



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Isabel Werle

**Efeitos da ayahuasca sobre a extinção de memórias aversivas contextuais em
ratos**

Florianópolis

2023

Isabel Werle

Efeitos da ayahuasca sobre a extinção de memórias aversivas contextuais em ratos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Orientador: Prof. Leandro José Bertoglio, Dr.

Florianópolis

2023

Werle, Isabel

Efeitos da ayahuasca sobre a extinção de memórias aversivas contextuais em ratos / Isabel Werle ; orientador, Leandro José Bertoglio, 2023.

76 p.

2. Aprendizagem e memória. 3. Ansiedade. 4. Psicodélicos. 5. Extinção de memórias aversivas. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Isabel Werle

Efeitos da ayahuasca sobre a extinção de memórias aversivas contextuais em ratos

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 09 de março de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Janaína Menezes Zanoveli, Dra.
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

Profa. Maria Gabriela Menezes de Oliveira, Dra.
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.

Prof. Antônio de Pádua Carobrez, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Leandro José Bertoglio, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho à minha avó, Adelita (*in memoriam*), que me ensinou sobre as plantas que curam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares Ari, Iria, Ariel, Aline, Lorival, Victor Hugo e Yuri pelo carinho, apoio em todos os sentidos e por estarem ao meu lado sempre.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Leandro J. Bertoglio, por me acolher no Laboratório de Neuropsicofarmacologia, por todas as discussões científicas e conhecimento compartilhado. Agradeço também aos colegas de laboratório, Bruno, Hugo, Laura, Luciane e Lorena, com os quais tive oportunidade de aprender muito nesta etapa da minha formação.

Obrigada à Universidade Federal de Santa Catarina, por todas as oportunidades que oferece à sociedade. Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por todos os ensinamentos; também aos funcionários do biotério, funcionários técnicos e administrativos, sem os quais a universidade não funcionaria.

Muito obrigada aos membros da banca, professores Dr. Antônio de Pádua Carobrez, Dra. Camila Marchioni, Dra. Janaína Menezes Zanoveli e Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira por suas contribuições enriquecedoras.

Aos meus amigos, especialmente à Fabiani e Letícia, obrigada pelos momentos compartilhados durante o mestrado.

À Minerva, obrigada pelos ronrones ansiolíticos e companhia de sempre.

Agradeço também aos ratos, que foram fundamentais para realização deste trabalho.

Por último, agradeço ao CNPq, pela concessão de minha bolsa.

There was only one species on the planet more intelligent than dolphins, and they spent a lot of their time in behavioral research laboratories running round inside wheels and conducting frighteningly elegant and subtle experiments on man. The fact that once again man completely misinterpreted this relationship was entirely according to these creature's plans. (ADAMS, 1979)

RESUMO

A formação de memórias aversivas e a ansiedade “fisiológica” são necessárias para a capacidade de defesa e conseqüente sobrevivência dos animais. A extinção de memórias aversivas é um processo representativo de adaptação comportamental, pois ocorre a formação de uma memória inibitória que suprime a memória aversiva original. Este processo vem sendo estudado em roedores devido à sua similaridade com terapias cognitivas comportamentais aplicadas na clínica. Evidências científicas sugerem que o sistema serotoninérgico regula a extinção de memórias aversivas. A ayahuasca (AYA) é uma bebida obtida através da decocção de folhas de *Psychotria viridis* e arbustos de *Banisteriopsis caapi*, que contêm substâncias que potencializam a função serotoninérgica, a destacar a substância psicodélica agonista de receptores serotoninérgicos *N,N*-dimetiltryptamina (DMT). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da AYA sobre a extinção de memórias aversivas contextuais recentes (com 1 dia de idade) e remotas (com 21 dias de idade), além da influência sobre a expressão de comportamentos exploratórios e defensivos relacionados à ansiedade utilizando ratos Wistar machos adultos. Para avaliar parâmetros relacionados à ansiedade e atividade exploração geral, foi usado o paradigma do labirinto em cruz elevado (LCE) uma hora e vinte e quatro horas após o tratamento por via oral com AYA contendo 0,1, 0,3 ou 1,0 mg/Kg de DMT ou solução veículo (água). Não houve diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que a AYA não altera comportamentos relacionados à ansiedade e exploração geral nesta faixa de dose. Nos experimentos relacionados à extinção de memórias aversivas foi utilizado protocolo de condicionamento aversivo contextual. Animais condicionados ao contexto A foram tratados com AYA (0,3 mg/Kg de DMT, via oral) uma hora antes da sessão de extinção (contexto A) e posteriormente testados para avaliação da retenção (contexto A), generalização (contexto B) e reinstalação (contexto A) da memória. Em todos os testes, a porcentagem (em segundos) de tempo em que o animal apresenta o comportamento aversivo de congelamento foi quantificado e utilizado para inferir os efeitos do tratamento. Uma única administração de AYA reduziu a expressão do congelamento em relação ao grupo controle durante a sessão de extinção, mas no teste de retenção da extinção da memória aversiva os grupos não diferiram. Para avaliar se a diferença observada durante a sessão de extinção decorreria de alterações na ansiedade ou exploração geral, animais condicionados ao contexto foram tratados com a mesma dose de AYA e submetidos ao LCE, onde não houve diferenças relativas ao controle, sugerindo que tal efeito não estaria acompanhado de alterações na ansiedade ou exploração geral. Após realizarmos duas vezes (em dias consecutivos) a associação de AYA (0,3 mg/Kg de DMT) com a sessão de extinção, o tratamento foi capaz de facilitar a extinção da memória aversiva durante as sessões de extinção, efeito mantido no teste de retenção da extinção de memórias com 1 e 21 dias de idade. Não houve alterações no congelamento expresso em um contexto neutro e não-condicionado e, como predito, após uma sessão de reinstalação da memória original, os grupos voltaram a expressar níveis semelhantes de congelamento em ambos os casos. Em conjunto, tais resultados sugerem que a AYA pode facilitar a extinção de memórias aversivas contextuais recentes e remotas em ratos.

Palavras-chave: Aprendizagem e memória; ansiedade; condicionamento aversivo contextual; psicodélicos; serotonina.

ABSTRACT

Aversive memories and "physiological" anxiety are necessary for animals' defense and consequent survival. The extinction of aversive memories is a representative process of behavioral adaptation, as a neutral, inhibitory memory is formed that suppresses the original aversive memory. This process has been studied in rodents due to its similarity with cognitive behavioral therapies in the clinic. Scientific evidence suggests that the serotonergic system regulates the extinction of aversive memories. Ayahuasca (AYA) is a beverage obtained from the decoction of *Psychotria viridis* leaves and *Banisteriopsis caapi* bushes, which contain substances that enhance serotonergic function, particularly the psychedelic substance agonist of serotonergic receptors *N,N*-dimethyltryptamine (DMT). This work aimed to investigate the effects of AYA on the extinction of recent (1 day old) and remote (21 days old) contextual aversive memories, in addition to the influence on the expression of exploratory and defensive behaviors related to anxiety using adult male Wistar rats. The elevated plus-maze (EPM) paradigm was used to assess parameters related to anxiety and general exploration activity one and twenty-four hours after oral treatment with AYA (containing 0.1, 0.3, or 1.0 mg/Kg of DMT) or vehicle solution (water). There were no significant differences between groups, suggesting that AYA does not alter anxiety-related and general exploration behaviors in this dose range. A contextual aversive conditioning protocol was used in the experiments related to the extinction of aversive memories. Animals conditioned to context A were treated with AYA (0.3 mg/Kg of DMT, orally) one hour before the extinction session (context A) and subsequently tested to assess extinction retention (context A), generalization (context B), and reinstatement (context A) of the memory. In all tests, the freezing behavior time (in seconds) was quantified and used to infer treatment effects. A single administration of AYA reduced freezing expression relative to the control group during the extinction session, but the groups did not differ in the fear extinction retention test. To assess whether the difference observed during the extinction session was due to changes in anxiety or general exploration, animals conditioned to the context were treated with AYA and submitted to the EPM, in which there were no differences relative to the control group, suggesting that changes in general anxiety or exploration did not accompany that effect. When we repeated the association of AYA (0.3 mg/Kg of DMT) with the extinction session twice, on consecutive days, treatment was able to facilitate the extinction of the aversive memory during the extinction sessions, an effect maintained in the retention test for both 1- and 21-days old memories. There were no changes in freezing expressed in a neutral, unconditioned context. As predicted, the groups returned to expressing similar freezing levels following the reinstatement of the original memory. These results suggest that AYA (containing 0.3 mg/Kg of DMT) may enhance the extinction of recent and remote contextual aversive memories in rats.

Keywords: Anxiety; contextual aversive conditioning; learning and memory; psychedelics; serotonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de extinção de memórias aversivas	16
Figura 2 - Síntese da serotonina e vias serotoninérgicas	19
Figura 3 - Labirinto em cruz elevado (LCE)	29
Figura 4 - Protocolo de condicionamento aversivo contextual.....	32
Figura 5 - Protocolo referente ao experimento 1A.....	33
Figura 6 - Protocolo referente ao experimento 1B.....	34
Figura 7 - Protocolo referente ao experimento 3.....	35
Figura 8 - Protocolo referente ao experimento 4.....	36
Figura 9 - Protocolo referente ao experimento 5.....	37
Figura 10 - A administração oral de AYA uma hora antes do teste não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade	40
Figura 11 - A administração oral de AYA vinte e quatro horas antes do teste não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade.....	41
Figura 12 - Uma administração de AYA não foi capaz de potencializar a retenção da extinção de memórias aversivas contextuais.....	43
Figura 13 - O tratamento com AYA não influencia parâmetros relacionados à ansiedade e atividade exploratória em animais condicionados.....	45
Figura 14 - Efeito da administração repetida de AYA na extinção de memórias aversivas contextuais em ratos.....	47
Figura 15 - Efeito da administração repetida de AYA na extinção de memórias aversivas após vinte e um dias do condicionamento aversivo contextual em ratos..	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HT - 5-hidroxitriptamina ou serotonina
- AMPA - Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiônico
- AMPc - Adenosina monofosfato cíclico
- ANOVA - Análise de variância (*analysis of variance*)
- AYA - Ayahuasca
- BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo (*Brain-derived neurotrophic factor*)
- CPFm - Córtex pré-frontal medial
- CREB - Proteína de ligação do elemento responsivo ao AMPc (*cAMP response element-binding protein*)
- DL50 - Dose letal para 50% dos animais testados
- DMT - *N,N*-Dimetiltriptamina
- E.P.M. - Erro padrão da média
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- h - Hora
- IC50 - Concentração inibitória média
- IL - Infralímbico
- ISRS - Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
- Kg - Quilogramas
- Ki - Constante de inibição
- LCE - Labirinto em cruz elevado
- Log P - Coeficiente de partição
- LSD - Dietilamida do ácido lisérgico
- mA - Miliampere
- MAO - Monoamina oxidase
- MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina
- Mg - Miligramas

mL - Mililitros

mTOR - Alvo de rapamicina em mamíferos (*mammalian-target of rapamycin*)

N - Número

nM - Nanomolar

NMDA - N-metil D-Aspartato

PAG - Substancia cinzenta periaquedutal

PL - Pré-límbico

s - segundo

TEPT - Transtorno de estresse pós-traumático

VEI - Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	AS MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	12
1.2	TRANSTORNOS DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E ANSIEDADE.....	13
1.3	O PROCESSO DE EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	15
1.4	A SEROTONINA E OS PSICODÉLICOS.....	18
1.5	AYAHUASCA.....	22
2	HIPÓTESE.....	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	MATERIAL E MÉTODO.....	27
4.1	ANIMAIS E CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	27
4.2	TRATAMENTO: AYAHUASCA (AYA).....	27
4.3	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	28
4.4	CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL.....	29
4.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.5.1	Experimento 1: Curva dose-resposta para avaliação dos efeitos da AYA sobre comportamentos exploratórios e defensivos relacionados à ansiedade.....	32
4.5.1.1	<i>Experimento 1A: Efeitos agudos do tratamento com AYA no LCE.....</i>	<i>32</i>
4.5.1.2	<i>Experimento 1B: Efeitos pós-agudos do tratamento com AYA no LCE.....</i>	<i>33</i>
4.5.2	Experimento 2: Efeitos de uma administração de AYA sobre a extinção de uma memória aversiva contextual com um dia de idade.....	34
4.5.3	Experimento 3: Avaliação do comportamento relacionado à ansiedade em ratos previamente condicionados ao contexto e tratados com AYA.....	34
4.5.4	Experimento 4: Efeito de duas administrações de AYA sobre a extinção de uma memória aversiva contextual com um dia de idade.....	35
4.5.5	Experimento 5: Efeito de duas administrações de AYA sobre a extinção de uma memória aversiva contextual com vinte e um dias de idade.....	36

4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS.....	39
5.1	EXPERIMENTO 1A: A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE AYA UMA HORA ANTES DO TESTE NÃO ALTEROU COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE.....	39
5.2	EXPERIMENTO 1B: A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE AYA VINTE E QUATRO HORAS ANTES DO TESTE NÃO ALTEROU OS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE.....	40
5.3	EXPERIMENTO 2: A ADMINISTRAÇÃO DE UMA DOSE DE AYA NÃO POTENCIALIZOU A RETENÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL RECENTE.....	42
5.4	EXPERIMENTO 3: O TRATAMENTO COM AYA NÃO INFLUENCIA PARÂMETROS RELACIONADOS À ANSIEDADE E ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM ANIMAIS CONDICIONADOS.....	43
5.5	EXPERIMENTO 4: A ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE AYA FACILITOU A RETENÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL RECENTE.....	45
5.6	EXPERIMENTO 5: A ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE AYA FACILITOU A RETENÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL REMOTA.....	48
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS MEMÓRIAS AVERSIVAS

A formação e manutenção de memórias aversivas possui papel fundamental nas nossas vidas. O medo é uma emoção dotada de efeitos poderosos no comportamento e fisiologia entre as espécies animais (GROSS; CANTERAS, 2012) e a exposição a situações de medo agudo gera alterações emocionais potentes, ativando um sistema comportamental de defesa cuja função biológica é nos proteger de ameaças ambientais perigosas (FENDT; FANSELOW, 1999; ASOK *et. al.*, 2019). Armazenar, reter e reativar informações de medo previamente aprendidas é necessário para o enfrentamento de perigos e sobrevivência dos animais. Para que isso aconteça, é necessária uma orquestra ordenada de processos moleculares, celulares e comunicação entre regiões encefálicas. Inicialmente, ocorre a aquisição da informação, formando uma memória lábil, que é gradualmente estabilizada através do processo de consolidação (IZQUIERDO *et. al.*, 2016; TROYNER; BERTOGLIO, 2021). Essa memória estável fica armazenada e pode ser evocada, gerando alterações comportamentais (CUMMINGS *et. al.*, 2019).

O processo de consolidação envolve transcrição gênica e síntese proteica além de alterações morfológicas de plasticidade sináptica para que se forme o que chamamos de engrama. O engrama é um conjunto neuronal que representa a atividade concomitante de um grupo específico de neurônios, podendo abranger um amplo repertório de funções cerebrais, incluindo a memória (CARRILLO-REID, 2022). A atividade destas células é necessária e suficiente para a recuperação da memória consolidada, que se torna novamente instável, sendo necessário outro processo dependente de síntese proteica, a reconsolidação, para que ocorra reestabilização (HAN *et. al.*, 2022).

Para estudar as memórias, são utilizadas diversas formas de condicionamento. O condicionamento clássico foi inicialmente descrito por Ivan Pavlov, em 1927, que observou o condicionamento apetitivo. No experimento de Pavlov, cachorros

aprenderam a associar o som de uma sineta ao ato de receber alimento, e gradualmente passaram a apresentar respostas fisiológicas de salivação apenas por ouvir som da sineta, mesmo sem a apresentação da comida, ou seja, aprenderam que o som precedia o alimento. Até os dias atuais, os trabalhos que utilizam variadas formas de condicionamento baseiam-se nos fundamentos obtidos através deste experimento, tendo por base a associação entre um estímulo neutro e um estímulo de valência emocional (positiva ou negativa), onde o estímulo neutro passa a adquirir valência emocional, tornando-se condicionado (PAVLOV, 1927).

As memórias aversivas, foco deste trabalho, podem ser estudadas empregando condicionamentos baseados no pareamento entre um estímulo aversivo (como choques) associado à uma pista previamente neutra (como um contexto ou um som), fazendo com que animais (de laboratório e humanos) passem a experienciar um estado de aversão/medo condicionado quando apenas a pista previamente neutra estiver presente, sem o estímulo aversivo. A expressão do medo condicionado aprendido fornece uma resposta crítica relacionada à sobrevivência por ativar uma gama de comportamentos defensivos (FENDT; FANSELOW, 1999).

Nem todas as memórias são criadas com a mesma valência: algumas experiências são bem lembradas, enquanto outras não, dependendo da relevância emocional delas, associada à capacidade de ativar sistemas envolvendo hormônios e redes neurais que regulam o processamento das memórias (ROOZENDAAL *et. al.*, 2011). Situações de estresse intenso e/ou prolongado, insegurança e experiências traumáticas podem fazer com que as memórias percam sua função fisiológica de defesa, gerando transtornos (WILLIAMSON *et. al.*, 2021).

1.2 TRANSTORNOS DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E ANSIEDADE

A experiência de um trauma intenso leva à formação de memórias aversivas duradouras, que podem desencadear o desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) (SILVA *et. al.*, 2018), uma condição psiquiátrica associada com memórias aversivas disfuncionais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION,

2014). No TEPT, a habilidade de alterar rapidamente o comportamento frente a mudanças de circunstância, chamada de flexibilidade cognitiva, está frequentemente prejudicada ou interrompida (IZQUIERDO *et. al.*, 2017), e o medo se torna inapropriado (intenso, generalizado), perdendo sua função biológica benéfica e causando muito mal a quem o sente (MAHAN; RESSLER, 2012).

A ansiedade é uma emoção que faz parte do repertório normal das experiências diárias de qualquer indivíduo sadio, estando associada à tensão muscular, estado de alerta e preparação para potencial perigo futuro (SHIN e LIBERZON, 2010). Apesar de biologicamente necessária para a sobrevivência, quando os estímulos que desencadeiam esta resposta de defesa são muito intensos ou inapropriados em relação à causa, a ansiedade deixa de ter uma função adaptativa e passa a ser caracterizado como transtorno. Os transtornos de ansiedade manifestam-se como a ativação inapropriada de mecanismos naturais de comportamentos de defesa (FANSELOW; PONNUSAMY, 2008). Em animais de laboratório, podemos observar comportamentos de avaliação de risco, abordagem e evitação, expressos perante a exposição a estímulos ou ambientes potencialmente aversivos que o sujeito possa explorar (BLANCHARD *et. al.*, 2011).

O TEPT era classificado como um transtorno relacionado à ansiedade até o ano de 2014, no qual, com a publicação da quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), passou a ser associado com transtornos relacionados ao estresse e trauma (WILLIAMSON *et. al.*, 2021). Apesar da reclassificação, os transtornos de ansiedade e o TEPT possuem características similares, incluindo a capacidade prejudicada de discernimento entre situações seguras e potencialmente perigosas, dificuldade de extinguir memórias aversivas (MILAD *et. al.*, 2008), além de semelhanças em termos de diagnóstico, tratamento e comorbidades, que se refletem devido às bases moleculares e de circuitos neuronais envolvidos na geração dos sintomas (WILLIAMSON *et. al.*, 2021).

Com base em resultados de estudos em ratos e camundongos, as regiões encefálicas envolvidas na ansiedade são similares às envolvidas na modulação das memórias aversivas, incluindo possíveis desequilíbrios na função do córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo, do septo lateral, do núcleo central da amígdala e da substância cinzenta periaquedutal (IZQUIERDO *et. al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2021). Os

mecanismos moleculares também são similares, envolvendo hormônios glicocorticoides e neurotransmissores como noradrenalina e serotonina (MERZ; WOLF, 2022).

