



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

**TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO CHÁ AYAHUASCA (*BANISTERIOPSIS*  
*CAAPI* E *PSYCHOTRIA VIRIDIS*), POR ANÁLISE HISTOLÓGICA EM RATAS  
*WISTAR*.**

**JULIANA ALVES DE MORAIS**

**Brasília-DF**  
**2014**

**JULIANA ALVES DE MORAIS**

**TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO CHÁ AYAHUASCA (*BANISTERIOPSIS*  
*CAAPI* E *PSYCHOTRIA VIRIDIS*), POR ANÁLISE HISTOLÓGICA EM RATAS  
*WISTAR*.**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Pic-Taylor**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloisa Dutra Caldas**

**Brasília-DF**

**2014**

**JULIANA ALVES DE MORAIS**

**TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO CHÁ AYAHUASCA (*BANISTERIOPSIS*  
*CAAPI* E *PSYCHOTRIA VIRIDIS*), POR ANÁLISE HISTOLÓGICA EM RATAS  
*WISTAR*.**

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

**BANCA EXAMINADORA**

**Presidente: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Pic-Taylor**

**Membros: Prof<sup>a</sup> Dr Rivadavio Amorin**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Mara de Oliveira**

**Prof<sup>a</sup> Dr Mauricio M. Homem (Suplente)**

**Universidade de Brasília**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, por me dar persistência e determinação, por mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Meu muitíssimo obrigado as minhas orientadoras, Aline Pic-Taylor e Eloisa Dutra Caldas, amigas e mães por acreditarem em mim, aceitar-me como orientanda, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de mulheres as quais sempre farão parte da minha vida.

Ainda no âmbito acadêmico, devo agradecer aos professores: José Eduardo Baroneza, pelo acolhimento e oportunidade oferecida, tem um carinho enorme por ti, você sem dúvidas é uma das pessoas mais competentes que tive a oportunidade de conhecer; a Leonora, seu carinho, atenção e experiência me fez subir vários degraus; ao Rivadávio Amorim, obrigada pela confiança em fazer parte desse estudo, além de sua simpatia; a Vânia, pela pelos ensinamentos valiosos; ao Sacha Braun, pela ajuda no início da minha pesquisa; a Silene Lozzi, pela parte crucial do estudo; ao Osmino pelo auxílio da liofilização do nosso material; a Márcia pelas sugestões pertinentes durante a construção final desse trabalho; a Maria Lucília Santos, pela sintetização do nosso material; a Daniela Mara, pela confiança em fazer parte da banca do meu trabalho; ao Leandro Ambrósio, pela dedicação e paciência, seus ensinamentos foram cruciais.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. A Anátalia por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. A minha mãe biológica Cidália, sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho. A minha vovó D<sup>a</sup> Maria, que devo muito por ser quem sou.

As minhas irmãs Taty, Ciça, Joyce, Carol, Magda e meu irmão Kennedy, ausente no momento, mas que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos meus sobrinhos amores da minha vida: Gui, Gugu, Vitinho, Alice, Thata, Jeh, Alan e Izabelly... a titia ama vocês...

A Lu Gueiros, minha amiga e companheira, devo muito a você, que me fez crescer com sua sabedoria, agradeço muito a ti, e também por ter colocado no mundo uma princesinha: Isabela.

A Alana e Ana Albernaz, obrigada pela dedicação, e por ter tomado muito dos ensaios como se fossem seus, ajudando-me nos fins de semanas, dias, noites, feriados, Natal...



Não haveria como descrever a imensa ajuda que tive dos estagiários: Vivi, Clara, Laura, Laís, Leilane, Letícia Oliveira, Naywara, Tamara, Letícia Lira, Thales, André Wagner, Muriel, Ana Paula, Bianca, Marline, Roberto, Rodrigo, Bianca, Raquel e Marcus Túlio. Mesmo que alguns passaram pouco tempo, foi essencial a dedicação de todos, e os momentos de descontração (muitas gargalhadas).

Aos meus colegas de trabalho pelo carinho e momentos de distração no laboratório: D<sup>a</sup> Maria, Willian, José, Vânia, Janaína, Mary, Camila, Halina, Marcela.

Ao Emiraldo e sua equipe, por sempre cuidarem dos animais de estudo.

Ao meu namorado Diego, obrigada pela compreensão, carinho e amor, pelo seu apoio incondicional, amizade e paciência demonstrados nessa etapa de nossas vidas.

Ao Fredherico, o amor incondicional e mais puro. Amo-te meu bebê!!!

A FAP - DF pelo apoio financeiro na pesquisa e ao DPP (REUNI) pela bolsa cedida.

A equipe da União do Vegetal (UDV), pelo colhimento em sua sede e pela doação do material da pesquisa.

Por fim, agradeço a Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde que lutam por uma educação digna e ensino de qualidades, e não posso esquecer-me da secretária super simpática e gentil: Edygrace, muito obrigada.

*Veni, vidi, vici*  
*(Vim, vi, venci)*

## SUMARIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVII</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 – REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1 – Ayahuasca	2
2.2 – Os componentes da ayahuasca	5
2.2.1 Banisteriopsis caapi (Malpighiaceae): o mariri	5
2.2.2 <i>Psycotria viridis</i> (Rubiaceae): a chacrona	7
2.3 – Mecanismos de ação da ayahuasca	7
2.4 – Efeitos biológicos	9
2.5 - Potencial terapêutico	9
2.6 – Potencial toxicológico	10
2.7 - Estudos da toxicidade por análise histológica	12
2.8 - Estudos de neurotoxicidade	14
2.8.1 - Núcleos da Rafe (Nr)	16
2.8.2 - Complexo amigdalóide (Ca)	16
2.8.3 - Formação hipocampal (FH)	17
<b>3 – OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
3.1 - Objetivo Geral	19
3.2- Objetivos Específicos	19
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1 - Material biológico e preparo do chá ayahuasca	20
4.2 – Caracterização química	21
4.3 – Animais	21
4.4- Estabelecimento das doses	22
4.5 - Toxicidade aguda	22
4.5.1 – Processamento histológico	24
4.5.2 – Análise histológica qualitativa	24
4.6 – Toxicidade crônica durante a gestação	25

4.6.1 - Toxicidade materna_____	26
4.6.1.1 – Eutanasia e laparotomia_____	27
4.6.1.2 – Coleta do cérebro_____	27
4.6.1.3 - Avaliação de perda neuronal_____	27
4.7 - Análise estatística_____	32
<b>5 - RESULTADOS _____</b>	<b>33</b>
5.1 - Toxicidade aguda_____	33
5.1.1 - Peso dos órgãos_____	33
5.1.2 - Avaliação macroscópica dos órgãos_____	34
5.1.3 – Análise histológica do baço, fígado e rins_____	35
5.2 – Toxicidade Crônica_____	39
5.2.1 - Avaliação do consumo de ração e do ganho de peso corpóreo_____	40
5.2.2 - Peso dos órgãos _____	43
5.2.3- Análise macroscópica dos órgãos_____	43
5.2.4 - Análise histológica do baço, fígado e rins pela microscopia óptica__	46
5.2.4.1 - Análise histológica do Baço_____	47
5.2.4.2 – Análise histológica do Fígado_____	50
5.2.4.3 – Análise histológica dos Rins_____	53
5.2.5 - Análise histológica do cérebro pela microscopia óptica_____	56
5.2.5.1- Contagem de neurônios viáveis pela coloração de Nissl_____	56
5.2.5.2 - Densidade neuronal na região de CA1_____	56
5.2.5.3 - Densidade neuronal na região de CA2_____	59
5.2.5.4 - Densidade neuronal na região de CA3_____	61
5.2.5.5 - Densidade neuronal na região do GD_____	62
5.2.5.6 - Densidade neuronal na região do Complexo Amígdaloide (Ca)____	64
5.2.5.7 - Densidade neuronal na região dos núcleos da Rafe (nR)_____	65
<b>6 - DISCUSSÃO _____</b>	<b>68</b>
6.1. Toxicidade aguda do chá da ayahuasca em ratas <i>Wistar</i> _____	68
6.2. Toxicidade crônica do chá da ayahuasca em ratas <i>Wistar</i> prenhas_____	69
<b>7 - CONCLUSÃO _____</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS _____</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS _____</b>	<b>87</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>5-HT</b>	5 hidroxitriptamina (Serotonina)
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Ca</b>	Complexo amigdalóide
<b>CA1</b>	Corno de Amon 1
<b>CA2</b>	Corno de Amon 2
<b>CA3</b>	Corno de Amon 3
<b>CEFLURIS</b>	Centro Eclético de Fluente Luz Universal Raimundo Irineu Serra
<b>CICLU</b>	Centro de Iluminação Cristã Luz Universal
<b>CONAD</b>	Conselho Nacional Antidrogas
<i>et al.</i>	e colaboradores
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FH</b>	Formação Hipocámpal
<b>FS</b>	Faculdade de Saúde
<b>GD</b>	Giro Denteado
<b>h</b>	Horas
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HRL</b>	Harmalina
<b>HRM</b>	Harmalina
<b>IB</b>	Instituto de Biologia

<b>KG</b>	Quilograma (s)
<b>mg</b>	Miligrama (s)
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>N</b>	Número de indivíduos na amostra
<b>nR</b>	Núcleos da Rafe
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P</b>	Probabilidade, nível de significância alcançado
<b>SN</b>	Sistema Nervoso
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SPSS</b>	Statistical package for the Social Science
<b>SSRI</b>	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
<b>TGI</b>	Trato Gastrointestinal
<b>THH</b>	Tetrahydroharmalina
<b>UDV</b>	União do Vegetal
<b>UNB</b>	Universidade de Brasília
<b>x</b>	Vezes

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae): o mariri	5
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular dos principais alcalóides presentes no chá de ayahuasca e do neurotransmissor serotonina. Presentes no cipó ( <i>Banisteriopsis caapi</i> ) estão: as $\beta$ -carbolinas harmina, harmalina e tetrahydroharmina, enquanto o dimetiltriptamina (DMT) está contido nas folhas da chacrona ( <i>Psychotria viridis</i> ).	6
<b>Figura 3:</b> <i>Psychotria viridis</i> (Rubiaceae): a chacrona.	7
<b>Figura 4:</b> Preparo do chá de Ayahuasca pelo Núcleo Luz do Oriente, União do Vegetal (UDV).	20
<b>Figura 5:</b> Procedimento de gavagem com administração do chá de ayahuasca em ratas <i>Wistar</i> .	22
<b>Figura 6:</b> Delineamento experimental de ensaio toxicológico agudo com o chá de ayahuasca em ratas <i>Wistar</i> .	23
<b>Figura 7:</b> Delineamento experimental de ensaio toxicológico materno, reprodutivo e fetal com o chá de ayahuasca em ratas <i>Wistar</i> prenhas.	26
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do encéfalo demonstrando suas sub-regiões. <b>A:</b> hipocampo direito e esquerdo; <b>B:</b> núcleos da Rafe e <b>C:</b> complexo amigdalóide direito e esquerdo.	28
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática do hipocampo ( <b>A</b> ) e suas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e GD ( <b>B</b> ), onde foi realizada a quantificação neuronal pela técnica de Nissl, aumento de 40x.	30
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do complexo amigdalóide ( <b>A</b> ) onde foi realizada a quantificação neuronal ( <b>B</b> ) pela técnica de Nissl em $1.000 \mu\text{m}^2$ . Os neurônios em contato com a área de delimitação foram incluídos na contagem. Aumento de 200x.	31
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática da região dos núcleos da Rafe ( <b>A</b> ) onde foi realizada a quantificação neuronal ( <b>B</b> ) pela técnica de Nissl em $1.000 \mu\text{m}^2$ . Os neurônios em contato com a área de delimitação foram incluídos na contagem, aumento de 100x.	32
<b>Figura 12:</b> Peso dos órgãos de ratas <i>Wistar</i> tratadas com 30 e 50X a dose usual.	33
<b>Figura 13:</b> Peso do estômago dos animais controle e tratados com a ayahuasca nas doses 30X e 50X a dose usual.	34
<b>Figura 14:</b> Diferença morfológica (tamanho e aspecto) do estômago dos animais do	34

estudo. **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 30X e **C:** ayahuasca 50X.

**Figura 15:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de baço de ratas pertencentes aos três grupos de estudo. **A a C** - grupo controle ; **D a F** - ayahuasca 30X; **G a I** - ayahuasca 50X. Polpa branca/nódulo linfático bem delimitado (seta) e polpa vermelha bem evidente (cabeça de seta). Aumentos 40x, 80x e 400x, respectivamente. Coloração HE. **36**

**Figura 16:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do fígado de ratas pertencentes aos três grupos de estudo. **A e B:** grupo controle, **C e D:** ayahuasca 30X, **E e F:** ayahuasca 50X. Aumento de 200x e 400x respectivamente. Coloração HE. **37**

**Figura 17:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos da região medular e dos glomérulos renais dos rins de ratas pertencentes aos três grupos de estudo. **A e B:** grupo controle, **C e D:** ayahuasca 30X, **E e F:** ayahuasca 50X. Aumento de 100x e 400X, respectivamente. Coloração HE. **38**

**Figura 18:** Sinais clínicos observados em ratas *Wistar* durante o tratamento com o chá de Ayahuasca nas doses 4X e 8X. **A:** Cromodaciorréia (setas), **B:** cianose (setas), **C:** lordose e piloereção (seta) em uma rata no momento da convulsão. **39**

**Figura 19:** Média do tempo de vida em horas das fêmeas dos grupos ayahuasca 4X e 8X que foram a óbito. **40**

**Figura 20:** Consumo de ração em gramas dos grupos experimentais. Os valores estão expressos em média e erro padrão. **41**

**Figura 21:** Média do consumo total de ração em gramas dos grupos experimentais. **41**

**Figura 22:** Ganho de peso corpóreo em gramas dos grupos experimentais. **42**

**Figura 23:** Alterações macroscópicas no estômago de ratas *Wistar* tratadas com ayahuasca. **A:** grupo controle; **B:** ayahuasca 1X; **C:** ayahuasca 2X; **D:** ayahuasca 4X e **E:** ayahuasca 8X. **45**

**Figura 24:** Alterações macroscópicas no baço de ratas *Wistar* tratadas com ayahuasca. **A:** baço de um animal do grupo controle, **B:** baço de um animal do grupo ayahuasca 8X, notar formas irregulares (setas). **45**

**Figura 25:** Alterações macroscópicas no fígado de ratas *Wistar*. **A:** fígado de um animal do grupo controle. **B:** fígado de um animal do grupo ayahuasca 4X. **C e D:** fígado de animais do grupo ayahuasca 8X. Notar a formação de necrose enzimática gordurosa (setas). **46**



- Figura 26:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de baços de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo. **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 1X, **C:** ayahuasca 2X, **D:** ayahuasca 4X e **E:** ayahuasca 8X. Notar cápsula (seta fina), polpa branca bem delimitada (cabeça de seta) e polpa vermelha bem evidente (seta). Aumento de 100x. Coloração HE. **47**
- Figura 27:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de baços de ratas pertencentes aos grupos **A:** grupo controle, a polpa branca aparece bem delimitada (círculo), aumento de 100x **B:** Região mostrada em **A** com aumento de 200x. **C:** ayahuasca 4X, congestão (cabeça de seta), hemorragia (seta) e nódulo linfático em processo necrótico (círculo), aumento de 100x. **D:** ayahuasca 8x, necrose na polpa branca, aumento de 200x. Coloração HE. **49**
- Figura 28:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de fígado de ratas pertencentes aos diferentes grupos de estudo. **A:** grupo controle, células de Kupffer (setas), **B e C:** focos de esteatose/degeneração gordurosa (cabeça de setas) nos grupos ayahuasca 4X e 8X, respectivamente; **D:** infiltrado inflamatório (círculo) em um animal do grupo ayahuasca 8X; **E:** corpúsculo hialino/degeneração hialina de Mallory (seta) presente em um animal do grupo ayahuasca 8X; **F:** necrose hepática em um animal do grupo ayahuasca 8X. Aumento de 400x. Coloração HE. **52**
- Figura 29:** Aspecto geral do rim mostrando a região cortical (setas) e medular (cabeça de seta). Coloração HE. **53**
- Figura 30:** Fotomicrografia de cortes histológicos de rins de glomérulos de ratas pertencentes a vários grupos de tratamento. **A:** glomérulo de um animal representativo do grupo controle; **B:** degeneração hidrópica; **C:** infiltrado inflamatório; **D:** esteatose/degeneração gordurosa; **E:** degeneração hialina/cilindro hialino; **F:** glomérulo necrótico. As figuras **B** a **F** pertencem a animais do grupo ayahuasca 8X. Aumento de 400x. Coloração HE. **55**
- Figura 31:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área de CA1 de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %). **57**
- Figura 32:** Fotomicrografia da região de CA1 (setas) de animais representativo dos vários grupos de estudo. **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 1X, **C:** ayahuasca 2X, **D:** ayahuasca 4X e **E:** ayahuasca 8X. Aumento de 40x. Coloração de Nissl. **58**

- Figura 33:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área de CA2 de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %). **60**
- Figura 34:** Fotomicrografia da divisão das regiões CA1 e CA2. **A:** grupo controle e **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 100x. Coloração de Nissl. **60**
- Figura 35:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área de CA3 de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75%). **61**
- Figura 36:** Fotomicrografia do final da área de CA3. **A:** grupo controle e **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 40x. Coloração de Nissl. **62**
- Figura 37:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área do giro denteado (GD) de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %). **63**
- Figura 38:** Fotomicrografia da região do giro denteado (GD). **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 100x. Coloração de Nissl. **63**
- Figura 39:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área do complexo amigdalóide (Ca) de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %). **64**
- Figura 40:** Fotomicrografia da região do complexo amigdalóide (Ca). **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 200x. Coloração de Nissl. **65**
- Figura 41:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área dos núcleos da Rafe (nR) de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %). **66**
- Figura 42:** Fotomicrografia da região dos núcleos da Rafe (retângulo). **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 1X e **C:** ayahuasca 8X. Aumento de 100x. Coloração de Nissl. **67**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Escores utilizados na avaliação do grau de lesão neuronal.	<b>29</b>
<b>Tabela 2:</b> Peso dos órgãos de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com chá de ayahuasca durante ao período gestacional (6° ao 20° dia).	<b>43</b>
<b>Tabela 3:</b> Alteração macroscópica dos órgãos de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com chá de ayahuasca durante ao período gestacional (6° ao 20° dia).	<b>44</b>
<b>Tabela 4:</b> Alterações histológicas encontradas no baço de ratas do grupo controle e dos vários grupos de tratamento com o chá de ayahuasca em suas respectivas doses.	<b>48</b>
<b>Tabela 5:</b> Alterações histológicas encontradas no fígado de ratas do grupo controle e dos vários grupos de tratamento com o chá de ayahuasca em suas respectivas doses.	<b>50</b>
<b>Tabela 6:</b> Alterações histológicas encontradas nos rins (direito e esquerdo) de ratas do grupo controle e dos vários grupos de tratamento com o chá de ayahuasca em suas respectivas doses.	<b>54</b>
<b>Tabela 7:</b> Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de CA1 dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca.	<b>56</b>
<b>Tabela 8:</b> Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de CA2 dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca.	<b>59</b>
<b>Tabela 9:</b> Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de CA3 dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca.	<b>61</b>
<b>Tabela 10:</b> Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área do giro denteado (GD) dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca.	<b>62</b>
<b>Tabela 11:</b> Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área do complexo amigdalóide (Ca) dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca.	<b>64</b>
<b>Tabela 12:</b> Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área dos núcleos da Rafe (nR) dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca.	<b>66</b>

## RESUMO

Ayahuasca é uma bebida psicoativa feita da mistura das plantas *Banisteriopsis caapi*, rica em  $\beta$ -carbolinas e *Psychotria viridis*, que contém o alcalóide indólico, o N,N-dimetiltriptamina (DMT), estruturalmente semelhante à serotonina. É tradicionalmente utilizado por populações indígenas da Amazônia, e desde a década de 30 em rituais de religiões ayahuasqueiras no Brasil (Santo Daime, Barquinha, UDV), onde o uso ritualístico é legalizado. Nas últimas décadas, o crescimento do uso não ritualístico da infusão, levou a uma série de acidentes de intoxicação com a ayahuasca. Este estudo avaliou a toxicidade do chá a partir da avaliação histológica visceral (baço, fígado e rins) e do encéfalo de ratas *Wistar* por via oral em dose única e repetida. A avaliação histológica do baço, fígado e rins foi estudada em ratas *Wistar* após exposição única de 30X e 50X a dose ritualística da UDV (6 animais/dose; protocolo OECD 423/2001) e após exposição diária durante o 6<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dia de gestação nas doses 1X, 2X, 4X e 8X (25 animais/dose; protocolo OECD 414/2001). Adicionalmente, a neurotoxicidade do chá em ratas prenhes tratadas foi avaliada utilizando a coloração de Nissl, que serve como indicador da viabilidade neuronal. A dose letal aguda (DL<sub>50</sub>) de ayahuasca em ratas *Wistar* foi superior a 50X a dose ritual. Vinte e quatro fêmeas prenhas dos grupos 4X e 8X foram a óbito durante o estudo, após sinais clínicos de toxicidade como tremores, cromodaciorréia, piloereção, lordose, cianose e convulsão. Alterações macroscópicas significativas foram encontradas no estômago e intestino dos animais de todos os grupos do estudo (dose única ou repetida). Os resultados na análise histológica no tratamento agudo não evidenciaram alterações significativas comparadas ao grupo controle. A análise histológica no tratamento crônico evidenciou algumas alterações estatisticamente significativas nos rins (p=0,008) de animais tratados nas maiores doses. Foi observado perda neuronal estatisticamente significativa nas áreas de CA1, CA2, CA3 e núcleos da Rafe do cérebro de animais tratados nas doses maiores doses, numa relação dose dependente. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o chá ayahuasca tem baixa toxicidade aguda em ratas fêmeas e que a dose ritualística, mesmo consumida em doses diárias é segura. Porém, fica claro que o uso crônico em doses iguais ou superiores a 4X a dose ritual pode levar a danos no sistema renal e ao SNC, indicando que o uso recreacional do chá pode representar um risco para a saúde humana.

**Palavras-Chave:** Ayahuasca, toxicidade, neurotoxicidade, histologia.

## ABSTRACT

Ayahuasca is a psychoactive concoction of two plants: *Banisteriopsis Caapi*, rich in  $\beta$ -carbolines; and *Psycotria viridis*, containing an indole alkaloid- N, N-dimethyltryptamine (DMT), which is structurally similar to serotonin. It is traditionally used by indigenous Amazonian populations, and since the 1930s, in the rituals of ayahuasca religious in Brazil (Santo Daime, Barquinha, UDV) where ritualistic use is considered legal. Over the last decade, the non-ritualistic use of ayahuasca has led to a series poisoning incidents. This study evaluated the toxicity of the ayahuasca by visceral and brain histology of Wistar female rats treated orally with single and repeated doses. Spleen, liver and kidney histological samples were analyzed following acute treatment at 30X and 50X the UDV ritual dose (6 animals/dose; OECD 423/2001 protocol), and chronic treatment from the 6<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> gestational days at doses of 1X, 2X, 4X and 8X (25 animals/dose; OECD 414/2001 protocol). Additionally, the neurotoxicity of pregnant ayahuasca treated rats was evaluated by Nissl staining, an indicator of neuronal viability. The ayahuasca lethal dose (DL<sub>50</sub>) was estimated to be over 50X the ritual dose. Twenty four pregnant rats from the 4X and 8X groups died during the experiment after showing clinical signs of toxicity, including tremors, piloerection, hind limb abduction, cyanoses and convulsion. Significant macroscopic changes were observed in the stomach and intestine of the surviving animals from all study groups, after single or repeated dosing. Histological analysis of acute treatment showed no significant changes compared to the control group. However, histological analysis following chronic treatment showed statistically significant changes in the kidneys of animals treated at the two highest doses. Neuronal quantification also revealed statistically significant loss in CA1, CA2, CA3 and raphe nuclei areas, compared to the control group, mainly in the highest doses, with a direct correlation between neural loss and dose. Our results indicate that the ayahuasca has a low acute toxicity to female rats, and that daily exposure at the ritualistic dose is safe. However, it is clear that chronic use at doses equal or higher than 4X the ritual dose can harm the kidneys and lead to CNS damage, an indication that the recreacional use of ayahuasca may represent a health risk to humans.

**Key-words:** Ayahuasca, toxicity, neurotoxicity, histology.

## 1- INTRODUÇÃO

A ayahuasca é uma infusão feita pela cocção de duas plantas consideradas sagradas para tribos indígenas da Amazônia Andina (NARANJO, 1986). Na cultura indígena, o chá tomado pelos xamãs é instrumento de purificação, cura e conexão com o cosmo. As religiões ayahuasqueiras surgiram a partir da década de 30 no Brasil (GOULART, 2004), e misturam cristianismo, elementos afro-religiosos e espiritismo, além de ter como pilar central o consumo do chá, ferramenta essencial para conexão com o Divino, a espiritualidade e conhecimento interior. O consumo ritualístico da ayahuasca é legal no Brasil e outros países, inclusive por crianças e mulheres grávidas (Resolução 05/04 CONAD). O uso terapêutico do chá tem sido investigado por vários autores, inclusive para tratamento de dependentes químicos e parkinsonianos (SCHWARZ *et al.*, 2003; SAMOYLENKO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010). Atualmente, a expansão do consumo da bebida levou ao seu uso não ritualístico, recreativo e muitas vezes abusivo. As mídias brasileira e estrangeira relataram nas últimas décadas acidentes de intoxicação onde a associação de mortes com a ayahuasca suscitou questionamentos da população em geral com relação à segurança do uso desta infusão. Neste contexto, a determinação do potencial toxicológico do chá é essencial para investigar os riscos reais quando o mesmo é usado no contexto não religioso e avaliar as doses seguras para a realização de estudos clínicos em humanos para avaliar seu potencial terapêutico.

Este estudo se insere num projeto mais amplo, cujo objetivo é determinar em ratas *Wistar* a toxicidade aguda do chá e sua toxicidade reprodutiva feminina após exposição durante a gestação (PIC-TAYLOR *et al.*, 2014; Anexo 2) (MOTTA, 2013). Neste contexto, este estudo avalia a toxicidade do chá a partir da avaliação histológica visceral e do encéfalo de animais tratados, visando investigar os efeitos desta infusão em sistemas biológicos.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Ayahuasca

Ayahuasca é uma infusão vegetal psicoativa utilizada desde tempos pré-históricos por diversas tribos indígenas da região amazônica, incluindo os Kaxinawá, Yaminawá, Sharanawa, Asshaninka, Airo-pai e Baranara (NARANJO, 1986; LUNA, 1986; COSTA *et al.*, 2005). A bebida é utilizada como uma ferramenta para diagnóstico e cura no contexto cerimonial, onde o curador (xamã) promove a conexão com espíritos (TUPPER, 2008). Durante o ritual, o xamã procura atingir um estado ampliado de consciência, e alega ser possível uma comunhão e integração intensa com o Cosmos, com a Natureza e com o Criador.

O termo ayahuasca é de origem *quéchua*, língua indígena dos Andes Peruanos, falada pelos Incas (**aya** – pessoa, alma, espírito morto; **waska** – corda, cipó, liana), e pode ser traduzido por “trepadeira das almas” ou “corda dos mortos” (LUNA, 1986). Esta denominação refere-se não somente à mistura, mas também as diversas espécies de cipó utilizadas no feitiço dessa infusão, assim como à “força espiritual” presente na bebida (SANTOS *et al.*, 2006). A infusão também é conhecida por outros nomes, como daime, caapi, yajé, natema, vegetal e hoasca (LABATE & ARAÚJO, 2004).

Tradicionalmente, a ayahuasca é preparada a partir do cipó *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), conhecido como mariri, nativo da Amazônia e dos Andes, e das folhas do arbusto *Psychotria viridis* (Rubiaceae), a chacrona (GROISMAN, 2000). Algumas tribos utilizam outras espécies do gênero *Psychotria*, como a *P. batiskawa*, *P. carthaginensis*, *P. leiocarpa*, *P. naikawa*, *P. pishikawa*, *P. psychotraefolia* e *P. retifolia* (OTT, 1994; MCKENNA *et al.*, 1998).

A partir do contato dos índios com a cultura ocidental nasceram diversas formas de uso da ayahuasca, muitas delas já consideradas tradicionais. Uma delas, comum nos outros países da Amazônia, como Peru, Colômbia e Equador, é o vegetalismo. Os vegetalistas são habitantes ribeirinhos que fazem uso da ayahuasca e outras plantas, onde “encontram” poder e conhecimento para efetuar a cura. Segundo Luna (2005), essa tradição nasceu do contato dos seringueiros vindos do Peru e de outros países com a população indígena e ribeirinha já intensamente influenciada pelas missões cristãs, tendo fortes influências indígenas, andinas e cristãs.

No Brasil, as religiões ayahuasqueiras surgiram no início do século XX, influenciadas pelo espiritismo, catolicismo popular, cultos e magias, e introduziram o chá em seus rituais e

sacramentos caracterizando uma nova maneira de utilização da substância (GOULART, 1996). Dentre as religiões ayahuasqueiras mais antigas cita-se o Santo Daime, a Barquinha e a União do Vegetal (GOULART, 2005).

A doutrina do Santo Daime, a mais antiga, iniciou-se entre as décadas de 1920 e 1930 por um “curador” de nome Raimundo Irineu Serra (Mestre Irineu), em Rio Branco, Acre (GOULART, 2004; PIRES *et al.*, 2010;). A palavra Daime, deriva do rogativo "Dai-me Amor", "Dai-me Firmeza". Hoje a doutrina segue duas vertentes: a do Centro de Iluminação Cristã Luz Universal (CICLU) dirigido pela viúva do mestre Irineu, Peregrina Gomes Serra, e a do Centro Eclético de Fluente Luz Universal Raimundo Irineu Serra (CEFLURIS), fundado por seu seguidor Sebastião Mota de Melo.

A Casa de Jesus - Fonte de Luz, ou Barquinha, foi fundada pelo ex-escravo Daniel Pereira de Matos (Frei Daniel), após ser introduzido ao Daime pelo Mestre Irineu. Seus seguidores mais antigos vêm da mesma região do Acre e do mesmo grupo social, e se consideram também parte da doutrina Daimista (MERCANTE, 2006). Assim como no Santo Daime, possui elementos do catolicismo popular, xamanismo indígena, afros brasileiros, e como diferencial, tem grande influência da umbanda (MERCANTE, 2003). É considerada a comunidade mais restrita e com maiores estudos relacionados à antropologia (LABATE *et al.*, 2004). É fiel às origens xamânicas, com atividades dirigidas à cura de doenças físicas e psicossociais, como o alcoolismo, com forte ênfase na remoção de espíritos malignos e combate a feitiçaria (MACRAE, 2004).

A União do Vegetal (UDV) foi fundada em 1961 pelo seringueiro José Gabriel da Costa, Mestre Gabriel. É uma instituição estruturada e hierarquizada, e com o maior número de associados dentre as três religiões ayahuasqueiras, além de ser a mais criteriosa na triagem de novos adeptos (GOULART, 2004; LABATE 2004; MACRAE, 2004; LABATE *et al.*, 2008). A UDV está estruturada em núcleos, num total de 205 atualmente, espalhados em todos os estados brasileiros, mas também nos Estados Unidos, Espanha, Suíça, Reino Unido, Austrália, Holanda e Portugal. A sede desta estrutura (Sede Geral) está localizada em Brasília, e o grupo possui hoje mais de 15.000 associados (site UDV).

Não há uma padronização dos rituais realizados pelas religiões ayahuasqueiras (ANDERSON *et al.*, 2012), mas em geral são realizados quinzenalmente no período noturno. Orações, cantorias e danças são comuns, e os líderes servem aos outros membros um copo com o chá (LUNA, 1986; SHANNON, 2002; LUNA, 2011). A duração do culto religioso é de aproximadamente 4 horas, onde se vivencia os efeitos psicoativos do chá, conhecido na UDV como borracheira. Um elemento importante do ritual em todas as comunidades é a peia, que se



expressa principalmente por vômitos e diarreias. A peia é considerada benéfica, como uma purificação física, moral e espiritual (SILVA, 2004).

A partir da década de 70, as religiões ayahuasqueiras passaram a ser frequentadas por “hippies” e curiosos a procura de cura e novas experiências (LABATE *et al.*, 2008). Várias comunidades ayahuasqueiras foram instituídas, amplificando a utilização do chá tanto no Brasil como no mundo (LUNA, 1986; SHANNON 2002; LABATE & ARAÚJO, 2002; TUPPER, 2008; LUNA, 2011). Apesar desta expansão, o fenômeno religioso institucionalizado é caracteristicamente brasileiro (SANTOS, 2011).

Em território brasileiro, a utilização de ayahuasca num contexto religioso é liberada desde a década de 80 pelo COFEN (Resolução nº 06/1986), cabendo às gestantes a responsabilidade pelo uso e pela preservação do desenvolvimento fetal. Crianças podem receber o chá desde que com autorização dos pais (Resolução 05/04 CONAD). Em 26 de janeiro de 2010, o governo brasileiro reafirmou a regulamentação do uso para fins religiosos, tendo nessa mesma resolução o veto à comercialização e propaganda, além de coibir seu uso em conjunto com outras drogas e em eventos de turismo (Resolução Nº 1 CONAD, de 25 de janeiro de 2010).

Porém, a expansão do uso da ayahuasca e seu efeito alucinógeno levaram a um aumento da procura para uso recreativo por pessoas que buscam experiências novas, aumentando assim a sua utilização em situações não ritualísticas. O turismo da ayahuasca atrai principalmente jovens, do mundo inteiro, que ávidos por novas experiências compram pacotes que os levam a adentrar a selva Amazônica onde são convidados a experimentar a bebida (MCKENNA, 2004).

A modalidade mais recente do uso não ritualístico da ayahuasca surgiu na última década, com o fenômeno de “turismo xamânico”, onde moradores de centros urbanos procuram “centros de terapias”, cuja principal atividade é o consumo da bebida para a cura de problemas que vão desde a depressão até a dependência química. Em sua grande maioria, os centros são dirigidos por psicólogos, terapeutas ou psiquiatras com formação acadêmica, que se unem a indígenas, ribeirinhos ou “mestres do cipó” (os xamãs), constituindo um sistema terapêutico contemporâneo que mistura livremente ciência, religiosidade e conhecimentos tradicionais amazônicos (COUTINHO, 2013). O Brasil e o Peru são os países que contam com o maior número desses centros, que chegam a mais de 50 atualmente. Existem também cerimônias por encomenda, onde os “new-age xamãs” realizam os rituais, mantendo ou não as características ritualísticas das cerimônias (COUTINHO, 2013).

Em 2008, foi entregue ao então ministro da Cultura Gilberto Gil documento solicitando o reconhecimento do uso da ayahuasca em rituais religiosos como Patrimônio Imaterial da Cultura

Brasileira. A justificativa expressa na petição é de que sua utilização ritual em doutrinas religiosas preenche os quesitos que a caracterizam como patrimônio imaterial, considerado como “práticas, representações, expressões, conhecimentos e técnicas que comunidades ou grupos reconhecem como parte integrante do seu patrimônio cultural”. O documento contou com a participação dos três troncos fundadores das doutrinas ayahuasqueiras tradicionais: CICLU Alto Santo, Barquinha e União do Vegetal (NEVES & SOUZA, 2010).

## 2.2 – Os componentes da ayahuasca

### 2.2.1 *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae): o mariri

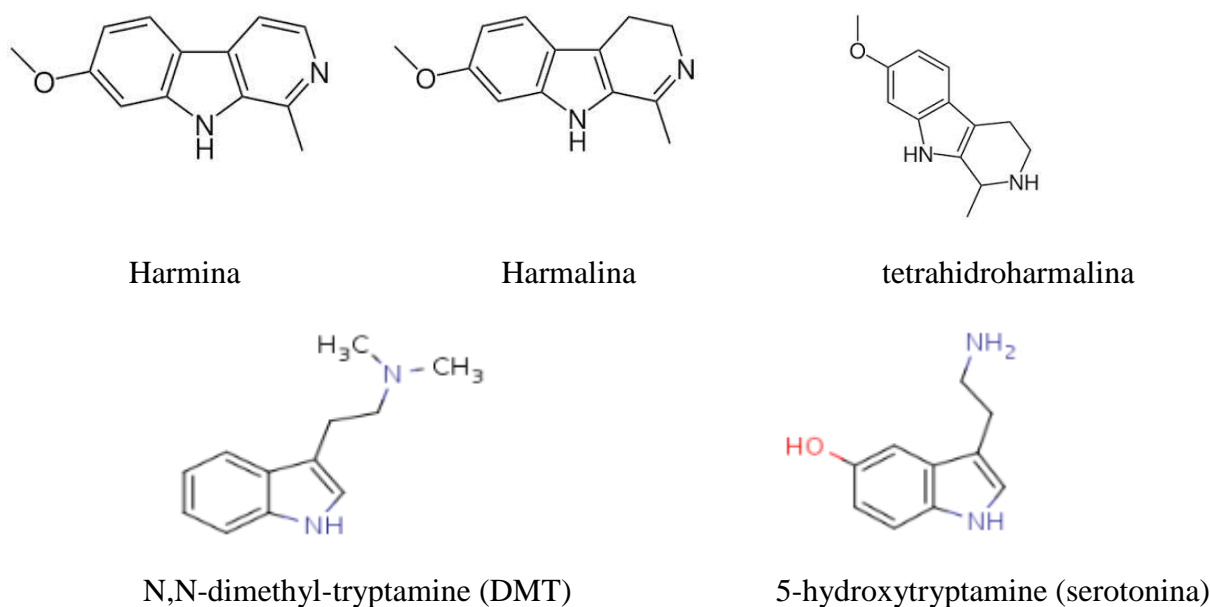
O cipó *Banisteriopsis caapi* (Figura 1) conhecido como mariri, é o principal ingrediente usado na preparação da ayahuasca. Pertence à família *Malpighiaceae*, é nativo da Amazônia e dos Andes, e está distribuído por quase toda a América do Sul.



**Figura 1:** *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), o mariri; Foto tirada no Núcleo Luz do Oriente (UDV) em Brazlândia-DF.

O mariri contém os alcalóides  $\beta$ -carbolinas harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetra-hidro-harmalina (THH) (Figura 2), inibidores de monoamina oxidase (MAO), enzima mitocondrial de suma importância metabólica (BALDESSARINI, 1996). A MAO funciona

como uma espécie de válvula de segurança responsável pela degradação de vários neurotransmissores, como noradrenalina, dopamina e serotonina (HARVEY & CHAMPE, 1998; MCKENNA *et al.*, 1998), podendo ocorrer em dois subtipos, a MAO-A e a MAO-B. A inibição da MAO-A é especificamente responsável pela elevação dos níveis da serotonina (GARERI, 1998). A concentração desses alcalóides no chá de ayahuasca varia de 0,05% a 1,95% de peso seco (MCKENNA *et al.*, 1984; MCKENNA, 2004).



**Figura 2:** Estrutura molecular dos principais alcalóides presentes no chá de ayahuasca e do neurotransmissor serotonina. Presentes no cipó (*Banisteriopsis caapi*) estão: as β-carbolinas harmina, harmalina e tetrahydroharmalina, enquanto o dimetiltryptamina (DMT) está contido nas folhas da chacrona (*Psychotria viridis*). Fonte: <http://adroga.casadia.org/news/usoritual.htm>

Além de inibir a MAO, a THH tem a capacidade de inibir a recaptação de serotonina (MORENO *et al.*, 1999; SANTOS, 2011). A ação conjunta destes mecanismos eleva os níveis de noradrenalina, serotonina e de dopamina na fenda sináptica (MCKENNA *et al.*, 1998; CALLAWAY *et al.*, 1999; CAZENAVE, 2000; LUNA, 2005). As quantidades de β-carbolinas presentes em uma dose usual de ayahuasca estão abaixo do limiar de sua atividade alucinógena (300 a 500 mg para HRL e THH e 100 mg para HRM), mas acima do limiar para atividade como inibidora da MAO (BRITO, 2004).

### 2.2.2 - *Psycotria viridis* (Rubiaceae): a chacrona.

Inicialmente descrita por Ruíz & Pavón (1798) o arbusto *Psycotria viridis* (Figura 3) da família *Rubiaceae* (possui cerca de 1.400 espécies), é conhecida como chacrona. Em sua composição existe um alcalóide indólico, o N,N-dimetiltriptamina (DMT), substância de estrutura molecular semelhante ao neurotransmissor serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT; Figura 2). O DMT apresenta ação agonista sobre os receptores de serotonina, principalmente do subtipo 5-HT<sub>2</sub>, e é um potente alucinógeno (GRELLA, *et al.*, 2003; SMITH, *et al.*, 1998). Sua concentração no chá de ayahuasca varia de 0,1 a 0,66% de peso seco (MCKENNA *et al.*, 1984; MCKENNA, 2004). No seu estado puro, o DMT é uma substância controlada e classificada nos termos da Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971 (UN, 1971).



