efeitos colaterais relatados com a utilização isolada dos IMAOs incluem a hipotensão, boca seca, visão embaçada, sonolência, tontura, insônia e, em superdosagem, convulsões e excitação, embora com menor risco do que com os tricíclicos (Fiedorowicz, Swartz, 2004). Do ponto de vista de interações farmacológicas, os IMAOs podem interagir com a petidina (um analgésico opiáceo), causando hiperpirexia intensa, com agitação, coma e hipotensão (Gillman, 2005). Além disso, a interação farmacodinâmica dos IMAOs com a imipramina e com os ISRS pode ser letal (Richelson, 2001), uma vez que a estimulação excessiva de receptores serotoninérgicos promovidos por tais interações em nível central pode ocasionar sintomas da síndrome serotoninérgica, na qual incluem mudanças no estado mental e motor, além de uma instabilidade autonômica (Boyer, Shannon, 2005).

Os antidepressivos da categoria dos tricíclicos ainda são amplamente usados. Eles atuam inibindo a recaptação tanto de noradrenalina como de serotonina por competição pelo sítio ativo de ligação do transportador dessas monoaminas (Richelson, 2001). Os efeitos colaterais dos tricíclicos incluem sedação, confusão e falta de coordenação motora em pacientes com depressão nos primeiros dias de tratamento, mas tendem a desaparecer ou

diminuir em 1-2 semanas, quando se desenvolve o efeito antidepressivo (Rang et al. 2007). Dentre os medicamentos dessa categoria, a imipramina apresenta um $t_{1/2}$ aproximadamente de 28 horas (Richelson, 2001) e a dose diária para o tratamento da depressão é de 75 a 300 mg, (Fuller, Sajatonic, 1999). A superdosagem está associada a uma grande taxa de morbidade e mortalidade em decorrência da toxicidade cardiovascular que os tricíclicos apresentam (Thanacoody, Thomas, 2005). Alguns dados na literatura apontam que tricíclicos potencializam os efeitos agudos do álcool (Boyce-Rustay et al., 2008), bem como postula-se que quando aplicados localmente possam potencializar os efeitos de drogas analgésicas por compartilhar o mecanismo de bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, fato que justifica seu uso como adjuvante em anestésias odontológicas (Movassaghian et al., 2013).

Diante disso, existia uma grande necessidade de fármacos que produzissem menos efeitos colaterais e que apresentassem menos riscos com a superdosagem. Isso levou à introdução dos ISRS que são o grupo de antidepressivos mais comumente prescritos hoje em dia, o qual inclui a fluoxetina, a sertralina, a paroxetina, o citalopram, entre outros. Dentre esses ISRS citados, a sertralina é o segundo mais potente inibidor da recaptação de serotonina, bem como inibe fracamente o transportador de dopamina (Stahl et al., 2013). Além disso, a sertralina apresenta sua dose máxima diária de 200 mg, uma vez ao dia ou em doses fracionadas, com o $t_{1/2}$ de aproximadamente 26 horas (Hiemke, Härtter, 2000). Os ISRS são tão eficazes quanto os tricíclicos e os IMAOs para tratar depressão de grau moderado, mas provavelmente menos eficazes que os tricíclicos em tratar depressão severa (de Silva, Hanwella, 2012). O uso dos ISRS para o tratamento da depressão em pacientes abaixo de 18 anos de idade necessita de cautela, uma vez que a eficácia desses agentes é duvidosa e podem ocorrer efeitos colaterais como excitação, insônia, agressividade e um alto risco de suicídio nas primeiras semanas de tratamento (Oberlander, Miller, 2011). Os efeitos colaterais promovidos pelos ISRS são náuseas, anorexia, insônia, perda de libido e incapacidade de ter orgasmo (Richelson, 2001), e em combinação com um IMAO-A ou IMAO inespecífico (Izumi et al., 2006; Degner et al., 2010) ou com a eletroconvulsoterapia (Okamoto et al., 2012) os ISRS podem causar a síndrome serotoninérgica, caracterizada por tremor, hipertermia, colapso cardiovascular e causar a morte (Boyer, Shannon, 2005). Além disso, uma característica importante dos ISRS, como a fluoxetina e a fluvoxamina, é o seu potencial para interações medicamentosas farmacocinéticas, pois inibem isoenzimas da superfamília do citocromo P₄₅₀ (CYPs) como a CYP_{2D6}, responsável pela metabolização de muitas outras drogas (Hiemke, Härtter, 2000).

É importante citar que além das drogas antidepressivas existem outras formas de terapia não farmacológica para o tratamento da depressão como a eletroconvulsoterapia e as terapias comportamentais e cognitivas, que se mostram eficazes em pacientes com casos de depressão leve a moderada. Além disso, a combinação de medicação antidepressiva e psicoterapia pode exercer um efeito sinérgico positivo no tratamento da depressão. Contudo, embora o tratamento com antidepressivos seja a primeira linha de terapia para o tratamento da depressão, a ação antidepressiva desses medicamentos surge em torno de 2 a 3 semanas de tratamento, o que leva muitas pessoas a abandonarem o tratamento (Hindmarch, 2001; Krishnan, Nestler, 2008).

Pesquisas recentes têm combinado técnicas comportamentais, moleculares e eletrofisiológicas com o objetivo de melhorar o entendimento da fisiopatologia e da etiologia da depressão. Essas pesquisas revelaram que certos aspectos da depressão são resultado de mudanças neuroplásticas inadequadas, induzidas pelo estresse crônico em circuitos neurais específicos como o hipocampo (Castrén, Rantamäki, 2010; Larsen et al., 2008; Segawa et al., 2013). O estresse crônico ocasiona uma desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal o que resulta na síntese e na liberação exacerbada de cortisol que, por sua vez, diminui as concentrações de neurofinas, tal como o fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF) (Krishnan, Nestler, 2008). O BDNF é o fator de crescimento mais prevalente no sistema nervoso central e é essencial tanto para o desenvolvimento como para a plasticidade neuronal (Autry, Monteggia, 2012). Neste sentido, Larsen et al. (2008) constataram que a imipramina induziu mudanças na plasticidade neural por meio da regulação do BDNF no hipocampo durante 14 e 21 dias de tratamento em ratos, o que explicaria, no caso, o fato da ação antidepressiva da imipramina levar semanas para se desenvolver.

Contudo, o progresso em revelar os mecanismos neuroquímicos da depressão é limitado pela falta de bons modelos animais, pois a maioria dos sintomas principais da depressão, como o humor deprimido e sentimento de inutilidade são dificilmente mensurados em modelos animais de laboratório (Nestler et al., 2002). Apesar destas ressalvas, alguns procedimentos produzem em animais estados comportamentais típicos da depressão humana e tem se mostrado adequados para a pesquisa de novas drogas (Cryan et al., 2002). Qualquer teoria da depressão tem de levar em conta o fato de que os efeitos bioquímicos diretos dos antidepressivos aparecem muito rapidamente, enquanto o efeito antidepressivo (melhora de humor) leva semanas para se desenvolver (Krishnan, Nestler, 2008). Nesse sentido, a utilização de modelos animais comportamentais e farmacológicos de depressão representa uma importante ferramenta para detectar novas drogas antidepressivas, bem como para

realizar uma investigação de circuitos neurais envolvidos na depressão (Andreatini et al., 2006). O próximo tópico discute um pouco sobre os modelos animais de depressão e sua importância para o estudo da doença e de drogas antidepressivas.

1.4 Modelos Animais de Depressão

Um exemplo da utilidade dos modelos animais é seu uso na investigação dos mecanismos de ação de drogas, bem como na investigação da neurobiologia dos transtornos mentais (Andreatini et al., 2006). Embora amplamente utilizados na pesquisa biomédica, seu uso na psiquiatria, particularmente o dos modelos animais de psicopatologia, é dificultado pelas características peculiares dos distúrbios mentais, uma vez que, esses modelos são limitados à observação de alterações comportamentais, enquanto que no ser humano muitas vezes são os aspectos subjetivos como alucinações, delírios, tristeza e culpa que predominam nos distúrbios mentais (Guimarães, 1993; Nestler, Hyman, 2010).

Particularmente na depressão, os modelos animais são ferramentas indispensáveis na busca de identificar novas drogas antidepressivas e fornecer informações com a finalidade de elucidar os mecanismos da neurobiologia da depressão. Alguns modelos animais com diferentes graus de sensibilidade aos efeitos de agentes antidepressivos são: o teste da natação forçada, o teste da suspensão da cauda, o desamparo aprendido, o estresse crônico moderado e o teste de inibição à hipotermia induzida por doses elevadas de apomorfina (Porsolt et al. 1991; Weiss, Kilts, 1998; Cryan et al. 2002), entre outros. Os critérios mais importantes para validar tais modelos são: 1) alta sensibilidade a diferentes tipos de antidepressivos (ausência de falsos negativos) e ao mesmo tempo 2) alta seletividade (ausência de falsos positivos) (Porsolt et al., 1991). Além disso, as drogas devem apresentar relação de potência entre os efeitos observados no modelo e na clínica, bem como o modelo deve ser reprodutível em diferentes laboratórios (McKinney, Bunney, 1969 *apud* Cryan et al., 2002). Segundo Willner (1984) e Nestler e Hyman (2010) é possível ainda mencionar três tipos de validade que devem ser consideradas na elaboração de um modelo animal para os distúrbios neuropsiquiátricos como a depressão: (1) a validade preditiva (farmacológica), significa que um modelo responde aos tratamentos de uma forma que prevê os efeitos desses tratamentos em seres humanos; (2) a validade de face, indica que um modelo recapitula importantes características anatômicas, bioquímicas, neuropatológicos ou comportamentais de uma doença humana; (3) a validade de construção (etiologia) refere-se em reproduzir nos animais os processos

etiológicos que causam a doença em humanos e assim replicar características comportamentais e neurais da doença.

No teste da natação forçada os ratos são forçados a nadar em tanque cilíndrico onde não há escape, com isso tendem a adotar rapidamente uma postura de imobilidade, realizando somente movimentos necessários para manter o focinho fora da água. Porsolt et al. (1978) sugeriram que a imobilidade reflete um estado de humor depressivo em que os animais perderam a esperança de encontrar uma saída e desistem de escapar. Segundo Weiss e Kilts (1998), trata-se de um modelo homólogo de depressão, ou seja, que induz nos animais algum comportamento que se assemelha ao quadro observado na clínica. Embora muito criticado, permanece o fato que a imobilidade induzida pelo teste da natação forçada é atenuada por uma vasta gama de antidepressivos (Porsolt et al. 1991). Por outro lado, o teste da inibição a hipotermia induzida pela apomorfina é um modelo baseado em interações farmacológicas (do antidepressivo com a apomorfina). Ao contrário da natação forçada, neste modelo não há qualquer analogia entre o efeito induzido e a depressão, e sim é baseado na observação de que drogas antidepressivas de algumas categorias podem inibir ou reverter a hipotermia induzida farmacologicamente. A apomorfina é uma droga que induz hipotermia, estereotipia e comportamento de escalar em camundongos colocados em gaiolas de arame, por meio de sua ação agonista com receptores dopaminérgicos. A hipotermia induzida por doses baixas da apomorfina (1 mg/kg) é inibida pela utilização de drogas neurolépticas (Neves et al., 2013). Os antidepressivos, por outro lado, antagonizam a hipotermia induzida por altas doses de apomorfina (10 e 16 mg/kg) sem afetar a estereotipia ou comportamento de escalar. Com isso se detecta a atividade do antidepressivo (Puech et al. 1978; Porsolt et al. 1991).

Desse modo, os dois modelos escolhidos para este trabalho podem ser considerados complementares. O teste da natação forçada permite a avaliação da ação antidepressiva do ponto de vista farmacológico e comportamental, enquanto no teste da hipotermia induzida pela apomorfina a avaliação do efeito das drogas se dá por mecanismos que dependem sobretudo de alteração de respostas fisiológicas. A pré-administração de ayahuasca em animais tratados com drogas antidepressivas e submetidos aos modelos animais descritos permite tanto a avaliação de uma possível potencialização de efeito das drogas, como a investigação de mecanismos fisiológicos envolvidos com este processo. Ainda que este estudo seja baseado em modelos animais, tais resultados podem fornecer grande subsídio para futuros estudos clínicos. Saber se a ayahuasca modifica o efeito dos antidepressivos e em que proporção, é de grande relevância para políticas públicas de saúde, em especial na orientação de médicos e na medicação de pacientes com transtornos de humor e que são usuários do chá

de ayahuasca. Nesse sentido, o próximo tópico abordará alguns dados na literatura sobre a interação dos componentes do chá de ayahuasca com outras drogas.

1.5 Interações do Chá de Ayahuasca com Outras Drogas

Aparentemente, o uso regular e a longo prazo do chá de ayahuasca modula o sistema de neurotransmissão serotoninérgico (McKenna, 2004), pois foi constatado em pessoas que consumiam o chá regularmente há mais de dez anos uma elevada densidade dos transportadores de serotonina nas plaquetas e no cérebro (Callaway et al., 1994). Além disso, foi constatado em estudos de neuroimagem (como já citados anteriormente) que a ayahuasca induziu a ativação de estruturas específicas no encéfalo moduladas pela ativação de receptores serotoninérgicos (Riba et al., 2006; de Araujo et al., 2012).

Postula-se que o chá de ayahuasca possa ter efeitos positivos e terapêuticos no humor e psiquismo de pessoas com problemas psiquiátricos (Grob et al., 1996; Doering-Silveira et al., 2005), uma vez que déficits serotoninérgicos (e de outras monoaminas) estão correlacionados com a depressão (Meyer et al. 2006; Krishnan, Nestler, 2008). Entretanto, outros efeitos poderiam ser esperados da associação do chá com outras drogas, bem como medicamentos utilizados na psiquiatria, uma vez que é bem conhecida a ação inibitória da MAO-A pelas β -carbolinas e pelo fato do alucinógeno DMT ser um potente agonista de receptores serotoninérgicos. Nesse sentido, são carentes as informações sobre a potencial interação dos componentes ativos do chá com outras drogas (Callaway et al., 1999; McKenna, 2004; Pires, 2009).

Em um dos poucos estudos encontrados na literatura científica, Pires (2009), utilizando modelos animais de psicofarmacologia, relata a interação do chá de ayahuasca com a morfina e o propofol, drogas anestésicas muito utilizadas em cirurgias. O estudo sugere que a interação possa ter ocorrido na metabolização das drogas estudadas, mas não avaliou o efeito do chá de ayahuasca sobre a atividade de enzimas de metabolização, seja a MAO-A ou enzimas do sistema P_{450} . Contudo, a afinidade dos alcaloides β -carbolínicos por isoenzimas do sistema P_{450} , em especial o subtipo CYP_{2D6} já é bem documentado (Yu et al., 2003). As enzimas do sistema P_{450} são as principais responsáveis pela metabolização da maioria dos agentes farmacológicos, de forma que interações com este sistema podem alterar significativamente a biodisponibilidade de drogas (Hiemke, Pfuhlmann, 2012; Rahimi, Abdollahi, 2012). Várias substâncias de origem vegetal, incluindo algumas presentes em alimentos e fitoterápicos já foram descritas como inibidores ou indutores de enzimas do

sistema citocromal, como é o caso do *Hypericum perforatum*, usado como antidepressivo (Roby et al., 2000), e com os sucos de “grape fruit” e maçã, entre outros (Nowack, 2008; Farkas et al., 2008).

Dessa forma, o estudo da interação do chá de ayahuasca com outras drogas, como os antidepressivos, é de grande importância, pois considerando a ação IMAO-A das β -carbolinas presentes no chá de ayahuasca, bem como o efeito agonista da DMT sobre o sistema serotoninérgico, é de se esperar que a associação do chá com antidepressivos (IMAO ou outras categorias) leve a uma potencialização dos efeitos destes. Por exemplo, a estimulação excessiva de receptores serotoninérgicos em nível central e periférico pode induzir a síndrome serotoninérgica, que é caracterizada por uma série de efeitos adversos como mudanças no estado mental, hiperatividade autonômica e anormalidades neuromusculares (Boyer, Shannon, 2005).

Este estudo em particular, fundamenta-se no fato de que o número de participantes das religiões ayahuasqueiras tem crescido nos últimos anos, assim como o número de trabalhos que advertem para a potencial interação do chá com certos agentes farmacológicos. Ao mesmo tempo, constata-se que a automedicação com agentes utilizados em psiquiatria, principalmente ansiolíticos e antidepressivos, também tem crescido consideravelmente.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar se o chá de ayahwasca interfere no efeito de drogas antidepressivas de diferentes categorias:

- imipramina (antidepressivo tricíclico, inibidor não-seletivo da recaptação de serotonina e de noradrenalina), sertralina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina); e moclobemida (inibidor reversível da MAO-A). Também foi avaliado o efeito da associação de ayahwasca com as drogas pargilina (inibidor irreversível da MAO-B) e tranilcipromina (inibidor irreversível não-seletivo da MAO-A e da MAO-B).

Para tanto, procurou-se avaliar:

- A atividade *in vitro* da monoaminoxidase na presença do chá de ayahwasca isoladamente e após pré-incubação com a selegilina (inibidor irreversível seletivo da MAO-B);
- A atividade por si só do chá de ayahwasca e efeito de sua interação com drogas antidepressivas em modelos animais de depressão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Chá de Ayahuasca

Foi empregada amostra de ayahuasca gentilmente cedida por ex-integrante da União do Vegetal (UDV), em São Paulo, preparada por decocção (cozimento do cipó de *B. caapi* e folhas de *P. viridis*). O material em questão já foi utilizado em estudos prévios e submetido à análise química que confirmou a presença de DMT e de β -carbolas em concentrações correspondentes àsquelas descritas em literatura, conforme mostram os dados da tabela 1 (Pires, 2009). O chá foi liofilizado e armazenado em dessecador à 10 °C para melhor preservar sua integridade e facilitar a posterior preparação nas concentrações desejadas. Na ocasião dos testes *in vivo*, o chá liofilizado foi solubilizado em água destilada e administrado aos animais por via oral (v.o.), por gavagem. No caso dos testes *in vitro* o chá liofilizado foi solubilizado em tampão de incubação, cuja composição será descrita mais a frente.

A escolha da dose unitária do chá de ayahuasca utilizada neste estudo foi baseada nas doses médias consumidas pelo homem durante um ritual, estipulada em cerca de 70 ml (Pires, 2009). Considerando que a liofilização de 100 ml do chá de ayahuasca produziu um rendimento de 12 g, ou seja, encontra-se na concentração de 0,12 g/ml, a dose média consumida nos rituais seria de 8,4 g de sólido (em 70 ml de chá). Para um indivíduo adulto de 70 kg (peso médio) isto equivale a 120 mg/kg (8,4 g/70 kg), dose que foi escolhida como a dose unitária do trabalho.

Tabela 1. Resultado do doseamento do chá de ayahuasca, conforme Pires (2009).

| Quantificação dos constituintes químicos do chá de ayahuasca | |
|--|--------------|
| Substância | Concentração |
| Dimetiltriptamina | 0,38 mg/ml |
| Tetrahidroharmina | 1,67 mg/ml |
| Harmina | 0,32 mg/ml |
| Harmalina | 0,12 mg/ml |

3.2 Drogas

Os seguintes sais e demais reagentes foram utilizados: fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (J.T. Baker), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (Sigma), cloreto de potássio (KCl) (Mallinckrodt Chemicals), sacarose (Synth), ácido tricloroacético (TCA) e hidróxido de sódio (NaOH). Para a determinação da concentração de proteína foi utilizado o reativo de Biureto e o ácido deoxicólico (Sigma), além de albumina (Sigma) como padrão.

Também foram utilizados os seguintes antidepressivos: cloridrato de imipramina (antidepressivo tricíclico; inibidor não-seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina – marcas Cristália e Biosintética), cloridrato de sertralina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina – Biosintética), moclobemida (inibidor reversível da MAO-A – Aurorix[®], Roche), pargilina (inibidor irreversível da MAO-B – Sigma), tranilcipromina (inibidor irreversível não-seletivo da MAO-A e da MAO-B – Sigma). Cloridrato de apomorfina (agonista do receptor dopaminérgico D_2 – Sigma) foi utilizada como droga indutora de hipotermia. Selegilina (deprenil hidrocloreto, Research Biochemicals Inc.) foi empregada como inibidor seletivo da MAO-B nos ensaios *in vitro*.

Todas as drogas empregadas nos testes *in vivo* foram solubilizadas em salina a 0,9% e administradas aos animais por via intraperitoneal (i.p.). A moclobemida, em particular, foi solubilizada em salina 0,9% contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) ou Tween 80. Já nos ensaios *in vitro* as drogas foram solubilizadas em tampão de incubação (ver descrição à frente), com auxílio de DMSO quando era o caso.

A moclobemida foi extraída de comprimidos do medicamento vendido comercialmente por meio do método de purificação adaptado de Villarinho et al. (2012). Inicialmente o revestimento do comprimido foi removido com o auxílio de uma espátula, sendo em seguida os comprimidos triturados. O pó obtido foi solubilizado em solução contendo água e diclorometano (CAAL) em volumes iguais (± 20 ml) e em seguida foi realizada a filtração a vácuo para remoção dos excipientes insolúveis. O filtrado foi transferido para uma proveta e submetido a agitação intensa durante 1 minuto, sendo logo em seguida transferido para um funil de separação e mantido em repouso por alguns minutos. A fase aquosa (contendo os excipientes) foi descartada e a fase orgânica (contendo a droga de interesse) foi reservada. O processo foi repetido quatro vezes e ao final o resíduo seco foi obtido por evaporação do solvente.

A efetividade do processo e pureza da droga foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (Waters) e indicou que

o procedimento de extração / purificação foi satisfatório, conforme indicado pelo cromatograma da figura 4. Para tanto, utilizou-se uma coluna C18 (5 μ m, 150 x 4,6 mm); isocrático; fluxo de leitura 1 ml/min; A detecção foi realizada em 239 nm. A fase móvel consistiu de 25% de KH_2PO_4 10 mM com 1% de trietilamina (pH 3,9) e 75% de acetonitrila (Tedia) + água (83:17, v/v). A amostra (1 mg/ml) foi diluída em metanol (MeOH) (Tedia) com 10 minutos de leitura. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma (1.727) corresponde a 96% da área sob a curva. A condição cromatográfica descrita foi adaptada de Plenis et al. (2007) e Rakic et al. (2007).

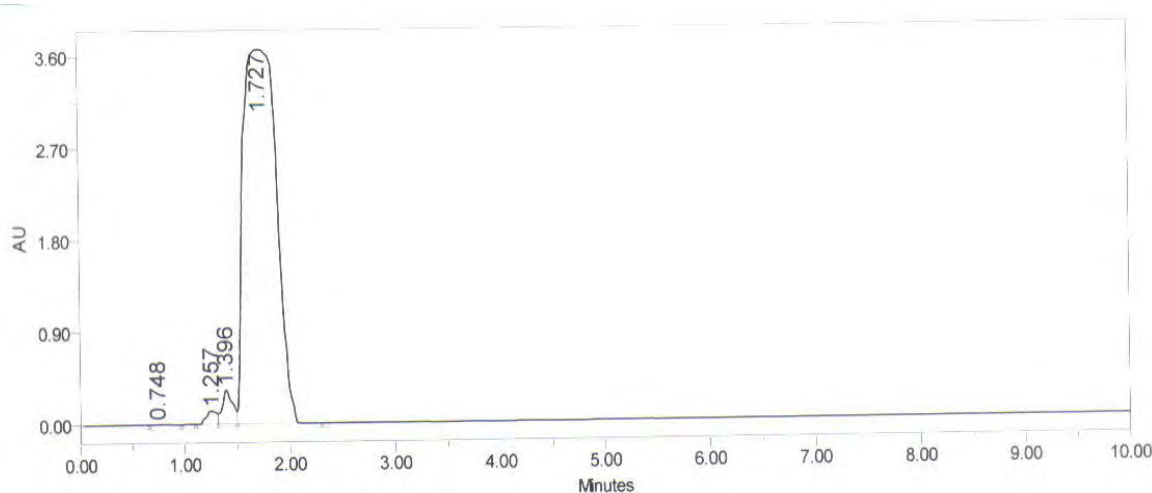


Figura 4. Cromatograma indicando a presença de moclobemida (Pico 1,727) no material extraído a partir do medicamento vendido comercialmente como Aurorix®.

3.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar e camundongos Suíços, machos, adultos jovens (2-5 meses), provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O peso dos ratos variou de 250 a 530 gramas e dos camundongos de 32 a 59 gramas. Os testes comportamentais (*in vivo*) foram realizados no Departamento de Psicobiologia da UNIFESP, e os animais foram habituados ao local do experimento pelo menos 7 dias antes das avaliações para evitar interferências referentes ao transporte e readaptação. Os animais ficaram alojados em caixas com água e ração *ad libitum* em salas com ciclo claro-escuro controlado (12h) e controle de temperatura. As administrações das drogas testadas foram feitas no volume de 0,1 ml/10g (camundongos) ou 0,1 ml/100g (ratos). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do ABC (UFABC), sendo registrado sob o número 11/2011 (ANEXO A).

3.4 Inibição à Hipotermia Induzida pela Apomorfina

Neste teste foram empregados camundongos Suíços ($n = 5-9$ / grupo) e um termômetro digital (Temp JKT, Oakton Instruments). O protocolo consistiu primeiramente em ambientar os animais na sala do experimento por duas horas antes do início do teste, sendo privados de água e ração. Na sequência, foi realizada a mensuração da temperatura basal por meio de uma sonda introduzida à profundidade de 2 cm no reto do animal (Rainer et al., 2012). Foram utilizados no estudo apenas os animais que apresentaram temperatura entre 36,9 e 38,4 °C, a fim de diminuir a variabilidade e facilitar a observação dos resultados (Mendes et al., 2002). Posteriormente foi avaliada a capacidade de diferentes drogas antidepressivas e do chá de ayahuasca, isoladas e em associação, quanto à capacidade de inibir ou potencializar a hipotermia induzida pela apomorfina.