1.3 O PROCESSO DE EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

A extinção é um novo aprendizado, envolvendo o recrutamento de circuitarias encefálicas complexas, sendo um processamento representativo de alteração comportamental extensamente estudado devido à sua similaridade com terapias cognitivas aplicadas na clínica (BOUTON *et. al.*, 2021) para o tratamento do TEPT, apresentando sucesso na remissão dos sintomas. O processo de extinção consiste na exposição longa e/ou repetida a estímulos ligados ao trauma, porém em um ambiente neutro e seguro, resultando na atenuação da expressão da memória traumática (SILVA *et. al.*, 2018).

Em animais de laboratório, a aquisição da extinção refere-se ao aprendizado inicial que ocorre quando as respostas relacionadas ao medo reduzem dentro de uma sessão de exposição ao estímulo condicionado, sem apresentação do estímulo aversivo. Este processo é consolidado nas horas subsequentes, formando uma memória de extinção estável; após este processamento, a nova apresentação do estímulo condicionado gera níveis de expressão de respostas defensivas baixos se a extinção for bem-sucedida (QUIRK *et. al.*, 2007).

Diferente do que o nome faz pensar, a extinção é a redução da expressão da resposta defensiva que ocorre quando o estímulo incondicionado está ausente, não sendo a memória aversiva apagada do repertório comportamental de um organismo, mas novamente aprendida, costumeiramente caracterizada como inibida. Essa nova memória inibitória compete e inibe a memória original aversiva, que gera o comportamento defensivo de congelamento ou *freezing* (MILAD; QUIRK, 2012). Assim, o aprendizado original fica ao menos parcialmente intacto no encéfalo mesmo que o comportamento tenha sido extinto (BOUTON *et. al.*, 2021).

Quando o sujeito que teve a memória aversiva devidamente extinta é novamente exposto a um estímulo incondicionado (igual ou menor do que o original), ocorre a reinstalação, isto é, a memória aversiva original volta a ser expressa comportamentalmente (QUIRK; MUELLER, 2008; BOUTON, 2021). Ainda, como a extinção é dependente do contexto, as respostas de medo a um estímulo aversivo previamente extinto são instaladas em um novo contexto, diferente daquele no qual ocorreu a extinção (MYERS; DAVIS, 2002; MILAD *et. al.*, 2006). Além disso, o comportamento extinto sofre recuperação espontânea quando as respostas condicionadas são testadas um longo período após a conclusão da extinção (BOUTON, 2021). Até mesmo o primeiro trabalho realizado por Pavlov (1927) esclareceu que um comportamento “extinto” pode retornar ou se recuperar espontaneamente ao longo do tempo, isso por que a memória aversiva original é suprimida no processo de extinção, porém continua a existir, permanecendo propensa a ressurgir (SILVA; GRÄFF, 2023).

Figura 1: Processo de extinção de memórias aversivas

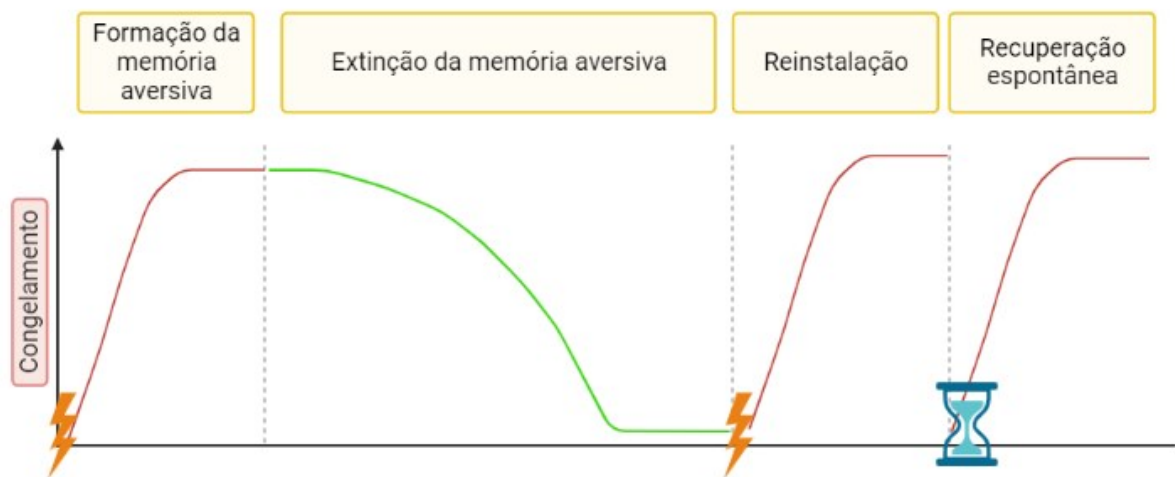


Figura 1: A memória aversiva formada é expressa por um alto nível de congelamento. À medida em que ocorre a aquisição da extinção, a expressão do comportamento de congelamento reduz gradualmente, podendo sofrer reinstalação quando o indivíduo é novamente exposto a um estímulo aversivo, ou ainda se recuperar espontaneamente ao longo do tempo. Fonte: Imagem elaborada pela autora, criada utilizando o Biorender.

Memórias aversivas remotas (isto é, formadas há mais de 21 dias, em animais de laboratório) são mais difíceis de modular (SILVA; GRÄFF, 2023), porém, a extinção da expressão da resposta defensiva ainda ocorre longos períodos após o estímulo aversivo (SILVA *et. al.*, 2018). O estudo da extinção de memórias aversivas remotas em modelos animais é de grande potencial translacional, uma vez que a intervenção clínica raramente irá ocorrer logo após a situação traumática; apesar disso, são poucos os trabalhos que acessam este processo (TSAI; GRÄFF, 2014).

As áreas encefálicas como o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e amígdala participam do processo de extinção (LIU *et al.*, 2021). O CPF é dividido em áreas que possuem funcionalidades distintas, a destacar o CPF medial (CPFm), que é subdividido em córtex cingulado anterior, córtex pré-limbico (PL) e córtex infralímbico (IL) (PAREDES *et.al.*, 2019). O córtex IL parece suprimir comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e medo, sendo considerado uma região responsável pelo controle inibitório (BARKER, 2013). Sabe-se que o córtex IL é fundamental para a aquisição e consolidação da extinção de memórias aversivas recentes (DO-MONTE *et al.*, 2015) e remotas (AWAD *et. al.*, 2015), sendo que sua inativação durante a extinção dificulta a ocorrência do processo. Na substância cinzenta periaquedutal (PAG) ventral e dorsal, parece existir uma subpopulação de neurônios resistentes ao processo de extinção, sugerindo que essa região desempenha função importante na reativação de memórias aversivas extintas (WATSON *et. al.*, 2016).

A nível molecular, em situações de estresse intenso, são liberados hormônios (como por exemplo os glicocorticoides), neurotransmissores (como por exemplo a noradrenalina, serotonina, dopamina, glutamato, GABA e endocanabinoides) e neuropeptídeos (como por exemplo a oxitocina e os opioides) que influenciam processos relacionados ao medo, modulando a extinção de memórias aversivas (CAMP; JOHNSON, 2015).

Em função do supracitado, intervenções farmacológicas que tenham por alvo estes sistemas poderiam influenciar as várias etapas da extinção da memória aversiva (CRASKE *et. al.*, 2022). Do ponto de vista translacional, seria interessante associar às sessões de extinção uma ou mais substâncias capazes de otimizar a aquisição ou retenção da memória de extinção (MERZ; WOLF, 2022).

1.4 A SEROTONINA E OS PSICODÉLICOS

No ano de 1937, o cientista Vittorio Erspamer identificou uma substância presente nas células enterocromafins do intestino de coelhos, responsável por causar contração de células do músculo liso. Erspamer deduziu, através de testes colorimétricos, que se tratava de uma molécula contendo grupamento indol e a nomeou enteramina (ERSPAMER; VIALLI, 1937). Posteriormente, essa substância passou a ser chamada de serotonina, por estar presente em grande quantidade no soro e exercer efeitos na coagulação sanguínea, sendo extensamente estudada como possível vasoconstritor (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Em 1949 o pesquisador Maurice Rapport foi capaz de isolar a serotonina no soro e determinar sua estrutura química: a 5-hidroxitriptamina (RAPPORT, 1949). Em 1951, a serotonina podia ser isolada e sintetizada, mas ainda não se conhecia a sua função. Essa questão intrigava a cientista Irvine Page, que buscava, sem sucesso, encontrar na serotonina um possível tratamento para desordens do tônus vascular. A identificação da serotonina no encéfalo, como neurotransmissor, foi resultado do trabalho da pesquisadora Betty Twarog, em colaboração com Irvine Page (TWAROG; PAGE, 1953).

Atualmente, sabe-se que a serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), é uma indolamina biogênica que deriva do metabolismo do aminoácido essencial triptofano, o qual é obtido através da dieta, por meio de alimentos como: banana, ovo, leite, chocolate amargo, queijo, amêndoas, arroz integral, mel, nozes, sementes e grãos (SOUSA *et al.*, 2021). A nível sistêmico, a serotonina desempenha ações importantes, como termorregulação, ativação da agregação plaquetária, contrações uterinas, broncoconstrição, vasoconstrição, motilidade gastrointestinal (BORROTO-ESCUELA *et al.*, 2021) e modulação da resposta imune (MONDANELLI; VOLPI, 2021). No sistema nervoso central, age como neurotransmissor, controlando diversas funções como a modulação do humor, resposta ao estresse, temperatura corporal, sono e apetite (BORROTO-ESCUELA *et al.*, 2021; KANOVA; KOHOUT, 2021).

A serotonina está altamente concentrada em neurônios específicos cujos corpos celulares estão localizados na parte superior do bulbo, na região da rafe (por isso chamados de núcleos da rafe), com projeções direcionadas para diversas regiões do encéfalo (AGHAJANIAN; LIU, 2009). A síntese deste neurotransmissor inicia com a hidroxilação do L-triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), produzindo 5-

hidroxitriptofano (5-HTP), que sofre ação da enzima 5-hidroxitriptofano-descarboxilase (TDC) gerando serotonina. Quando liberado na fenda sináptica mediante potencial de ação, esse neurotransmissor age nos seus diversos receptores pré e pós-sinápticos, é recaptado por transportadores e degradado nos neurônios pré-sinápticos por enzimas, tal como a monoamina oxidase A (MAO-A) (BADER *et. al.*, 2020).

Figura 2: Síntese da serotonina e vias serotoninérgicas

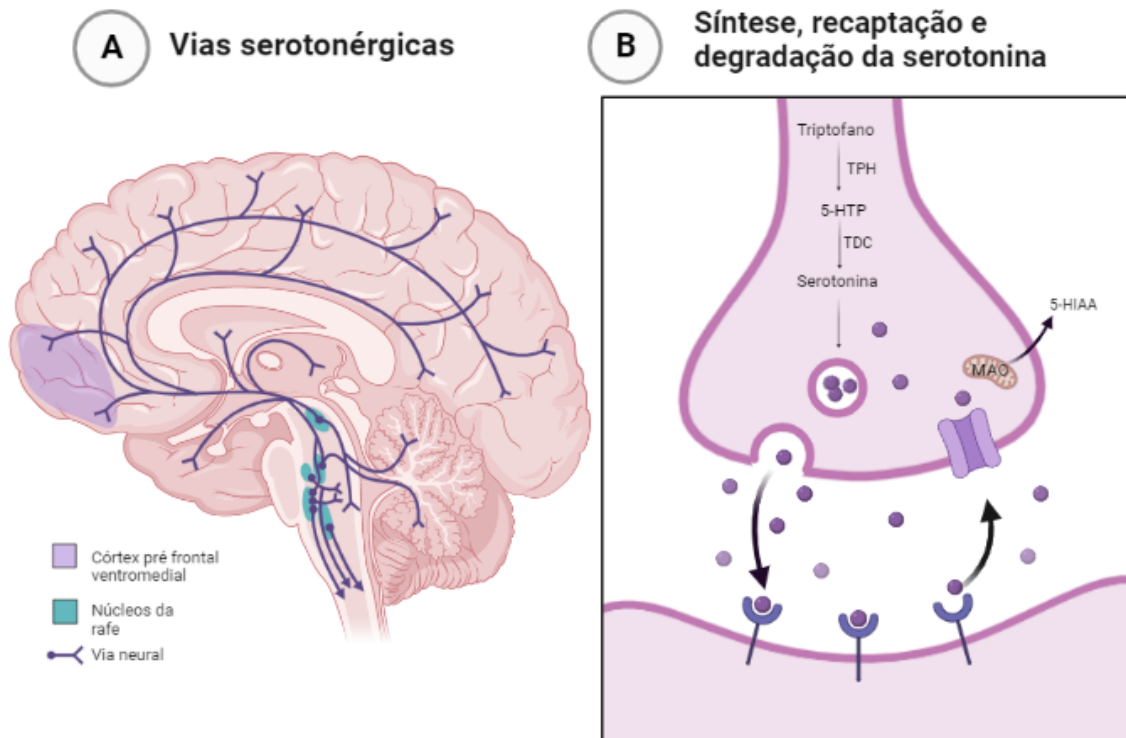


Figura 2: (A) A serotonina é sintetizada na região dos núcleos da rafe e os neurônios serotoninérgicos projetam-se para diversas regiões do encéfalo (humano), a destacar o córtex pré-frontal ventromedial. **(B)** O aminoácido triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), e posteriormente o 5-HTP é convertido em serotonina pela enzima 5-hidroxitriptofano-descarboxilase (TDC). A serotonina é armazenada em vesículas e liberada na fenda sináptica mediante potencial de ação, podendo ligar-se aos seus receptores, ativando-os, ou ser recaptada por transportadores e degradada em ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) pela enzima mitocondrial monoamina oxidase (MAO). Fonte: Imagem elaborada pela autora, criada utilizando o Biorender.

As regiões encefálicas envolvidas no processamento de memórias aversivas e comportamentos relacionados à ansiedade, incluindo CPFm, amígdala e hipocampo, possuem grande concentração de receptores 5-HT (BAUER *et. al.*, 2015). Existem 7 famílias conhecidas de receptores serotoninérgicos, sendo que a maioria deles são acoplados à proteína G (5-HT1, 2, 4, 5, 6, 7) com exceção do 5-HT3, que é um canal iônico (FILIP; BADER, 2009; BADER *et. al.*, 2020).

Tratando-se dos efeitos da ativação de receptores serotoninérgicos sobre comportamentos relacionados à ansiedade e extinção de memórias aversivas, destacam-se os receptores do tipo 5-HT1A e 5-HT2A. Agonistas dos receptores 5-HT2A parecem exercer efeitos ansiogênicos e de aumento da extinção de memórias aversivas, enquanto agonistas dos receptores 5-HT1A parecem ser ansiolíticos e prejudicar a extinção de memórias aversivas contextuais (BAUER *et. al.*, 2015) em estudos realizados utilizando ratos e camundongos.

Os efeitos comportamentais supracitados podem estar relacionados com ações fisiológicas da serotonina nas sinapses do hipocampo ou da amígdala, uma vez que variações nos genes que controlam a produção destes receptores podem influenciar o condicionamento e a extinção de memórias aversivas (IZQUIERDO *et. al.*, 2016). Além disso, as vias de sinalização intracelulares ativadas por estes receptores desencadeiam respostas celulares distintas: os receptores 5-HT2A (localizados nos neurônios pós-sinápticos) são acoplados à proteína Gq, cuja ativação gera aumento da formação de Inositol trifosfato (IP3) e ativação da proteína kinase C (PKC) pelo diacilglicerol (DAG), culminando no aumento da concentração intracelular de cálcio e consequente excitação neuronal; os receptores 5-HT1A (localizados nos neurônios pré e pós-sinápticos) são acoplados à proteína Gi, que quando ativada, leva à redução de AMPc e da concentração intracelular de cálcio, gerando inibição neuronal (KWAN *et. al.*, 2023). Estes efeitos sobre a função celular podem auxiliar no entendimento das diferenças comportamentais observadas pela ativação destes receptores.

A regulação do sistema serotoninérgico por meio de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) é utilizada para o tratamento de transtornos de ansiedade generalizada, e, de forma paliativa, para o TEPT (BAUER *et. al.*, 2015). Apesar de evidenciado em animais de laboratório que o tratamento crônico com ISRS facilita a aquisição da extinção de memórias aversivas

(BURGHARDT; BAUER, 2013), na clínica, o tratamento por vezes é ineficaz na remissão completa dos sintomas, demora de 2 a 4 semanas para começar a gerar efeitos benéficos, é associado à uma gama de efeitos adversos (HOSKINS *et al.*, 2015) e apesar de comparável, não supera a terapia cognitiva comportamental em seus efeitos (LEE; STEIN, 2022) o que estimula novos estudos acerca de substâncias que possam modular o sistema serotoninérgico de maneira mais eficaz para o tratamento destes transtornos psiquiátricos.

A história da serotonina no encéfalo relaciona-se com o estudo das substâncias psicodélicas, capazes de alterar a percepção (provocando efeitos alucinógenos) e o humor, além de afetar um grande número de processos cognitivos (KWAN *et al.*, 2022). No começo da década de 1950, com a elucidação da estrutura química da dietilamida do ácido lisérgico (LSD), realizada por Albert Hoffman, foi possível observar que há relação estrutural entre a serotonina e esta substância alucinógena, descoberta evidenciada por Dilworth Wayne Woolley. Wolley combinou o trabalho de Betty Twarog à descoberta de Albert Hoffman e hipotetizou que a serotonina teria papel importante na fisiopatologia dos transtornos mentais (WOOLLEY; SHAW, 1954). Com o passar dos anos, uma ampla variedade de substâncias psicodélicas com estrutura de indolamina (similares à serotonina) foram identificadas, como por exemplo a *N-N*-dimetiltriptamina (DMT) (NICHOLS, 2016).

As substâncias psicodélicas podem ser divididas em quatro classes, baseado no perfil farmacológico e estrutura das moléculas: psicodélicos clássicos (que são agonistas dos receptores 5-HT_{2A}), empatógenos (que alteram a liberação e recaptação de serotonina e dopamina), agentes anestésicos dissociativos (antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato [NMDA]) e alucinógenos atípicos (que afetam múltiplos sistemas de neurotransmissão) (REIFF *et al.*, 2020).

A DMT, presente na ayahuasca, age como agonista dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} localizados em estruturas corticais e subcorticais (PELLER *et al.*, 2017) e destaca-se pelo potencial de servir como alternativa terapêutica eficaz em estudos clínicos, fato que estimula a realização de estudos pré-clínicos para melhor elucidar seu mecanismo de ação (SANTOS; HALLAK, 2021). Devido à capacidade que a DMT possui em gerar neuroplasticidade de maneira rápida e duradoura (KWAN *et al.*, 2023), o estudo dos efeitos pós-agudos

desta substância é de grande valia para avaliar as alterações encefálicas que permanecem após a depuração da droga.

Investigando o processamento de emoções, alguns estudos têm demonstrado que psicodélicos podem reduzir a resposta a estímulos emocionais negativos em ambientes experimentais controlados, possuindo capacidade de aumentar a sinaptogênese, melhorando conexões sinápticas, causando efeitos benéficos a longo prazo após uma única administração (VOLLENWEIDER; PRELLER, 2020), o que estimula o estudo dos efeitos pós-agudos (ou seja, após a depuração da droga) de psicodélicos como a DMT. De modo geral, agonistas dos receptores serotoninérgicos parecem facilitar a extinção de memórias aversivas associadas ao som, além de atenuar comportamentos relacionados à ansiedade (CAMERON *et al.*, 2018), porém a extinção de memórias aversivas associadas ao contexto ainda não foi avaliada, bem como a extinção de memórias remotas. Além disso, as doses utilizadas em tratamentos que avaliam a DMT isolada são altas e produzem comportamentos relacionados à alucinações nos ratos e camundongos, como a resposta de contração da cabeça (*head-twitch response*) e tremores (*“wet-dog” shakes*) (JASTER *et al.*, 2022). Em termos translacionais, seria interessante a utilização de baixas doses de DMT, que não possuam tais efeitos psicomiméticos. Isso pode ser atingido utilizando outras substâncias que não possuam efeitos psicodélicos e possam atuar em sinergismo com a DMT, como no caso da ayahuasca.

