



II Simpósio de Pesquisa do Ecosistema Ânima:  
**Juntos pelo Conhecimento: um novo saber cria um novo amanhã**

**AValiação dos Efeitos da Ayahuasca nos Parâmetros Neuroquímicos de Ratos Submetidos ao Modelo de Neuroinflamação Induzida por Lipopolissacarídeo**

**Autores e Orientadores:**

Maria Clara Toesca Martins<sup>1</sup>; Emília Damazio Meneghel Cachoeira<sup>1</sup>; Alice Bittencourt Silveira<sup>1</sup>; Yasmin Ribeiro Strickert<sup>2</sup>; Lara Benedet Martins<sup>1</sup>; Linério Ribeiro Novais<sup>1</sup>; Dr. Rafael Mariano de Bitencourt (orientador)<sup>3</sup>.

**Resumo**

A neuroinflamação é uma resposta de defesa do sistema nervoso central. Em modelo animal é comumente induzida através da aplicação de lipopolissacarídeo. Como a neuroinflamação tem sido associada a diversas condições, cresce o interesse pelo estudo de substâncias com potencial anti-inflamatório, como a ayahuasca. O estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da ayahuasca nos parâmetros comportamentais, neuroquímicas e plasticidade sináptica de ratos Wistar submetidos à neuroinflamação através da aplicação intraperitoneal (i.p.) de lipopolissacarídeo. Este estudo é de caráter experimental, pesquisa pré-clínica. Os animais serão submetidos ao protocolo de indução da neuroinflamação, o qual envolve a administração i.p. de LPS (0,5 mg/kg) durante sete dias seguidos ou solução salina pelo mesmo período. Estes dois grupos serão posteriormente subdivididos em outros oito grupos que receberão uma abordagem preventiva e de com ayahuasca (2 e 4 ml/kg) ou solução salina por via oral para posterior análises comportamentais, neuroquímicas e de plasticidade sináptica.

**Introdução:**

A neuroinflamação se dá através da resposta celular e molecular do Sistema Nervoso Central (SNC), a fim de extirpar um dano ou infecção causado em resposta a um estresse. Nesse processo, há a contribuição de componentes imunes celulares, que podem ser produzidos dentro do próprio SNC ou recrutados do sistema periférico em consequência de um dano à barreira hematoencefálica. Deste modo, as células gliais são ativadas e o efeito da neuroinflamação é considerado neuroprotetor nos casos em que a atividade neuroinflamatória atinge um período curto de tempo. Entretanto,



quando a inflamação se torna crônica, está associada a consequências prejudiciais ao SNC (SHASTRI et al., 2013; STREIT et al., 2004).

Dentre as patologias causadas pela neuroinflamação, encontram-se a isquemia cerebral, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Ainda, está relacionada à ansiedade, depressão, delirium e demência, bem como, poderia e ser associada à progressão acelerada do declínio cognitivo (DA SILVA et al., 2021; GLASS et al., 2010; SKELLY et al., 2013).

Em modelo animal de experimento, a neuroinflamação é comumente induzida através da aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) como ativador glial. Esta molécula desencadeia a liberação de diversas citocinas, dentre elas fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6) (CARLOS et al., 2014; DA e CRUZMACHADO, 2010).

Desta forma, tendo em vista que a neuroinflamação tem sido associada a diversas patologias, cresce o interesse pela descoberta de novas substâncias que tenham efeitos antineuroinflamatórios e, assim, sejam capazes de trazer benefícios à saúde dos pacientes. Cabe salientar a importância do estudo de plantas medicinais, sobretudo as psicoativas, como a ayahuasca<sup>5-7</sup>.

A ayahuasca (AYA) é uma bebida composta por plantas de origem amazônica, formada pela associação da *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*. Em relação a seus ativos, a AYA é composta por inibidores reversíveis da enzima monoaminoxidase, constituintes da *B. caapi*, bem como pelos subtipos 1A, 2A e 2C do agonista serotoninérgico 5-hidroxitriptamina, com potente ação alucinógena, através da *P. viridis*. Ainda em relação à *B. caapi*, um composto denominado tetrahydroharmina apresenta, também, papel de inibidor seletivo da recepção de serotonina<sup>9,11,13</sup>.

Por conseguinte, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da ayahuasca nos parâmetros comportamentais, neuroquímicas e na plasticidade sináptica nos ratos submetidos à neuroinflamação através da aplicação intraperitoneal de LPS.