**Figura 3:** *Psycotria viridis* (Rubiaceae): a chacrona; Fonte: [www.ayahuascaassociation.org](http://www.ayahuascaassociation.org)

### 2.3 – Mecanismos de ação da ayahuasca

A serotonina estimula uma ampla variedade de funções do sistema nervoso central (SNC) (MAYER, 1996), além de contribuir para a sua plasticidade (CHOPIN *et al.*, 1994). É produzida por descarboxilação e hidroxilação do aminoácido triptofano. Mais de 90% da 5-HT do organismo são encontradas nas células enterocromafins do trato gastrointestinal (TGI). Os neurônios serotoninérgicos do SNC localizam-se, predominantemente, nos núcleos medianos da

Rafe, desde o tronco cerebral até a medula, que sintetizam, armazenam e liberam a serotonina como neurotransmissor (KATZUNG, 1998).

Nos últimos 16 anos, sete famílias distintas de receptores de 5-HT foram identificadas (5-HT1 a 5-HT7), e pelo menos 15 subpopulações destes receptores já foram clonados. Por ser mediadora de ampla variedade de funções fisiológicas e interagir com múltiplos receptores, a serotonina desempenha papel importante em condições patológicas e psicopatológicas (GLENNON *et al.*, 2000). No SNC, a serotonina participa nos mecanismos de humor, sono, vigília, termorregulação, vômito, percepção da dor, regulação da pressão arterial, entre outros. Em nível periférico, está relacionada com o tônus muscular, vasodilatação, agregação placentária e inflamação. Pode estar envolvida, ainda, em condições patológicas, tais como depressão, ansiedade, pânico e enxaqueca (KATZUNG, 1998).

Por ser estruturalmente semelhante à serotonina (Figura 2), o DMT compete com a serotonina e se liga a receptores 5-HT1a, 5-HT1b, 5-HT2a e 5-HT2c no SNC (YRITIA *et al.*, 2002), levando ao efeito alucinógeno encontrado no chá. A intensidade e rapidez dos efeitos do DMT dependem da via de administração e da concentração. Por via pulmonar (fumado), o DMT é capaz de produzir efeitos alucinógenos imediatos (PIRES *et al.*, 2010), e por via parenteral em doses a partir de 25 mg, seus efeitos psicotrópicos são evidentes (STRASSMANS *et al.*, 1994). Quando administrado por via intravenosa em humanos, provoca grandes modificações na percepção da realidade, ainda que seus efeitos sejam de curta duração (STRASSMAN, 2001). O DMT causa acentuadas alterações sensitivas, como bem estar, pensamentos complexos, alterações visuais das cores, movimentos e forma de objetos, alteração do tato e percepções mais claras e distintas. Os efeitos têm início de 35 a 40 minutos após a administração oral, com picos de intensidade entre 90 e 120 minutos, e perduram por até 4 horas (GROB *et al.*, 1996; RIBA *et al.*, 2001; RIBA *et al.*, 2003).

Quando ingerido, o DMT sofre ação da enzima MAO intestinal e hepática, sendo desaminado e, conseqüentemente, inativado. Porém, quando ingerido juntamente com as  $\beta$ -carbolinas, combinação existente na ayahuasca, ele não sofre inativação pela MAO intestinal, o que possibilita sua chegada ao SNC (MACKENA *et al.*, 1984; CALLAWAY *et al.*, 1999, CAZENAVE, 2000). As  $\beta$ -carbolinas, além de impedir a inativação do DMT, apresentam, por si só, efeito alucinógeno (CAZENAVE, 1996), uma vez que provocam aumento dos níveis de serotonina (LUNA, 2005). A ação do chá ayahuasca deve-se então à interação sinérgica do DMT e das  $\beta$ -carbolinas presentes na mistura, cujo resultado é uma cascata de efeitos neuroquímicos que irão alterar os padrões normais da percepção, sobre aquilo que comumente é compreendido como sendo “realidade” (DE SOUZA, 2011).

## 2.4 – Efeitos biológicos

Os efeitos neuroquímicos e psíquicos relatados pela ingestão da ayahuasca são tonturas, vertigens, distúrbios visuais, ilusões de mudanças rápidas de forma e tamanho de pessoas ou objetos, em alguns casos perda de memória, confusão mental e desorientação (SCHVARTSMAN, 1992; SANTOS, 2004). Também foram relatadas alterações na percepção da passagem do tempo, perda de contato com a realidade, alterações na expressão emocional variando do êxtase ao desespero, mudanças na percepção corporal, sensações de estar suspensas no espaço, alucinações, visões de vários animais e de anjos e paraíso, sinestésias, “insights”, hipersugestibilidade, medo, insônia e sensação de morte eminente (SCHVARTSMAN, 1992; CAZENAVE, 1996; CALLAWAY & GROB, 1998; RIBA *et al.*, 2003; SHANNO, 2003; SANTOS, 2011). Vale ressaltar, que independentemente dos efeitos comportamentais e cognitivos provocados pela ayahuasca, os usuários do chá no contexto ritualístico permanecem totalmente conscientes e capazes de se comunicar de forma lógica (RIBA *et al.*, 2001).

As reações físicas comumente observadas incluem aumento do diâmetro pupilar (PINTO, 2010), hipertensão, perda de coordenação motora, agitação passageira, taquicardia, tremores, sudorese, prostração, sonolência, náuseas, vômitos e diarreia, o que pode provocar a desidratação e descompensação eletrolítica, elevação nos níveis de cortisol, do hormônio do crescimento e da prolactina (GROB *et al.*, 1996; CALLAWAY *et al.*, 1999; HALPERN *et al.*, 2008; ANDERSON *et al.*, 2012).

## 2.5 - Potencial terapêutico

A utilização de plantas medicinais ou extratos de plantas no tratamento e cura de enfermidades é um recurso terapêutico muito antigo adotado em muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas psicoativas e a descoberta de seus mecanismos de ação têm fornecido subsídios para compreender a neuroquímica de muitas doenças do sistema nervoso central, bem como a química da consciência (O’CONNOR & ROTH, 2005). O uso terapêutico do chá de ayahuasca e sua segurança embasam-se principalmente no histórico de uso ancestral por tribos indígenas na cura de inúmeras doenças, incluindo doenças parasitárias e gastrointestinais comuns nos trópicos (DESMARCHELIER *et al.*, 1996; POMILIO *et al.*, 1999).

Propriedades antioxidantes, antimutagênica, antitumorais, mas principalmente efeitos psicoterapêuticos que atenuam problemas relativos ao abuso de drogas, humor e ansiedade tem

sido o foco de vários estudos (MCLLHENNY *et al.*, 2011; HALPERN, 2004; LABATE *et al.*, 2006; STUCKEY *et al.*, 2005; SCHENBERG, 2013).

Estudos mostraram que a administração da ayahuasca liofilizada em doses terapêutica é segura (RIBA *et al.*, 2001), não produz dependência, ou mudanças crônicas no organismo aptas a tolerância (SHANON, 2002; LUNA, 1986; MCKENNA, 2004; GROB *et al.*, 1996). Dados do Projeto Hoasca (Hoasca Project) mostram a inexistência de distúrbios psiquiátricos entre os afiliados da UDV, maior poder de concentração e melhor resposta de memória auditiva quando comparados ao controle (GROB *et al.*, 1996; CALLAWAY *et al.*, 1999; CALLAWAY, 2004; GROB *et al.*, 2004.; MACKENNA, 2004). Outros estudos indicam o potencial uso da ayahuasca no tratamento do alcoolismo e com relação a comportamento violento e suicida (MCKENNA, 2004; GROB *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2006). Consumidores de ayahuasca abandonaram a nicotina, cocaína e anfetamina quando adeptos da bebida regularmente (MCKENNA, 2004). Além do mais, Fábregas e colaboradores (2010) mostraram que a utilização frequente de ayahuasca não está associada com problemas psíquicos que as drogas de abuso provocam.

## **2.6 – Potencial toxicológico**

As substâncias psicoativas são aquelas que alteram o funcionamento cerebral, causando e proporcionando modificações no SNC. Estas substâncias têm a propriedade de imitar os efeitos de neurotransmissores naturais ou endógenos, interferir com a função normal do cérebro bloqueando uma função, ou alterando os processos normais de acumulação, liberação e eliminação de neurotransmissores (WHO, 1998). Existem no bioma do planeta, cerca de 450 espécies de plantas e cogumelos que podem ser classificadas como psicoativas, das quais aproximadamente 120 possuem propriedades alucinógenas (CUNNINGHAM, 2008).

Apesar da longa história e tradição do uso indígena e da incorporação do uso da ayahuasca em grupos religiosos, houve nas últimas décadas um aumento importante de adeptos ao chá de ayahuasca (não ritualístico) o que motivou a comunidade científica e até mesmo o público em geral a questionar a segurança do uso desta infusão (PIRES, 2010). O fato de haver poucas informações pré-clínicas (dados toxicológicos) e clínicas, somadas a eventos de intoxicações e morte após consumo da bebida descrito na mídia (KOURA & BETTI, 2014), suscitam especulações e controvérsias sobre os possíveis efeitos tóxicos indesejáveis da exposição aos componentes da bebida.

Embora não se tenha relatos de mortes por intoxicação de  $\beta$ -carbolinas, Callaway *et al.* (1996) destacam que, como são potentes inibidores da MAO, essas substâncias podem causar

reações adversas quando combinadas com medicamentos, que possuem tempo de meia-vida longo, incluindo os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (SSRIs). O bloqueio da MAO juntamente com o decréscimo de recaptção de serotonina pelos SSRIs pode levar a síndrome serotoninérgica, ocasionada por elevadas concentrações de serotonina circulante. Esses efeitos vão desde a modificação de inúmeras funções fisiológicas (apetite, sono, temperatura, comportamento, movimentação e atividade sexual) à patologias associadas, como a depressão, ansiedade, agressividade, insônia, esquizofrenia e disfunção sexual (GROB *et al.*, 1996; MOSSNER E LESCH, 1998). Portanto, com o aumento do uso de medicamentos SSRIs e o crescente interesse no chá de ayahuasca, o risco de toxicidade aumentou nos últimos anos.

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial tóxico de novas substâncias à saúde humana, independente da via de exposição (CAZARIN *et.al.*, 2004). A análise de dados toxicológicos de uma substância química permite sua classificação em categorias toxicológicas estabelecidas, seu potencial de letalidade ou toxicidade, além de fornecer também informações a respeito da forma correta e segura de uso, medidas de prevenção e tratamento em caso de intoxicação. Testes de toxicidade aguda avaliam além da letalidade, o potencial tóxico em órgãos específicos, toxicocinética e a relação-dose resposta (VALADARES, 2006).

O teste da dose letal aguda (DL<sub>50</sub>) introduzido por Trevan em 1927 foi amplamente usado com o objetivo de encontrar a dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste. A partir da década de 70, passou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias por várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos e químicos industriais.

Para a realização do teste da DL<sub>50</sub> para cada substância testada eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada (normalmente ratos e camundongos) (KRYSIK & RYDZYNSKI, 1997; GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005). Hoje em dia, novos protocolos são utilizados, onde um número mínimo de animais é suficiente para caracterizar a substância de acordo com seu potencial letal, sem especificamente determinar a DL<sub>50</sub> (Toxicidade aguda de classe). O protocolo OECD-423 é um procedimento gradual com a utilização de três fêmeas por etapa com administração de uma única dose oral (OECD – 423). Dependendo da mortalidade e/ou o estado moribundo dos animais, em média, 2-4 etapas podem ser necessárias para permitir a classificação de uma substância quando ao seu potencial de letalidade.

Estudos para determinar a toxicidade letal do chá da ayahuasca e seus componentes bioativos são insuficientes na literatura e nenhum estudo determinou diretamente a dose letal



aguda da infusão. Gable (2007) estimou, a partir de estudos com outras vias de administração, que a DL<sub>50</sub> oral do DMT em camundongo é cerca de 8.0 mg/kg, estimando que a dose letal aguda da ayahuasca em humanos seria de aproximadamente 20X a dose usada durante a cerimônia religiosa. A DL<sub>50</sub> via subcutânea da harmina e harmalina em ratos foram determinadas como 120 e 200 mg/kg de peso corpóreo e pela via intravenosa a harmina em camundongos foi definida como 38 mg/kg de peso corpóreo (MAHMOUDIAN *et al.*, 2002).

Um estudo realizado no nosso grupo de pesquisa utilizando o protocolo OECD 423 determinou que a DL<sub>50</sub> oral de ayahuasca em ratas *wistar* era superior a 50X a dose ritual empregada no contexto religioso da UDV (PIC TAYLOR *et al.*, 2014; Anexo 2).

Estudos de múltiplas doses se assemelham ao uso ritualístico do chá e são importantes para determinar efeitos crônicos. Em estudo conduzido por Santos *et al.*, 2013, mostrou que apesar de haver alterações sugestivas, não foram observadas diferenças relevantes em análises histológicas nos tecidos do miocárdio, renal e hepático de ratos *Wistar* hipertensos quando comparados grupos tratados e não-tratados com o chá de ayahuasca em ingestão crônica, com um grupo que recebeu a dose ritual uma vez por semana, e outro grupo com dose ritual diariamente por 60 dias (adotando 100mL/kg pc).

Oliveira *et al* (2010) conduziram um estudo a qual foram empregados três doses do chá de ayahuasca em ratas prenhes de linhagem *Wistar*, para avaliar a toxicidade materna e teratogenicidade. Nesse estudo não foram observados sinais de toxicidade materna e não houve relatos de morte dos animais. Porém, foi constatado embriotoxicidade o que sugere que os alcalóides presentes na ayahuasca podem atravessar a barreira placentária. Motta (2013) mostrou que a administração de ayahuasca durante quinze dias em ratas *Wistar* prenhes, em doses mais elevadas que as utilizadas por Oliveira *et al.*, (2010), causam toxicidade materna com óbitos de animais, um potencial efeito embriofetotóxico, além de embriofetalidade. Foram também relatadas malformações viscerais e esqueléticas nos fetos analisados nas maiores doses de tratamento, indicando que o tratamento com o chá de ayahuasca induz a toxicidade fetal. Avaliações histológicas não foram realizadas por Pic-Taylor *et al.* (2014) e Motta (2013) são objeto do presente estudo.

## **2.7 - Estudos da toxicidade por análise histológica**

As técnicas histológicas permitem o estudo dos tecidos biológicos, podendo assim correlacionar estrutura, formação e função. O método mais comum para estudar os tecidos animais é por meio de análise histológica dos órgãos. O estudo de órgãos específicos envolvidos

no metabolismo geral é uma maneira robusta para complementar o estudo de toxicidade, contribuindo com informações sobre a integridade estrutural, o tipo e grau de injúria e a resposta do organismo a injúria causada pela substância estudada.

O **baço** é um importante órgão de defesa contra microrganismos, respondendo com rapidez aos antígenos que invadem o sangue, sendo um importante filtro fagocitário e imunológico para o sangue e grande produtor de anticorpos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). O baço age também como reservatório sanguíneo, e está diretamente envolvido com os mecanismos de defesa do corpo e produção de anticorpos (RICHARD & SHERIND, 1998; SLATTER, 1998). Apresenta também função hematopoiética em recém-nascido e indivíduos adultos. Apesar de exercer várias e importantes funções, o baço não é essencial para a vida, podendo ser retirado (esplenectomia), e sua função é parcialmente restabelecida pelo fígado, porém a ausência deste órgão acarreta uma maior susceptibilidade às infecções. É constituído por uma trabécula, que conduz vasos e nervos, e pelo estroma que sustenta a polpa esplênica (polpa vermelha e branca) (STITES *et al.*, 1997). A polpa vermelha, que consiste a maior parte do órgão, possui sinusóides separados por fibroblastos, macrófagos, eritrócitos e outras células de defesa (POPE & ROCHAT, 1996). A polpa branca apresenta um centro germinativo com várias células linfoides (FREITAS, *et al.*, 2009).

O **fígado**, segundo maior órgão e a maior glândula do corpo, corresponde a cerca de 1,8 a 3,1% do peso corpóreo de humanos adultos e aproximadamente a 4% do peso corporal de ratos (FILHO, 2006). É o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos, possuindo inúmeras funções vitais do metabolismo básico dos vertebrados, incluindo de xenobióticos (ARIAS *et al.*, 1998; GINGERICH e DALICH, 1982; JUNQUEIRA & CARNEIRO; 2008). É provido de um sistema vascular, e a distribuição de produtos tóxicos para outros órgãos vai depender de seu potencial de acumulação, biotransformação e excreção no organismo (MEYERS e HENDRICKS, 1985; MEEKS *et al.*, 2000). O hepatócito é o componente estrutural básico do fígado, e é considerado o primeiro alvo da toxicidade de uma substância (ZELIKOFF, 1998). Considerado a célula mais versátil do organismo, o hepatócito acumula e transportam inúmeras substâncias além de possuir funções endócrinas e exócrinas (GARTNER & HIATT, 1997).

O **rim** é o principal órgão do sistema urinário, sendo responsável pela regulação da concentração da maioria dos íons presentes nos líquidos orgânicos e pela filtração do sangue e excreção de substâncias indesejáveis (GUYTON, 2008). A unidade funcional do rim é o néfron, constituído pelo corpúsculo renal, túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal, túbulo coletor e alça de Henle. Cada rim apresenta milhões de néfrons, que são responsáveis pela

excreção de muitos resíduos metabólicos tóxicos e osmorregulação pela filtração, reabsorção e secreção (BURKITT *et al.*, 1994). Xenobióticos que circulam pela corrente sanguínea passam pelos rins em quantidades consideradas elevadas, podendo comprometer o metabolismo e gerar patologias relacionadas a sobrecarga do órgão (SCHNELLMANN, 1996).

Por definição, uma substância neurotóxica é aquela que altera a atividade normal do sistema nervoso de tal forma que causa danos ao tecido nervoso. Lesões no SNC causam vários impactos no organismo, e podem levar a sequelas que surgem em decorrência da morte neuronal, como déficits motores, cognitivos ou de memória, dependendo do tamanho da lesão e do local que foi atingido (PULSINELLI, 1992). Análises histológicas podem evidenciar alterações significativas na morfologia do cérebro e na redução de neurônios. A histologia do cérebro e principalmente das regiões que compõe o circuito serotoninérgico pode ser de grande valia no entendimento da neurotoxicidade da infusão, tendo em vista que o DMT age como um agonista deste neurotransmissor.

## **2.8 - Estudos de neurotoxicidade**

O DMT, constituinte da ayahuasca, é considerado neurotóxico e está incluído na lista de nível I da Convenção das Nações Unidas para Substâncias Psicotrópicas (CONVENTION ON PSYCHOTROPIC SUBSTANCE, 1971). Existem poucos estudos que avaliem ou determinem o risco toxicológico do chá de ayahuasca *in natura* no sistema nervoso central de animais de experimentação. Alguns estudos disponíveis foram conduzidos com os princípios ativos isolados.

Os efeitos alucinógenos do DMT foram descritos pela primeira vez em 1957 por Szara. Quase uma década mais tarde, Franzen e Gross (1965), reportaram a presença de DMT no sangue e urina humana sugerindo que este composto é produzido de maneira endógena. Nas décadas que seguiram, apesar de poucas evidências moleculares, vários estudos vincularam DMT a psicoses e esquizofrenias, devido a sua alta concentração na urina de pessoas esquizofrênicas (JACOB & PRESTI, 2005). Ciprian-Ollivier & Cetkovich-Bakmas (1997), fizeram uma revisão destes estudos e encontraram correlação significativa entre a excreção urinária de DMT e a severidade de sintomas psicóticos, porém sugeriram uma grande complexidade na etiologia da esquizofrenia e o envolvimento de outras aminas incluindo serotonina, dopamina, e as triptaminas N-metiladas.

Alguns autores relatam neurotoxicidade dos componentes  $\beta$ -carbolínicos em camundongos, e vinculam este fato a danos mitocondriais (CHEN *et al.*, 2005). Miwa *et al.*

(2006) demonstraram que a harmina causa morte celular em neurônios (MIWA *et al* 2006) através da indução de processos apoptóticos mediados pela ativação da caspase-3 (ISERI *et al.*, 2011). Estes animais apresentavam entre outros sintomas tremores e contrações musculares após a exposição às carbolinas.

Estudo conduzido por Brito *et al.* (1994) concluiu que uma dose de 500 mg/kg pc de chá de ayahuasca administrado em ratos não produz dano neurológico, e que os efeitos observados nos animais foram similares aqueles produzidos por drogas que elevam os níveis de serotonina no sistema nervoso central. Oliveira *et al.* (2011) demonstraram que a administração oral do chá de ayahuasca na dose de 1X (admitindo que uma pessoa de 70 kg ingere 100 ml de chá) durante a gestação e lactação produziu diminuição da ansiedade e da motivação social na prole das mães exposta ao chá de ayahuasca.

Estudo de neurotoxicidade conduzido por Figueroa (2012) com ratos *Wistar* machos tratados oralmente com chá de ayahuasca durante três semanas com dose ritual diluída (50% a dose usual) revelou aumento significativo nos valores de ureia urinária, podendo ser um indicativo de dano renal nos animais tratados. O autor observou também em cortes histológicos de cérebro da região hipocampal uma diferença significativa de células apoptóticas por ensaio TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), indicador de dano ao DNA, quando comparado com controle sugerindo apoptose neural; porém estes dados não foram confirmados pela imunoreatividade da Caspase 3, que mostrou não ser significativo quando comparado ao controle.

Pic-Taylor *et al.* (2014; Anexo 2) observaram efeitos neurotóxicos em animais tratados com doses únicas aguda de 30 e 50 vezes a dose ritual (150 mL/70 kg pc). Foi observado tremores e piloereção em todos os animais durante as primeiras 24 após o tratamento, características estas que corroboram com efeitos da estimulação serotoninérgica. Também foi observado diminuição da locomoção e diminuição do interesse exploratório em testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada, e aumento do tempo de nado no teste de natação forçada, o que prediz uma ação antidepressiva do chá. Neste mesmo trabalho, foi realizada análise imunohistoquímica pela marcação do proto-oncogene *c-fos* em regiões cerebrais ricas em receptores de serotonina. Foi observada forte ativação neural específica nas áreas do núcleo da Rafe, amígdala e hipocampo em animais tratados com 30X a dose usual. A hiperativação neuronal pode causar lesões nestas células (DA SILVA & CAVALHEIRO, 2004). Entretanto a utilização da coloração de Nissl, para quantificação da densidade neuronal (número de neurônios numa área de 1 micrometro quadrado) mostrou que apesar da ativação detectada por expressão de *c-fos*, não houve morte neuronal que resultasse em lesões definitivas nestas regiões.

A coloração de Nissl, principalmente com violeta de cresila, é uma das técnicas mais utilizadas em laboratório na investigação do sistema nervoso. A substância de Nissl é um material granular constituído por RNA ribossomal presente no núcleo (predominantemente no nucléolo) das células nervosas (XAVIER, 1999). Esta técnica serve como indicador da viabilidade neuronal, pois evidencia os neurônios viáveis com fácil visualização. Desse modo, essa coloração simples serve como indicador da viabilidade neuronal, uma vez que quando há eventos de lesão neuronal, os corpúsculos de Nissl geralmente desaparecem (cromatólise).

### **2.8.1 - Núcleos da Rafe (Nr)**

Os neurônios serotoninérgicos estão localizados nos núcleos da Rafe e consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios do tronco cerebral que estão organizados ao longo da linha média originando projeções ascendentes e descendentes (ZIGMOND *et al.*, 1999).

Anatomicamente, os núcleos da Rafe são divididos em grupos rostrais (B7, B8 e B9) que correspondem aos núcleos *dorsalis* (NRD), *medianus* (NRM) e *centralis* superior, respectivamente, e o grupamento caudal (B1 a B6). Os neurônios da Rafe inervam praticamente todas as regiões do encéfalo, enviando axônios colaterais a áreas do cérebro com funções relacionadas (AZMITIA, 1999). O núcleo B7, que compõe o NRD, é visto como a principal fonte de inervação serotoninérgica, pois possui a maior concentração de neurônios serotoninérgicos, cujos axônios se projetam para a região dorsal do mesencéfalo, onde se localiza o colículo superior (BEITZ *et al.*, 1986; HARING, 1991; VERTES; CRANE, 1997). Esse núcleo também projeta seus neurônios para a formação reticular tálamo, amígdala e hipocampo, dentre outros, e está diretamente implicado na regulação fisiológica do fluxo sanguíneo cerebral, sono, enxaqueca, tolerância ao stress, inibição comportamental e impulsividade (AZMITH & SEGAL, 1978). A destruição dos núcleos da Rafe pode reduzir a tendência exploratória e diminuir a atenção para estímulos externos, além de participar na regulação do comportamento alimentar, variação de humor e comportamento sexual (ADELL, *et al.*, 2002).

### **2.8.2 - Complexo amigdalóide (Ca)**

Outra região importante para o estudo histológico da ativação neuronal serotoninérgica é o complexo amigdalóide (Ca). Diversos estudos mostram que essa região neural é um local crítico para as manifestações autonômicas e comportamentais que ocorrem com o medo (LENT, 2008). O Ca recebe informações do bulbo olfatório, e projeta diretamente para o hipocampo,

influenciando processos mnemônicos e cognitivos. É dividido em quatro regiões principais: 1) amígdala expandida, que possui os limites anatômicos mediais e centrais da amígdala; 2) amígdala com características corticais, que são porções que se ligam às vias olfatórias e vomeronasal; 3) áreas de transição entre a porção ventral dos núcleos e da base e a amígdala expandida; e 4) núcleos ainda não classificados, que são um grupo de células dispersas na substância branca (DALL'OGGIO, 2007). A amígdala expandida é composta por células justapostas à porção lateral do trato óptico e que possui rede de conexões neurais entre seus subnúcleos, núcleos do complexo amigdalóide, e núcleos fora do complexo (DONG *et al.*, 2001), como a formação hipocampal e os núcleos da Rafe (CANTERAS *et al.*, 1995).

Em seres humanos a estimulação do Ca produz ansiedade e sentimento de medo, sendo uma interface entre a cognição e a emoção, reações que incluem mudanças autonômicas, endócrinas e somáticas, bem como alterações neuromodulatórias da função cerebral, além da participação no comportamento social (LENT, 2008).

### **2.8.3 - Formação hipocampal (FH)**

A formação hipocampal (FH) é um dos sistemas neuronais mais estudados no cérebro, estando envolvida na resposta ao estresse e no controle de respostas neuroendócrinas (LHATE, 2001). Está posicionado medialmente à fissura rinal na região temporal, atrás do complexo amigdalóide, ocupando as paredes ventroposteriores e ventrolaterais do córtex cerebral (LENT, 2008; BAYER, 1985). Participa do processamento de informações sobre eventos ameaçadores (GRAY, 2000), além de se tornar alvo para os efeitos deletérios do estresse. Muitas evidências experimentais mostram que o hipocampo é alterado pela exposição a estresses, e parece ter um papel considerável na mediação dos efeitos terapêuticos da cura contra a depressão (JOCA *et al.*, 2003). Tradicionalmente está relacionado a processos cognitivos como aprendizado e memória (RIEDEL & MICHEAU, 2001).

Estudos de neuroimagem mostram a relação direta da FH com a doença de Alzheimer, epilepsia do lobo temporal, envelhecimento cognitivo, amnésia, esquizofrenia e transtornos depressivos e de ansiedade (SMALL *et al.*, 2011) evidenciando sua importância na consolidação de informações de memória de curto prazo a memória de longo prazo, aprendizagem e orientação espacial (HOU, *et al.*, 2013). Lesões hipocâmpais produzem déficits em relação ao aprendizado dos animais. Em humanos, algumas populações seletivas de neurônios da FH se degeneram na doença de Alzheimer e em certos tipos de amnésia (LENT, 2008). Segundo DE

LIMA (1998), lesões no hipocampo desencadeiam um quadro de desinibição do comportamento locomotor e exploratório.

De acordo com Seindenbecher *et al.*, (2003) a comunicação amígdala-hipocampo é importante para a evocação e a expressão de memórias relacionadas ao medo. Foi demonstrado que durante a evocação de uma resposta condicionada de medo, células de ambas as estruturas disparam de forma sincronizada com uma frequência (ritmo teta) antecedente à aquisição de memória aversiva e à resposta do hipocampo. Shumake *et al.* (2002) demonstraram que animais geneticamente selecionados com maior sensibilidade a modelos de depressão apresentam atividade hipocampal aumentada, o que também foi observado em pacientes deprimidos que não respondem a antidepressivos (MALBERG *et al.*, 2000).

A FH é formada por quatro regiões corticais: o complexo subicular, o córtex entorrinal, o giro denteado e o hipocampo propriamente dito. As duas últimas regiões possuem uma grande variedade de receptores, incluindo os colinérgicos nicotínicos e receptores de serotonina, principalmente as do subtipo 5-HT<sub>1A</sub> e 5H-T<sub>4</sub>. O giro denteado (GD) é constituído por células granulares, e tem a capacidade de formar novos neurônios nos mamíferos (HOU *et al.*, 2013). É dividido em três camadas: camada molecular, camada de células granulares e o hilo (camada polimórfica). O hipocampo propriamente dito é dividido em três subcampos. O Corno de Ámon 1 (CA1), sítio de predileção à lesão isquêmica, possui células piramidais menores e mais agrupadas. O Corno de Ámon 2 (CA2) possui células piramidais maiores, e o corno de Ámon 3 (CA3), que da mesma forma que CA2, é composto por células maiores e menos agrupadas. Do ponto de vista estrutural, a FH é a região cerebral mais propícia aos efeitos neuropatológicos (MELLO & CAVALHEIRO, 1993; CAVALHEIRO, 1995).

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo Geral:**

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e crônica e a neurotoxicidade crônica do chá de ayahuasca em ratas *Wistar* por meio de técnicas histológicas

#### **3.2 - Objetivos Específicos:**

- Investigar a ocorrência de alterações histológicas no baço, fígado e rins de ratas tratadas com ayahuasca em doses únicas de 30 e 50 vezes a dose usual;
- Investigar a ocorrência de alterações histológicas no baço, fígado e rins de ratas prenhas tratadas com ayahuasca durante 15 dias com doses 1, 2, 4 e 8 vezes a dose usual;
- Avaliar o potencial neurotoxicológico por contagem de neurônios viáveis do núcleo da Rafe, formação hipocampal e complexo amígdaloide de ratas prenhas tratadas com ayahuasca durante 15 dias com doses 1, 2, 4 e 8 vezes a dose usual.



## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Material biológico e preparo do chá ayahuasca

O chá ayahuasca utilizado neste estudo foi cedido pelo Núcleo Luz do Oriente da União do Vegetal, com sede em Planaltina-DF. O chá foi preparado em maio de 2011 a partir da cocção do cipó mariri (*Banisteriopsis caapi*) proveniente de uma chácara localizada em Águas Lindas de Goiás (15° 46' 17 "S, 48° 14' 56" W) e da folha do arbusto chacrona (*Psychotria viridis*), colhida em Sobradinho, Distrito Federal (15° 75' 23 "S, 47° 72' 92" W). Amostras das plantas usadas na preparação do chá foram identificadas e depositadas como exsicatas no *Herbarium* da UnB com os números de referência Azevedo EP 149880 Brahms e Trieto B 149.879 BRAHMS, respectivamente.

O chá foi preparado sob a coordenação do Mestre do Núcleo, seguindo o ritual de feitiço estabelecido, com participação dos outros membros do grupo. O material foi colocado em grandes recipientes, dispostos em camadas alternadas de cipó e chacrona e recoberto por água. O material foi fervido (Figura 4) por um período de 5 horas até atingir uma coloração marrom, coado em peneira e armazenado em recipientes plásticos de 1 L esterilizados. A equipe envolvida neste estudo participou de todo o processo de preparação da ayahuasca, desde a colheita das espécies, preparo do chá e engarrafamento.



**Figura 4:** Preparo do chá de Ayahuasca pelo Núcleo Luz do Oriente, União do Vegetal (UDV) com sede em Brazlândia-DF.

Diferenças na composição química do chá de ayahuasca são esperadas, devido a fatores ambientais e de cultivo das plantas utilizadas, e da preparação da bebida. Cada mestre ayahuasqueiro tem sua maneira própria de preparo, com diferentes proporções entre mariri (*Banisteriopsis caapi*) e a chacrona (*Psychotria viridis*), tempo de cozimento e diluição da bebida.

Um volume de 30 litros de chá preparado durante o ritual foi cedido para esta pesquisa. O chá foi armazenado no Laboratório de Toxicologia da UnB em freezer -20°C e posteriormente, cerca de 10L foram liofilizados (Liotop L101) para a utilização no projeto. Para a determinação da densidade do chá, 10 amostras de 10 mL foram liofilizadas separadamente, pesadas e uma média aritmética foi calculada. A densidade do chá foi estimada em 0,1615 g /mL.

#### **4.2 - Caracterização química**

Padrões de harmalina (99.2% pureza) e harmina (98% pureza) foram obtidos da Sigma Aldrich. Por ser uma substância proscrita no Brasil e em diversos países no mundo, não foi possível a aquisição comercial do DMT, que foi sintetizado pela Prof. Maria Lucília Santos, do Instituto de Química da UnB, seguindo os procedimentos de QU *et al.* (2011). A identidade e pureza deste padrão foram determinadas por LC-MS/MS (Shimadzu LC sistema acoplado com um espectrômetro de massas 4000 QTRAP, Applied Biosystem), <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR (Varian Mercury Plus spectrometer 7.05 T operating at 300 MHz for <sup>1</sup>H and at 75.46 MHz for <sup>13</sup>C) e LC-MSD TOF (Agilent 1100 Series).

Os níveis de DMT, harmina e harmalina presentes no chá de ayahuasca obtido da União do Vegetal foram determinados por CG-MS/MS (Trace Ultra coupled with a TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole; Thermo Scientific). A análise quantitativa do chá ayahuasca indicou a presença de 0.146 mg/mL de DMT, 1,56 mg/mL de harmina e 0,12 mg/mL de harmalina.

#### **4.3 – Animais**

Para os estudos foram utilizados um total de 169 ratos *Wistar* com idade entre 9 e 12 semanas provenientes da Granja R.G. com sede em São Paulo, dos quais 19 fêmeas para os testes agudos e 150 animais para o estudo crônico (125 fêmeas e 25 machos). As fêmeas eram nulíparas, com variação máxima de peso de até 15% (260±13,3). Os animais foram alojados em estante Alesco (Harímetro 1550584) no biotério na Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, em caixas de polipropileno com tampa de arame zincado e cama de maravalha de pinho branco

esterilizada em autoclave. Os machos foram mantidos em caixas individuais, e as fêmeas em grupos de três animais por caixa. Antes do início de cada estudo, os animais foram aclimatados por um período de 15 dias. Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12h/12h, claro/escuro), temperatura ( $23\pm 2$  °C), umidade relativa ( $60 \pm 10\%$ ) e receberam água potável e ração comercial Purina® *ad libitum*. O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. O protocolo experimental adotado foi previamente aprovado pelo CEUA (protocolo n.º 107766/2010; Anexo 1).

#### 4.4- Estabelecimento das doses

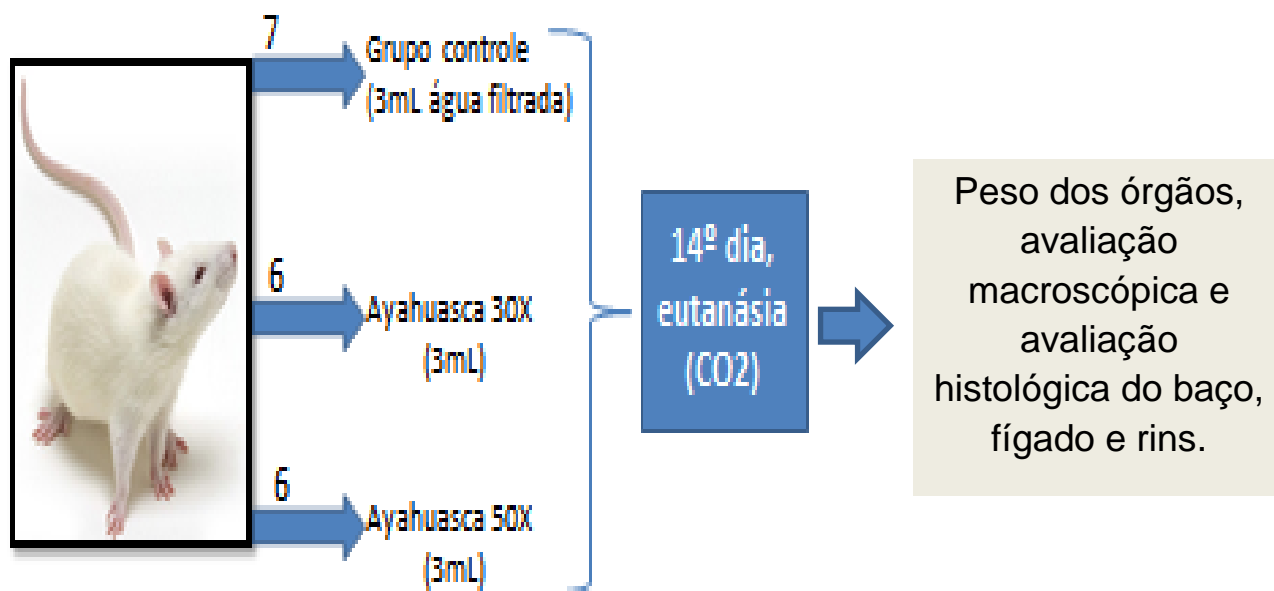
Em todos os estudos, o tratamento dos animais com chá ayahuasca foi feito por gavagem, com auxílio de sonda uretral flexível (número 6) (Figura 5). As doses administradas basearam-se no consumo ritualístico da União do Vegetal, de 150 ml para uma pessoa de 70 kg. Doravante, esta dose ritualística será denominada dose 1X, e as doses utilizadas nos estudos serão proporcionais a esta dose (1X, 2X, 4X, 8X, 30X ou 50X). As doses dos grupos tratados foram preparadas a partir do material liofilizado, ajustado para o peso do animal, e ressuspendidas para 2 ou 3 mL com água filtrada.



**Figura 5:** Procedimento de gavagem com administração do chá de ayahuasca em ratas *Wistar*.

#### 4.5 - Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda do chá da ayahuasca utilizando técnicas histológicas foi realizada no âmbito do estudo de Pic-Taylor et al. (2014; Anexo 2) utilizando o protocolo OECD-423 (OECD, 2001). Nesse protocolo, três animais fêmeas são expostas a uma dose inicial selecionada, o teste repetido, e dependendo do número de animais que foram a óbito, uma segunda dose é testada. No presente estudo, a dose inicial foi de 30X, e a dose subsequente de 50X, que foi a maior dose que pode ser diluída em 3 mL para gavagem. Foi também incluído no estudo um grupo controle. O protocolo do estudo está mostrado na Figura 6. Todos os animais do grupo de estudo ficaram em jejum por um período de 12 horas antes do tratamento. Os animais do grupo controle receberam água filtrada e em todos os grupos o volume administrado foi de 3 mL em todos os grupos. Após a administração, os animais foram observados por quatro horas, quando a ração foi re-introduzida. Os animais foram avaliados diariamente quanto a sinais de toxicidade e no 14º dia foram submetidos a eutanásia por exposição a CO<sub>2</sub>. Os órgãos (cérebro, coração, baço, estômago, intestino, fígado e rins) foram retirados para avaliação macroscópica quanto ao aspecto, peso, coloração, tamanho e consistência. Baço, fígado e rins foram preparados para avaliação histológica.



**Figura 6:** Delineamento experimental de ensaio toxicológico agudo com o chá de ayahuasca em ratas *Wistar*.

#### **4.5.1 – Processamento histológico**

As amostras de fígado e baço dos animais foram seccionados em fragmentos de até 0,5 cm e os rins inteiros foram mergulhados em solução formalina 4% tamponada (pH 7,4) e mantidos em geladeira por 24 horas. Os fragmentos e os rins foram desidratados em série etanólica crescente de 70, 80, 90%, durante uma hora cada, sendo então mergulhados em três soluções de álcool absoluto durante 1 hora. A diafanização foi feita durante 45 minutos em álcool e xilol (1:1), seguido por três banhos de uma hora de xilol 100%. Na etapa da inclusão, o material foi submetido a três banhos de 1 hora a 60°C em estufa com parafina purificada. O material foi incluído em blocos de parafina moldados em metal formato L e os blocos seccionados com 5 µm de espessura utilizando micrótomo de marca LEICA. As secções foram colhidas em laminas de vidro e mantidas em estufa a 39° C por pelo menos um dia, para sua aderência às lâminas. As lâminas foram retiradas da parafina utilizando-se três banhos de xilol, dois banhos de álcool absoluto e em série etanólica decrescente de 90, 80 e 70%. Os cortes foram corados com hematoxilina durante 25 segundos, lavados em água corrente e submersos em eosina por 2 minutos.