3.4.1 Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente

Em testes independentes, os camundongos receberam por via i.p. salina ou o antidepressivo a ser testado (moclobemida, pargilina, imipramina e sertralina) ou por v.o. água ou ayahuasca, e após trinta minutos apomorfina (10 mg/kg, i.p. - dose indutora de hipotermia) (Menon, Vivonia, 1981). A mensuração da temperatura dos animais foi realizada antes da administração das drogas (basal), após 30 minutos da administração das drogas em avaliação e após 30 minutos da administração da apomorfina. As doses utilizadas nesse teste para a ayahuasca e para cada antidepressivo foram baseadas em estudos prévios da literatura e estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Doses empregadas na avaliação do efeito dos antidepressivos e do chá de ayahuasca isoladamente no teste de hipotermia induzida pela apomorfina (10 mg/kg, i.p.).

| Tratamento | Doses utilizadas (mg/kg) | n | Referências |
|-------------------|-------------------------------------|----------|---|
| Ayahuasca | 120 e 1200 | 8 | Doses baseadas em dados do laboratório |
| Imipramina | 0,5; 1 e 5 | 5-6 | Puech et al. (1978); Menon et al. (1984); Bueno et al. (2006) |
| Sertralina | 1, 5, 10 e 20 | 9 | Menon et al. (1984) |
| Moclobemida | 5, 10, 20 e 40 | 8 | Villarinho et al. (2012) |
| Pargilina | 40 | 5 | Abdel-Fattah et al. (1995b); Abdel-Fattah et al. (1997) |

3.4.2 Teste da associação da ayahuasca com os antidepressivos

Em um segundo momento, o objetivo era avaliar o efeito da interação de ayahuasca com os antidepressivos, em doses subefetivas. Para avaliar o efeito das interações, os animais foram pré-tratados com ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) e após 30 minutos com os antidepressivos (via i.p.), nas seguintes doses: imipramina 1 mg/kg, sertralina e moclobemida 5 mg/kg e pargilina 40 mg/kg. Foi utilizado como grupo controle água destilada (v.o.) + salina (i.p.). Após 30 minutos do tratamento com os antidepressivos os animais receberam apomorfina (10 mg/kg, i.p.). A temperatura retal dos animais foi avaliada antes da administração da ayahuasca (temperatura basal), após 30 minutos da administração dos antidepressivos e após 30 minutos da administração da apomorfina.

3.5 Teste da Natação Forçada

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (n = 5-9 / grupo). O protocolo consistiu em expor os animais a um tanque cilíndrico (50 cm de altura por 30 cm de diâmetro) com água a 25 °C numa altura de 38 cm por 15 minutos. Em seguida os animais foram removidos do tanque, secos com toalha e jato de ar morno (secador) e retornaram para suas respectivas caixas (Mendes et al., 2002). Vinte e quatro horas depois os mesmos animais foram

recolocados nos tanques com água e avaliados durante 5 minutos por dois avaliadores (utilizando a média das avaliações) quanto ao tempo tentando escapar da situação imposta e o tempo de imobilidade, que consistia em realizar apenas os movimentos necessários para manter o focinho fora da água. Além disso, foi quantificado o número de defecações de cada animal, uma vez que esta é considerada uma medida de emocionalidade do animal em situações aversivas (Connor et al., 1999). As drogas foram administradas conforme descrito por Porsolt et al. (1978), ou seja, uma primeira administração imediatamente após a primeira sessão de natação, a segunda administração 5 horas antes do teste de avaliação e a terceira uma hora antes do teste.

3.5.1 Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente

Em testes independentes, os animais receberam por via i.p. salina ou o antidepressivo a ser testado (moclobemida, pargilina, tranilcipromina, imipramina e sertralina) ou por v.o. água ou ayahuasca. As doses utilizadas para a ayahuasca e para cada antidepressivo foram baseadas em estudos prévios da literatura e estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Doses utilizadas para avaliação do efeito dos antidepressivos e do chá de ayahuasca isoladamente no teste da natação forçada.

| Tratamento | Doses utilizadas (mg/kg) | n | Referências |
|-------------------------|-----------------------------|-----|---|
| Ayahuasca | 120 e 1200 | 8-9 | Definidas a partir de dados do laboratório |
| Imipramina ^a | 7,5; 15 e 30 | 7-8 | Guilhermano et al. (2004); Kitamura et al. (2004); Réus et al. (2011a) |
| Sertralina | 2,5; 5; 10 e 20 | 8 | Rogóz, Szuka (2006); Bilge et al. (2008); Prica et al. (2008); Espallergues et al. (2012) |
| Pargilina | 1, 5 e 20 | 5 | Paul et al. (1988) |
| Tranilcipromina | 0,5; 2 e 10 | 5-7 | Torregrossa et al. (2005); Reed et al. (2008) |
| Moclobemida | 7,5; 15 e 30 | 8 | Ferigolo et al. (1998); Wesolowska; Nikiforuk (2008) |

(^a) = Foram testadas duas marcas de imipramina: Cristália (doses 7,5-30 mg/kg) e Biosintética (30 mg/kg)

3.5.2 Teste da associação da ayahuasca com os antidepressivos

Num segundo momento, foi avaliada a capacidade do chá de ayahuasca potencializar o efeito dos antidepressivos, em doses não efetivas. Os animais foram pré-tratados com ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) ou água e logo na sequência com salina ou os antidepressivos (via i.p.) nas seguintes doses: imipramina 3,75 (Cristália) e 15 mg/kg (Biosintética), sertralina 2,5 e 10 mg/kg, tranilcipromina 0,1 mg/kg, moclobemida 15 e 30 mg/kg. O grupo de animais controle recebeu água (v.o.) + salina (i.p.). A associação com pargilina não foi avaliada.

3.6 Medida da Atividade Motora

Foi avaliado o efeito da ayahuasca (120 e 1200 mg/kg, v.o.) e dos antidepressivos imipramina (30 mg/kg, i.p.), sertralina (20 mg/kg, i.p.) e moclobemida (30 mg/kg, i.p.) isoladamente sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos ($n = 7$ / grupo). Como controle foi administrado água (v.o.). O teste consistiu em colocar os animais imediatamente após a administração das drogas em caixas acrílicas individuais de medida automática (47,5 X 25,7 X 20,5 cm), contendo 15 pares de células fotoelétricas espaçadas em 2,54 cm (Columbus Instruments, CA) (figura 5). A interrupção de dois feixes de luz consecutivos corresponde a uma unidade de locomoção (Paro et al. 2008). O número de interrupções dos feixes de luz foi registrado aos 30, 60, 90, 120 minutos, porém sendo a contagem não-cumulativa.



Figura 5. Caixa locomotora utilizada para o registro da atividade motora de camundongos. Foto: William Carvalho Amaral.

3.7 Avaliação da Inibição Sobre a Monoaminoxidase (MAO)

3.7.1 Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias

O tecido encefálico utilizado para a preparação da fração enzimática foi obtido de ratos que não haviam recebido nenhuma droga experimental. Depois de anestesiados com hidrato de cloral (2 ml de solução a 30%) o encéfalo dos animais foi perfundido com solução salina 0,9% e em seguida removido e congelado a -20 °C até o momento do ensaio. Para a preparação do homogenato, o tecido foi homogeneizado utilizando agitador mecânico (Ika®) em 4 volumes (massa/volume) de solução de Na₂HPO₄ 0,0168 M, KH₂PO₄ 0,0106 M e sacarose 0,32 M; pH 7,4; à 4 °C (tampão de homogeneização). O homogeneizado foi centrifugado (Thermo Scientific) a 900 x g por 5 minutos, 4 °C, e o sobrenadante obtido centrifugado a 12.500 x g por 15 minutos. O pellet mitocondrial foi lavado mais uma vez com tampão de homogeneização e recentrifugado sob as mesmas condições. Finalmente, o pellet foi ressuspensionado em 1 ml de tampão de incubação (Na₂HPO₄ 0,0168 M, KH₂PO₄ 0,0106 M, KCl 0,0036 M, pH 7,4 à 4 °C) e após dosagem de proteínas estocado em alíquotas à -20 °C (Soto-Otero et al., 2001; Sant'Anna, 2008).

A dosagem de proteína foi feita por meio do método do reagente de Biureto. Este método consiste na reação do cobre com a ligação peptídica das proteínas, formando assim um complexo quadrado planar com duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm, sendo esta última a mais utilizada por não permitir interferência de compostos que também absorvem na região de 270 nm (Zaia, et al. 1998). Assim, a absorbância obtida no espectrofotômetro (Thermo Scientific) em 540 nm é diretamente proporcional à concentração de proteínas na solução analisada. Uma alíquota (10 µl) do homogenato foi misturado a 100 µl de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p. 1,5 ml. A essa mistura foi adicionado 1,5 ml do reativo de Biureto, composto por sulfato cúprico 0,15 % (m/v), tartarato de sódio e potássio 0,6 % (m/v) e NaOH 0,75 mol/l. Após 10 minutos, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco de reagentes e a concentração de proteínas foi determinada a partir de uma curva de calibração utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (Cain, Skilleter, 1987). Por ocasião dos ensaios o homogenato foi diluído com tampão de incubação para uma concentração aproximada de 2,5 mg/ml de proteína, correspondendo a concentração que produziu melhor resultados em ensaios-piloto.

3.7.2 Padronização do ensaio para determinação da atividade da MAO

Para a determinação da atividade da MAO, foram realizados inicialmente experimentos a fim de estabelecer as melhores condições para os ensaios, como concentração de enzima (expressa em proteína total), concentração de substrato e tempo de ensaio. Os ensaios foram realizados conforme os métodos de Soto-Otero et al. (2001) e Sant'Anna (2008), com algumas modificações. O método é baseado na oxidação de quinuramina em 4-hidroxiquinolina pela MAO com ciclização espontânea completa do intermediário aldeído, conforme descrito pela seguinte reação (figura 6):

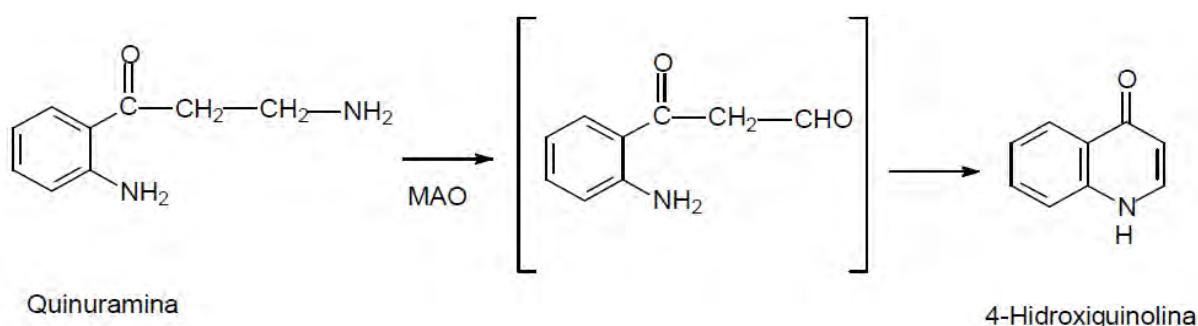


Figura 6. Formação de 4-hidroxiquinolina por meio da oxidação da quinuramina pela enzima MAO, conforme Sant'Anna (2008).

Após a padronização das condições ideais, as frações mitocondriais (2,5 mg/ml de proteína, o que corresponde a 0,71 mg/ml no ensaio) foram pré-incubadas à 37 °C por 5 minutos com a pargilina (0,1; 1; 10; 100 µM e 1 e 10 mM) e com a selegilina (0,25; 2,5; 25; 100; 250; 500 nM e 2,5 e 25 µM). Após a pré-incubação a quinuramina foi adicionada como substrato não-seletivo na concentração de 60 µM no ensaio com a pargilina ou 90 µM no ensaio com a selegilina. O homogenato contendo as drogas foi incubado por mais 30 minutos a 37 °C, quando ao fim deste período, adicionou-se TCA 10% para paralisar a reação. As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 5 minutos e 800 µl de sobrenadante foi transferido para outro microtubo juntamente com 1 ml de NaOH (1M). Finalmente, 200 ou 300 µl (a depender do ensaio) de cada tubo foi pipetado em microplaca, em triplicata, e levado para quantificação. A concentração do produto gerado pela MAO, 4-hidroxiquinolina, foi medida espectrofotometricamente (Biotech – *software* Gen5 versão 2.01.14) pelo método fluorimétrico (excitação 320/20 nm e emissão: 460/40 nm), utilizando para comparação uma curva padrão do produto. Nos dois ensaios, um tubo extra contendo apenas as drogas testadas, na maior concentração empregada, foi incluído para verificar se havia interferência destas na

leitura. A porcentagem de inibição da MAO foi calculada utilizando o valor de leitura do tubo sem o inibidor como 100% de atividade enzimática.

3.7.3 Ensaios iniciais da inibição da monoaminoxidase (MAO) total e MAO-A pela ayahuasca

Antes de avaliar o efeito da ayahuasca sobre a atividade da MAO foram medidas as leituras no fluorímetro para concentrações crescentes do chá: 10; 100 ng/ml, 1; 10, 100 e 1000 µg/ml (sem adição da fração enzimática ou substrato). Este teste foi realizado com a finalidade de verificar se a ayahuasca por si só interferia na leitura com tais concentrações.

Em um segundo momento, foi avaliado o efeito inibitório da ayahuasca sobre a MAO total. Para tanto, foram pipetados em microtubos diferentes concentrações de ayahuasca (10; 100 e 250 ng/ml e 1; 2,5 e 10 µg/ml), em seguida a fração enzimática e 90 µM de quinuramina. As amostras foram incubadas à 37 °C por 30 min e o ensaio conduzido conforme descrito anteriormente.

Finalmente, foi realizado um ensaio para avaliar a inibição específica da ayahuasca sobre a monoaminoxidase do tipo A (MAO-A). Para isso, foi feita uma pré-incubação (37 °C por 5 min) dos tubos contendo a fração enzimática com 250 nM de selegilina e na sequência pipetada a ayahuasca (10; 100 e 250 ng/ml e 1; 2,5 e 10 µg/ml), 90 µM do substrato quinuramina e incubação de 30 min à 37 °C. Os demais passos do ensaio foram realizados conforme descrito anteriormente, utilizando 300 µl das amostras em triplicata. Para o cálculo da inibição específica da MAO-A o valor de leitura do tubo contendo 250 nM de selegilina sem ayahuasca foi considerado como 100% de atividade.

3.8 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados paramétricos foram analisados estatisticamente pela ANOVA de uma via (ou ANOVA de duas vias, no caso de medidas repetidas), seguida pelo teste de Duncan, quando havia diferença entre os grupos. Por outro lado, os dados não-paramétricos foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Mann-Whitney. Foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene) para verificar se os dados eram paramétricos. Quando houve conflito entre dados paramétricos e não-paramétricos no mesmo teste da inibição a hipotermia induzida pela apomorfina foi avaliado a

homocedasticidade dos dados para a escolha do teste estatístico mais apropriado. O nível de significância foi estipulado em 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados usando o software Portable Statistica 8.

4 RESULTADOS

4.1 Inibição à Hipotermia Induzida pela Apomorfina

4.1.1 Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente

Na medição da temperatura basal, isto é, antes da administração das drogas, nenhum grupo diferiu entre si, indicando que os animais foram distribuídos de forma homogênea. Além disso, a administração de ayahuasca ou dos antidepressivos sertralina e imipramina não modificou a temperatura dos animais (figuras 7 e 8). Em todos os ensaios, o grupo controle, tratado com água ou salina e 30 minutos depois com apomorfina, apresentou hipotermia. Já a avaliação da temperatura dos animais após 30 minutos da apomorfina revelou que as administrações de ayahuasca (figura 7) na dose de 1200 mg/kg [$F(2,21) = 5,74$; $p = 0,010295$] (Duncan, $p < 0,01$) e imipramina (figura 8A) na dose de 5 mg/kg [$F(3,19) = 6,90$; $p = 0,0025$] (Duncan, $p < 0,01$) inibiram a hipotermia induzida pela apomorfina. Por outro lado, nenhuma dose de sertralina [$F(4,40) = 0,79$; $p = 0,5357$] inibiu a hipotermia quando comparada ao grupo controle salina (figura 8B).

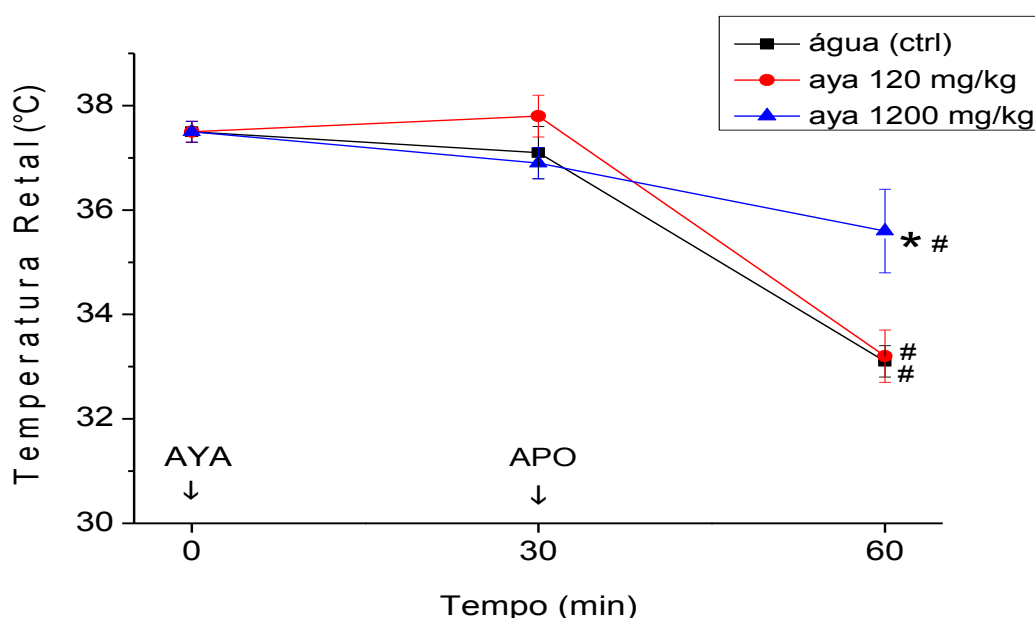


Figura 7. Efeito da administração oral de ayahuasca (aya) sobre a temperatura retal de camundongos administrados após 30 min com apomorfina (10 mg/kg, i.p.). Cada ponto e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 8$).

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle (ctrl) água ou salina. Anova de uma via, seguida pelo teste de Duncan.

(#) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente da respectiva temperatura basal. Anova de medidas repetidas, seguida pelo teste de Duncan.

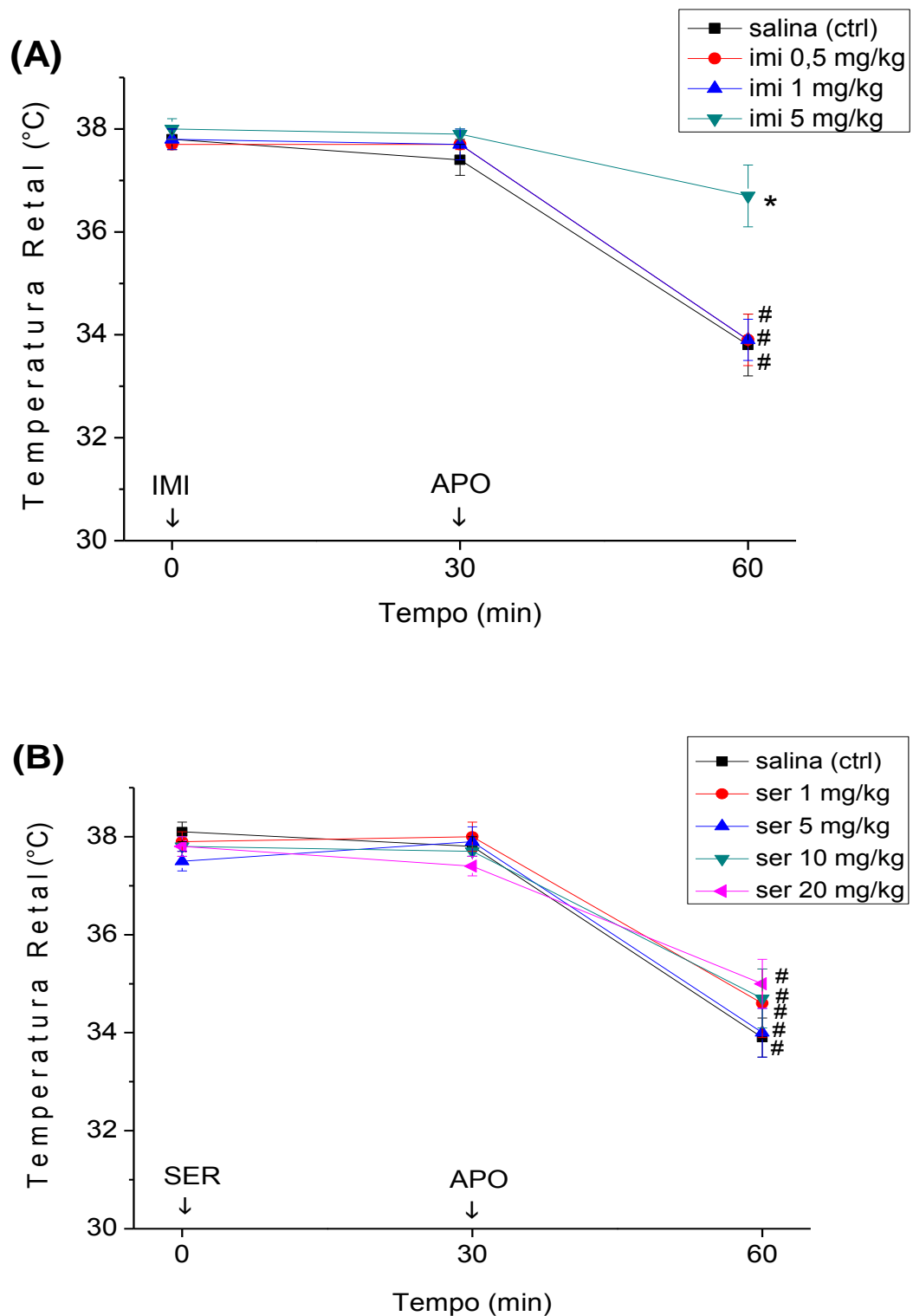


Figura 8. Efeito da administração i.p. de imipramina (imi) (A) e sertralina (ser) (B) sobre a temperatura retal de camundongos administrados após 30 min com apomorfina (10 mg/kg, i.p.). Cada ponto e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5 - 9$).

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle (ctrl) água ou salina. Anova de uma via, seguida pelo teste de Duncan.

(#) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente da respectiva temperatura basal. Anova de medidas repetidas, seguida pelo teste de Duncan.

No teste com a moclobemida a temperatura dos animais dos diferentes grupos foi mensurada até 2h30 min após a administração de apomorfina, já que seu efeito neste teste é bem distinto do observado com outras classes de antidepressivos, em especial os tricíclicos. A moclobemida por si só, nas doses de 20 e 40 mg/kg, diminuiu a temperatura dos animais tanto em relação aos valores basais (Anova de medidas repetidas) como na comparação com o grupo controle [$F(4,35) = 15,08$; $p = 0,0000$] (Duncan: $p < 0,001$ para doses de 20 e 40 mg/kg) (figura 9). Com a administração de apomorfina, houve pronunciada hipotermia em todos os grupos, mantendo-se até os 120 min de observação (e em menor intensidade até os 180 min para grupos das doses 10 e 20 mg/kg) (ANOVA de medidas repetidas). Por outro lado, somente os animais tratados com a dose de 40 mg/kg diferiram do grupo controle, na observação aos 120 min [$F(4,35) = 4,31$; $p = 0,0061$] (Duncan, $p < 0,05$), indicando potencialização do efeito da apomorfina (figura 9).

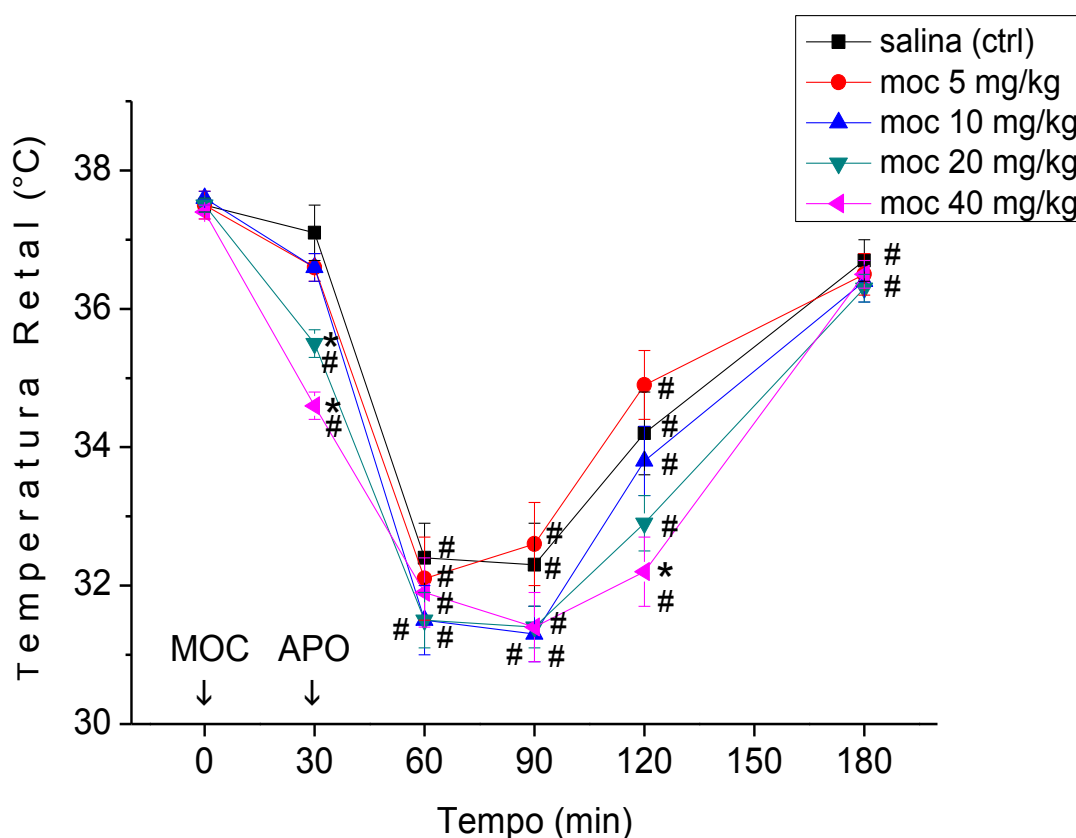


Figura 9. Efeito da administração i.p. de moclobemida (moc) sobre a temperatura retal de camundongos administrados após 30 min com apomorfina (10 mg/kg, i.p.). Cada ponto e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 8$).