**Palavras-chave:** Ayahuasca; Neuroinflamação; Depressão;

### **Métodos:**

Tipo de estudo: Este estudo é de caráter experimental, pesquisa pré-clínica.

**Aspectos éticos:** A utilização de animais neste estudo seguirá a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, setembro/2013) e os



procedimentos experimentais serão realizados após aprovação da Comissão de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina. Durante todo o período experimental, os animais serão mantidos em temperatura controlada ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclos de luz artificial (12 horas claro/escuro), recebendo ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água ad libitum.

**Animais e grupos Experimentais** serão utilizados ratos Wistar adultos, provenientes do biotério da UFSC/Florianópolis, recebidos com cerca de 60 dias e pesando entre 150 a 300g, e serão divididos em dois grupos experimentais. O grupo 1 (grupo LPS) será constituído por roedores que receberão administração intraperitoneal (i.p.) de uma única injeção de LPS (Sigma®), na dose de 5 mg/kg/ml, diluída em solução salina (NaCl 0,9%). O grupo 2 (grupo controle) será constituído por animais que receberão administração i.p. de uma única injeção, via i.p., do veículo de dissolução utilizado no grupo anterior. A dose de LPS foi baseada em estudos anteriores que demonstraram mudanças agudas na permeabilidade da BHE seguida de progressão neurodegenerativa ao longo do tempo (HOBAN et al., 2013). Os grupos LPS e controle serão, ainda, divididos em 4 subgrupos, sendo eles: LPS+Controle, LPS+AYA, Controle+Controle e Controle+AYA. O tratamento com AYA ou solução salina (Controle) serão feitos por via oral uma hora após a administração de LPS ou solução controle. A dose de AYA utilizada será de 4 ml/kg (OSÓRIO et al., 2015) e os testes neuroquímicos serão realizados 24 horas após o tratamento.

**Coleta de amostras encefálicas:** será realizada a morte indolor assistida dos animais, para posterior retirada das amostras encefálicas de hipocampo e córtex pré-frontal.

#### **Protocolos dos testes bioquímicos:**

**Enzimas antioxidantes:** a atividade da superóxido dismutase (SOD) será medida com base em sua capacidade de inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina em adrenocromo

**Atividade da catalase (CAT):** é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

**Dano oxidativo em lipídios:** o dano em lipídios será avaliado pela técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

**Citocinas pró-inflamatórias:** as concentrações de  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  e  $\text{TNF-}\alpha$  serão determinadas pelo ensaio adsorvente ligado a enzima (ELISA) utilizando kit duo set (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).



Análises estatísticas: As variáveis serão apresentadas em média  $\pm$  DP de 10 animais por grupo. A análise estatística será realizada através do programa estatístico GraphPad Prism. Os dados serão avaliados pela ANOVA de uma via, seguido pelo post hoc de Dunnett e/ou Tukey (dados paramétricos) e teste de Kruskal-Wallis, seguidos de pós-testes de Dunns (dados não-paramétricos). Os dados serão considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussões:

### Citocinas anti-inflamatória

Para avaliação das citocinas anti-inflamatórias foram realizadas dosagens das interleucinas 4 e 10. Em relação a IL-4, observou-se, em cerebelo, o seu aumento em SAL+AYA comparado ao grupo controle (0,0225) e a diminuição em LPS+SAL comparado ao grupo SAL+AYA (0,0011). Já no hipotálamo, houve diminuição dos níveis da citocina em todos os grupos quando comparados ao grupo controle (SAL+AYA  $p = 0,0016$ ; LPS+SAL  $p = 0,0001$ ; LPS+AYA  $p < 0,0001$ ).

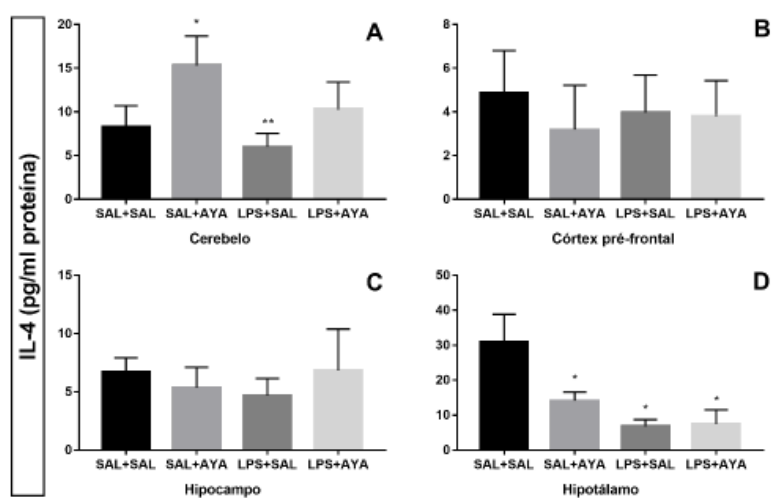


Figura 1 – IL-4 no cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos à neuroinflamação e tratados com ayahuasca (2 ml/kg). Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, analisados por ANOVA de uma via com post hoc de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+SAL e \*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+AYA.