Depois de corado, o material foi desidratado em solução crescente de álcool com concentração 70%, 80%, 90% e duas vezes no álcool absoluto (banhos de 1,5 minutos cada), e diafanizados em xilol (xilol 1: 1 minuto; xilol 2: 2 minutos e xilol 3: 3 minutos). Após o último banho de xilol, as mesmas foram montadas com Entellan (Merck), recobertas com lamínulas e posteriormente colocadas para secagem em caixas de plástico, por no mínimo 48 horas até sua limpeza e codificação. As lâminas foram analisadas e fotografadas em Apério Scanscope com auxílio de microscopia óptica comum (Olympus BX41). Foram obtidas de quinze a vinte lâminas de cada órgão, e três lâminas com cortes escalonados (pulando no mínimo cinco cortes) foram selecionadas para análise microscópica. Cada lâmina confeccionada representa no mínimo dois cortes de órgão. As lâminas foram codificadas aleatoriamente, sem conhecimento do avaliador a que animal/grupo pertencia.

#### **4.5.2 – Análise histológica qualitativa**

Na leitura das lâminas, considerou-se padrão de normalidade para o fígado: bom estado de conservação, homogeneidade de aspecto, identificação de lóbulos hepáticos íntegros, espaço-porta íntegro e veias hepáticas bem definidas; cordões sinusóides presentes,

íntegros, confluindo para veia centro-lobular. Nos capilares sinusóides entendeu-se como normal a presença de algumas hemácias. Nas células hepáticas, consideraram-se normais aquelas com um ou mais núcleos íntegros, em geral centralizados, e nucléolos bem evidentes. No citoplasma, foi considerado padrão de normalidade encontrar áreas basófilas e eosinófilas.

Nos rins, a normalidade obedeceu aos quesitos: bem conservados, apresentando corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais íntegros; os glomérulos formados por capilares, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas. Outros itens avaliados: cápsula de Bowman íntegra, presença de células cúbicas ou poliédricas, apresentando citoplasma eosinófilo e núcleo arredondado. Na região medular, analisaram-se as alças de Henle junto aos capilares e túbulos coletores, estes com citoplasma bem delimitado e núcleo esférico, quando dentro da normalidade.

Para o baço foi considerado para avaliação de normalidade a integridade do tecido, polpas evidentes e organizadas, núcleos e citoplasma íntegros, ausência de necrose.

Para avaliar as alterações dos respectivos órgãos foram considerados: coloração padrão já bem estabelecida para as estruturas, alteração na morfologia de núcleos, rompimento de limites de alguma organela citoplasmática, presença de congestão vascular, áreas com infiltrado inflamatório, congestão de vasos e capilares, núcleos com cromatina extremamente condensada, edema, esteatose e áreas de degenerações reversíveis (hidrópica e gordurosa) e irreversíveis (necrose e apoptose).

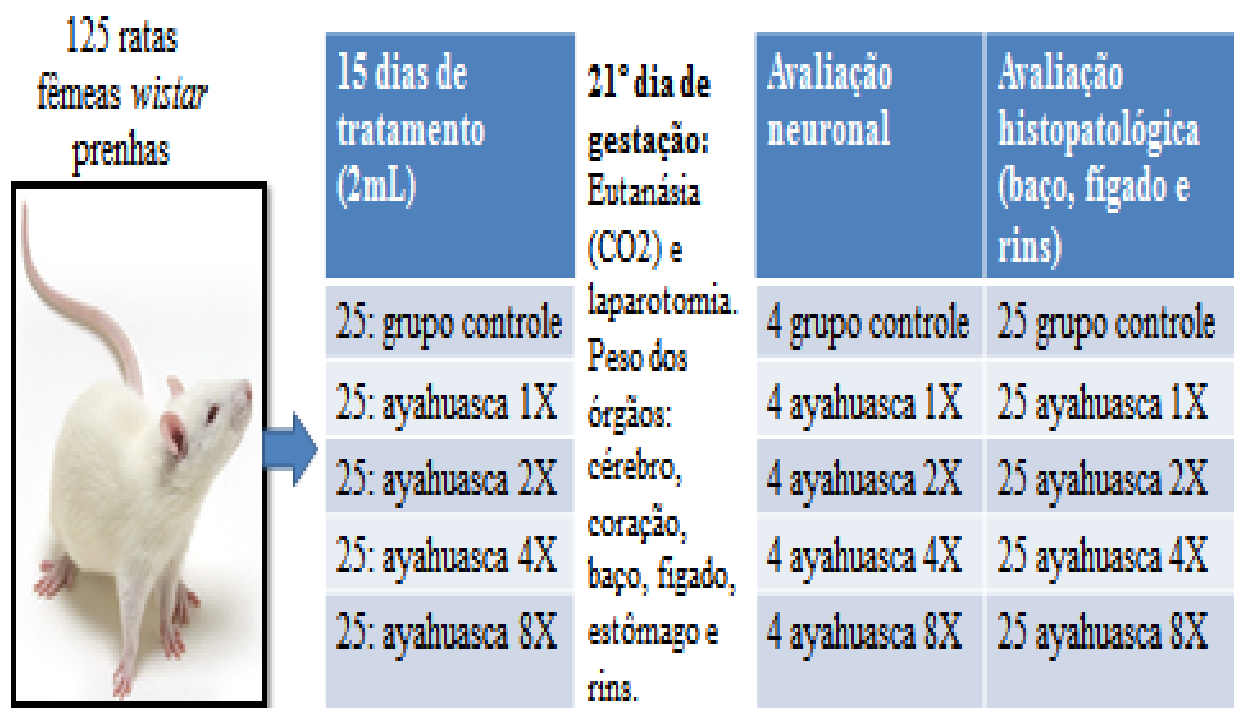
Foram avaliadas três lâminas de cada órgão, e cada lâmina analisada foi classificada com um valor numérico conforme: (1) alteração histológica presente, (2) alteração histológica ausente. Ao final, foram calculadas as médias desses valores para cada amostra.

#### **4.6 – Toxicidade crônica durante a gestação**

A avaliação da toxicidade crônica do chá da ayahuasca durante a gestação utilizando técnicas histológicas foi realizada no âmbito do estudo de Motta (2013) para avaliar a toxicidade reprodutiva e embriotoxicidade utilizando o protocolo OECD-414 (OECD, 2001). Para o acasalamento, três ratas foram transferidas para a caixa de um macho durante as três últimas horas do período escuro (6 às 9 da manhã). Após este período, as fêmeas foram retiradas das caixas, realizou-se o lavado vaginal com solução fisiológica e coletado o esfregaço vaginal, que foi analisado em microscópio óptico (Olympus BX41) com aumento de dez vezes. O início da gestação (dia zero da prenhez = D0) foi confirmado após a verificação da presença de células

corneificadas e espermatozóides no esfregaço vaginal. As fêmeas que apresentavam esfregaço vaginal negativo eram novamente colocadas para acasalamento três dias depois.

Nesse estudo, 125 fêmeas prenhas foram divididas de forma aleatória em cinco grupos (N=25 cada), sendo um grupo controle e 4 grupos tratados nas doses de 1X, 2X, 4X e 8X. O grupo controle recebeu água filtrada. Em todos os grupos, o volume final de administração foi de 2 mL. As fêmeas foram tratadas diariamente do 6º ao 20º dia de gestação, que corresponde ao período de implantação, organogênese e o desenvolvimento fetal. No 21º dia, os animais foram eutanasiados com CO<sub>2</sub> e feita a laparotomia.



**Figura 7:** Delineamento experimental da toxicidade materna, reprodutiva e fetal com o chá de ayahuasca em ratas *Wistar* prenhas.

#### 4.6.1 - Toxicidade materna

Confirmada a gestação, a massa corporal e a ração foram mensuradas no dia zero, no 6º dia e, então a cada três dias até o 21º dia (eutanásia). Os animais foram observados após a primeira hora de tratamento e subsequentemente diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade incluindo sangramento vaginal e narinas, estresse, salivação, lacrimejamento, letargia, cianose, diarreia, piloereção, perda de coordenação motora, tremores, vocalização, contorções, convulsões, e óbito.

#### **4.6.1.1 – Eutanasia e laparotomia**

Os animais que sobreviveram aos tratamentos foram eutanasiados no 21º dia de gestação por exposição ao CO<sub>2</sub> e procedeu-se a laparotomia. Foram retirados o coração, baço, fígado, estômago e rins, que foram avaliados macroscopicamente quanto ao aspecto, coloração, tamanho e consistência. Os órgãos foram rapidamente lavados em solução salina (0,9% NaCl) e pesados. O baço, fígado e rins dos animais foram fixados em solução de formalina 4%, e processados para análise histológica como descrito no item 3.5.1..

#### **4.6.1.2 – Coleta do cérebro**

O cérebro de quatro animais de cada grupo foi retirado para avaliação histológica. Para retirada do cérebro da caixa craniana, a cabeça foi separada do resto do corpo do animal por um corte transversal na altura do pescoço. A pele que reveste o crânio foi retirada por meio de corte até a altura dos olhos do animal, os músculos removidos e o crânio exposto. Com uma tesoura de ponta fina, fez-se um pequeno corte na região de inserção da coluna vertebral em direção à sutura dos ossos na parte superior do crânio, tomando cuidado para que nenhuma das pontas da tesoura se aprofundasse, para não lesar o cérebro. A dura-máter foi removida com cuidado com o auxílio de uma tesoura de ponta fina, rompeu-se os nervos e ligamentos com uma espátula, e o encéfalo foi colocado em placa de Petri limpa e esterilizada. O encéfalo foi pesado e imediatamente colocado em substância de fixação (formalina 4% tamponada) durante 24 horas para subsequente armazenamento em solução de sacarose 30% em geladeira por no mínimo 72 horas antes do processamento para avaliação da perda neural.

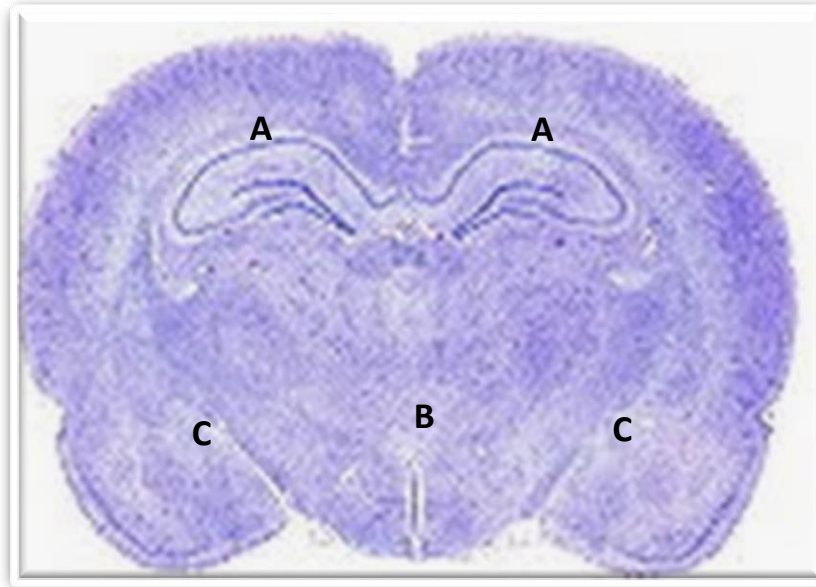
#### **4.6.1.3 - Avaliação de perda neuronal**

Foram selecionadas para estudo as seguintes regiões do cérebro: núcleo dorsal da Rafe, amígdala (núcleo basolateral posterior: BLP) e formação do hipocampo (giro denteado: GD, e áreas do *Cornu Ammonis* CA1, CA2, CA3) (Figura 8). Estas áreas correspondem a regiões ricas em receptores de serotonina no cérebro, e foram identificadas baseadas no livro *Rat Brain Atlas* (PAXINOS and WATSON, 2009).

De cada região, foram cortados fatias de 50 µm de espessura utilizando um micrótomo vibracional (KD 400). As fatias foram mantidas durante um mínimo de 48 horas em solução aquosa anti-congelante 0,2M (fosfato de sódio monobásico (6,25 g/L) e fosfato de sódio



dibásico (41,5 g/L) Após esse período, os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas gelatinizadas. Ao menos uma lâmina com duas fatias de cada uma das regiões do cérebro foram confeccionadas, coradas e analisadas (RASCore) para cada animal.



**Figura 8:** Representação esquemática do encéfalo demonstrando suas sub-regiões. **A:** hipocampo direito e esquerdo; **B:** núcleos da Rafe e **C:** complexo amigdalóide direito e esquerdo. Figura com adaptações, disponível em: [http://www.wesapiens.org/hosted\\_file/agtuYXR1cmFzY29wZXITCxIKSG9zdGVkRmlsZRI40s8BDA/](http://www.wesapiens.org/hosted_file/agtuYXR1cmFzY29wZXITCxIKSG9zdGVkRmlsZRI40s8BDA/)

Foi realizada a coloração Nissl para a detecção de perda neuronal. Após a montagem dos cortes em lâminas gelatinizadas, esperou-se 20 minutos para aderência das mesmas, e procedeu-se ao processo de diafanização, que consiste em dois banhos de xilol (Vetec) com duração de 2 minutos cada. Para a hidratação do espécimen foi realizado banhos em álcool em concentrações decrescentes com duração de dois minutos cada: dois banhos de álcool 100%, dois banhos de álcool 95%, um banho de álcool 70% e um banho de álcool 50%. Para finalizar a hidratação, foi efetuado um banho de água destilada por 2 minutos. As lâminas foram coradas em solução de cresil violeta por 7 minutos e o excesso do corante foi retirado por mergulhos em água destilada.

A desidratação dos cortes consistiu em 5 mergulhos das laminas em álcool 50% seguidos de 5 mergulhos em álcool 70%. Para melhor fixação da coloração, foi realizada uma imersão rápida em solução de ácido acético:álcool (1:100). O espécimen foi submetido a sucessivos banhos de álcool em concentração crescente: um banho em álcool 70%, três banhos em álcool 96% seguidos de três banhos de álcool 100% com duração um minuto cada. O espécimen foi

então diafanizado novamente, com dois banhos de xilol (2 minutos). Colocou-se finalmente uma gota de Enthelan (Merck) sobre o espécimen e fechou-se a lâmina com lamínula.

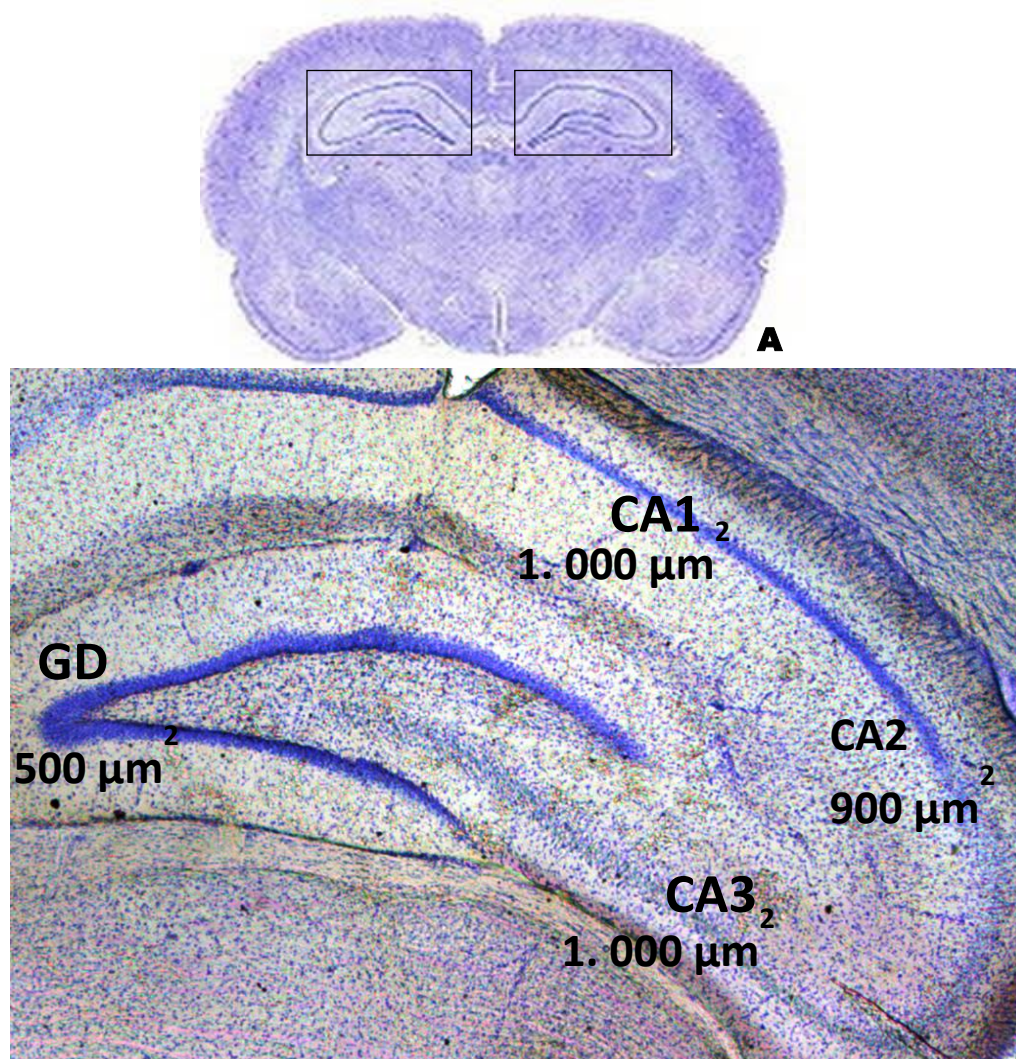
Foram utilizados dois cortes seriados de cada região do cérebro para cada animal com distância de 50  $\mu\text{m}$  entre eles. A avaliação do grau de perda neuronal foi feita com a utilização de um microscópio de marca LEICA DM 2000, com aumento 10x, 20x e 40x. O software de análise utilizado acoplado junto ao microscópio foi o Leica Application Suite (LAS) V4.1 Core. Foi atribuído um escore para cada uma das regiões, de cada hemisfério do hipocampo e amígdalas, e da região central dos núcleos da Rafe, de acordo com a Tabela 1.

Os achados referentes aos animais do grupo controle foram utilizados para a caracterização do padrão de 100% de neurônios viáveis e saudáveis (escore 0; Tabela 1). A contagem de neurônios viáveis das mesmas áreas avaliadas previamente serviu para uma análise quantitativa dos cortes. Todas as imagens capturadas para posterior análise foram codificadas, e a correspondência com o grupo experimental não era de conhecimento do avaliador.

**Tabela 1.** Escores utilizados na avaliação do grau de lesão neuronal.

<b>Escore</b>	<b>Percentual de neurônios saudáveis (núcleo e nucléolo evidentes)</b>
0	100%
1	> 75 % e < 100 %
2	> 50 % a 75 %
3	> 25 % a 50 %
4	$4 \leq 25 \%$

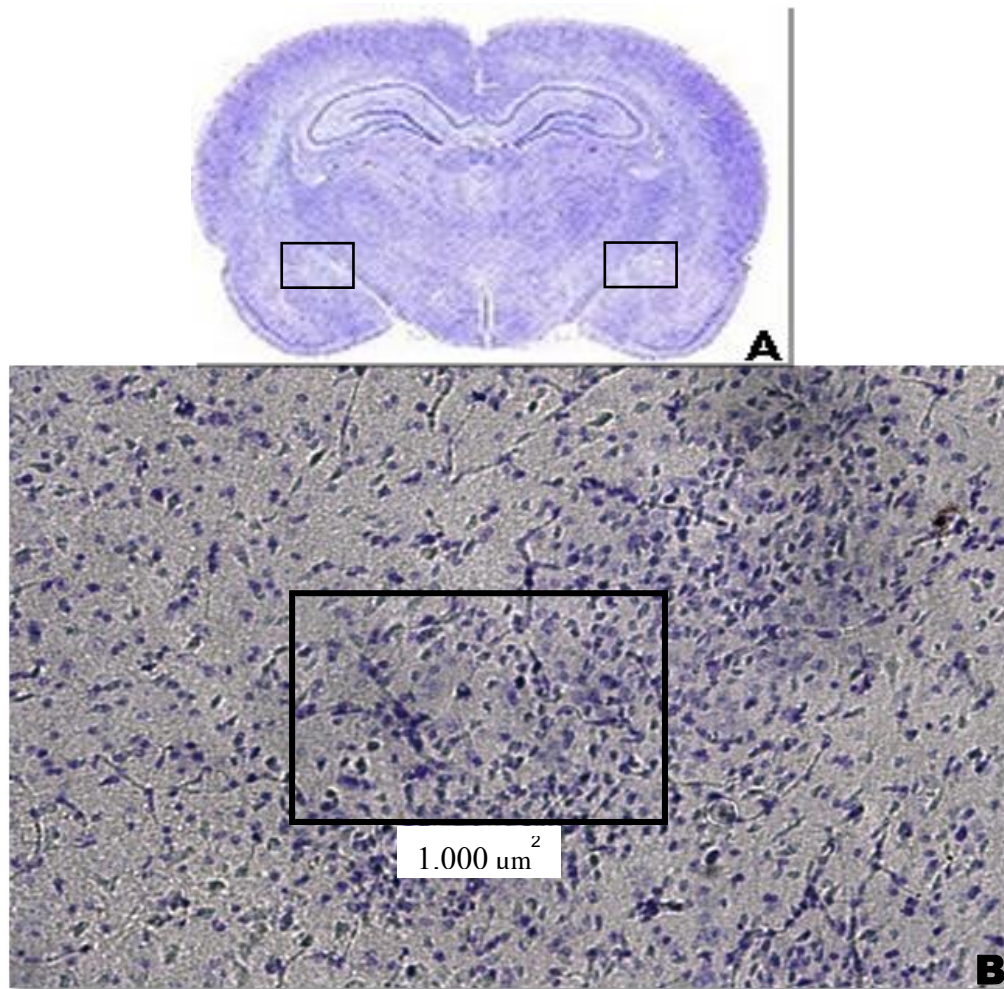
A contagem de neurônios do hipocampo direito e esquerdo foi feita num perímetro 500  $\mu\text{m}$  para a área da ponta do giro denteado, 1.000  $\mu\text{m}$  para a área de CA1 e CA3 e 900  $\mu\text{m}$  para a área de CA2, como mostrado na Figura 9.



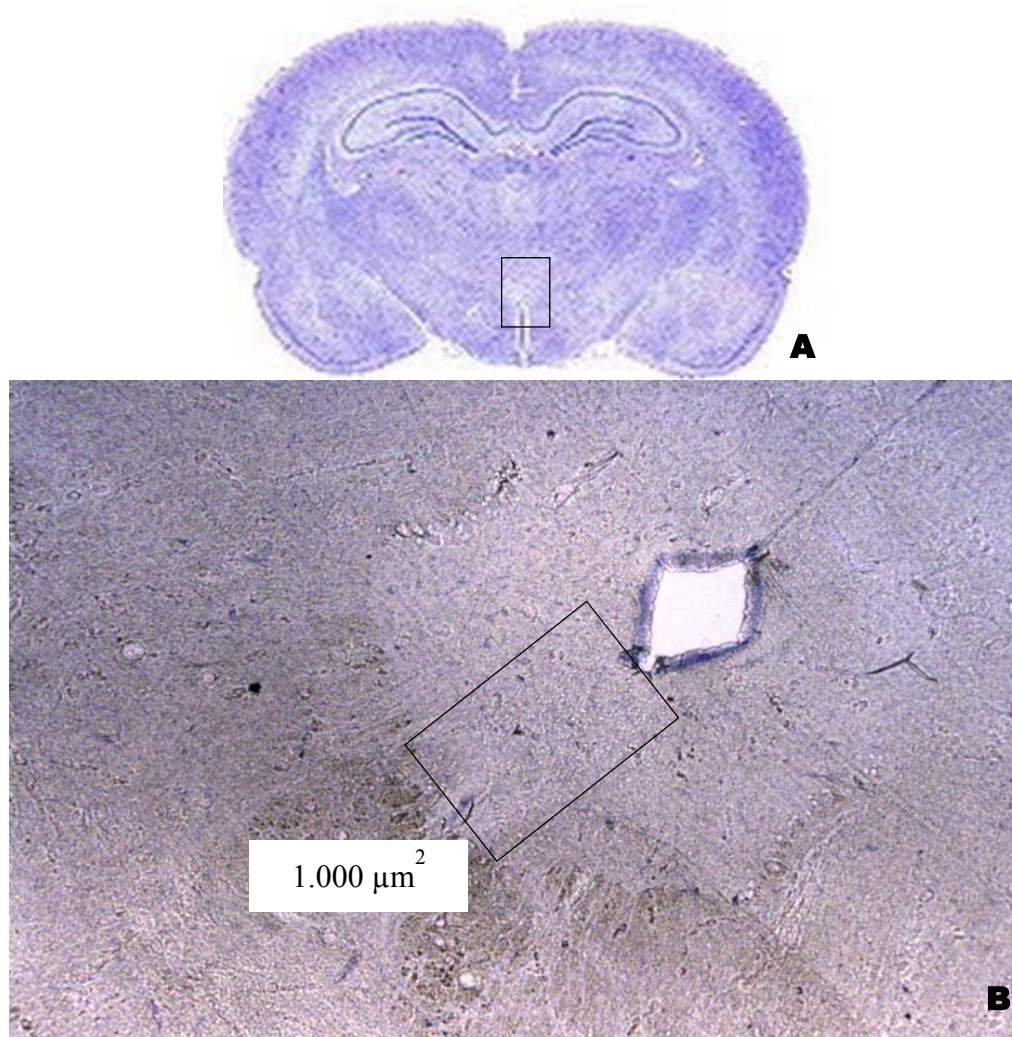
**Figura 9:** Representação esquemática do hipocampo (A) e suas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e GD (B), onde foi realizada a quantificação neuronal pela técnica de Nissl, aumento de 40x.

Para as amígdalas e núcleos da Rafe, o perímetro para avaliação neuronal foi de 1.000 μm (Figuras 10 e 11). Foram contados todos os neurônios no interior da área delimitada e aqueles em contato com a linha de limitação. Todas as contagens foram avaliadas no aumento de 200x. O resultado final foi a média dos três cortes que correspondeu ao número total de neurônios mostrados em cada uma das regiões: hipocampo e amígdalas (direito e esquerdo) e área central dos núcleos da Rafe.





**Figura 10:** Representação esquemática do complexo amigdalóide (A) onde foi realizada a quantificação neuronal (B) pela técnica de Nissl em  $1.000 \mu\text{m}^2$ . Os neurônios em contato com a área de delimitação foram incluídos na contagem. Aumento de 200x.



**Figura 11:** Representação esquemática da região dos núcleos dorsais da Rafe (A) onde foi realizada a quantificação neuronal (B) pela técnica de Nissl em  $1.000 \mu\text{m}^2$ . Os neurônios em contato com a área de delimitação foram incluídos na contagem, aumento de 100x.

#### 4.7 - Análise estatística

Para o ganho de peso materno e consumo de ração a análise estatística dos dados foi realizada pela análise da variância de uma via (ANOVA), *Tukey* (peso materno), teste *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney* (ganho de peso materno e consumo de ração). Para a análise de perda neuronal foi utilizado ANOVA seguido de *Tukey*, e para a histologia dos órgãos da cavidade corporal (baço, fígado e rins) foi utilizado o teste *Qui-quadrado* para determinação de associação entre dose e lesão; quando houve significância, foi empregado o *Teste Exato de Fisher*, entre o grupo controle e cada grupo tratado. Em todos os casos a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados com o programa IBM SPSS Statistics 20 ou Prisma.

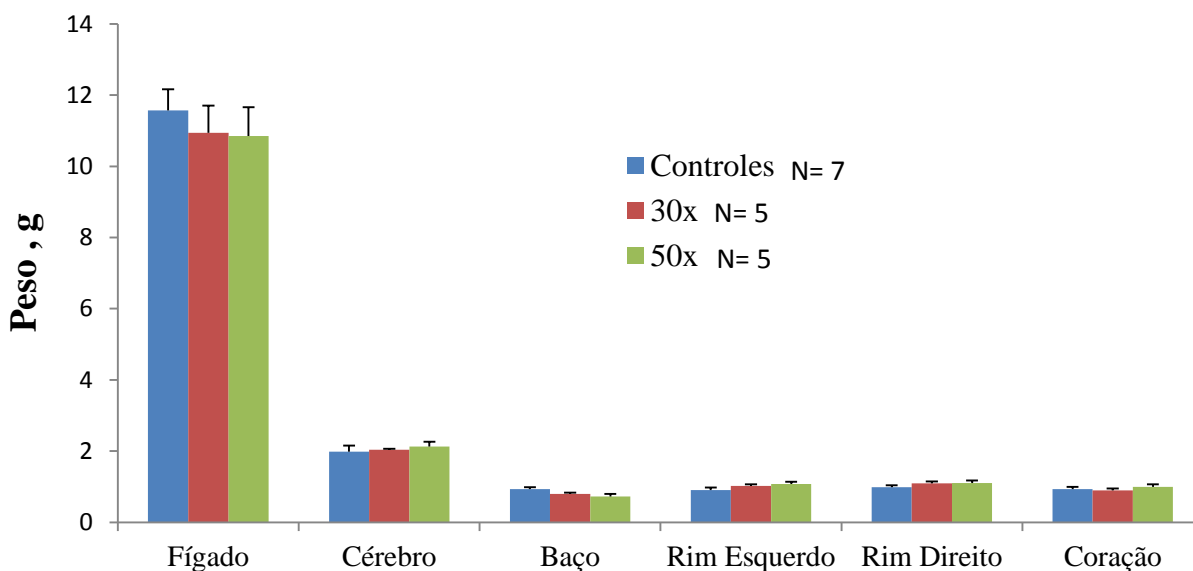
## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Toxicidade aguda

Durante o teste de toxicidade aguda segundo o protocolo OECD 423, foi observado um óbito entre os seis animais tratados com a dose inicial de 30X, que ocorreu duas horas após a gavagem. Segundo o protocolo, quando o número de óbitos é inferior a 2 por cada grupo de 3 animais, o teste deve ser repetido com uma dose maior, que nesse experimento foi de dose para 50X a dose ritual, dose máxima possível devido a dificuldade para solubilizar o chá liofilizado em 3 mL. Nesse grupo de seis animais ocorreu também um óbito, cinco horas e 40 minutos após a gavagem. Esses óbitos foram precedidos de piloereção e tremores seguidos de convulsões. Dessa maneira, a LD50 do chá é maior que 50X a dose usual, indicando baixa toxicidade aguda.

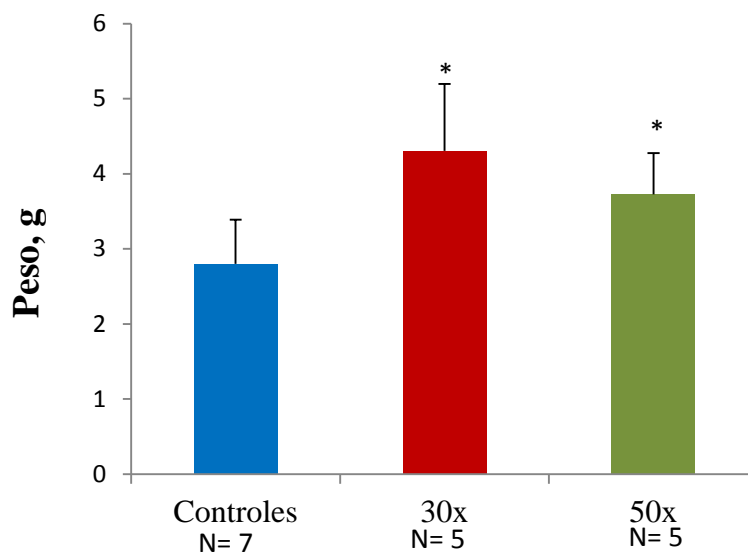
#### 5.1.1 - Peso dos órgãos

Não houve diferença significativa no peso do cérebro, baço, coração, fígado e rins dos animais tratados com ayahuasca em comparação ao grupo controle (Figura 12). Porém, houve um aumento significativo no peso do estômago dos animais dos grupos tratados em comparação ao grupo controle (Figura 13).



**Figura 12:** Peso dos órgãos de ratos *Wistar* tratadas com 30 e 50X a dose usual. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por letras diferentes. Os resultados foram analisados por *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

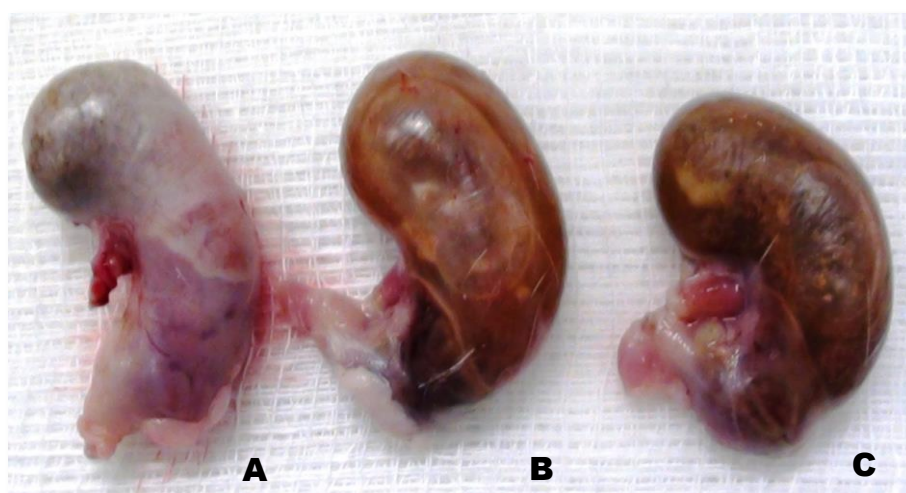




**Figura 13:** Peso do estômago dos animais controle e tratados com a ayahuasca nas doses 30X e 50X a dose usual. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por \*. Os resultados foram analisados por *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

### 5.1.2 - Avaliação macroscópica dos órgãos

Não foi observada nenhuma alteração macroscópica no cérebro, fígado, rins, baço e coração. Porém o estômago de todos os animais tratados com ayahuasca estavam dilatados no momento da necropsia 14 dias após o tratamento, com um aumento significativo no tamanho e alteração da coloração em comparação com ao grupo controle (Figura 14).



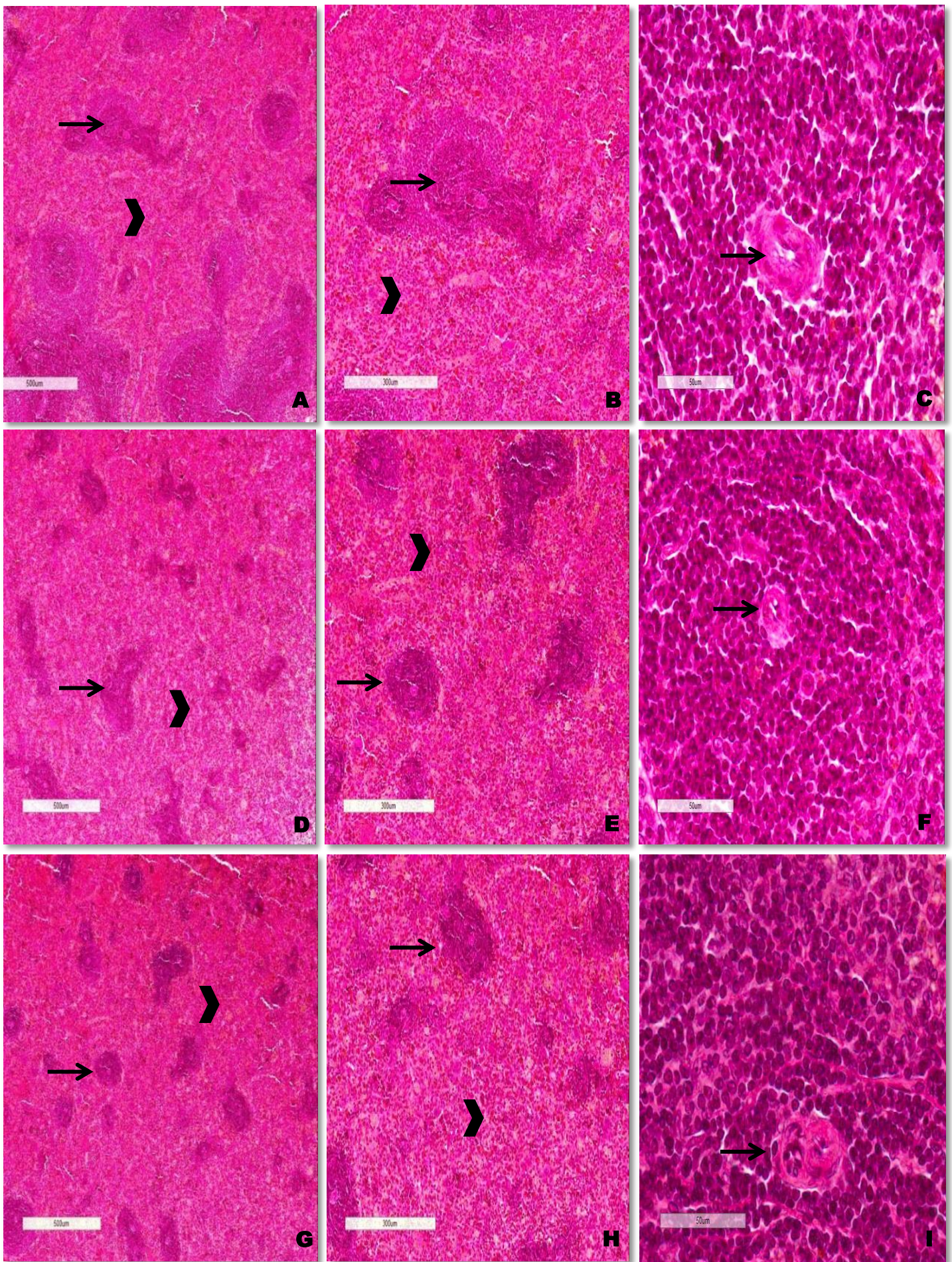
**Figura 14:** Diferença morfológica (tamanho e aspecto) do estômago dos animais do estudo. **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 30X e **C:** ayahuasca 50X.

### **5.1.3 – Análise histológica do baço, fígado e rins**

Não foram realizadas análises histológicas dos órgãos dos animais que foram a óbito durante o experimento. Para os animais que finalizaram o experimento, a eutanásia seguida de necropsia foi efetuada no 14º dia após o tratamento com chá de ayahuasca. Os rins e fragmentos de baço e fígado foram retirados e submetidos ao processamento histológico com a finalidade de examinar prováveis alterações morfológicas microscópicas nos respectivos órgãos sobre o efeito do tratamento. Os cortes foram corados com HE (hematoxilina e eosina) para a observação das características gerais, e analisadas em microscopia ótica.