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle (ctrl). Anova de uma via, seguida pelo teste de Duncan.

(#) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente da respectiva temperatura basal. Anova de medidas repetidas, seguida pelo teste de Duncan.

4.1.2 Associação da ayahuasca com os antidepressivos

No teste da associação da ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) com a imipramina (1 mg/kg, i.p., dose subefetivas na avaliação com a droga isoladamente) os tratamentos experimentais produziram por si só diminuição da temperatura dos animais (tempo 60 min no gráfico) quando comparada às respectivas temperaturas basais (Anova de medidas repetidas), sendo que no caso do grupo da associação das drogas a queda de temperatura também foi estatisticamente diferente do grupo controle água + salina [$F(3,28) = 8,50$; $p = 0,0004$] (Duncan, $p < 0,001$) (figura 10A). Com a administração de apomorfina, o grupo que recebeu apenas imipramina e o de animais tratados com ayahuasca + imipramina apresentaram inibição da hipotermia induzida pela apomorfina (figura 10A), quando comparados ao grupo controle água + salina [$F(3,28) = 3,98$; $p = 0,017697$] (Duncan: $p < 0,05$ para água + imipramina; $p < 0,01$ para ayahuasca + imipramina).

Com a finalidade de melhor analisar a interação dos efeitos tratamento e tempo, optou-se também em avaliar a diferença de temperatura (Δt) das medições feitas 30 minutos após a administração dos antidepressivos (tempo 60) em relação à temperatura basal [$\Delta t(60' - \text{Basal})$]. Esta avaliação revelou que a associação da ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) + imipramina (1 mg/kg, i.p.) induziu uma Δt estatisticamente significativa de $-2,9 \pm 0,5$ °C (figura 10B) em relação ao grupo controle que recebeu água + salina onde a Δt foi de $-0,6 \pm 0,3$ °C [$F(3,28) = 8,9580$; $p = 0,000254$] (Duncan, $p < 0,001$). Por outro lado, os tratamentos com as drogas isoladas não induziram uma variação de temperatura estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Quando avaliamos a Δt das medições feitas 30 minutos após a administração da apomorfina (tempo 90) em relação à temperatura após administração do antidepressivo [$\Delta t(90' - 60')$] foi constatado que os grupos administrados com as drogas isoladas não foram diferentes entre si (figura 10B), mas foram diferentes do grupo controle [$F(3,28) = 12,21792$; $p = 0,00003$] (Duncan: $p < 0,05$ para ayahuasca + salina; $p < 0,01$ para água + imipramina). No caso da associação de ayahuasca + imipramina houve elevação da temperatura retal dos animais, com Δt de $0,8 \pm 0,6$ °C diferindo significativamente da Δt do grupo controle, de $-4,3 \pm 0,4$ °C (Duncan, $p < 0,001$). Além disso, a Δt do grupo tratado com a associação das drogas foi diferente do grupo ayahuasca + salina (Duncan, $p < 0,01$) e do grupo água + imipramina (Duncan, $p < 0,05$). Dessa forma, considera-se que houve interação entre os efeitos da imipramina e da ayahuasca.

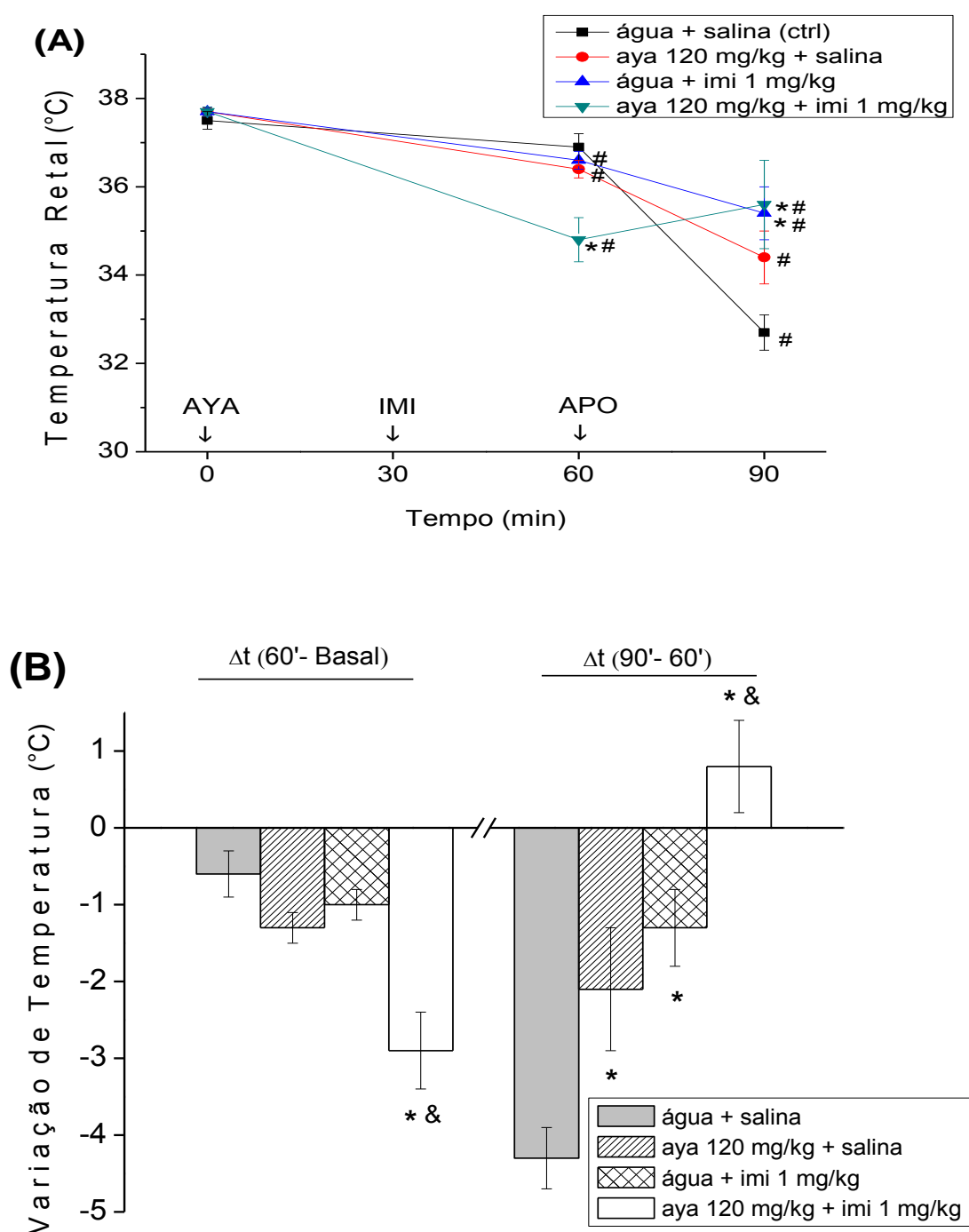


Figura 10. Efeito da administração de ayahuasca (aya 120 mg/kg, v.o.) e de imipramina (imi 1 mg/kg, i.p.), isoladamente ou em associação, sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina (10 mg/kg, i.p.) dada após 30 min do antidepressivo. (A) Temperatura retal dos camundongos nos intervalos indicados. (B) Diferença de temperatura (Δt) entre as medições realizadas nos tempos 60 e 0 (60' - Basal) ou entre os tempos 90 e 60 (90' - 60') do gráfico do painel A. Cada coluna ou ponto e respectivas barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 8$).

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle água + salina. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

(#) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente da respectiva temperatura basal. Anova de medidas repetidas, seguido pelo teste de Duncan.

(&) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo ayahuasca + salina e do grupo água + imipramina. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

No caso do experimento com a sertralina foi empregada uma dose intermediária na associação, já que nenhuma dose empregada isoladamente inibiu o efeito da apomorfina. A administração de sertralina (5 mg/kg, i.p.), ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) ou da associação destas produziu queda de temperatura em relação às respectivas temperaturas basais, ou seja, as drogas modificaram por si só a temperatura dos animais (tempo 60 min na figura 11A) (ANOVA de medidas repetidas), bem como as temperaturas dos grupos experimentais diferiram em relação ao grupo controle [$F(3,32) = 14,59$; $p = 0,000004$] (Duncan: $p < 0,01$ para ayahuasca + salina; $p < 0,001$ para água + sertralina e para ayahuasca + sertralina). Com a administração de apomorfina, todos os grupos passaram a ser estatisticamente semelhantes, ou seja, a hipotermia induzida pela apomorfina não foi inibida pelas drogas isoladamente ou em associação, como observado no tempo 90 min no gráfico [$F(3,32) = 2,76$; $p = 0,05848$] (tempo 90 min na figura 11A).

Quando foram avaliadas as diferenças de temperatura (Δt) do intervalo 60' - Basal (figura 11B) novamente os grupos experimentais foram diferentes do controle [$F(3,32) = 13,5664$; $p = 0,000007$] (Duncan: $p < 0,01$ para ayahuasca + salina e para água + sertralina; $p < 0,001$ para ayahuasca + sertralina). Quando avaliamos a Δt das medições feitas 30 minutos após a administração da apomorfina (90 min) em relação à temperatura após administração do antidepressivo (90' - 60') foi constatado que os grupos administrados com as drogas isoladas não foram diferentes entre si, mas foram diferentes do grupo controle [$F(3,32) = 16,7206$; $p = 0,000001$] (Duncan: $p < 0,05$ para ayahuasca + salina; $p < 0,001$ para água + sertralina). Além disso, o tratamento com ayahuasca + sertralina elevou a temperatura retal dos animais, com Δt de $0,2 \pm 0,6$ °C diferindo significativamente da Δt de $-4,5 \pm 0,5$ °C observada para o grupo controle (Duncan, $p < 0,001$). Somado a esse fato, a Δt do grupo tratado com a associação das drogas foi diferente da Δt dos grupos tratados com ayahuasca (Duncan, $p < 0,001$) ou sertralina (Duncan $p < 0,01$) isoladamente (figura 11B). Dessa forma, considera-se que houve interação entre os efeitos da sertralina e da ayahuasca.

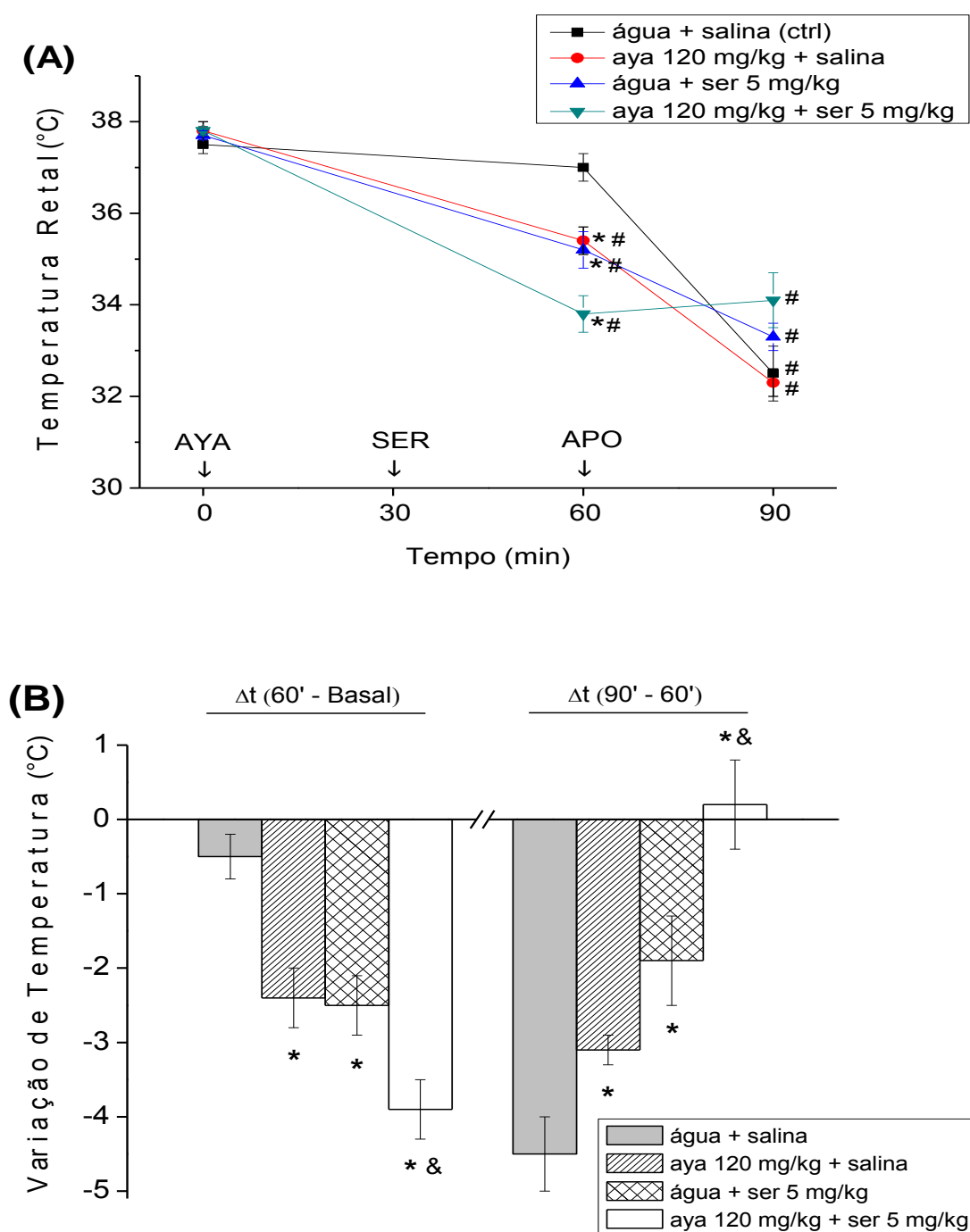


Figura 11. Efeito da administração de ayahuasca (aya 120 mg/kg, v.o.) e de sertralina (ser 5 mg/kg, i.p.) isoladamente ou em associação, sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina (10 mg/kg, i.p.) dada após 30 min do antidepressivo. (A) Temperatura retal dos camundongos nos intervalos indicados. (B) Diferença de temperatura (Δt) entre as medições realizadas nos tempos 60 e 0 (60' - Basal) ou entre os tempos 90 e 60 (90' - 60') do gráfico do painel A. Cada coluna ou ponto e respectivas barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 9$).

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle água + salina. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

(#) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente da respectiva temperatura basal. Anova de medidas repetidas, seguido pelo teste de Duncan.

(&) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo ayahuasca + salina e do grupo água + sertralina. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

Para o teste de associação da ayahuasca com a moclobemida, optou-se pela utilização da dose 5 mg/kg desta última, pois tal dose não produziu queda de temperatura quando dada isoladamente e tampouco interferiu no efeito da apomorfina. Na avaliação da temperatura 30 minutos após a administração do antidepressivo, houve diferença estatística no grupo ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) associada a moclobemida (5 mg/kg, i.p.) em relação a sua temperatura basal, ou seja, a associação das duas drogas induziu queda de temperatura nos animais (figura 12A, ANOVA de medidas repetidas). Por outro lado, a avaliação da temperatura dos animais 30 minutos após a administração de apomorfina revelou que nenhum dos tratamentos experimentais inibiu a hipotermia induzida pela apomorfina quando comparados ao grupo controle [$F(3,32) = 1,09$; $p = 0,369030$]. Ou seja, o efeito da apomorfina foi similar e todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação às suas respectivas temperaturas basais (ANOVA de medidas repetidas).

A avaliação da Δt após 30 min do antidepressivo (tempo 60 min) e os valores basais confirmou que a associação de ayahuasca e moclobemida produziu queda de temperatura nos animais [$F(3,32) = 3,15088$; $p = 0,038307$] (Duncan $p < 0,05$). Por outro lado, as variações de temperatura após a administração de apomorfina foram semelhantes entre todos os grupos avaliados [$F(3,32) = 0,5181$; $p = 0,672829$] (figura 12B).

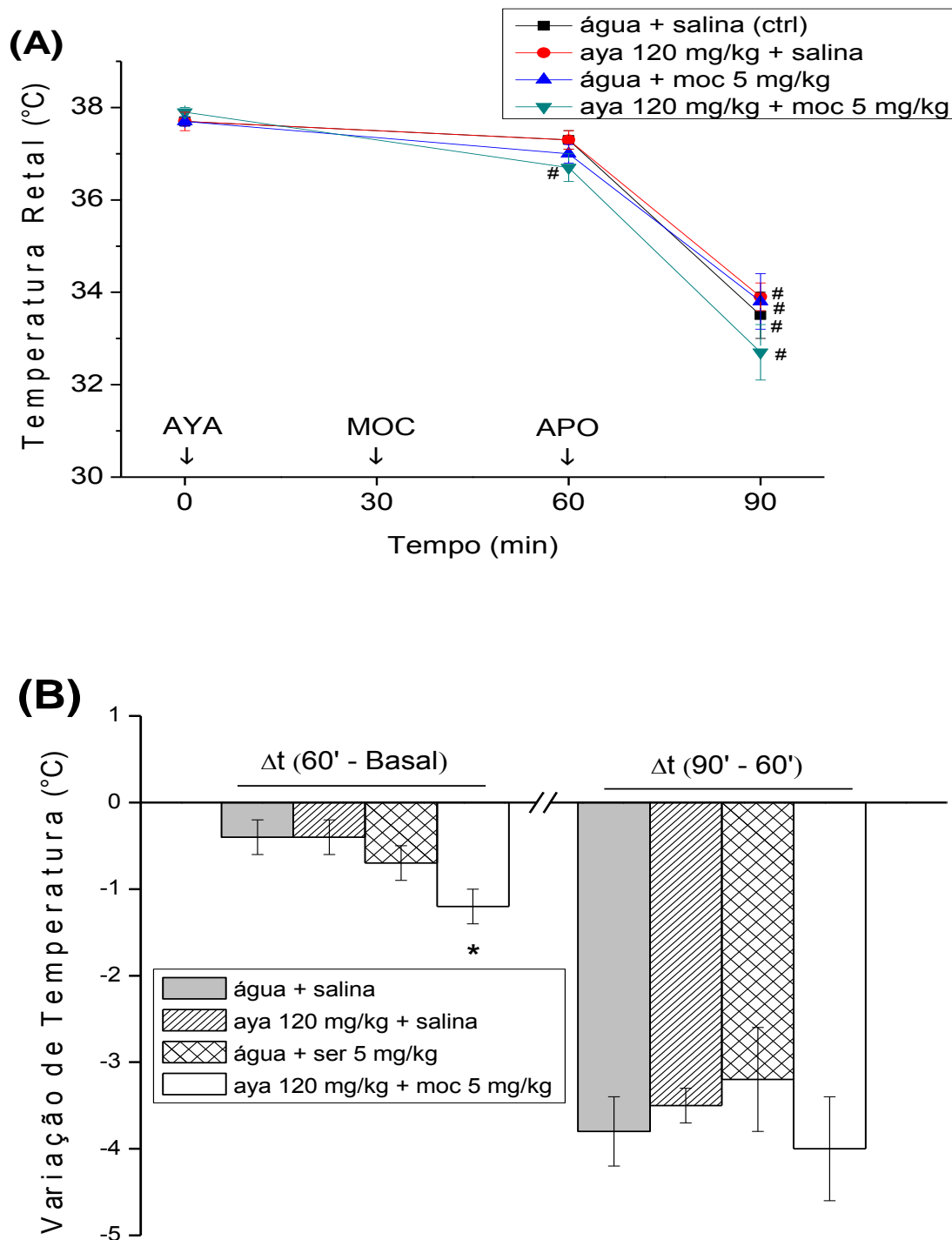


Figura 12. Efeito da administração de ayahuasca (aya 120 mg/kg, v.o.) e de moclobemida (moc 5 mg/kg, i.p.) isoladamente ou em associação, sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina (10 mg/kg, i.p.) dada após 30 min do antidepressivo. (A) Temperatura retal dos camundongos nos intervalos indicados. (B) Diferença de temperatura (Δt) entre as medições realizadas nos tempos 60 e 0 (60' - Basal) ou entre os tempos 90 e 60 (90' - 60') do gráfico do painel A. Cada coluna ou ponto e respectivas barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 9$).

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle água + salina. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

(#) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente da respectiva temperatura basal. Anova de medidas repetidas, seguido pelo teste de Duncan.

4.1.3 Associação da ayahuasca com a pargilina

O efeito da administração da pargilina (40 mg/kg, i.p.), IMAO-B, e de sua associação com ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) também foi avaliado, como forma de estimar a potencial interação de inibidores da MAO com ações distintas. Após a administração de ayahuasca ou água, todos os grupos receberam pargilina, exceto o grupo controle (ctrl), o que resultou em expressiva queda de temperatura (tempo 60 no gráfico) em relação às respectivas temperaturas basais (ANOVA de medidas repetidas) (figura 13A), bem como em relação ao grupo controle [$F(4,20) = 11,47$; $p = 0,000053$] (Duncan, $p < 0,001$ para todos os grupos em relação ao grupo controle).

Curiosamente, após a administração de apomorfina, todos os animais que receberam previamente pargilina, principalmente aqueles tratados com ayahuasca + pargilina, tiveram elevação de temperatura, ou seja, uma inversão do efeito observado na medida anterior. No caso da associação ayahuasca + pargilina + apomorfina, houve inclusive hipertermia, constatada no tempo 120 min, quando a temperatura medida neste grupo foi diferente da sua temperatura basal (Anova de medidas repetidas). A diferença entre a temperatura do grupo da associação + apomorfina parece ter perdurado até os 240 minutos, quando houve recuperação da temperatura dos animais do grupo controle; mas a ANOVA de medidas repetidas para os demais tempos de observação não foi feita, pois a associação de pargilina e apomorfina levou a óbito vários animais a partir dos 120 minutos, inviabilizando a análise estatística nos intervalos entre os tempos 180 e 300 min. Esta ocorrência de mortes revela ainda o risco elevado da associação da apomorfina com a pargilina.

A avaliação da Δt (60' – Basal), ou seja, antes da administração de apomorfina, confirmou que a administração de pargilina produziu queda na temperatura dos animais (figura 13B), só não manifestada no grupo controle água + salina (que não recebeu pargilina) [$F(4,20) = 12,0458$; $p = 0,000038$] (Duncan, $p < 0,001$ para todos os grupos em relação ao grupo controle). Já a Δt entre 30 min após a apomorfina e antes desta droga (90' – 60') mostra que o grupo de animais que recebeu previamente a associação de ayahuasca e pargilina teve elevação da temperatura superior a todos os demais grupos, indicando interação distinta quando as três drogas foram administradas [$F(4,20) = 69,57029$; $p = 0,000000$] (Duncan, $p < 0,001$ em relação a todos os outros grupos).

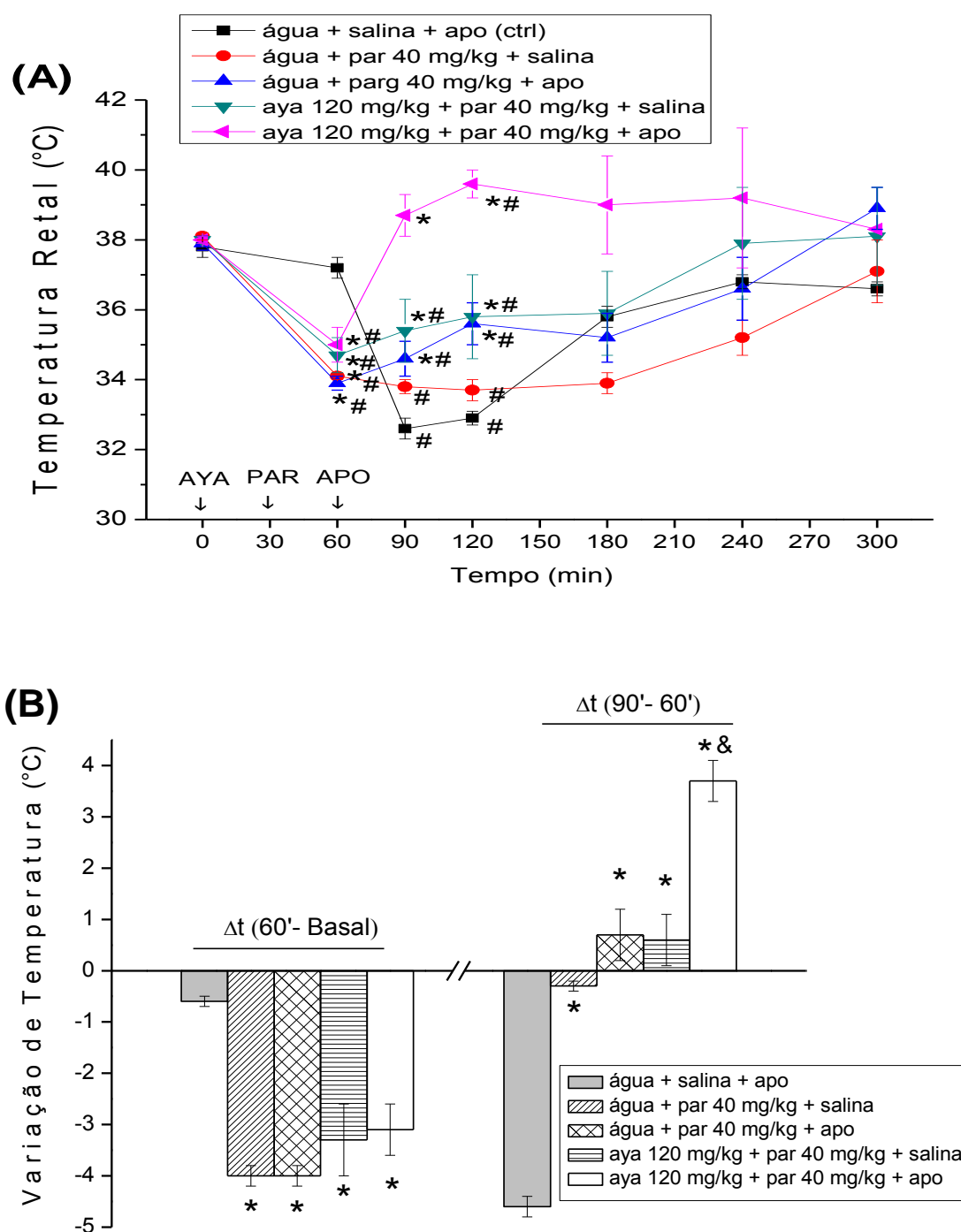


Figura 13. Efeito da administração de pargilina (par 40 mg/kg, i.p.) isoladamente ou em associação com ayahuasca (aya 120 mg/kg, v.o.) sobre a temperatura retal de camundongos administrados com apomorfina (10 mg/kg, i.p.) ou salina 30 min depois. (A) Temperatura retal dos camundongos nos intervalos indicados. (B) Diferença de temperatura (Δt) entre as medições realizadas nos tempos 60 e 0 (60'- Basal) ou entre os tempos 90 e 60 (90'- 60') do gráfico do painel A. Cada coluna ou ponto e respectivas barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5$).