Em relação aos níveis de IL-10, ao serem comparados com o grupo controle, observou-se diminuição nos grupos SAL+AYA ( $p=0,0035$ ), LPS+SAL ( $p=0,0458$ ) e LPS+AYA ( $p=0,0055$ ) em cerebello, SAL+AYA ( $p=0,0235$ ) em hipocampo e LPS+SAL ( $p=0,0009$ ) e LPS+AYA ( $p=0,0007$ ) em hipotálamo.

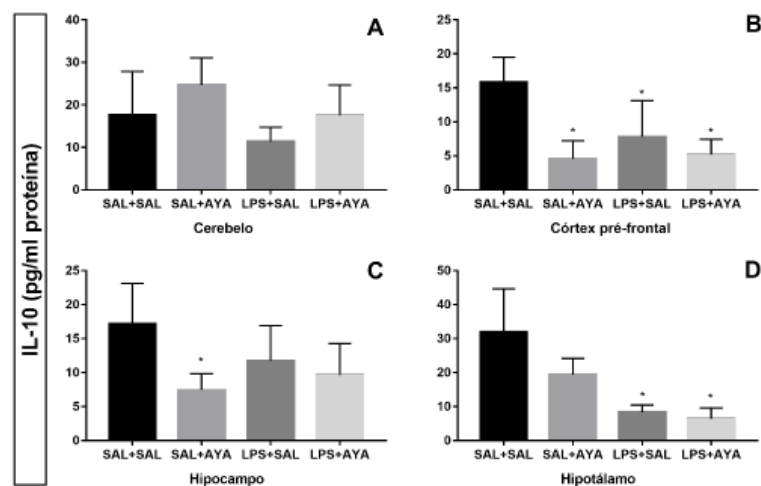


Figura 2 – IL-10 no cerebello, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos à neuroinflamação e tratados com ayahuasca (2 ml/kg). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com post hoc de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+SAL.

### Citocina pró-inflamatória

A fim de analisar o nível de substâncias pró-inflamatórias no encéfalo, avaliou-se IL-6. Em cerebello, houve diminuição dos níveis da citocina no grupo LPS+SAL ( $p=0,0175$ ) em relação ao grupo controle. O mesmo achado se repetiu no hipotálamo ( $p < 0,0001$ ), conjuntamente com a diminuição nos grupos SAL+AYA ( $p=0,0419$ ) e LPS+AYA ( $p < 0,0001$ ). Ainda em hipotálamo, os níveis de IL-6 diminuíram em LPS+SAL ( $p=0,0069$ ) e LPS+AYA ( $p=0,0033$ ) quando comparados ao grupo SAL+AYA.

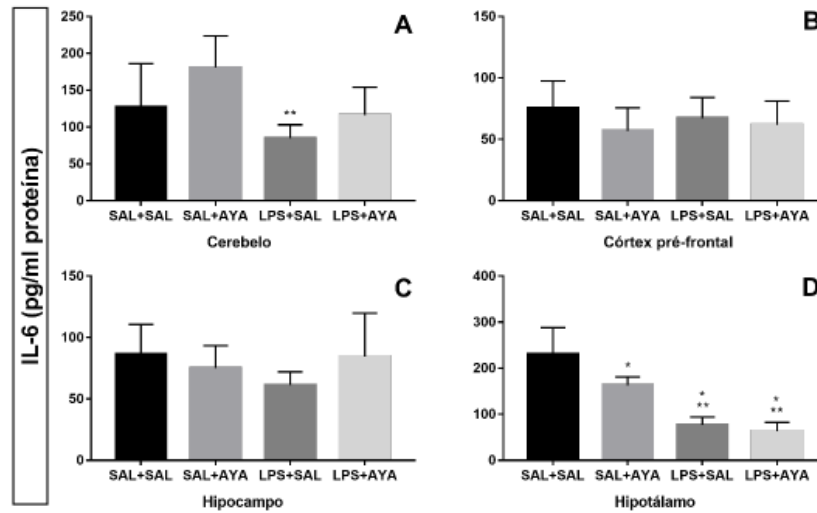


Figura 3 – IL-6 no cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos à neuroinflamação e tratados com ayahuasca (2 ml/kg). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com post hoc de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+SAL e \*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+AYA.

### Dano oxidativo em proteínas e lipídios

Avaliou-se marcadores de dano oxidativo em lipídios e proteínas após o tratamento com ayahuasca (Figuras 4 e 5). Com relação à carbonilação proteica, não se observou diferença significativa entre os grupos. Já na avaliação da peroxidação lipídica, o grupo LPS+SAL apresentou aumento dos níveis de MDA em cerebelo ( $p=0,0488$ ) e diminuição em córtex pré-frontal ( $p=0,249$ ), quando comparados ao grupo SAL+SAL. Já em hipocampo e hipotálamo, o grupo LPS+AYA ( $p < 0,0001$ ; exceto em SAL+SAL vs LPS+AYA em hipocampo, com  $p=0,0002$ ) foi significativamente mais elevado do que todos os outros grupos.

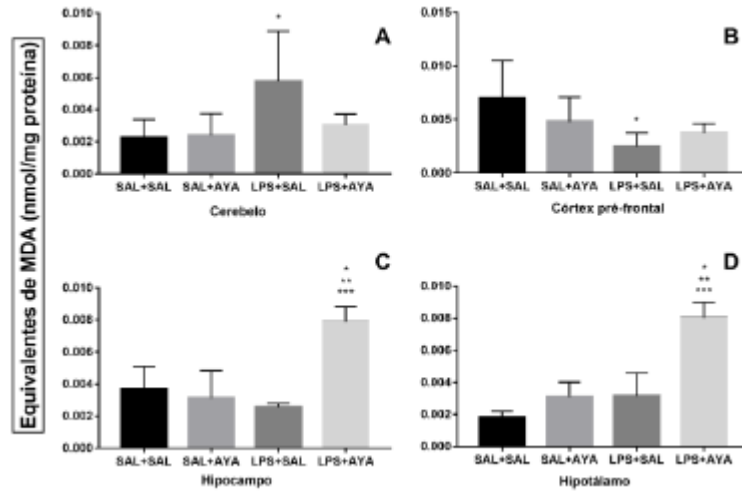


Figura 4 – Peroxidação lipídica no cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos à neuroinflamação e tratados com ayahuasca (2 ml/kg). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com post hoc de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+SAL, \*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+AYA e \*\*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS+SAL.

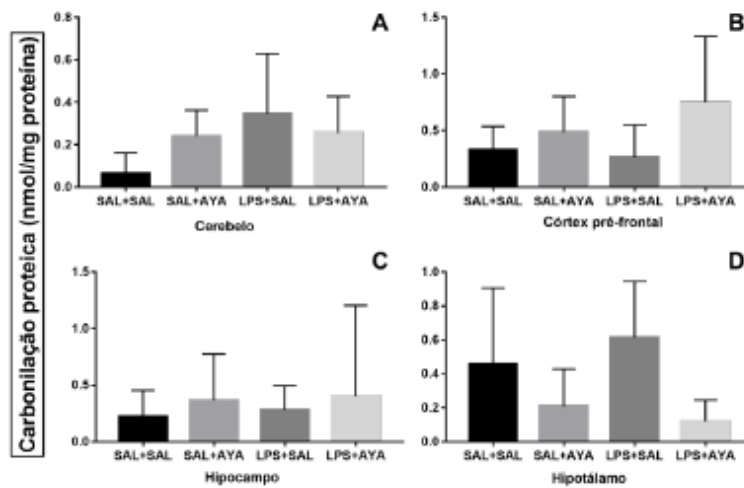


Figura 5 – Carbonilação proteica no cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos à neuroinflamação e tratados com ayahuasca (2 ml/kg). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com post hoc de Tukey.

Enzimas antioxidantes



Verificou-se a atividade das defesas antioxidantes enzimáticas (Figuras 9 e 10). As atividades enzimáticas da SOD não apresentaram diferenças entre os grupos e da CAT mostrou-se aumentada no grupo LPS+AYA em relação aos grupos SAL+AYA (0,0307) e LPS+SAL (0,0413) em cerebello, e SAL+SAL em córtex pré-frontal (0,0263).

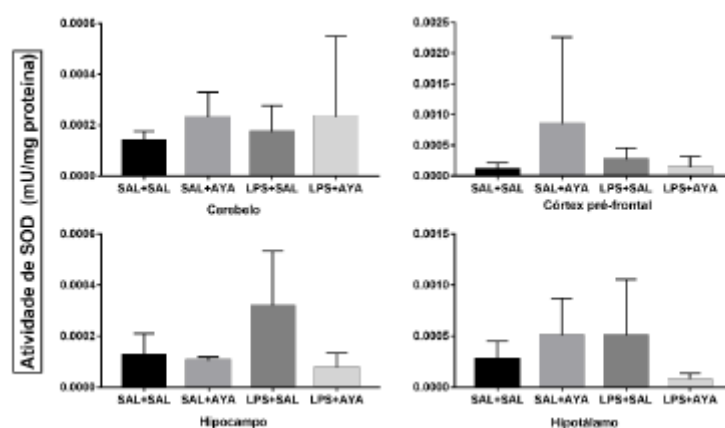


Figura 6 – Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no cerebello, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos à neuroinflamação e tratados com ayahuasca (2 ml/kg). dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com post hoc de Tukey.

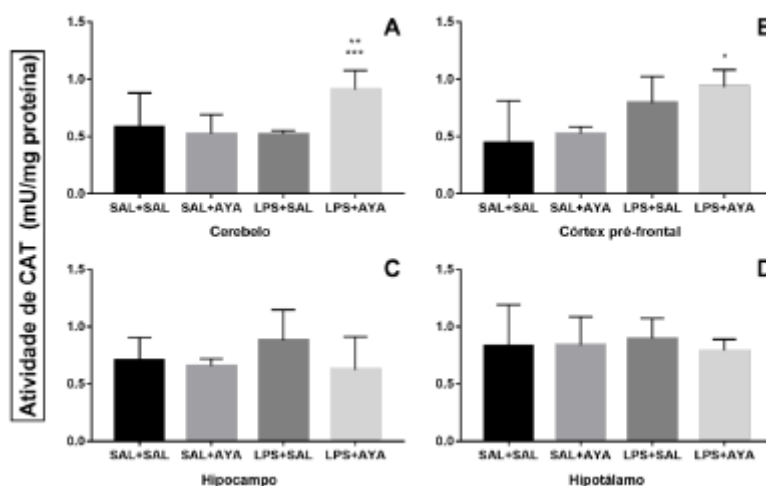


Figura 7 – Atividade da enzima catalase (CAT) no cerebello, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos à neuroinflamação e tratados com ayahuasca (2 ml/kg). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com post hoc de Tukey.





\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+SAL, \*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+AYA e \*\*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS+SAL.

### **Conclusões:**

Não foi possível concluir se a ayahuasca é capaz de amenizar ou reverter os danos encefálicos causados pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo, já que esta não foi capaz de promover as mudanças em parâmetros encefálicos compatíveis com a neuroinflamação. Foram levantadas hipóteses sobre qual viés afetou o resultado do estudo, e concluiu-se que a não validade do modelo de neuroinflamação ocorreu por conta do pó liofilizado de lipopolissacarídeo utilizado, que por ser extremamente sensível apresenta facilmente alterações em suas características físicas e químicas.

### **Referências:**

1. Barichello, T., Martins, M. R., Reinke, A., Constantino, L. S., Machado, R. A., Valvassori, S. S. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, n. 6, p. 831-837, 2007.
2. Dakic, V., Nascimento, J.M., Sartore, R.C., Maciel, R.M., Araujo, D.B., Ribeiro, S., Martins, S. D., Rehen, S.K. Short term changes in the proteome of human cerebral organoids induced by 5-MeO-DMT. *Scientific Reports*, vol. 7, 2017.
3. Frecska E, Bokor P, Winkelman M. The therapeutic potentials of AYA: possible effects against various diseases of civilization. *Front. in Phar.* 7, 2016. - Hoban, D. B., Connaughton, E., Connaughton, C., Hogan, G., Thornton, C., Mulcahy, P., Moloney, T., Dowd, E. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: A comparison of intra-nigral and intra-striatal LPS administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. *Brain, Beh. and Immunity*, v. 27, p. 91-100, 2013.
4. Lima, V. M. Avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Estadual Paulista, 2010.
5. Liu, H.Y., Yue, J., Hu, L.N., Cheng, L.F., Wang, X.S., Wang, X.J., Feng, B. Chronic minocycline treatment reduces the anxiety-like behaviors induced by repeated restraint stress through modulating neuroinflammation. *Brain Res. Bulletin*, 143:19-26, 2018.



**Fomento:** O trabalho teve a concessão de Bolsa pelo Programa UNIEDU artigo 170/171.