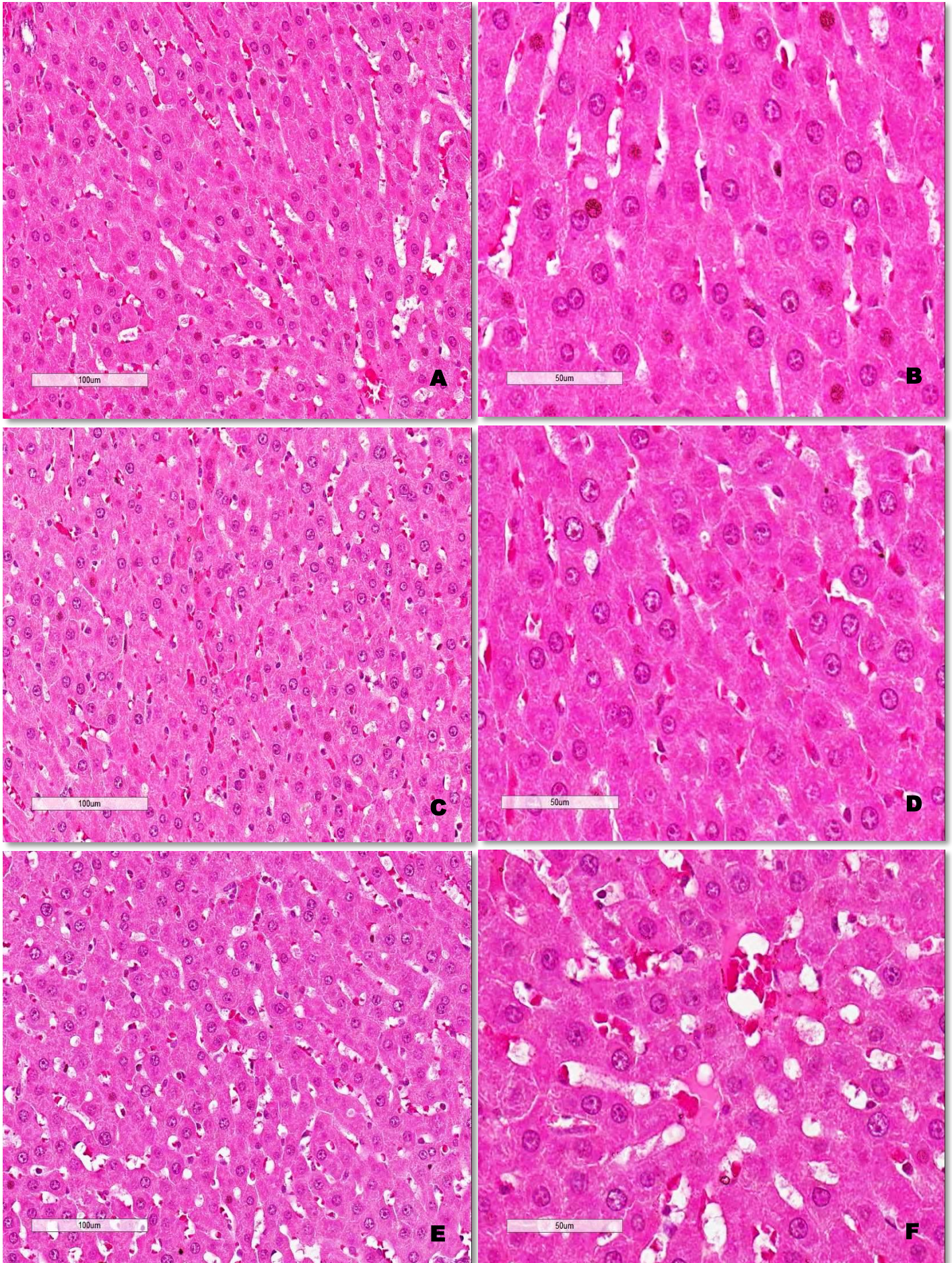
Todas as alterações histológicas observadas no fígado, baço e rins dos animais tratados foram de intensidade leve, ou seja, representam menos de 25% do campo analisado, e não foram consideradas relevantes. No baço a organização do tecido foi semelhante em todos os grupos, com a polpa branca/nódulo linfático bem delimitado (seta), e polpa vermelha bem evidente (cabeça de seta) (Figura 15). O fígado apresentou-se com cordões de hepatócitos bem organizados e semelhantes tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados (Figura 16). A histologia dos rins mostra a organização medular (Figura 17 A, C e E) dos grupos ayahuasca 30X e 50X, similar ao grupo controle. Os glomérulos renais se apresentaram com parâmetros de normalidade em todos os grupos do estudo (Figura 17 B, D e F).





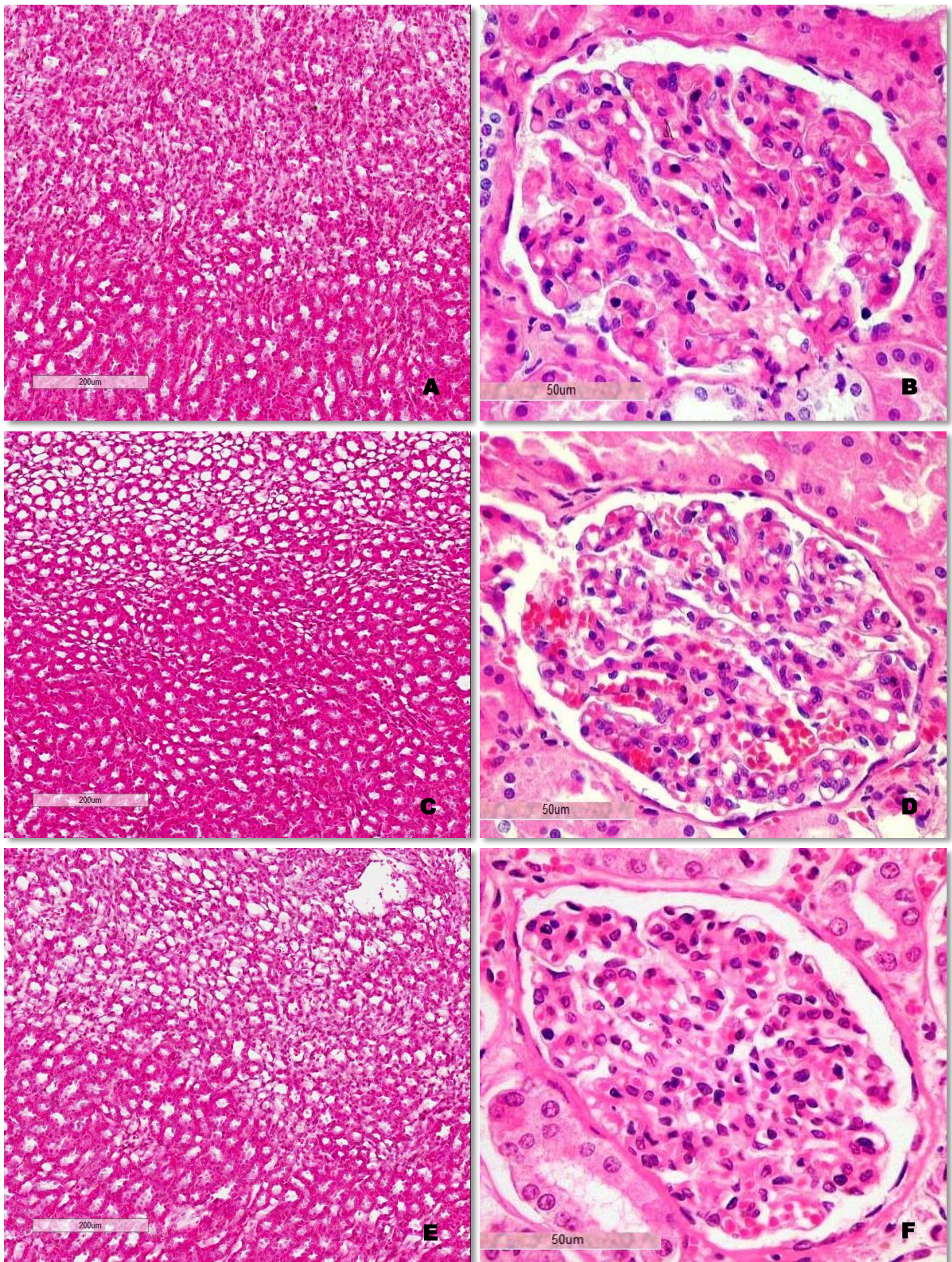
**Figura 15:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de baço de ratas pertencentes aos três grupos de estudo. **A a C** - grupo controle ; **D a F** - ayahuasca 30X; **G a I** - ayahuasca 50X. Polpa branca/nódulo linfático bem delimitado (seta) e polpa vermelha bem evidente (cabeça de seta). Aumentos 40x, 80x e 400x, respectivamente. Coloração HE.





**Figura 16:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do fígado de ratas pertencentes aos três grupos de estudo. **A e B:** grupo controle, **C e D:** ayahuasca 30X, **E e F:** ayahuasca 50X. Aumento de 200x e 400x respectivamente. Coloração HE.



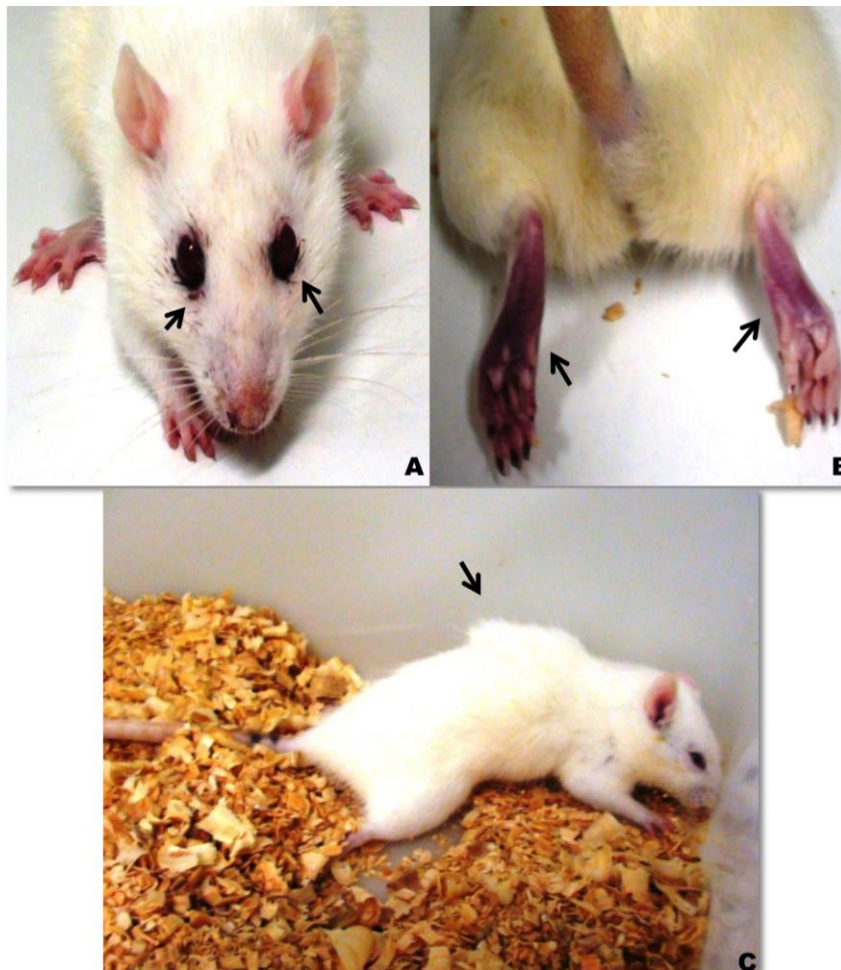


**Figura 17:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos da região medular e dos glomerulos renais dos rins de ratas pertencentes aos três grupos de estudo. **A e B:** grupo controle, **C e D:** ayahuasca 30X, **E e F:** ayahuasca 50X. Aumento de 100x e 400X, respectivamente. Coloração HE.



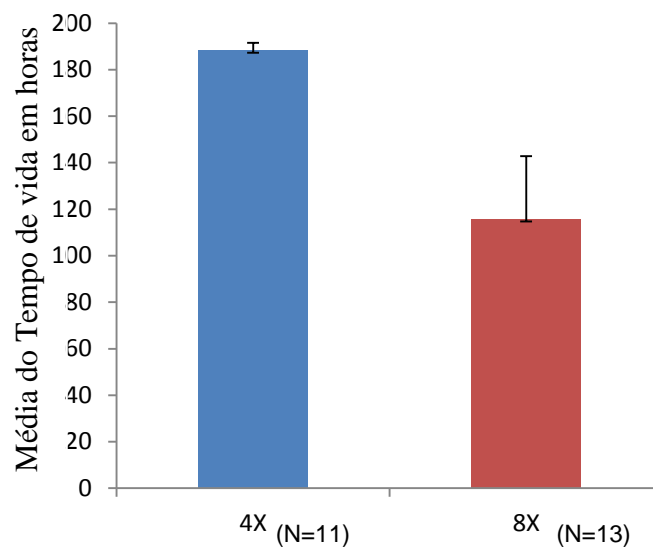
## 5.2 – Toxicidade Crônica

Para toxicidade crônica, foi utilizado o protocolo da OECD 414, com 4 grupos tratados (ayahuasca 1X, 2X, 4X e 8X) durante 15 dias do período gestacional (6<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dia). Os animais foram observados diariamente quanto a sinais clínicos, e peso corporal e consumo de ração foram mensurados a cada três dias. Durante o período de estudo, ocorreram 11 óbitos no grupo ayahuasca 4X e 13 óbitos no grupo de ayahuasca 8X. As mortes foram precedidas de sinais clínicos de toxicidade como tremores, cromodacriorréia, piloereção, lordose, cianose e convulsão, após a intoxicação pelo chá de ayahuasca (Figura 18). O início dos sinais clínicos descritos aconteceu aproximadamente 10 minutos após a gavagem. Não foi feito necropsia nestes animais.



**Figura 18:** Sinais clínicos observados em ratas *Wistar* durante o tratamento com o chá de Ayahuasca nas doses 4X e 8X. **A:** Cromodacriorréia (setas), **B:** cianose (setas), **C:** lordose e piloereção (seta) em uma rata no momento da convulsão.

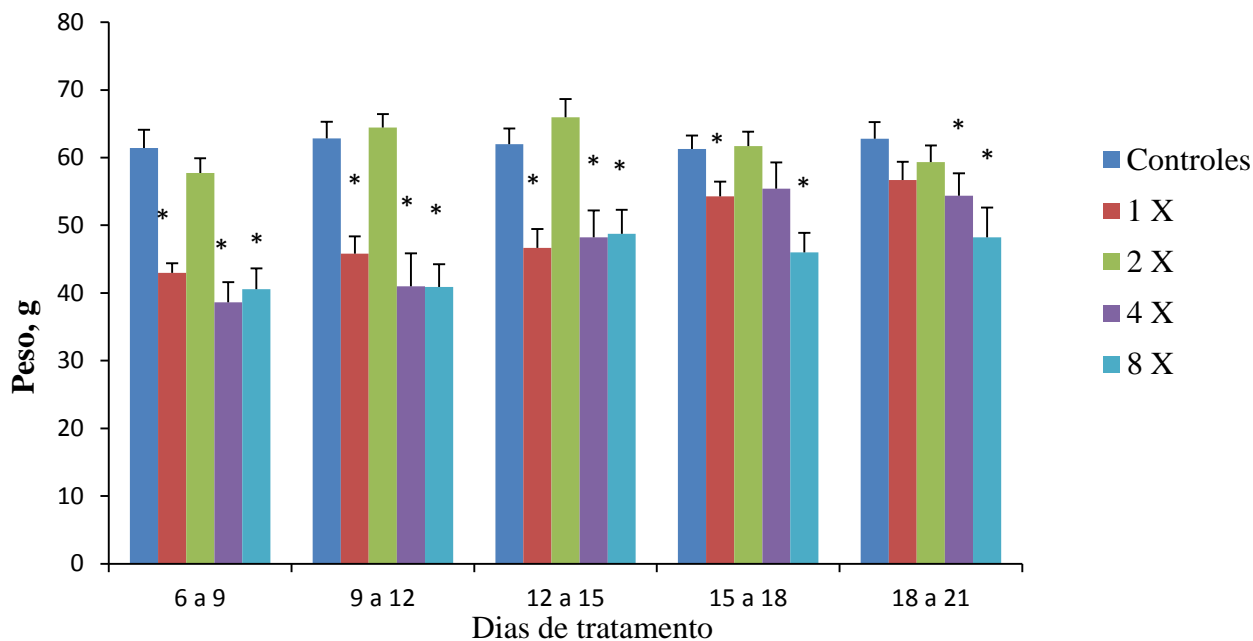
Não foram realizadas necropsias nos animais que foram a óbito, principalmente por que muitos foram a óbito durante a noite, sem a presença do pesquisador. Nesse caso, assumiu-se que o óbito ocorreu 12 horas após a administração. Foi observado que os óbitos no grupo ayahuasca 4X tiveram início 96 horas após o início do tratamento, enquanto que no grupo ayahuasca 8X os óbitos iniciaram-se 48 horas após o início do tratamento. A Figura 19 contabiliza o tempo de vida em horas dos animais dos grupos 4X e 8X que chegaram a óbito. Observa-se que os animais do grupo de 4X tiveram o tempo de vida maior do que aqueles do grupo de ayahuasca 8X, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.



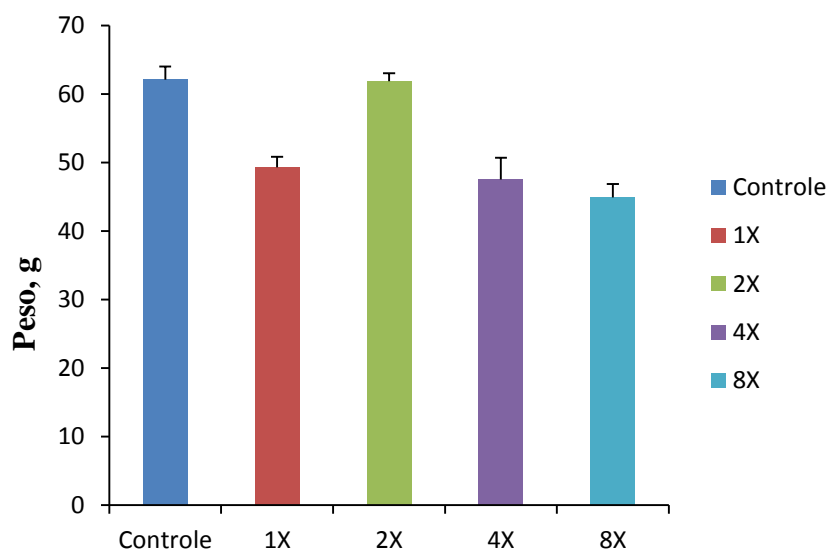
**Figura 19:** Tempo de vida em horas das fêmeas dos grupos ayahuasca 4X e 8X que foram a óbito. Os valores estão expressos em média e erro padrão. Os resultados foram analisados pelo teste de *U Mann-Whitney*.

### 5.2.1 - Avaliação do consumo de ração e do ganho de peso corpóreo

Os resultados do consumo de ração e ganho de peso (GP) corpóreo das ratas tratadas com ayahuasca e controles estão apresentados nas Figuras 20 a 22. Foi observada que os animais do grupo controle consumiram significativamente mais ração ao longo dos 15 dias quando comparados com os animais dos grupos de 1X, 4X e 8X. Porém não houve diferença significativa entre o consumo de ração do grupo controle e o grupo ayahuasca 2X ao longo do experimento (Figura 20). Além do mais, não houve diferença significativa no consumo de ração entre o grupo controle e os grupos tratados com ayahuasca no fim do estudo (Figura 21).

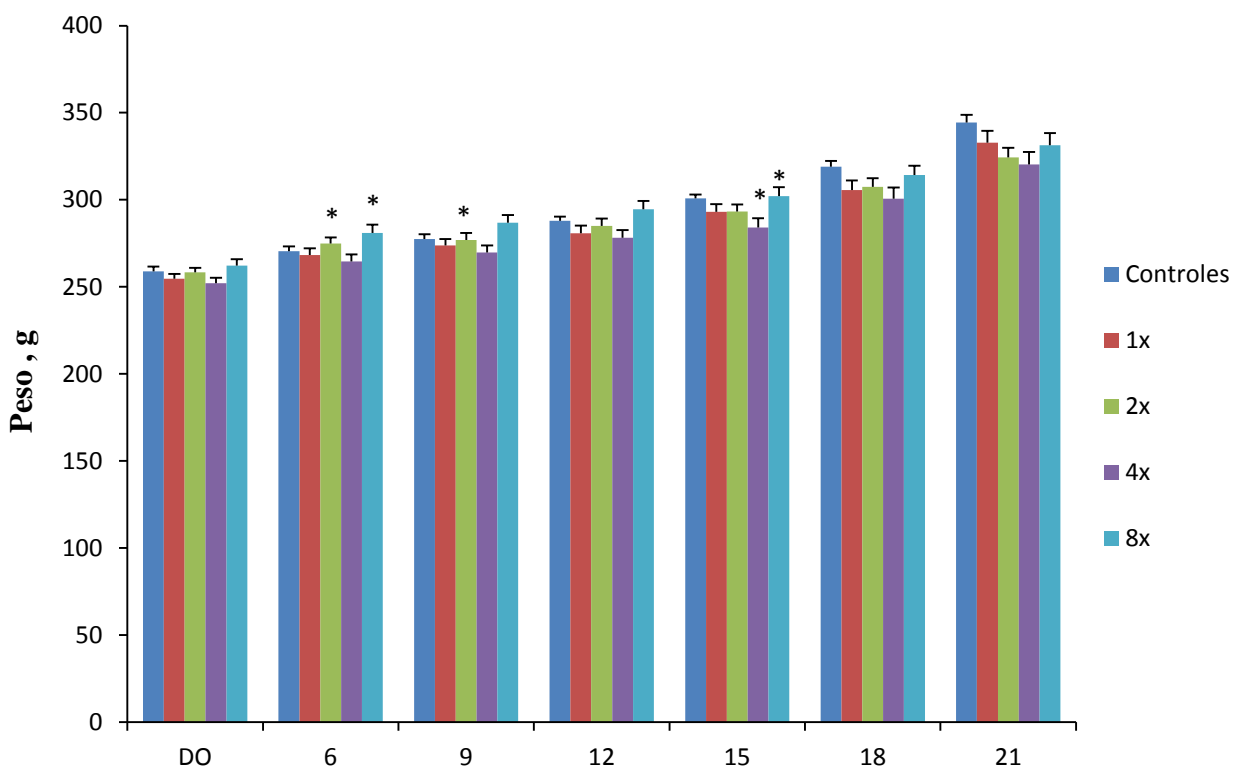


**Figura 20:** Consumo de ração em gramas dos grupos experimentais. Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por \*. Os resultados foram analisados por *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*



**Figura 21:** Média do consumo total de ração em gramas dos grupos experimentais. Os valores estão expressos em média e erro padrão. Os resultados foram analisados por *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*

O grupo ayahuasca 2X evidenciou um ganho de peso significativo quando comparado ao grupo controle no intervalo de tempo do primeiro ao nono dia de gestação, neste período os animais receberam três doses de tratamento (do 6<sup>o</sup> ao 9<sup>o</sup> dia). Porém após este período não houve ganho significativo. Com relação ao grupo ayahuasca 4X, foi observada uma desaceleração no ganho de peso no período do 12<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia de gestação, porém após esta fase, o ganho de peso foi similar aos outros grupos. No que diz respeito ao grupo ayahuasca 8X foi observado dois picos de aumento de massa corporal um até o sexto dia gestacional e um do 12<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia gestacional. Apesar destas flutuações no ganho de peso em grupos tratados, o peso final (dia 21) não foi alterado significativamente.



**Figura 22:** Ganho de peso corpóreo em gramas dos grupos experimentais. Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por \*. Os resultados foram analisados por *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

### 5.2.2 - Peso dos órgãos

O peso dos órgãos está relacionado de modo direto com a atividade metabólica, bem como o próprio peso corpóreo do animal. Os resultados obtidos do peso dos órgãos dos grupos experimentais estão mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Peso dos órgãos de ratas *Wistar* controles e tratadas com chá de ayahuasca durante ao período gestacional (6° ao 20° dia).

	<b>Controle</b>	<b>1X</b>	<b>2X</b>	<b>4X</b>	<b>8X</b>
		<b>N= 25</b>	<b>N= 25</b>	<b>N= 14</b>	<b>N= 12</b>
Baço	0,86±0,03	0,81±0,03	0,86±0,03	0,79±0,04	0,90±0,05
Cérebro	2,07±0,04	1,99±0,03	2,00±0,02	1,97±0,03	2,08±0,03
Coração	0,98±0,02 <sup>a</sup>	0,94±0,02 <sup>a</sup>	1,01±0,03 <sup>b</sup>	0,89±0,02 <sup>a</sup>	1,05±0,06 <sup>a</sup>
Estômago	4,33±0,34 <sup>a</sup>	6,82±0,63 <sup>b</sup>	6,58±0,48 <sup>b</sup>	4,19±0,44 <sup>a</sup>	6,88±1,15 <sup>b</sup>
Fígado	13,86±0,43	13,50±0,36	13,62±0,27	13,09±0,44	13,71±0,44
Rim direito	1,01±0,02	0,98±0,02	1,00±0,02	0,96±0,03	1,03±0,03
Rim esquerdo	0,96±0,02	0,93±0,02	0,95±0,02	0,90±0,02	1,00±0,03

Os valores estão expressos em média ± erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por letras diferentes. Os resultados foram analisados por *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

Não foi encontrado variações significativas no peso do baço, cérebro, fígado e rins dos animais dos cinco grupos experimentais. Foi observado aumento significativo do peso do coração nos animais do grupo ayahuasca 2X com relação a todos os outros grupos. O peso do estômago foi significativamente maior nos grupos de tratamento 1X, 2X e 8X quando comparado ao grupo controle, porém este aumento não foi observado no grupo 4X.

### 5.2.3- Análise macroscópica dos órgãos

Na avaliação macroscópica, alguns órgãos apresentaram alterações relevantes, como mostrados na Tabela 3.

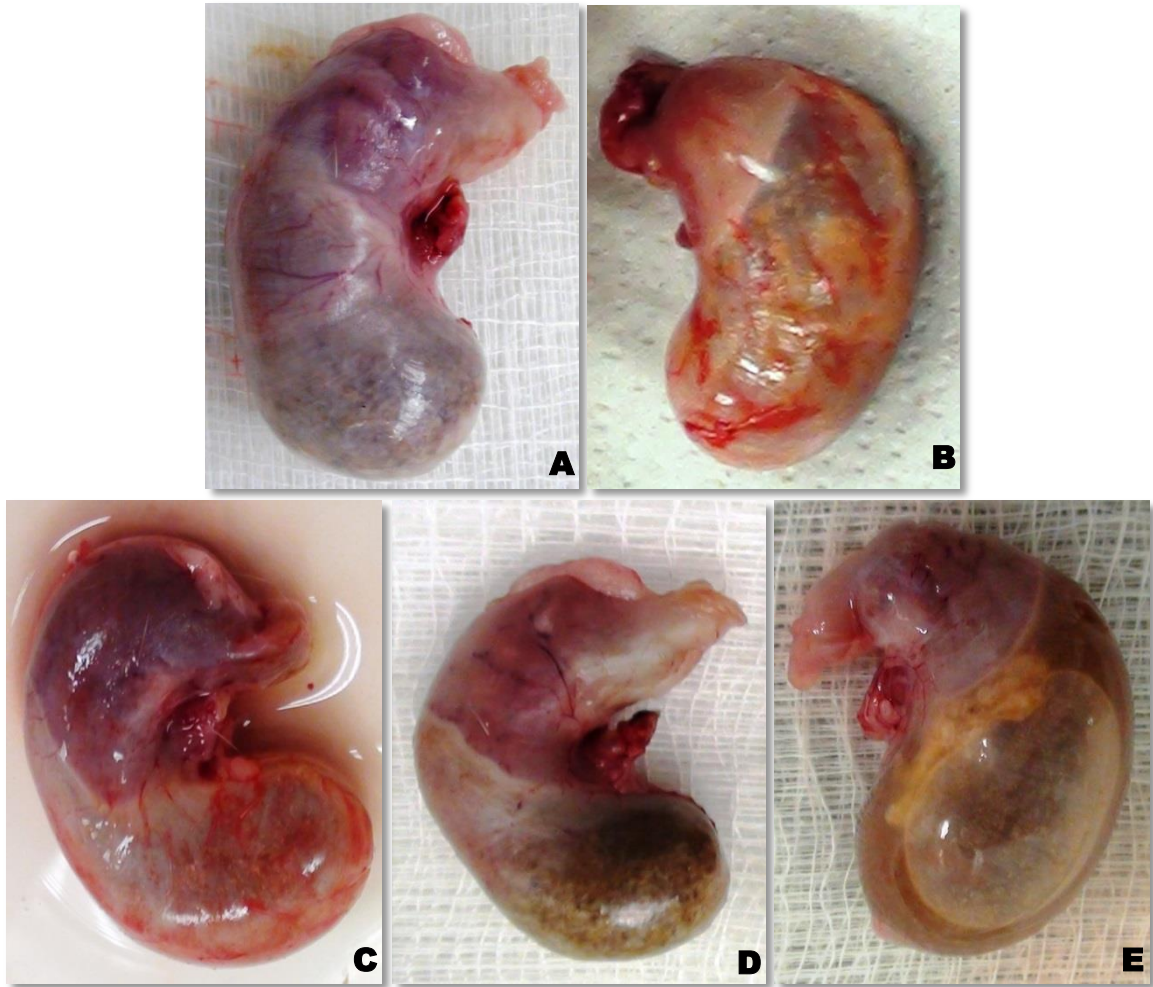


**Tabela 3:** Alteração macroscópica dos órgãos de ratas *Wistar* controles e tratadas com chá de ayahuasca durante ao período gestacional (6° ao 20° dia).

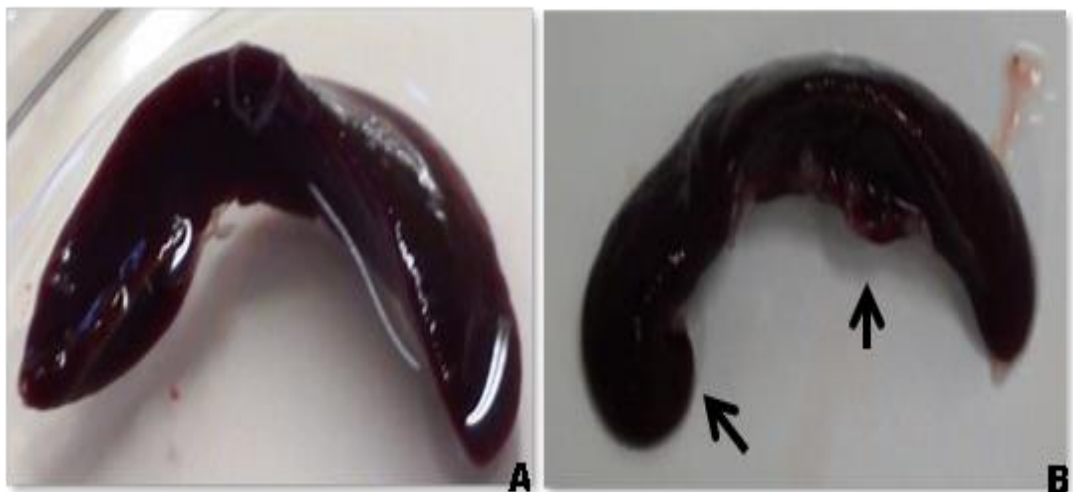
	<b>Controle</b>	<b>1X</b>	<b>2X</b>	<b>4X</b>	<b>8X</b>
	<b>N=25</b>	<b>N=25</b>	<b>N=25</b>	<b>N=14</b>	<b>N=12</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
Baço c/ forma irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)
Estômago dilatado	1 (4)	10 (40)*	4 (16)	1 (7,1)	6 (50)*
Fígado amarelado	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	1 (8,3)
Fígado c/ necrose gordurosa enzimática	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	2 (16,7)
Intestino dilatado	6 (24)	9 (36)	8 (32)	3 (21,4)	10 (83,3)*

Os valores estão expressos em numero de casos (N) e porcentagens. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por \*. Os resultados foram analisados por *Qui-quadrado* seguido de *Teste Exato de Fisher*.

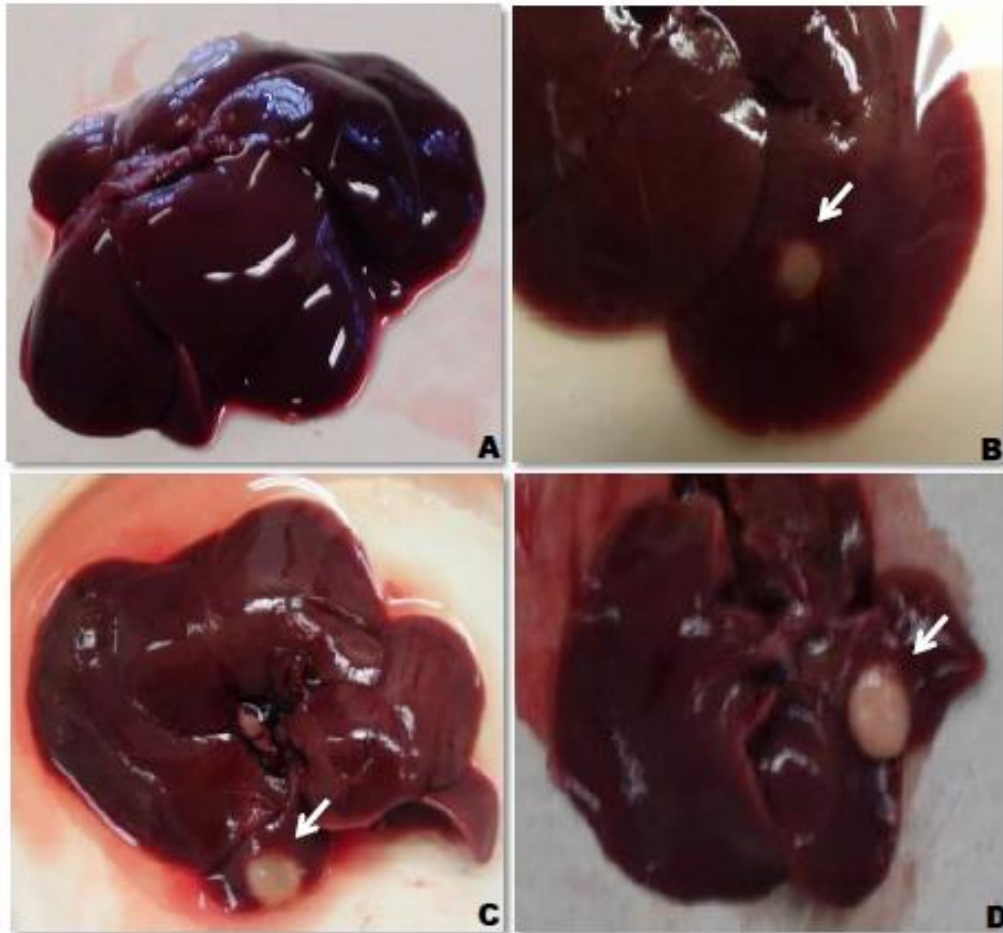
Algumas dessas alterações, como estômago (Figura 23) e intestino dilatados foram constatadas em todos os grupos de experimento. Formas irregulares foram identificadas no baço de um animal do grupo ayahuasca 8X (Figura 24), porém sem associação significativa entre dose e alteração macroscópica. Foi observado estômago dilatado em todos os grupos estudados, porém esta diferença só foi estatisticamente significativa em relação ao controle nos grupos de 1X e 8X, portanto sem correlação com a dose. O fígado um animal do grupo ayahuasca 4X e dois do grupo ayahuasca 8X apresentaram-se amarelados, edemaciados e com necrose gordurosa enzimática (Figura 25). Para a alteração “intestino dilatado” houve diferença significativa para o grupo de tratamento ayahuasca 8X comparado ao grupo controle. Não foram encontradas alterações macroscópicas no cérebro, coração e rins das ratas tratadas com ayahuasca.



**Figura 23:** Alterações macroscópicas no estômago de ratas *Wistar* tratadas com ayahuasca. **A:** grupo controle; **B:** ayahuasca 1X; **C:** ayahuasca 2X; **D:** ayahuasca 4X e **E:** ayahuasca 8X.



**Figura 24:** Alterações macroscópicas no baço de ratas *Wistar* tratadas com ayahuasca. **A:** baço de um animal do grupo controle, **B:** baço de um animal do grupo ayahuasca 8X, notar formas irregulares (setas).



**Figura 25:** Alterações macroscópicas no fígado de ratas *Wistar*. **A:** fígado de um animal do Grupo Controle. **B:** fígado de um animal do grupo ayahuasca 4X. **C e D:** fígado de animais do grupo ayahuasca 8X. Notar a formação necrose gordurosa enzimática (setas).

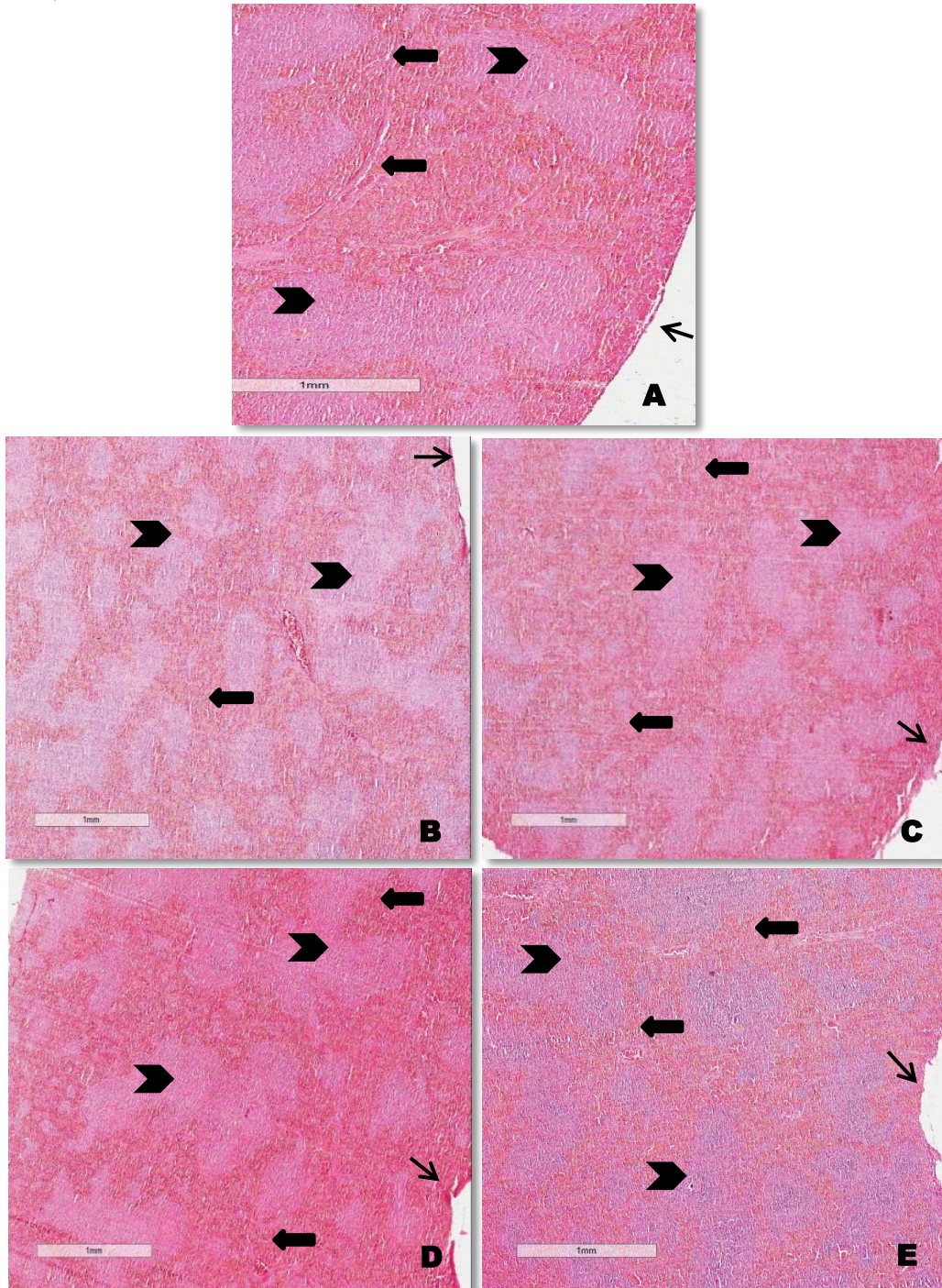
#### **5.2.4 - Análise histológica do baço, fígado e rins pela microscopia óptica**

Para o estudo crônico, não foi efetuado estudo histológico dos órgãos dos animais que foram a óbito antes do fim do experimento (grupos 4X e 8X). Os rins e fragmentos de baço e fígado dos animais que foram eutanasiados no 21º dia de gestação foram retirados durante a necropsia e submetidos ao processamento histológico com a finalidade de examinar alterações morfológicas detectáveis devido ao tratamento. Os cortes foram corados com HE (hematoxilina e eosina) para a observação das características gerais. Todas as alterações histológicas observadas nos órgãos dos animais do teste crônico, foram de intensidade leve, ou seja representam menos de 25% do campo analisado



### 5.2.4.1 - Análise histológica do Baço

Nos animais tratados e do grupo controle, foi observado a preservação da capsula e das trabéculas, com a polpa branca bem evidenciada e sem alterações, com nódulos linfáticos preservados e a polpa vermelha com formações das trabéculas sem alterações histológicas (Figuras 26).



**Figura 26:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de baços de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo. **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 1X, **C:** ayahuasca 2X, **D:** ayahuasca 4X e **E:** ayahuasca 8X. Notar cápsula (seta fina), polpa branca bem delimitada (cabeça de seta) e polpa vermelha bem evidente (seta). Aumento de 100x. Coloração HE.