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle (ctrl) água + salina + apomorfina. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

(#) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente da respectiva temperatura basal. Anova de medidas repetidas, seguido pelo teste de Duncan.

(&) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo água + pargilina + salina, água + pargilina + apomorfina e do grupo ayahuasca + pargilina + salina. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

4.2 Teste da Natação Forçada

4.2.1 Avaliação dos antidepressivos e da ayahuasca isoladamente

A figura 14 mostra que a administração de ayahuasca por via oral nas doses de 120 e 1200 mg/kg não reduziu o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle [$F(2,23) = 3,0440$; $p = 0,6717$]. Além disso, não foi constatada diferença estatisticamente significativa quanto ao número de defecações dos animais tratados com a ayahuasca, na comparação com o grupo controle [$F(2,23) = 0,7676$; $p = 0,475659$] (tabela 4).

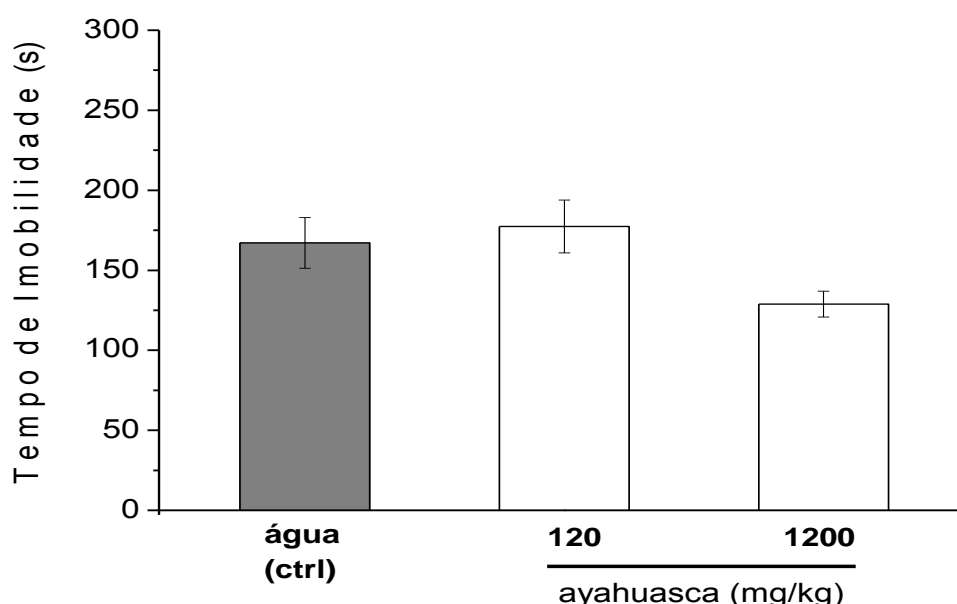


Figura 14. Tempo de imobilidade no teste da natação forçada de ratos tratados com ayahuasca (120 e 1200 mg/kg, v.o.). Não significativo. Anova de uma via. As colunas e barras representam a média ± erro padrão da média ($n = 8 - 9$).

Nos testes com a imipramina [$F(4,34) = 2,4329$; $p = 0,066270$] e com a sertralina [$F(4,35) = 0,9704$; $p = 0,4360$], ao contrário do que era esperado, nenhuma dose administrada reduziu o tempo de imobilidade dos animais quando comparadas aos seus respectivos grupo controle salina (figura 15).

Já em relação ao número de defecações, nota-se que a dose de 30 mg/kg de imipramina (das duas marcas testadas) induziu uma redução do número de defecações dos animais em relação ao grupo controle [$H(4,39) = 11,7754$; $p = 0,0191$] (Mann-Whitney, $p < 0,05$ para ambas as drogas). Por outro lado, embora o teste de Kruskal-Wallis tenha detectado diferença estatisticamente significativa no número de defecações entre os grupos no teste com

a sertralina [$H(4,40) = 9,6439$; $p = 0,0469$], nenhuma dose do antidepressivo induziu mudança estatisticamente significativa no número de defecações dos animais em relação ao grupo controle (tabela 4).

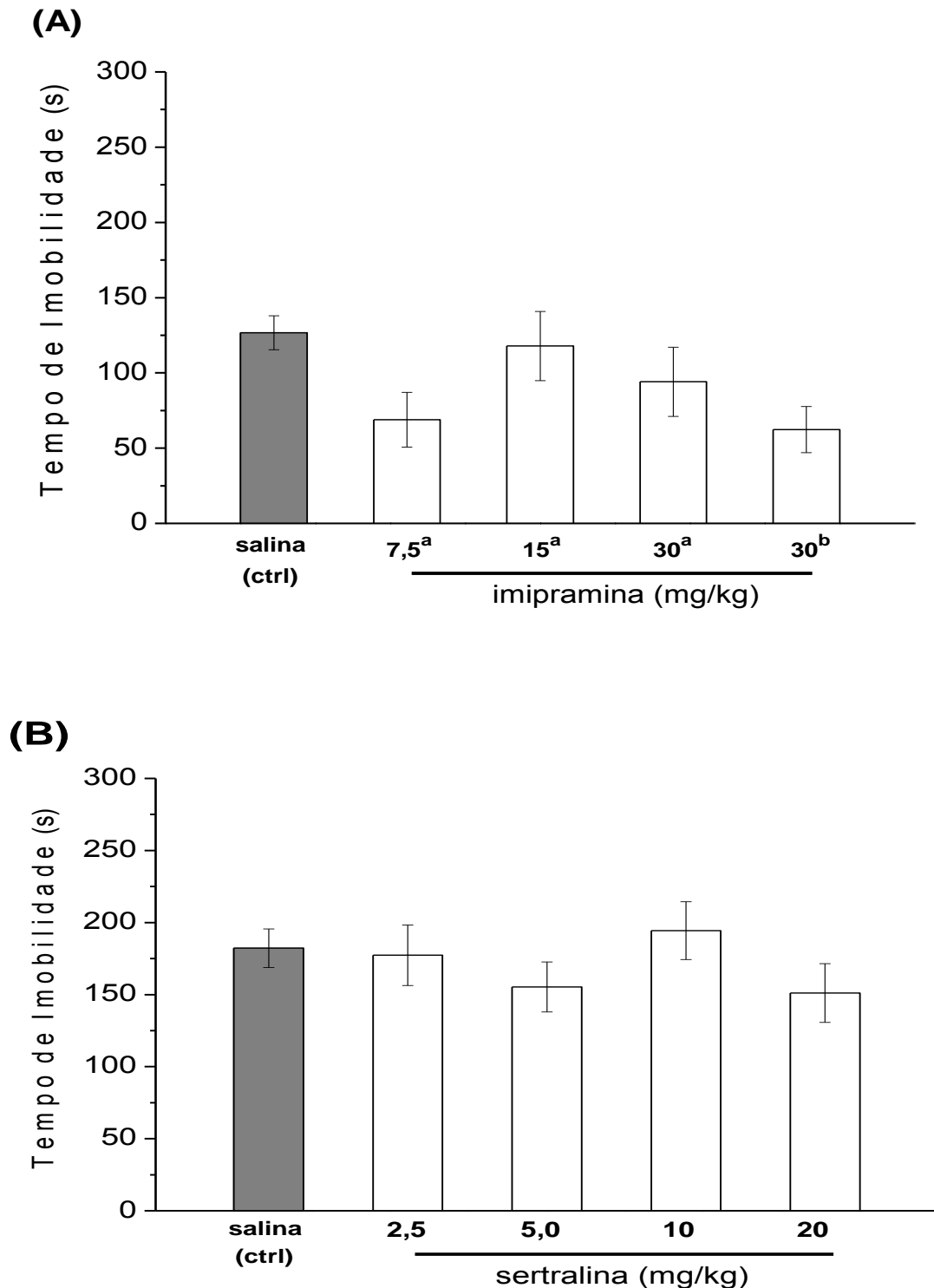


Figura 15. Tempo de imobilidade no teste da natação forçada de ratos tratados por via i.p. com diferentes doses de imipramina (A) e sertralina (B). Não significativo. Anova de uma via. As colunas e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 7 - 9$). (^a) = Imipramina Cristália; (^b) = Imipramina Biosintética.

No teste com a moclobemida, nenhuma dose administrada reduziu o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle salina [$H(3,32) = 0,3644$; $p = 0,9475$] (figura 16). Além disso, nenhum dos tratamentos induziu uma mudança estatisticamente significativa no número de defecações dos animais em relação ao respectivo grupo controle [$F(3,28) = 2,36003$; $p = 0,092832$] (tabela 4).

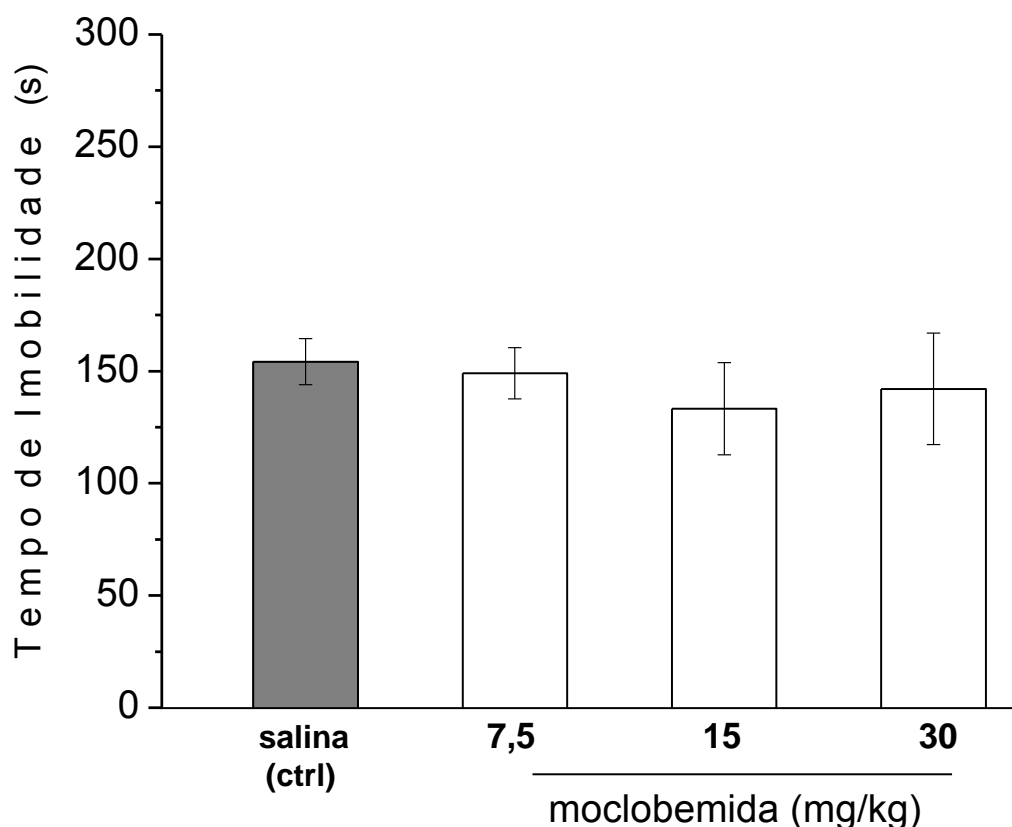


Figura 16. Tempo de imobilidade no teste da natação forçada de ratos tratados por via i.p. com diferentes doses de moclobemida. Não significativo. Kruskal-Wallis. As colunas e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 8$).

Tabela 4. Número de defecações dos ratos tratados com ayahuasca ou com as drogas antidepressivas isoladamente no teste da natação forçada. Para cada droga avaliada, notar o controle correspondente.

| Teste | Doses utilizadas (mg/kg) | Número de defecações (média \pm EPM) | n |
|-----------------|--------------------------|--|---|
| Ayahuasca | controle (água) | 3,5 \pm 0,7 | 9 |
| | 120 | 4,4 \pm 0,6 | 9 |
| | 1200 | 4,7 \pm 0,9 | 8 |
| Imipramina | controle (salina) | 2,7 \pm 0,9 | 9 |
| | 7,5 ^a | 1,7 \pm 0,7 | 8 |
| | 15 ^a | 0,7 \pm 0,3 | 7 |
| | 30 ^a | 0,1 \pm 0,1 [§] | 8 |
| | 30 ^b | 0,2 \pm 0,3 [§] | 7 |
| Sertralina | controle (salina) | 2,5 \pm 0,9 | 8 |
| | 2,5 | 2,5 \pm 0,3 | 8 |
| | 5,0 | 1,5 \pm 0,8 | 8 |
| | 10 | 0,8 \pm 0,4 | 8 |
| | 20 | 0,8 \pm 0,4 | 8 |
| Moclobemida | controle (salina) | 3,4 \pm 0,9 | 8 |
| | 7,5 | 3,6 \pm 0,5 | 8 |
| | 15 | 3,0 \pm 0,9 | 8 |
| | 30 | 1,3 \pm 0,5 | 8 |
| Tranilcipromina | controle (salina) | 3,9 \pm 1,0 | 7 |
| | 0,5 | 4,4 \pm 0,9 | 7 |
| | 2 | 0,4 \pm 0,2* | 5 |
| Pargilina | Controle (salina) | 4,6 \pm 0,7 | 5 |
| | 1 | 3,6 \pm 1,2 | 5 |
| | 5 | 3,6 \pm 0,9 | 5 |
| | 20 | 1,4 \pm 0,5 | 5 |

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

(§) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney. (Análise por teste não paramétrico porque não houve homogeneidade das variâncias)

(^a) = Imipramina Cristália; (^b) = Imipramina Biosintética.

Outras duas drogas com ação inibidora sobre a MAO foram também avaliadas no teste da natação forçada, a pargilina (IMAO-B) e a tranilcipromina (IMAO inespecífico). Em teste realizado com a pargilina nenhuma das doses utilizadas reduziu o tempo de imobilidade dos animais quando comparadas com o grupo controle salina [$F(3,16) = 0,3196$; $p = 0,8110$] (figura 17A). Da mesma forma, a tranilcipromina não reduziu o tempo de imobilidade dos animais nas doses utilizadas (figura 17B) comparativamente aos animais do grupo controle salina [$F(2,16) = 1,7263$; $p = 0,2095$]. Não foi possível avaliar o efeito de doses maiores da tranilcipromina, que se mostraram tóxicas, ocasionando a morte dos animais antes da realização do teste de 5 minutos.

Em relação ao número de defecações (tabela 4), a tranilcipromina na dose de 2 mg/kg (i.p.) induziu uma redução estatisticamente significativa no número de defecações dos animais comparado com o grupo controle salina correspondente [$F(2,16) = 5,56990$; $p = 0,014592$] (Duncan, $p < 0,05$). Já no teste com a pargilina, não houve diferença entre os grupos, embora a dose de 20 mg/kg (i.p.) visualmente tenha reduzido o número de defecações dos animais [$F(3,16) = 2,40351$; $p = 0,105553$].

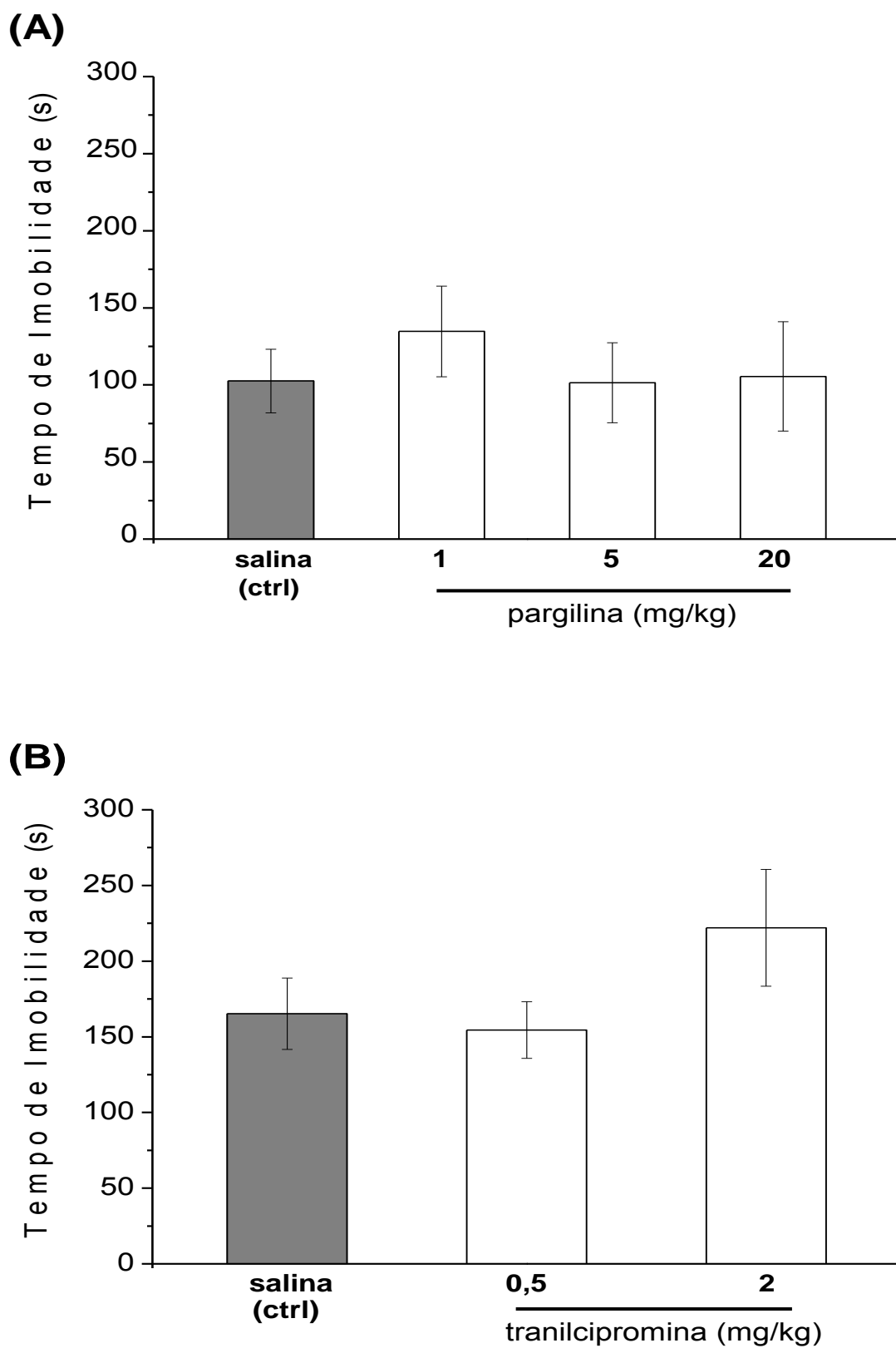


Figura 17. Tempo de imobilidade na natação forçada de ratos tratados por via i.p. com diferentes doses de pargilina (A) e da tranilcipromina (B). Não significativo. Anova de uma via. As colunas e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5 - 7$).

4.2.2 Associação da ayahuasca com os antidepressivos

No teste de associação dos antidepressivos e ayahuasca o objetivo era avaliar a interação entre doses subefetivas destas drogas. Para a ayahuasca foi empregada a dose de 120 mg/kg (v.o.), pois embora a dose de 1200 mg/kg não tenha diferido estatisticamente do controle, visualmente houve uma diminuição do tempo de imobilidade com esta. Para as demais drogas, uma vez que não houve doses efetivas, foram avaliadas duas doses intercaladas, para aumentar as chances de encontrar uma possível interação.

Nos testes de associação da ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) com a imipramina na dose de 3,75 mg/kg (i.p.) [$F(3,23) = 1,1201$; $p = 0,3614$] e na dose de 15 mg/kg (i.p.) [$F(3,25) = 1,3723$; $p = 0,274144$] (figura 18) não foi verificada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controle (água + salina), ou seja, nenhuma dose avaliada dos antidepressivos reduziu o tempo de imobilidade dos animais, seja isoladamente ou em associação com a ayahuasca. Com relação ao número de defecações, no teste da associação da ayahuasca com a imipramina (3,75 mg/kg, i.p.), os tratamentos com ayahuasca + imipramina (Duncan, $p < 0,001$), água + imipramina (Duncan, $p < 0,01$) e ayahuasca + salina (Duncan, $p < 0,05$) reduziram o número de defecações dos animais em relação ao grupo controle água + salina [$F(3,30) = 7,6011$; $p = 0,000635$] (tabela 5). Quando foi avaliada a associação da ayahuasca com a imipramina (15 mg/kg, i.p.) houve redução do número de defecações nos grupos tratados com água + imipramina (Duncan, $p < 0,05$) e com ayahuasca + imipramina (Duncan, $p < 0,01$) [$F(3,25) = 4,18924$; $p = 0,015632$].

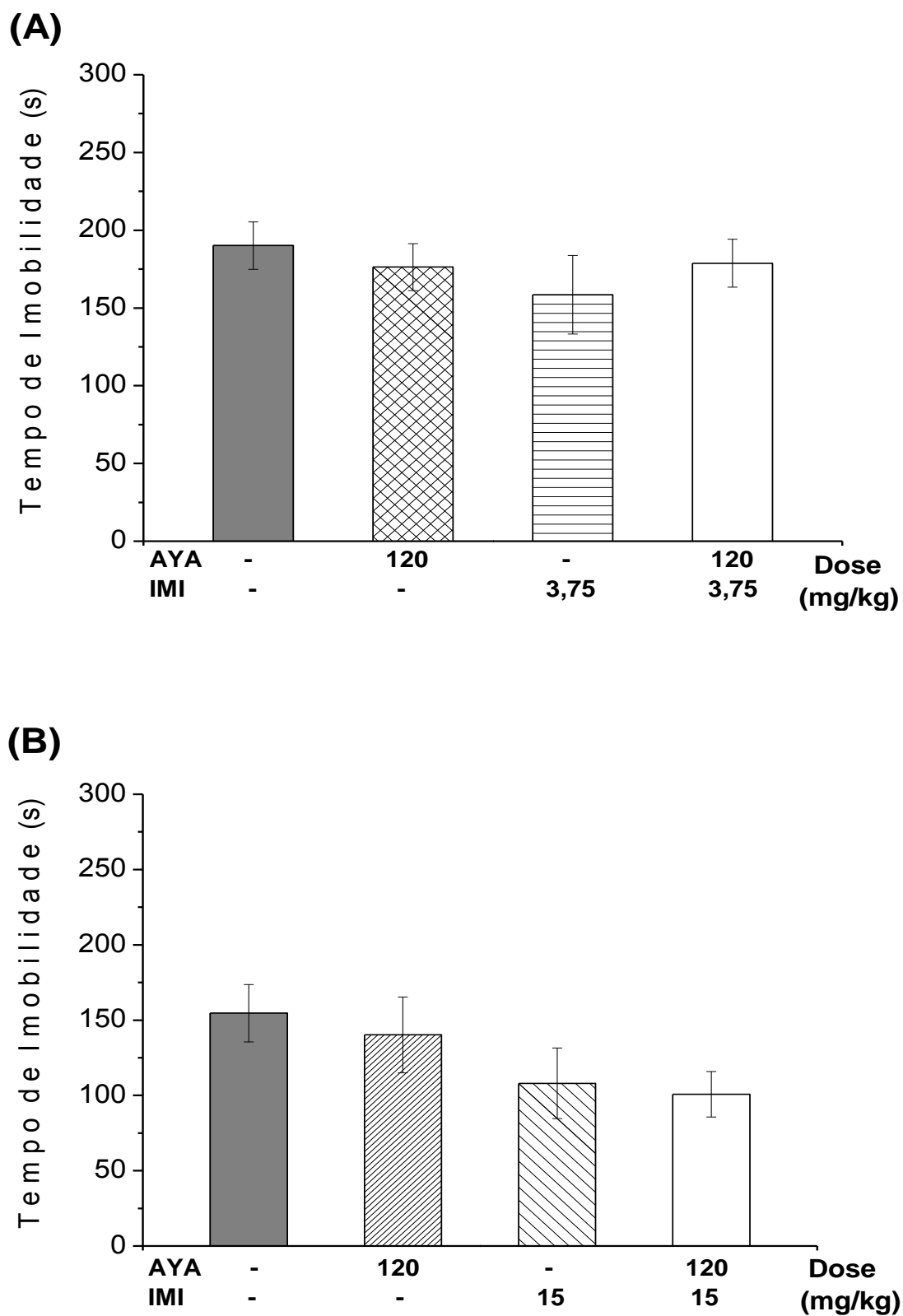


Figura 18. Tempo de imobilidade de ratos no teste da natação forçada. (A) Associação da ayahuasca (AYA, 120 mg/kg, v.o.) com a imipramina (IMI, Cristália, 3,75 mg/kg, i.p.); (B) Associação da ayahuasca (AYA, 120 mg/kg, v.o.) com a imipramina (IMI, Biosintética, 15 mg/kg, i.p.). Não significativo. Anova de uma via. As colunas e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 6 - 9$).

