

Avaliação histológica cerebral em ratos expostos a ayahuasca por via dérmica e oral

Autores: Luca Silva Facciolo¹, Wilson Roberto Malfará²

Colaboradora: Ana Rosa Crisci³

^{1,2,3} Centro Universitário Barão de Mauá

¹lucafacciolo@icloud.com - Medicina,²wilson.malfara@baraodemaua.br

Resumo

A bebida psicodélica ayahuasca está sendo cada vez mais investigada pelo seu potencial terapêutico para várias aplicações clínicas. Porém o chá administrado por via oral gera vários efeitos adversos significativos. O objetivo do referido projeto foi o de formular e testar através do chá da ayahuasca (*in natura*), duas diferentes vias de exposição ao mesmo, sendo a oral e a dérmica. Foram utilizados 24 ratos machos Wistar que receberam o chá por via oral e dérmica por um período de 15 dias, sendo feitas comparações histológicas entre as duas vias mencionadas. Nas comparações entre os números de neurônios piramidais contados, não ocorreram diferenças significativas. Com os demais neurônios não é possível inferir que será observado o mesmo resultado, sendo isso válido também para a histologia, a qual deverá receber colorações específicas (impregnação por prata) em estudos complementares futuros.

Introdução

O chá da ayahuasca (AYA) vem sendo utilizado milenarmente por índios da América do Sul, principalmente da Amazônia, como instrumento espiritual e ritualístico. Atualmente, existem rituais não-índigenas que passaram a fazer uso do chá devido a seus benefícios. Essa utilização vem aumentando desde a liberação do uso da ayahuasca para fins religiosos no Brasil pelo CONAD (Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas) em 2004 (COSTA; FIGUEIREDO; CAZENAVE, 2005). A ayahuasca, composta da união da casca do cipó da *Banisteriopsis caapi* e da folha da *Psychotria viridis*, age pela somatória e inibição temporária da família enzimática das monoamina oxidases (MAO-A e MAO-B) e aumento da dimetiltriptamina (DMT) principalmente em SNC (SANTOS, 2007). O bloqueio da MAO é gerado pelos grupos alcaloides das *beta*-carbolinas, principalmente pela harmina, harmalina e tetrahydroharmina, o que

permite a ação do DMT, o qual seria degradado pela MAO, competir com a serotonina pela ligação nos seus receptores, mais especificamente 5-HT1 a,b e d, 5HT2 a e c (COSTA *et al.*, 2005). Essa interação leva aos efeitos mais comuns relatados pelos usuários: vômitos, delírios, imagens geradas de olhos fechados, diarreia, hipertensão e palpitação. Esses, apesar de negativos, constituem para os usuários vinculados a processos religiosos, parte de um processo geral, o qual é responsável pela purificação corporal e interpretação das diferentes realidades (MERCANTE, 2013).

Como ocorre para quase todos os medicamentos, a via de administração de uma substância pode desempenhar um papel crucial em sua farmacologia geral e uso como terapêutica. Contudo, a maioria dos artigos científicos feitos com AYA em bases de dados exploram sua propriedade antidepressiva e terapêutica através do chá utilizado por via oral, são escassos os artigos encontrados na literatura sobre as diferentes vias de administração do chá.

Dentre esses Barker (2022), direciona nas diferentes vias para administrar a N,N-dimetiltriptamina (DMT) com o intuito de encontrar possíveis alternativas de via oral que não requeiram o uso concomitante de um inibidor da monoamina oxidase (MAO) (BARKER, 2022).

Um outro interessante ensaio clínico comparou a administração peroral de uma cápsula (com DMT purificada e harmina) e uma administração combinada de um comprimido de harmina oromucosa com um spray intranasal de DMT. Esse estudo obteve resultados de atenuação dos efeitos colaterais comuns induzidos pela ayahuasca tradicional como náuseas, vômitos e diarreia nos dois tipos de administração, e concluiu que a administração combinada bucal/intranasal de harmina e DMT produziu perfis farmacocinéticos substancialmente melhorados, indicados por variações reduzidas na exposição sistêmica (DORNBIERER *et al.*, 2023).

Observando tal cenário, é preciso compreender quais mudanças ocorrem em nível histológico no uso da ayahuasca, além de quais áreas são

afetadas com o uso. Para isso, a 5-hidroxitriptamina, ou serotonina, constitui parte do agente principal, já que essa está vinculada a regulação de diversas funções corporais como: humor, regulação de pressão arterial, parcialmente por alucinações cerebrais e dor. Além disso, entender, histologicamente a função dos grupamentos harmina, harmalina e tetrahydroharmina é de suma importância, já que esses constituem associados, muito dos efeitos gerados pelo chá (SOUZA, 2011).