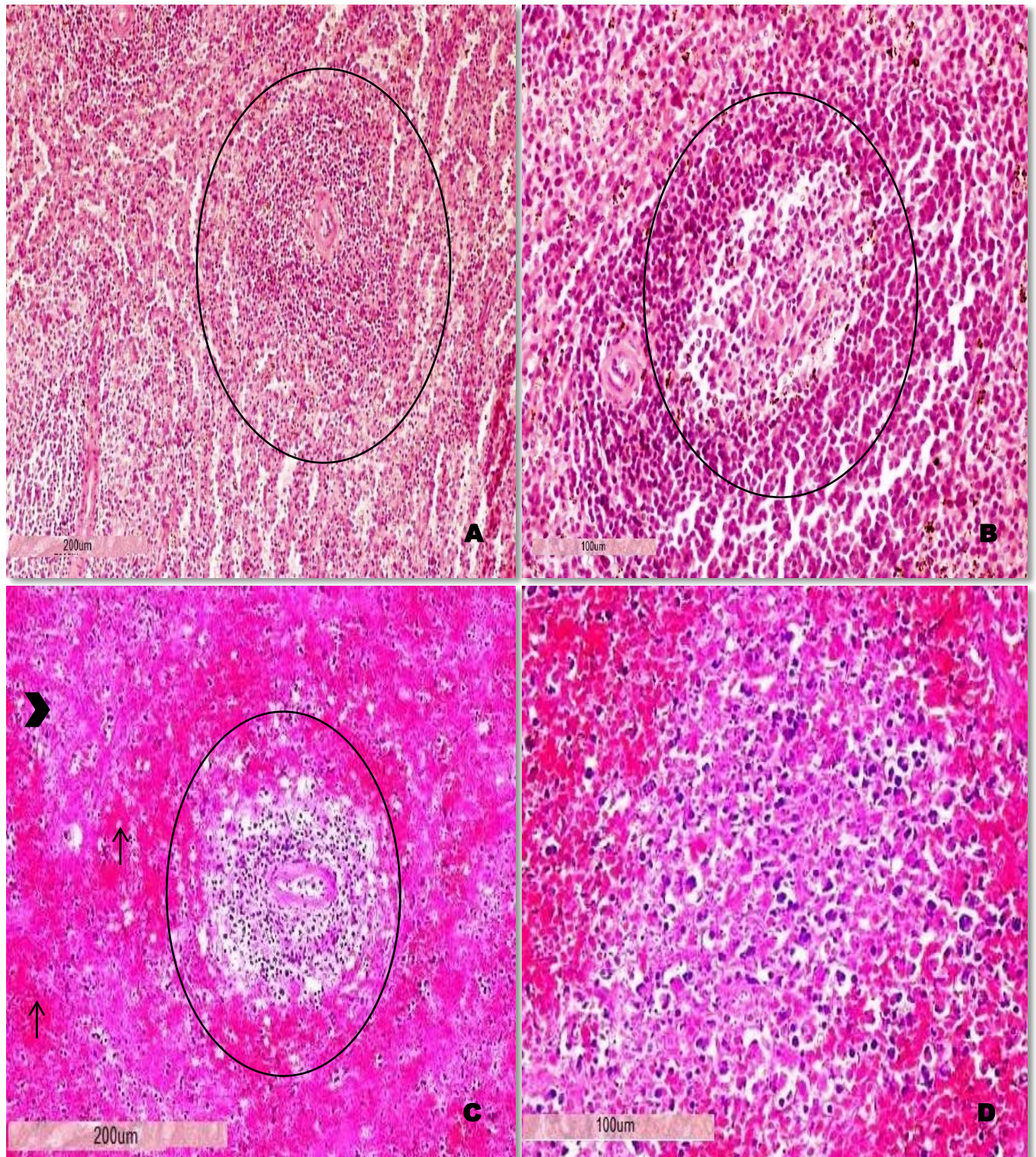
A Tabela 4 resume as alterações observadas no baço nos animais tratados e no grupo controle. Apesar do número de animais com alterações ser maior nos grupos tratados, as diferenças não foram significativas. A congestão e hemorragia são caracterizadas por uma coloração vermelha escura e degeneração das células (Figura 27 C) (ROBINS & COTRAN, 2005). Focos isolados de alterações severas como a necrose (Figura 27 C e D) foram encontrados em animais dos grupos tratados com as maiores doses (ayahuasca 4X e 8X). A necrose é um tipo de lesão irreversível que envolve grande edema celular, desnaturação e coagulação das proteínas (ROBBINS & COTRAN, 2005; BOGLIOLO, 2011).

**Tabela 4:** Alterações histológicas encontradas no baço de ratas do grupo controle e dos vários grupos de tratamento com o chá de ayahuasca em suas respectivas doses.

	<b>Controle</b>	<b>1X</b>	<b>2X</b>	<b>4X</b>	<b>8X</b>
	<b>N=25</b>	<b>N=25</b>	<b>N=25</b>	<b>N=14</b>	<b>N=12</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
Congestão	1 (4)	2 (8)	2 (8)	2 (14,3)	3 (25)
Hemorragia	1 (4)	2 (8)	1 (4)	2 (14,3)	3 (25)
Necrose	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	1 (8,3)

Os valores estão expressos em numero de casos (n) e porcentagens. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por \*. Os resultados foram analisados por *Qui-quadrado* seguido de *Teste Exato de Fisher*.





**Figura 27:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de baços de ratas pertencentes aos grupos **A:** grupo controle, a polpa branca aparece bem delimitada (círculo), aumento de 100x **B:** Região mostrada em **A** com aumento de 200x. **C:** ayahuasca 4X, congestão (cabeça de seta), hemorragia (seta) e nódulo linfático em processo necrótico (círculo), aumento de 100x. **D:** ayahuasca 8x, necrose na polpa branca, aumento de 200x. Coloração HE.



#### 5.2.4.2 – Analise histológica do Fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo (BOGLIOLO, 2006), sendo responsável pelo processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo. Este órgão é vulnerável a uma ampla variedade de agressões metabólicas, tóxicas, microbianas, circulatórias e neoplásicas (ROBINS & COTRAN, 2005).

A Tabela 5 sumariza os achados histológicos do fígado de animais do grupo controle e demais grupos de tratamento.

**Tabela 5:** Alterações histológicas encontradas no fígado de ratas do grupo controle e dos vários grupos de tratamento com o chá de ayahuasca em suas respectivas doses.

	<b>Controle</b>	<b>1X</b>	<b>2X</b>	<b>4X</b>	<b>8X</b>
	<b>N=25</b>	<b>N=25</b>	<b>N=25</b>	<b>N=14</b>	<b>N=12</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
Congestão	1 (4)	2(8)	3 (12)	2 (14,3)	3 (25)
Corpúsculo hialino	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1 (8,3)
Degeneração hidrópica	3 (12)	3 (12)	3 (12)	4 (28,6)	4 (33,3)
Esteatose	1 (4)	2 (8)	4 (16)	4 (28,6)	3 (25)
Infiltrado inflamatório	0 (0)	0 (0)	1 (14)	2 (14,3)	2 (16,7)
Necrose	0 (0)	0 (0)	1 (4)	2 (14,3)	2 (16,7)

Os valores estão expressos em numero de casos e porcentagens. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por \*. Os resultados foram analisados por *Qui-quadrado* seguido de *Teste Exato de Fisher*.

Para as lesões do tipo congestão, corpúsculo hialino, degeneração hidrópica e esteatose não foram observados uma associação entre dose e incidência da lesão. Porém, tanto para a lesão do tipo infiltrado inflamatório e necrose, foi observado uma associação entre dose e incidência da lesão ( $p=0.029$ ), porém quando foi efetuada a comparação de cada grupo tratado relativo ao controle, não houve diferença significativa.

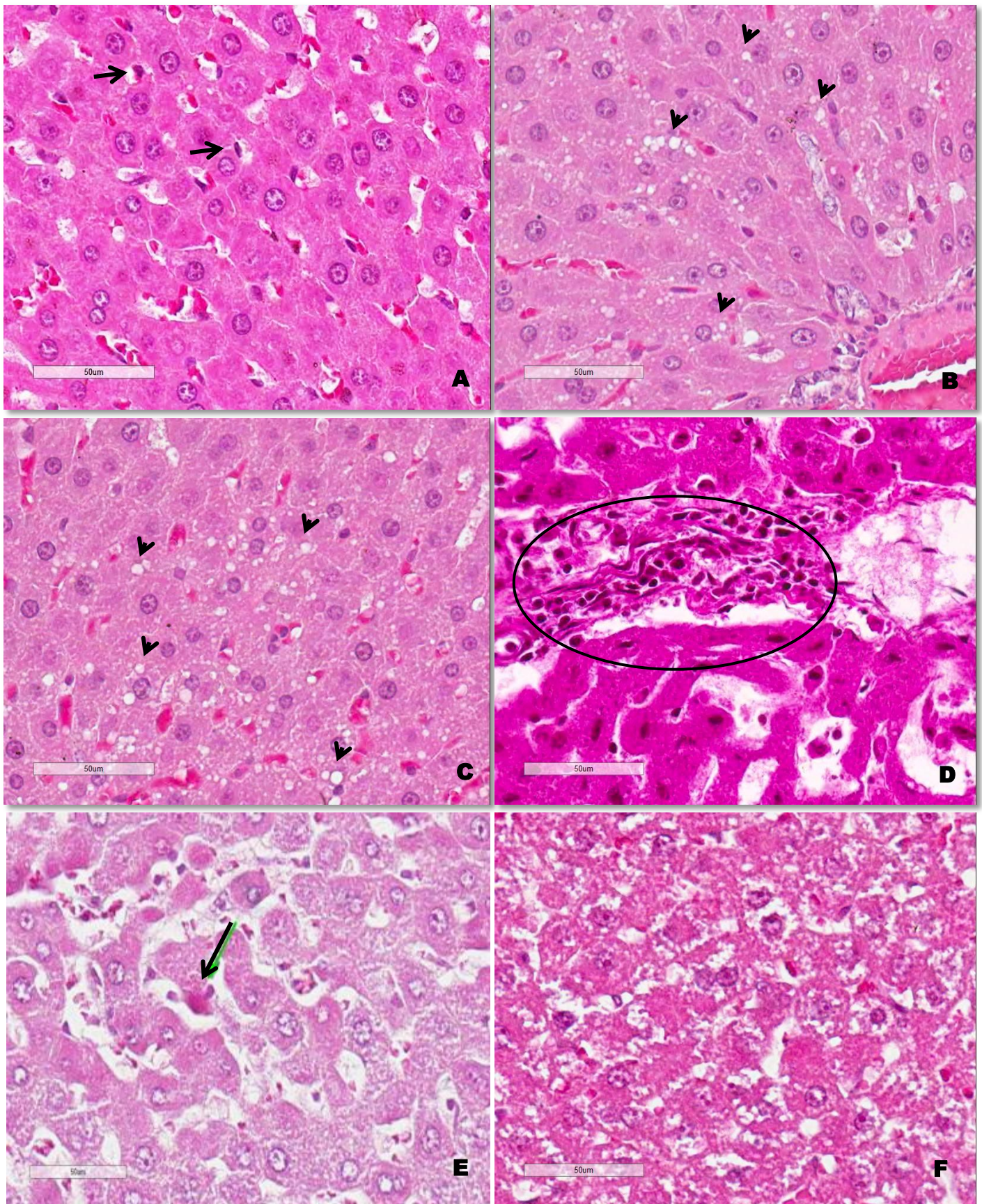
Na figura 28 A, pode-se observar a arquitetura hepática com parâmetros morfológicos de normalidade de um animal do grupo controle, com o parênquima formando uma massa contínua, com cordões de hepatócitos, células de Kuppfer, ducto biliar, veia porta e artérias hepáticas intactas e bem delineadas. Alterações morfológicas presentes em todos os grupos foram congestão vascular, focos de degeneração hidrópica, que é uma lesão reversível caracterizada

pelo acúmulo de água e eletrólitos no interior da célula, tornando-a tumefeita, aumentada de volume, com uma tonalidade pálida e presença de grânulos eosinófilos e esteatose. A esteatose/degeneração gordurosa (Figura 28 B e C) é definida como uma lesão reversível quando não está em excesso, e é vista como pequenos vacúolos no citoplasma.

Foram evidenciadas algumas alterações severas, que podem prejudicar o bom funcionamento do órgão, apenas nos grupos tratados com ayahuasca em maiores doses (2X, 4X e 8X), como o infiltrado inflamatório (Figura 28 D). Uma alteração que esteve presente apenas nos grupos tratados com ayahuasca nas doses de 2X e 8X foi o corpúsculo hialino/degeneração hialina de Mallory (Figura 28 E), que é uma alteração caracterizada pela formação de grânulos grandes semelhantes a vidro e que podem levar a necrose.

A necrose hepática (Figuras 28 F), caracterizada por ser mais eosinofílica (rosa) que as células normais, é uma lesão grave não reversível. Nos animais tratados ayahuasca 8X as áreas de necrose foram acompanhadas por focos de esteatose (ROBINS & COTRAN, 2005).





**Figura 28:** Fotomicrografia mostrando cortes histológicos de fígado de ratas pertencentes aos diferentes grupos de estudo. **A:** grupo controle, células de Kuppfer (setas), **B e C:** focos de esteatose/degeneração gordurosa (cabeça de setas) nos grupos ayahuasca 4X e 8X, respectivamente; **D:** infiltrado inflamatório (círculo) em um animal do grupo ayahuasca 8X; **E:** corpúsculo hialino/degeneração hialina de Mallory (seta) presente em um animal do grupo ayahuasca 8X; **F:** necrose hepática em um animal do grupo ayahuasca 8X. Aumento de 400x. Coloração HE.



### 5.2.4.3 – Análise histológica dos Rins

As alterações renais não foram abundantes e estavam pouco distribuídas pelo órgão. A morfologia dos rins das ratas tratadas com ayahuasca mostrou-se muito semelhante ao do grupo controle. A Figura 29 apresenta o aspecto geral do rim, mostrando as regiões, cortical e medular.



**Figura 29:** Aspecto geral do rim mostrando a região cortical (setas) e medular (cabeça de seta). Coloração HE.

Foi observado nos rins da maioria dos animais (de todos os grupos de estudo) que as regiões medular e cortical estavam bem conservadas dentro do padrão de normalidade. Estas regiões não apresentaram alterações morfológicas de destaque e a distinção entre as zonas medular e cortical estava nítida, com poucas alterações celulares e morfologia com parâmetros adequados.

O rim quando observado em microscópio de luz, apresenta-se em geral com uma abundância de túbulos e uma quantidade razoável de glomérulos que são desenvolvidos e ricamente vascularizados.

A Tabela 6 apresenta os resultados da análise histológica dos rins direito e esquerdo de ratas controles e tratadas com chá de ayahuasca por um período de 15 dias, coradas com HE.

**Tabela 6:** Alterações histológicas encontradas nos rins (direito e esquerdo) de ratas do grupo controle e dos vários grupos de tratamento com o chá de ayahuasca em suas respectivas doses.

	Controle	1X	2X	4X	8X
	N=25	N=25	N=25	N=14	N=12
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Cilindro hialino	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (7,1)	1 (8,3)
Congestão	2 (8)	2 (8)	2 (8)	3 (21,4)	1 (8,3)
Degeneração hidrópica	2 (8)	3 (12)	4 (16)	6 (42,9)*	6 (50)*
Esteatose	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)
Infiltrado inflamatório	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	2 (16,7)
Necrose	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	1 (8,3)

Os valores estão expressos em número de casos e porcentagens. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ , sendo representado por \*. Os resultados foram analisados por *Qui-quadrado* seguido de *Teste Exato de Fisher*.

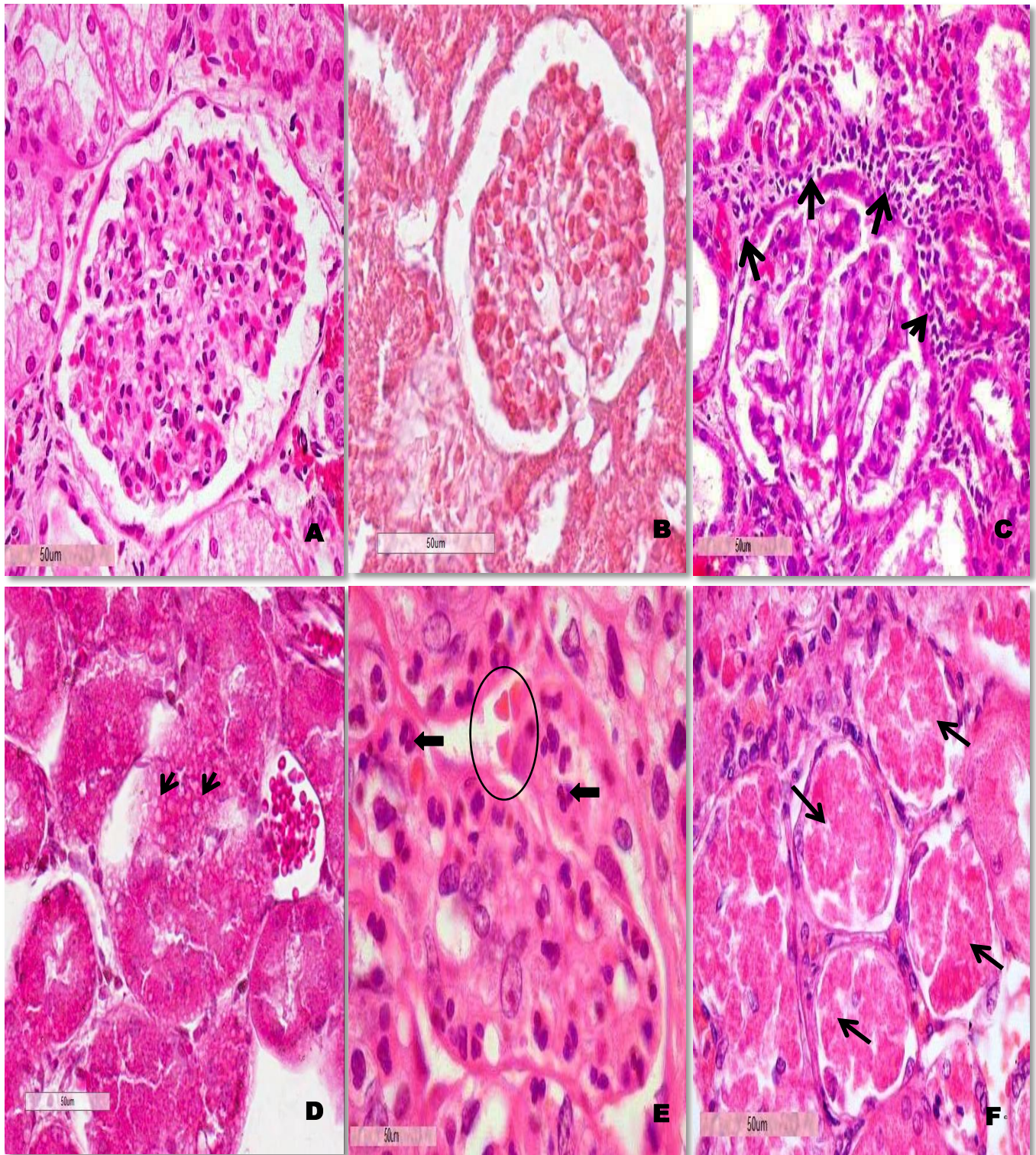
A lesão predominante no tecido renal foi a degeneração hidrópica (Figura 30 B). Esta degeneração foi encontrada nos grupos tratados e no grupo controle (8% dos animais). Para esta lesão, foi observada uma associação entre dose e incidência da lesão ( $p=0,08$ ). Além do mais, a comparação dos grupos de tratamento ayahuasca 4X e 8X relativo ao controle se mostrou significativamente diferente. Esta é uma alteração reversível. Para todas as outras lesões não houve associação significativa entre dose e lesão.

Focos de esteatose/degeneração gordurosa (Figura 30 D) foram encontrados apenas em um animal do grupo ayahuasca 8 X (8,3 %). Esta é uma lesão reversível quando não está em excesso. As alterações no glomérulo podem ser o resultado de material tóxico no filtrado do glomérulo (MEYERS, HENDRICKS, 1985).

Outras alterações renais também foram observadas, como o infiltrado inflamatório (Figuras 3 C). A degeneração hialina/cilindro hialino, que esteve presente apenas nos grupos tratados (ayahuasca 2X, 4X e 8X) (Figura 30 E), é uma alteração caracterizada pela formação



de grânulos grandes, que pode levar à necrose (MEYERS, HENDRICKS, 1985). A necrose esteve presente em 7,1% do grupo 4X e em 8,3% do grupo 8X (Figura 30 F).



**Figura 30:** Fotomicrografia de cortes histológicos de rins de glomérulos de ratas pertencentes a vários grupos de tratamento. **A:** glomérulo de um animal representativo do grupo controle; **B:** degeneração hidrópica; **C:** infiltrado inflamatório; **D:** esteatose/degeneração gordurosa; **E:** degeneração hialina/cilindro hialino; **F:** glomérulo necrótico. As figuras **B** a **F** pertencem a animais do grupo ayahuasca 8X. Aumento de 400x. Coloração HE.

## 5.2.5 - Análise histológica do cérebro pela microscopia óptica

### 5.2.5.1- Contagem de neurônios viáveis pela coloração de Nissl

O método de contagem de neurônios viáveis foi utilizado para medir o volume das seguintes regiões: formação hipocampal (CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado), complexo amigdalóide e núcleos da Rafe. Os hemisférios direito e esquerdo foram analisados separadamente para verificar se a perda neuronal ocorreu em ambos os lados. Na análise, não houve diferença estatisticamente significativa entre os hemisférios direito e esquerdo, assim, os dados foram agregados.

Nos cortes histológicos dos cérebros das ratas pertencentes aos grupos controle e ayahuasca 1X submetida à coloração de Nissl foi notado a conservação das camadas celulares em todas as regiões mencionadas no estudo. Nos grupos de tratamento de maiores doses, principalmente as de 4X e 8X, foi observada uma acentuada morte neuronal predominante na área de CA1. Vale ressaltar que os achados referentes aos animais do grupo ayahuasca foram caracterizados no padrão de escore 1 e 2 da classificação de neurônios, correspondendo entre < 100 % e > 50 % de neurônios viáveis e saudáveis comparados ao grupo controle.

### 5.2.5.2 - Densidade neuronal na região de CA1

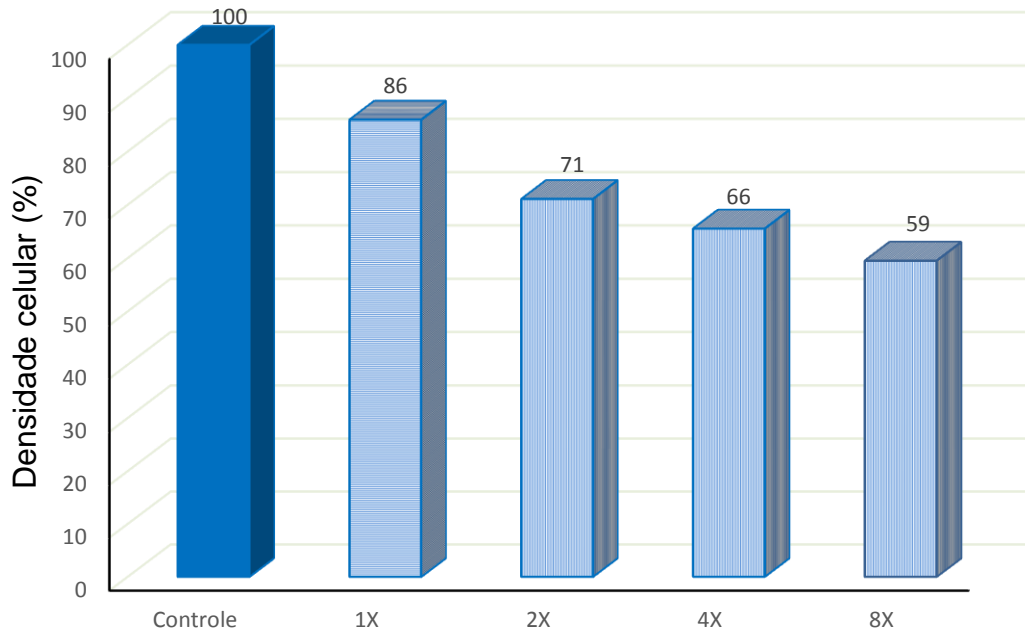
Foi observado diminuição no número de neurônios viáveis nos grupos de maiores doses de tratamento (ayahuasca 2X, 4X e 8X) quando comparado ao grupo controle (Tabela 7). Foi utilizada como controle a quantificação das células da região CA1 dos animais do grupo controle, onde foram encontradas  $(0,0056 \pm 0,0004)$  células/ $\mu\text{m}^2$  (Figura 31), que foi considerado como 100% de celularidade e score 0 .

**Tabela 7:** Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de CA1 dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca

	Controle	1X	2X	4X	8X
Densidade celular,	0,0056	0,0048	0,004	0,0037	0,0033
células/ $\mu\text{m}^2$	$\pm 0,0004$	$\pm 0,0004$	$\pm 0,0002^*$	$\pm 0,0002^{**}$	$\pm 0,0003^{***\#}$

Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,03$  (\*\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*\*), quando comparados ao grupo controle (GC), e diferença de  $p \leq 0,05$  quanto ao grupo de 1X representado por #. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA seguido de *Tukey*.

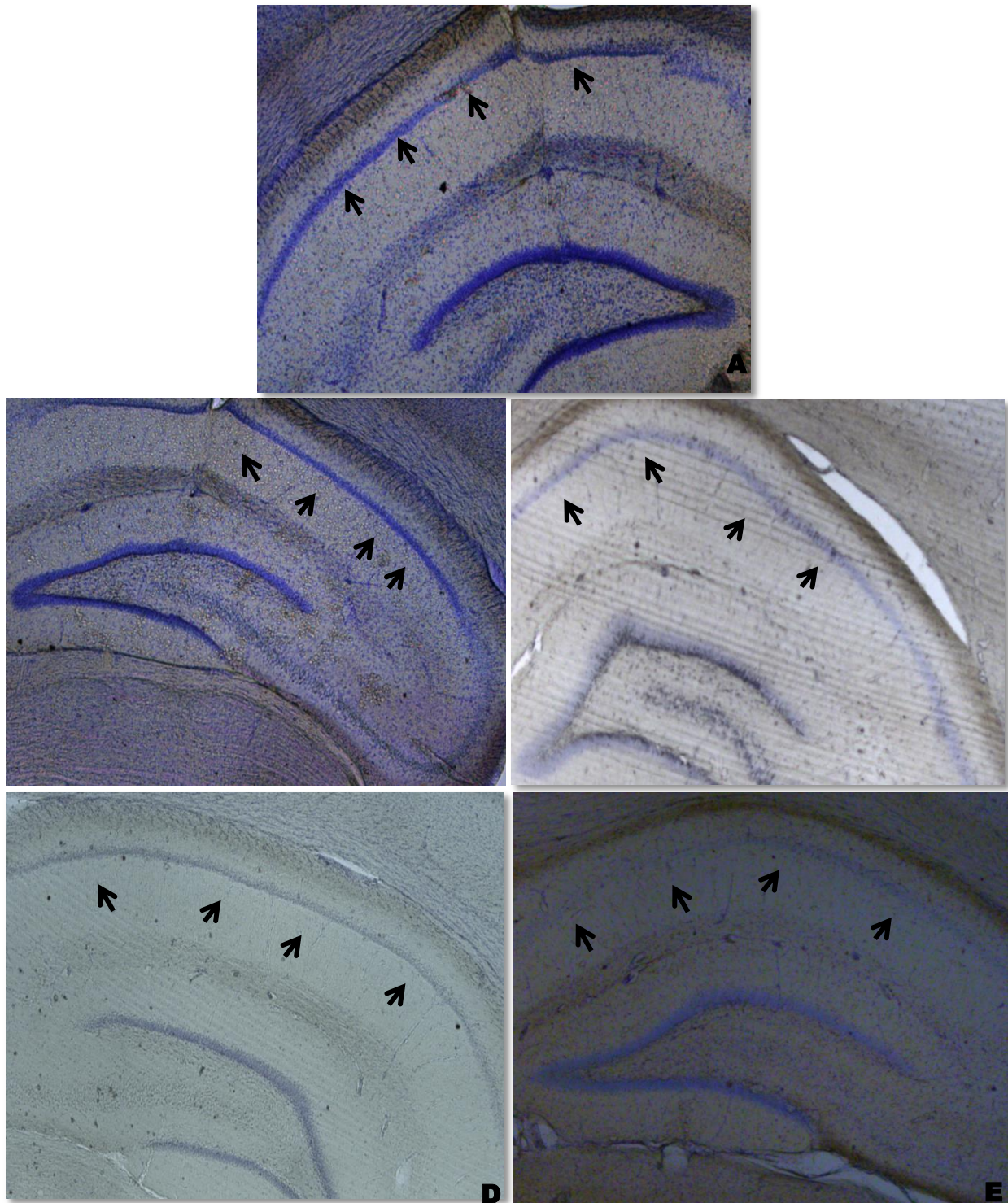
Nos animais que receberam os tratamentos em doses mais elevadas, foi observada uma perda neuronal significativa (Figura 31), com perda de pelo menos 30% da densidade celular em relação ao grupo controle.



**Figura 31:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área de CA1 de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %).

A camada de CA1 dos animais submetidos à dose ritualística de ayahuasca (1X) mostrou-se com células nervosas de aspecto semelhante às presentes nos animais do grupo controle (Figura 32 A e B). A densa distribuição dos neurônios detectada nos animais controles foi substituída nos animais tratados com doses 2X, 4X e 8X por uma frouxa camada de células com muitos espaçamentos entre si, consequência da morte neuronal, evidenciada pela diminuição da espessura desta estrutura (Figura 32 C-E).





**Figura 32:** Fotomicrografia da região de CA1 (setas) de animais representativo dos vários grupos de estudo. **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 1X, **C:** ayahuasca 2X, **D:** ayahuasca 4X e **E:** ayahuasca 8X. Aumento de 40x. Coloração de Nissl.

### 5.2.5.3 - Densidade neuronal na região de CA2

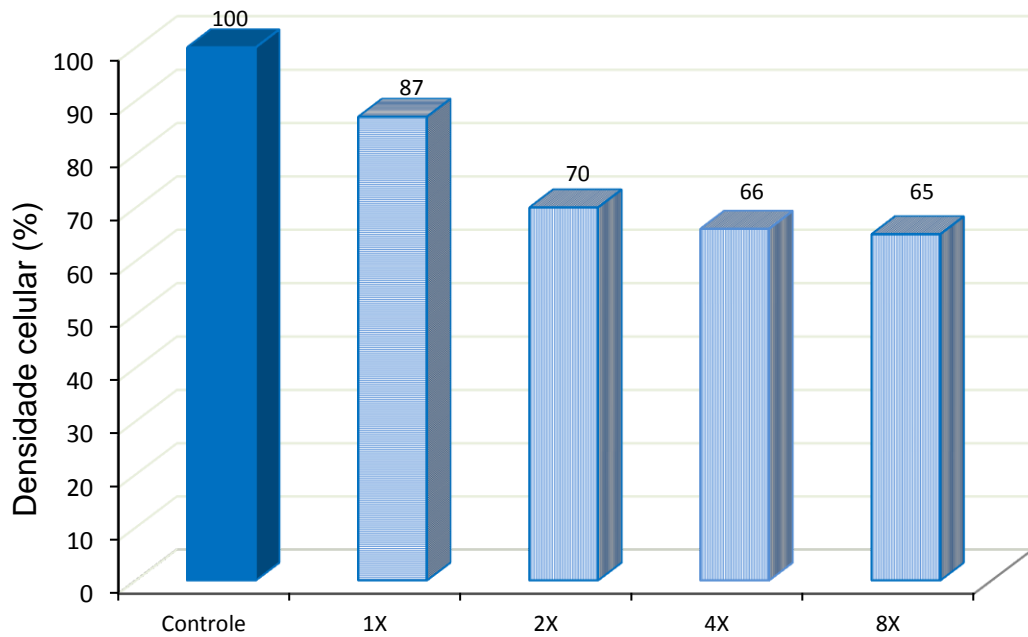
Com relação à região CA2, o estudo histológico evidenciou um efeito estatisticamente significativo no grupo de maior dose (ayahuasca 8X), onde houve uma considerável diminuição de neurônios quando comparados ao grupo controle. Na área de CA2 a quantificação das células dos animais do grupo controle, foi de  $(0,0108 \pm 0,0011)$  células/ $\mu\text{m}^2$ , o que foi considerado como 100% de celularidade. Porém pode-se verificar que há uma considerável perda neuronal dos animais do grupo ayahuasca 8X  $(0,0070 \pm 0,0013, *p \leq 0,05)$  células/ $\mu\text{m}^2$  (Tabela 8), o que equivale a apenas 65% de neurônios quando comparado ao grupo controle (Figura 33). Assim como, observa-se que ocorreu uma desestruturação da arquitetura das camadas dos neurônios dos animais deste grupo quando comparado ao grupo controle (Figura 34).

**Tabela 8:** Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de CA2 dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca

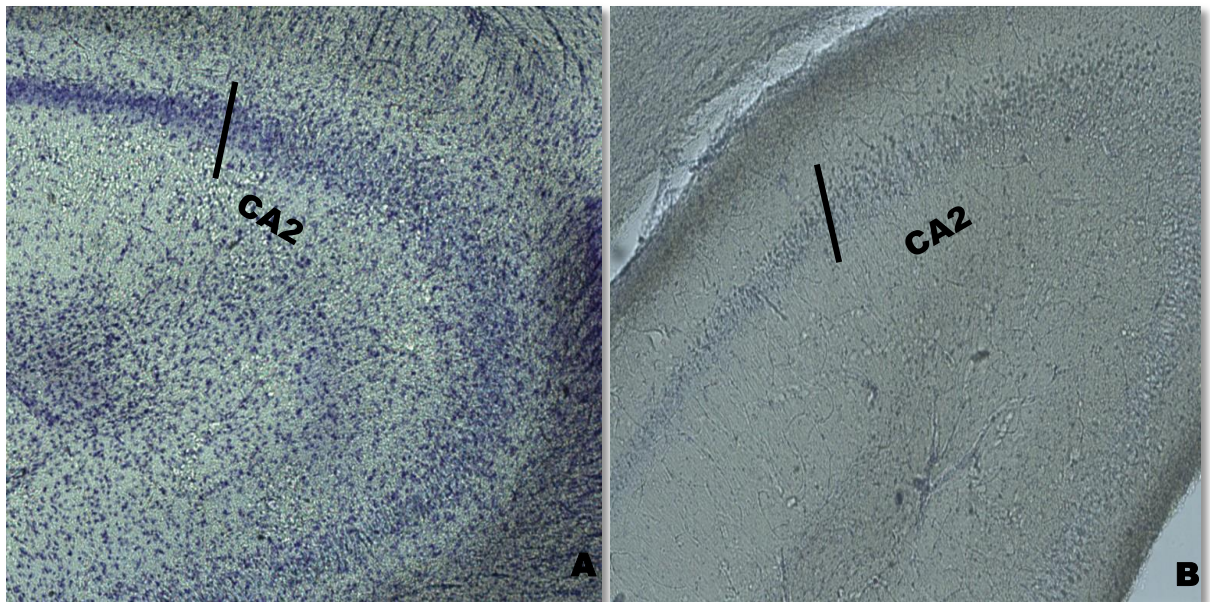
	Controle	1X	2X	4X	8X
Densidade celular, células/ $\mu\text{m}^2$	0.0109 $\pm 0,0011$	0.0094 $\pm 0,0007$	0,0076 $\pm 0,0003$	0,0072 $\pm 0,0006$	0,0071 $\pm 0,0013^*$

Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,03$  (\*\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*\*), quando comparados ao grupo controle (GC), e diferença de  $p \leq 0,05$  quanto ao grupo de 1X representado por #. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA seguido de *Tukey*.





**Figura 33:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área de CA2 de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %).



**Figura 34:** Fotomicrografia da divisão das regiões CA1 e CA2. **A:** grupo controle e **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 100x. Coloração de Nissl.

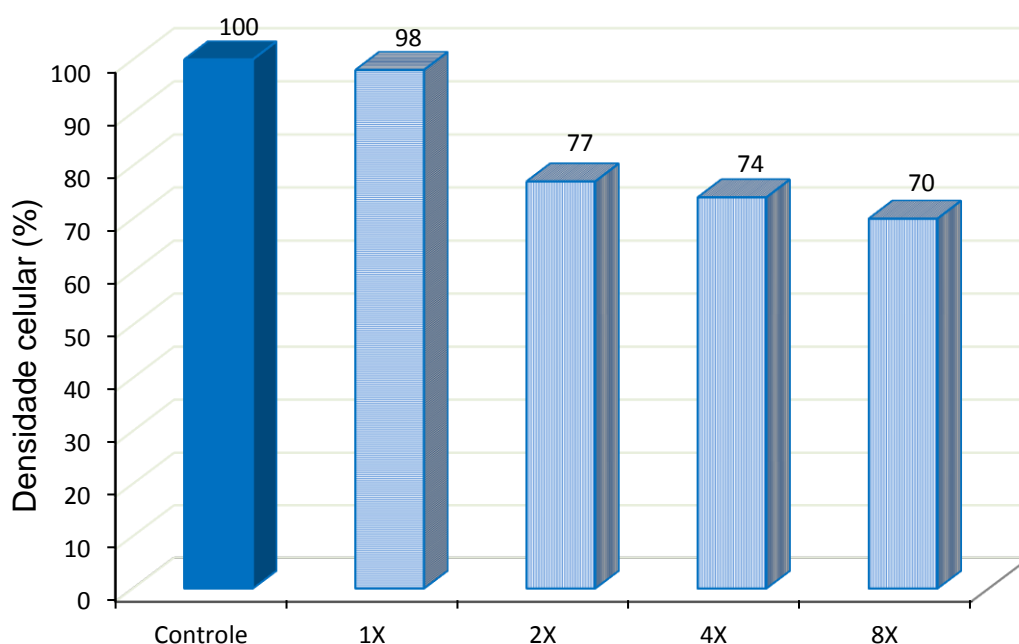
#### 5.2.5.4 - Densidade neuronal na região de CA3

Na área de CA3 da formação hipocampal, foi observado diminuição significativa de neurônios no grupo ayahuasca 8X quando comparado com o grupo controle (Tabela 9). Esses resultados são similares à área de CA2. A quantificação de 100% de celularidade dos animais do grupo controle foi de  $0,0071 \pm 0,0005$  células/ $\mu\text{m}^2$  e nos animais do grupo ayahuasca 8X, houve uma intensa perda neuronal na área de CA3 (Figuras 35 e 36 B) representando apenas 69% de células viáveis quando comparado ao grupo controle ( $0,0049 \pm 0,0003$ ,  $*p \leq 0,05$ ) células/ $\mu\text{m}^2$ .

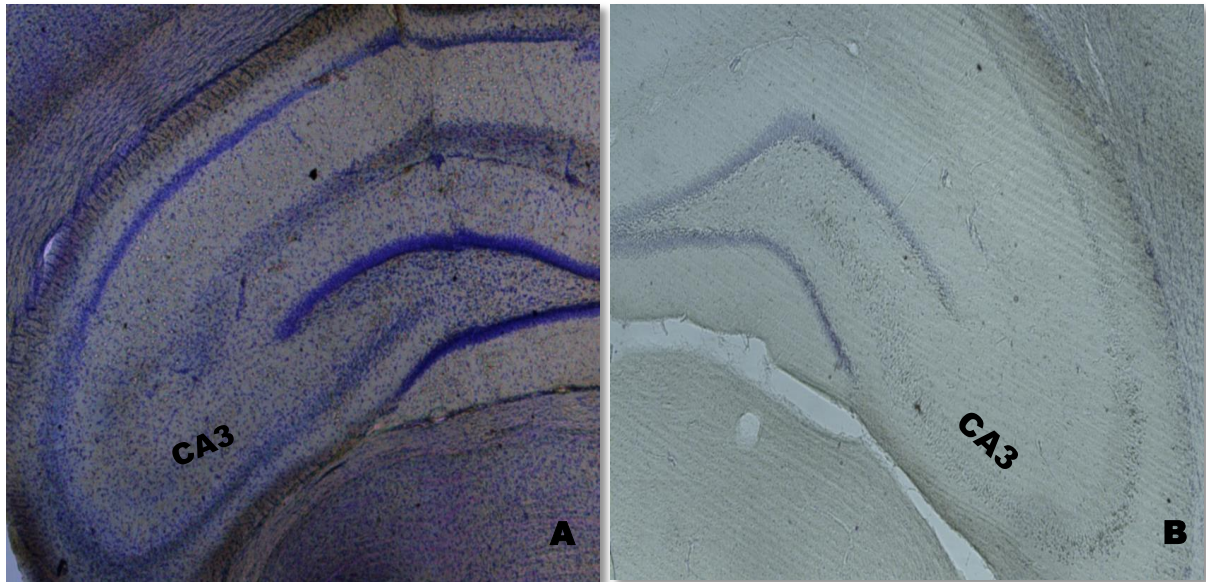
**Tabela 9:** Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de CA3 dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca

	Controle	1X	2X	4X	8X
Densidade celular, células/ $\mu\text{m}^2$	0,0071 $\pm 0,0005$	0,0070 $\pm 0,0006$	0,0055 $\pm 0,0003$	0,0053 $\pm 0,0005$	0,0050 $\pm 0,0003^*$

Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,03$  (\*\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*\*), quando comparados ao grupo controle (GC), e diferença de  $p \leq 0,05$  quanto ao grupo de 1X representado por #. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA seguido de *Tukey*.