Tabela 5. Número de defecações dos ratos tratados com a associação de ayahuasca e diferentes antidepressivos no teste da natação forçada. Para cada droga avaliada, notar o controle correspondente.

| Teste | Doses utilizadas (mg/kg) | Número de defecações (média ± EPM) | n |
|-------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|---|
| Ayahuasca + Imipramina ^a | ctrl (água + salina) | 6,3 ± 0,7 | 8 |
| | 120 + salina | 3,8 ± 0,8* | 8 |
| | água + 3,75 | 2,9 ± 0,7* | 9 |
| | 120 + 3,75 | 1,8 ± 0,6* | 9 |
| Ayahuasca + Imipramina ^b | ctrl (água + salina) | 3,4 ± 0,8 | 8 |
| | 120 + salina | 2,5 ± 0,6 | 8 |
| | água + 15 | 1,0 ± 0,5* | 7 |
| | 120 + 15 | 0,7 ± 0,5* | 6 |
| Ayahuasca + Sertralina | ctrl (água + salina) | 4,8 ± 0,6 | 8 |
| | água + 2,5 | 3,1 ± 1,0 | 8 |
| | água + 10 | 1,3 ± 0,4 [§] | 8 |
| | 120 + 2,5 | 2,4 ± 0,6 [§] | 8 |
| | 120 + 10 | 0 [§] | 7 |
| Ayahuasca + Moclobemida | ctrl (água + salina) | 3,3 ± 0,6 | 8 |
| | 120 + salina | 4,8 ± 0,8* | 8 |
| | água + 15 | 2,3 ± 0,6 | 8 |
| | 120 + 15 | 2,3 ± 0,6 | 8 |
| | 120 + 30 | 1,0 ± 0,3* | 5 |
| Ayahuasca + Tranilcipromina | ctrl (água + salina) | 3,9 ± 1,0 | 7 |
| | 120 + salina | 3,2 ± 0,6 | 5 |
| | água + 0,1 | 2,4 ± 0,5 | 5 |
| | 120 + 0,1 | 3,5 ± 0,6 | 6 |

(*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

(§) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do grupo controle. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney. (Análise por teste não paramétrico porque não houve homogeneidade das variâncias).

(^a) = Imipramina Cristália; (^b) = Imipramina Biosintética.

Nos testes de associação da ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) com a sertralina (2,5 e 10 mg/kg, i.p.) [$F(4,34) = 1,0760$; $p = 0,3836$] e com a moclobemida (15 e 30 mg/kg, i.p.) [$H(4,34) = 6,6224$; $p = 0,1572$] a associação das drogas, bem como a administração das drogas isoladas, não reduziu o tempo de imobilidade dos animais (figura 19). Na avaliação do número de defecações, os seguintes tratamentos reduziram o número de defecações dos animais em relação ao grupo controle: ayahuasca + sertralina 2,5 e 10 mg/kg (Mann-Whitney, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente); água + sertralina 10 mg/kg (Mann-Whitney, $p < 0,01$) [$H(4,39) = 21,4309$; $p = 0,001$], bem como o grupo tratado com ayahuasca + moclobemida 30 mg/kg [$F(4,29) = 5,48931$; $p = 0,002044$] (Duncan, $p < 0,05$) (tabela 5). Por outro lado, o grupo de animais tratado com ayahuasca + salina, no teste da associação da ayahuasca com moclobemida, apresentou um aumento do número de defecações em relação ao grupo controle (Duncan, $p < 0,05$).

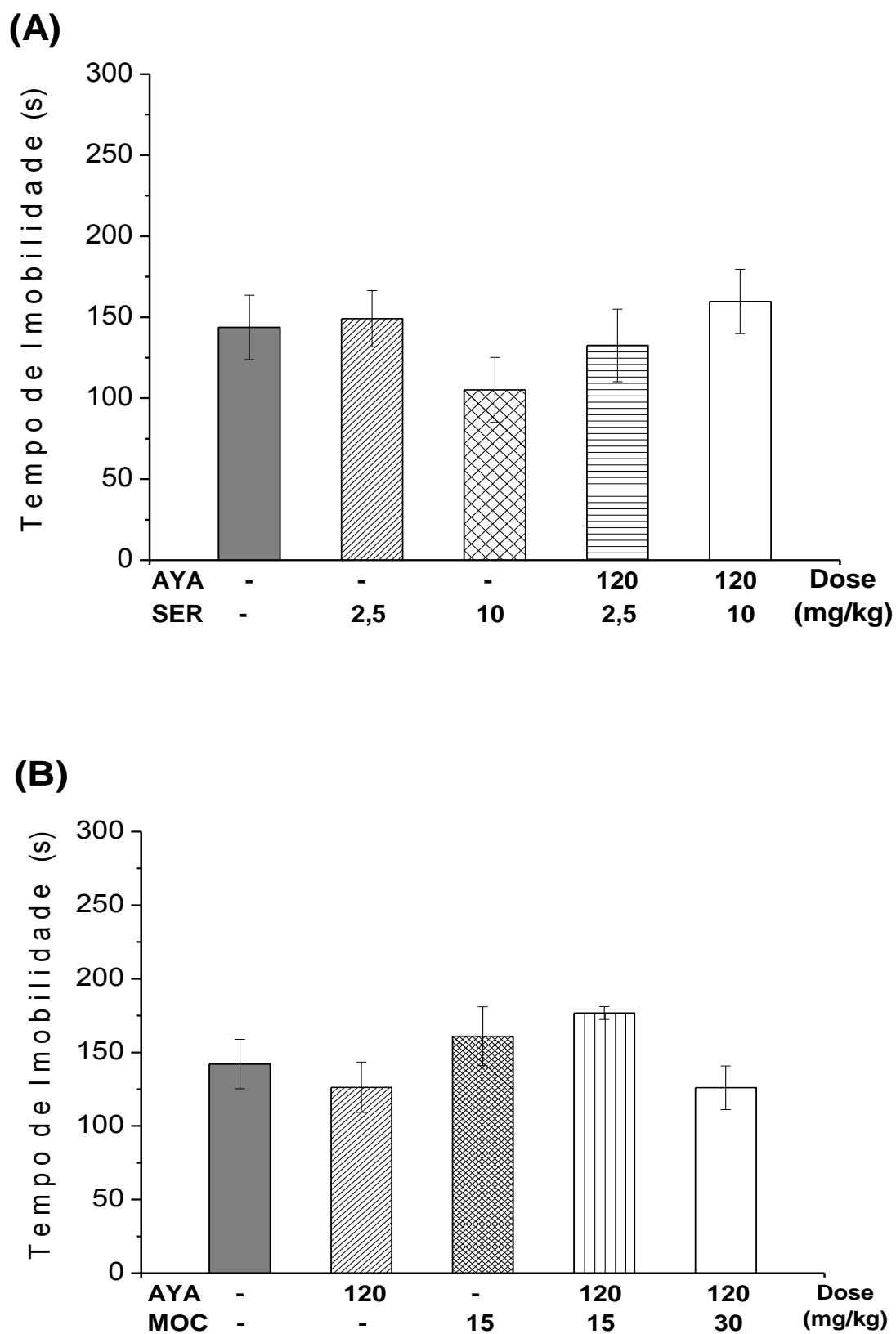


Figura 19. Tempo de imobilidade de ratos no teste da natação forçada. (A) Associação de ayahuasca (AYA, 120 mg/kg, v.o.) com a sertralina (SER, 2,5 e 10 mg/kg, i.p.); (B) Associação de ayahuasca (AYA, 120 mg/kg, v.o.) com a moclobemida (MOC, 15 e 30 mg/kg, i.p.). Não significativo. Anova de uma via (A) / Kruskal-Wallis (B). As colunas e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5 - 8$).

Foi também realizado um teste da associação da ayahuasca (120 mg/kg, v.o.) com a tranilcipromina na dose de 0,1 mg/kg (i.p.), com a finalidade de avaliar o efeito de uma possível interação com um inibidor inespecífico da MAO neste modelo animal. Contudo, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com ayahuasca associada a tranilcipromina em relação ao grupo controle água + salina [$F(3,19) = 0,6830$; $p = 0,5733$], ou seja, a associação das drogas não diminuiu o tempo de imobilidade dos animais (figura 20). Na avaliação do número de defecações (tabela 5) também não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos [$H(3,23) = 1,6722$; $p = 0,6431$].

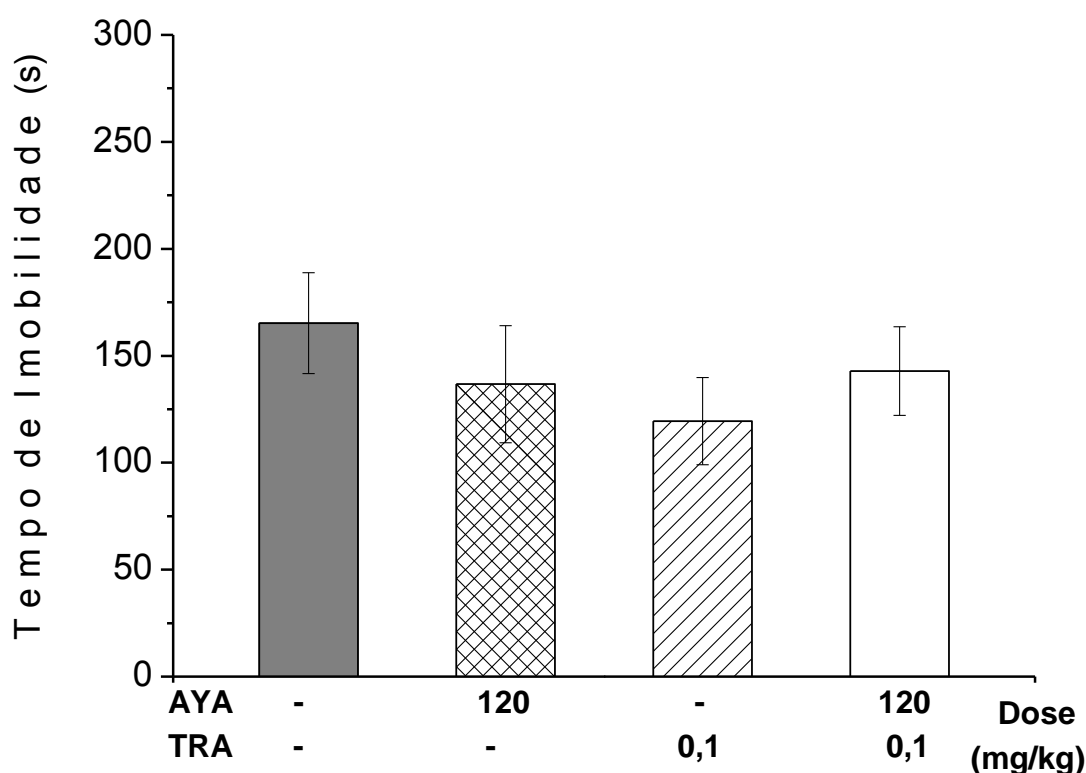


Figura 20. Tempo de imobilidade de ratos tratados com ayahuasca (AYA 120 mg/kg, v.o.) e tranilcipromina (TRA 0,1 mg/kg, i.p.) no teste da natação forçada. Não significativo. Anova de uma via. As colunas e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5 - 7$).

4.3 Atividade Locomotora

Os dados da figura 21 mostram os resultados do teste de atividade motora. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais tratados com sertralina (20 mg/kg, i.p.) em relação ao grupo controle (água, v.o.) nos tempo 60 [$F(5,36) = 5,68376$; $p =$

0,00058] (Duncan, $p < 0,05$), 90 [$F(5,36) = 3,54384$; $p = 0,010448$] (Duncan, $p < 0,01$) e 120 minutos [$F(5,36) = 2,75205$; $p = 0,033206$] (Duncan, $p < 0,05$), indicando que esta dose induziu um aumento da atividade locomotora dos animais. Os demais tratamentos – ayahuasca (120 e 1200 mg/kg, oral), imipramina (30 mg/kg, i.p.) e moclobemida (30 mg/kg, i.p.) – não alteraram a locomoção dos animais.

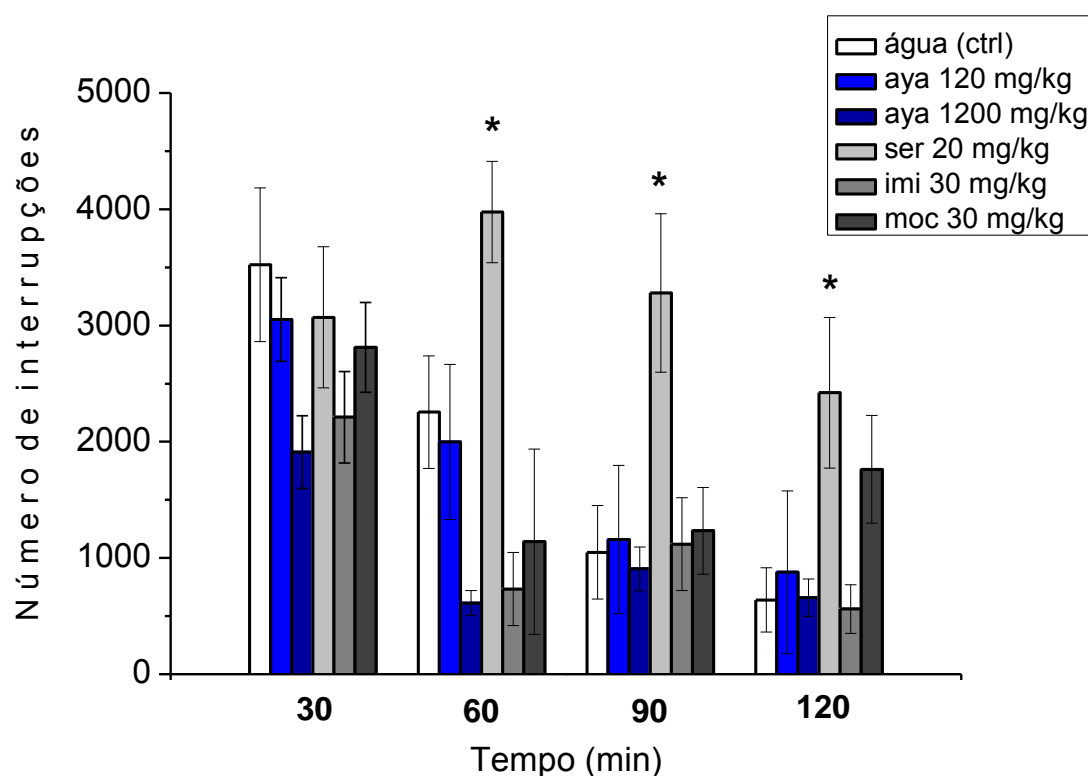


Figura 21. Registro da atividade locomotora de camundongos tratados com ayahuasca (aya, 120 e 1200 mg/kg, v.o.), sertralina (ser, 20 mg/kg, i.p.), imipramina (imi, 30 mg/kg, i.p.) e moclobemida (moc, 30 mg/kg, i.p.) ou água- grupo controle (ctrl, v.o.). As colunas e barras representam a média \pm erro padrão da média ($n = 7$). (*) = $p < 0,05$. Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle. Anova de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

4.4 Ensaios de Inibição da Monoaminoxidase (MAO)

4.4.1 Padronização das condições do ensaio

Em um primeiro momento, foram feitos testes-piloto para padronizar as condições ótimas do ensaio. A figura 22 mostra os resultados dos testes onde foram avaliadas: (A) concentração de substrato, (B) a concentração de enzima (fração mitocondrial, em mg/ml de proteína) e (C) tempo de reação. Como pode ser notado na figura 22A, ocorreu um platô na

fluorescência entre as concentrações de 90 a 720 μM , o que indica que a partir da concentração de 90 μM do substrato não há mais formação significativa do produto 4-hidroquinolina. No painel B da figura 22 observa-se um aumento proporcional da fluorescência com o aumento da concentração de proteínas (enzima), sendo esse efeito mais pronunciado com a incubação de 30 minutos. Diante desses resultados, optou-se pela concentração de 2,5 mg/ml de fração enzimática (equivale a 0,71 mg/ml na incubação) associada a concentração de 90 μM de substrato (quinuramina) para avaliação do efeito do tempo dessa reação. Sendo assim, observa-se na figura 22C que houve pouca formação do produto da reação com incubações de até 15 min, ao passo que incubações de 30 e de 60 minutos mostraram-se adequadas para quantificar a formação do produto 4-hidroquinolina.

4.4.2 Ensaios iniciais da inibição da monoaminoxidase (MAO)

Após padronização da concentração de proteínas - 2,5 mg/ml (0,71 mg/ml no ensaio), concentração de substrato (90 μM) e tempo de incubação (30 min) foram feitos alguns ensaios iniciais com a pargilina e a selegilina, inibidores seletivos da MAO-B. Como era esperado, a pargilina inibiu a atividade da monoaminoxidase, mas provavelmente fez isso de forma inespecífica, já que em concentrações a partir de 100 μM houve inibição praticamente total da MAO (figura 23A). Já a selegilina, apresentou duas curvas de inibição, mostrando um platô de resposta em concentrações entre 250 e 2500 nM indicando que nestas concentrações houve provavelmente inibição total da isoforma MAO-B, enquanto concentrações superiores provavelmente passaram a inibir também a isoforma MAO-A (figura 23B). Para a pargilina, não foi possível sugerir uma concentração que inibisse 100% da MAO-B sem interferir com a MAO-A, o que inviabilizou a utilização desta droga nos estudos com a ayahuasca.

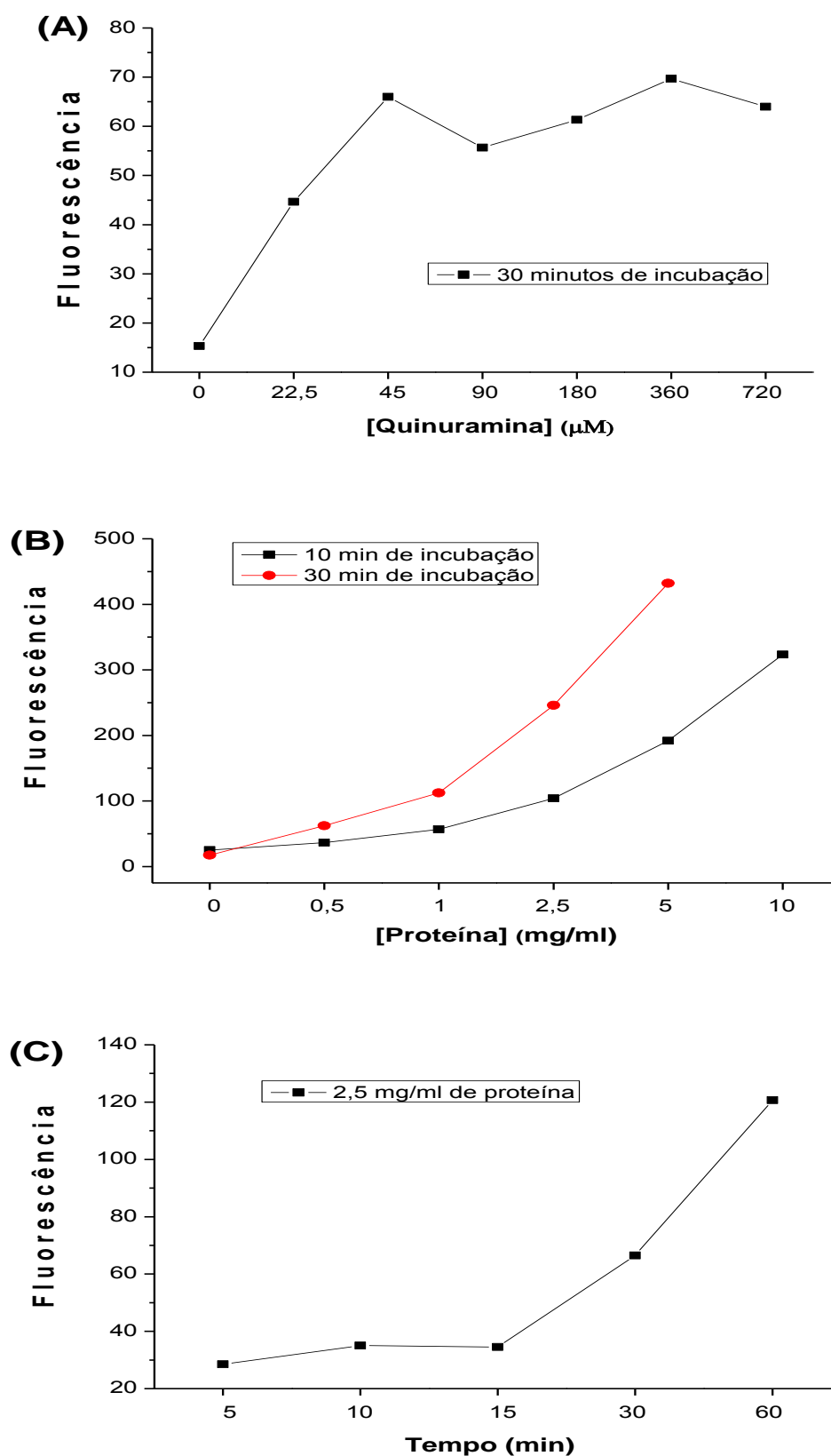


Figura 22. Ensaios iniciais para a padronização da concentração de substrato (A), da concentração de enzima (fração mitocondrial, em mg/ml de proteína) (B) e do tempo de reação (C). A leitura no fluorímetro foi realizada com excitação de 320/20 e emissão de 460/40 (nm). No experimento mostrado em A foi empregada a concentração de 1 mg/ml de proteína e em C 2,5 mg/ml (concentrações antes da pipetagem nos tubos).

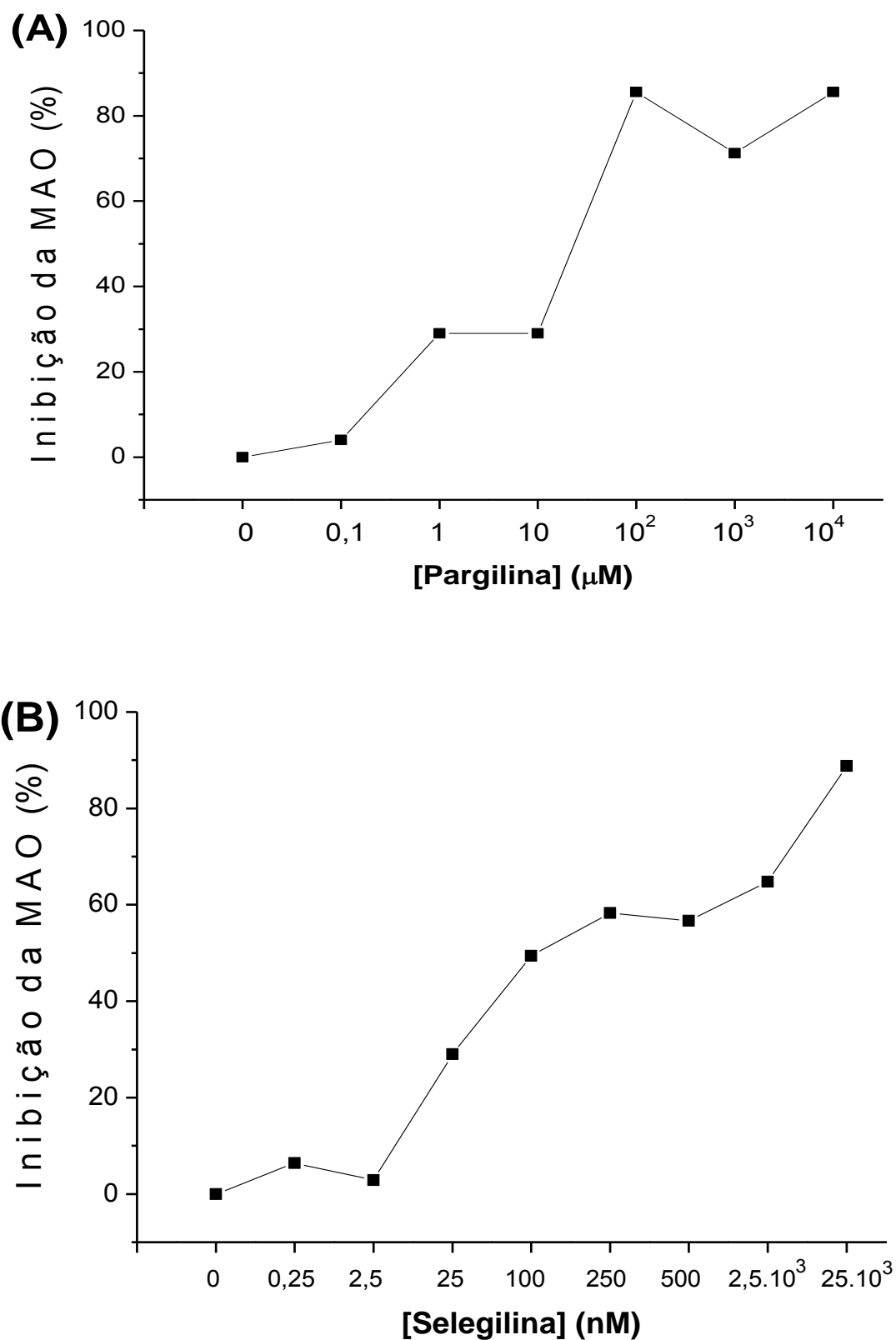


Figura 23. Ensaios iniciais para avaliar a inibição da atividade da MAO com a pargilina (A) e com a selegilina (B). A leitura no fluorímetro foi realizada com excitação de 320/20 e emissão de 460/40 (nm). Em (A) foi utilizado a concentração de 60 μM do substrato quinuramina. Em (B) foi utilizado a concentração de 90 μM do substrato.

4.4.3 Ensaios iniciais da inibição da monoaminoxidase (MAO) total e MAO-A pela ayahuasca

Inicialmente foi realizado um ensaio com concentrações crescentes de ayahuasca, sem a presença da enzima ou do substrato, para ver se as diferentes concentrações do chá interferiam na leitura do fluorímetro. Os dados da figura 24 mostram que concentrações acima de 10 µg/ml de ayahuasca produziram um aumento da leitura no fluorímetro, sendo, portanto inapropriadas para o teste. Ao avaliar o efeito da ayahuasca sobre a metabolização do substrato quinuramina pela MAO observa-se que ela foi capaz de inibir parcialmente a MAO total em concentrações acima de 100 ng/ml (figura 25A). Por fim, a pré-incubação da fração enzimática com 250 nM de selegilina, ao inibir seletivamente a MAO-B, permitiu que fosse avaliado no ensaio o efeito inibitório da ayahuasca sobre a MAO do tipo A. Os resultados da figura 25B mostram que nestas condições, a ayahuasca na concentração de 100 ng/ml inibe em aproximadamente 50% a MAO-A, enquanto a concentração de 1 µg/ml inibiu em aproximadamente 80% esta isoforma. Não foi possível estimar a porcentagem de inibição da MAO-A com concentrações maiores de ayahuasca, uma vez que elas já interferiam com a fluorescência.