Dados da literatura confirmam que analisando histologicamente cérebro de ratos Wistar, observou-se uma alta ativação neuronal em regiões como o núcleo dorsal da rafe, no núcleo basolateral posterior da amígdala e em toda a região hipocampal, o que mostra e reforça o vínculo do chá com a serotonina, principalmente o receptor 5HT₂, também sendo vinculado a síndrome serotoninérgica encontrada em humanos, a qual é responsável por mortes (PIC-TAYLOR *et al.*, 2015). Em humanos que utilizam o chá de maneira regular, encontra-se ativação em regiões envolvidas no processamento de imagens, memória episódica de curto e longo prazo, no processamento de contextualizações e imaginação, além de maior nível de receptores 5HT em regiões hipocámpais e amígdalas. (CASTRO-NETO *et al.*, 2013).

Além disso, vale ressaltar o efeito antidepressivo demonstrado histologicamente pela harmalina, principalmente em roedores, o que reitera a hipótese de liberação e estímulo serotoninérgico. (FORTUNATO *et al.*, 2009). Não há, portanto, até o momento, nenhum estudo relatado e em condução, comparando-se vias diferentes de administração do chá da ayahuasca.

Objetivos

O objetivo geral foi o de desenvolver uma apresentação inovadora de ayahuasca na forma de um gel utilizado por via dérmica, e compará-la histologicamente com a ayahuasca na forma de chá, utilizada oralmente em ratos machos Wistar através de administração subaguda (15 dias).

Métodos/Procedimentos

Chá da Ayahuasca

O chá da Ayahuasca foi obtido através da doação do Espaço Holístico e Xamânico Nova Era, localizado na cidade de Cravinhos - S. Paulo.

Preparo do gel de ayahuasca

Foi desenvolvida uma formulação do gel (natrosol + permeadores cutâneos) do chá in natura da Ayahuasca, com testes de permeação cutânea e estabilidade físico-química e microbiológica, os quais apresentaram respostas satisfatórias, condizentes com os objetivos do estudo.

Animais

Foram utilizados 3 grupos (n=8) de ratos *Wistar*, machos, adultos, com peso variando entre 250 a 300 gramas, que foram obtidos no biotério do Centro Universitário Barão de Mauá. Os animais foram alojados em número de 8 em gaiolas de plástico medindo 50 x 35 x 15 cm. As gaiolas foram mantidas em salas com temperatura ambiente constante (22 a 24°C), controlada por meio de aparelho de ar-condicionado, em ciclo controlado de 12 horas de claro e escuro. Água e ração foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo o experimento. A manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos da Experimentação animal- Colégio Brasileiro da Experimentação Animal (COBEA-1991). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPan) do Centro Universitário “Barão de Mauá”, sob o número de protocolo 511/23.

Administração nos grupos controle e grupos com o chá (via dérmica e oral)

As administrações nos grupos controle e tratados com o chá, ocorreram na forma de exposição subaguda (15 dias) consecutivos, abrangendo as duas vias de administração: dérmica e oral.

- **Grupo Controle Via Oral e Dérmica (COD):** Animais receberam 0,3 mL de água potável por gavagem e a aplicação do veículo do gel (natrosol), diariamente.

- **Grupo Ayahuasca Dérmica (AD):** Animais receberam o gel de Ayahuasca em região tricotomizada no dorso, diariamente. Esses animais não ficaram alojados na mesma caixa.

- **Grupo Ayahuasca Oral (AO):** Animais receberam 0,3 mL de Ayahuasca por gavagem, diariamente.

Coleta do Material

Ao término de todos os procedimentos experimentais, todos os animais do grupo controle e tratados com ayahuasca nas diferentes vias de administração já citadas, foram profundamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina e xilazina, seguindo normativas do CONCEA, e no último