1.5 AYAHUASCA

A palavra “ayahuasca” é originária da língua indígena quíchua, onde “aya” significa “alma” e “waska” significa “cipó”, ou seja, “cipó das almas” (MCKENNA, 2004). Esta bebida psicodélica obtida usualmente através da decocção de folhas de *Psychotria viridis* (planta que contém abundante quantidade de DMT) e arbustos de *Banisteriopsis caapi* (planta rica em beta-alcalóides, tais como harmina, harmalina e tetrahydroharmina) vem sendo utilizada há muitas décadas por povos indígenas da América do Sul, fazendo parte da medicina tradicional da Amazônia (RIBA *et al.*, 2001; BERLOWITZ *et al.*, 2019).

Quando ingerida, por via oral, os beta-alcalóides presentes na ayahuasca (principalmente harmina) atuam como inibidores da enzima MAO-A intestinal, responsável pela degradação da serotonina e também da DMT, assim, permitindo que a DMT seja absorvida (CARBONARO *et.al.*, 2016) e possa chegar ao encéfalo em quantidades suficientes para induzir efeitos farmacológicos (BRITO-DA-COSTA *et. al.*, 2020). Além disso, parte destes alcalóides também são absorvidos e atuam inibindo a MAO-A encefálica, o que pode produzir um efeito aditivo/sinérgico com a substância psicodélica DMT, potencializando a ativação do sistema serotoninérgico (SANTOS; HALLAK, 2016). Assim, pode-se utilizar menores doses de DMT, permitindo redução de possíveis efeitos adversos relacionados à estados de psicose/delírio, também chamados de psicomiméticos (SANTOS; HALLAK, 2021).

A administração de harmina *per se* parece estar associada com efeitos neuroprotetores, aumento da neurotrofina BDNF, redução da excitotoxicidade e do estresse oxidativo no sistema nervoso central (LIESTER; PRICKETT, 2012; SANTOS; HALLAK, 2016).

A DMT é uma molécula de baixo peso molecular (188.27 g/mol) e caráter hidrofóbico ($\log P = 2.573$) capaz de penetrar rapidamente a barreira hematoencefálica (STRASSMAN, 1994). O efeito psicodélico da DMT parece ser mediado pela ativação dos receptores 5-HT_{2A} (MCKENNA *et al.*, 1984), aos quais ela se liga com afinidade moderada ($K_i = 127-1200$ nM, $IC_{50} = 75-360$ nM) (MCKENNA *et al.* 1990; RAY *et. al.*, 2010). Além dos receptores 5-HT_{2A}, a DMT também ativa receptores 5-HT_{1A} ($K_i = 183$ nM, $IC_{50} = 170$ nM) e 5-HT_{2C} ($K_i = 360-2630$ nM, $IC_{50} = 360$ nM), que contribuem para outros efeitos psicoativos (MCKENNA *et al.* 1990; RAY *et. al.*, 2010; HIRSCHFELD; SCHMIDT, 2021). Em ratos, a DL₅₀ reportada para injeção intraperitoneal de DMT é 47 mg/Kg; no caso da administração intravenosa, a DL₅₀ é 32 mg/kg; em humanos, por via intravenosa, é estimada em 1,6 mg/Kg; quando administrada em forma de ayahuasca (via oral), a DL₅₀ em humanos é estimada em 8 mg/Kg, uma vez que nem toda a DMT ingerida torna-se biodisponível (CALLAWAY *et. al.*, 2005).

Apesar dos efeitos adversos, que incluem aumento moderado na pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura corporal, diâmetro pupilar, náuseas e vômitos, a ayahuasca é um composto de boa segurança (OSÓRIO *et. al.* 2015;

NUNES *et. al.*, 2016). Em ratos, a administração de doses extremamente altas de ayahuasca durante 30 dias consecutivos não causaram comprometimentos cognitivos graves, suportando evidências sobre a segurança da ingestão da ayahuasca (DALDEGAN-BUENO *et. al.*, 2021).

Em termos de eficácia, a maioria dos estudos clínicos utilizando tratamentos com ayahuasca em pacientes diagnosticados com Transtorno Depressivo Maior evidenciaram melhora nos sintomas depressivos após uma única dose da bebida (OSÓRIO *et. al.*, 2015), inclusive em pacientes refratários ao tratamento antidepressivo usual (PALHANO-FONTES *et. al.*, 2018), sendo que estes efeitos persistiram por mais de 3 semanas após a ingestão. A administração de ayahuasca também reduz sintomas da síndrome de retirada de drogas em pacientes dependentes (NUNES *et. al.*, 2016).

Os estudos que avaliam o efeito da ayahuasca para o tratamento de transtornos de ansiedade e TEPT vem crescendo nos últimos anos (SIEGEL *et. al.*, 2021), devido a sua habilidade descrita de alterar o estado de percepção e consciência, permitindo que os sujeitos se sintam mais relaxados e introspectivos, demonstrando grande potencial terapêutico (HAMILL *et. al.*, 2019; SAEGER; OLSON, 2021).

Os componentes da ayahuasca potencializam o sistema serotoninérgico e possuem propriedades anti-inflamatórias e de neuroplasticidade, possuindo efeitos neuroprotetores (ROSSI *et. al.*, 2022). Evidências sugerem que a ayahuasca pode reativar memórias traumáticas suprimidas há muito tempo, fazendo com que o paciente que sofre de TEPT encare-as com empatia, assim explicando sua capacidade curativa (MAIA *et. al.*, 2023). Um estudo clínico acompanhou 1125 pacientes diagnosticados com ansiedade que consumiram ayahuasca, sendo que destes, 70% reportaram melhora significativa e 4,5% reportaram piora nos sintomas, fato que pode ter ocorrido devido a fatores psicológicos pessoais, número de ingestões e percepções do ritual (SARRIS *et. al.*, 2021). A falta de padronização, a dificuldade de realização de estudos controlados por placebo e o grande viés interpessoal associado ao uso ritualístico tornam os ensaios clínicos acerca do uso de ayahuasca desafiadores, uma vez que a percepção mística de cada participante difere e influencia o resultado.

Atualmente os estudos pré-clínicos que avaliam os efeitos da ayahuasca (com todos os seus componentes) no âmbito da memória e ansiedade demonstram resultados promissores, porém ainda são escassos. A administração de ayahuasca por via oral em uma ampla faixa de doses aumentou os níveis de serotonina na amígdala e hipocampo de ratos, áreas conhecidas por sua relação com a memória (CASTRO-NETO *et. al.*, 2013).

Em ratos tratados de forma crônica com altas doses de ayahuasca, não houve efeito ansiolítico relacionado à exploração de um novo ambiente ansiogênico, sugerindo que baixas doses deste composto deverão ser avaliadas em estudos futuros (DALDEGAN-BUENO *et. al.*, 2021). Ainda, a administração crônica de ayahuasca parece causar alterações de plasticidade capazes de melhorar o aprendizado e memória em ratos submetidos ao condicionamento aversivo contextual, até mesmo após o final do tratamento, analisado por modificações comportamentais (FAVARO *et. al.*, 2015) o que estimula estudos acerca dos efeitos pós-agudos da ayahuasca.

Uma única administração de baixas doses de ayahuasca parece prejudicar a reconsolidação de memórias aversivas contextuais em ratos, sem causar alterações comportamentais relacionadas à ansiedade (DANELUZ *et. al.*, 2022). Estudos acerca das possíveis alterações comportamentais causadas pelo tratamento agudo, pós agudo e repetido na extinção de memórias aversivas contextuais e em parâmetros relacionados à ansiedade fazem-se necessários para melhor compreender seu potencial translacional e mecanismos de ação.

2 HIPÓTESE

A hipótese de trabalho é que o tratamento com duas administrações repetidas, mas não com uma única administração de ayahuasca, é capaz de facilitar o processo de extinção de memórias aversivas contextuais recentes e remotas em uma faixa de dose incapaz de alterar comportamentos relacionados à ansiedade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do tratamento com uma e duas administrações de ayahuasca sobre a extinção de memórias aversivas contextuais recentes e remotas, além da expressão de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Investigar os efeitos do tratamento oral agudo e pós-agudo com diferentes doses de ayahuasca sobre comportamentos exploratórios e defensivos relacionados à ansiedade em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE);
- b. Investigar os efeitos de uma única administração oral de ayahuasca sobre a aquisição e retenção da extinção de memórias aversivas contextuais recentes em ratos;
- c. Avaliar os efeitos do tratamento oral com ayahuasca sobre comportamentos exploratórios e defensivos relacionados à ansiedade em ratos previamente condicionados ao contexto e submetidos ao teste do LCE;
- d. Investigar os efeitos da administração oral repetida de ayahuasca sobre a aquisição e retenção da extinção de memórias aversivas contextuais recentes em ratos;
- e. Avaliar os efeitos do tratamento repetido com ayahuasca sobre a aquisição e retenção da extinção de memórias aversivas contextuais remotas em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Foram utilizados no estudo 178 ratos Wistar machos com idade entre 90 a 130 dias, pesando 300-450 gramas. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com número de projeto 5934221121. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, mantidos no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia a temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com livre acesso a água e ração, em ciclo claro/escuro de 12:12 h iniciando às 7:00 h, agrupados em quatro por caixa. Todas as manipulações foram realizadas durante o ciclo claro.

4.2 TRATAMENTO: AYAHUASCA (AYA)

A AYA foi produzida pela igreja Santo Daime Rainha do Céu (Ribeirão Preto - SP, Brasil) (SILVEIRA *et. al.*, 2020) e doada em junho de 2021 ao nosso laboratório, que imediatamente a armazenou em freezer -80°C e descongelou alíquotas minutos antes do tratamento em cada um dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados utilizando o mesmo lote de AYA. O teor de DMT e dos principais alcalóides da decocção foi determinado por Silveira e colaboradores (2020) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Associada à espectrometria de massas em tandem (CLAE-MS) e a quantificação dos principais componentes está apresentada na Tabela 1. Para manter sua estabilidade, a AYA pode ser liofilizada (DALDEGAN-BUENO *et. al.*, 2021) ou congelada (SILVEIRA *et. al.*, 2020), sendo a última utilizada neste trabalho devido às nossas condições de laboratório. As doses de AYA (conforme descrito posteriormente) foram calculadas levando-se em consideração o teor de DMT e o diluente utilizado foi água destilada. A administração da AYA foi realizada por via oral, através de gavagem, uma hora antes do teste.

Tabela 1: Componentes da AYA

Substância	Teor (mg/mL)
DMT	0,45
Harmina	0,30
Tetrahidroharmina	0,59
Harmalina	2,07

Tabela 1: Principais substâncias que compõem a AYA e seu respectivo teor em mg/mL (SILVEIRA *et. al.*, 2020).

4.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O teste do LCE tem por objetivo avaliar o comportamento exploratório e defensivo relacionado à ansiedade dos ratos. O aparato (marca *Insight*, Brasil) consiste em uma estrutura feita de madeira e coberta por lâminas de fórmica, em forma de “+” elevada a uma altura de 50 cm da base de apoio, dotada de dois braços abertos e dois braços fechados, medindo 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, sendo que os braços fechados possuem paredes de 40 cm (conforme ilustrado na figura 3).

Os animais são posicionados no centro do aparato, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e exploram livremente o LCE por 5 minutos, contabilizando o tempo total do teste. Entre cada rato testado, foi realizada a limpeza do LCE com solução de etanol a 10% (v/v) e, ao final de cada dia de teste, com solução de etanol a 70% (v/v). Os experimentos foram gravados e posteriormente analisados por um observador cego aos tratamentos.

Os parâmetros utilizados para avaliar as medidas de comportamentos relacionados à ansiedade, conforme descrito por Pellow *et. al.* (1985), incluem o tempo de permanência do animal nos braços abertos (TA, expresso em %TA; $[(TA/300) \times 100]$), o número de entradas nos braços fechados (EF) e o número de avaliações de risco (AR; caracterizada pela postura que o rato adota ao se esticar partindo de um dos braços fechados em direção a um dos braços abertos, retornando

ao braço fechado em seguida, hesitando em entrar no braço aberto). As respostas relacionadas à ansiedade nos ratos foram inferidas pela %TA e AR, enquanto a atividade exploratória foi avaliada pelo número de EF (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

O protocolo de teste e reteste foi aplicado, sendo cada animal exposto à uma segunda sessão no LCE, dois dias após a primeira, com propósito de avaliar a capacidade do rato adquirir, consolidar e reativar memórias relacionadas à exploração das áreas potencialmente perigosas do labirinto. Assim, na segunda exposição ao LCE, observa-se maior tempo nos braços fechados e menor exploração dos braços abertos, ou seja, ocorre alteração no padrão de exploração do aparato caso a memória de exploração da primeira sessão no LCE seja devidamente lembrada (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005)

Figura 3: Labirinto em cruz elevado (LCE)

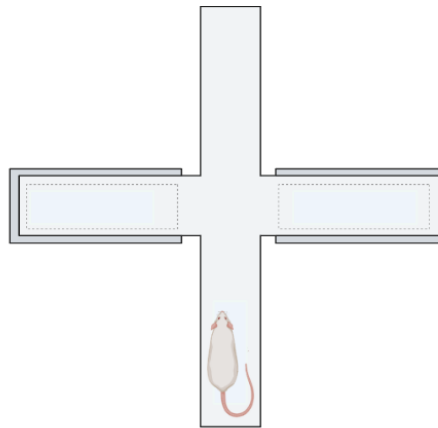


Figura 3: Labirinto em cruz elevado (LCE). Fonte: Imagem elaborada pela autora, criada utilizando o Biorender.

4.4 CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL

O condicionamento aversivo contextual consiste no pareamento de um estímulo neutro ou condicionado (o contexto) com um estímulo aversivo ou incondicionado (choques nas patas), alterando assim a valência do estímulo de forma que, quando exposto a ele novamente sem a apresentação do estímulo aversivo, o

indivíduo expresse respostas defensivas associadas ao medo (ex.: congelamento ou *freezing*), indicando que houve associação entre as informações apresentadas.

Os contextos utilizados foram:

- Contexto A: caixa retangular medindo 35 x 20 x 30 cm, com piso gradeado acoplado a um gerador de choque elétrico, dotada de parede frontal e tampa de acrílico (*Insight*, Brasil). Neste contexto, os animais foram familiarizados, condicionados e testados (extinção, teste A e reteste A).
- Contexto B: caixa quadrada medindo 30 x 30 x 30 cm cujas paredes e piso são de vidro transparente e a tampa é gradeada. Neste contexto ocorre o teste B.
- Contexto C: caixa retangular que segue as mesmas características do contexto A, porém contém listras na cor preta nas paredes e teto, com cores e texturas para tornar o contexto o mais diferente possível do A. O contexto C é utilizado para a etapa da reinstalação.

Assim, conforme detalhado subseqüentemente, o protocolo foi padronizado da seguinte maneira: inicialmente, os animais foram expostos ao contexto A durante três minutos para uma sessão de familiarização, necessária para adquirir a representação contextual inicial. No dia seguinte, foi realizado o condicionamento, onde os animais foram colocados na mesma caixa e, após 30 segundos, receberam 3 choques nas patas (1,0 mA, espaçados entre si por 30 segundos), e após mais 30 segundos, os ratos foram retirados da caixa de condicionamento (totalizando uma sessão de 2 minutos).

Após o condicionamento, os animais passaram por uma ou duas sessões de extinção precedidas de tratamento, nas quais foram expostos ao contexto A durante 15 minutos, para que pudessem gradualmente formar uma nova associação (memória de extinção). Posteriormente, os animais foram submetidos ao teste A (duração de 3 minutos sem apresentação de choque), que permite a avaliação de respostas defensivas condicionadas ao contexto A, além de avaliar se a memória adquirida na sessão de extinção foi devidamente consolidada. No dia seguinte ao teste A, os ratos foram expostos a um novo

contexto (contexto B, caracterizando o teste B, com duração de 3 minutos sem apresentação de choque) para avaliar a taxa de respostas defensivas generalizadas perante um contexto não condicionado. No dia subsequente, os animais foram submetidos ao contexto C, onde receberam um choque nas patas (1,0 mA) com o objetivo de reinstalar a resposta extinta. Por fim, no dia seguinte, os animais passaram pelo reteste A, desta vez para avaliar a taxa de respostas defensivas após a sessão de reinstalação. Entre cada rato testado, foi realizada a limpeza do contexto com solução de etanol a 10% (v/v) e, ao final de cada dia de teste, com solução de etanol a 70% (v/v). O protocolo completo está ilustrado abaixo, na figura 4.

Em todos os casos, o comportamento de congelamento foi utilizado como um índice de respostas defensivas, sendo este definido como a ausência total de movimentos do corpo, exceto aqueles necessários para a respiração do animal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969). Desta maneira, as sessões foram filmadas e o tempo de congelamento expresso pelos ratos foi quantificado (por um observador cego aos tratamentos) em segundos, a cada minuto das sessões e testes e expresso em porcentagem do tempo total de cada etapa.

Figura 4: Protocolo de condicionamento aversivo contextual

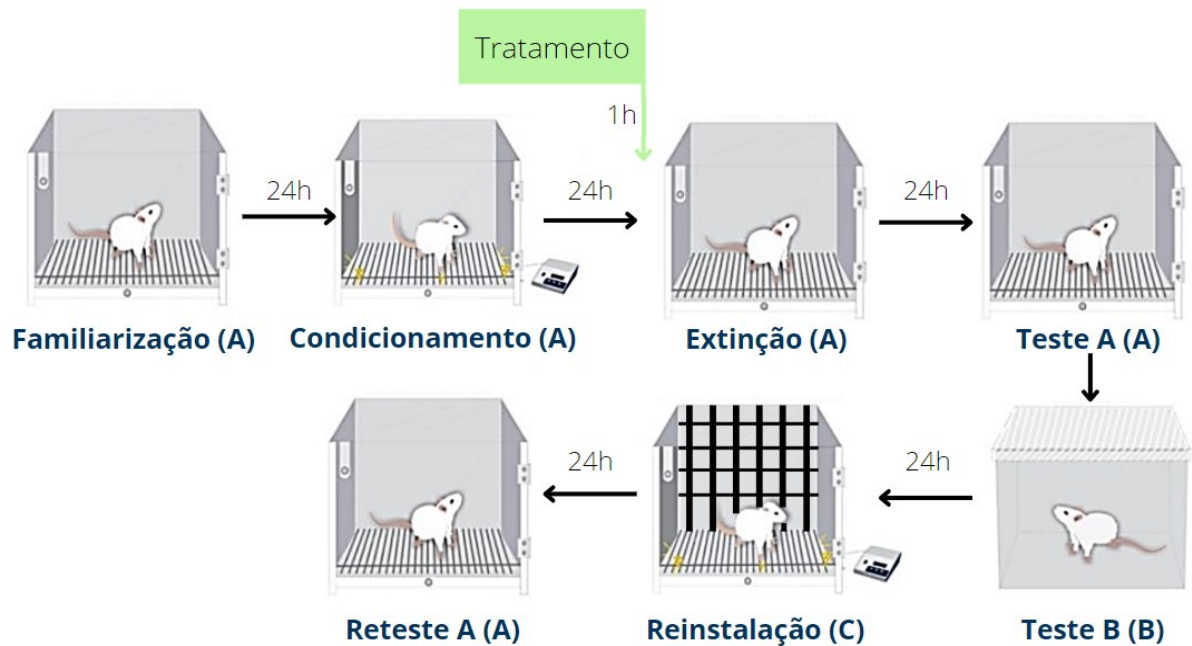


Figura 4: A figura ilustra as etapas do protocolo utilizado, sendo que a letra contida entre parênteses designa o contexto utilizado em cada etapa. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1 Experimento 1: Curva dose-resposta para avaliação dos efeitos da AYA sobre comportamentos exploratórios e defensivos relacionados à ansiedade

4.5.1.1 Experimento 1A: Efeitos agudos do tratamento com AYA no LCE

Neste experimento, quarenta e sete animais foram tratados por via oral (gavagem) com AYA em baixas doses, de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/Kg em teor de DMT ou veículo (água destilada) (N = 11 a 13/grupo). Uma hora após o tratamento, os animais foram testados no LCE para avaliação do comportamento exploratório e relacionado à ansiedade. Quarenta e oito horas após a primeira exposição ao LCE, os animais foram novamente submetidos ao teste, com a finalidade de reavaliar o comportamento após a depuração da droga, além de observar se os ratos alteraram o padrão de

exploração do aparato em função da experiência prévia (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Este protocolo está ilustrado na figura 5.