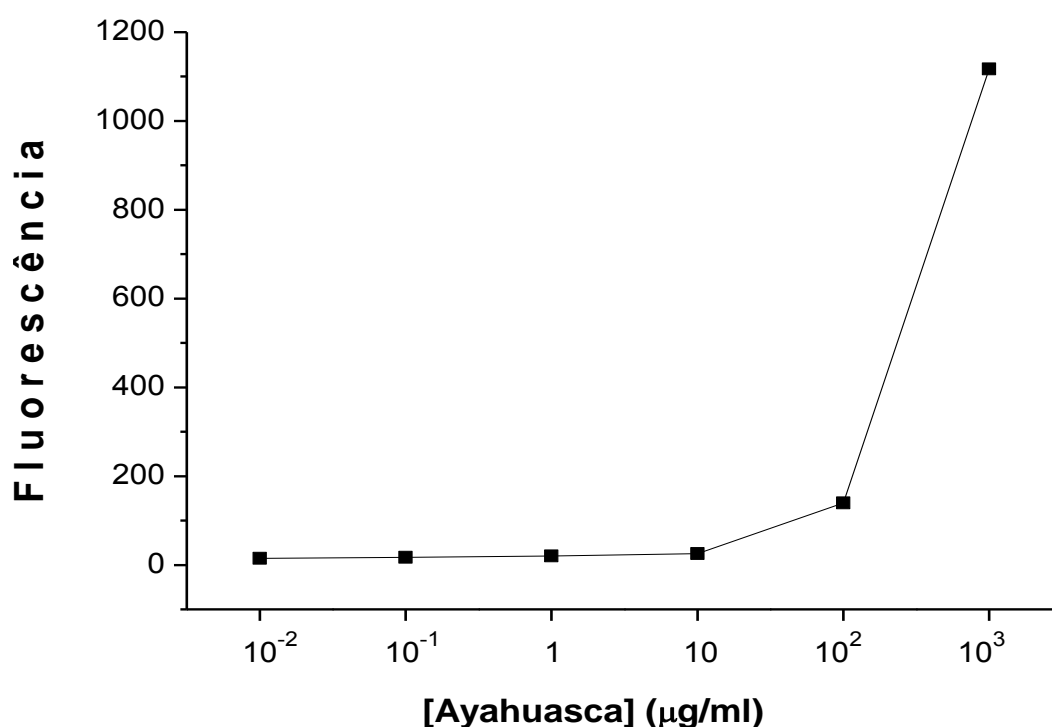


Figura 24. Avaliação da fluorescência da ayahuasca isoladamente reproduzindo as mesmas condições de ensaio, exceto pela adição da fração enzimática e do substrato quinuramina. A leitura no fluorímetro foi realizada com excitação de 320/20 e emissão de 460/40 (nm).

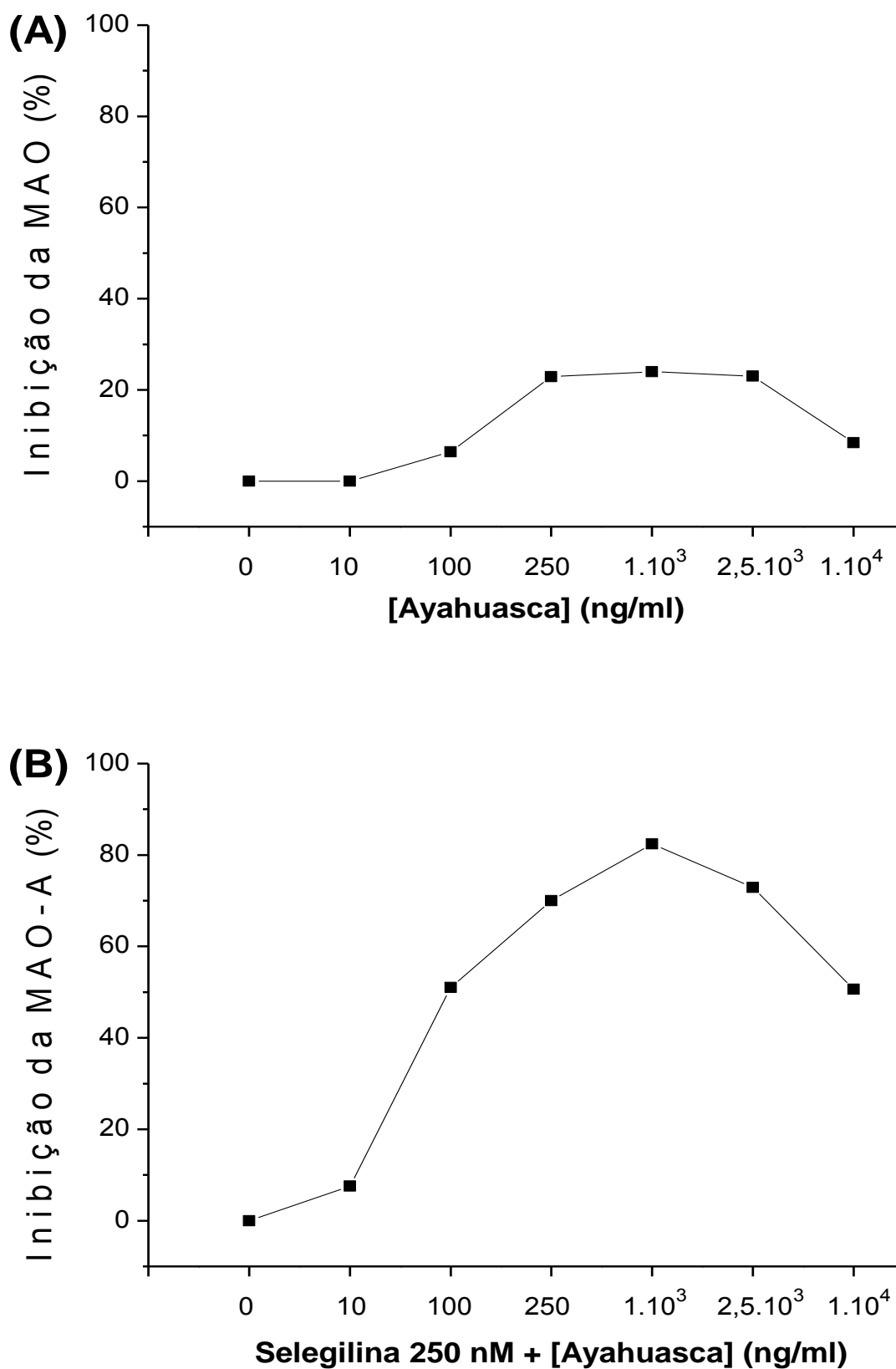


Figura 25. Ensaios iniciais para avaliar a inibição da atividade da MAO com a ayahuasca isolada (A) e para avaliar a inibição da atividade da MAO-A pela associação da selegilina 250 nM + diferentes concentrações de ayahuasca (B). A leitura no fluorímetro foi realizada com excitação de 320/20 e emissão de 460/40 (nm).

5 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da interação do chá de ayahuasca com antidepressivos de mecanismos de ação diferentes. Para tal propósito foram utilizados dois modelos animais de depressão: a inibição a hipotermia induzida pela apomorfina e o teste da natação forçada. Estes modelos foram escolhidos por serem de simples execução e por avaliarem o efeito de drogas antidepressivas por mecanismos distintos.

A escolha das doses de ayahuasca para os testes *in vivo* levou em consideração o que seria a dose média consumida pelo ser humano, calculada em 120 mg/kg, e em uma dose 10 vezes maior (1200 mg/kg). No entanto, vale ressaltar que não existe uma correlação direta entre doses clínicas e doses pré-clínicas, mas por meio de cálculos alométricos que consideram a espécie e seu peso corporal é possível sugerir a correspondência de uma dose do humano para um roedor. O objetivo prático mais evidente, do cálculo alométrico, é a extrapolação das doses de drogas entre animais de formas, tamanhos e massas diferentes (Pachaly, 2006). Assim, a dose de 120 mg/kg de ayahuasca consumida pelo ser humano com peso de 60 kg corresponderia a uma dose aproximada de 315 mg/kg em ratos, considerando um peso médio de 350 g (Reagan-Shaw et al., 2007). No caso dos camundongos, com peso médio de 40g, a dose humana corresponderia a aproximadamente 800 mg/kg (Reagan-Shaw et al., 2007), portanto estas doses estão dentro do intervalo empregado no presente estudo. Soma-se a esse fato, que ao contrário do uso ritualístico, normalmente caracterizado pelo consumo do chá de ayahuasca em sessões com intervalos de uma a três semanas (McKenna, 2004), neste estudo optou-se por realizar um tratamento agudo (ou de até três doses agudas no teste da natação forçada). Assim, não se pode descartar que o uso ritualístico, da forma como ocorre, pode induzir efeitos diferentes daqueles observados neste estudo.

Para a escolha das doses também levou-se em consideração os resultados do estudo de Pires (2009) realizado com a mesma amostra de ayahuasca, onde foram empregadas doses de 12, 120, 1200 e 2400 mg/kg de ayahuasca em camundongos. Em tal estudo, a administração do chá por v.o. (120 e 1200 mg/kg) não provocou alterações no teste do rotarod, enquanto no teste da atividade motora os animais que receberam a dose de 1200 mg/kg apresentaram efeito bifásico, com diminuição inicial da ambulação (até 30 min), seguida de aumento entre 2 e 4 horas. Entretanto, esse efeito não foi observado no nosso estudo, pois o tratamento com a ayahuasca na dose de 1200 mg/kg não alterou a atividade locomotora dos camundongos em relação ao grupo controle durante as duas horas de observação. É natural que os animais do grupo controle, ao serem colocados na caixa de atividade motora,

apresentem de início uma grande ambulação, correspondente à atividade exploratória de um ambiente novo, e em seguida redução da ambulação, pois acabam se ambientando à caixa.

Pires (2009) relata ainda que no teste do *screening* farmacológico a ayahuasca na dose de 2400 mg/kg induziu diminuição da ambulação, do número de defecações e micções de maneira considerável, além de produzir tremor e aumento da sensibilidade a estímulos sonoros nos animais. Portanto, esta dose foi descartada já que se demonstrou relativamente tóxica, e assim, optou-se pela administração da ayahuasca por via oral nas doses de 120 e 1200 mg/kg, de modo que a dose unitária média consumida pelo ser humano, a partir de cálculos alométricos, estaria incluída neste intervalo.

A hipotermia induzida pela apomorfina é um teste baseado em interações farmacológicas entre a apomorfina e os antidepressivos. Neste teste não há qualquer analogia entre o efeito induzido e a depressão, e sim ele é baseado na observação de que drogas antidepressivas de algumas categorias podem inibir ou reverter a hipotermia induzida farmacologicamente, sem afetar a estereotipia ou comportamento de escalar induzido pela apomorfina (Puech et al., 1978; Porsolt et al., 1991). A hipotermia é o resultado do efeito agonista da apomorfina sobre o receptor pré-sináptico dopaminérgico D₂, localizados na região pré-óptica anterior do hipotálamo, área que integra as informações térmicas provenientes do SNC e da periferia para gerar as respostas termorregulatórias mais apropriadas para o ambiente (Cox et al., 1981; Menon et al., 1984; Boulant, 2000). A hipotermia induzida por uma dose baixa de apomorfina (1 mg/kg) é inibida por neurolépticos com ação antagonista no receptor dopaminérgico D₂, ao passo que, a hipotermia induzida por doses elevadas de apomorfina (10 e 16 mg/kg) é inibida, especialmente, por drogas antidepressivas relacionadas ao sistema β -adrenérgico (Puech et al., 1978).

Nesse sentido, postula-se que uma diminuição da neurotransmissão noradrenérgica na região pré-óptica anterior do hipotálamo tenha um papel predominante para o desenvolvimento de hipotermia induzida por doses elevadas de apomorfina. Corroborando com essa análise, Redrobe et al. (1998) relatam que a ação agonista da apomorfina sobre o receptor pré-sináptico D₂, situado nas terminações nervosas noradrenérgicas (Langer, 1977; Galzin et al., 1982), pode inibir a liberação de noradrenalina, uma vez que receptores D₂ localizados em terminais pré-sinápticos provocam uma diminuição na síntese e na liberação do neurotransmissor, bem como inibem o potencial de ação do neurônio (Bourin, 1990; Boyd, Mailman, 2012). Contudo, esses receptores são sensíveis somente a altas doses de apomorfina devido ao seu número limitado na região pré-óptica anterior do hipotálamo.

Logo, drogas capazes de aumentar a neurotransmissão noradrenérgica são capazes de bloquear ou reverter o efeito da apomorfina. Neste sentido, os antidepressivos da categoria dos tricíclicos, como a imipramina, que atuam na inibição da recaptação das monoaminas serotonina e, principalmente a noradrenalina, são mais efetivos em inibir o desenvolvimento da hipotermia quando comparados aos antidepressivos de outras categorias, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e os IMAO (Puech et al., 1978; Menon et al., 1984; Porsolt et al. 1991; An et al., 2008).

No presente trabalho foram empregadas 3-4 doses de antidepressivos baseadas em estudos da literatura ou estudos prévios do grupo. O tratamento com a imipramina na dose de 5 mg/kg inibiu a hipotermia induzida pela apomorfina, como era esperado para um antidepressivo tricíclico. O mesmo efeito também foi obtido com a administração de ayahuasca por via oral na dose de 1200 mg/kg, mas não na dose de 120 mg/kg. Contudo, nenhuma dose de sertralina e de moclobemida utilizada inibiu a hipotermia induzida pela apomorfina em relação ao grupo controle, apesar de observarmos uma pequena redução do efeito da apomorfina no grupo tratado com a maior dose de sertralina. Como o objetivo do estudo era avaliar em uma segunda fase a interação entre doses subefetivas da ayahuasca e dos antidepressivos, foram selecionadas as doses de 1 mg/kg de imipramina e 120 mg/kg de ayahuasca, enquanto para a sertralina optou-se por uma dose intermediária (5 mg/kg). No caso da moclobemida foi escolhida a dose de 5 mg/kg, pois doses maiores produziram por si só queda de temperatura nos animais.

No que se refere aos estudos de associação da ayahuasca com os antidepressivos foi observado efeito da interação das drogas tanto no teste com a imipramina como no estudo com a sertralina. No estudo da associação da ayahuasca com a imipramina, a imipramina inibiu o desenvolvimento da hipotermia, na comparação com o grupo controle. No caso da associação de ayahuasca e imipramina além de inibir o desenvolvimento da hipotermia pela apomorfina, a associação das drogas levou a um efeito temporal distinto, produzindo inicialmente queda de temperatura nos animais (efeito da associação de ayahuasca e do antidepressivo) e posteriormente aumento (recuperação) da temperatura (efeito da associação anterior, isto é, ayahuasca + imipramina, com a apomorfina). Dessa forma, considera-se que houve uma interação farmacodinâmica entre imipramina e ayahuasca que induziu provavelmente a um aumento da neurotransmissão noradrenérgica pela somatória da ação IMAO-A da ayahuasca com a inibição da recaptação de noradrenalina promovida pela imipramina. É bem estabelecido na literatura que o aumento da neurotransmissão noradrenérgica inibe o desenvolvimento da hipotermia induzida pela apomorfina (Puech et al.,

1978; Menon et al., 1984; Porsolt et al. 1991; An et al., 2008). Assim, postula-se que o predomínio da ação agonista da serotonina na área pré-óptica anterior do hipotálamo pela associação da ayahuasca com a imipramina, tenha produzido queda de temperatura, uma vez que dados na literatura apontam a participação de receptores serotoninérgicos como o 5-HT_{1A}, o 5-HT₃ e o 5-HT₇ nos mecanismos de hipotermia (Bill et al., 1991; Naumenko et al., 2011). Por outro lado, os níveis elevados de noradrenalina bloquearam o efeito da apomorfina na região pré-óptica.

No teste da associação da ayahuasca com a sertralina os grupos que receberam ayahuasca ou o antidepressivo tiveram queda de temperatura induzida por tais tratamentos, mas não foram capazes de inibir o efeito da apomorfina. Por outro lado, ao analisarmos o efeito ao longo do tempo, observa-se que a associação da ayahuasca com o antidepressivo induziu um comportamento diferente, com pequena elevação de temperatura na medida 30 min após a administração de apomorfina em relação ao tempo anterior. Para os demais grupos, especialmente o grupo controle, houve queda de temperatura após a administração de apomorfina. Este resultado também sugere interação entre os efeitos da ayahuasca e sertralina. Alguns dados na literatura apontam que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica está relacionada ao mecanismo de hipertermia via receptores 5-HT₂ (Gudelsky et al., 1986; Abdel-Fattah et al., 1995b; Abdel-Fattah et al. 1997) e a inibição da hipotermia induzida pela apomorfina (Menon et al., 1981), desde que esse aumento de serotonina seja significativamente superior ao aumento serotoninérgico que induz hipotermia, mediado principalmente pelo receptor 5-HT_{1A}. Assim, o efeito observado provavelmente se relaciona com um aumento significativo da neurotransmissão serotoninérgica, por consequência de uma interação farmacodinâmica via receptor 5-HT₂, pois o chá possui a DMT, um potente agonista do receptor 5-HT₂, assim como as β -carbolicinas com ação IMAO-A, que contribuem para a diminuição da metabolização da serotonina. Uma vez que a sertralina é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina é possível supor que com a associação das duas drogas seus efeitos tenham se somado e determinado os efeitos observados sobre a temperatura dos animais.

Estudos que compararam a fluoxetina (um outro inibidor seletivo da recaptação de serotonina) com drogas tricíclicas, como a imipramina, a desipramina e a venlafaxina, sugerem que a fluoxetina seja menos eficaz ou quase ineficaz em inibir o desenvolvimento da hipotermia induzida pela apomorfina, quando comparada aos antidepressivos tricíclicos (Menon et al., 1984; Artaiz et al., 2005), confirmando que este teste é mais adequado para a avaliação de antidepressivos tricíclicos. Apesar desta ressalva, o objetivo do nosso trabalho

era avaliar as possíveis interações da ayahuasca com antidepressivos de diferentes classes, razão pela qual a interação com a sertralina foi investigada.

Também fez parte deste estudo avaliar o efeito da interação de ayahuasca com a moclobemida, um inibidor reversível da MAO-A utilizado clinicamente como antidepressivo. No teste realizado com a moclobemida isoladamente, nenhuma dose utilizada inibiu a hipotermia induzida pela apomorfina, mas ao contrário, as doses de 20 e 40 mg/kg induziram queda de temperatura nos animais de maneira dose-efeito. Esse fato se deve, provavelmente, ao aumento da neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica em decorrência do mecanismo de ação IMAO-A da moclobemida. Conforme já mencionado, ambos os sistemas de neurotransmissão possuem papel fundamental nos mecanismos de hipotermia em animais, principalmente pela interação serotoninérgica com o receptor 5-HT_{1A} (Gudelsky et al., 1986) e pela interação dopaminérgica com os receptores dopaminérgicos pré-sinápticos D₂ (Zarrindast, Tabatai, 1992). Neste sentido, pode-se especular que o pré-tratamento com a ayahuasca permitiu que uma dose menor de moclobemida (5 mg/kg) fosse capaz de induzir queda de temperatura dos animais, comparado ao grupo controle, pela sua ação serotoninérgica. Entretanto, a combinação das duas drogas não foi suficiente para inibir a hipotermia induzida pela apomorfina, o que de certa forma já era esperado, já que este teste farmacológico não é indicado para avaliação de drogas IMAO, dentro de seu contexto como modelo para investigação de antidepressivos.

Não se deve esquecer que a própria administração de ayahuasca induziu queda de temperatura nos animais, registrada antes da administração de apomorfina. Abdel-Fattah et al. (1995a) apresentam evidências que sustentam esse resultado. Os autores constataram que as β -carbolinas harmina e harmalina extraídas das folhas da *Peganum harmala* induziram um quadro de hipotermia dose-dependente em ratos (2,5 – 20 mg/kg, via i.p.), onde a queda de temperatura foi mais significativa entre 30 e 60 minutos após a administração dos alcaloides. Adicionalmente, o pré-tratamento com um inibidor da síntese de serotonina (p-clorofenilalanina, 100 mg/kg/dia, durante 3 dias) inibiu significativamente a hipotermia induzida pelos alcaloides totais (5 mg/kg, i.p.) e pela harmina isolada (10 mg/kg, i.p.). Além disso, o pré-tratamento com 2 mg/kg do pindolol (antagonista parcial do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} e antagonista do receptor β -adrenérgico), bem como sua associação com o haloperidol, um antagonista do receptor dopaminérgico D₂ (5 mg/kg subcutâneo 24 horas antes e 2 mg/kg i.p. 2 horas antes do teste), inibiram completamente a hipotermia induzida pelos alcaloides. A partir desses resultados, Abdel-Fattah et al. (1995a) concluíram que a hipotermia promovida pelos alcaloides ocorre por meio de três mecanismos: (1) sua

ação IMAO induz um aumento da neurotransmissão serotoninérgica, e, por conseguinte, a serotonina torna-se disponível para interagir com o receptor 5-HT_{1A} que participa do mecanismo de hipotermia em camundongos; (2) sua ação IMAO induz um aumento da neurotransmissão dopaminérgica, e, por conseguinte, a dopamina torna-se disponível para interagir com o receptor D₂ que também está envolvido no mecanismo de hipotermia em camundongos; (3) harmalina por si só interage com os receptores serotoninérgicos promovendo a hipotermia.

Tanto a ayahuasca como a moclobemida atuam inibindo preferencialmente a MAO-A. Para verificar o efeito da interação da ayahuasca com outros inibidores da MAO, foi realizado um teste-piloto com a pargilina, um inibidor irreversível e seletivo da MAO-B, não empregado clinicamente como antidepressivo. Neste teste a administração de pargilina induziu hipotermia nos animais, porém com a injeção posterior de apomorfina houve um quadro de hipertermia prolongada. A associação de ayahuasca e pargilina acentuou o quadro de hipertermia, indicando um efeito potencialmente tóxico desta combinação.

Nesse teste com a pargilina a temperatura e o estado geral dos animais foram avaliados de hora em hora até 4 horas após a administração da apomorfina, a fim de verificar se os efeitos produzidos pela interação das drogas eram reversíveis. Contudo, com a evolução do tempo observou-se a morte dos animais. Em um estudo com a pargilina realizado por Abdel-Fattah et al. (1995b), embora não tenha sido administrada a apomorfina, os pesquisadores relataram que após um breve período de hipotermia, os camundongos apresentavam um período prolongado de hipertermia que evoluía para a morte dos mesmos. No nosso estudo, a associação de ayahuasca e pargilina acelerou o tempo de morte dos animais, na comparação com os demais grupos. Esse fato se justifica, provavelmente, pelo aumento significativo e permanente de serotonina e noradrenalina em decorrência da inibição irreversível da MAO-B pela pargilina, e que neste caso foi potencializado pelo efeito de inibição adicional da MAO-A pelas β -carbolinas do chá. Conforme já comentado, aumentos significativos, tanto de serotonina como de noradrenalina em nível central, estão relacionados com quadros de hipertermia (Abdel-Fattah et al., 1997) e com a inibição da hipotermia induzida pela apomorfina (Puech et al., 1978; Menon et al., 1984; Porsolt et al. 1991; An et al., 2008).

O outro modelo animal de depressão utilizado nesse estudo foi o teste da natação forçada, também conhecido como teste do desespero comportamental e que consiste no modelo mais utilizado para a avaliação de drogas antidepressivas. Este teste baseia-se na observação de que ratos colocados para nadar em um tanque de água onde o escape é

impossível, quando reexpostos a tal situação apresentam um grande período de imobilidade, que representaria a “desistência” frente à situação imposta. Este comportamento representa uma diminuição da capacidade de lidar com situações de estresse e dificuldade, como ocorre com o paciente com depressão. Drogas antidepressivas diminuem o tempo de imobilidade dos animais, assim como o eletrochoque e privação de sono, terapias não farmacológicas utilizadas no tratamento da depressão (Porsolt et al., 1978; Porsolt et al., 1991; Weiss, Kilt, 1998).

O propósito deste estudo era determinar as doses efetivas e subefetivas de três antidepressivos (imipramina, sertralina e moclobemida) e então avaliar o efeito da associação de ayahuasca com tais drogas, em suas doses subefetivas. Esperava-se com isso que a ayahuasca pudesse induzir diminuição de imobilidade em animais tratados com estas doses dos antidepressivos, agindo de modo sinérgico, como demonstrado em outros estudos de associação (Poleszak et al., 2005; Rogóz, Skuza, 2006; Wesolowska, Nikiforuk, 2008; Réus et al., 2011b). Contudo, nenhuma dose testada dos antidepressivos isoladamente reduziu o tempo de imobilidade dos ratos em relação aos respectivos grupos controle. As doses empregadas dos antidepressivos imipramina, sertralina e moclobemida foram baseadas em dados da literatura (Ferigolo et al., 1998; Réus et al., 2011a; Espallergues et al., 2012) e estudos prévios do laboratório, nas quais as doses superiores haviam sido efetivas. É importante ainda ressaltar que não foi viável a utilização de doses superiores destas drogas, pois as maiores doses empregadas já se mostraram limítrofes, induzindo extrema irritação nos animais e alguns sinais de toxicidade.