dia de experimentação (15º dia) após duas horas da administração da Ayahuasca através das duas vias, e os respectivos grupos controle, foi realizada a perfusão intracardíaca para a lavagem e fixação do encéfalo. Este procedimento consistiu em fazer uma incisão na região do tórax do animal, expondo seu interior. A seguir os animais foram perfundidos com 300 mL de PBS 0,1 M (salina tamponada com fosfato - *phosphate-buffered saline*, pH 7,4) pelo ventrículo esquerdo e, simultaneamente, foi feita uma incisão no átrio direito para permitir a saída da salina e a lavagem do sangue de todo o tecido perfundido. Ao final do processo foram perfundidos com 200 mL de paraformaldeído 4% (PFA 4%) em PBS 0,2 M com o objetivo de fixar o tecido. Ao término desta etapa os encéfalos foram cuidadosamente retirados da caixa craniana e colocados em frascos contendo a mesma solução de PFA 4% em PBS 0,2 M. Após o procedimento descrito, o material coletado seguiu procedimento padrão para inclusão em lâminas que foram observadas em microscópio óptico (Nikon) acoplado ao sistema de captura de imagem Digital e descritas detalhadamente baseadas nas análises comparativas com o grupo controle.

Análises Estatísticas

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições por tratamento. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann – Whitney, e um pós teste de Dunn's. Os dados obtidos serão registrados e construídos como medianas e expressos em *box plots* e limite inferior e superior. Diferenças serão consideradas significantes quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, EUA).

Resultados

Os resultados referentes a contagem dos neurônios piramidais são apresentados abaixo seguindo *box-plots*, com valores de mediana, limite inferior e superior (figura 1).

As lâminas para contagem dos neurônios, foram examinadas ao aumento de quarenta vezes, com auxílio de um microscópio óptico Nikon acoplado a uma câmera de vídeo e monitor de um computador, usou-se a metodologia de contagem aleatória de 6 campos por animal, totalizando 48 campos. No exame microscópico foram observados corpos neuronais piramidais da área III (figura 2, setas pretas).

Figura 1 – Números de neurônios piramidais nos grupos CD (controle da via dérmica), AD (ayahuasca administrada via dérmica), CO (controle da via oral) e AO (ayahuasca administrada via oral)
Fonte: os autores

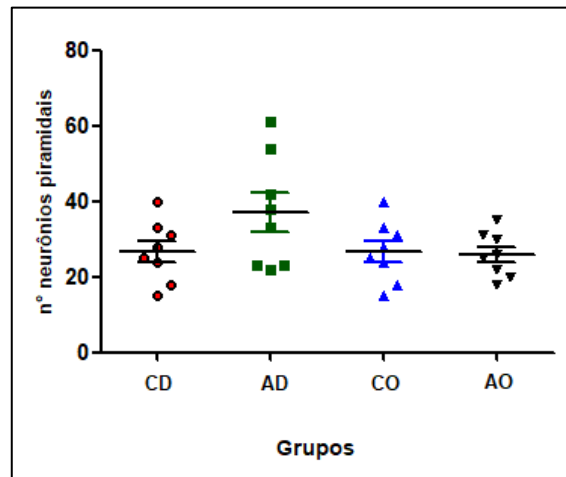
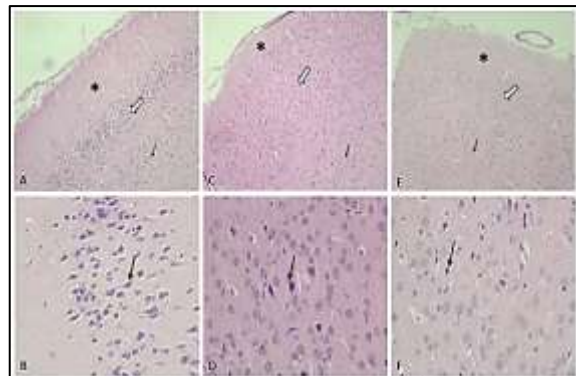


Figura 2- Fotomicrografia do Cérebro dos ratos (secção transversal).

Em A e B :Grupo Controle (via dérmica e oral); Em C e D: Grupo via dérmica (AD); Em E e F.: Grupo via oral (AO). Aum. 100X e 400X. Col. H.E.
Fonte: os autores



Discussão

O neurônio piramidal é um dos principais tipos de neurônios, pois é o mais abundante e o principal excitatório, presente no córtex cerebral, hipocampo e amígdala. Pensando na inteligência e na quantidade de neurônios, principalmente os corticais, associado a eficácia das transmissões através dos axônios e velocidade de processamento destas (TAN, 2021). Geralmente são considerados neurônios de projeção, ou seja, atuam enviando a mensagem para células distantes e separadas da área onde nasceram. Por ser um tipo de neurônio tão prevalente no córtex, os neurônios piramidais são ativados e ligados a grande parte das funções e processos realizados pelo ser humano, como as funções de movimento

voluntário, inervação de músculos voluntários da cabeça e pescoço e dos membros.