Figura 5: Protocolo referente ao experimento 1A.

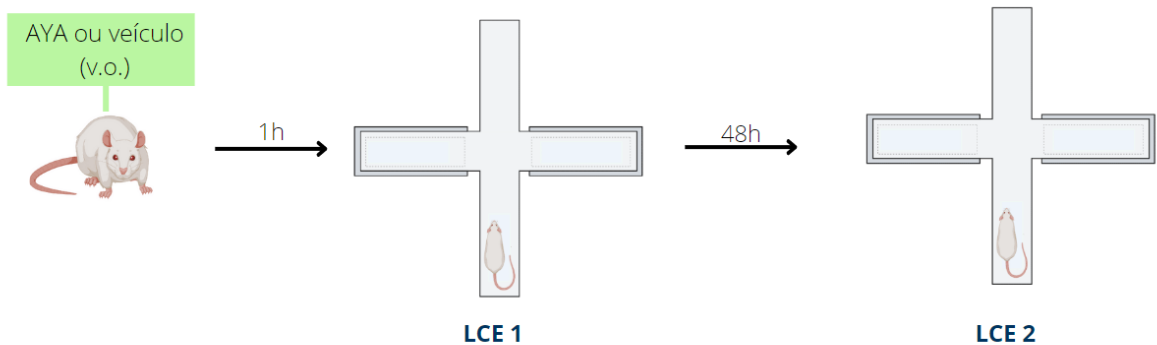


Figura 5: A figura ilustra o protocolo referente ao experimento 1A. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

4.5.1.2 Experimento 1B: Efeitos pós-agudos do tratamento com AYA no LCE

Para avaliar se o tratamento com AYA altera comportamentos relacionados à ansiedade mesmo após sua depuração, neste experimento, quarenta e oito animais foram tratados por via oral (gavagem) com AYA nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/Kg em teor de DMT ou veículo (água destilada) (N = 12/grupo). Vinte e quatro horas após o tratamento, os animais foram testados no LCE para avaliação do comportamento exploratório e relacionado à ansiedade. Quarenta e oito horas após a primeira exposição ao LCE, os animais foram novamente submetidos ao teste (LCE 2). Este protocolo está ilustrado na figura 6.

Figura 6: Protocolo referente ao experimento 1B

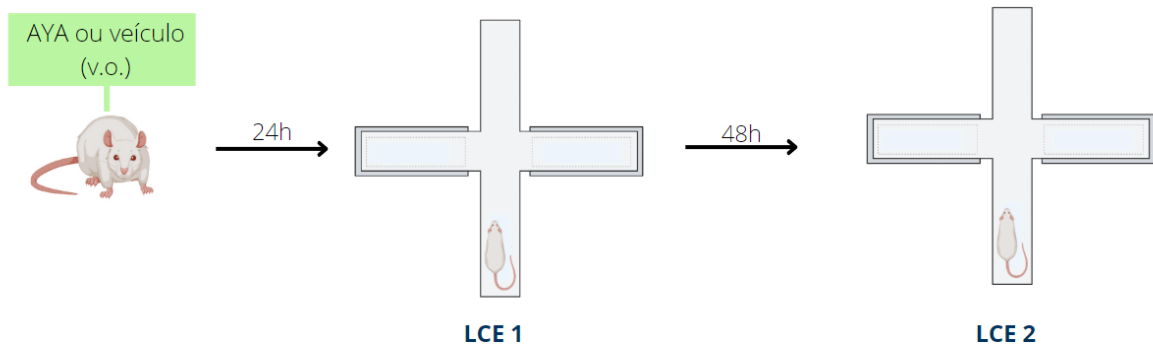


Figura 6: A figura ilustra o protocolo referente ao experimento 1B. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

4.5.2 Experimento 2: Efeitos de uma administração de AYA sobre a extinção de uma memória aversiva contextual com um dia de idade

Este experimento foi delineado com a finalidade de observar se uma administração aguda de AYA facilita o processo de extinção. Após familiarizados e condicionados ao contexto, vinte e dois ratos Wistar machos foram condicionados, divididos aleatoriamente em dois grupos (N = 10 a 11/grupo) e tratados por via oral (gavagem) com AYA (0,3 mg/Kg em teor de DMT) ou veículo (água), uma hora antes da sessão de extinção (conforme protocolo descrito anteriormente no item 4.4 e ilustrado na figura 2), para avaliar se a ingestão de AYA nestas condições experimentais facilita a aquisição e retenção da extinção de memórias aversivas contextuais.

4.5.3 Experimento 3: Avaliação do comportamento relacionado à ansiedade em ratos previamente condicionados ao contexto e tratados com AYA

Para avaliar se a redução do congelamento observada nos ratos tratados com AYA durante a sessão de extinção no experimento 2 seria devido a alteração dos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade ou locomoção, dezenove ratos foram familiarizados e condicionados ao contexto. No dia seguinte, estes animais receberam tratamento com AYA (0,3 mg/Kg em teor de DMT) ou veículo (água) (N = 9 a 10/grupo), uma hora antes de serem submetidos ao LCE 1 e, quarenta e oito horas depois, ao LCE 2, conforme ilustrado na figura 7.

Figura 7: Protocolo referente ao experimento 3

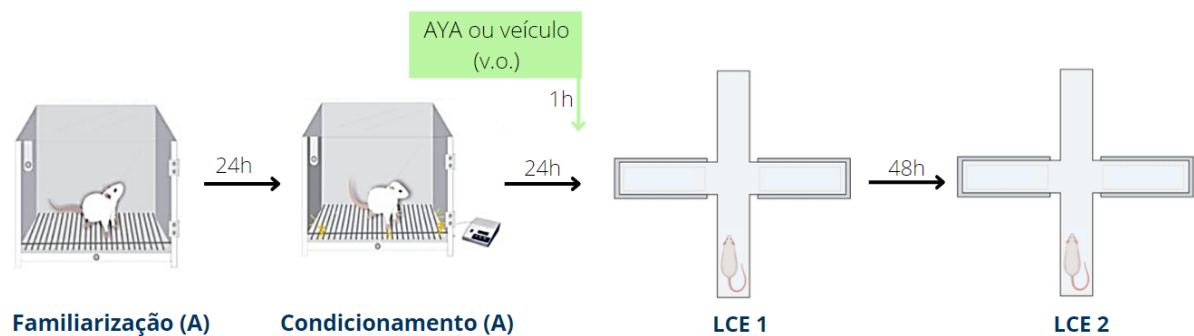


Figura 7: A figura ilustra o protocolo referente ao experimento 3. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

4.5.4 Experimento 4: Efeito de duas administrações de AYA sobre a extinção de uma memória aversiva contextual com um dia de idade

Levando em consideração a análise dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, este experimento foi delineado com objetivo de avaliar se duas administrações de AYA seguidas de exposição à sessão de extinção seriam necessárias para o efeito deste psicodélico sobre o processo de aquisição e retenção da memória de extinção. Assim, após familiarizados e condicionados ao contexto, vinte e dois ratos foram tratados por via oral (gavagem) com AYA (0,3 mg/Kg em teor de DMT) ou veículo (água) (N = 11/grupo) e submetidos a sessão de extinção uma hora após o tratamento. No dia seguinte, o mesmo tratamento foi administrado e seguido da sessão de extinção, de maneira igual à etapa anterior, como ilustrado na figura 8.

Figura 8: Protocolo referente ao experimento 4

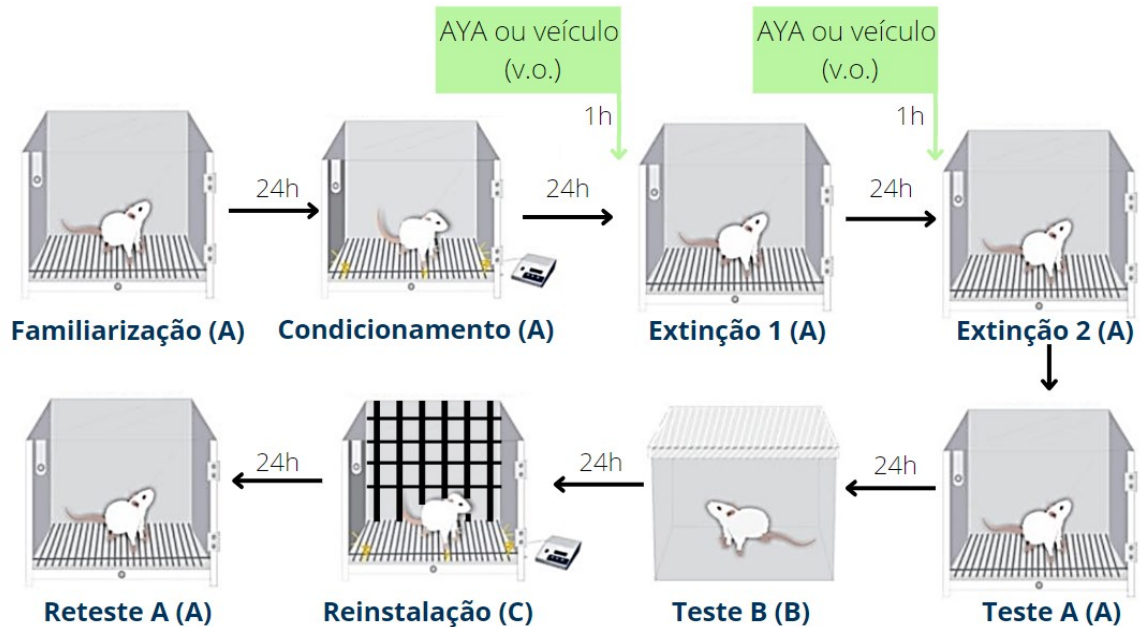


Figura 8: A imagem ilustra o protocolo do experimento contendo uma administração de AYA antes de cada uma das duas sessões de extinção. A figura ilustra as etapas do protocolo utilizado, sendo que a letra contida entre parênteses designa o contexto utilizado em cada etapa. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

4.5.5 Experimento 5: Efeito de duas administrações de AYA sobre a extinção de uma memória aversiva contextual com vinte e um dias de idade

Para avaliar se o efeito da administração repetida de AYA se mantém no caso de memórias aversivas remotas, neste experimento, vinte ratos passaram pelo mesmo protocolo do experimento 4, apenas diferindo no intervalo entre o condicionamento e a primeira sessão de extinção [precedida de tratamento com AYA (0,3 mg/Kg em teor de DMT) ou veículo], sendo este intervalo de vinte e um dias, conforme ilustrado na figura 9.

Figura 9: Protocolo referente ao experimento 5

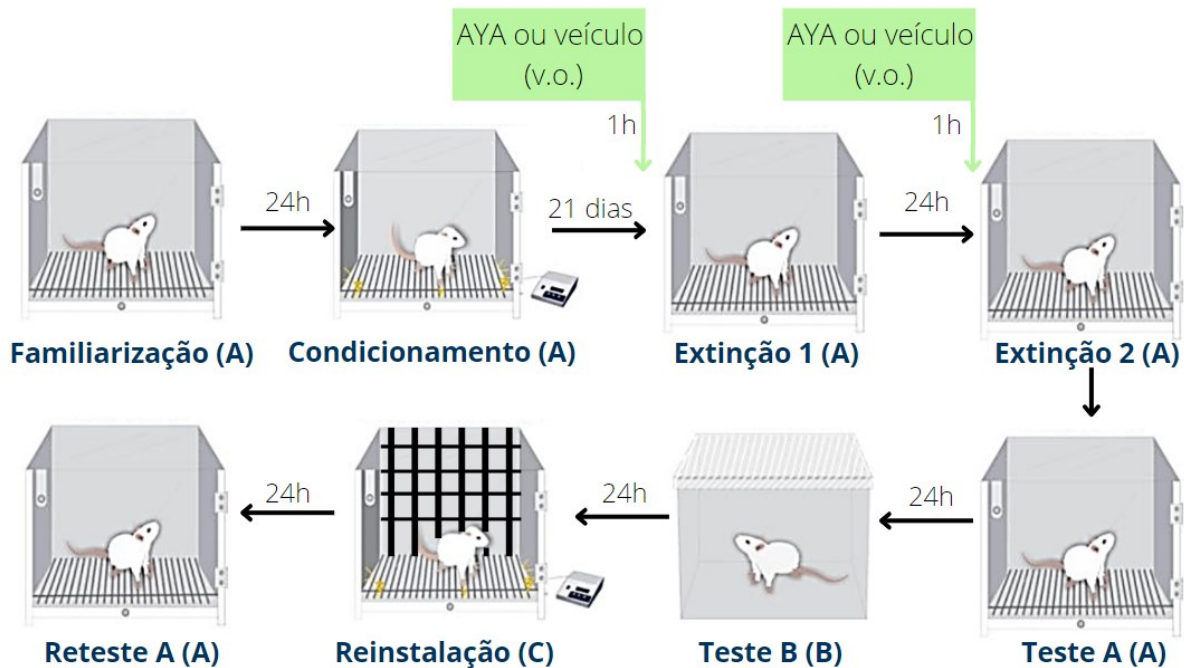


Figura 9: A imagem ilustra o protocolo de condicionamento aversivo contextual para avaliação do tratamento com administrações repetidas de AYA sobre a extinção de memórias remotas. A figura ilustra as etapas do protocolo utilizado, sendo que a letra contida entre parênteses designa o contexto utilizado em cada etapa. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi realizado por meio do *software GPower 3.1* (valor de alfa de 0,05; poder estatístico de 0,95; tamanho de efeito de 0,8). O número amostral foi de pelo menos 8 animais por grupo. Inicialmente, o número de animais por grupo foi designado igualmente, porém por algumas perdas durante os experimentos (por exemplo, animais que caíram do LCE ou que não condicionaram), alguns grupos tornaram-se desiguais.

Os resultados obtidos estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Inicialmente, os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene* comprovaram que a distribuição dos dados foi normal e homogênea, respectivamente, com valor de $p >$

0,05, não sendo necessária a transformação dos dados. Posteriormente, foi aplicada a análise paramétrica ANOVA (análise de variância) de uma via com medidas repetidas, onde a variável independente foi o tratamento e as variáveis dependentes foram os parâmetros avaliados no LCE ou os níveis médios de congelamento, quantificados em cada teste. Observando diferença significativa na ANOVA ($p < 0,05$), seguimos para avaliação do tamanho do efeito de cada variável independente (eta quadrado; sendo $\eta_p^2 > 0,14$ considerado um grande efeito) e para o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* ($p < 0,05$ considerado efeito significativo). Para as análises estatísticas, o programa utilizado foi o *TIBCO Statistica*® 13.5 e para a construção dos gráficos o *GraphPad Prism* 8.02.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1A: A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE AYA UMA HORA ANTES DO TESTE NÃO ALTEROU COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE

A porcentagem de tempo nos braços abertos avaliada no LCE (figuras 10B e E) não foi influenciada pelo tratamento [$F_{(3,43)} = 2,1$, $p = 0,12$; $\eta_p^2 = 0,12$] ou interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(3,43)} = 1,4$, $p = 0,26$; $\eta_p^2 = 0,09$].

O comportamento de avaliação de risco não foi influenciado pelo tratamento [$F_{(3,43)} = 3,8$, $p = 0,16$; $\eta_p^2 = 0,20$] ou interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(3,43)} = 0,9$, $p = 0,4$; $\eta_p^2 = 0,06$] (figuras 10C e F).

Para o parâmetro de entradas nos braços fechados, o tratamento não influenciou o comportamento [$F_{(3,43)} = 1,0$, $p = 0,39$; $\eta_p^2 = 0,06$] e não houve influência da interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(3,43)} = 1,1$, $p = 0,36$, $\eta_p^2 = 0,07$] (figuras 10D e G).

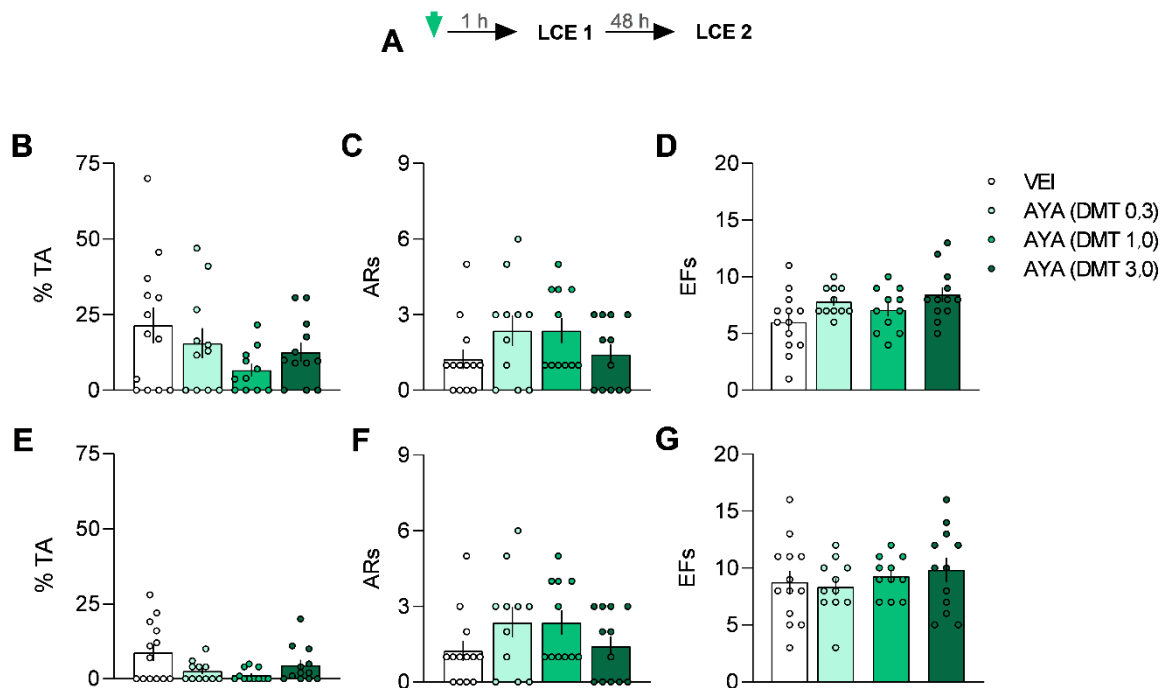


Figura 10: Experimento 1A: A administração oral de AYA uma hora antes do teste não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade. (A) Desenho experimental. A flecha verde indica o momento do tratamento. **(B) e (E)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos. **(C) e (F)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no número de avaliações de risco. **(D) e (G)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados. Os gráficos B, C e D são referentes ao teste (LCE 1) e os gráficos E, F e G são referentes ao reteste (LCE 2). Os gráficos apresentam os valores individuais e valores de média \pm E.P.M. (N = 11 a 13 por grupo). Siglas: LCE = Labirinto em cruz elevado; TA = tempo nos braços abertos; ARs = avaliações de risco; EFS = entradas nos braços fechados; VEI = veículo; AYA = ayahuasca; DMT = *N,N*-dimetiltriptamina.