**Figura 35:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área de CA3 de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %).



**Figura 36:** Fotomicrografia do final da área de CA3. **A:** grupo controle e **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 40x. Coloração de Nissl.

#### 5.2.5.5 - Densidade neuronal na região do GD

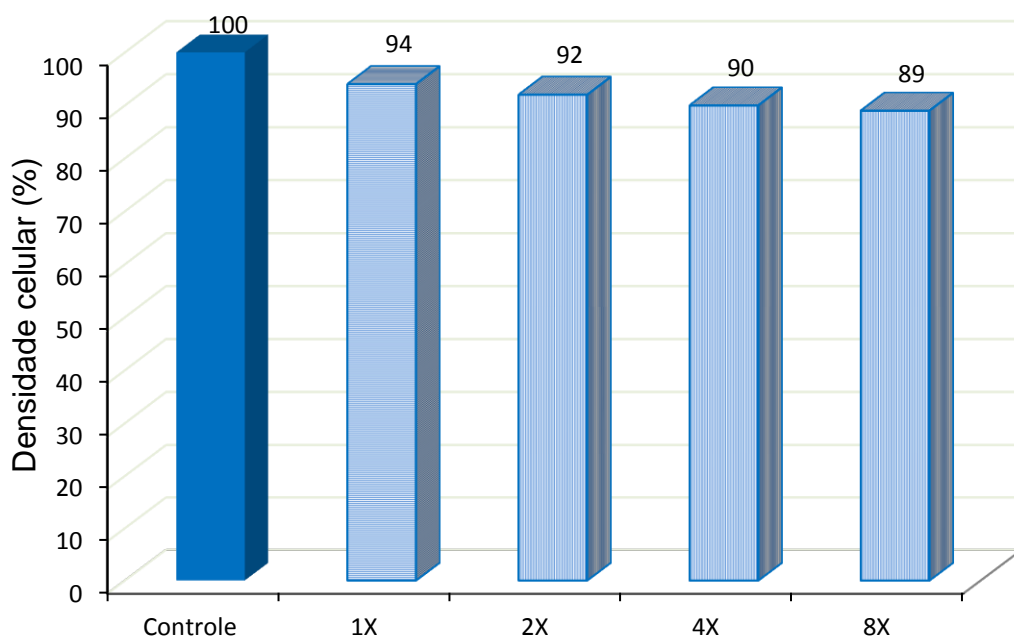
Em contraste com as áreas de CA1 e CA3 que são mais sensíveis, as células granulares do GD possuem maior resistência natural (SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991) e também à ação do chá. Quando comparado às outras regiões, observa-se que o GD representa a estrutura que sofreu menor impacto com as diversas doses de tratamento. A densidade celular média encontrada no grupo controle foi de  $0,0177 \pm 0,0016$ , e o grupo mais afetado, ayahuasca 8X, a perda neuronal equivaleu a 88% do controle, sem diferença significativa (Tabela 10). Nos animais do grupo ayahuasca 8X, observou-se uma pequena diminuição em número de neurônios na área do GD, mas não estatisticamente significativa (Figura 37). A ponta do giro denteado dos animais dos grupos de estudo mostrou-se em grande maioria, organização lamelar e espessura normal (Figura 38), assim como os animais dos diferentes grupos de tratamento com ayahuasca.

**Tabela 10:** Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de GD dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca

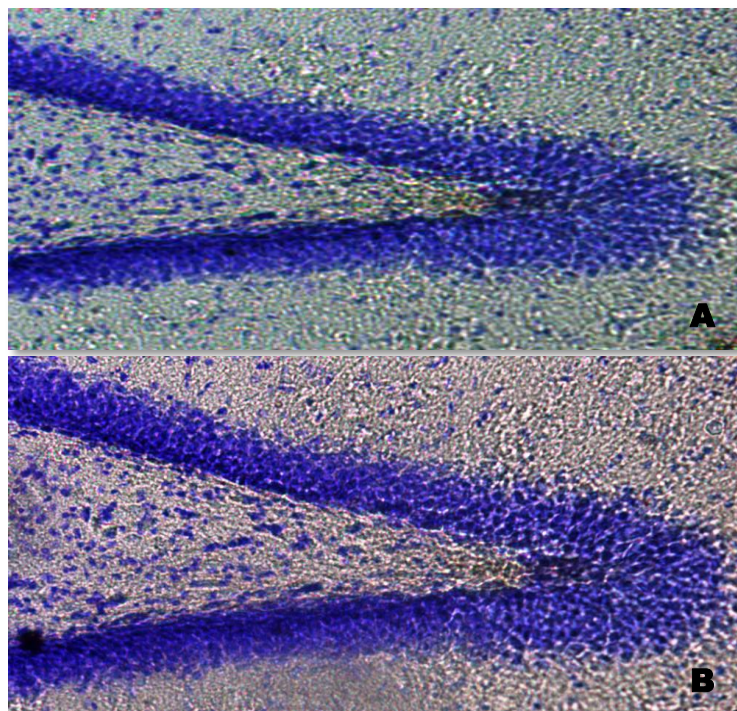
	Controle	1X	2X	4X	8X
Densidade celular, células/ $\mu\text{m}^2$	0,0178 $\pm 0,0016$	0,0167 $\pm 0,0011$	0,0164 $\pm 0,0008$	0,0161 $\pm 0,001$	0,0160 $\pm 0,0009$

Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,03$  (\*\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*\*), quando comparados ao grupo controle (GC), e diferença de  $p \leq 0,05$  quanto ao grupo de 1X representado por #. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA seguido de *Tukey*





**Figura 37:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área do giro denteado (GD) de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %).



**Figura 38:** Fotomicrografia da região do giro denteado (GD). **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 100x. Coloração de Nissl.

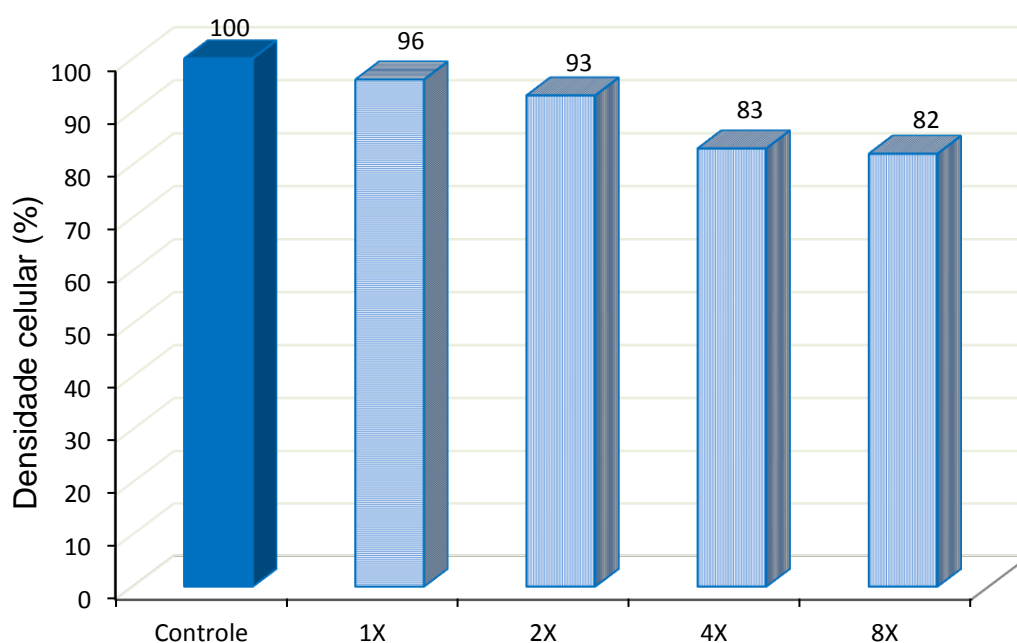
### 5.2.5.6 - Densidade neuronal na região do Complexo Amígdaloide (Ca)

A quantificação de 100% das células da região do Ca dos animais do grupo controle foi  $(0,0056 \pm 0,0004)$  células/ $\mu\text{m}^2$ . Para os animais dos grupos ayahuasca 4X e 8X a quantificação celular foi de  $0,0047 \pm 0,0001$  e  $0,0046 \pm 0,0001$  células/ $\mu\text{m}^2$ , respectivamente, ambos com  $p \geq 0,05$  (Tabela 11) correspondendo a 83% e 81% (Figura 39). A análise do número de neurônios por  $\mu\text{m}^2$  revelou que não houve diferença significativa entre o grupo controle e os respectivos grupos de tratamento para o Ca.

**Tabela 11:** Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área de Ca dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca

	Controle	1X	2X	4X	8X
Densidade celular, células/ $\mu\text{m}^2$	0,0056 $\pm 0,0004$	0,0054 $\pm 0,0003$	0,0053 $\pm 0,0004$	0,0047 $\pm 0,0001$	0,0046 $\pm 0,0001$

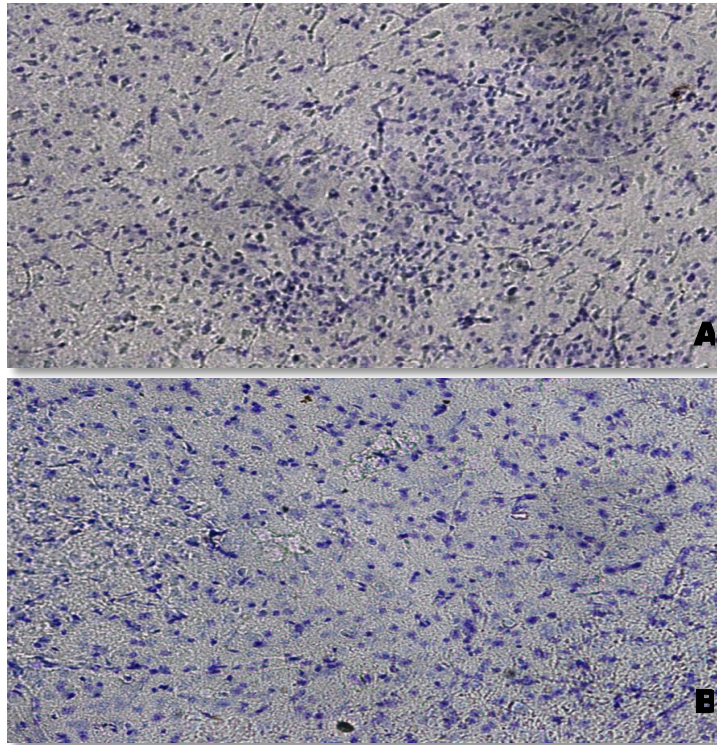
Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,03$  (\*\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*\*) , quando comparados ao grupo controle (GC), e diferença de  $p \leq 0,05$  quanto ao grupo de 1X representado por #. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA seguido de *Tukey*.



**Figura 39:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área do complexo amigdalóide (Ca) de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores:

barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %).

O complexo amigdalóide manteve-se com sua morfologia básica em todos os grupos do estudo (Figura 40), não sendo, portanto afetada pelo tratamento com o chá de ayahuasca.



**Figura 40:** Fotomicrografia da região do complexo amigdalóide (Ca). **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 8X. Aumento de 200x. Coloração de Nissl.

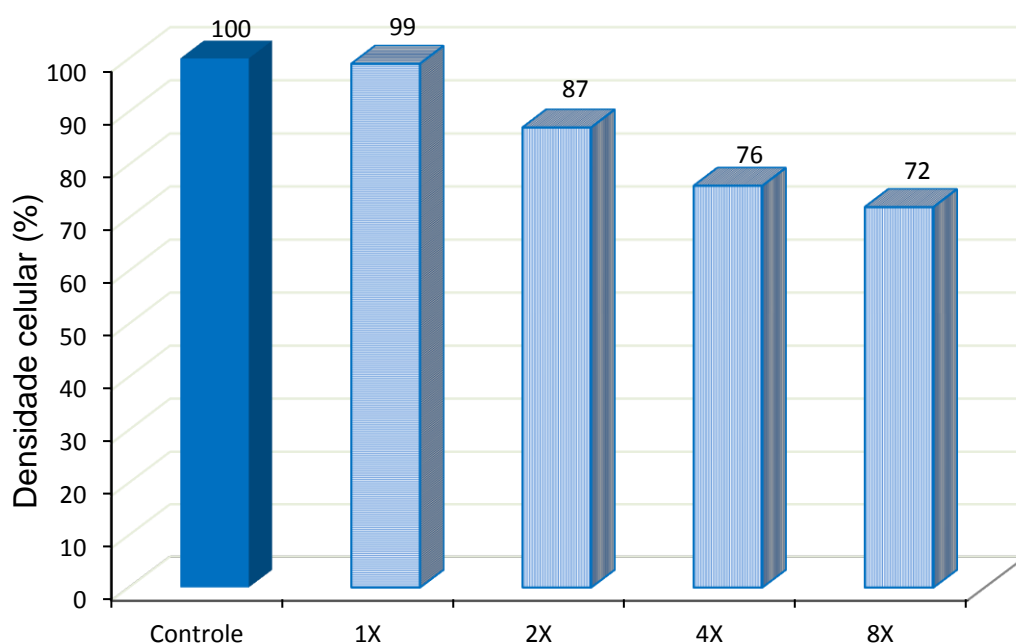
#### **5.2.5.7 - Densidade neuronal na região dos núcleos da Rafe (nR)**

A densidade neural média dos animais do grupo controle foi de  $0,0069 \pm 0,0005$  células/ $\mu\text{m}^2$  (Tabela 12). Houve uma diminuição desta densidade nos animais tratados com ayahuasca em doses a partir de 2X, porém esta diminuição só foi estatisticamente significativa no grupo de maior dose (8X) quando comparado ao grupo controle, com uma perda neural de 28% (Figura 41).

**Tabela 12:** Densidade celular (células/ $\mu\text{m}^2$ ) de neurônios na área dos nR dos animais do grupo controle e de grupos tratados com o chá de ayahuasca

	Controle	1X	2X	4X	8X
Densidade celular, células/ $\mu\text{m}^2$	0,0069 $\pm 0,0007$	0,0068 $\pm 0,0005$	0,0059 $\pm 0,0004$	0,0052 $\pm 0,0002$	0,0050 $\pm 0,0002^{*#}$

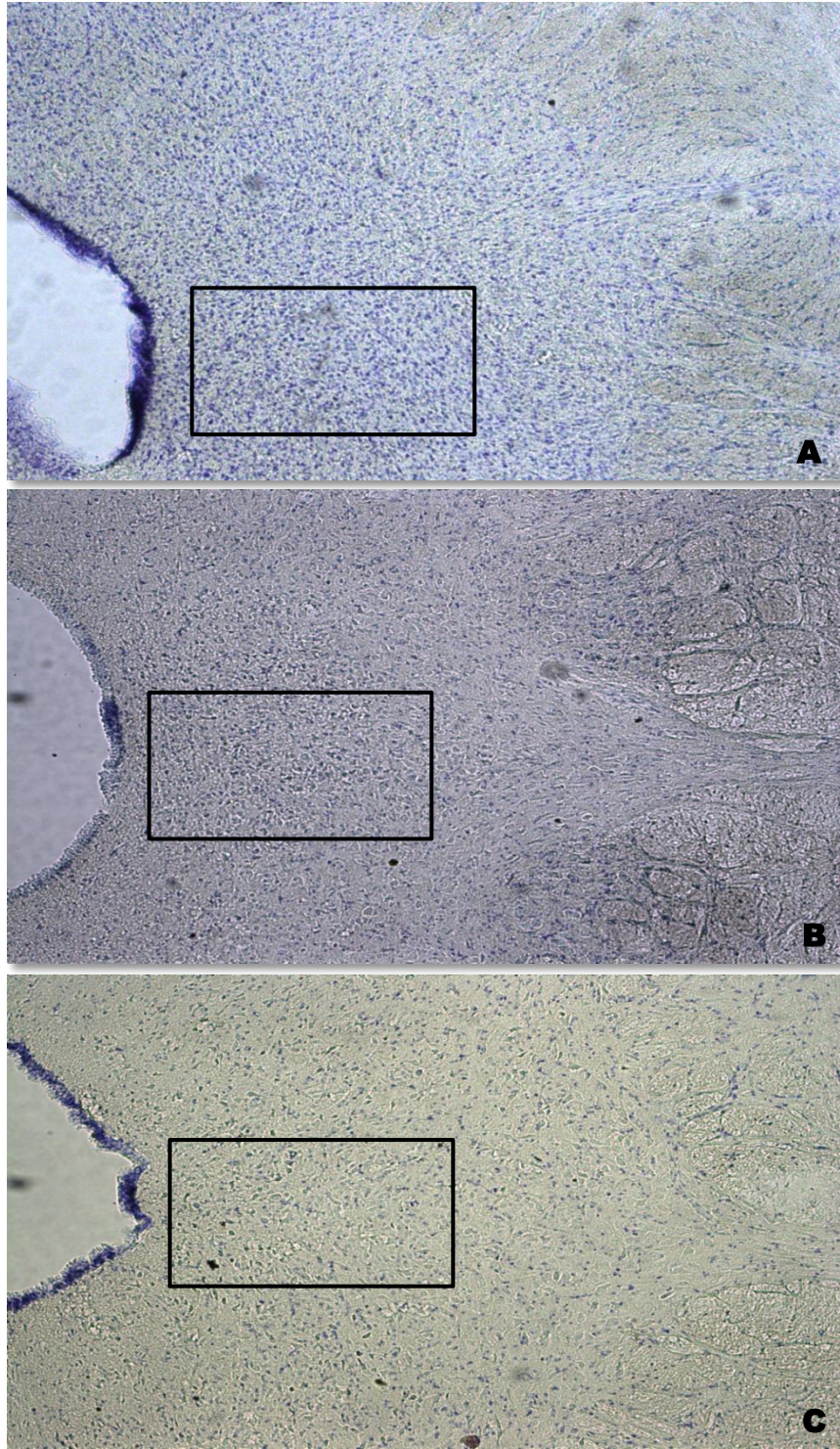
Os valores estão expressos em média e erro padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,03$  (\*\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*\*), quando comparados ao grupo controle (GC), e diferença de  $p \leq 0,05$  quanto ao grupo de 1X representado por #. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA seguido de *Tukey*.



**Figura 41:** Densidade celular (%) em relação ao grupo controle (100%) na área do complexo amigdalóide (Ca) de ratas *Wistar* nas diferentes doses de tratamento com ayahuasca. Scores: barra preenchida = 0; barra com linhas horizontais = 1 (> 75 % e < 100 %), barra com linhas verticais = 2 (> 50 % a 75 %).

Essa perda neuronal acarretou em diferenças morfológicas visíveis como demonstrado na Figura 42





**Figura 42:** Fotomicrografia da região dos núcleos da Rafe (retângulo). **A:** grupo controle, **B:** ayahuasca 1X e **C:** ayahuasca 8X. Aumento de 100x. Coloração de Nissl.



## 6 - DISCUSSÃO

O chá de ayahuasca é uma infusão ancestral usada em rituais sagrados por tribos na região Amazônica (LUNA, 1986; McKENNA, 2004). Seu uso por populações urbanas iniciou-se na década de 1930, quando as religiões ayahuasqueiras, como o Santo Daime e a União do Vegetal (UDV), foram constituídas. Os principais componentes ativos do chá, as  $\beta$ -carbolinas e o DMT, agem de maneira sinérgica no organismo humano resultando num aumento da atividade serotoninérgica que leva a estados alterados de consciência, entre outros efeitos (CAZENAVE, 1996; GRELLA, *et al.*, 2003). Vários estudos evidenciaram que uso do chá no contexto religioso é seguro, porém o aumento do uso não ritualístico e recreativo da ayahuasca nos últimos anos, inclusive com relatos midiáticos de intoxicação e óbito, tem levantado questionamentos sobre seu potencial tóxico.

Apesar de estudos toxicológicos com as substâncias ativas de a ayahuasca serem relativamente frequentes na literatura (GABLE, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANTOS, 2013) estudos realizados com o chá ainda são limitados. Alguns estudos em ratos indicaram que o chá da ayahuasca apresenta toxicidade materna e embriotoxicidade em doses a partir de 4 vezes a dose ritualística da UDV (OLIVEIRA *et al.*, 2010; MOTTA, 2013) e tem potencial neurotóxico (FIGUEIROA, 2012). O presente estudo visou complementar os estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (MOTTA, 2013; PIC-TAYLOR *et al.*, 2014) pela investigação histológica de órgãos vitais e do sistema nervoso central de ratas *Wistar* expostas oralmente a diferentes doses de ayahuasca.

### 6.1. Toxicidade aguda do chá da ayahuasca em ratas *Wistar*

Todas as ratas tratadas com doses únicas de 30 e 50X a ritualística da UDV (150 mL para uma pessoa de 70 kg) (total de 12 animais) apresentaram piloereção e tremores durante as primeiras 24 horas, e um animal de cada grupo foi a óbito nas primeiras horas após a ingestão. Os sintomas observados nesses animais foram característicos da síndrome serotoninérgica, que culminaram em convulsão e morte. O fato de apenas um animal ir a óbito na dose máxima testada (50X, n=6) indica que a dose letal de ayahuasca é superior a 50X. Baseado na composição química do chá determinada no estudo, esta dose corresponde a 15,1 mg/kg pc DMT; 13,1 mg/kg pc harmalina e 167 mg/kg pc de harmina (PIC-TAYLOR *et al.*, 2014; Anexo 2). Doses superiores a 50X não foram testadas devido a impossibilidade de diluir o chá liofilizado no volume máximo administrado por gavagem (3 mL).

A necropsia dos animais foi realizada no 14º dia após a administração e os órgãos vitais coletados para avaliação. A avaliação macroscópica mostrou dilatação no estômago e intestino de todos os animais tratados nas doses 30 e 50X. O peso do estômago desses animais foi significativamente maior que do grupo controle, provavelmente devido ao aumento significativo no consumo de ração no final do experimento. Não foi mensurado o peso do intestino neste experimento. Não foram observadas alterações macroscópicas no cérebro, coração, baço, fígado e rins dos animais tratados. Avaliação histológica do fígado, baço e rins não mostrou alterações relevantes quando comparados ao controle.

## **6.2. Toxicidade crônica do chá da ayahuasca em ratas *Wistar* prenhas**

Ratas *Wistar* prenhas foram expostas a doses 0, 1X, 2X, X e 8X a dose usual de ayahuasca (25 animais por grupo) durante 15 dias consecutivos (do 6º ao 20º dia de gestação). No total, 24 animais foram a óbito durante o experimento, 11 no grupo 4X e 13 no grupo 8X. Estes óbitos foram precedidos de tremores, cromodaciorréia, piloereção, lordose, cianose e convulsão. Os óbitos ocorreram a partir de 48 horas do início do tratamento nos animais do grupo de maior dose (8X) e a partir de 96 horas para o grupo 4X. Apesar do tempo de vida destes animais terem sido inversamente proporcional a dose, esta associação não foi significativa.

Oliveira *et al.* (2010) não relatou óbitos em um estudo utilizando o mesmo protocolo e nenhum sinal de toxicidade materna durante o tratamento com o chá de ayahuasca em doses de 5X e 10X a dose usual (100 mL/70kg). Esta divergência pode ser consequência da diferença da concentração dos princípios ativos nos chás utilizados nestes estudos, principalmente do DMT. No estudo de Oliveira *et al.*, o chá continha 1,37 mg/ml de harmina e 0,62 mg/ml de harmalina (~ 2 mg/mL total), 15 % superior a encontrada no chá utilizado no presente estudo (~ 1.7 mg/mL total). No que diz respeito a concentração de DMT, observou-se que esta é quase 3 vezes maior no chá utilizado pelo grupo de Oliveira *et al.* Diferenças na composição química do chá da ayahuasca são esperadas, devido a fatores intrínsecos das plantas utilizadas na sua preparação (que depende de fatores ambientais e de cultivo) e da preparação da bebida. Cada mestre ayahuasqueiro tem sua maneira própria de preparar a bebida, com diferentes proporções entre o mariri e a chacrona, tempo de cozimento e diluição da bebida. Uma bebida com maior proporção de chacrona na sua preparação terá concentrações maiores de DMT em relação as  $\beta$ -carbolinas. Estudos com as substâncias puras e misturas poderão esclarecer melhor a toxicidade reprodutiva dos componentes da ayahuasca.

Em concordância com estudos anteriores (OLIVEIRA *et al.*, 2010, 2011; FIGUEROA, 2012), a administração de ayahuasca diariamente do 6º ao 20º dia gestacional não afetou no ganho de peso corpóreo durante os 15 dias de experimento comparado ao grupo controle.

A avaliação visceral macroscópica e microscópica pode ser de grande valia em estudos de toxicologia. Órgãos que participam do metabolismo e excreção, assim como o sistema nervoso central são em geral mais susceptíveis a efeitos nocivos de substâncias exógenas. Não foram observadas neste estudo diferenças significativas no peso do cérebro, baço, fígado e rins dos animais dos grupos tratados com ayahuasca comparada ao grupo controle, porém houve um aumento significativo no peso do estômago dos animais dos grupos ayahuasca 1X, 2X e 8X; e do coração dos animais do grupo ayahuasca 2X com relação ao grupo controle. Observamos também uma dilatação significativa do estômago e intestino dos animais dos grupos ayahuasca 8X, como também foi observado no estudo agudo em doses maiores. É provável que esta dilatação possa estar associada a uma hiperestimulação dos receptores de serotonina presentes em grande número no trato gastrintestinal (KATZSUNG, 1998; OLIVEIRA, 2013). Pontos de gordura foram encontrados no fígado de animais dos grupos 4X e 8X. Na maior dose, houve uma associação significativa de dose e lesão, sugerindo uma toxicidade do chá em doses crônicas altas.

Apenas um estudo relata análise histológica de órgãos vitais de animais tratados com ayahuasca. Santos *et al.* (2013) não observaram alterações significativas nos tecidos cardiovasculares, hepáticos e renais de ratos *Wistar* machos hipertensos em ingestão crônica, com um grupo que recebeu a dose ritual uma vez por semana, e outro grupo com dose ritual diariamente por 60 dias. Em nosso estudo, observou-se que a administração de ayahuasca por um período de 15 dias durante a gestação causou algumas alterações histológicas importantes no baço, fígado e rins, apesar destas estarem presente em menos de 25% do campo analisado, ou seja, considerada de grau leve. As alterações presentes incluem congestão, esteatose/degeneração gordurosa no fígado e rins; hemorragia no baço; alteração hialina, cilindro hialino, infiltrado inflamatório, e necrose no baço, fígado e rins dos animais tratados com ayahuasca.

Santos *et al.* (2013), porém, relataram um aumento significativo da atividade plasmática de TGO (transaminase glutâmica oxalacética) no grupo tratado com ayahuasca. O aumento de TGO está associado à presença de lesão cardíaca ou hepática, possivelmente causado pelo tratamento crônico com ayahuasca. Figueiroa (2012) relata déficit de vitamina E hepática dos ratos machos de linhagem *Wistar* tratados com o chá de ayahuasca por um período de 21 dias em comparação ao grupo controle com dose ritual diluída (50% a dose usual). Deficiência de

vitamina E predispõe o hepatócito à peroxidação lipídica (DICHI e BURINI, 1996), o que pode levar a lesão. Em nosso estudo, foram evidenciadas algumas lesões importantes no fígado de animais tratados com ayahuasca como o corpúsculo hialino, esteatose/degeneração gordurosa, infiltrado inflamatório e necrose. Para as duas últimas lesões, houve associação significativa entre dose e incidência da lesão para o grupo 4X. Em conjunto, estas evidências enfatizam uma susceptibilidade hepática a doses crônicas de ayahuasca, apesar do alto poder de regeneração deste órgão.

A análise histológica renal aponta diferença significativa no parâmetro degeneração hidrópica nas doses 4X e 8X em relação ao grupo controle. Santos *et al.* (2013) observaram alterações renais sugestivas, porém sem significância estatística entre os grupos. Figueiroa (2012) observou uma elevação estatisticamente significativa na concentração de ureia urinária nos animais tratados com ayahuasca quando comparados ao controle com dose ritual diluída (50% a dose usual). Os valores de creatinina urinária estavam mais elevados nos animais tratados, apesar dessa alteração não ter sido estatisticamente significativa. Esses dados corroboram os resultados histológicos encontrados nesse estudo, sugerindo que doses crônicas elevadas do chá ayahuasca podem acarretar danos renais.

Alguns estudos basearam-se em análises comportamentais para avaliar o efeito da ayahuasca no sistema nervoso central. Pic-Taylor *et al.* (2014) em estudo de dose aguda única, mostraram que animais tratados com 15 e 30X de ayahuasca se locomoviam e exploravam significativamente menos que o grupo controle no campo aberto e labirinto de cruz elevada, respectivamente. Animais tratados nadavam significativamente mais tempo que o controle e que animais tratados com fluoxetina. Os princípios ativos da ayahuasca podem atravessar a barreira placentária e serem excretados no leite. Oliveira *et al.* (2011) mostraram que a prole de mães tratadas durante a gravidez e lactação apresentaram redução da ansiedade geral e da motivação social e um aumento da sensibilidade da iniciação e propagação da atividade convulsiva. Estes achados sugerem ativações de vias serotoninérgicas em regiões específicas do cérebro. Estudo anterior através de imunohistoquímica com a proteína *c-fos* realizado pelo nosso grupo (PIC-TAYLOR *et al.*, 2014), mostrou que o chá ativa significativamente os neurônios da região CA1, CA2, CA3 da formação hipocampal, o complexo amigdalóide, e núcleo da Rafe, regiões responsáveis pela liberação controlada de serotonina para o resto do cérebro. O núcleo dorsal da Rafe, por meio da liberação da serotonina, tem um papel importante na facilitação de respostas e comportamento relacionados à ansiedade e estímulo de aversão e tem projeções eferentes para o complexo amigdalóide e hipocampo (PEYRON *et al.*, 1998). As regiões do núcleo dorsal da Rafe

e do complexo amigdalóide mostraram, no mesmo estudo marcação positiva para Fluoro-jade B, sugerindo que esta hiperativação pode levar lesão celular. Estes resultados corroboram dados de Figueiroa (2012), que, utilizando o ensaio TUNEL, afirma que células da região hipocampal ativam processo apoptótico após exposição a doses crônicas de ayahuasca, sugerindo um processo neurotóxico relacionado ao uso do chá de ayahuasca em ratos *Wistar*. Porém o mesmo autor, não obteve resultados significativamente relevantes quando o teste de caspase-3 foi efetuado.

No presente estudo, a integridade das células das regiões envolvidas com a neurotransmissão serotoninérgica foi investigada através da coloração de Nissl, que revela perda neural permanente. Foi observado uma intensa diminuição do número de neurônio das regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo e do núcleo dorsal da Rafe em animais tratados com a ayahuasca por 15 dias. Em associação com estudos prévios podemos sugerir que a hiperativação leva a lesão de neurônios específicos (PIC-TAYLOR *et al.*, 2014) das regiões CA1, CA2, CA3 e núcleo dorsal da Rafe. A exposição por 15 dias, até mesmo quando a dose é apenas o dobro da dose ritualística, leva a uma lesão significativa e irreversível em regiões do cérebro controladas por impulsos serotoninérgicos (CA1). Em conjunto com resultados apresentados acima, estes dados sugerem um forte potencial neurotóxico da ayahuasca quando utilizada cronicamente em doses altas.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser mencionadas. Primeiramente, não foi possível determinar a LD<sub>50</sub> exata do chá devido à dificuldade de dissolver o liofilizado em 3 mL. Testes preliminares utilizando volumes de gavagem maiores (5 mL) mostrou não ser adequado pois levou a compressão do diafragma do animal, e ao óbito por sufocamento. Neste estudo não avaliamos histologicamente o estômago e intestino dos animais, que demandam um processamento histológico diferenciado. Adicionalmente, não foram realizadas necropsias nos animais que foram a óbito, principalmente por que muitos foram a óbito durante a noite, sem a presença do pesquisador.

## 7 - CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- A dose letal aguda (DL<sub>50</sub>) de ayahuasca em ratas *Wistar* é superior a 50X a dose utilizada nos rituais da União do Vegetal, sugerindo baixa toxicidade oral da infusão vegetal.
- A administração oral de ayahuasca em ratas prenhes *Wistar* do 6º ao 20º dia de gestação em doses (1X, 2X 4X e 8X) levou a óbito 24 animais dos grupos de maiores doses, caracterizando toxicidade materna. Os óbitos foram precedidos de sinais clínicos de toxicidade como tremores, cromodaciorréia, piloereção, lordose, cianose e convulsão.
- A administração de ayahuasca durante a gestação causou alterações histológicas significativas nos rins dos animais tratados com as maiores doses apesar destas estarem presente em menos de 25% do campo analisado e serem consideradas leves.
- Alterações macroscópicas significativas foram encontradas no estômago e intestinos dos animais de todos os grupos do estudo (dose única ou repetida).
- A análise pela coloração de Nissl mostrou perda neuronal estatisticamente significativa nas áreas de CA1, CA2, CA3 e núcleos da Rafe do cérebro de animais tratados com o chá de ayahuasca, principalmente nas maiores doses, sugerindo neurotoxicidade da substancia em ratas *Wistar* tratadas com chá de ayahuasca durante a gestação.
- Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o chá ayahuasca tem baixa toxicidade aguda em ratas fêmeas e que a dose ritualística, mesmo consumida em doses diárias é segura. Porém, fica claro que o uso crônico em doses iguais ou superiores a 4X a dose ritual pode levar a danos no sistema renal e ao SNC, indicando que o uso recreacional do chá pode representar um risco para a saúde humana.

## REFERÊNCIAS

- ADELL, A.; CELADA, P.; TERESA ABELLAN, M.; ARTIGAS, F. (2002); Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res. Rev.* 39: 154-80.
- ANDERSON, B. T., LABATE, B. C., MEYER, M., TUPPER, K. W., BARBOSA, P. C., GROB, C. S., & MCKENNA, D. (2012). Statement on ayahuasca. *International Journal of Drug Policy*, 23(3), 173-175.
- AZMITIA, E.C. (1999). Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology*, v. 21, p. 33S-45S.
- AZMITIA, E.C., & SEGAL, M. (1978). Na autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsla and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 179(3), 641-667
- BALDESSARINI, R.J. (1996). Drugs and the treatment of psychiatric disorders: depression and mania. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Edition, eds Hardman JG, Limbird LE. *New York: McGraw-Hill*; 431-459.
- BAYER, S. A. (1985). Neuron Production in the Hippocampus and Olfactory Bulb of the Adult Rat Brain: Addition or Replacement? *a. Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 457, n. 1, p. 163-172.
- BEITZ, A. J., LARSON, A. A., MONAGHAN, P., ALTSCHULER, R. A., MULLETT, M. M., & MADL, J. E. (1986). Immunohistochemical localization of glutamate, glutaminase and aspartate aminotransferase in neurons of the pontine nuclei of the rat. *Neuroscience*, 17(3), 741-753.
- BOGLIOLO, F, G.B. *Patologia*, 7° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- BOGLIOLO, G. B. F. *Patologia*, 8ª Edição. Brasil: Editora Guanabara Koogan, 2011. 1524 p.
- BRITO, A. R. M. S., ANTONIO, M. A., COSTA, M., CARVALHO, J. E., DIAS, P. C., 1994. Efeitos farmacológicos do decocto (hoasca) de *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* em camundongos. Resumos da IX Reunião Anual da FESBE, 203.
- BRITO, G.S. (2004). Farmacologia humana da hoasca (chá preparado de plantas alucinógenas usado em contexto ritual no Brasil). In: LABATE, B.C. *O uso ritual da ayahuasca*. Mercado de Letras, Edições e Livraria Ltda. Campinas, p.623-671.
- BURKITT H. G., YOUNG B. AND HEATH, J. W. (1994) *Wheater - Histologia Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. pp. 214-303.
- CALLAWAY, J. C., RAYMON, L.P., HEARN, W.L., MCKENNA, D.J., GROB, C.S., BRITO,

- G.S., MASH, D.C., 1996. Quantitation of N, N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *Journal of Analytical Toxicology*, 20: 493-497.
- CALLAWAY, J.C., MCKENNA, D.J., GROB, C.S., BRITO, G.S., RAYMON, L.P., POLAN R.E., ANDRADE, E. N., ANDRADE, E. O., MASH, D.C., 1999. Pharmacokinetics of hoas alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 243-256.
- CALLAWAY, J.C.; GROB, C.S., Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: A potential combination for severe adverse reactions. *Journal of Psychoactive Drugs*, volume 30, p.367-369, 1998.
- CALLAWAY, R. M., THELEN, G. C., RODRIGUEZ, A., & HOLBEN, W. E. (2004). Soil biota and exotic plant invasion. *Nature*, 427(6976), 731-733.
- CANTERAS, N.S; SIMERLY, R.B; SWANSON, L.W. 1995. Organizations of projections from the medial nucleus of amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360, 213-245.
- CAVALHEIRO, E. A. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* ; 16:33-37.
- CAZARIN, K.C.C., CORRÊA, C.L., ZAMBRONE, F.A.D., 2004. Redução, refinamento e substituição de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40: 289-299.
- CAZENAVE, S.O.S., 1996. Alucinógenos. In: Olga, S. Fundamentos de Toxicologia, Atheneu, São Paulo 329-343.
- CAZENAVE, S.O.S., (2000). *Banisteriopsis caapi*: ação alucinógena e uso ritual. *Revista de Psiquiatria Clínica*, São Paulo, 27: 32-35.
- CHEN, Q., CHAO, R., CHEN, H., HOU, X. YAN, H., ZHOU, S & XU, A. (2005). Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International journal of cancer*, 114(5), 675-682.
- CHOPIN, P.; MORET,C.; BRILEY, M. (1994). Neuropharmacology of 5-Hydroxytryptamine 1B/1D Receptor Ligands. *Pharmac. Ther.*, v. 62, p. 385.
- CIPRIAN-OLLIVIER, J; CETKOVICH-BAKMAS, M. G. (1997). Altered consciousness states and endogenous psychoses: a common molecular pathway? *Schizophrenia research*, v. 28, n. 2, p. 257-265.
- CONFEN, Resolution nº 06/CoNFeN, 04 February 1986, URL: [http:// www.bialabate.net/text.1986](http://www.bialabate.net/text.1986).
- CONAD, Resolution nº 5/CoNAd, 4 November 2004, URL: <http://www.bialabate.net/texts.2004>.



- CONAD. Resolução nº 1, de 25 de janeiro de 2010. Diário Oficial da União, 26 jan 2010.
- CONVENTION ON PSYCHOTROPIC SUBSTANCES, 1971: Convention on Psychotropic Substances, entry into force August (1971) 16, 1976, 1019.
- COSTA, M.C.M.; FIGUEIREDO, M.C.; CAZENAVE, S.O.S. (2005). Ayahuasca: Uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 32 (6); 310-318.
- COURA, K E BETTI, R. Revista Veja Edição 2157 / 24 de março de 2010 e Will Robinson, Mail online, 28/04/2014
- COUTINHO, T. (2013). Curando através de imagens. Notas sobre os mecanismos terapêuticos de um rito urbano de consumo de Ayahuasca. Ponto Urbe. *Revista do núcleo de antropologia urbana da USP*, n. 13.
- CUNNINGHAM, C and SANDERSON, D. (2008) Malaise in the water Maze: untangling the effects of IL-1b and LPS on learning and memory. *Brain Behaviour and Immunity*. (In Press, doi:10.1016/j.bbi.2008.05.007).
- DA SILVA, A. V.; CAVALHEIRO, E. A. (2004). Epilepsia: uma janela para o cérebro. *Revista Multiciência*, n. 3..
- DALL'OGGIO, A. (2007). Morfologia dendrítica de neurônios do núcleo medial da amígdala de ratos: um estudo pela técnica de Golgi.
- DE LIMA, V.A. (1998). Papel do Núcleo Mediano da Rafe na regulação do condicionamento contextual em ratos. Dissertação de Mestrado em Psicobiologia Universidade de São Paulo.
- DE SOUZA, P.A., (2011). Alcaloides e o chá de ayahuasca: uma correlação dos “estados alterados da consciência” induzido por alucinógenos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 13(3): 349-358.
- DESMARCHELIER, C., GURNI, A., CICCIA, G., GUILIETTI, A.M., (1996). Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). *Journal Ethnopharmacology* 52 (1): 45-51.
- DICHI, J. B; BURINI, R. C. (1996). Alterações da defesa antioxidante na hepatopatia alcoólica. *Rev Metab Nutr*; 3:50.
- DONG, H.W; PETROVICH, G; SWANSON, L.W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Rev* **38**, 192-235.
- FÁBREGAS, J.M., GONZÁLEZ, D., FONDEVILA, S., CUTCHET, M., FERNÁNDEZ, X., BARBOSA, P.C.R., ALCÁZAR-CÓRCOLES, M.A., BARBANOJ, M.J., RIBA, J., BOUSO, J.C., (2010). Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca.

Drug and Alcohol Dependence 111 (3): 257-61.

- FIGUEROA, A. R. M. (2012). Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FREITAS, S. H., EVÊNCIO-NETO, J., DÓRIA, R. G. S., MENDONÇA, F. S., SIMÕES, M. J., CAMARGO, L. M., & SÉBE, A. A. (2009). Macroscopic, morphologic and morphometric aspects of the spleen of rats after total clamping of the hepatic pedicle. Aspectos macroscópicos, morfológicos e morfométricos do baço de ratos após o clampeamento total do pedículo hepático. *Ciência Animal Brasileira*, 10.
- FRANZEN, F.; GROSS, H. (1965). Tryptamine, N,N-dimethyltryptamine, N,N-dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. *Nature.*, v.21, p.84-93.
- GABLE, R.S., (2007). Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction*. 102 (1):24-34.
- GARERI, P.; STILO, G.; BEVACQUA, I.; MATTACE, R.; FERRERI, G.; DE SARRO, G. (1997). Antidepressant drugs in the elderly. *Gen. Pharmac.*, v. 30, p. 465-475, 1998.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. *Color Text book of Histology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- GINGERICH, W.H. e DALICH, G.M. (1982) An evaluation of liver toxicity in rainbow trout following treatment with monochlorobenzene. *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 21: 475-480.
- GLENNON, R.A., DUKAT, M., WETKAEMPER, R.B., (2000). Serotonin receptor subtypes and ligands. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Disponível em: <http://www.acnp.org/G4/GN401000039/Ch039.html>
- GOULART, S. L. (2004). Contrastes e continuidades em uma tradição Amazônica: as regiões da Ayahuasca.
- GOULART, S. L., (2005). Contrastes e continuidades em uma tradição religiosa amazônica: os casos do Santo Daime, da Barquinha e UDV. In: LABATE, B.C., GOULART, S.L. (Orgs.), *O uso ritual das plantas de poder. Mercado de Letras*, Campinas, pp. 355–396.
- GOULART, S.L. (1996). *As raízes culturais do Santo Daime*. FFLCH, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GRAY J, M. N. *The neuropsychology of anxiety*. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Oxford University Press; 2000. P. 2-36.
- GRELLA, B., TEITLER, M., SMITH, C., HERRICK-DAVIS, K., GLENNON, R.A.

- (2003). Binding of beta-Carbolines, 5-HT<sub>2</sub> Serotonin Receptors *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 4421–4425.
- GROB, C. S., McKENNA, D. J., CALLAWAY, J. C., BRITO, G. S., ANDRADE, E. O., OBERLAENDER, GUILHERME ... & NEVES, E. S. (2004). Farmacologia humana da hoasca: efeitos psicológicos. *O uso ritual da ayahwasca*, 653-669.
- GROB, C.S., MCKENNA, D.J., CALLAWAY, J.C., BRITO, G.S., NEVES, E.S., OBERLAENDER, G., SAIDE, O.L., LABIGALINE, E., TACLA, C., MIRANDA, C.T., STRASSMAN, R.J., BOONE, K.B. (1996). Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *Journal of Nervous and Mental Disease* 184: 86-94.
- GROISMAN, A. (2000). Santo Daime in the Netherlands: An Anthropological Study of a New World Religion in a European Setting. Tese de Doutorado em Antropologia, Univ. of London, London.
- GUBBELS-VAN HAL W. M., BLAAUBOER B.J., BARENTSEN H.M., HOITINK M.A., MEERTS I.A., VAN DER HOEVEN J.C. (2005). An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 42, n. 3, p. 284-95.
- GUYTON, A. C. Fisiologia Humana. 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara. 2008. 564 p.
- HALPERN, J. H., SHERWOOD, A. R., PASSIE, T., BLACKWELL, K. C., & RUTTENBER, A. J. (2008). Evidence of health and safety in American members of a religion who use a hallucinogenic sacrament. *Med Sci Monit*, 14(8), 22.
- HALPERN, J.H. (2004). Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Journal Pharmacology and Therapeutics* 102: 131-138.
- HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. (1998). Farmacologia Ilustrada. Ed. Artmed: Porto Alegre, p.478.
- HOU, G.; YANG, X.; YUAN, T.-F. (2013). Hippocampal Asymmetry: Differences in Structures and Functions. *Neurochem Res*.
- ISERI, P. K., Karson, A., Gullu, K. M., Akman, O., Kocurk, S., Yardımcıoğlu, M., ... & Ates, N. (2011). The effect of memantine in harmaline-induced tremor and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 61(4), 715-723.
- JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. *Medical hypotheses*, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005.

- JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. (2003). Estresse, depressão e hipocampo Stress, depression and the hippocampus. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 25, n. Supl II, p. 46-51.
- JUNQUEIRA, L.C. U.; CARNEIRO, J. (2008). *Histologia Básica, Texto e Atlas*, 11<sup>a</sup> Edição. Brasil: Editora Guanabara Koogan. 556 p.
- KATZUNG, B.G. (1998). *Farmacologia Básica e Clínica*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 1046p.
- KRYSIAK, B.; RYDZYNSKI, K. (1997). Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose and a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. *Med Pr.*, v.48, n.5, p. 561-78.
- LABATE, B. C & ARAÚJO, W. S. (2004). *O uso ritual da ayahuasca*. FAPESP.
- LABATE, B. C.; GOULART, S.; FIORE, M.; MACRAE, E.; CARNEIRO, H. (2008). *Drogas e cultura: novas perspectivas*. Salvador: Edufba.
- LABATE, B. C. (2012). Paradoxes of ayahuasca expansion: The UDV-DEA agreement and the limits of freedom of religion. *Drugs: Education, Prevention and Policy*, 19(1), 19–26.
- LABATE, B. (2006). *A Reinvenção do Uso da Ayahuasca nos Centros Urbanos*. Campinas :Mercado de Letras.
- LABATE, B.C., ARAÚJO, W.S., (2002). O uso ritual da Ayahuasca. Campinas: *Mercado das Letras* 322-330.
- LABATE, B.C. (2004). *A reinvenção do uso da ayahuasca nos centros urbanos*. Campinas, São Paulo:Mercado de Letras/ Fapesp.535pp.
- LAMÔNICA, D. A. C., SAES, S. D. O., PARO, P. M. M., BRASOLOTTO, A. G., & SOARES-BARBOSA, A. (2003). Doença de Parkinson: proposta de protocolo de anamnese. *Salusvita*, 22(3), 363-371.
- LATHE, R. (2001). Hormone and hippocampus. *J Endocrinol*;169:205-31.
- LENT, R. (2008). *Neurociência: Da mente e do comportamento*, 1<sup>a</sup> Edição. Brasil: Lab Brasil Editora. 374 p.
- LUNA, L. E. (1986). Vegetalismo: shamanism among the mestizo population of the Peruvian Amazon. *Studies in Comparative Religion, Almqvist and Wiksell International*, Stockholm.
- LUNA, L.E. (2011). Indigenous and mestizo use of ayahuasca. An overview. In: Guimarães dos Santos R (ed.) *The ethnopharmacology of ayahuasca*. 1st ed. Trivandrum,

- India: *Transworld Research Network*, 2011, pp. 1–21.
- LUNA, L.E. (2005). Narrativas da alteridade: a ayahuasca e o motivo de transformação em animal. In: LABATE, B.C. & GOULART, S.L. O uso ritual das plantas de poder. Campinas, São Paulo: *Mercado de Letras* 333-354.
- MACRAE, E. (2004). The ritual use of Ayahuasca by three brazilian religions. *Drug Use and Cultural Contexts* “Beyond the West Coomber, pp. 27-45.
- MAHMOUDIAN, M., HOSSEIN J. H., SALEHIAN, P. (2002). Toxicity of peganum harmala: review and a case report. *Iran. Journal Pharmacology Therapeutics* 1: 1-4.
- MALBERG, J. E., EISCH, A. J., NESTLER, E. J., & DUMAN, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 20(24), 9104-9110.
- MARTINEZ, G. B., SILVA, C. P. (2010). Ayahuasca—aspectos botânicos e farmacológicos Ayahuasca—botanical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde-USCS*, v. 7, n. 22.
- MAYER, H. (1996). Human-biometeorologische probleme des stadtklimas. *GEOWISSENSCHAFTEN-WEINHEIM-*, v. 14, p. 233-239.
- MCILHENNY, E. H., RIBA, J., BARBANOJ, M. J., STRASSMAN, R., & BARKER, S. A. (2011). Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of the Amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine. *Biomedical Chromatography*, 25(9), 970-984.
- MCKENNA D. (2004). Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacol Ther.*102(1):111-29.
- MCKENNA, D.J., CALLAWAY, J.C., GROB, C.S., (1998). The scientific investigation of ayahuasca: A review of past and current research. *The Heffer Review os Psychedelic Research*.
- MCKENNA, D.J., TOWERS, G.H.N., ABBOTT, F. (1984). Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and betacarboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology* 10:195-223.
- MCKENNA, D.J.; CALLAWAY, J.C.; GROB, C.S. (1998). The scientific investigation of ayahuasca: A review of past and current research. *The Heffer Review os Psychedelic Research*.
- MCKENNA, D.J.(2004) Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges." *Pharmacology & therapeutics* 102.2: 111-129.



- MEEKS, R.G.; HARRISON, S.D.; BULL, R.J. (2000). *Hepatotoxicology. Florida: Corporate Blvd Boca Raton.*
- MELLO, L. E., CAVALHEIRO, E. A., TAN, A. M., KUPFER, W. R., PRETORIUS, J. K., BABB, T. L., & FINCH, D. M. (1993). Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 34(6), 985-995.
- MERCANTE, M. S. (2003). O uso ritual da ayahuasca. *Horizontes Antropológicos*, v. 9, n. 19, p. 323-330,
- MERCANTE, M. S. (2006). Ayahuasca spiritual experiences. The objectivity of spiritual experiences: spontaneous mental imagery and spiritual space. *Revista eletrônica in-formação e Cognição*, v. 5, n. 1, p. 78-98, São Paulo.
- MEYERS, T.R. & HENDRICKS, J.D. (1985). Histopathology. In: RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. (Ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Washington: Hemisphere Pub. p.283-331.
- MIWA, J. M., STEVENS, T. R., KING, S. L., CALDARONE, B. J., IBANEZ-TALLON, I., XIAO, C., ... & HEINTZ, N. (2006). The Prototoxin. Acts on Nicotinic Acetylcholine Receptors to Balance Neuronal Activity and Survival In Vivo. *Neuron*, 51(5), 587-600.
- MORENO, R. A; MORENO, D. H; SOARES, M. B. M. (1999) *Psicofarmacologia de antidepressivos*. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 21, p. 24-40.
- MOSLEN, M. T. (2001) Toxic responses of the liver. In C. D. Klaassen, Casarett and Doull's *Toxicology: The basic Science of Poisons (6th Edition)*. Cap. 13, pp. 471- 489.
- MOSSNER, R; LESCH, K-P. (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain, Behav. Immu.*, v.12, p 249-271.
- MOTTA, L. S. G. (2013). Toxicidade aguda, neurotoxicidade reprodutiva e embriotoxicidade do chá ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) em ratas wistar. Universidade de Brasília.
- NARANJO, P. (1986). El ayahuasca en la arqueologia ecuatoriana. *America Indígena*, v. 46, n.1, p. 115-127.
- NEVES & SOUZA, (2010). Livro: Comunidades tradicionais da Ayahuasca – Construindo Políticas publicas para o Acre – Organização Marcos Vinicius Neves e Maria Leudes da Silva Souza – 1º Edição – Rio Branco Assembleia Legislativa do Estado do Acre)
- O'CONNOR , K.A., ROTH, B.L., (2005). Screening the receptorome for plant-based psychoactive compounds. *Life Sciences* 506 – 511

- OECD 423: Organization for economic co-operation and development) 2001. Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline: 423. <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/>
- OECD (2001). *Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. doi:
- OLIVEIRA, C. D. R., MOREIRA, C. Q., de SÁ, L. R. M., de SOUZA SPINOSA, H., & YONAMINE, M. (2010). Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in Wistar rats. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 89(3), 207-212.
- OLIVEIRA, C. D. R.D., MOREIRA, C. Q., SPINOSA, H. D. S., & YONAMINE, M. (2011). Neurobehavioral, reflexological and physical development of Wistar rat offspring exposed to ayahuasca during pregnancy and lactation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), 1065-1076.
- OLIVEIRA, F. C. (2013). Avaliação do papel da serotonina e seus receptores no desenvolvimento da constipação intestinal..
- OTT, J. (1994). *The of Entheogens & The Angels Dictionary*. Natural Products Co., Kennewick, WA.
- PAXINOS, G & WATSON, C. (2009). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed, London: Academic, 340 p.
- PEYRON, C., TIGHE, D. K., VAN DEN POL, A. N., DE LECEA, L., HELLER, H. C., SUTCLIFFE, J. G., & KILDUFF, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience*, 18(23), 9996-10015.
- PINTO, J. P. "Estudo sobre alterações neurofuncionais após ingestão de ayahuasca." 2010.
- PIRES, A.P.S., OLIVEIRA, C.D.R., YONAMINE, M. (2010). Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. *Revista Ciências Farmacêuticas e Básica Aplicada* 31(1): 15-23.
- POMILIO, A.B., VITALE, A.A., CIPRIAN-OLLIVIER, J., CETKOVICH-BAKMAS, M., GOMEZ, R., VÁZQUEZ, G. (1999). Ayahuasca: na experimental psychosis that mirrors the transmethylation hypothesis of schizophrenia. *J. Ethnopharmacol.*, v.65, n.1, p29-51.
- POPE, E. R; ROCHAT, M. C. (1996). Baço. In: BOJRAB, M. J. *Mecanismo da moléstia na cirurgia dos pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Manole. p. 722-728.

- PULSINELLI, W. (1992). Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *The lancet*, v. 339, n. 8792, p. 533-536.
- RIBA, J., FORNELLS, A.R., URBANO, G., MORTE, A., ANTONIJOAN, R., MONTERO, M., CALLAWAY, J.C. (2001). Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage ayahuasca in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 154:85–95.
- RIBA, J., VALLE, M., URBANO, G., YRITIA, M., MORTE, A., BARBANOJ, M.J. (2003). Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* 306(1): 73-83.
- RICHARD, S. J.; SHERIND, R. G. (1998). Clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, p. 206-207.
- RIEDEL, G; MICHEAU, J. (2001). Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 25, n. 4, p. 835-853..
- ROBBINS & COTRAN; 2005; Bases Patológicas das Doenças, Patologia., 7ª. Ed. Editora Elsevier.
- RUIZ, H., & PAVON, J. (1798). *Systema vegetabilium florum Peruvianae et Chilensis, characteres prodomi genericos differentiales, specierum omnium differentias...* Gabrielis de Sancha.
- SAMOYLENKO, V., RAHMAN, M. M., TEKWANI, B. L., TRIPATHI, L. M., WANG, Y. H., KHAN, S. I., ... & MUHAMMAD, I. (2010). Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *Journal of ethnopharmacology*, 127(2), 357-367.
- SANTOS, A. C., AZEVEDO, B. R. D. M. S., PEREIRA, N. K., IRULEGUI, R. D. S. C., & BARACHO, N. C. D. V. (2013). Efeitos Cardiovasculares, Renais e Hepáticos Produzidos pela Administração Crônica de Ayahuasca em Ratos Hipertensos/Cardiovascular, Renal and Hepatic Effects Produced by Chronic Administration of Ayahuasca in Hypertensive Rats. *REVISTA CIÊNCIAS EM SAÚDE*, 3(4), 21-38.
- SANTOS, R. G. (2011). Efeitos da ingestão de ayahuasca em estados psicométricos relacionados ao pânico, ansiedade e depressão em membros do culto do Santo Daime.

- SANTOS, R.G. (2004). Resenha: o uso ritual da ayahuasca. Labirinto, Universidade Federal de Rondônia.
- SANTOS, R.G.; MORAES, C.C.; HOLANDA, A. (2006). Ayahuasca e redução do uso abusivo de psicoativos: eficácia terapêutica? *Psicologia: teoria e pesquisa*, volume 22, p. 363-370.
- SCHENBERG, E. E. (2013). Ayahuasca and cancer treatment. *SAGE Open Medicine*, v. 1, p. 2050312113508389.
- SCHIMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T.F. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neurosci.*, 40: 599-636.
- SCHNELLMANN R.G. (1996) Toxic responses of the kidney. In C. D. Klassen, Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (5th ed.) New York: McGraw-Hill. pp. 491-512.
- SCHVARTSMAN, S., (1992). Plantas venenosas e animais peçonhentos. 2ª edição São Paulo: Sarvier.
- SCHWARZ, M. J., HOUGHTON, P. J., ROSE, S., JENNER, P., & LEES, A. D. (2003). Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 627-633.
- SEINDENBECHER, T.; LAXMI, R.; STORK, O.; PAPE, H.C. (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*; 301:846-50.
- SHANON, B. (2003). Os conteúdos das visões da ayahuasca. *Mana*, v. 9, n. 2, p. 109-152.
- SHANON, B. (2002). *The Antipodes of the Mind.: Charting the Phenomenology of the Ayahuasca Experience*. Oxford University Press.
- SHARAPIN, N. (1996). Problemas de controle de qualidade na indústria de fitofármacos. In Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 14, 1996, Florianópolis – SC. Resumos. Florianópolis, p. 25.
- SHUMAKE, J.; EDWARDS, E.; GONZALEZ-LIMA, F. (2003) Dissociation of septo hippocampal metabolism in the congenitally helpless rat. *Neurosci* 2002;114(2):373-7. strategies. *Eur Neuropsychopharmacol*;13:57-66.
- SILVA, L.O., (2004). Estudo sobre o castigo simbólico, ou peia, do culto do Santo Daime. Dissertação de mestrado em ciências da religião, PUC/SP.
- SLATTER, D. (1998). Manual de cirurgia de pequenos animais. 2. ed. São Paulo: Manole, v. 1. p. 1151-1153.

- SMALL, S. A.; SCHOBEL, S. A.; BUXTON, R. B.; WITTER, M. P.; BARNES, C. A.A. (2011). Pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 12.
- SMITH RL, CANTON H, BARRETT RJ, SANDERS-BUSH E. (1998). Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Pharmacol Biochem Behav* ; 61: 323–330.
- STITES, D. P.; TERR, A.I.; PARLOW, T. G. (1997). Medical immunology. 9. ed. Singapore: Appleton & Lange,. p. 55-59.
- STRASSMAN, R. (2001). DMT: the spirit molecule. Rochester, VT.
- STRASSMAN, R.J., QUALLS, C.R., UHLENHUTH, E.H., KELLNER, E., (1994). Dose-response study of N, N-dimethyltryptamine in humans. II. Subjective effects and preliminary results of a new rating scale. *Archives of General Psychiatry* 51(2): 98-108.
- STUCKEY DE, LAWSON R, LUNA LE. (2005). EEG gamma coherence and other correlates of subjective reports during ayahuasca experiences. *J Psychoactive Drugs*; 37(2):163-78.
- SZÁRA, S. (1957). The comparison of the psychotic effect of tryptamine derivatives with the effects of mescaline and LSD-25 in self-experiments. In: GARATTINI, S.& GHETTI, V. (eds.). *Psychotropic drugs*. Amsterdã, Holanda: Elsevier,. p. 460-467.
- TREVAN, J. (1927). The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society*. v. 101B, p. 483-514.
- TUPPER, K.W. (2008). The globalization of ayahuasca: Harm reduction of benefit maximization. *International Journal of Drug Policy* 19 (4): 297-303.
- UNITED NATIONS (1971). Convention on psychotropic substances. United Nations. Disponível em: <http://www.incb.org/pdf/e/conv/convention>
- VALADARES, M. C. (2006). Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a era do teste DL50. *Revista Eletrônica de Farmácia* 3(2): 93-98.
- VERTES, R. P.; CRANE, A.M. (1997). Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 378: 411-424.
- WANG, Y. H., SAMOYLENKO, V., TEKWANI, B. L., KHAN, I. A., MILLER, L. S., CHAURASIYA, N. D., ... & MUHAMMAD, I. (2010). Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of*



*ethnopharmacology*, 128(3), 662-671.

WHO, 1998. Quality control methods for medicinal plant material. Geneva, 1998.

XAVIER, G. F. (1999). Técnicas Para O Estudo do Sistema Nervoso. 1. ed. São Paulo: Plêiade,. v. 1. 241 p

YRITIA, M., RIBA, J., ORTUNO, J., RAMIREZ, A., CASTILLO, A., ALFARO, Y., ... & BARBANOJ, M. J. (2002). Determination of N,N-dimethyltryptamine and  $\beta$ -carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. *Journal of Chromatography B*, 779(2), 271-281.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. ; CECHINEL FILHO, V. (2001) Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 147-152.

ZELIKOFF, J.T. (1998) Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinelspecies: predictive value for mammals? *Toxicology*, 129(1): 63-71.

ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L.; SQUIRE, L.R.(1999). *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press, 2 ed.

## **ANEXOS**



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 05 de maio de 2011.



## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO CHÁ AYAHUASCA E DE SEUS COMPONENTES BIOATIVOS EM RATOS: DOSE LETAL AGUDA, COMPORTAMENTO, TOXICIDADE REPRODUTIVA E EMBRIOTOXICIDADE”**, UnBDOC n.º 107766/2010, sob responsabilidade da Profa. Eloísa Dutra Caldas, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA



# Behavioural Pharmacology

## Acute oral toxicity, behaviour and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rats --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Acute oral toxicity, behaviour and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rats
<b>Article Type:</b>	Review Article
<b>Keywords:</b>	ayahuasca; acute doses; behavioural tests; neurotoxicity
<b>Corresponding Author:</b>	Eloisa D caldas, PhD University of Brasilia Brasilia, BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	University of Brasilia
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Aline Pic-Taylor, PhD
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Aline Pic-Taylor, PhD Luciana G da Motta, MSc Juliana A de Moraes Alana F A Santos Willian Melo Junior Leandro A Campos, PhD Marcia R Mortari, PhD Marcus V von Zuben, PhD Eloisa D caldas, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	BRAZIL
<b>Abstract:</b>	<p>Ayahuasca, a psychoactive beverage used by indigenous and religious groups, is generally prepared by the coction of Psychotria viridis and Banisteriopsis caapi, plants containing N,N-dimethyltryptamine (DMT) and <math>\beta</math>-carboline alkaloids, respectively. To investigate the acute toxicity of ayahuasca, the infusion was administered by gavage to female Wistar rats at doses of 30 (30X) and 50 times (50X) the usual dose taken during a União do Vegetal ritual, and the animals observed for 14 days. Behavioural functions were investigated one hour after dosing at 15X and 30X using the open field, elevated plus maze, and forced swimming tests, which also included a fluoxetine group (20 mg/kg bw i.p). Neuronal activation (c-fos marked neurons) and toxicity (Fluoro-Jade B and Nissl/cresyl staining) were investigated in the dorsal raphe nuclei (DRN), amygdaloid nucleus, and hippocampal formation brain areas of rats treated with a 30X ayahuasca dose. The lethal oral dose was determined to be higher than the 50X dose (15.1 mg/kg bw DMT), indicating a large margin of safety for humans within the religious context. The ayahuasca and fluoxetine treated groups showed a significant decrease in locomotion in the open field and elevated plus-maze tests compared to controls. In the forced swimming test, ayahuasca treated animals swam more than controls, a behaviour that was not significant in the fluoxetine group. Treated animals showed higher neuronal activation in all brain areas involved in serotonergic</p>

neurotransmission. Although this led to some brain injury, no permanent damage was detected. These results suggest that ayahuasca has antidepressant properties in Wistar female at high doses, an effect that should be further investigated at doses closer to the ritualistic doses.



1           **Acute oral toxicity, behaviour and neurotoxic effects of ayahuasca infusion**  
2           **(*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rats**

3  
4   Aline Pic-Taylor<sup>a</sup>, Luciana Gueiros da Motta<sup>b</sup>, Juliana Alves de Moraes<sup>a</sup>, Alana de  
5   Fátima Andrade Santos<sup>b</sup>, Willian Melo Junior<sup>a</sup>, Leandro Ambrósio Campos<sup>c</sup>, Marcia  
6   Renata Mortari<sup>c</sup>, Marcus Vinicius von Zuben<sup>d</sup> and Eloisa Dutra Caldas<sup>b</sup>

7  
8   <sup>a</sup>Department of Genetic and Morphology, Institute of Biology, University of Brasilia,  
9   Brasilia-DF, Brazil

10   <sup>b</sup>Laboratory of Toxicology, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia-  
11   DF, Brazil

12   <sup>c</sup>Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasilia,  
13   Brasilia-DF, Brazil

14   <sup>d</sup>*Centro Espírita Beneficente União do Vegetal*, Brasilia-DF, Brazil

15  
16  
17   \*Correspondence to Eloisa D. Caldas, PhD, Laboratory of Toxicology, Faculty of  
18   Health Sciences, University of Brasilia, 70910900 - Brasilia-DF, Brazil; Tel/FAX:  
19   ++ 55 61 31071875; e-mail:eloisa@unb.br

21 **Abstract**

22 Ayahuasca, a psychoactive beverage used by indigenous and religious groups, is  
23 generally prepared by the coction of *Psychotria viridis* and *Banisteriopsis caapi*, plants  
24 containing N,N-dimethyltryptamine (DMT) and  $\beta$ -carboline alkaloids, respectively. To  
25 investigate the acute toxicity of ayahuasca, the infusion was administered by gavage to  
26 female Wistar rats at doses of 30 (30X) and 50 times (50X) the usual dose taken during  
27 a *União do Vegetal* ritual, and the animals observed for 14 days. Behavioural functions  
28 were investigated one hour after dosing at 15X and 30X using the open field, elevated  
29 plus maze, and forced swimming tests, which also included a fluoxetine group (20  
30 mg/kg bw i.p). Neuronal activation (*c-fos* marked neurons) and toxicity (Fluoro-Jade B  
31 and Nissl/cresyl staining) were investigated in the dorsal raphe nuclei (DRN),  
32 amygdaloid nucleus, and hippocampal formation brain areas of rats treated with a 30X  
33 ayahuasca dose. The lethal oral dose was determined to be higher than the 50X dose  
34 (15.1 mg/kg bw DMT), indicating a large margin of safety for humans within the  
35 religious context. The ayahuasca and fluoxetine treated groups showed a significant  
36 decrease in locomotion in the open field and elevated plus-maze tests compared to  
37 controls. In the forced swimming test, ayahuasca treated animals swam more than  
38 controls, a behaviour that was not significant in the fluoxetine group. Treated animals  
39 showed higher neuronal activation in all brain areas involved in serotonergic  
40 neurotransmission. Although this led to some brain injury, no permanent damage was  
41 detected. These results suggest that ayahuasca has antidepressant properties in Wistar  
42 female at high doses, an effect that should be further investigated at doses closer to the  
43 ritualistic doses.

44

45 **Keywords:** ayahuasca; acute doses; behavioural tests; neurotoxicity

46

47

48

## 49 Introduction

50 Ayahuasca (or hoasca) is a psychoactive beverage traditionally used in  
51 shamanic rituals by various indigenous populations of the Amazon (McKeena, 2004). It  
52 was introduced to non-indigenous Brazilians in the 1930s, and its use by religious  
53 groups, including *Santo Daime* and *União do Vegetal*, spread beyond the Amazon  
54 borders in the 1970s (UDV) (McRae, 2004). Religious use of ayahuasca has been  
55 regulated in Brazil since 1986 in response to concerns raised by society and health  
56 authorities regarding its inadequate use, while ensuring the freedom of religious  
57 practices (CONAD, 2010). Its use has also been regulated in other countries, including  
58 the USA, Belgium and the Netherlands (Labate and Feeney, 2012; Blainey, 2014).  
59 However, ayahuasca consumption has extended beyond religious practices, and may  
60 occur in recreational contexts by people seeking the psychedelic effects of the infusion.

61 The psychoactive properties of ayahuasca are produced by the substances  
62 present in the plants normally used to prepare the infusion: N,N-dimethyltryptamine  
63 (DMT) present in the leaves of *Psychotria viridis*, and  $\beta$ -carboline alkaloids such as  
64 harmine, harmaline and tetrahydroharmine, present in the *Banisteriopsis caapi* vine  
65 (MacRae, 2004) (Fig. 1). DMT, a non-selective serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT;  
66 Fig. 1) receptor agonist, elicits its effect through stimulation of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin  
67 receptor (Smith et al., 1998), an action that may be attenuated by its interaction with 5-  
68 HT<sub>1A</sub> receptors (Halberstadt and Geyer, 2011). However, unlike other hallucinogens,  
69 DMT is inactive when administered orally, as it is readily metabolized by monoamine  
70 oxidases (MAO) (Suzuki et al., 1981).  $\beta$ -carboline, mainly harmine and harmaline,  
71 inhibit MAO activity (Wang et al., 2010), and therefore block the metabolic breakdown  
72 of DMT in the liver and gut. Thus, when DMT is absorbed in the gastrointestinal tract,  
73 the psychoactive properties of the ayahuasca infusion can occur (Ott, 1999; Riba et al.,  
74 2003). Furthermore, as MAO inhibitors,  $\beta$ -carboline can increase the level of serotonin  
75 in the brain (McKeena et al., 1984), and are capable of inducing direct psychoactive  
76 effects (Freedland and Mansbach, 1999; Brierley and Davidson, 2012). Brierley and  
77 Davidson (2013) also suggested that harmine augments dopamine efflux via a novel  
78 shell-specific, presynaptic 5-HT<sub>2A</sub> receptor-dependent mechanism, independent of  
79 MAO inhibitory activity.

80 The effects and pharmacokinetics of ayahuasca in healthy volunteers after a  
81 single or two-repeated ritual doses (about 0.5 - 1 mg/kg bw of DMT) have been  
82 thoroughly described in the literature (Callaway et al., 1999; Riba et al., 2003; Barbanøj

83 et al., 2008; Bouso et al., 2012; Santos et al., 2012; Riba et al., 2012). Other studies  
84 have investigated the therapeutic properties of ayahuasca, primarily to treat drug  
85 addiction (Brierley and Davidson, 2012; Thomas et al., 2013).

86 Although the ritualistic use of ayahuasca is considered to be safe,  
87 indiscriminate use in large doses may have serious mental and physical health  
88 consequences (Santos, 2013). However, experimental data from studies with animals  
89 exposed to high doses of the infusion remain scarce in the literature. The present study  
90 aimed at investigating the lethal dose, the impact on behaviour, and the neurotoxic  
91 potential in female Wistar rats after acute exposure at high-dose levels of an ayahuasca  
92 infusion.

93

## 94 **Methods**

### 95 **Subjects**

96 The study was conducted with healthy nulliparous female Wistar rats aged  
97 between 9 and 12 weeks. The animals were acquired from Granja RG (São Paulo,  
98 Brazil) and allowed to acclimatize for a 15-day period in the Faculty of Health Sciences  
99 of the University of Brasilia (UnB) animal house prior to study initiation. Subjects were  
100 kept individually in polypropylene cages under controlled conditions: 12h/12h,  
101 light/dark; 22-25° C; 45-60% humidity, and received water and the commercial feed  
102 Purina® *ad libitum*. Animals were fasted for 12 hours prior to gavage, and free access to  
103 water and food was re-introduced 4 hours after dosing. The experimental protocol was  
104 approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UnB Institute of Biological  
105 Sciences (No. 107766/2010).

106

### 107 **Ayahuasca infusion**

108 The ayahuasca infusion was provided by an *União do Vegetal* (UDV) group in  
109 the Federal District, Brazil. Plants were collected and the infusion prepared in April  
110 2011. The mariri vine (*Banisteriopsis caapi*) was collected in *Águas Lindas de Goiás*  
111 (15° 46' 17"S; 48° 14' 56"W) and the chacrona leaves and shrubs (*Psychotria viridis*)  
112 were collected in Sobradinho, Federal District (15° 75' 23"S; 47° 72' 92"W). Specimens  
113 of the mariri vine and chacrona leaves used to prepare the infusion were deposited in the  
114 University of Brasilia (UnB) Herbarium under the reference numbers Azevedo EP  
115 149880 BRAHMS and Trieto B 149879 BRAHMS, respectively. The ayahuasca

116 infusion prepared by the UDV was kept at -20°C until lyophilisation (Liotop L101) to  
117 be used throughout the experiment. Dry matter corresponded to 16% (w/v) of the  
118 infusion. The doses selected for this study were based on the usual dose consumed  
119 during a UDV ritual, which corresponds to 150 mL for a 70 kg person (1X).  
120 Appropriate weighed lyophilized materials were subsequently re-suspended in 3 mL of  
121 filtered water prior to treatment, and administered by oral gavage to the rats.

122

### 123 **Chemical characterization of the ayahuasca infusion**

124 Harmaline (99.2% purity) and harmine (98% purity) standards were obtained  
125 from Sigma Aldrich. DMT was synthesized according to Qu et al. (2011), and its  
126 identity and purity confirmed by GC-MS/MS (Trace GC Ultra coupled with a TSQ  
127 Quantum XLS Triple Quadrupole; Thermo Scientific), <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR (Varian  
128 Mercury Plus spectrometer 7.05 T operating at 300 MHz for <sup>1</sup>H and at 75.46 MHz for  
129 <sup>13</sup>C), and LC-MSD TOF (Agilent 1100 Series) for exact mass determination.

130 A 100 µL aliquot of the infusion was dissolved in 10 mL acetonitrile, 1 mL  
131 filtered in Millex LCR PTFE 0.45 µm membrane, and 1 µL injected in the GC-MS/MS  
132 for quantification against standard curves of harmaline, harmine and DMT prepared in  
133 acetonitrile. For DMT (MW of 187.3), the quantification and confirmation ions were  
134 m/z of 77 and 58 (β-cleavage), respectively. The results were confirmed by LC/MS/MS  
135 (LC Shimadzu coupled to a triple quadrupole mass spectrometer 4000QTRAP, Applied  
136 Biosystem/MDS Sciex). The analysis showed that the ayahuasca infusion contained  
137 1.56 mg/mL harmine, 0.122 mg/mL harmaline and 0.141 mg/mL DMT. A ritual dose of  
138 this infusion (150 mL) contained 234 mg harmine, 18.3 mg harmaline and 21.2 mg  
139 DMT.

140

### 141 **Acute oral toxicity test**

142 The acute oral toxicity of the ayahuasca was determined based on the OECD  
143 Guide protocol 423/2001 (Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method), which is a  
144 stepwise procedure using three animals of a single sex per step/dose. Depending on the  
145 mortality and/or moribund status of the animals, the experiment is repeated at a lower  
146 dose (at least 2 moribund or dead animals), or a higher dose (a maximum of one  
147 moribund or dead animal). Each dose was tested in duplicate to determine the  
148 classification in a toxicological ranking. The test started out at an empirical dose of 30  
149 times (=30X) the usual ayahuasca ritual dose (3 mL total volume).



150           Animals were weighed prior to administration ( $276.4 \pm 9.0$  g), and at three-day  
151 intervals following administration. Daily observations were made for clinical effects,  
152 including posture, tremor, piloerection, vocalization and convulsion. On day 14, all  
153 animals were euthanized by CO<sub>2</sub> exposure, and the liver, spleen, heart, brain and  
154 kidneys were macroscopically analyzed and weighed. Organ fragments were fixed in  
155 4% formalin for 24 h and embedded in paraffin; 5–6  $\mu$ m sections were obtained using a  
156 microtome (Leica), and stained with haematoxylin and eosin (H&E). Alterations from  
157 the normal structure were investigated under a light microscope (Olympus BX41 with a  
158 SCANSCOPE).

159

### 160 **Behaviour tests**

161           Female rats ( $223 \pm 16$  g) treated with 15X and 30X doses (n=10 at each dose) of  
162 ayahuasca were used to investigate motor and sensory behavioural functions one hour  
163 after dosing using the open field (Hall, 1934), elevated plus maze (Pellow et al., 1985),  
164 and forced swimming tests (Porlsot et al., 1978; Detke et al., 1995; Slatery and Cryan,  
165 2012). The forced swimming test protocol (Detke et al., 1995; Slatery and Cryan, 2012)  
166 requires the inclusion of a fluoxetine positive control group (n=10) at a dose of 20  
167 mg/kg bw (intra peritoneal, ip). This protocol also requires that the rats go over an  
168 adaptation phase 24 hours before the test starts, when they are left to swim for 15 min.  
169 Each test was performed by a single, trained person, blind to the treatment doses.  
170 Fluoxetine was a gift from *Farmacotécnica*, Brazil.

171           The open field equipment consisted of a 96 cm diameter circular white wooden  
172 arena, with a 34 cm wall. The floor was divided into 18 squares and a central area. One  
173 hour after ayahuasca administration, the animals were placed in the central area and  
174 their behaviour observed for 5 minutes for locomotion (number of quadrants crossed),  
175 number of entries in the central square, and number of rearing, grooming, defecation  
176 (number of faecal boli), and urination.

177           Immediately after the open field test, the animal was placed in the central  
178 platform of the elevated plus-maze, facing a closed arm. The equipment consisted of a  
179 plus-shaped wooden apparatus painted black with two open and two closed arms (each  
180 50 cm long), with an open roof, and elevated 38 cm from the floor with a central  
181 platform (10 x 10 cm). The closed arms had 43-cm-high walls. Animal behaviour was  
182 observed for 5 minutes for number of entries in the open and closed arms, time spent in  
183 the open and closed arms and in the central area, and number of rearing, grooming,

184 defecation and urination.

185         Following the elevated plus maze test, each rodent was submitted to the forced  
186 swimming test in a transparent glass tank, 50.5 cm tall by 39 cm in diameter, filled with  
187 water (approximately 25°C) to a depth of 30 cm. Fluoxetine, a selective serotonin  
188 reuptake inhibitor (SSRI) antidepressant, was administered 23, 5 and 1 h prior to the  
189 test. The test was scored every 5 sec for 5 min for immobility, swimming and climbing  
190 (Detke et al., 1995).

191

## 192 **Neurotoxicity tests**

193         Animals treated at 30X and controls (n=6 for each group) were placed in an open  
194 field arena for a 2-hour period prior to euthanasia via intra-peritoneal thiopental  
195 overdose (240 mg/kg bw). Using a peristaltic pump (AVS Projects), transcardial  
196 perfusion was conducted in each animal with a 0.9% saline solution (at 8mL/min for 5  
197 minutes), followed by a 4% formalin solution (10mL/min for 15 minutes). The brain  
198 was removed, fixed in 4% formalin solution for 48 hours, and stored in 30% sucrose  
199 solution. Each brain was sliced (coronal 50 µm thick) using a KD-400 Vibrating  
200 Microtome and the slices kept in an anti-freezing solution at 4°C for a minimum of 48  
201 hours. Slices from the following regions were selected for investigation: dorsal raphe  
202 nuclei (dorsal part; DRN), amygdaloid nucleus (basolateral posterior nucleus: BLP),  
203 and hippocampal formation (dentate gyrus, GD, and the *Cornu Ammonis* areas CA1,  
204 CA2, CA3). The regions were identified based on the Rat Brain Atlas (Paxinos and  
205 Watson, 2006).

206         For the immunohistochemical analysis, three slices of each selected brain region  
207 from each animal were pre-treated with 40 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:methanol (3%) solution (9:1),  
208 followed by two washes with 0.3% Triton X-100 in PBS solution. Non-specific binding  
209 was blocked by incubation of the brain slices at room temperature for 30 min in 3%  
210 goat serum in PBS. Following the non-specific blockage, the primary polyclonal rabbit  
211 anti-*c-fos* antibody (Sigma-Aldrich), diluted 1:1000 with PBS, was added and incubated  
212 at 4°C for 48 hours. The slices were washed in PBS and incubated with goat anti-rabbit  
213 IgG-biotinylated secondary antibody (Sinapse Biotecnologia) in a 1:100 PBS dilution  
214 for 2 hours. Sections were treated with ABC reagent (Thermo Scientific) for 30  
215 minutes. Immunoreactions were visualized by exposing the slices to a 0.06% 3,3'-  
216 diaminobenzidine solution containing 10µL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 8-10 minutes. Lastly, the  
217 slices were washed in PBS, placed on gelatinized slides, dehydrated in graded alcohol,

218 cleaned in xylene and covered by entellan (Merck). The number of *fos*-positive neurons  
219 was counted using the Leica Application Suite (LAS 4.1.0). The full areas were  
220 counted in the dorsal raphe nuclei, and hippocampal formations and selected areas were  
221 counted for BLP.

222 To evaluate neuron injury, three slices of each brain region were stained with  
223 Fluoro-jade B using the protocols described by Schmued and Hopkins (2000). The  
224 analysis of this staining was performed according to the following classification: (0) not  
225 marked, (+) weakly marked, (++) mildly marked, and (+++) strongly marked. Neuron  
226 death and loss were evaluated after Nissl/Cresyl violet staining. Three slices of each  
227 selected brain region from each animal were stained and analysed.

228

## 229 **Statistical analysis**

230 Statistical analyses of the behavioural test data were performed using IBM® SPSS®  
231 Statistics version 20, using one-way ANOVA, followed by Tukey (homogeneous  
232 variance) or Dunnett T3 (non-homogenous variance). Statistical analyses of the  
233 neurotoxicity assay data were performed with the GraphPad Prism Software version 6.0  
234 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA), using the Student's t test. In all  
235 cases,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

236

## 237 **Results**

### 238 **Acute toxicity**

239 None of the first three animals treated with 30X the usual dose died or had any  
240 morbidity signs over the 14-day study. When this test was repeated, one animal died in  
241 the first 2 hours after oral gavage. Following the OECD 423/2001 protocol, the  
242 experiment was repeated at a higher dose, which in this study was the highest possible  
243 dose that could be given to the rat by gavage, 50X the usual dose. This limitation was  
244 due to the difficulty of dissolving the lyophilized material in water using a maximum of  
245 3 mL dose volume. One animal died of the six 50X tested animals (5 hours and 40  
246 minutes after gavage). These results indicate that the lethal oral dose of ayahuasca  
247 infusion for female Wistar rats was higher than 50X the usual dose. Piloerection and  
248 tremors were observed during the first 24 hours in all dosed animals, and both animals  
249 that died showed flat body posture, reciprocal forepaw treading, hindlimb abduction,  
250 and lateral head weaving, characteristic symptoms of 5-HT behavioral syndrome

251 (Halberstadt and Geyer, 2011).

252 Table 1 shows the food consumption and organ weights of the control and  
253 treated animals over the 14 days after a single oral dose of ayahuasca. A significant  
254 decrease in food consumption was observed in the first 3 days after treatment in the 50X  
255 treated group compared to the lower dose and the control groups. An increase in food  
256 consumption was observed in both the tested doses at the end of the experiment  
257 compared to the control. Rats from the control group consumed significantly less food  
258 between 10-14 days compared to 0–3 days, while the 50X group increased food  
259 consumption during the same period. The changes in food consumption did not impact  
260 animal body weights among the groups, nor over the experimental period (data not  
261 shown). Analysis of relative organ weights produced the same results (data not shown).  
262 The increase in food consumption observed in both treated groups was probably  
263 responsible for the increased stomach weight and size observed in treated animals  
264 during the last three days of the experiment.

265 All treated animal stomachs were dilated at the time of necropsy 14 days after  
266 treatment, with a significant increase in weight compared with the controls (Table 1).  
267 No other macroscopic alterations were observed in the animal organs, and no  
268 histological alterations were observed in liver, spleen, heart, brain and kidneys at any  
269 dose level.

270

### 271 **Behaviour tests**

272 In the open field test, there was a significant decrease in locomotion and rearing  
273 performed by animals from the fluoxetine and ayahuasca treated groups compared with  
274 the controls (Fig. 2). There was also a significant decrease in grooming in the ayahuasca  
275 treated groups compared with the control and fluoxetine groups. Rats from the treated  
276 groups entered the central area less than the control, but this decrease was not  
277 significant.

278 Ayahuasca and fluoxetine treated rats had statistically fewer entries in the closed  
279 arms than the controls in the elevated plus-maze test, and those from the 30X dose  
280 group also entered less in the open arms than the controls (Fig. 2). Treated animals  
281 spent less time in the open arms than the controls, however this decrease was not  
282 significant. Ayahuasca-treated rats spent significantly less time in the centre of the  
283 platform than the controls. Treated rats had a significant decrease in the number of  
284 rearing than the controls, but grooming was only significantly lower for the 30X group.

285 Ayahuasca-treated rats from both groups showed more swimming activity and  
286 less immobility than the control and fluoxetine groups (Fig. 3). Although the fluoxetine  
287 group also showed more activity and less immobility than controls, the difference was  
288 not significant. All treated groups showed higher climbing activity than controls, but not  
289 significantly. No statistical differences were found between treated groups and the  
290 control for urination and/or defecation in all tests performed (data not shown).

291

## 292 **Neurotoxicity**

293 Figure 4A shows the area selected for *c-fos* reactive neuron counting of the  
294 dorsal part of the dorsal raphe nuclei (DRN), with strongly marked neurons considered  
295 positive (Fig. 4B). The same marking method was used to quantify *c-fos* reactive  
296 neurons in the other brain areas. A significant increase in marked neuron counting of the  
297 dorsal raphe nuclei was observed in comparison with the control (Fig. 4C). This  
298 increase was also identified in the basolateral posterior amygdaloid nucleus (Fig. 5A)  
299 and in all hippocampal formation regions investigated (Fig. 5B).

300 In the Fluoro-Jade B analysis, the control rats did not show any evidence of  
301 marked neurons, whereas the treated rats showed marked neurons in all areas analysed.  
302 The dorsal raphe nuclei region (DRN) was strongly marked (+++), probably as a  
303 consequence of the strong activation of the *c-fos* reactive neurons, shown in Fig. 4C.  
304 Dentate gyrus (Fig. 6) and amygdaloid nucleus showed to be mildly marked (++), and  
305 the CA1 region of hippocampal formation was weakly marked (+). No marks were  
306 observed in the CA2 or CA3 neurons, probably because the experiment was conducted  
307 only 2 hours after exposure, and changes in this region are expected to be seen later.  
308 Control animals showed no marked neurons in any region investigated (Fig. 6). Nissl  
309 substance staining did not show any significant difference between control and treated  
310 animals in viable neurons and composition of hippocampal formation layers. .

311

## 312 **Discussion**

313 Ayahuasca alkaloid profiles vary considerably, mainly due to the proportion of  
314 the plants and the method used to prepare the infusion, as well as the plant cultivars  
315 (McKeena et al., 1984; McKeena, 2004). The level of harmine present in the material  
316 used in this study (1.56 mg/mL) was similar to that reported by Callaway et al. (1999;  
317 1.7 mg/mL) in a human pharmacokinetic study, and by Oliveira et al. (2010; 1.37



318 mg/mL) in toxicological studies. However, our infusion contained less DMT (0.141  
319 mg/mL) than the material used by other authors (0.23-0.42 mg/mL).

320 The acute oral toxicity test OECD 423/2001 protocol is not intended to calculate  
321 a precise LD<sub>50</sub> of a substance, but rather to classify the substance according to toxicity  
322 classes defined by fixed LD<sub>50</sub> cut-off values. When lethality (2-3 rats) does not occur at  
323 2000 mg/kg bw, the substance is classified as of relatively low acute toxicity hazard  
324 (LD<sub>50</sub>> 2000 mg/kg bw). Ayahuasca is a mixture of active substances, so the tested  
325 doses corresponded to the dose used by a 70 kg person in a UDV ritual. The lethal dose  
326 of the ayahuasca infusion in female Wistar rats was found to be greater than 50X the  
327 usual dose, which was the highest dose tested due to the limited water solubility of the  
328 ayahuasca lyophilized material. This dose corresponds to 15.1 mg/kg bw DMT, 13.1  
329 mg/kg bw harmaline, and 167 mg/kg bw harmine. To the best of our knowledge, oral  
330 LD<sub>50</sub> values for these substances have not been directly determined. Based on an  
331 intravenous LD<sub>50</sub> of 32 mg/kg bw and an intravenous-to-oral conversion factor of 1:5,  
332 Gable (2007) estimated the oral LD<sub>50</sub> of 160 mg/kg bw for DMT in mice, which is over  
333 ten times the highest dose that could be investigated in our study. Using a safety factor  
334 of 20 (accounting for interspecies variability, assuming humans to be more sensitive),  
335 the authors estimated a LD<sub>50</sub> for DMT in humans as 8 mg/kg bw, which is at least 20  
336 times higher than the usual dose taken by a 70 kg person of an ayahuasca infusion  
337 containing 27 mg DMT.

338 The serotonergic syndrome observed in the rats that died at the 30 or 50X dose  
339 in this study may also occur in humans after ayahuasca consumption, especially if pro-  
340 serotonergic drugs, such as SSRI, are concomitantly ingested (Callaway and Grob,  
341 1998). Sklerov et al. (2005) reported a fatal case involving the recreational use of an  
342 ayahuasca-like preparation followed by the ingestion of 5-MeO-DMT (Fig. 1), an  
343 indoleamine present in *Virola* sp and other plants (Ott, 2001). Although DMT, harmine,  
344 harmaline and 5-MeO-DMT were found in the gastric content, hallucinogenic amine  
345 intoxication was ruled out as the cause of death, which could not be determined. The  
346 media have reported fatalities involving the consumption of ayahuasca in Brazil and  
347 other South American countries in the last decade. However, no direct implication with  
348 the infusion could be made due to lack of forensic analyses, and information on the  
349 actual dose taken and the previous health conditions of the individual (Santos, 2013).

350 The behavioural effects of ayahuasca infusion by female Wistar rats after acute  
351 exposure were evaluated in this study using the open field, elevated plus-maze, and

352 forced swimming tests. The open field test is a common measure of exploratory  
353 behaviour and general activity in rodents, and was originally used to investigate the  
354 emotionality of rats (fear), indicated by increased defecation and urination (Hall, 1934).  
355 In this study, no significant differences were found in these parameters between the  
356 control and treated animals. In addition, the open field model is based on rodent  
357 aversion to open space and a tendency to walk close to walls, a behaviour known as  
358 thigmotaxis (Lamprea et al., 2008), allowing the assessment of the potential stimulant,  
359 depressant or anxiolytic effects of a given compound (Prut and Belzung, 2003).  
360 Parenteral administration of 5HT<sub>1A</sub> agonists generally induces anxiolytic-like effects in  
361 rats subject to the open field tests, although non-specific 5-HT agonists (such as DMT)  
362 were anxiogenic or had no effect in most studies (Prut and Belzung, 2003). In our study,  
363 fluoxetine and ayahuasca-treated rats clearly showed a decrease in locomotion activity,  
364 and less exploring behaviour than controls, shown by decreasing rearing and grooming  
365 (only ayahuasca groups). Fluoxetine is one of the most widely prescribed antidepressant  
366 drugs worldwide, and is also approved for other mood disorders, including generalized  
367 anxiety (Zou et al., 2013).

368         The elevated plus-maze test is based on spontaneous exploratory behaviour of  
369 rodents, and their natural aversion to the open arms caused by fear and anxiety (Pellow  
370 et al., 1985; Walf and Frye, 2007). Thus, an increase in the number of entries added to  
371 the lengthy time spent in the open arm apparatus indicates a lower level of anxiety  
372 (Pellow et al., 1985; Hogg, 1996). Animals treated with fluoxetine or ayahuasca entered  
373 the closed arms significantly less than the controls, the 30X treated group entered less  
374 the open arms, and both ayahuasca groups entered less the central area, meaning that the  
375 animals moved less through the apparatus. These results confirm the open field test  
376 findings of a decreased mobility effect on rats exposed to fluoxetine and ayahuasca at  
377 the doses tested. Furthermore, as in the open field, the treated animals showed  
378 significantly less rearing than the control group, reflecting less intention to explore.

379         These results confirm previous studies showing that serotonergic hallucinogens  
380 produce significant effects on mobility and exploratory behaviours in rodents. In mice,  
381 moderate doses of phenyl alkylamines (such as mescaline and 2,5-dimethoxy-4-  
382 iodoamphetamine) were shown to increase locomotion activity which are mediated by  
383 the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. However, indoleamines, such as psilocin and 5-MeO-DMT,  
384 decrease locomotor activity which is mediated by the 5-HT<sub>1</sub> receptor (Halberstadt et al.,  
385 2009; Halberstadt and Geyer, 2011). In addition, rats exposed to 5-MeO-DMT

386 (indoleamine with a longer acting profile when compared to DMT) at 0.1 mg/kg bw  
387 showed decreased locomotor activity in the behavioural pattern when combined with a  
388 MAO inhibitor (Halberstadt et al., 2008).

389 The forced swimming test (also known as behavioural despair or Porsolt test) is  
390 one of the most widely used tools for the screening of antidepressants in rodent models.  
391 Rats when forced to swim in a cylinder from which they cannot escape will, after an  
392 initial period of vigorous activity, adopt a characteristic immobile posture. Immobility is  
393 reduced by various clinically effective antidepressant drugs at doses which would  
394 otherwise decrease spontaneous motor activity in an open field (Porsolt et al., 1978).  
395 The antidepressant effect of MAO inhibitors in this model was first described by  
396 Loomer et al. (1957). In our study, animals treated with ayahuasca showed significantly  
397 higher swimming behaviour and less immobility than the controls. Although fluoxetine  
398 (20 mg/kg bw ip) showed the same tendency, the difference in relation to the controls  
399 was not significant, contrary to what has been found in other studies (Dekte et al., 1995;  
400 subcutaneous infection, 5-20 mg/kg bw; Refaey et al., 2012, 10 mg/kg bw ip). Taken  
401 together, the forced swimming test results strongly suggest that the ayahuasca infusion  
402 has an antidepressant effect. Indeed, harmine, the most concentrated  $\beta$ -carboline found  
403 in ayahuasca, has been shown to have an antidepressant-like effect in rodents submitted  
404 to the forced swimming tests (Fortunato et al., 2009, 2010). The animal studies seem to  
405 corroborate the results in humans, as reported by Santos et al. (2007), who showed that  
406 regular ayahuasca users scored lower on the scales for panic and hopelessness, which  
407 are indicators of a depression state.

408 It is well known that the psychoactive properties of ayahuasca is a result of a  
409 high serotonin concentration in the central nervous system, mediated mainly by DMT  
410 and  $\beta$ -carbolines present in the infusion (McKeena et al., 1984; Freedland and  
411 Mansbach, 1999; Ott, 1999; Riba et al., 2003; Wang et al., 2010; Brierley and  
412 Davidson, 2012). Indeed, neuroimaging of regular ayahuasca users shows activation of  
413 brain structures involved in emotional arousal (amygdala/para hippocampal gyrus)  
414 (Riba et al., 2006). Furthermore, Castro-Neto et al. (2013) showed that ayahuasca  
415 treated rats (at 5-16X dose) had a higher level of 5HT in the hippocampus and amygdala  
416 regions. However, alterations in brain activity induced by ayahuasca have not yet been  
417 demonstrated in animal models.

418 In this study, neuronal activation was investigated in the dorsal part of the dorsal  
419 raphe nuclei (DRN), amygdaloid nucleus and hippocampal formation brain regions.

420 The raphe nuclei are a cluster of nuclei found in the brain stem whose main function is  
421 to release serotonin to correlated areas of the brain. The DRN plays an important role in  
422 facilitating anxiety-related physiological or behavioural responses to drugs or  
423 uncontrollable aversive stimuli, and has efferent projections on the amygdaloid  
424 complex, hippocampal formation and locus coeruleus (Peyron et al., 1998; Lowry et al.,  
425 2008). Indeed, we found that animals treated with a 30X dose of ayahuasca had higher  
426 neuronal activation, indicated by *c-fos* marked neurons, in all brain areas investigated in  
427 comparison with the controls. Although this led to some brain injury, no permanent  
428 damage that could lead to alterations in the brain morphology and number of cells was  
429 detected. Figueroa (2012) showed neuron apoptosis in rats exposed to a 5X dose for 21  
430 days through the TUNEL test (Terminal deoxy nucleotidyl transferased UTP nick end  
431 labeling), which could support the hypothesis that apoptosis occurs after neuron injury,  
432 as was detected in our study.

433

434

#### 435 **Conclusion**

436 This study showed that the ayahuasca infusion had a low oral acute toxicity in  
437 Wistar female rats, indicating a large safety margin compared to the usual ritualistic  
438 dose. Rats exposed to 15 and 30X the usual ayahuasca dose presented decreased  
439 locomotor and exploratory activities in the open field and elevated plus-maze tests,  
440 similar to fluoxetine, a known antidepressant drug. Behaviour of treated rats in the  
441 forced swimming test indicated a more pronounced antidepressant effect than what was  
442 observed for fluoxetine. Furthermore, *C-fos* expression activation observed in brain  
443 areas involved in serotonergic neurotransmission confirmed the role of ayahuasca  
444 components in interoception and emotional processing modulated by serotonergic  
445 pathways. Further studies conducted at lower and multiple doses are necessary to  
446 confirm the antidepressant effects of the ayahuasca infusion, and its potential  
447 therapeutic use.

448

#### 449 **Acknowledgments**

450 We are highly grateful to Prof. Maria Lucilia dos Santos from the Chemistry  
451 Institute at the University of Brasilia for providing the synthesized DMT. This work  
452 received the financial support of the Federal District Research Foundation (FAP-DF;  
453 Grant 193000358/2010). LG Motta, JA Morais e W Melo Jr were granted Master's

454 scholarships by the REUNI Program of the University of Brasilia.

455

## 456 **References**

457 Barbanoj MJ, Riba J, Clos S, Giménez S, Grasa E, Romero S (2008). Daytime  
458 Ayahuasca administration modulates REM and slow-wave sleep in healthy  
459 volunteers. *Psychopharmacology* **196**:315-326.

460 Blainey MG (2014). Forbidden Therapies: Santo Daime, Ayahuasca, and the  
461 Prohibition of Entheogens in Western Society. *J Religious Health*. [Epub ahead of  
462 print]

463 Bouso JC, González D, Fondevila S, Cutchet M, Fernández X, Ribeiro Barbosa PC,  
464 Alcázar-Córcoles MÁ, Araújo WS, Barbanoj MJ, Fábregas JM, Riba J (2012).  
465 Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance  
466 among ritual users of Ayahuasca: a longitudinal study. *PLoS One* **7**e42421:1-13.

467 Brierley DI, Davidson C (2012). Developments in harmine pharmacology-implications  
468 for ayahuasca use and drug-dependence treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol*  
469 *Psych* **39**: 263-272

470 Brierley DI, Davidson C (2013). Harmine augments electrically evoked dopamine  
471 efflux in the nucleus accumbens shell. *J Psychopharmacol* **27**:98-108

472 Callaway JC, Grob CS (1998). Ayahuasca preparations and serotonin reuptake  
473 inhibitors: potential combination for severe adverse interactions. *J Psychoactive*  
474 *Drugs* **30**:367-369

475 Callaway JC, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, Raymon, LP, Poland RE, Andrade EN,  
476 Andrade EO, Mash DC, (1999). Pharmacokinetics of hoasca alkaloids in healthy  
477 humans. *J Ethnopharmacol* **65**: 243-256

478 Castro-Neto EF, Cunha RH, Silveira DX, Yonamine M, Gouveia TL, Cavalheiro EA,  
479 Amado D, Naffah-Mazzacoratti MG (2013). Changes in aminoacidergic and  
480 monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after  
481 ayahuasca ingestion. *World J Biol Chem* **4**: 141-147

482 CONAD *Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas*,  
483 2010[http://www.obidsenad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Legislacao/32](http://www.obidsenad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Legislacao/327995pdf)  
484 7995pdf Accessed on May 13 2014

485 Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test  
486 differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants.

487 *Psychopharmacology* **121**: 66-72

488 Figueroa ARM (2012) Evaluation of the neurotoxic effects of ayahuasca tea. Thesis  
489 (Doctoral) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto da Universidade  
490 de São Paulo, Riberão Preto, Brazil

491 Freedland CS, Mansbach RS (1999). Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an  
492 Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Depend* **54**: 183-94

493 Fortunato JJ, Réus GZ, Kirsch TR, Stringari RB, Stertz L, Kapczinski F, Pinto JP,  
494 Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J (2009). Acute harmine administration  
495 induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat  
496 hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacol Biol Psych* **33**: 1425-30

497 Fortunato JJ, Réus GZ, Kirsch TR, Stringari RB, Fries GR, Kapczinski F, Hallak JE,  
498 Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J (2010). Chronic administration of harmine elicits  
499 antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. *J Neural*  
500 *Transmission* **117**: 1131-37

501 Gable RS (2007). Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and  
502 harmala alkaloids. *Addiction* **102**: 24-34

503 Halberstadt AL, Buell MR, Masten VL, Risbrough VB, Geyer MA (2008).  
504 Modification of the effects of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine on exploratory  
505 behavior in rats by monoamine oxidase inhibitors. *Psychopharmacology* **201**: 55-66

506 Halberstadt AL, van der Heijden I, Ruderman MA, Risbrough VB, Gingrich JA, Geyer  
507 MA, Powell SB (2009). 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors exert opposing effects on  
508 locomotor activity in mice. *Neuropsychopharmacology* **34**: 1958-67

509 Halberstadt AL, Geyer MA (2011). Multiple receptors contribute to the behavioral  
510 effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology* **61**: 364-81

511 Hall CS (1934). Emotional behavior in the rat: Defecation and urination measures of  
512 individual differences in emotionality. *J Comp Psychology* **18**: 385-403

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

515 Labate B, Feeney K (2012). Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and  
516 internationally: implications and challenges. *Int J Drug Policy* **23**: 154-61

517 Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S (2008). Thigmotactic responses in an  
518 open-field. *Braz J Med Biol Res* **41**: 135-40

519 Loomer , HP, Saunders, JC, Kline, NS, 1957 A clinic and pharmacodynamic evaluation  
520 of iproniazid as a psychic energizer. *Psych Res Rep* **8**, 129-141



521 Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008).  
522 Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part  
523 of the dorsal raphe nucleus. *Ann New York Acad Sci* **1148**: 86-94

524 MacRae E (2004). The ritual use of ayahuasca by three Brazilian religions. *In* R  
525 Coomber & N South (Eds), *Drug use and cultural contexts' beyond the West':*  
526 *Tradition, change and post-colonialism. UK: Free Association Books* 27–45

527 McKenna DJ, Towers GHN, Abbott F (1984). Monoamine oxidase inhibitors in South  
528 American hallucinogenic plants: triptamine and  $\beta$ -carboline constituents of  
529 ayahuasca. *J Ethnopharmacol* **10**: 195-223

530 McKenna DJ (2004). Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca:  
531 rationale and regulatory challenges. *Pharmacol Therapeutics* **102**: 111 – 29

532 Oliveira CD, Moreira CQ, de Sá LR, Spinosa HS, Yonamine M (2010). Maternal and  
533 developmental toxicity of ayahuasca in Wistar rats. *Birth Defects Research: Part B,*  
534 *Devel Reprod Toxicol* **89**: 207-12

535 Ott J (1999). Pharmahuasca: human pharmacology of oral DMT plus harmine. *J*  
536 *Psychoactive Drugs* **31**: 171-77

537 Ott J (2001). Pharmepena-Psychonautics: Human intranasal, sublingual and oral  
538 pharmacology of 5-methoxy-N,N-dimethyl-tryptamine. *J Psychoactive Drugs* **33**:  
539 403– 407.

540 Paxino G, Watson C (2006) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edition  
541 Elsevier, Inc

542 Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in  
543 an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosc Met* **14**: 149-67

544 Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the  
545 rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing  
546 methods. *Neuroscience* **82**: 443-68

547 Prut L, Belzung C (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs  
548 on anxiety-like behaviours: a review. *European Journal of Pharmacology* **463**: 3-33

549 Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978). Behavioural despair in rats: a new  
550 model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* **47**: 379-91

551 Qu S-J, Wang G-F, Duan W-H, Yao S-Y, Zuo J-P, Tan C-H, Zhu D-Y (2011)  
552 Tryptamine derivatives as novel non-nucleosidic inhibitors against hepatitis B virus.  
553 *Bioorg Med Chem* **19**: 3120-27

554 Refaey H, Amri HS (2011). Effects of Antidepressants on Behavioral Assessment in

555 Adolescent Rats. *Brain Med Bull* **33**, 1-10

556 Riba J, Valle M, Urbano G, Yritia M, Morte A, Barbanoj MJ (2003). Human  
557 pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine  
558 metabolite excretion, and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exper Ther* **306**: 73-83

559 Riba J, Romero S, Grasa E, Mena E, Carrió I, Barbanoj MJ (2006). Increased frontal  
560 and paralimbic activation following ayahuasca, the pan-Amazonian inebriant  
561 *Psychopharmacology* **186**: 93-98

562 Riba J, McIlhenny EH, Valle M, Bouso JC, Barker SA, (2012). Metabolism and  
563 disposition of N,N-dimethyl tryptamine and harmala alkaloids after oral  
564 administration of ayahuasca. *Drug Test and Analysis* **4**, 610-616

565 Santos, RG, Landeira-Fernandez, J, Strassman, RJ, Motta, V, Cruz, AP, 2007Effects of  
566 ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in  
567 Santo Daime members. *J Ethnopharmacol* **112**:507-513

568 Santos RG, Grasa E, Valle M, Ballester MR, Bouso JC, Nomdedéu JF, Homs  
569 R, Barbanoj MJ Riba J (2012). Pharmacology of ayahuasca administered in two  
570 repeated doses. *Psychopharmacology* **219**:1039-53

571 Santos RG (2013). A Critical evaluation of reports associating ayahuasca withlife-  
572 threatening adverse reactions. *J Psychoactive Drugs* **45**:179–188

573 Schmued LC, Hopkins KJ (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for  
574 the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* **874**: 123-130

575 Slattery DA, Cryan, JF (2012). Using the rat forcedswimtest to assessantidepressant-  
576 likeactivity in rodents. *Nature Protocols* **3**:1009-1014

577 Sklerov J, Levine, B Moore KA, King T, Fowler D (2005). A fatal intoxication  
578 following the ingestion of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in an ayahuasca  
579 preparation. *J Anal Toxicol* **29**: 838-841

580 Smith RL, Canton H, Barrett RJ, Sanders-Bush E (1998). Agonist properties of N,N-  
581 dimethyltryptamine at serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Pharmacol*  
582 *Biochem Behaviour* **61**: 323-330

583 Suzuki O, Katsumata Y, Oya M (1981). Characterization of eight biogenic  
584 indoleamines as substrates for type A and type B monoamine oxidase *Bioch*  
585 *Pharmacol* **30**:1353-1358

586 Thomas G, Lucas P, Capler NR, Tupper KW, Martin G (2013). Ayahuasca-assisted  
587 therapy for addiction: Results from a preliminary observational study in Canada.  
588 *Current Drug Abuse Reviews* **6**: 30-42

- 589 Walf AA, Frye CA (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-  
590 related behavior in rodents. *Nature Protocols* **2**: 322–328
- 591 Wang YH, Samoylenko V, Tekwani BL, Khan IA, Mille, LS, Chaurasiya ND, Rahman  
592 MM, Tripathi LM, Khan SI, Joshi VC, Wigger FT, Muhammad I (2010).  
593 Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant  
594 for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *J*  
595 *Ethnopharmacol* **128**: 662-671
- 596 Zou C, Ding X, Flaherty JH, Dong B (2013). Clinical efficacy and safety of fluoxetine  
597 in generalized anxiety disorder in Chinese patients. *Neur Disease Treat* **9**:1661-1670  
598

599 **Fig. 1**

600 Chemical structures of the main components of ayahuasca infusion (DMT, harmine and  
601 harmaline), serotonin and 5-MeO-DMT.

602

603 **Fig. 2**

604 Results of the open field and elevated plus maze tests for female Wistar rats exposed to  
605 fluoxetine or ayahuasca (15X or 30X dose). Mean  $\pm$  SEM; means with different letters  
606 are significantly different ( $p < 0.05$ ); N= 10 for each group. Values for locomotion and  
607 time spent in closed arms results are divided by 10 to fit the graphic scales.

608

609 **Fig. 3**

610 Results of the forced swimming test for female Wistar rats exposed to fluoxetine or  
611 ayahuasca (15X or 30X dose). Mean  $\pm$  SEM. N= 10 for each group. Means with  
612 different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

613

614 **Fig. 4**

615 *C-fos* reactive neurons from dorsal raphe nuclei region of female Wistar rats exposed to  
616 30X dose of ayahuasca. A: coronal section from midbrain region, showing the dorsal  
617 raphe nuclei inside the traced marked area; B: *c-fos* reactive neurons in the dorsal part  
618 (arrow heads) of a 30x treated rat (20x); C: number of *c-fos* reactive neurons for control  
619 and treated rats. \*  $p < 0.05$ , N=6 in each group.

620

621 **Fig. 5**

622 Number of *c-fos* reactive neurons from basolateral posterior amygdaloid nucleus (A)  
623 and hippocampal formation (B) regions of female Wistar rats treated with 30X dose of  
624 ayahuasca and control. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

625

626 **Fig. 6**

627 Fluoro-Jade images of the dentate gyrus area from the control (left) and ayahuasca  
628 treated group (30X dose), showing the fluorescent marked neurons

Brasilia, May 13 2014

Dr. Viviana Trezza  
Assistant Editor  
Behavioural Pharmacology

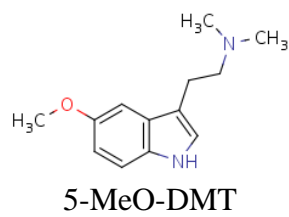
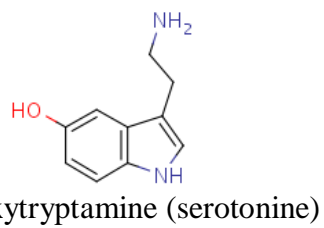
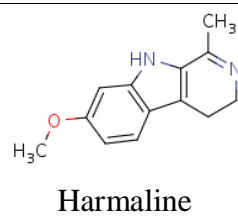
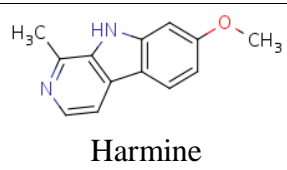
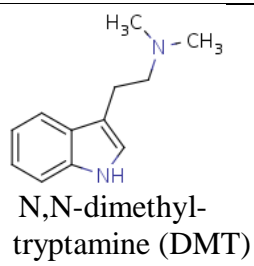
Dear editor,

Ayahuasca is a psychoactive beverage traditionally used by Amazonian indigenous populations and by Brazilian religious groups. The ritualistic use is considered to be safe, however, the recreational use of this beverage has increased in the last decade, stimulating the so called "ayahuasca tourism" in Latin American. Although many studies have been conducted to investigate the effects on humans exposed to ritualistic doses of the infusion, very few work has been done with animal models to investigate the potential effects when high doses are used. This work is the first attempt to directly determine the oral acute toxicity of this broadly used beverage. Behavioural functions were evaluated using the open field, elevated plus maze and forced swimming tests, and neuronal activation and toxicity were investigated in brain regions involved in serotonin activity.

Sincerely yours,

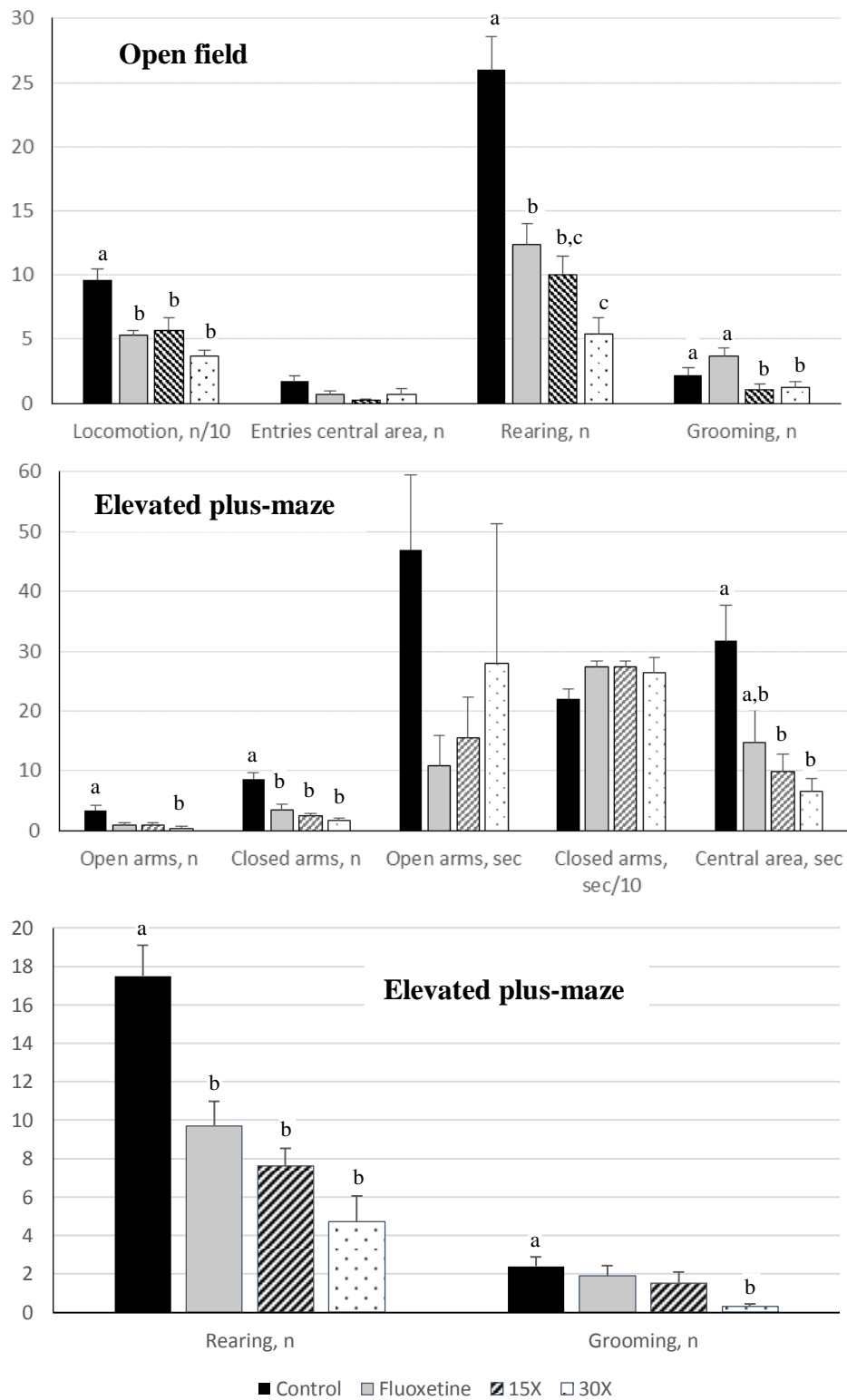
Prof. Eloisa Dutra Caldas  
Department of Pharmaceutical Sciences,  
University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

**Fig. 1**

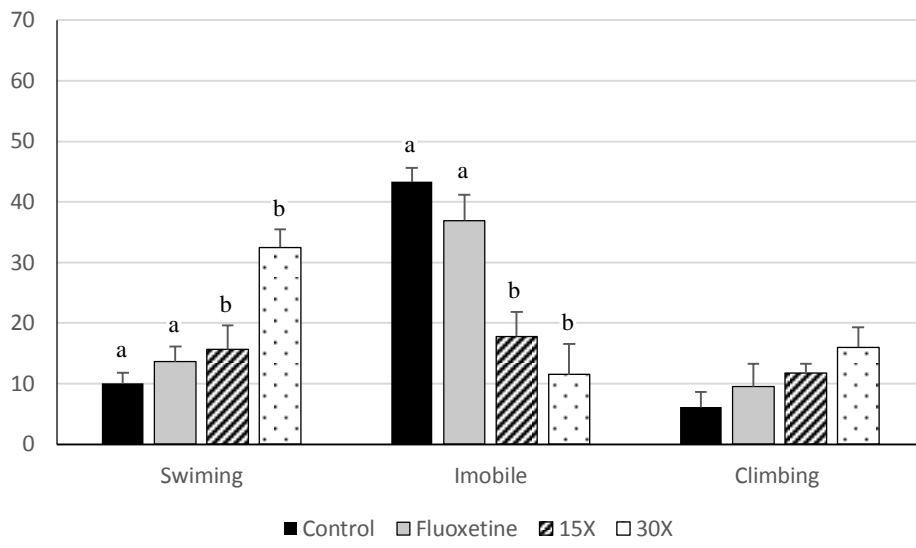




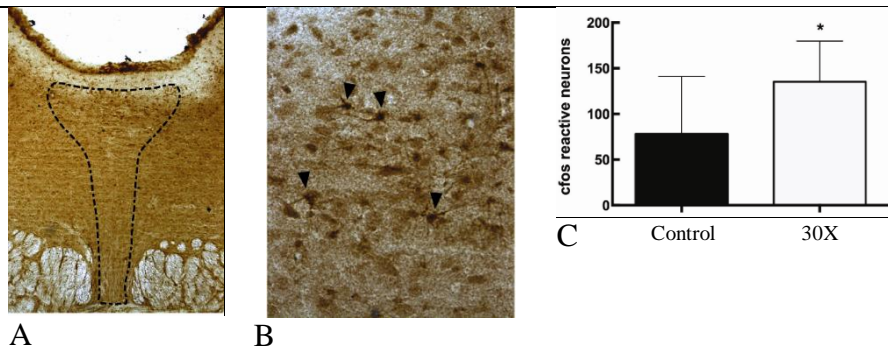
**Fig. 2**



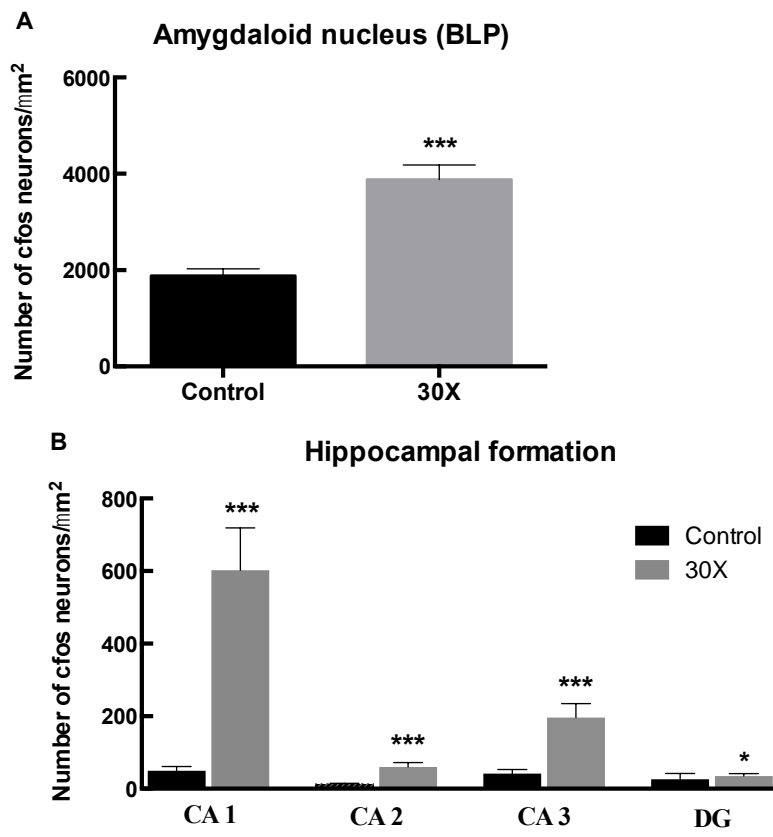
**Fig. 3**



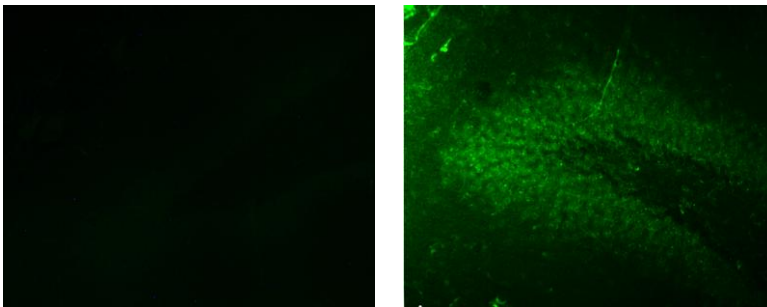
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Table 1.** Food consumption and organ weight of the control group and ayahuasca treated rats. Data are the mean  $\pm$  standard error

	<b>Control (n=7)</b>	<b>30X (n=5)</b>	<b>50X (n=5)</b>
<i>Food consumption, g</i>			
Day 0-3	62.5 $\pm$ 1.5 <sup>a†</sup>	72.6 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>	27.6 $\pm$ 10.5 <sup>b†</sup>
Day 3-7	45.4 $\pm$ 2.6 <sup>‡</sup>	59.6 $\pm$ 10.7	65.6 $\pm$ 8.6 <sup>‡</sup>
Day 7-10	65.2 $\pm$ 3.5 <sup>†</sup>	58.9 $\pm$ 4.3	66.4 $\pm$ 11.0 <sup>‡</sup>
Day 10-14	37.4 $\pm$ 2.6 <sup>a‡</sup>	49.5 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	51.7 $\pm$ 5.3 <sup>b‡</sup>
<i>Organ weight, g</i>			
Liver	11.3 $\pm$ 0.56	10.9 $\pm$ 0.77	11.2 $\pm$ 0.72
Spleen	0.94 $\pm$ 0.05	0.80 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.07
Left kidney	0.91 $\pm$ 0.08	1.0 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.06
Right kidney	0.99 $\pm$ 0.04	1.1 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.07
Stomach	2.8 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	4.3 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	3.8 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
Heart	0.94 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.06
Brain	2.0 $\pm$ 0.16	2.0 $\pm$ 0.03	2.1 $\pm$ 0.14

Letters: comparison among groups at the same day; symbols: comparison within the same group during the study period. Significant differences were found for means with different letters or symbols ( $p < 0.05$ )