Observa-se pela contagem dos neurônios piramidais que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos analisados, embora tenha se observado no grupo AD (ayahuasca dérmica) um aumento nesses neurônios em dois animais, elevando seus valores de limites e da mediana, ainda que, de forma não significativa conforme relatado (figura 1). Foram contados apenas os neurônios piramidais, onde com a sequência dos estudos serão contabilizados outros neurônios, que no momento, não foram contados.

Na histopatologia (figura 2) do grupo controle via dérmica que recebeu o gel de natrosol e água destilada por gavagem, observou-se a camada molecular I (A- asterisco) com fibras nervosas finas e dendritos das células piramidais. Na camada granulosa externa (II) (seta branca) observou-se numerosos neurônios estrelados e piramidais. Na camada piramidal externa (III) (seta fina, B), observou-se vários neurônios piramidais médios (seta preta).

Na histopatologia do grupo tratado que recebeu o gel de ayahuasca (C e D), observou-se a camada molecular (I) (asterisco) mais fina com poucas fibras nervosas. Na camada granulosa externa (II) (seta branca) observou-se numerosos neurônios estrelados e poucos neurônios piramidais (seta preta). Na camada piramidal externa (III) (seta fina), observou-se poucos neurônios piramidais médios (seta preta).

Na histopatologia do grupo tratado que recebeu ayahuasca oral (E e F), observou-se a camada molecular (I) (asterisco) mais espessa comparada com o grupo controle, com fibras nervosas. Na camada granulosa externa (II) (seta branca) observou-se vários neurônios estrelados e poucos neurônios piramidais. Na camada piramidal externa (III) (seta fina), observou-se vários neurônios piramidais médios (seta preta).

Conclusões

De acordo com os estudos realizados e pelas comparações feitas nestes estudos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de neurônios piramidais entre os grupos controle e grupos tratados. Para a realização da referida contagem realizou-se como coloração a hematoxilina-eosina (HE), o que em estudos complementares irá se utilizar de outras técnicas de coloração específicas para uma conclusão detalhada da morfologia. Além disso, o plasma dos animais foi colhido, onde serão comparados para verificação dos alcaloides do chá nas duas vias mencionadas e também pela via inalatória, correlacionando tais achados com a histopatologia.

Referências

- BARKER, S. A. Administration of N, N-dimethyltryptamine (DMT) in psychedelic therapeutics and research and the study of endogenous DMT. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 6, p. 1749–1763, 2022.
- CASTRO-NETO, E.F. de; CUNHA, R.H. da; SILVEIRA, D.X. da; YONAMINE, M.; GOUVEIA, T. L. FURTADO; CAVALHEIRO, E.A.; AMADO, D.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. **World Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 141, 2013.
- COSTA, M. C. M.; FIGUEIREDO, M. C.; CAZENAVE, S. DE O. S. Ayahuasca: uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. **Revista de psiquiatria clínica**, v. 32, n. 6, p. 310–318, 2005.
- DORNBIERER, D. A. *et al.* Overcoming the clinical challenges of traditional ayahuasca: a first-in-human trial exploring novel routes of administration of N,N-Dimethyltryptamine and harmine. **Frontiers in pharmacology**, v. 14, p. 1-13, 2023.
- FORTUNATO, J.J.; RÉUS, G. Z.; KIRSCH, T.R.; STRINGARI, R.B.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; PINTO, J. P.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1425-1430, 2009.
- MERCANTE, Marcelo S.. A ayahuasca e o tratamento da dependência. **Mana**, v. 19, n. 3, p. 529-558, dez. 2013.
- PIC-TAYLOR, A.; MOTTA, L.G. de; MORAIS, J.A. de ; MELO JUNIOR, W.; SANTOS, ANDRADE A.F.; CAMPOS, L.A. ; MORTARI, M.R.; VON ZUBEN, M.V.; CALDAS, D.E. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rat. **Behavioural Processes**, v. 118, p.102-110., 2015.
- SANTOS, Rafael Guimarães dos. AYAHUASCA: neuroquímica e farmacologia. **SMAD, Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog. (Ed. port.)**, Ribeirão Preto , v. 3, n. 1, fev. 2007.

SOUZA, P.A. de. Alcaloides e o chá de ayahuasca: uma correlação dos. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 349-358, 2011.

TAN, H.Y. TAN, H. Y., CHO, H., LEE, L. P. Human mini-brain models. *Nature biomedical engineering*, v.5, n.1, p. 11–25, 2021.