5.2 EXPERIMENTO 1B: A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE AYA VINTE E QUATRO HORAS ANTES DO TESTE NÃO ALTEROU OS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE

Quando os animais foram testados vinte e quatro horas após o tratamento, não foram observadas diferenças significativas no tempo de permanência nos braços

abertos [$F_{(3,45)} = 0,77$, $p = 0,52$; $\eta_p^2 = 0,05$] e da interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(3,45)} = 0,27$, $p = 0,84$; $\eta_p^2 = 0,01$] (figuras 11B e E).

Nas avaliações de risco, não houve influência do tratamento [$F_{(3,45)} = 0,23$, $p = 0,85$; $\eta_p^2 = 0,01$] ou da interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(3,45)} = 0,29$, $p = 0,83$; $\eta_p^2 = 0,019$] no comportamento (figuras 11C e F).

Quanto ao parâmetro de entradas nos braços fechados, o tratamento [$F_{(3,45)} = 0,94$, $p = 0,43$; $\eta_p^2 = 0,06$] e a interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(3,45)} = 1,0$, $p = 0,40$; $\eta_p^2 = 0,63$] não influenciaram o comportamento (figuras 11D e G).

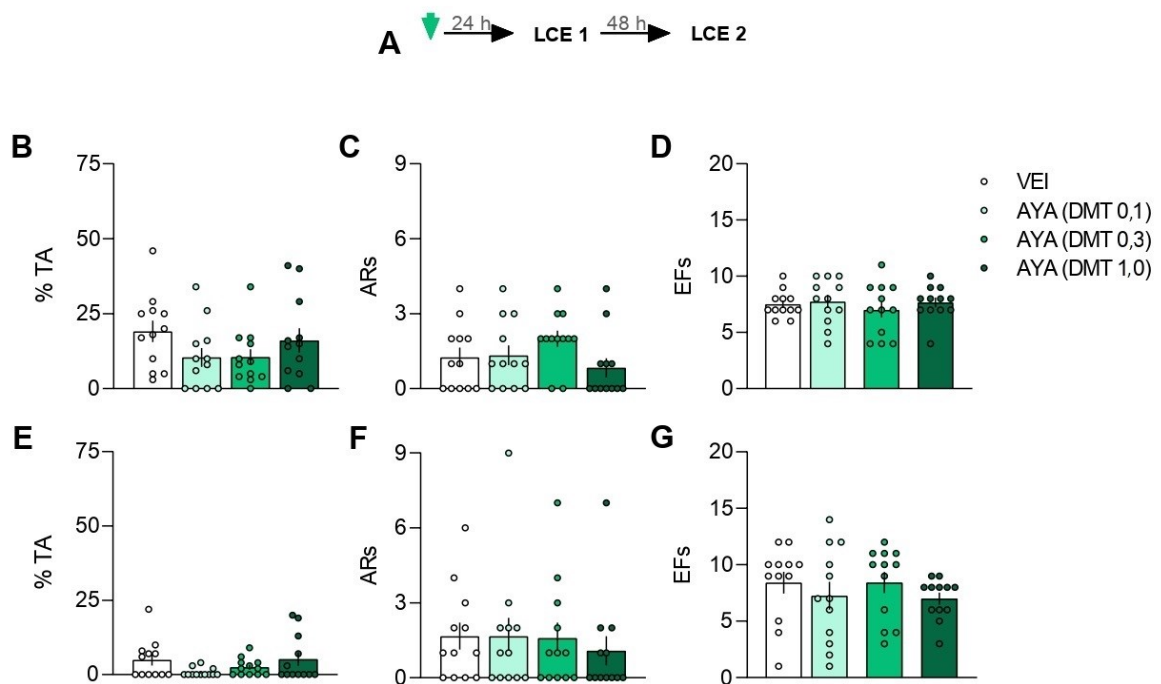


Figura 11: Experimento 1B: A administração oral de AYA vinte e quatro horas antes do teste não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade. (A) Desenho experimental. A flecha verde indica o momento do tratamento. **(B)** e **(E)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos. **(C)** e **(F)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no número de avaliações de risco. **(D)** e **(G)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados. Os gráficos B, C e D são referentes ao teste (LCE 1) e os gráficos E, F e G são referentes ao reteste (LCE 2). Os gráficos apresentam os valores individuais e valores de média \pm E.P.M. (N = 12 por grupo). Siglas: LCE = labirinto em cruz elevado; TA = tempo nos braços abertos; ARs = avaliações de risco; EFs = entradas nos braços fechados; VEI = veículo; AYA = ayahuasca; DMT = *N,N*-dimetiltriptamina.

5.3 EXPERIMENTO 2: A ADMINISTRAÇÃO DE UMA ÚNICA DOSE DE AYA NÃO POTENCIALIZOU A RETENÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL RECENTE

Durante a sessão de extinção, o tratamento [$F_{(1,19)} = 9,5$, $p = 0,006$; $\eta_p^2 = 0,33$] e a diferença entre blocos [$F_{(4,76)} = 25,8$, $p = 0,00001$; $\eta_p^2 = 0,58$] mas não a interação desses fatores [$F_{(4,56)} = 0,68$, $p = 0,61$; $\eta_p^2 = 0,03$] influenciou o tempo de congelamento dos animais. Como demonstrado na figura 12B, quando aplicado o teste *post hoc* desprotegido, tanto o grupo veículo quanto o grupo AYA apresentaram redução dos valores de congelamento do terceiro ao quinto bloco da sessão de extinção, em relação ao primeiro bloco ($p \leq 0,05$). O grupo AYA apresentou maior redução no comportamento de congelamento durante o quarto bloco da sessão de extinção ($p \leq 0,03$).

Já no Teste A, Teste B e Reteste A, a repetição do teste [$F_{(2,38)} = 120,6$, $p = 0,00001$; $\eta_p^2 = 0,86$] mas não o tratamento [$F_{(1,19)} = 1,1$, $p = 0,30$; $\eta_p^2 = 0,06$] ou a interação entre eles [$F_{(2,38)} = 1,2$, $p = 0,32$; $\eta_p^2 = 0,06$] influenciou o tempo de congelamento. O grupo tratado com AYA apresentou valores de congelamento similares ao grupo controle nestes testes ($p \geq 0,29$) demonstrado na figura 12C.

O tempo de congelamento durante os 3 primeiros minutos da sessão de extinção (figura 12B) e durante os 3 minutos de duração do Teste A (figura 12C) foram comparados para estimar as alterações durante e entre as sessões. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(1,19)} = 5,1$, $p = 0,04$; $\eta_p^2 = 0,21$] mas não da repetição [$F_{(1,19)} = 1,7$, $p = 0,21$; $\eta_p^2 = 0,08$] ou da interação entre estes fatores [$F_{(1,19)} = 1,7$, $p = 0,21$; $\eta_p^2 = 0,08$]. Conforme demonstrado na figura 12D, quando aplicado o teste *post hoc* desprotegido, os animais tratados com AYA diferem dos tratados com veículo no início da extinção ($p = 0,04$), e os controles tendem a reduzir seus valores de congelamento durante o Teste A, em comparação com o início da extinção ($p = 0,08$).

Estes resultados sugerem que uma única administração de AYA é capaz de reduzir a expressão do comportamento de congelamento dentro da sessão de extinção, apesar de não potencializar a retenção da extinção da memória aversiva contextual.

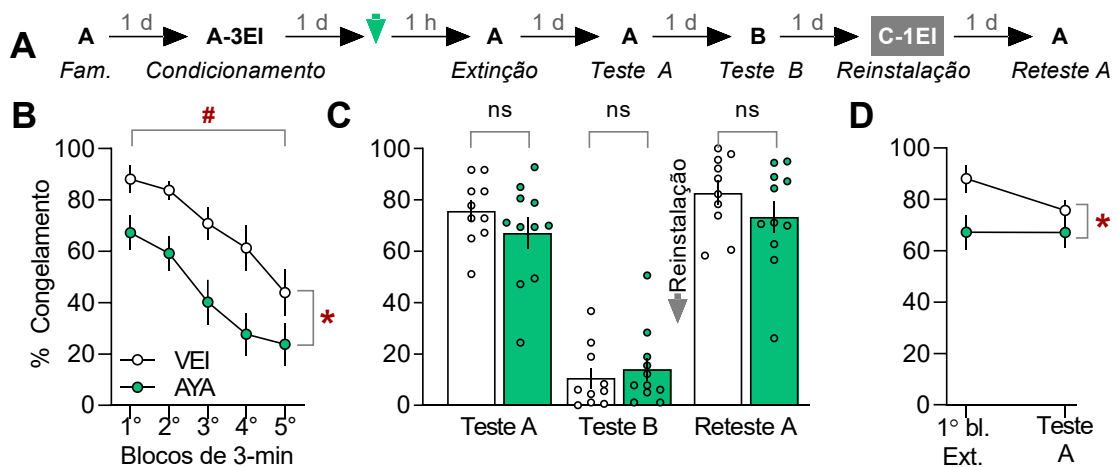


Figura 12: Experimento 2: Uma administração de AYA (0,3 mg/Kg de DMT, via oral) não foi capaz de potencializar a retenção da extinção de memórias aversivas contextuais. (A) Desenho experimental. A flecha verde indica o momento do tratamento. **(B)** Os grupos VEI e AYA reduziram gradualmente a expressão do comportamento de congelamento durante a sessão de extinção. O grupo tratado com AYA apresentou tempo de congelamento significativamente menor que o grupo controle no quarto bloco da sessão de extinção. **(C)** O grupo tratado com AYA apresentou níveis de congelamento similares ao grupo controle no Teste A, Teste B e Reteste A. **(D)** O grupo tratado com AYA apresentou nível de congelamento significativamente menor que o grupo controle no início da sessão de extinção e o grupo controle exibiu tendência a reduzir o nível de congelamento durante do Teste A, em relação ao início da sessão de extinção. Os valores estão expressos como unidades individuais e média \pm E.P.M. (N = 11/grupo). Foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* desprotegido. # = $p \leq 0,05$ em comparação ao primeiro bloco da respectiva sessão de extinção; * = $p \leq 0,05$ em comparação ao respectivo grupo controle. Siglas: Fam = familiarização; Els = estímulos incondicionados; VEI = veículo; AYA = ayahuasca.

5.4 EXPERIMENTO 3: O TRATAMENTO COM AYA NÃO INFLUENCIA PARÂMETROS RELACIONADOS À ANSIEDADE E ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM ANIMAIS CONDICIONADOS

No parâmetro de tempo de permanência nos braços abertos, não houve influência do tratamento [$F_{(1,17)} = 0,2$, $p = 0,62$; $\eta_p^2 = 0,01$] ou da interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(1,17)} = 0,2$, $p = 0,68$; $\eta_p^2 = 0,009$] sobre o comportamento (figuras 13B e E).

O comportamento de avaliação de risco não foi influenciado pelo tratamento [$F_{(1,17)} = 0,01$, $p = 0,97$; $\eta_p^2 = 0,01$], ou pela interação entre tratamento e repetição do teste [$F_{(1,17)} = 0,5$, $p = 0,5$; $\eta_p^2 = 0,03$] (figuras 13C e F).

O parâmetro de entradas nos braços fechados não foi influenciado pelo tratamento [$F_{(1,17)} = 2,1$, $p = 0,2$; $\eta_p^2 = 0,10$] ou pela interação entre tratamento e repetição [$F_{(1,17)} = 0,2$, $p = 0,7$; $\eta_p^2 = 0,009$] (figuras 13D e G).

Como demonstrado nas figuras 13B, C e D, os grupos tratados com AYA e veículo apresentaram valores similares em todos os parâmetros ($p \geq 0,12$). Estes resultados sugerem que o tratamento com AYA não é capaz de produzir alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade e comportamentos gerais de atividade exploratória em animais previamente condicionados, demonstrando que a redução do comportamento de congelamento observada durante a sessão de extinção no Experimento 2 (figura 12B) não está relacionado a um efeito da AYA sobre a atividade locomotora dos animais.

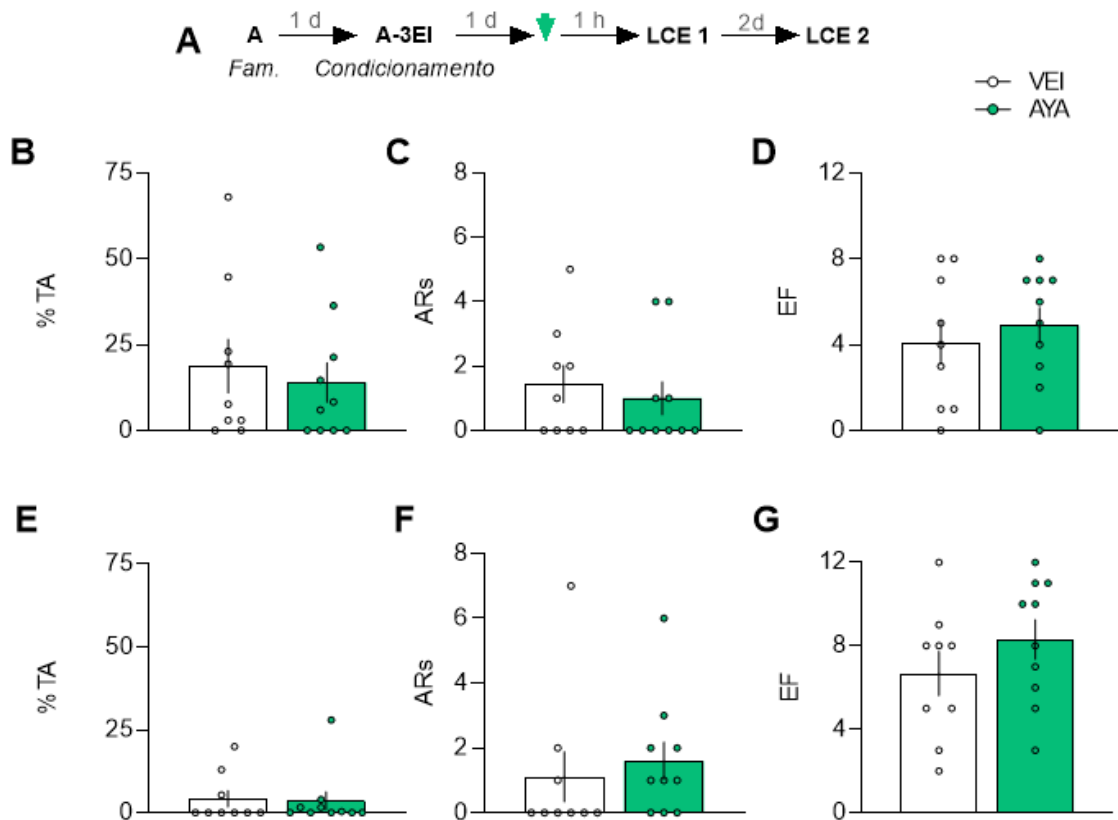


Figura 13: Experimento 3: O tratamento com AYA (0,3 mg/Kg de DMT, via oral) não influencia parâmetros relacionados à ansiedade e atividade exploratória em animais condicionados. (A) Desenho experimental. A flecha verde indica o momento do tratamento. **(B)** e **(E)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos. **(C)** e **(F)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no número de avaliações de risco. **(D)** e **(G)** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados. Os gráficos B, C e D são referentes ao teste (LCE 1) e os gráficos E, F e G são referentes ao reteste (LCE 2). Os gráficos apresentam os valores individuais e valores de média \pm E.P.M. (N = 9-10/grupo). Siglas: Fam = familiarização; EIs = estímulos incondicionados; LCE = labirinto em cruz elevado; TA = tempo nos braços abertos; ARs = avaliações de risco; EFs = entradas nos braços fechados; VEI = veículo; AYA = ayahuasca.

5.5 EXPERIMENTO 4: A ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE AYA FACILITOU A RETENÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL RECENTE

Durante a primeira sessão de extinção, o tratamento [$F_{(1,20)} = 13,6, p = 0,0008; \eta_p^2 = 0,44$] e a diferença entre blocos [$F_{(4,80)} = 77,7, p = 0,00001; \eta_p^2 = 0,80$], mas não a interação entre estes fatores [$F_{(4,80)} = 1,6, p = 0,18; \eta_p^2 = 0,07$] influenciaram significativamente o tempo de congelamento dos animais. Como demonstrado na figura 14B, quando aplicado o teste *post hoc* desprotegido observamos que ambos os grupos apresentaram redução da expressão do congelamento a partir do segundo bloco, até o quinto bloco, em relação ao primeiro ($p \leq 0,008$); o grupo AYA apresentou maior redução do comportamento de congelamento nos quatro primeiros blocos em comparação com o grupo veículo ($p \leq 0,04$).

Durante a segunda sessão de extinção, o tratamento [$F_{(1,20)} = 68,9, p = 0,00001; \eta_p^2 = 0,78$], a diferença entre os blocos [$F_{(4,80)} = 91,2, p = 0,00001; \eta_p^2 = 0,82$] e a interação entre estes dois fatores [$F_{(4,80)} = 15,1, p = 0,00001; \eta_p^2 = 0,43$] influenciaram significativamente o tempo de congelamento. Como demonstrado na figura 14C, tanto o grupo AYA quanto o grupo veículo apresentaram valores menores de congelamento a partir do segundo bloco, que se manteve até o quinto bloco, ambos em relação ao primeiro bloco ($p \leq 0,0002$). As maiores diferenças encontradas entre o grupo AYA e controle se referem aos primeiros quatro blocos da sessão de extinção ($p \leq 0,0002$).

Durante o Teste A, Teste B e Reteste A, houve influência do tratamento, [$F_{(1,20)} = 13,8, p = 0,002; \eta_p^2 = 0,41$], da repetição dos testes [$F_{(4,80)} = 160,5, p = 0,00001; \eta_p^2 = 0,89$] e da interação entre estes fatores [$F_{(4,80)} = 8,4, p = 0,0009; \eta_p^2 = 0,29$] no tempo de congelamento dos animais. O grupo tratado com AYA apresentou valores de congelamento menores que o grupo controle durante o Teste A ($p = 0,0002$; figura 14D) mas não durante o Teste B ($p = 0,26$; figura 14D) ou Reteste A ($p = 0,07$; figura 14D).

O tempo de congelamento durante o primeiro bloco da primeira sessão de extinção (figura 14B), primeiro bloco da segunda sessão de extinção (figura 14C), e durante o Teste A (figura 14D) foram comparados para estimar as mudanças dentro e entre as sessões. A ANOVA de medidas repetidas evidenciou efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(1,20)} = 55,0, p = 0,00001; \eta_p^2 = 0,73$], da repetição dos testes [$F_{(4,80)} = 46,9, p = 0,00001; \eta_p^2 = 0,70$] e da interação entre estes fatores [$F_{(4,80)} = 4,3, p = 0,02; \eta_p^2 = 0,18$]. Conforme demonstrado na figura 14E, o grupo que recebeu AYA comportou-se de maneira diferente que o grupo que recebeu veículo em todos

os pontos analisados ($p \leq 0,0002$). Os dois grupos apresentaram redução da expressão do congelamento no Teste A e no primeiro bloco da segunda sessão de extinção, em relação ao primeiro bloco da primeira sessão de extinção ($p \leq 0,03$).

Estes resultados sugerem que a administração repetida de AYA é capaz de reduzir a expressão do comportamento de congelamento entre as sessões, facilitando a extinção de memórias aversivas contextuais.