Também foi objetivo do trabalho avaliar o efeito isolado da ayahuasca, e desta forma estimar seu potencial como agente antidepressivo, uma vez que é relatado entre integrantes dos grupos ayahuasqueiros que o chá promove melhora de humor em indivíduos deprimidos. O chá, nas doses de 120 e 1200 mg/kg não alterou o tempo de imobilidade dos animais na natação forçada, indicando ausência de atividade nesta faixa de dose. Lima et al. (2006) também avaliaram o efeito da ayahuasca sobre a natação forçada de ratos, porém as doses utilizadas não estão claramente descritas no trabalho. Aparentemente os autores avaliaram doses correspondentes a 2,5; 5 e 10 mg/kg de DMT no chá de ayahuasca, que administrado por via oral, reduziu o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle, sendo o efeito mais pronunciado com a dose menor. No nosso trabalho as doses foram baseadas em estudos prévios do grupo com outros modelos animais (Pires, 2009), sendo que a dose de 120 mg/kg corresponde a dose média consumida por humanos, segundo a pessoa que cedeu o chá. Considerando o teor de DMT dosado no material utilizado em nosso estudo (0,38 mg/ml) e a

concentração de ayahuasca (120 mg/ml) temos que a DMT representa aproximadamente 0,32% do resíduo seco. Ao se calcular a quantidade de DMT no chá (0,32% de 120 mg/kg - dose unitária) temos a dose de 0,38 mg/kg, ou seja, como a dose é igual a concentração inicial os valores de concentração e dose dos constituintes também são coincidentes). Para a dose de 1200 mg/kg do chá (10 vezes maior) a dose de DMT foi de 3,8 mg/kg, o que está dentro da fase de doses com efeito positivo utilizadas por Lima et al. (2006). Contudo, como estes autores não mencionam a concentração de DMT no chá, não é possível calcular a dose total de ayahuasca utilizada naquele estudo e assim não é possível estimar a participação de outras substâncias, como as β -carbolinas com ação IMAO, o que torna inviável comparar nossos dados com tais resultados. Estudo de Fortunato et al. (2009) demonstrou que a harmina, em doses de 10 e 15 mg/kg, diminuiu o tempo de imobilidade de ratos no teste da natação forçada, enquanto a dose maior induziu ainda aumento dos níveis de BDNF no hipocampo dos animais. Já no nosso estudo, considerando o teor de harmina de 0,32 mg/ml (que representa 0,27% do resíduo seco), calcula-se que na dose de 120 mg/kg do chá temos 0,32 mg/kg de harmina, o que corresponde a doses mais de 30 vezes menores que as utilizadas por Fortunato et al. (2009).

Apesar dos estudos com os antidepressivos isoladamente não terem indicado nenhuma dose efetiva, foram conduzidos experimentos de associação da ayahuasca com estas drogas, até porque o intuito do trabalho era verificar a interação entre doses que sozinhas não são efetivas. Nos testes com a imipramina isoladamente ou na associação com a ayahuasca utilizou-se o antidepressivo de dois laboratórios diferentes, como uma tentativa de obter o resultado esperado. A dose de 3,75 mg/kg (Cristália) foi escolhida, uma vez que a dose 7,5 mg/kg desta marca induziu menor tempo de imobilidade comparada com as outras doses utilizadas de imipramina do mesmo lote. Por outro lado, optou-se pela dose de 15 mg/kg de imipramina (Biosintética), pois a dose de 30 mg/kg desta marca induziu uma redução no tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle, embora não tenha sido estatisticamente significativo.

A imipramina é uma das principais drogas empregadas como controle positivo em estudos que utilizam a natação forçada para avaliar outras substâncias ou interações entre elas. Dados da literatura mostram que doses de 5, 10, 15 e 30 mg/kg são efetivas em diminuir o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (Chaviaras et al., 2010; Kitamura et al., 2004; Réus et al., 2011a). Estudos-piloto do grupo haviam indicado que a imipramina é eficaz na dose de 30 mg/kg, produz um pequeno efeito (não estatístico) na dose de 15 mg/kg e não modifica a imobilidade dos animais em doses de 7,5 mg/kg ou inferiores (dados não

publicados). No presente estudo, as drogas isoladamente (3,75 a 30 mg/kg), assim como a associação da imipramina com ayahuasca, não modificaram o tempo de imobilidade dos animais, indicando ausência de interação neste teste.

Existem diversos estudos de associação da imipramina com outras drogas no teste da natação forçada, com objetivos semelhantes ao do nosso estudo. Réus et al. (2011b) avaliaram a associação da imipramina com a cetamina, uma droga antagonista do receptor NMDA do glutamato e os resultados mostraram que a associação de doses subefetivas da imipramina (10 mg/kg) + cetamina (5 mg/kg) produziu uma ação sinérgica positiva, ou seja, diminuiu o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle. De modo similar, Poleszak et al. (2005) constataram que a associação de doses subefetivas da imipramina (10 e 15 mg/kg) com o magnésio (5 e 10 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade de camundongos de forma significativa comparada ao grupo controle. Os autores do estudo relatam que a interação farmacodinâmica, ao invés da interação farmacocinética, é a responsável pelo efeito encontrado da associação da imipramina com o magnésio, uma vez que não detectaram alteração nos níveis de magnésio, imipramina ou desipramina (metabólito ativo da imipramina), em nível central e periférico, após a administração conjunta da imipramina e do magnésio.

No caso do estudo com a sertralina optou-se por testar a interação da ayahuasca com duas doses do antidepressivo (2,5 e 10 mg/kg), já que as quatro doses empregadas isoladamente não foram efetivas em diminuir o tempo de imobilidade dos animais. Procurou-se com isso aumentar as chances de observar uma possível interação da sertralina com a ayahuasca. Mesmo assim, não foi observada alteração no tempo de imobilidade dos animais para nenhum grupo, seja da sertralina isolada ou em associação com ayahuasca.

É importante destacar que a avaliação de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina pelo teste de natação forçada requer certos cuidados, segundo a literatura. Nesse sentido, é possível discriminar três comportamentos distintos do rato exposto ao teste: natação – movimentos ativos com as patas dianteiras e traseiras, mais do que necessários apenas para manter a cabeça acima da água; *climbing* – movimentos ativos e vigorosos com as patas dianteiras, normalmente dirigidas contra as paredes do cilindro; e imobilidade – flutuação na água sem luta, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água (Detke et al., 1997). Conforme, Detke et al. (1995) o comportamento de *climbing* dos animais aumenta nesse teste em decorrência de uma maior neurotransmissão noradrenérgica, enquanto o comportamento da natação aumenta em decorrência da neurotransmissão serotoninérgica. Contudo, como a distinção entre estes

comportamentos não é clara, e para facilitar a mensuração dos dados, optamos por medir apenas nado versus imobilidade. A decisão também foi subsidiada pelo fato de que em um teste-piloto não se evidenciou diferença de natação ou *climbing* com o uso de sertralina (dados não publicados).

Cryan et al. (2005) apontam que o tratamento crônico com antidepressivos diversos, produz resultados mais significativos em relação ao tratamento agudo (tratamento utilizado nesse estudo). Esses autores constataram que doses aparentemente inativas de três antidepressivos com mecanismos de ação diferente apresentam efeito potencializado no tratamento crônico de 14 dias em relação ao tratamento agudo de 3 dias em um teste adaptado da natação forçada. Em outras palavras, constataram que a reboxetina, um potente e altamente seletivo inibidor da recaptação da noradrenalina, produz aumento do *climbing*; enquanto a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, aumentou a natação.

Há vários outros estudos demonstrando que a associação de drogas antidepressivas diversas com outros agentes farmacológicos permite que doses menores do antidepressivo passem a ser eficazes. Por exemplo, Rogóz e Skuza (2006) avaliaram a interação de uma dose subefetiva de pramipexol (0,1 mg/kg) com doses subefetivas de sertralina (2,5 e 5 mg/kg). O pramipexol é um potente agonista do receptor dopaminérgico D₃. Os resultados obtidos mostram que o grupo de animais que recebeu a associação pramipexol 0,1 mg/kg + sertralina 5 mg/kg apresentou menor tempo de imobilidade em relação ao grupo controle, enquanto a associação da mesma dose de pramipexol com 2,5 mg/kg de sertralina não foi efetiva. Os autores do estudo justificam que a eficácia da associação entre pramipexol e sertralina em reduzir o tempo de imobilidade esteja relacionada com a ligação da sertralina com o receptor específico de serotonina 5-HT_{1A} e com o receptor σ_1 , e da ligação do pramipexol com receptores dopaminérgicos D_{2/3}, pois constataram que a administração de drogas antagonistas desses receptores diminui a eficácia da associação. Vale ressaltar ainda, que a sertralina além de atuar como um potente inibidor da recaptação de serotonina atua também, em menor nível, como um inibidor dos transportadores dopaminérgicos (Stahl et al., 2013). Assim, estes dados sugerem que a estimulação de diferentes sistemas monoaminérgicos no teste de natação forçada contribua para o efeito positivo no mesmo. Como uma forma de avaliar esta possibilidade, investigamos o efeito da associação da ayahuasca com a tranilcipromina, um inibidor irreversível das enzimas MAO-A e MAO-B (Youdim et al., 2006). Tal interação, em teoria, levaria a um expressivo aumento das concentrações de dopamina, noradrenalina e serotonina. Entretanto, os resultados mostram que o grupo de animais que recebeu a associação ayahuasca 120 mg/kg + tranilcipromina 0,1 mg/kg não apresentou redução no

tempo de imobilidade comparado ao grupo controle. Não foi possível trabalhar com doses superiores, pois a tranilcipromina, sendo um inibidor irreversível da MAO, produziu sinais evidentes de toxicidade com doses maiores que 10 mg/kg.

Dados da literatura mostram o efeito da tranilcipromina de forma isolada no teste da natação forçada. Num desses estudos, Reed et al. (2008) observaram que as doses de 0,5; 1; 2,5 e 10 mg/kg (i.p.) diminuíram o tempo de imobilidade de ratos com 21 dias de idade em relação ao grupo controle salina. As doses de 1; 2,5 e 10 mg/kg aumentaram o tempo de natação, enquanto o *climbing* foi aumentado somente no grupos de animais que receberam a dose de 0,5 mg/kg. Os autores ressaltam que o aumento do comportamento da natação e do *climbing*, ocorreu devido ao aumento das concentrações de serotonina e de noradrenalina, respectivamente. Já Torregrossa et al. (2005) constataram que o tratamento crônico de tranilcipromina (total de 21 dias, sendo 7 dias na dose de 7,5 mg/kg e 14 dias com 10 mg/kg, i.p.) diminuiu o tempo de imobilidade de ratos. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, a tranilcipromina (via i.p.) se mostrou potencialmente tóxica em nossos estudos, o que inviabilizou o estudo com doses superiores a 10 mg/kg.

Em relação à pargilina (IMAO-B, irreversível) foi realizado apenas um teste-piloto com a droga isolada (1, 5 e 20 mg/kg) e nenhuma destas doses reduziu o tempo de imobilidade dos ratos em relação ao grupo controle. Além disso, a pargilina é uma droga empregada com fins experimentais e atualmente não é mais utilizada na clínica médica para o tratamento da depressão. Soma-se ainda, que devido à toxicidade observada na associação de ayahuasca e pargilina no experimento da hipotermia induzida pela apomorfina, foi decidido que essa droga não seria mais utilizada no nosso trabalho; sendo planejado o emprego da moclobemida como droga IMAO nos dois modelos de depressão.

No teste com a moclobemida isoladamente (doses de 7,5; 15 e 30 mg/kg) nenhuma dose utilizada diminuiu o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle, não sendo possível discriminar entre uma dose ativa e aquela subefetiva. Este resultado contrasta com dados da literatura que mostram o efeito da moclobemida no teste da natação forçada em doses próximas àquelas empregadas no presente estudo. Num desses estudos, Weinstock et al. (2002) constataram que a administração de 20 mg/kg (v.o.) de moclobemida reduziu o tempo de imobilidade dos animais e aumentou o tempo de natação tanto no tratamento agudo (conforme Porsolt et al., 1978) como no tratamento crônico (2 semanas de tratamento, 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia). Em outro estudo Cryan et al. (2005) utilizaram minibombas osmóticas para a liberação de moclobemida. As concentrações da droga foram ajustadas de acordo com o peso corporal médio dos animais, consistindo em tratamentos com

as doses de 2,5 e 15 mg/kg por 3 ou 14 dias. Ambas as doses reduziram o tempo de imobilidade e aumentaram o tempo de *climbing*, sendo os efeitos mais pronunciados com a dose maior e o tratamento de 14 dias. Em ambos os estudos, os efeitos constatados pelos diferentes tratamentos com a moclobemida no teste da natação forçada é justificado pelos autores devido a ação IMAO-A da moclobemida que afeta de modo não-seletivo a neurotransmissão serotoninérgica (relacionada ao tempo de natação), bem como a neurotransmissão noradrenérgica (relacionada ao tempo de *climbing*).

A associação da moclobemida em doses subefetivas com outros fármacos já foi avaliada por alguns autores, empregando o teste da natação forçada. Ferigolo et al. (1998) constataram que a moclobemida isoladamente (30 mg/kg) bem como a associação de uma dose subefetiva do antidepressivo (10 mg/kg, i.p.) com feniletilamina (10 mg/kg, i.p.) reduziram o tempo de natação dos animais em relação ao grupo controle. Segundo os pesquisadores, a redução do tempo de imobilidade pela interação das duas drogas, ocorreu, provavelmente, por mudanças significativas dos níveis das monoaminas serotonina, dopamina, noradrenalina ou da feniletilamina, que induzem um aumento no tempo de natação e/ou *climbing*. No nosso estudo, o teste de associação foi feito utilizando as doses de 15 e 30 mg/kg, mas tais associações não alteraram o tempo de imobilidade dos animais, comparados ao grupo controle. Wesolowska e Nikiforuk (2008) investigaram a associação de uma dose subefetiva de moclobemida (20 mg/kg, i.p.) e de um antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₆ (SB-399885, 3 mg/kg, i.p.) sob a justificativa que esse receptor pós-sináptico tem papel fundamental na depressão devido a sua localização em áreas corticolímbicas relacionadas ao humor, como o hipocampo. Os autores constataram uma acentuada redução no tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle, devido provavelmente ao aumento da neurotransmissão serotoninérgica e das catecolaminas. Por fim, os autores desses estudos compartilham a ideia que os diferentes resultados obtidos com a moclobemida no teste da natação forçada possivelmente ocorreram devido a variações no teste, bem como pela utilização de diferentes doses e vias de administração. Vale lembrar que nessa dissertação, a moclobemida foi extraída a partir do medicamento comercial Aurorix[®] e embora a extração da substância ativa tenha sido confirmada por HPLC, não foi possível estimar o grau de pureza da droga e, portanto a fidedignidade das doses utilizadas no presente estudo.

Destaca-se ainda, que a conclusão sobre a ausência de efeito da associação da ayahuasca com os antidepressivos no teste da natação forçada fica prejudicada, uma vez que, o tratamento com as drogas isoladas também não surtiu efeito nesse teste, isto é, nenhum dos tratamentos com as drogas isoladas diminuiu o tempo de imobilidade dos animais. Assim,

considera-se que esse modelo não foi sensível aos tratamentos, bem como há a necessidade de uma maior investigação de diferentes doses de ayahuasca no teste da natação forçada para uma melhor compreensão dos efeitos da mesma nesse teste.

O outro parâmetro avaliado durante o teste da natação forçada foi o número de defecações, já que este é considerado uma medida de emocionalidade do animal em resposta a uma exposição estressora (Masur, 1970; Archer, 1973; Connor et al. 1999). De fato, alguns tratamentos utilizados no nosso trabalho reduziram o número de bolos fecais dos animais avaliados, sendo que este efeito foi mais consistente com a imipramina. Esse fato sugere que a imipramina seja mais eficaz do que os outros antidepressivos na redução da reatividade emocional do animal em uma situação estressora. Contudo, Connor et al. (1999) advertem que a redução do número de defecações no teste da natação forçada promovidas por drogas que aumentem a biodisponibilidade de noradrenalina, como é o caso da imipramina, pode ser devido a ativação dos terminais sinápticos simpáticos do trato gastrointestinal, que por sua vez, induzem a um estado de constipação no animal. De qualquer forma, os resultados apontam para uma interação entre a ayahuasca e a sertralina, pois os tratamentos com a sertralina isoladamente não induziram uma redução no número de defecações, enquanto que no teste da associação das drogas o tratamento com ayahuasca e sertralina (doses de 2,5 e 10 mg/kg) induziu redução do número de defecações. Neste teste, o tratamento apenas com sertralina (10 mg/kg) também reduziu o número de defecações, mas esta queda foi estatisticamente menor do que a observada após a associação, o que, hipoteticamente indica que a associação da ayahuasca e sertralina foi mais eficaz em reduzir a reatividade emocional dos animais durante o teste.

Uma recomendação importante em estudos que utilizam o teste da natação forçada é certificar-se de que eventuais aumentos observados na natação (ou seja, diminuição da imobilidade) não se devem a um efeito inespecífico de drogas estimulantes do sistema nervoso central (Porsolt et al., 1991). Embora nenhum dos tratamentos experimentais no nosso estudo tenha reduzido o tempo de imobilidade dos animais, foi feita a avaliação da atividade locomotora em camundongos com a ayahuasca (120 e 1200 mg/kg) e com as doses maiores dos antidepressivos avaliados. Contudo, nossos resultados revelaram que somente os animais tratados com a dose de 20 mg/kg de sertralina (ISRS) apresentaram uma hiperatividade locomotora quando comparados ao grupo controle, em 60, 90 e 120 minutos de avaliação. Postula-se que esse efeito ocorra provavelmente por meio de dois mecanismos: (1) a sertralina em doses elevadas atua como um inibidor dos transportadores dopaminérgicos (Stahl et al., 2013), e assim, provavelmente induz um aumento dos níveis de dopamina no

circuito mesocortical, o qual influencia a atividade motora; (2) o aumento serotoninérgico em regiões dopaminérgicas centrais específicas pode influenciar indiretamente a neurotransmissão dopaminérgica e consequentemente a atividade motora. Nesse sentido, Sasaki-Adams e Kelley (2001) constataram que a infusão bilateral de 5 µg de serotonina no núcleo *accumbens* (volume total de 1 µl) induziu uma hiperatividade locomotora em ratos avaliados na caixa de medida automática durante duas horas. Entretanto, essa resposta foi atenuada pela administração prévia de antagonistas de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ (D₁ – R(+)-SCH-23390, 0,1 mg/kg, i.p.; D₂ – S(-)-*raclopride-L-tartrate*, 1,0 mg/kg, i.p.). Mais recentemente, Herin et al. (2013) constataram que o aumento da expressão do receptor 5-HT_{2A} na área tegmental ventral (por meio da técnica de transferência gênica por vetor viral), aumentou a hiperatividade locomotora de ratos induzida por cocaína (15 mg/kg) no teste do campo aberto (60 min de avaliação). Além disso, constataram que sem o desafio da cocaína, os ratos que expressaram de forma significativa o receptor 5-HT_{2A} na área tegmental ventral, não apresentaram uma hiperatividade locomotora. Somado a isso, constataram em outro estudo que a microinfusão isolada de um agonista seletivo do receptor 5-HT_{2A} (*1-(2,5-dimethoxy-4-iodo)-2-aminopropane*) na área tegmental ventral foi suficiente para evocar a hiperatividade de ratos. Dessa forma, os pesquisadores concluem que a ativação do receptor 5-HT_{2A} na área tegmental ventral tem um papel fundamental em mediar a hiperatividade locomotora evocada pela cocaína no circuito dopaminérgico mesocortical.

Diante disso, era de se esperar que o tratamento com ayahuasca na dose de 1200 mg/kg e moclobemida na dose de 30 mg/kg (IMAO-A) induzissem uma hiperatividade locomotora nos camundongos, devido ao aumento da neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica induzidas pelas mesmas, o que não ocorreu. Estes resultados indicam que, de modo geral, as doses empregadas das diferentes drogas foram adequadas, já que não interferem na locomoção dos animais.

Para melhor subsidiar os resultados dos estudos *in vivo*, planejava-se avaliar a atividade inibidora *in vitro* da ayahuasca sobre a MAO e verificar o efeito da associação deste chá com antidepressivos de diferentes categorias, como ocorreu nos modelos animais. Além disso, os modelos *in vitro* caracterizam-se por serem menos complexos que os estudos *in vivo*, o que poderia aumentar as chances de observar interações mais sutis, não quantificáveis nos estudos com animais, notadamente complexos e com alta variabilidade. Ainda assim, é necessário cautela ao estabelecer comparativos de resultados obtidos em modelos *in vitro* e *in vivo*, já que no primeiro caso não é possível reproduzir toda a complexidade que envolve

processos de absorção, distribuição, metabolização, excreção, além de mecanismos de ação secundários (Fisar et al., 2010).

É importante esclarecer que os dados bioquímicos apresentados nesta dissertação ainda são preliminares. Inicialmente foram realizados ensaios para padronizar as condições ideais de reação, que consistiam em determinar a concentração da fração enzimática (medida pela concentração total de proteínas), concentração de substrato (quinuramina) e tempo de incubação. O ponto de referência para nossos estudos foram os trabalhos do grupo da UFSM, com o qual mantivemos estreita comunicação e que foi importante fornecendo dicas sobre o estudo (Sant'Anna, 2008; Acker et al., 2009). Sant'Anna (2008) utilizou a concentração de 1 mg/ml de proteína (ou 0,14 mg/ml no ensaio) para a realização dos seus ensaios, bem como as concentrações de 60 μ M de quinuramina para avaliar a atividade da MAO-B e 90 μ M para avaliar a atividade da MAO-A, correspondendo, segundo a autora, aos pontos de K_m (concentração de substrato para que a enzima atinja metade da sua velocidade máxima) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade da reação máxima) obtidos pela análise de uma curva de concentração de substrato realizada para MAO-A e para MAO-B, em cérebro e fígado de ratos. Contudo, nossos ensaios mostraram uma baixa formação do produto quantificável (4-hidroxiquinolina) com a concentração correspondente a 1 mg/ml de proteína, de forma que resolveu-se adotar a concentração de 2,5 mg/ml (concentração final de 0,71 mg/ml nos tubos) nos ensaios subsequentes. Quanto ao substrato, a concentração de 90 μ M pareceu adequada e foi mantida, até mesmo para manter as condições de ensaio mais próximas possíveis daquelas utilizadas como referência nos nossos estudos (Soto-Otero et al., 2001; Sant'Anna, 2008). Já o tempo de reação mostrou-se diretamente proporcional a quantificação do produto da reação, e desta forma, procuramos utilizar nos ensaios iniciais duas medidas, aos 30 e 60 min, padronizando posteriormente as incubações em 30 min.

Para avaliar a atividade inibidora da MAO, Sant'Anna (2008) utilizou a clorgilina como inibidor seletivo irreversível para a MAO-A, na concentração de 250 nM, e a selegilina como inibidor seletivo irreversível para a MAO-B, na concentração de 250 nM, uma vez que essas concentrações representam a menor concentração que garante 100% de inibição da isoforma da MAO correspondente para cada antidepressivo (Soto-Otero et al., 2001).

Neste estudo testamos a pargilina e a selegilina como inibidores seletivos da MAO-B. Concentrações superiores a 100 μ M de pargilina inibiram em mais de 50% a formação do produto da reação, quantificado fluorimetricamente, enquanto a concentração de 10 mM parece inibir perto de 100% da atividade enzimática. Embora a pargilina seja considerado um inibidor seletivo da MAO-B, alguns estudos demonstram que em condições *in vitro* ela inibe

as isoformas MAO-B e MAO-A com seletividade moderada para a primeira (Fisar et al., 2010; Passos et al., 2013). Em estudo de Passos et al. (2013) a CI_{50} da pargilina sobre a MAO-B foi de 0,13 μM e para a MAO-A de 4,07 μM , ou seja, uma diferença de 30 vezes. No mesmo estudo os autores mostraram que o CI_{50} da clorgilina (inibidor seletivo da MAO-A) foi aproximadamente 2750 vezes mais potente para a MAO-A (CI_{50} de 0,004 μM contra 4,96 μM para a MAO-B). Já a selegilina se mostrou aparentemente mais seletiva em nossos ensaios, o que pode ser constatado pelo platô obtido entre as concentrações de 250 nM até quase 2,5 μM . Em concentração superior, a seletividade da droga parece se perder. A concentração de 250 nM é justamente aquela sugerida pela literatura para bloqueio específico da MAO-B (Soto-Otero et al., 2001) e portanto foi aquela empregada nos ensaios posteriores para a determinação da inibição da MAO-A pela ayahuasca.

Segundo a literatura, a ayahuasca tem ação predominantemente IMAO-A por meio da ação das β -carbolinas harmina, harmalina e da THH (Herraiz et al., 2010). Em um ensaio onde foi avaliada a ação da ayahuasca sobre a atividade da MAO total, ou seja, sem bloqueio da MAO-B, observou-se uma leve inibição na formação do produto quantificável em concentrações a partir de 100 ng/ml. Já no ensaio onde foi feita uma pré-incubação com a selegilina (250 nM), com a finalidade de bloquear a MAO-B, o efeito da ayahuasca foi bem mais pronunciado. Este resultado sugere, a princípio, que a ayahuasca de fato seja seletiva (ou predominantemente seletiva) para a MAO-A, no entanto, isso só poderá ser avaliado num ensaio onde seja feita a pré-incubação da enzima com um inibidor seletivo da MAO-A (por exemplo, a clorgilina), e assim, o efeito a ser medido indicará a inibição do chá sobre a MAO-B. Além disso, a baixa inibição da ayahuasca sobre a MAO total indica que a preparação utilizada seja rica principalmente na isoforma MAO-B. Ambas as isoformas da MAO estão presentes no SNC, assim como no fígado, plasma e outros tecidos (Benedetti, Dostert, 1992), entretanto, há um predomínio de MAO-B em relação a MAO-A no SNC (Wimbiscus et al., 2010). Dentro das condições utilizadas, a CI_{50} da ayahuasca sobre a MAO-A parece ser próxima de 100 ng/ml, porém é necessária a realização de outros ensaios para que esse resultado seja confirmado. A concentração 10 vezes maior de ayahuasca (1000 ng/ml) inibiu em torno de 80% a atividade da MAO-A, porém não foi possível avaliar o efeito IMAO-A de concentrações superiores a esta, uma vez que essas concentrações já interferiram por si só nas leituras no fluorímetro, conforme constatado em teste onde foi feita a leitura da ayahuasca isoladamente.

Samoylenko et al. (2010) relatam que durante a mensuração da inibição da atividade da MAO pela *Banisteriopsis caapi* houve fortes interferências na fluorescência com

concentrações superiores a 5 µg/ml com a leitura feita em 460 nm. Dessa forma, utilizaram um protocolo onde a leitura da fluorescência foi realizada com emissão em 380 nm (Parikh et al., 2002) e assim determinaram a porcentagem de inibição da MAO-B e da MAO-A, sendo que a inibição da MAO-A nestas condições foi similar à medida feita em 460 nm. No nosso estudo não foi possível realizar a leitura na fluorescência com uma emissão em um comprimento de onda menor que 460 nm (por limitações do aparelho), o que poderia ser útil para estabelecer um comparativo de dados e quem sabe diminuir a interferência de concentrações elevadas de ayahuasca na leitura.

De qualquer forma, os resultados obtidos no nosso estudo confirmam a atividade IMAO-A para a amostra de ayahuasca utilizada em concentrações que parecem próximas daquelas descritas na literatura para preparações isoladas das plantas. Schwarz et al. (2003), utilizando um homogenato de fígado de rato, constataram uma ação IMAO-A com o CI_{50} de 1,24 µg/ml para o extrato de *Banisteriopsis caapi* e de 4,54 nM para a harmina. Em termos de equivalência, os autores relatam que o extrato apresentou uma potência de inibição da MAO-A superior a da harmina, pois a concentração do CI_{50} do extrato correspondeu a 0,0011 nM do princípio ativo, o que sugere o sinergismo de outros componentes presentes no extrato. Em outro estudo, Samoylenko et al. (2010) constataram que as β -carbolinas harmina e harmalina foram mais potentes na inibição da MAO-A em relação a MAO-B (CI_{50} 2,0 nM/2,5nM; 20 µM/25 µM, respectivamente). Além disso, constataram que a atividade dos extratos obtidos do caule (seco ou fresco) ou do cipó sem casca da *Banisteriopsis caapi* também foram mais potentes na inibição da MAO-A (CI_{50} 0,02–0,05 µg/ml) em relação a MAO-B (CI_{50} ~100 µg/ml). No entanto, os autores ressaltam que há diferentes espécies da *Banisteriopsis*, que não são conhecidas devido à escassez de coleções férteis e a carência de estudo taxonômico detalhado. A variação dos teores de β -carbolinas e de DMT no cipó e folhas das espécies que compõem o chá de ayahuasca em diferentes localidades, ou na mesma localidade em diferentes momentos, é bem conhecida.

Há ainda na literatura um estudo recente onde os autores avaliaram a atividade inibitória da MAO-A e da MAO-B pelos alcaloides da *Psychotria laciniata* Vell., pertencente ao gênero *Psychotria*, o mesmo da *P. viridis*, que possui DMT em sua composição e é utilizada no preparo do chá de ayahuasca (Passos et al., 2013). Os pesquisadores constataram que alguns alcaloides da *P. laciniata* apresentaram uma atividade inibitória da MAO-A variando a CI_{50} entre 0,85 a 7,41 µM, mas ao comparar com os valores de CI_{50} da harmina obtidos por Samoylenko et al. (2010) constataram que a inibição da MAO-A pelos alcaloides da *P. laciniata* foi 1000 vezes menos potente. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo

que avaliou a atividade inibitória da *Psychotria viridis* sobre a MAO-A e a MAO-B, e assim não há como saber se esta espécie contribuiria com uma ação sinérgica na inibição da MAO *in vitro*.

Considerando nossos resultados como um todo, faz-se necessário a realização de um maior número de estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* para avaliar as possíveis interações existentes entre a ayahuasca e os antidepressivos, uma vez que os resultados obtidos nesse estudo apontam a interação de doses subefetivas da ayahuasca com os antidepressivos imipramina e sertralina no teste da hipotermia induzida pela apomorfina. No caso de interações com drogas que inibem de forma irreversível a MAO, como é o caso da pargilina, a interação mostrou-se extremamente perigosa. Um ponto importante a se considerar na realização de estudos futuros com a ayahuasca isolada, bem como sua interação com os antidepressivos em modelos animais de depressão, é o tempo de tratamento. Deste modo, sugere-se a avaliação após tratamento crônico, visto que a ação dos antidepressivos na clínica médica surge por volta de 2 a 3 semanas de tratamento (Hindmarch, 2001; Krishnan, Nestler, 2008), assim como o uso de ayahuasca, embora não seja diário, também se dá de forma repetida.

Finalmente, espera-se que as informações obtidas nesses estudos pré-clínicos sejam úteis para a realização de estudos clínicos que visem avaliar a ação antidepressiva da interação entre a ayahuasca e os antidepressivos. Esta seria uma possibilidade interessante, permitindo ocasionalmente que doses menores dos antidepressivos fossem empregadas com sucesso.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho não indicaram interação do efeito de doses subefetivas agudas de sertralina, imipramina e moclobemida com a ayahuasca no teste da natação forçada ao avaliar o comportamento de imobilidade, relacionado a uma ação antidepressiva. Além disso, o fato dos antidepressivos não terem produzido os efeitos esperados com nenhuma dose sugere que o modelo não funcionou adequadamente. Desta foram, sugere-se estudos em que se avalie o tempo de imobilidade em ratos submetidos a um tratamento crônico de doses subefetivas da associação da ayahuasca com os antidepressivos, o que melhor reproduziria a condição real e aumentaria a possibilidade de sucesso no teste. No que se refere ao número de defecações dos animais neste teste, um parâmetro de emocionalidade, nota-se uma aparente interação entre a ayahuasca e a sertralina, uma vez que a sertralina de forma isolada não surtiu efeito na redução do número de defecações, enquanto na associação tal fato foi constatado.

Por outro lado, os resultados do teste da inibição à hipotermia induzida pela apomorfina indicam a provável existência de interações da ayahuasca com a imipramina e com a sertralina, uma vez que em ambos os testes a associação das drogas induziu uma elevação da temperatura retal dos animais após a administração de apomorfina (comparada à temperatura imediatamente anterior a administração desta), enquanto os tratamentos com as drogas isoladas não produziu este efeito. Embora não tenha sido observada uma interação significativa com a moclobemida, a interação com a pargilina produziu efeitos tóxicos que revelam que a associação de ayahuasca com drogas IMAO irreversíveis deve ser evitada.

Finalmente, no que se refere ao teste de inibição da MAO *in vitro*, os resultados obtidos, embora preliminares, confirma a atividade inibidora seletiva sobre a MAO-A pela ayahuasca.

REFERÊNCIAS

- ABDEL -FATTAH, A. F. M. et al. Central serotonin level-dependent changes in body temperature following administration of tryptophan to pargyline- and harmaline-pretreated rats. **General Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 405-409, 1997.
- ABDEL-FATTAH, A. F. M. et al. Hypothermic Effect of Harmala Alkaloid in Rats: Involvement of Serotonergic Mechanism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 421-426, 1995a.
- ABDEL-FATTAH, A. F. M. et al. 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors mediate hypothermic and hyperthermic effects of tryptophan in pargyline-pretreated rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 379-384, 1995b.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- ACKER, C. I. et al. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 168-172, 2009.
- AN, L. et al. Role for serotonin in the antidepressant-like effect of a flavonoid extract of Xiaobuxin-Tang. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, n. 4, p. 572-580, 2008.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; VITAL, M. A. B. F. Modelos animais em psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 4, p. 53-61.
- AMERICAN PSYCHIATRIC. **Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders**, 4^a ed, 1994.
- ARTAIZ, I. et al. Preclinical pharmacology of F-98214-TA, a novel potent serotonin and norepinephrine uptake inhibitor with antidepressant and anxiolytic properties. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 3, p. 400-413, 2005.
- AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. **Pharmacological reviews**, v. 64, p. 238-258, 2012.
- BARBOSA, P. C. et al. A Six-Month Prospective Evaluation of Personality Traits, Psychiatric Symptoms and Quality of Life in Ayahuasca-Naive Subjects. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 41, n. 3, p. 205-212, 2009.
- BENEDETTI, M.S.; DOSTERT, P. Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. **Advances in Drug Research**, v. 23, p. 65-125, 1002.
- BILGE, S. et al. Chronic treatment with fluoxetine and sertraline prevents forced swimming test-induced hypercontractility of rat detrusor muscle. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 6, p. 1734-1140, 2008.

BILL, D. J. et al. Direct Evidence For An Important Species-Difference In The Mechanism Of 8-Oh-Dpat-Induced Hypothermia. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, n. 4, 1991.

BONNET, U. Moclobemide: Therapeutic use and clinical studies. **CNS Drug Reviews**, v. 9, n. 1, p. 97-140, 2003.

BOURIN, M. Is it possible to predict the activity of a new antidepressant in animals with simple psychopharmacological tests? **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 49-64, 1990.

BOUSO, J. C. et al. Personality, Psychopathology, Life Attitudes and Neuropsychological Performance among Ritual Users of Ayahuasca: A Longitudinal Study. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. 1-13, 2012.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, 2000.

BOYCE-RUSTAY, J. M. et al. Desipramine potentiation of the acute depressant effects of ethanol: Modulation by $\alpha 2$ -adrenoreceptors and stress. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 5, p. 803-811, 2008.

BOYD, K. N.; MAILMAN, R. B. Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. **Handbook of Experimental Pharmacology**, p. 53-86, 2012.

BOYER, E. W.; SHANNON, M. The serotonin syndrome - Reply. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 23, 2005.

BUENO, A. X. et al. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p.317-323, 2006.

CALLAWAY, J. C. A review of ayahuasca phytochemistry and neuropharmacology. **Arquivo Brasileiro Fitomedicina Científica**, v.1, p.134-142, 2003.

CALLAWAY, J. C. et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in health humans. **Journal Ethnopharmacology**, v. 65, p. 243-256, 1999.

CALLAWAY, J. C. et al. Platelet serotonin uptake sites increased in drinkers of ayahuasca. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 385-387, 1994.

CAMI, J.; FARRE, M. Drug addiction. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 10, 2003.

CASTRÉN, E.; RANTAMÄKI, T. The Role of BDNF and Its Receptors in Depression and Antidepressant Drug Action: Reactivation of Developmental Plasticity. **Developmental neurobiology**, v. 70, p. 289-297, 2010.

CHAVIARAS, S. et al. Assessing the antidepressant-like effects of carbetocin, an oxytocin agonist, using a modification of the forced swimming test. **Psychopharmacology**, v. 210, n. 1, p. 35-43, 2010.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, May 2002.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 3, p. 335-344, 2005.

CONNOR, T. J. et al. Reboxetine attenuates forced swim test-induced behavioural and neurochemical alterations in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 379, n. 2-3, p. 125-133, 1999.

COX, B.; ENNIS, C.; LEE, T. F. The function of dopamine-receptors in the central thermoregulatory pathways of the rat. **Neuropharmacology**, v. 20, n. 11, 1981.

DEGNER, D. et al. Serotonin Syndrome with Severe Hyperthermia after Ingestion Of Tranylcypromine Combined with Serotonin Reuptake Inhibitors and Tyramine-Rich Food in a Case of Suicide. **Pharmacopsychiatry**, v. 43, n. 7, p. 284-285, Nov 2010.

DELIGANIS, A. V.; PIERCE, P. A.; PEROUTKA, S. J. Differential interactions of dimethyltryptamine (DMT) with 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 11, 1991.

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 107-112, May 1997.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66-72, 1995.

DE ARAUJO, D. B. et al. Seeing With the Eyes Shut: Neural Basis of Enhanced Imagery Following Ayahuasca Ingestion. **Human Brain Mapping**, v. 33, p. 2550–2560, 2012.

DE SILVA, V. A.; HANWELLA, R. Efficacy and tolerability of venlafaxine versus specific serotonin reuptake inhibitors in treatment of major depressive disorder: a meta-analysis of published studies. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 8-16, 2012.

DE SOUZA, P. A. Alcaloides e o chá de ayahuasca: uma correlação dos “estados alterados da consciência” induzido por alucinógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 349-358, 2011.

DOERING-SILVEIRA, E. et al. Report on psychoactive drug use among adolescents using ayahuasca within a religious context. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, n. 2, p. 141-144, 2005.

DOS SANTOS, R. G. et al. Autonomic, Neuroendocrine, and Immunological Effects of Ayahuasca A Comparative Study With D-Amphetamine. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 717-726, 2011.

DOS SANTOS, R. G. Safety and Side Effects of Ayahuasca in Humans—An Overview Focusing on Developmental Toxicology. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 45, n. 1, p. 68-78, 2013.

ESPALLERGUES, J. et al. The antidepressant-like effects of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane in mice is related to changes in neuroactive steroid and monoamine levels. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 492-502, 2012.

FÁBREGAS, J. M. et al. Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 111, n. 3, p. 257-261, 2010.

FARKAS, D.; GREENBLATT, D. J. Influence of fruit juices on drug disposition: discrepancies between in vitro and clinical studies. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, p. 381-393, 2008.

FERIGOLO, M. et al. Comparison of behavioral effects of moclobemide and deprenyl during forced swimming. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 2, 1998.

FIEDOROWICZ, J.G.; SWARTZ, K.L. The Role of Monoamine Oxidase Inhibitors in Current Psychiatric Practice. **Journal of Psychiatric Practice**, v. 10, n. 4, p. 239-248, 2004.

FISAR, Z.; JANA HROUDOVÁ, J.; RABOCH, J. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. **Neuroendocrinology Letters Volume**, v. 31, n. 5, p. 645-656, 2010.

FORTUNATO, J. J. et al. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, p. 1425-1430, 2009.

FULLER, M.A.; SAJATOVIC, M. **Drug information handbook for psychiatry**. 2nd ed. Hudson: Lexi-Comp, Inc, 1999.

GALZIN, A. M.; DUBOCOVICH, M. L.; LANGER, S. Z. Presynaptic Inhibition by Dopamine Receptor Agonists of Noradrenergic Neurotransmission in the Rabbit Hypothalamus. **The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, n. 2, p. 461-471, 1982

GILLMAN, P. K. Monoamine oxidase inhibitors, opioid analgesics and serotonin toxicity. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, n. 4, p. 434-441, 2005.

GLENNON, R. A. et al. Binding of b-carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂ and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 60, p. 121-132, 2000.

GROB, C. S. et al. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 184, n. 2, p. 86-94, 1996.

GUDELSKY, G. A.; KOENIG, J. I.; MELTZER, H. Y. Thermoregulatory responses to serotonin (5-HT) receptor stimulation in the rat - evidence for opposing roles of 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 12, 1986.

GUILHERMANO, L. G. et al. Commercially available Hypericum perforatum extracts do not decrease immobility of rats in the forced swimming test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

GUIMARÃES, F. S. Modelos experimentais de doenças mentais. **Revista ABP-PAL**, v. 15, n. 4, 1993.

HERIN, D. V. et al. Elevated expression of serotonin 5-HT_{2A} receptors in the rat ventral tegmental area enhances vulnerability to the behavioral effects of cocaine. **Frontiers in Psychiatry**, v.4, p. 1-12, 2013.

HERRAIZ, T. et al. beta-Carboline alkaloids in Peganum harmala and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 839-845, 2010.

HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, n. 1, p. 11-28, 2000.

HIEMKE, C.; PFUHLMANN, B. Interactions and monitoring of antipsychotic drugs. **Handb Exp Pharmacol**, v. 212, p. 241-265, 2012.

HINDMARCH, I. Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. **Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental**, v. 16, n. 3, p. 203-218, 2001.

IZUMI, T. et al. Effects of co-administration of a selective serotonin reuptake inhibitor and monoamine oxidase inhibitors on 5-HT-related behavior in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 532, n. 3, p. 258-264, 2006.

KITAMURA, Y. et al. Influence of imipramine on the duration of immobility in chronic forced-swim-stressed rats. **Acta Medica Okayama**, v. 58, n. 6, p. 271-274, 2004.

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

LABATE, B.C.; CAVNAR, C. The expansion of the field of research on ayahuasca: Some reflections about the ayahuasca track at the 2010 MAPS “Psychedelic Science in the 21st Century” conference. **International Journal of Drug Policy**, v. 22, p. 174-178, 2011.

LANGER, S. Z. Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. **British Journal of Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 481-497, 1977.

LARSEN, M. H. et al. Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants. **European Journal Pharmacology**, v. 578, p. 114-122, 2008.

LIMA, L. M. et al. Ayahuasca central nervous system effects: behavioral study. **Arzteitschrift für Naturheilverfahren**, v. 47, n. 7, p. 476-480, 2006.

MASUR, J. A técnica do “open field” como medida da reatividade emocional de ratos. **Revista de Psicologia Normal e Patológica**, Ano XVI, p. 195-220, 1970.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. L. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 462-471, 2002.

- MCKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 2, p. 111-129, 2004.
- MAC RAY, E. El uso religioso de la ayahuasca en el Brasil contemporâneo. 1994. Disponível em: <http://www.giesp.ffch.ufba.br/Textos%20Edward%20Digitalizados/16.pdf>. Acesso em: 26/04/2013.
- MENON, M. K.; VIVONIA, C. A.; KLING, A. S. Pharmacological studies on the antagonism by antidepressants of the hypothermia induced by apomorphine. **Neuropharmacology**, v. 23, n. 2A, p. 121-127, 1984.
- MENON, M. K.; VIVONIA, C. A. Modification of apomorphine hypothermia by drugs affecting brain 5-hydroxytryptamine function. **European Journal of Pharmacology**, v. 76, n. 2-3, p. 223-227, 1981.
- MEYER, J. H. et al. Elevated monoamine oxidase A levels in the brain - An explanation for the monoamine imbalance of major depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 11, p. 1209-1216, 2006.
- MOVASSAGHIAN, S.; AFZALIFAR, R.; ALAEDDINI, M. Clinical anesthetic effectiveness of intraoral mucoadhesive tablets of amitriptyline in healthy volunteers. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 1, p. 23-28, Jan 2013.
- NAUMENKO, V. S.; KONDAUROVA, E. M.; POPOVA, N. K. On the role of brain 5-HT₇ receptor in the mechanism of hypothermia: Comparison with hypothermia mediated via 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptor. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 1360-1365, 2011.
- NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.
- NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161-1169, 2010.
- NEVES, G. New insights into pharmacological profile of LASSBio-579, a multi-target N-phenylpiperazine derivative active on animal models of schizophrenia. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 86-95, 2013.
- NOWACK, R. Cytochrome P450 enzyme, and transport protein mediated herb-drug interactions in renal transplant patients: grapefruit juice, St John's Wort - and beyond! **Nephrology**, v. 13, p. 337-347, 2008.
- OBERLANDER, T. F.; MILLER, A. R. Antidepressant use in children and adolescents: practice touch points to guide paediatricians. **Paediatrics & Child Health**, v. 16, n. 9, p. 549-553, 2011.
- OKAMOTO, N.; SAKAMOTO, K.; YAMADA, M. Transient serotonin syndrome by concurrent use of electroconvulsive therapy and selective serotonin reuptake inhibitor. **Case reports in psychiatry**, p. 1-3, 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Depression**, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/index.html> . Acesso em: 08 maio 2013.
- PACHALY, J. R. Terapêutica por extrapolação alométrica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (org). **Tratado de animais selvagens – medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006, p. 1215-1223.

PARIKH, S. et al. A fluorescent-based, high-throughput assay for detecting inhibitors of human monoamine oxidase A and B. **Bioscience Discovery Labware**, S02T081R2, 2002. Disponível em: http://www.bdj.co.jp/gentest/articles/hkdqj2000001c9n2-att/Poster9-1_MAO_Fluor_Assay.pdf. Acesso em: 10/05/2013.

PARO, A. H. et al. Exposição repetida à cafeína aumenta a atividade locomotora induzida pelo femproporex em ratos adolescentes e adultos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 417-424, 2008.

PASSOS, C. S. et al. Indole alkaloids of *Psychotria* as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors. **Phytochemistry**, v. 86, p. 8–20, 2013.

PAUL, I. A. et al. Regionally specific neural adaptation of beta adrenergic and 5-hydroxytryptamine₂ receptors after antidepressant administration in the forced swim test and after chronic antidepressant drug treatment. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 246, p. 956-962, 1988.

PIERCE, P. A.; PEROUTKA, S. J. Hallucinogenic drug-interactions with neurotransmitter receptor-binding sites in human cortex. **Psychopharmacology**, v. 97, n. 1, 1989.

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

PIRES, J. M. **Interações agudas do chá de ayahuasca com agentes usados em anestesia (propofol e morfina), observadas em modelos animais**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

PLENIS, A. et al. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of moclobemide and its two metabolites in human plasma and application to pharmacokinetic studies. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 9, p. 958-966, 2007.

POLESZAK, E. et al. Enhancement of antidepressant-like activity by joint administration of imipramine and magnesium in the forced swim test: Behavioral and pharmacokinetic studies in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 81, p. 524-529, 2005.

PORSOLT, R. D.; LENÈGRE, A.; MCARTHUR, R. A. Pharmacological models of depression. In: OLIVIER, B.; MOS, J.; SLANGEN J. L. **Animals models in Psychopharmacology**. Birkhäuser Verlag Basel, 1991, p. 137-159.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioral despair in rats - new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

PRICA, C.; HASCOET, M.; BOURIN, M. Is co-administration of bupropion with SSRIs and SNRIs in forced swimming test in mice, predictive of efficacy in resistant depression? **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 1, p. 92-99, 2008.

PUECH, A. J.; FRANCES, H.; SIMON, P. Imipramine antagonism of apomorphine-induced hypothermia - non-dopaminergic interaction. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 125-127, 1978.

RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. An update on the ability of St. John's wort to affect the metabolism of other drugs. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 691-708, 2012.

RAINER, Q. et al. Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration. **Molecular Pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 106-112, 2012.

RAKIC, A. et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of moclobemide and its two major metabolites in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1416-1422, 2007.

RANG, H. P. Fármacos antidepressivos. In: _____. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap. 39, p. 557-574.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 659-661, 2007.

REDROBE, J. P. et al. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 1-8, 1998.

REED, A. L. et al. Juvenile rats in the forced-swim test model the human response to antidepressant treatment for pediatric depression. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 3, p. 433-441, 2008.

REÚS, G. Z. Administration of cannabidiol and imipramine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases brain-derived neurotrophic factor levels in the rat amygdala. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 23, p. 241-248, 2011a.

REÚS, G. Z. et al. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 166-171, 2011b.

RIBA, J. et al. Topographic pharmaco-EEG mapping of the effects of the South American psychoactive beverage ayahuasca in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 53, n. 6, 2002.

RIBA, J. et al. Increased frontal and paralimbic activation following ayahuasca, the pan-amazonian inebriant. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 1, 2006.

RIBA, J. et al. Human pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, 2003.

RICHELSON, E. Pharmacology of antidepressants. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 76, n. 5, p. 511-527, 2001.

ROBY, C. A. et al. St John's Wort: effect on CYP3A4 activity. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 67, p. 451-457, 2000.

ROGÓZ, Z.; SKUZA, G. Mechanism of synergistic action following co-treatment with pramipexole and fluoxetine or sertraline in the forced swimming test in rats. **Pharmacological Reports**, v. 58, n. 4, p. 493-500, 2006.

SAMOYLENKO, V. et al. 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**, v. 127, p. 357-367, 2010.

SANT'ANNA, G. S. **Efeito de compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1imidazóis sobre a atividade da enzima monoamina oxidase in vitro**. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

SASAKI-ADAMS, D. M.; KELLEY, A. E. Serotonin-Dopamine Interactions in the Control of Conditioned Reinforcement and Motor Behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 440-452, 2001.

SCHWARZ, M. J. et al. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 627-633, 2003.

SEGAWA, M. et al. Electroconvulsive seizure, but not imipramine, rapidly up-regulates pro-BDNF and t-PA, leading to mature BDNF production, in the rat hippocampus. **The International Journal of neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 339-350, 2013.

SMITH, R. L. et al. Agonist properties of N,N-Dimethyltryptamine at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 61, n. 3, 1998.

SOTO-OTERO, R. et al. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals - Potential implications in relation to oxidative stress. **Life Sciences**, v. 69, n. 8, p. 879-889, 2001.

STAHL, S.M. et al. Serotonergic drugs for depression and beyond. **Current drug targets**, v. 14, n. 5, p. 578-585, 2013.

STARKE, K. Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on α 2-adrenoceptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 4, p. 685-693, 2001.

STRASSMAN, R. J.; QUALLS, C. R. Dose-response study of n,n-dimethyltryptamine in humans .1. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, n. 2, p. 85-97, 1994.

THANACOODY, H. K.; THOMAS, S.H. Tricyclic antidepressant poisoning : cardiovascular toxicity. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 3, p. 205-214, 2005.

TORREGROSSA, M. M. et al. Chronic administration of the delta opioid receptor agonist (+)BW373U86 and antidepressants on behavior in the forced swim test and BDNF mRNA expression in rats. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 1, p. 31-40, 2005.

TUPPER, K. W. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? **International Journal of Drug Policy**, v. 19, p. 297-303, 2008.

VILLARINHO, J. G. et al. Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 39, p. 31-39, 2012.

WANG, Y. H. et al. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 662-671, 2010.

WEINSTOCK, M. et al. Effect of TV3326, a novel monoamine-oxidase cholinesterase inhibitor, in rat models of anxiety and depression. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 3, 2002.

WEISS, J. M.; KILTS, C. D. Animal models of depression and schizophrenia. In: SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. (ed.). **The American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology**, 2. ed. Washington: American Psychiatric Press, Inc., 1998. p. 90-131.

WESOLOWSKA, A.; NIKIFORUK, A. The selective 5-HT₆ receptor antagonist SB-399885 enhances anti-immobility action of antidepressants in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 582, p. 88-93, 2008.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p. 1-16, 1984.

WIMBISCUS, M.; KOSTENKO, O.; MALONE, D. MAO inhibitors: risks, benefits, and lore. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 77, n. 12, p. 859-882, 2010.

WINKELMAN, M. Drug tourism or spiritual healing? Ayahuasca seekers in Amazonia. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, n. 2, p. 209-218, 2005.

YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006.

YU, A. M. et al. Contribution of individual cytochrome P450 O-demethylation of the psychotropic beta-carboline alkaloids harmaline and harmine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 315-322, 2003.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZARRINDAST, M. R.; TABATABAI, S. A. Involvement of dopamine receptor subtypes in mouse thermoregulation. **Psychopharmacology**, v. 107, n. 2-3, 1992.

ANEXO A - Folha de aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal

Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA
Rua Catequese, 242 – 10º andar – CEP. 09090-400 – Santo André, SP
Tel: (11) 4437-8497
E-mail: ceua@ufabc.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **011/2011** na fl. **07** do livro **01** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fúlvio Rieli Mendes, Coordenador da linha de pesquisa: **Interação do chá de ayahuasca com antidepressivos: estudos bioquímico e comportamental**, do qual participa o pesquisador: **William Carvalho do Amaral**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA) no dia **21.06.2011**, com validade de 3 anos.

Santo André-SP, 22 de junho de 2011.

Prof. Dr. Marcelo Augusto Christoffolete
Coordenador Pró-Tempore
CEUA - UFABC