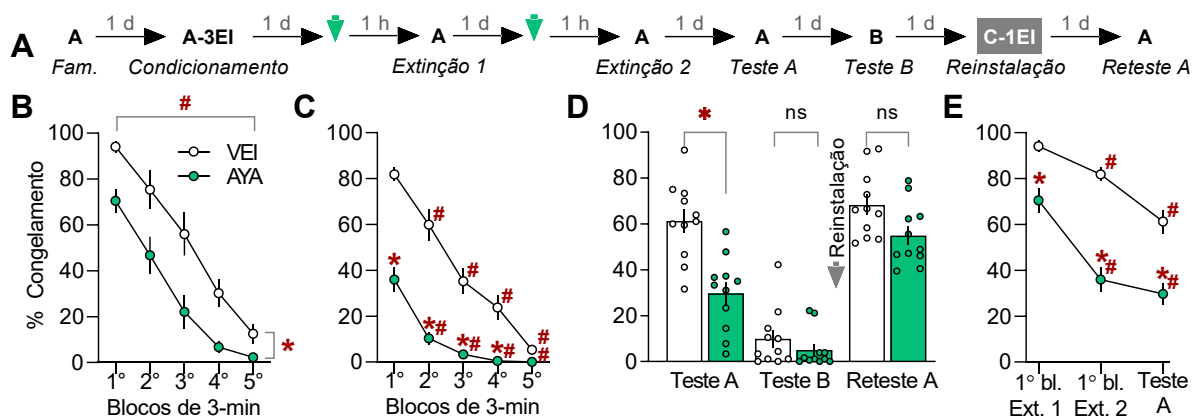


Figura 14. Experimento 4. Efeito da administração repetida de AYA (0,3 mg/Kg, via oral) na extinção de memórias aversivas contextuais em ratos. (A) Desenho experimental. A flecha verde indica o momento do tratamento. **(B)** e **(C)** Os grupos VEI e AYA apresentaram redução gradual da expressão do comportamento de congelamento durante as duas sessões de extinção, porém, o grupo tratado com AYA apresentou redução significativamente maior que o grupo VEI. **(D)** O grupo tratado com AYA apresentou valores de congelamento menores que o grupo VEI no Teste A, sugerindo aumento da capacidade de retenção da extinção da expressão deste comportamento relacionado ao medo; Não houve diferença no comportamento de congelamento expresso entre os grupos durante o Teste B e o Reteste A. **(E)** O grupo tratado com AYA expressou congelamento significativamente menor que o grupo tratado com VEI durante o início da sessão de extinção 1, início da sessão de extinção 2 e Teste A. Ambos os grupos apresentaram valores reduzidos de congelamento durante o Teste A, quando comparado ao início das sessões de extinção 1 e 2. Os valores estão expressos como unidades individuais e média \pm E.P.M. (N = 11/grupo). Foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. # = $p \leq 0,05$ em comparação ao primeiro bloco da respectiva sessão de extinção; * = $p \leq 0,05$ em comparação ao respectivo grupo controle. Siglas: Fam = familiarização; Els = estímulos incondicionados; VEI = veículo; AYA = ayahuasca.

5.6 EXPERIMENTO 5: A ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE AYA FACILITOU A RETENÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL REMOTA

Durante a primeira sessão de extinção, o tratamento oral [$F_{(1,18)} = 106,1$, $p = 0,000001$; $\eta_p^2 = 0,85$], a diferença entre blocos [$F_{(4,72)} = 187,2$, $p = 0,000001$; $\eta_p^2 = 0,91$] e a interação entre estes fatores [$F_{(4,72)} = 8,9$, $p = 0,000001$; $\eta_p^2 = 0,33$] influenciou o tempo de congelamento, como demonstrado na figura 15B. Ambos os grupos apresentaram valores de congelamento significativamente menores do segundo ao quinto bloco da sessão de extinção, em relação ao primeiro ($p \leq 0,0002$). O grupo tratado com AYA apresentou redução significativa do congelamento nos primeiros quatro blocos, em relação ao grupo controle ($p \leq 0,0002$).

Durante a segunda sessão de extinção, o tratamento oral [$F_{(1,18)} = 33,4$, $p = 0,000002$; $\eta_p^2 = 0,65$], a diferença entre blocos [$F_{(4,72)} = 54,3$, $p = 0,000001$; $\eta_p^2 = 0,75$] e a interação entre estes fatores [$F_{(4,72)} = 11,1$, $p = 0,000001$; $\eta_p^2 = 0,38$] influenciou o tempo de congelamento dos animais, como demonstrado na figura 15C. O grupo controle apresentou valores de congelamento significativamente menores do segundo ao quinto bloco da sessão de extinção, em comparação com o primeiro ($p \leq 0,0002$) e o grupo tratado com AYA apresentou valores significativamente menores de congelamento do terceiro ao quinto bloco da sessão de extinção, em relação ao primeiro ($p \leq 0,02$). O grupo tratado com AYA apresentou redução significativa do congelamento nos primeiros dois blocos, em relação ao grupo controle ($p \leq 0,002$).

Durante o Teste A, Teste B e Reteste A, o tratamento [$F_{(1,18)} = 18,4$, $p = 0,0004$; $\eta_p^2 = 0,50$], a repetição do teste [$F_{(4,36)} = 188,2$, $p = 0,000001$; $\eta_p^2 = 0,91$] e a interação entre estes fatores [$F_{(4,36)} = 12,0$, $p = 0,0001$; $\eta_p^2 = 0,40$] influenciaram o tempo de congelamento dos animais. O grupo tratado com AYA apresentou valores de congelamento menores que o grupo controle durante o Teste A ($p = 0,0002$; figura 15D) mas não durante o teste B ($p = 0,99$; figura 15D) e o Reteste A ($p = 0,32$; figura 15D).

O tempo de congelamento expresso no primeiro bloco da sessão de extinção 1 (figura 15B), primeiro bloco da sessão de extinção 2 (figura 15C), e durante o Teste A (figura 15D) foram comparados para estimar as mudanças dentro e entre as sessões.

Houve efeito significativo do tratamento [$F_{(1,18)} = 142,9$, $p = 0,000001$; $\eta_p^2 = 0,89$], da repetição do teste [$F_{(2,36)} = 107,5$, $p = 0,00001$; $\eta_p^2 = 0,86$] e da interação entre estes fatores [$F_{(2,36)} = 3,5$, $p = 0,04$; $\eta_p^2 = 0,16$]. Como demonstrado na figura 15E, o grupo tratado com AYA expressou comportamento de congelamento significativamente diferente do grupo controle em todos os casos ($p \leq 0,0002$). Ambos os grupos apresentaram valores reduzidos de congelamento no Teste A e no início da sessão de extinção 2, em relação ao início da sessão de extinção 1 ($p \leq 0,0002$).

Estes resultados sugerem que o tratamento repetido com AYA é capaz de reduzir a expressão do comportamento de congelamento durante as sessões de extinção, bem como aumentar a retenção da extinção da expressão de comportamentos relacionados ao medo, mesmo quando se trata de memórias aversivas remotas.

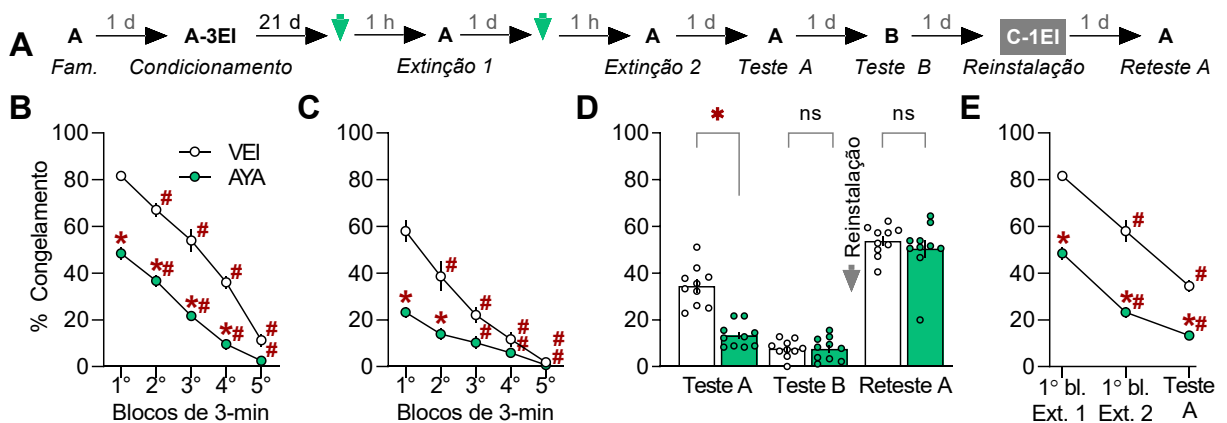


Figura 15. Experimento 5. Efeito da administração repetida de AYA (0,3 mg/Kg, via oral) na extinção de memórias aversivas após vinte e um dias do condicionamento aversivo contextual em ratos. (A) Desenho experimental. A flecha verde indica o momento do tratamento. **(B)** e **(C)** Os grupos VEI e AYA apresentaram redução gradual da expressão do comportamento de congelamento durante as duas sessões de extinção, porém, o grupo tratado com AYA apresentou redução significativamente maior que o grupo VEI. **(D)** O grupo tratado com AYA apresentou valores de congelamento menores que o grupo VEI no Teste A, sugerindo aumento da capacidade de extinção da expressão deste comportamento relacionado ao medo; Não houve diferença no comportamento de congelamento expresso entre os grupos durante o Teste B e o Reteste A. **(E)** O grupo tratado com AYA expressou congelamento significativamente menor que o grupo tratado com VEI durante o início da sessão de extinção 1, início da sessão de extinção 2 e Teste A. Ambos os grupos apresentaram valores reduzidos de congelamento durante o Teste A, quando comparado ao início das sessões de extinção

1 e 2. Os valores estão expressos como unidades individuais e média \pm E.P.M. (N = 10/grupo). Foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. # = $p \leq 0.05$ em comparação ao primeiro bloco da respectiva sessão de extinção; * = $p \leq 0.05$ em comparação ao respectivo grupo controle. Siglas: Fam = familiarização; Els = estímulos incondicionados; VEI = veículo; AYA = ayahuasca.

6 DISCUSSÃO

Uma única administração oral de AYA (contendo teor de DMT entre 0,1 e 1,0 mg/Kg) uma ou vinte e quatro horas antes do teste do LCE (LCE 1) não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade (%TA e ARs) e exploração (EF). Por outro lado, houve redução da %TA durante a segunda exposição (LCE 2), o que indica que a experiência prévia neste aparato foi lembrada (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005), mas se manteve inalterada entre os grupos tratados com AYA, ou seja, os animais que receberam AYA não tiveram a capacidade de adquirir e consolidar a memória de exploração do LCE prejudicada. Como as três doses testadas não influenciaram parâmetros de ansiedade e exploração, selecionamos a dose intermediária de AYA (0,3 mg/Kg em teor de DMT) para avaliar os efeitos sobre a extinção da expressão de memórias aversivas contextuais recentes e remotas.

Em relação aos efeitos da AYA sobre comportamentos relacionados à ansiedade, os resultados obtidos no experimento 1A corroboram o relatado por Daneluz e colaboradores (2022), onde uma administração de AYA em sua forma liofilizada, (0,24 mg/Kg em teor de DMT, v.o.) 20 minutos antes da exposição ao LCE não alterou a %TA e EF, avaliados em ratos Wistar machos. A dose utilizada no experimento de Daneluz e colaboradores (2022) se assemelha à dose escolhida para prosseguir com os experimentos neste trabalho (0,3 mg/Kg em teor de DMT).

Em ratas Wistar, uma administração de AYA em doses consideradas altas (4,5 ou 9,0 mg/Kg em teor de DMT) não alterou parâmetros relacionados à ansiedade, porém, reduziu a locomoção/atividade exploratória, avaliados no LCE e teste do campo aberto (este, que avalia atividade locomotora e parâmetros relacionados à ansiedade) uma hora após o tratamento (PIC-TAYLOR *et. al.*, 2015). Outro trabalho realizou a avaliação dos efeitos do tratamento oral com AYA (0,07; 0,14 e 0,28 mg/Kg em teor de DMT) durante 40 minutos no teste do campo aberto. Foi relatado um aumento do número de cruzamentos e do tempo de permanência no centro do aparato (comportamentos relacionados associados com redução da ansiedade) apenas nos 10 minutos finais do teste e nos ratos Wistar tratados com a maior dose de AYA testada, encorajando a realização de estudos futuros com intervalo maior entre

tratamento e teste (FARIAS *et. al.*, 2022), como no caso deste trabalho, onde os testes foram realizados uma hora após o tratamento.

O tratamento crônico com AYA foi avaliado por Favaro e colaboradores (2015), que realizaram uma administração de AYA (120, 240 ou 480 mg/Kg do liofilizado total, contendo 0,26 mg/mL de DMT) por dia, durante 30 dias. Dois dias após o último tratamento, os ratos Wistar foram testados no LCE, sendo que nenhuma das doses testadas produziram alterações comportamentais significativas. Em outro estudo, realizado por Daldegan-Bueno e colaboradores (2022), os ratos Wistar foram tratados durante 30 dias com AYA (120, 240, 480 ou 3600 mg/Kg do liofilizado total, sendo 1,25 mg/mL de DMT) e testados no teste do campo aberto durante 20 minutos, uma hora após a última administração de AYA. Os resultados encontrados sugerem que não houve alteração comportamental relacionada a um efeito ansiolítico nas doses de AYA testadas, porém, as menores doses foram relacionadas a um efeito estimulante, enquanto as doses mais altas foram relacionadas a redução da atividade dos ratos, provavelmente devido a efeitos adversos relacionados, encorajando a realização de estudos com doses menores (DALDEGAN-BUENO *et. al.*, 2022).

Outros trabalhos avaliaram a administração de componentes da AYA em sua forma isolada. Quando a DMT (10 mg/Kg, i.p.) foi injetada em ratos Sprague-Dawley, testados no LCE uma hora após administração, o tratamento não alterou a atividade exploratória, mas reduziu a %TA, havendo aumento do comportamento relacionado à ansiedade (CAMERON *et. al.*, 2018). Já a administração intermitente de DMT (1,0 mg/Kg, i.p.) uma vez a cada três dias, durante 2 meses, não alterou os parâmetros relacionados à ansiedade no LCE e reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (efeito relacionado à redução de comportamentos associados à depressão) (CAMERON *et. al.*, 2019).

O efeito da harmalina isolada sobre parâmetros de ansiedade no LCE em camundongos foi avaliado por Hilber e colaboradores (2005), cujos resultados demonstraram que, nas doses de 5 a 10 mg/kg, i.p., o tratamento produz comportamentos relacionados a um aumento da ansiedade, enquanto doses maiores (20 mg/Kg) se relacionam à redução da ansiedade. Outro trabalho investigou o potencial ansiolítico da harmalina em camundongos, utilizando o teste de

enterramento das esferas de vidro (que avalia comportamentos relacionados ao transtorno obsessivo-compulsivo), e reportou que os animais tratados com doses de 5 a 7,5 mg/Kg de harmalina enterraram um número significativamente maior de esferas que o grupo controle, fato que se relaciona a um efeito ansiogênico (WU *et. al.* 2009).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a administração oral de AYA só alteraria comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e parâmetros de atividade exploratória geral em uma faixa de dose maior do que a testada aqui. O teor de harmalina poderia ser um fator que explicaria os resultados potencialmente conflitantes, já que isso tem variado de estudo para estudo. No entanto, é apropriado ressaltar que administramos entre 0,4 e 3,9 mg/Kg de harmalina, uma faixa de dose que não alterou os parâmetros avaliados segundo os estudos supramencionados, logo, não causaria efeitos no experimento 1. Diante do exposto, seria necessária a padronização da dose de AYA com relação ao teor dos seus componentes, incluindo os principais alcalóides contidos, e não levando em consideração apenas a DMT, para permitir uma comparação entre os estudos com menos viés.

No experimento 2, os animais condicionados apresentaram redução no tempo de congelamento em relação ao grupo veículo a partir do terceiro bloco da sessão de extinção. Apesar disso, no teste A, realizado no dia seguinte, os grupos não apresentaram diferenças entre si, sugerindo que o aprendizado da extinção foi semelhante, sendo que a redução do comportamento de congelamento no grupo AYA pode estar associado com efeitos não-mnemônicos (como aumento da atividade exploratória). Ainda, uma sessão de extinção precedida de tratamento pode não ter sido suficiente para a devida aquisição e consolidação deste novo aprendizado. No mesmo experimento, observamos que não houve generalização do comportamento relacionado ao medo, avaliado no teste B e ocorreu a reinstalação da memória aversiva, avaliado no reteste A, conforme esperado para este tipo de protocolo, demonstrando que a AYA não interfere nestes processos.

Em ratos Sprague-Dawley, a administração aguda de DMT sintético (10 mg/Kg, i.p.) facilitou a extinção da expressão da memória aversiva relacionada ao condicionamento auditório, mas não contextual; ainda, quando administrada uma hora antes do condicionamento, a DMT aumenta o tempo de congelamento imediatamente

após o choque, mas não afeta a expressão de memórias aversivas, tanto no condicionamento ao som quanto ao contexto, avaliada no teste (CAMERON *et. al.*, 2018). Os protocolos utilizados, os animais, a dose e a forma de administração da DMT diferem entre o estudo realizado por Cameron e colaboradores (2018) e o realizado neste trabalho, apesar disso, uma única administração de AYA ou DMT não parece alterar o processo de extinção de memórias aversivas contextuais.

Em sequência, para avaliar se a redução do comportamento de congelamento do grupo tratado com AYA durante a sessão de extinção (experimento 2) estaria associada com alterações em comportamentos relacionados à ansiedade ou atividade locomotora dos animais, no experimento 3, os ratos foram condicionados, tratados com a mesma dose (0,3 mg/Kg em teor de DMT) de AYA e testados no LCE.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros relacionados à ansiedade (%TA e ARs) e exploração (EF) avaliados, sugerindo que a redução do comportamento de congelamento observada durante a sessão de extinção no experimento 2 não ocorreu devido a um aumento da atividade locomotora dos ratos e pode ter ocorrido pela supressão da expressão do medo temporária, que não foi mantida no teste A. Como já mencionado, uma sessão de 15 minutos de exposição ao contexto condicionado parece ter induzido apenas parcialmente a aquisição da extinção da expressão da memória aversiva nos animais do grupo controle. Ainda, de maneira similar ao experimento 1, na segunda exposição ao teste (LCE 2) os ratos exploraram menos os braços abertos do aparato, sugerindo que o tratamento com AYA não prejudica a memória espacial formada na primeira exposição ao teste (LCE 1) (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005) em animais condicionados.

A ausência de diferenças em relação aos comportamentos avaliados no LCE em animais condicionados corrobora o trabalho realizado por Korte e Boer (2003), onde animais condicionados com 1 choque leve (0,6 mA, por 3 segundos) e posteriormente submetidos ao LCE passam a apresentar redução significativa da exploração dos braços abertos em uma janela temporal de até 90 minutos, sendo que 160 minutos após o choque, a exploração se iguala ao grupo não estressado (KORTE; BOER, 2003). Como no nosso experimento os ratos foram testados um dia após o condicionamento, os parâmetros do LCE estariam alterados apenas em função de um possível efeito do tratamento, que não foi observado. Assim, para que a AYA atue

facilitando a extinção do medo de forma que esta extinção permaneça retida na avaliação do congelamento realizada no teste A, pode ser necessária a exposição repetida dos animais ao contexto condicionado sob efeito do tratamento.

No experimento 4, os ratos foram submetidos a duas sessões de extinção, cada uma precedida de tratamento com AYA (0,3 mg/Kg em teor de DMT) ou veículo. Na primeira sessão de extinção, a redução da expressão do comportamento de congelamento dos animais foi similar ao experimento 2, porém, na segunda sessão de extinção seguida de tratamento, ambos grupos iniciaram expressando um nível de congelamento menor que o apresentado no início da primeira sessão, demonstrando que a alteração comportamental não se tratou apenas da apresentada durante a sessão de extinção 1, sendo ela aprendida e consolidada pelos ratos. Ainda, na extinção 2, o nível de congelamento expresso pelo grupo tratado com AYA foi significativamente menor que o do grupo controle, do primeiro ao quarto bloco da sessão, demonstrando seu potencial de facilitação do processo de extinção. Ao final da extinção 2, os grupos apresentaram nível de congelamento similar, o que era esperado, uma vez que a exposição prolongada ao contexto deve promover a extinção da expressão da memória aversiva por si só, independente do tratamento. No entanto, o grupo tratado com AYA apresentou aceleração do processo de extinção, em comparação com o grupo controle, como esperado para drogas como a DMT, que atuam como agonistas serotoninérgicos (CAMERON *et. al.*, 2019).

No Teste A referente ao experimento 4, os animais que receberam AYA apresentaram níveis de congelamento menores que os que receberam veículo, demonstrando que houve a devida aquisição e consolidação da extinção, ou seja, quando dois tratamentos seguidos de extinção são associados, o efeito mnemônico persiste. A realização de novos estudos é necessária para entender o porquê isso acontece, podendo estar relacionado com a plasticidade sináptica, ativação de determinados subtipos de receptores serotoninérgicos e comunicação entre regiões encefálicas chave nestes processos. Avaliar as questões supracitadas, bem como a administração de AYA em diferentes momentos do delineamento experimental (como após a sessão de extinção e antes da reinstalação) poderão auxiliar na compreensão dos seus efeitos.

Ainda em relação ao experimento 4, quando comparamos o primeiro bloco da extinção 1 com o primeiro bloco da extinção 2 e o Teste A, observamos redução do comportamento de congelamento em relação ao início da extinção 1 em ambos os grupos, demonstrando que a extinção foi adquirida e consolidada, porém, o grupo tratado com AYA apresentou redução do comportamento de congelamento em relação ao grupo veículo em todos os pontos, demonstrando seu potencial de facilitar a extinção e atenuar a expressão de memórias aversivas contextuais. Neste experimento, também não foram observadas alterações comportamentais relacionadas à generalização de memórias aversivas, avaliado no Teste B, demonstrando que a AYA não altera a especificidade da memória aversiva. Além disso, ocorreu a devida reinstalação da expressão de memórias aversivas. Estes resultados referentes a generalização e reinstalação concordam com os encontrados por Daneluz e colaboradores (2022), também em ratos Wistar condicionados ao contexto, utilizando uma dose de AYA similar (0,24 mg/Kg em teor de DMT). Esta dose testada também não alterou parâmetros relacionados à ansiedade e exploração, avaliados no LCE, de maneira similar aos resultados encontrados neste trabalho (DANELUZ *et al.*, 2022).

O estudo realizado por Daneluz e colaboradores (2022) focou no processo de reconsolidação de memórias aversivas, o qual foi prejudicado após tratamento com AYA (0,24 mg/Kg em teor de DMT) administrada 20 minutos antes ou 3 horas após a sessão de reativação em ratos Wistar condicionados ao contexto, que demonstraram redução da expressão do comportamento de congelamento (DANELUZ *et al.*, 2022).

Os processos de reconsolidação e extinção, bem como os protocolos que os induzem, diferem. Enquanto a extinção é baseada em uma exposição longa ao contexto condicionado e objetiva formar uma nova memória inibitória, que suprime a memória aversiva original, a reconsolidação ocorre mediante exposição curta ao contexto condicionado, para que a evocação da memória permita sua reestabilização. A AYA parece apresentar potencial de facilitar a extinção e prejudicar a reconsolidação, ações envolvendo possíveis efeitos farmacológicos, áreas encefálicas e mecanismos de ação distintos, que culminam no mesmo efeito: a atenuação da expressão da memória de medo. Tais evidências instigam a realização de novos estudos que auxiliem a elucidar estes mecanismos, atualmente não

conhecidos. Poderia ser interessante estudar o efeito tratamento com AYA antes do condicionamento para avaliar sua influência na formação da memória aversiva.

Para avaliar o potencial da AYA na facilitação da extinção de memórias aversivas remotas, no experimento 5 os tratamentos seguidos de extinção ocorreram 21 dias após o condicionamento. Os resultados obtidos no experimento 5 foram muito parecidos com os do experimento 4, mostrando que o potencial da AYA na facilitação da extinção se mantém em memórias remotas. Durante as sessões de extinção seguidas de tratamento, o grupo tratado com AYA apresentou redução da expressão do congelamento significativamente maior que o grupo veículo, demonstrando sua possível capacidade de acelerar o processo. No Teste A, o grupo AYA apresentou níveis de congelamento significativamente menores em comparação com o grupo veículo, demonstrando que houve a devida facilitação da extinção e que a memória de extinção foi retida. De maneira similar aos experimentos anteriores, não houve generalização e reinstalação da memória aversiva, conforme esperado.

Memórias recentes e remotas são profundamente diferentes na natureza, sendo que as memórias remotas são menos precisas, mais resistentes à atenuação e armazenadas de maneira distinta no encéfalo (SILVA; GRÄFF, 2023). Do ponto de vista translacional, o estudo da modulação de memórias aversivas remotas é de extrema importância, porém, trabalhos acerca da extinção destas ainda são escassos, fato que ressalta a notabilidade do resultado obtido neste trabalho, que demonstra o potencial da AYA na facilitação e retenção da memória de extinção, até mesmo no caso de memórias remotas, que são menos propensas à modulação

Um estudo recente comparou o processo de extinção (sem intervenção farmacológica) de memórias recentes e remotas em ratos Wistar machos submetidos a condicionamento aversivo contextual (2 choques de 3 mA por minuto, durante 5 minutos). A extinção foi realizada no contexto condicionado utilizando 7 sessões de 5 minutos cada, espaçadas em 1 dia, iniciando no dia após o condicionamento ou 28 dias após o mesmo. A extinção da expressão do comportamento de congelamento ocorreu de maneira similar nos dois casos, assim como os resultados encontrados nos nossos experimentos (incluindo grupo veículo). Ainda, durante a última sessão de extinção dos animais testados um dia após o condicionamento, foi observado aumento da ativação do CPFm e redução da ativação da amígdala medial, diferente do

observado no grupo testado 28 dias após o condicionamento, onde os animais apresentaram redução da atividade da amígdala basolateral e de toda a região do hipocampo, avaliados por eletrofisiologia. Assim, apesar do processo de extinção ser bem-sucedido tanto em memórias recentes quanto remotas, os mecanismos encefálicos envolvidos diferem (CORREIA *et. al.*, 2023). Em camundongos, a extinção de memórias aversivas contextuais remotas está relacionada com o enfraquecimento das conexões entre neurônios do CPFm que estavam ativas durante a consolidação da memória (LEE *et. al.*, 2022).

A medida em que o tempo passa, as memórias aversivas utilizam de conexões e circuitarias distintas, parecem tornar-se menos dependentes de regiões envolvidas na sua formação, como amígdala e hipocampo, e mais distribuídas por regiões como córtex e tálamo, sendo a região do núcleo reuniens muito importante para sua modulação (ELSEY; KINDT, 2017; LIU *et. al.*, 2022; SILVA; GRÄFF, 2023).

Considerando os dados da literatura acerca de memórias aversivas contextuais remotas e os resultados obtidos no experimento 5 deste trabalho, podemos hipotetizar que a ação da AYA sobre a facilitação da aquisição e retenção de memórias envolve diferentes áreas encefálicas, uma vez que demonstra potencial similar na extinção de memórias recentes e remotas. Mais estudos acerca dos mecanismos pelos quais a AYA exerce seus efeitos sobre memórias remotas são necessários para compreensão dos efeitos comportamentais aqui observados.

Outras substâncias psicodélicas como a 2,5-dimethoxy-4-iodoanfetamina (DOI), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e psilocibina vêm sendo estudadas no âmbito da ansiedade e extinção de memórias aversivas. A administração de DOI parece reduzir comportamentos defensivos relacionados à ansiedade no LCE e labirinto em zero elevado além de reduzir a expressão de comportamentos relacionados ao medo no condicionamento auditório, sem alterar a aquisição da extinção; estes efeitos não ocorreram em camundongos *knockout* para 5-HT_{2A}, inferindo que a ação do DOI ocorre por meio deste receptor (PEDZICH *et. al.*, 2022), sendo relacionado ao aumento da plasticidade sináptica (REVENGA *et. al.*, 2021) e da expressão do fator de transcrição CREB (DESOUZA *et. al.*, 2021) no CPFm.

Em camundongos condicionados ao tom, a administração de MDMA (7.8 mg/Kg) foi capaz de aumentar significativamente a aquisição da extinção da expressão do comportamento de congelamento, efeito relacionado ao aumento da expressão da *cFos* e da neurotrofina BDNF na amígdala e no CPFm (YOUNG *et. al.*, 2015). Em ratos Long-Evans, condicionados ao contexto ou ao tom, a administração sistêmica de MDMA (de 1 e 10 mg/Kg) produziu redução significativa da expressão de comportamentos relacionado ao medo quando injetada imediatamente após a sessão de extinção (agindo na reconsolidação), mas não 30 minutos antes dela (HAKE *et. al.*, 2019). Apesar destes resultados distintos, o mecanismo molecular subjacente a ação do MDMA parece ser de fato o aumento da neurotrofina BDNF em regiões encefálicas envolvidas com o processo de extinção das memórias aversivas, principalmente o CPFm (SOTTILE *et. al.*, 2022).

Camundongos condicionados ao som e tratados com diferentes doses de psilocibina (0,1; 0,5 e 1,0 mg/Kg) apresentaram aceleração da aquisição da extinção, sendo que a extinção do comportamento de congelamento foi mais rápida quanto menor a dose testada; esta alteração comportamental parece estar relacionada ao aumento da neurogênese hipocampal (CATLOW *et. al.*, 2013).

Apesar dos avanços em relação ao estudo do potencial da AYA na extinção de memórias aversivas e ansiedade, os mecanismos moleculares pelos quais ela exerce seus efeitos ainda não estão completamente claros. Sabe-se que a DMT produz alterações estruturais e funcionais particularmente nos neurônios piramidais presentes no CPFm, como o aumento da liberação de glutamato, ativação de receptores AMPA e expressão de BDNF e mTOR, culminando em aumento da plasticidade sináptica e sinaptogênese (ALEKSANDROVA *et. al.*, 2021). Também foi evidenciado que a administração de DMT em camundongos melhora a capacidade de execução de tarefas relacionadas à memória de reconhecimento de objetos e ativa a zona subgranular do giro denteado do hipocampo, região onde ocorre a neurogênese na idade adulta (MORALES-GARCIA *et. al.*, 2020). Ainda, estes efeitos parecem estar relacionados não só a ativação de receptores serotoninérgicos, mas também de receptores sigma-1 (FONTANILLA *et. al.* 2009). Recentemente foi demonstrado que o efeito dos psicodélicos na plasticidade sináptica ocorre devido a ativação de receptores 5-HT_{2A} intracelulares na região do córtex IL (VARGAS *et. al.*, 2023). Os

mecanismos pelos quais a AYA (e DMT isolada) produzem seus efeitos na facilitação da extinção de memórias aversivas estão por ser esclarecidos.

7 CONCLUSÃO

O tratamento agudo e pós-agudo com uma faixa de doses de AYA contendo baixo teor de DMT não alterou comportamentos exploratórios e defensivos relacionados à ansiedade em ratos submetidos ao teste do LCE, além de não prejudicar a memória espacial obtida, avaliada na reexposição ao mesmo aparato. Animais previamente condicionados ao contexto e tratados com AYA também não demonstraram alterações nos parâmetros avaliados no teste do LCE. Em baixas doses, a AYA não parece interferir nos comportamentos relacionados à ansiedade e locomoção.

Uma única administração de AYA seguida de uma sessão de extinção foi capaz de acelerar a atenuação da expressão do comportamento de congelamento dos animais durante a sessão, mas essa informação não foi retida. Quando a administração de AYA associada à exposição à sessão de extinção foi repetida em dois dias consecutivos, houve facilitação e retenção do aprendizado de extinção de memórias aversivas, um dia e vinte e um dias após o condicionamento.

Os efeitos comportamentais da AYA sobre a extinção de memórias aversivas contextuais recentes e remotas reportados neste trabalho encorajam a realização de estudos futuros que permitam compreender os mecanismos subjacentes a este processo, incluindo as alterações moleculares e celulares, bem como as regiões encefálicas nas quais estão localizados os receptores responsáveis pela ação deste composto.

REFERÊNCIAS

ALEKSANDROVA, Lily R.; PHILLIPS, Anthony G. Neuroplasticity as a convergent mechanism of ketamine and classical psychedelics. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 42, n. 11, p. 929-942, nov. 2021. Elsevier BV.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5) 5. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2014.

ASOK, Arun; KANDEL, Eric R.; RAYMAN, Joseph B. The Neurobiology of Fear Generalization. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 11-21, 15 jan. 2019. Frontiers Media SA.

AWAD, Walaa; FERREIRA, Guillaume; MAROUN, Mouna. Dissociation of the Role of Infralimbic Cortex in Learning and Consolidation of Extinction of Recent and Remote Aversion Memory. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 2566-2575, 15 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

BADER, Michael. Inhibition of serotonin synthesis: a novel therapeutic paradigm. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 205, p. 107423, jan. 2020. Elsevier BV.

BARKER, J. M. et al. Bidirectional modulation of infralimbic dopamine D1 and D2 receptor activity regulates flexible reward seeking. **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 1-26, 2013. Frontiers Media SA.

BAUER, Elizabeth P. Serotonin in fear conditioning processes. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 277, p. 68-77, jan. 2015. Elsevier BV.

BERLOWITZ, Ilana; WALT, Heinrich; GHASARIAN, Christian; MENDIVE, Fernando; MARTIN-SOELCH, Chantal. Short-Term Treatment Effects of a Substance Use Disorder Therapy Involving Traditional Amazonian Medicine. **Journal Of Psychoactive Drugs**, [S.L.], v. 51, n. 4, p. 323-334, 1 maio 2019. Informa UK.

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **Journal Of Comparative And Physiological Psychology**, [S.L.], v. 68, n. 11, p. 129-135, maio 1969. American Psychological Association (APA).

BLANCHARD, D. Caroline; GRIEBEL, Guy; POBBE, Roger; BLANCHARD, Robert J. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 991-998, mar. 2011.

BORROTO-ESCUELA, D. O., The Role of Central Serotonin Neurons and 5-HT

Heteroreceptor Complexes in the Pathophysiology of Depression: a historical perspective and future prospects. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 1927, 2021.

BOUTON, Mark E.; MAREN, Stephen; MCNALLY, Gavan P., Behavioral and neurobiological mechanisms of pavlovian and instrumental extinction learning. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 2, p. 611-681, 2021.

BOUTON, Mark E. Context, attention, and the switch between habit and goal-direction in behavior. **Learning & Behavior**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 349-362, 28 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

BRITO-DA-COSTA, Andreia Machado; DIAS-DA-SILVA, Diana; GOMES, Nelson G. M.; DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge; MADUREIRA-CARVALHO, Áurea. Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ayahuasca Alkaloids N,N-Dimethyltryptamine (DMT), Harmine, Harmaline and Tetrahydroharmine: clinical and forensic impact. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 334, 23 out. 2020. MDPI AG.

BURGHARDT, N.s.; BAUER, E.P., Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: implications for underlying fear circuits. **Neuroscience**, [S.L.], v. 247, p. 253-272, set. 2013. Elsevier BV.

CALLAWAY, J. C.; BRITO, Glacus S.; NEVES, Edison S., Phytochemical Analyses of Banisteriopsis Caapi and Psychotria Viridis. **Journal Of Psychoactive Drugs**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 145-150, jun. 2005. Informa UK Limited.

CAMERON, Lindsay P.; BENSON, Charlie J.; DUNLAP, Lee E.; OLSON, David E., Effects of N,N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. **ACS Chemical Neuroscience**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 1582-1590, 17 abr. 2018. American Chemical Society (ACS).

CAMERON, Lindsay P.; BENSON, Charlie J.; DEFELICE, Brian C.; FIEHN, Oliver; OLSON, David E., Chronic, Intermittent Microdoses of the Psychedelic N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Produce Positive Effects on Mood and Anxiety in Rodents. **ACS Chemical Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 3261-3270, 4 mar. 2019. American Chemical Society (ACS).

CAMP, Robert M.; JOHNSON, John D., Repeated stressor exposure enhances contextual fear memory in a beta-adrenergic receptor-dependent process and increases impulsivity in a non-beta receptor-dependent fashion. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 150, p. 64-68, out. 2015. Elsevier BV.

CARBONARO, Theresa M.; GATCH, Michael B., Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. **Brain Research Bulletin**, [S.L.], v. 126, p. 74-88, 2016

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J.. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CARRILLO-REID, Luis. Neuronal ensembles in memory processes. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [S.L.], v. 125, p. 136-143, maio 2022. Elsevier BV.

CASTRO-NETO, Eduardo Ferreira de; CUNHA, Rafael Henrique da; SILVEIRA, Dartiu Xavier da; YONAMINE, Mauricio; GOUVEIA, Telma Luciana Furtado; CAVALHEIRO, Esper Abrão; AMADO, Débora; NAFFAH-MAZZACORATTI, Maria da Graça. 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. Baishideng Publishing Group Inc.

CATLOW, Briony J.; SONG, Shijie; PAREDES, Daniel A.; KIRSTEIN, Cheryl L.; SANCHEZ-RAMOS, Juan. Effects of psilocybin on hippocampal neurogenesis and extinction of trace fear conditioning. **Experimental Brain Research**, [S.L.], v. 228, n. 4, p. 481-491, 2 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

CORREIA, Pedro; DEMETER, Kornél; VARGA, János; URBÁN, Eszter; TÖRÖK, Bibiána; BALÁZSFI, Diána; BAKOS, Nikoletta; HALLER, József; ZELENÁ, Dóra. The effectiveness of extinction training in male rats: temporal considerations and brain mechanisms. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 441, p. 114285, mar. 2023. Elsevier BV.

CRASKE, Michelle G.; SANDMAN, Christina F.; STEIN, Murray B., How can neurobiology of fear extinction inform treatment? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 143, p. 104923, dez. 2022. Elsevier BV.

CUMMINGS, Kirstie A.; CLEM, Roger L., Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 61-74, 16 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

DALDEGAN-BUENO, Dimitri; FAVARO, Vanessa Manchim; TÓFOLI, Luís Fernando; SUSSULINI, Alessandra; CASSAS, Fernando; OLIVEIRA, Maria Gabriela Menezes. Ayahuasca Lyophilization (Freeze-drying) Protocol with Pre- and Post-procedure Alkaloids Quantification. **Journal Of Psychoactive Drugs**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 278-283, 17 set. 2021. Informa UK Limited.

DALDEGAN-BUENO, Dimitri; FAVARO, Vanessa Manchim; MORAIS, Paulo Rogério; SUSSULINI, Alessandra; OLIVEIRA, Maria Gabriela Menezes. Effects of repeated ayahuasca administration on behaviour and c-Fos expression in male rats

exposed to the open field. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 427, p. 113878, jun. 2022. Elsevier BV.

DANELUZ, Daiane Momo; SOHN, Jeferson Machado Batista; SILVEIRA, Gabriela O.; YONAMINE, Maurício; STERN, Cristina Aparecida. Evidence on the impairing effects of Ayahuasca on fear memory reconsolidation. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 3326-3333, 7 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

DESOUZA, Lynette A.; BENEKAREDDY, Madhurima; FANIBUNDA, Sashaina E.; MOHAMMAD, Farhan; JANAKIRAMAN, Balaganesh; GHAI, Utkarsha; GUR, Tamar; BLENDY, Julie A.; VAIDYA, Vidita A., The Hallucinogenic Serotonin2A Receptor Agonist, 2,5-Dimethoxy-4-Iodoamphetamine, Promotes cAMP Response Element Binding Protein-Dependent Gene Expression of Specific Plasticity-Associated Genes in the Rodent Neocortex. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, [S.L.], v. 14, p. 231-248, 24 dez. 2021. Frontiers Media SA.

DO-MONTE, F. H. et al. Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 3607-3615, 2015. Society for Neuroscience.

ELSEY, James W.B.; KINDT, Merel. Breaking boundaries: optimizing reconsolidation-based interventions for strong and old memories. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 472-479, 16 ago. 2017. Cold Spring Harbor Laboratory.

ERSPAMER, V.; VIALLI, M., Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. **Bol d Soc Med-chir Pavia**, 51:357-363, 1937.

FANSELOW, Michael S.; PONNUSAMY, Ravikumar. Chapter 2.2 The use of conditioning tasks to model fear and anxiety. **Handbook Of Anxiety And Fear**, [S.L.], p. 29-48, 2008. Elsevier.

FARIAS, Cid Pinheiro; VICTORIA, Paula Pólvora; XAVIER, Janaína; SEKINE, Fernanda Gelati; RIBEIRO, Eduardo Silveira; COGNATO, Giana de Paula; CARVALHO, Hudson Wander. Behavioral characterization of ayahuasca treatment on Wistar rats in the open field test. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 145-163, 2022. FapUNIFESP (SciELO).

FAVARO, Vanessa Manchim; YONAMINE, Maurício; SOARES, Juliana Carlota Kramer; OLIVEIRA, Maria Gabriela Menezes. Effects of Long-Term Ayahuasca Administration on Memory and Anxiety in Rats. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 145-163, 30 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS).

FENDT, M.; FANSELOW, M., The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 743-760, maio 1999. Elsevier BV.

FILIP, Małgorzata; BADER, Michael. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 761-777, set. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

FONTANILLA, Dominique; JOHANNESSEN, Molly; HAJIPOUR, Abdol R.; COZZI, Nicholas V.; JACKSON, Meyer B.; RUOHO, Arnold E., The Hallucinogen N,N - Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. **Science**, [S.L.], v. 323, n. 5916, p. 934-937, 13 fev. 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

GROSS, Cornelius T.; CANTERAS, Newton Sabino. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 651-658, 1 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC.

HAKE, Holly S.; DAVIS, Jazmyne K.P.; WOOD, River R.; TANNER, Margaret K.; LOETZ, Esteban C.; SANCHEZ, Anais; OSTROVSKYY, Mykola; OLESON, Erik B.; GRIGSBY, Jim; DOBLIN, Rick. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) impairs the extinction and reconsolidation of fear memory in rats. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 199, p. 343-350, fev. 2019. Elsevier BV.

HAMILL, Jonathan; HALLAK, Jaime; DURSUN, Serdar M.; BAKER, Glen. Ayahuasca: psychological and physiologic effects, pharmacology and potential uses in addiction and mental illness. **Current Neuropharmacology**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 108-128, 7 jan. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.

HAN, Dae Hee; PARK, Pojeong; CHOI, Dong Il; BLISS, Tim V.P.; KAANG, Bong-Kiun. The essence of the engram: cellular or synaptic? **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [S.L.], v. 125, p. 122-135, maio 2022. Elsevier BV.

HILBER, Pascal; CHAPILLON, Pierre. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 86, n. 1-2, p. 164-167, set. 2005. Elsevier BV.

HIRSCHFELD, Tim; SCHMIDT, Timo T. Dose–response relationships of psilocybin-induced subjective experiences in humans. **Journal Of Psychopharmacology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 384-397, 4 mar. 2021. SAGE Publications.

HOSKINS, Mathew; PEARCE, Jennifer; BETHELL, Andrew; DANKOVA, Liliya; BARBUI, Corrado; TOL, Wietse A.; VAN OMMEREN, Mark; JONG, Joop de; SEEDAT, Soraya; CHEN, Hanhui. Pharmacotherapy for post-traumatic stress

disorder: systematic review and meta-analysis. **British Journal Of Psychiatry**, [S.L.], v. 206, n. 2, p. 93-100, fev. 2015. Royal College of Psychiatrists.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane R. G.; MYSKIW, Jociane C., Fear Memory. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 695-750, abr. 2016. American Physiological Society.

IZQUIERDO, A.; BRIGMAN, J.L.; RADKE, A.K.; RUDEBECK, P.H.; HOLMES, A., The neural basis of reversal learning: an updated perspective. **Neuroscience**, [S.L.], v. 345, p. 12-26, mar. 2017. Elsevier BV.

JASTER, Alaina M.; ELDER, Harrison; MARSH, Samuel A.; REVENGA, Mario de La Fuente; NEGUS, S. Stevens; GONZÁLEZ-MAESO, Javier. Effects of the 5-HT_{2A} receptor antagonist volinanserin on head-twitch response and intracranial self-stimulation depression induced by different structural classes of psychedelics in rodents. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 239, n. 6, p. 1665-1677, 2 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

KANOVA, Marcela; KOHOUT, Pavel. Serotonin—Its Synthesis and Roles in the Healthy and the Critically Ill. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 4837, 3 maio 2021. MDPI AG.

KORTE, S. Mechiel; BOER, Sietse F. de. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 463, n. 1-3, p. 163-175, fev. 2003. Elsevier BV.

KWAN, Alex C.; OLSON, David E.; PRELLER, Katrin H.; ROTH, Bryan L., The neural basis of psychedelic action. **Nature Neuroscience**, v. 25, n. 11, p. 1407-1419, 24, 2022.

LEE, Hyun Jeong; STEIN, Murray B., Update on treatments for anxiety-related disorders. **Current Opinion In Psychiatry**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 140-145, 6 dez. 2022. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

LEE, Ji-Hye; KIM, Woong Bin; PARK, Eui Ho; CHO, Jun-Hyeong. Neocortical synaptic engrams for remote contextual memories. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 259-273, 23 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

LEONG, Celeste W.y.; LEOW, Josiah W.s.; GRUNSTEIN, Ronald R.; NAISMITH, Sharon L.; TEH, Jun Z.; D'ROZARIO, Angela L.; SAINI, Bandana. A systematic scoping review of the effects of central nervous system active drugs on sleep spindles and sleep-dependent memory consolidation. **Sleep Medicine Reviews**, [S.L.], v. 62, p. 101605, abr. 2022. Elsevier BV.

LIESTER, Mitchell B.; PRICKETT, James I., Hypotheses Regarding the Mechanisms of Ayahuasca in the Treatment of Addictions. **Journal Of Psychoactive Drugs**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 200-208, jul. 2012. Informa UK Limited.

LIU, Qing; ZHANG, Zhinuo; ZHANG, Wenjuan. Optogenetic Dissection of Neural Circuits Underlying Stress-Induced Mood Disorders. **Frontiers In Psychology**, v. 89, n. 33, p. 60-99, 17 jun. 2021. Frontiers Media SA.

LIU, Jianfeng; TOTTY, Michael S.; MELISSARI, Laila; BAYER, Hugo; MAREN, Stephen. Convergent Coding of Recent and Remote Fear Memory in the Basolateral Amygdala. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 91, n. 9, p. 832-840, maio 2022. Elsevier BV.

MAHAN, Amy L.; RESSLER, Kerry J., Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 24-35, jan. 2012. Elsevier BV.

MAIA, Lucas Oliveira; DALDEGAN-BUENO, Dimitri; WIEßNER, Isabel; ARAUJO, Draulio B. TÓFOLI, Luís Fernando. Ayahuasca's therapeutic potential: what we know and what not. **European Neuropsychopharmacology**, v. 66, p. 45-61, 2023.

MCKENNA, Dennis J.; TOWERS, G.H.N.; ABBOTT, F., Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and β -carboline constituents of ayahuasca. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 195-223, abr. 1984. Elsevier BV.

MCKENNA, D.J.; REPKE, D.B.; LO, L.; PEROUTKA, S.J., Differential interactions of indolealkylamines with 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 193-198, mar. 1990. Elsevier BV.

MCKENNA, Dennis J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 102, n. 2, p. 111-129, maio 2004. Elsevier BV.

MERZ, Christian J.; WOLF, Oliver T., How stress hormones shape memories of fear and anxiety in humans. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 142, p. 104901, nov. 2022. Elsevier BV.

MILAD, Mohammed R.; RAUCH, Scott L.; PITMAN, Roger K.; QUIRK, Gregory J., Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. **Biological Psychology**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 61-71, jul. 2006. Elsevier BV.

MILAD, Mohammed R.; ORR, Scott P.; LASKO, Natasha B.; CHANG, Yuchiao; RAUCH, Scott L.; PITMAN, Roger K., Presence and acquired origin of reduced recall

for fear extinction in PTSD: results of a twin study. **Journal Of Psychiatric Research**, [S.L.], v. 42, n. 7, p. 515-520, jun. 2008. Elsevier BV.

MILAD, Mohammed R.; QUIRK, Gregory J., Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: ten years of progress. **Annual Review Of Psychology**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 129-151, 10 jan. 2012. Annual Reviews.

MONDANELLI, G., The double life of serotonin metabolites: in the mood for joining neuronal and immune systems. **Current Opinion In Immunology**, v. 70, p. 1-6, 2021.

MORALES-GARCIA, Jose A.; CALLEJA-CONDE, Javier; LOPEZ-MORENO, Jose A.; ALONSO-GIL, Sandra; SANZ-SANCRISTOBAL, Marina; RIBA, Jordi; PALHANO-FONTES, Fernanda; BARRETO, Dayanna; ONIAS, Heloisa; ANDRADE, Katia C.; NOVAES, Morgana M.; PESSOA, Jessica A.; MOTA-ROLIM, Sergio A.; OSÓRIO, Flávia L.; SANCHES, Rafael; SANTOS, Rafael G. dos. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. **Psychological Medicine**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 655-663, 15 jun. 2018. Cambridge University Press (CUP).

MOUSSAOUI, D. Benzodiazepines and memory. **Encephale**. 1986 Nov-Dec;12(6):315-9. PMID: 2880710.

MYERS, Karyn M.; DAVIS, Michael. Behavioral and Neural Analysis of Extinction. **Neuron**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 567-584, nov. 2002. Elsevier BV.

NICHOLS, David E., **Psychedelics. Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 264-355, 2016. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).

NUNES, Amanda A.; SANTOS, Rafael G. dos; OSÓRIO, Flávia L.; SANCHES, Rafael F.; CRIPPA, José Alexandre S.; HALLAK, Jaime E. C., Effects of Ayahuasca and its Alkaloids on Drug Dependence: a systematic literature review of quantitative studies in animals and humans. **Journal Of Psychoactive Drugs**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 195-205, 26 maio 2016. Informa UK Limited.

OSÓRIO, Flávia de L.; SANCHES, Rafael F.; MACEDO, Ligia R.; SANTOS, Rafael G. dos; MAIA-DE-OLIVEIRA, João P.; WICHERT-ANA, Lauro; ARAUJO, Draulio B. de; RIBA, Jordi; CRIPPA, José A.; HALLAK, Jaime E., Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 13-20, mar. 2015. EDITORA SCIENTIFIC.

PAREDES, Denisse; MORILAK, David A., A Rodent Model of Exposure Therapy: the use of fear extinction as a therapeutic intervention for ptsd. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, v. 13, n. 3, p. 1-12, 11 mar. 2019.

PAVLOV, I. Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Oxford Univ. Press**, 1927.

PEDZICH, Blažej D.; RUBENS, Sarah; SEKSSAOUI, Mehdi; PIERRE, Anouk; VAN SCHUERBEEK, Andries; MARIN, Philippe; BOCKAERT, Joel; VALJENT, Emmanuel; BÉCAMEL, Carine; BUNDEL, Dimitri de. Effects of a psychedelic 5-HT_{2A} receptor agonist on anxiety-related behavior and fear processing in mice. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 47, n. 7, p. 1304-1314, 21 abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

PEREZ-CASTILLO, Ana. N,N-dimethyltryptamine compound found in the hallucinogenic tea ayahuasca, regulates adult neurogenesis in vitro and in vivo. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 235-247, 28 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

PIC-TAYLOR, Aline; MOTTA, Luciana Gueiros da; MORAIS, Juliana Alves de; MELO JUNIOR, Willian; SANTOS, Alana de Fátima Andrade; CAMPOS, Leandro Ambrósio; MORTARI, Marcia Renata; VON ZUBEN, Marcus Vinicius; CALDAS, Eloisa Dutra. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. **Behavioural Processes**, [S.L.], v. 118, p. 102-110, set. 2015. Elsevier BV.

QUIRK, Gregory J; MUELLER, Devin. Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 56-72, 19 set. 2007. Springer Science and Business Media LLC.

QUIRK, Gregory J; MUELLER, Devin. Noradrenergic Signaling in Infralimbic Cortex Increases Cell Excitability and Strengthens Memory for Fear Extinction. **The Journal of Neuroscience**, v. 28 n. 2, p. 369 –375, 2008.

RAPPORT, M.M., Serum vasoconstrictor (serotonin). The presence of creatinine in the complex: A proposed structure of the vasoconstrictor principle. **Journal of Biological Chemistry**, 180:961-969, 1949.

RAU, Vinuta; FANSELOW, Michael S., Neurobiological and Neuroethological Perspectives on Fear and Anxiety. **Understanding Trauma**, [S.L.], p. 27-40, 15 jan. 2007. Cambridge University Press.

RAY, Thomas S., Psychedelics and the Human Receptorome. **Plos One**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 19-90, 2 fev. 2010. Public Library of Science (PLoS).

REIFF, Collin M.; RICHMAN, Elon E.; NEMEROFF, Charles B.; CARPENTER, Linda L.; WIDGE, Alik S.; RODRIGUEZ, Carolyn I.; KALIN, Ned H.; MCDONALD, William M., Psychedelics and Psychedelic-Assisted Psychotherapy. **American Journal Of Psychiatry**, [S.L.], v. 177, n. 5, p. 391-410, 1 maio 2020. American Psychiatric Association Publishing.

REVENGA, Mario de La Fuente; ZHU, Bohan; GUEVARA, Christopher A.; NALER, Lynette B.; SAUNDERS, Justin M.; ZHOU, Zirui; TONEATTI, Rudy; SIERRA, Salvador; WOLSTENHOLME, Jennifer T.; BEARDSLEY, Patrick M., Prolonged epigenomic and synaptic plasticity alterations following single exposure to a psychedelic in mice. **Cell Reports**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 109836, out. 2021. Elsevier BV.

RIBA, Jordi; RODRÍGUEZ-FORNELLS, Antoni; URBANO, Gloria; MORTE, Adelaida; ANTONIJOAN, Rosa; MONTERO, Maria; CALLAWAY, James C.; BARBANOJ, Manel J.. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 154, n. 1, p. 85-95, 22 fev. 2001. Springer Science and Business Media LLC.

ROOZENDAAL, Benno; MCGAUGH, James L.. Memory modulation. **Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 125, n. 6, p. 797-824, dez. 2011. American Psychological Association (APA).

ROSSI, Giordano Novak; GUERRA, Lorena T. L.; BAKER, Glen B.; DURSUN, Serdar M.; SAIZ, José Carlos Bouso; HALLAK, Jaime E. C.; SANTOS, Rafael G. dos. Molecular Pathways of the Therapeutic Effects of Ayahuasca, a Botanical Psychedelic and Potential Rapid-Acting Antidepressant. **Biomolecules**, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 1618, 2 nov. 2022. MDPI AG.

SAEGER, Hannah N.; OLSON, David E., Psychedelic-inspired approaches for treating neurodegenerative disorders. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 162, n. 1, p. 109-127, 5 dez. 2021.

SANTOS, Rafael G. dos; HALLAK, Jaime E. C., Effects of the Natural β -Carboline Alkaloid Harmine, a Main Constituent of Ayahuasca, in Memory and in the Hippocampus: a systematic literature review of preclinical studies. **Journal Of Psychoactive Drugs**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 1-10, 5 dez. 2016. Informa UK Limited.

SANTOS, Rafael Guimarães dos; HALLAK, Jaime Eduardo Cecilio. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. **Epilepsy & Behavior**, [S.L.], v. 121, p. 106300, ago. 2021. Elsevier BV.

SHIN, L.M.; LIBERZON, I. The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. **Neuropsychopharmacology REVIEWS**, v. 35, p. 169–191, 2010.

SIEGEL, Ashley N.; MESHKAT, Shakila; BENITAH, Katie; LIPSITZ, Orly; GILL, Hartej; LUI, Leanna M.W.; TEOPIZ, Kayla M.; MCINTYRE, Roger S.; ROSENBLAT, Joshua D., Registered clinical studies investigating psychedelic drugs for psychiatric disorders. **Journal Of Psychiatric Research**, [S.L.], v. 139, p. 71-81, jul. 2021. Elsevier BV.

SILVA, Bianca A.; BURNS, Allison M.; GRÄFF, Johannes. A cFos activation map of remote fear memory attenuation. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 236, n. 1, p. 369-381, 17 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

SILVA, Bianca A.; GRÄFF, Johannes. Face your fears: attenuating remote fear memories by reconsolidation-updating. **Trends In Cognitive Sciences**, [S.L.], v. 07, n. 24, p. 1-13, fev. 2023.

SILVEIRA, Gabriela de Oliveira; SANTOS, Rafael Guimarães dos; LOURENÇO, Felipe Rebello; ROSSI, Giordano Novak; HALLAK, Jaime; YONAMINE, Mauricio. Stability Evaluation of DMT and Harmala Alkaloids in Ayahuasca Tea Samples. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 2072, 29 abr. 2020. MDPI AG.

SINGEWALD, N.; SCHMUCKERMAIR, C.; WHITTLE, N.; HOLMES, A.; RESSLER, K.J.. Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 149, p. 150-190, maio 2015. Elsevier BV.

SOTTILE, Robert J.; VIDA, Thomas. A proposed mechanism for the MDMA-mediated extinction of traumatic memories in PTSD patients treated with MDMA-assisted therapy. **Frontiers In Psychiatry**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 634-646, 12 out. 2022. Frontiers Media SA.

STRASSMAN, Rick J., Dose-Response Study of N,N-Dimethyltryptamine in Humans. **Archives Of General Psychiatry**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 85, 1 fev. 1994. American Medical Association (AMA).

SOUSA JÚNIOR, Dourival Tavares; VERDE, Thiago Ferreira Cândido Lima; LANDIM, Liejy Agnes Santos Raposo. Alimentos ricos em triptofano e seu efeito na liberação da serotonina e possíveis benefícios no transtorno de ansiedade. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 14, p. 101-190, 2021.

TSAI, Li-Huei; GRÄFF, Johannes. On the resilience of remote traumatic memories against exposure therapy-mediated attenuation. **Embo Reports**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 853-861, 16 jul. 2014. EMBO.

TWAROG, Betty M.; PAGE, Irvine H., Serotonin Content of Some Mammalian Tissues and Urine and a Method for Its Determination. **American Journal Of Physiology-Legacy Content**, [S.L.], v. 175, n. 1, p. 157-161, 30 set. 1953. American Physiological Society.

VARGAS, Maxemiliano V.; DUNLAP, Lee E.; DONG, Chunyang; CARTER, Samuel J.; TOMBARI, Robert J.; JAMI, Shekib A.; CAMERON, Lindsay P.; PATEL, Seona D.; HENNESSEY, Joseph J.; SAEGER, Hannah N., Psychedelics promote neuroplasticity through the activation of intracellular 5-HT_{2A} receptors. **Science**, [S.L.], v. 379, n. 6633, p. 700-706, 17 fev. 2023. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

WATSON, Thomas C.; CERMINARA, Nadia L.; LUMB, Bridget M.; APPS, Richard. Neural Correlates of Fear in the Periaqueductal Gray. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 36, n. 50, p. 12707-12719, 2016.

WHITAKER-AZMITIA, P. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 2-8, 1999.

WILLIAMSON, John B.; JAFFEE, Michael S.; JORGE, Ricardo E.. Posttraumatic Stress Disorder and Anxiety-Related Conditions. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 1738-1763, 2021.

WOOLLEY, D. W.; SHAW, E., A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. **Proc. Natl. Academic Science**, 40:228-231, 1954.

WU, Chao; JIANG, XI-Ling; SHEN, Hong-Wu; YU, Ai-Ming. Effects of CYP2D6 status on harmaline metabolism, pharmacokinetics and pharmacodynamics, and a pharmacogenetics-based pharmacokinetic model. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 78, n. 6, p. 617-624, set. 2009. Elsevier BV.

YOUNG, M B; ANDERO, R; RESSLER, K J; HOWELL, L L. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine facilitates fear extinction learning. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 5, n. 9, p. 634-644, 15 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC.