

AVALIAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO CHÁ DE AYAHUASCA

Bruno Acharezzi
Gabriela Carolina Tangerino
Lucas Gabriel Sperandio

Bolsista do Programa de Iniciação Científica do Centro Universitário Barão de Mauá, Brasil.

E-mail: brunoituano@hotmail.com

Ana Claudia Dinamarco Mestriner

Orientadora do Programa de Iniciação Científica do Centro Universitário Barão de Mauá, Brasil.

Wilson Roberto Malfará

Orientador do Programa de Iniciação Científica do Centro Universitário Barão de Mauá, Brasil.

RESUMO: O chá de Ayahuasca é empregado no xamanismo, na terapia antidrogas e indevidamente em recreações alucinógenas. O estudo teve como objetivo avaliar o fígado, tanto histológica como bioquimicamente, por se tratar do órgão responsável pela metabolização desse chá. Foram utilizados ratos *Wistar* ($n=24$), machos, adultos, divididos em dois grupos (controle e tratado). Foi administrada uma dose diária quatro vezes superior à utilizada no contexto religioso, por quatro dias consecutivos. Não houve alteração morfológica pela análise qualitativa, porém, na análise quantitativa do grupo tratado ocorreu redução do volume do hepatócito e de seu núcleo. Na análise bioquímica observou-se uma redução da Gama-Glutamil-Transferase e da Fosfatase Alcalina. De acordo com a dose e o tempo de exposição não foram encontradas alterações morfológicas nesse estudo. O estudo morfométrico mostrou alterações significativas no volume do hepatócito e de seu núcleo, onde ocorreu diminuição do volume do grupo tratado em relação ao grupo controle. Observou-se uma redução estatisticamente significativa nos parâmetros da Gama-Glutamil-Transferase e Fosfatase Alcalina. Nesse experimento foi observada uma redução do volume dos hepatócitos, sem ocorrer, entretanto, alterações na função e na estrutura hepática.

PALAVRAS-CHAVE: Bioquímica hepática; Chá de Ayahuasca; Enzimas Hepáticas; Morfologia Hepática; Morfometria Hepática.

HEPATIC EVALUATION IN WISTAR RATS EXPOSED TO AYAHUASCA TEA

ABSTRACT: Ayahuasca tea is employed in Xamanism, in anti-drug therapy and illicitly in hallucinogenic recreations. Current study assesses the liver histologically and biochemically since it is an organ involved in the metabolism of the tea. Twenty-four male adult Wistar rats were divided into two groups (control and treated). A daily dose four times higher than that used within a religious context was given, during four consecutive days. There was no qualitative morphological change but a reduction of hepatocyte volume and its nucleus occurred when the quantitative analysis of the treated group was performed. Biochemical analysis showed a decrease in gamma-glutamyl-transferase and Alkaline Phosphatase. There were no morphological alterations for dose and exposure time in current study. Morphometric analysis showed significant alterations in hepatocyte volume and its nucleus where a decrease in volume of the treated group occurred when compared to that of control. A significant statistical decrease was detected in the gamma-glutamyl-transferase and alkaline phosphatase parameters. Current analysis also detected a decrease in hepatocyte volume without alterations in hepatic functions and structure.

KEY WORDS: Ayahuasca Tea; Liver Morphology; Liver Morphometry; Hepatic Enzymes; Hepatic Biochemistry.

INTRODUÇÃO

No Brasil, principalmente na região Amazônica, diversos povos indígenas, estendendo-se até o Sul dos Andes, fazem uso ritualístico de várias substâncias alucinógenas (COSTA; FIGUEIREDO; CAZENAVE, 2005), com finalidade xamânicas.

Segundo Goulart (2004), no Brasil surgiram as primeiras misturas religiosas que uniram o cristianismo com as tradições caboclas e xamânicas da bebida sacramental Ayahuasca.

O consumo do chá Ayahuasca possibilitou os efeitos sobrenaturais pelos rituais religiosos, aproximando o indivíduo com as divindades, e originou religiões como o Santo Daime, a Barquinha e a União do Vegetal (COSTA; FIGUEIREDO; CAZENAVE, 2005).

O chá é preparado, aproximadamente, a cada três meses para o seu uso, esse processo tem uma duração de três dias de trabalho contínuo para a colheita e maceração do cipó (*Banisteropsis caapi*), e também para colheita e lavagem da folha (*Psychotria viridis*), sendo posteriormente dispostos em camadas em tachos com água, onde serão fervidos por horas (SOUZA, 2010).

As substâncias resultantes dessa infusão são principalmente as beta-carbolinas (harmina, tetra-hidro-harmina (THH) e harmalina) e a triptamina alucinógena, de ação ultra-rápida N, N-dimetiltriptamina (DMT) (SANTOS, 2007).

As beta-carbolinas, harmina e harmalina inibem irreversivelmente a enzima monoamino-oxidase (MAO) de preferência a MAO-A, enzima que desamina preferencialmente a noradrenalina e a serotonina. A tetra-hidro-harmalina possui pequena capacidade de inibir a MAO, entretanto inibe seletivamente a recaptação de serotonina (SANTOS, 2007). Em relação às beta-carbolinas, alguns autores defendem que quantidades dessa substância em uma dose regular de Ayahuasca são bem abaixo do limiar de sua dose alucinogênica (BRITO, 2004; MCKENNA, 2004).

A N-dimetiltriptamina (DMT) está presente em raízes, caules e folhas de diversas plantas, em mamíferos

incluindo os humanos e alguns animais aquáticos. Em humanos, a DMT está presente no sangue, na urina e no fluido cérebro-espinhal (STRASSMAN, 2001). A dimetiltriptamina é um potente alucinógeno, pois é um agonista de receptores serotoninérgicos (5HT), contudo, é inativado pela MAO intestinal e hepática. As beta-carbolinas protegem o DMT da ação da MAO, possibilitando a chegada do DMT no cérebro mesmo através da via oral (COSTA; FIGUEIREDO; CAZENAVE, 2005). Estudos recentes demonstram que a N-oxidação em humanos é importante para a degradação do DMT quando administrado com b-carbolinas em Ayahuasca (MCILHENNY, 2012). Outros estudos ainda mostram que a DMT do chá de Ayahuasca possui efeitos autonômicos mais inconsistentes que os efeitos observados com a DMT pura (SANTOS et al., 2012).

A serotonina 5-hidroxitriptamina (5-HT) se distribui amplamente nos tecidos animais. Na glândula pineal, atua como precursora da melatonina, um hormônio estimulador dos melanócitos. Mais de 90% da serotonina do organismo são encontrados nas células enterocromafins do trato gastrointestinal (TGI), função ainda não totalmente elucidada. Essas células sintetizam serotonina, a armazenam em um complexo com trifosfato de adenosina (ATP), onde a sua liberação ocorre em resposta a estímulos mecânicos e neuronais. Essa serotonina interage de modo parácrino com vários receptores 5-HT diferentes no intestino, onde parte desta liberada difunde-se nos vasos sanguíneos, onde é captada e armazenada nas plaquetas. No sangue, a serotonina é encontrada nas plaquetas, que são capazes de concentrar a amina por meio de um mecanismo transportador ativo. É encontrada também nos núcleos da rafe do tronco cerebral, que contêm corpos celulares de neurônios triptaminérgicos (serotoninérgicos) que sintetizam, armazenam e liberam a serotonina como seu transmissor. Os neurônios serotoninérgicos cerebrais estão envolvidos em diversas funções como sono, humor, regulação da temperatura, percepção da dor e regulação da pressão arterial. Pode estar envolvida ainda com condições patológicas, tais como depressão, ansiedade e enxaqueca. Neurônios serotoninérgicos são encontrados também no sistema nervoso entérico do TGI e em torno dos vasos sanguíneos. A serotonina

é metabolizada pela MAO em 5-hidroxiacetaldéido (COSTA; FIGUEIREDO; CAZENAVE, 2005).

Em detrimento do uso contínuo do chá de Ayahuasca em alguns grupos religiosos, sem informações conclusivas sobre os seus efeitos, o estudo em questão avalia as prováveis interferências hepáticas do chá, por meio da análise histológica do fígado, e funcional pelas enzimas e proteínas hepáticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de ética do órgão responsável, sob protocolo nº 205/2013.

O chá da Ayahuasca foi obtido por doação de um integrante de um grupo religioso que utiliza este chá em seus rituais.

Foi realizada uma revisão de literatura sobre a histologia hepática no livro de Histologia Básica de Junqueira e Carneiro (2011) e da bioquímica hepática no livro de Semiologia Médica de Porto (2014).

Foram utilizados 2 grupos (n=24) de ratos *Wistar*, machos, adultos, com peso variando entre 200 a 250 gramas. Os animais foram alojados em número de 5 em gaiolas plásticas, medindo 50 x 35 x 15 cm. As gaiolas eram mantidas em salas com temperatura ambiente constante (22 a 24°C), em ciclo controlado de 12 horas de claro e escuro. Água e comida foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo o experimento.

A administração do chá aos dois grupos separados foi realizada conforme descrito abaixo:

- **Grupo Controle:** 1,0 mL de água destilada a cada 100 gramas de peso corporal durante 4 dias consecutivos através da gavage.
- **Grupo Tratado:** 1,0 mL do chá a cada 100 gramas de peso corporal durante 4 dias consecutivos através da gavage (OLIVEIRA et al., 2010).

A dose habitual no ritual religioso varia de 150

mL a 200 mL para o ser humano (LABIGALINE, 1998), pesando aproximadamente 70 kg. A dose utilizada neste experimento é de 1,0 mL a cada 100 g de peso corporal (OLIVEIRA et al., 2010), equivalendo essa dose para uma pessoa de 70 kg, essa dose corresponderia a uma dose aproximada quatro vezes superior, portanto acima e não relacionada ao contexto do xamanismo.

2.2 MÉTODOS

Para a realização da coleta do material histológico, os ratos foram anestesiados com cetamina (0,3mL/i.p.) e xylazina (0,2mL/i.p.), após 2 horas da administração do chá, no último dia do experimento.

Devido à necessidade de colheita em quantidade relativamente grande de sangue, não foi realizada a colheita diária pela veia caudal, como muitos estudos descrevem. Optou-se pela cava, de onde se obtém uma maior quantidade de sangue seguido de distribuição do mesmo em tubo utilizando como anticoagulante o EDTA sódico (ácido tetracético d-etilenodiamino). Durante o procedimento de coleta de sangue houve uma perda por motivo de coagulação sanguínea de 4 amostras, sendo 2 amostras de cada grupo. Dessa forma, na análise bioquímica n=20.

Realizou-se em seguida a retirada do fígado durante ato cirúrgico, que foi então fixado em Bouin, incluído em parafina e seccionado com 5 micrômetros de espessura. As secções foram coradas com Hematoxilina-Eosina e analisadas qualitativamente os lóbulos hepáticos, o espaço-porta, as veias hepáticas, os cordões sinusóides e o aspecto morfológico dos hepatócitos; as secções também foram analisadas quantitativamente, através da morfometria das células hepáticas pelo *software MotiCImages Plus 2.00*, em microscopia de luz.

A análise morfométrica das micrografias de, no mínimo, seis campos aleatórios nas lâminas de cada animal, totalizando 30 medidas por órgão/animal.

As medidas foram obtidas automaticamente pelo *Imaje J* com o uso da máscara de cor (ANDREA; BLEGGI-TORRES; ALVES, 2008).

As medidas obtidas foram área do núcleo e área do limite celular dos hepatócitos.

A unidade de medida foi em micrômetros, obtida pela escala gerada através do *software* da micrografia.

A análise bioquímica foi realizada no mesmo dia da colheita do material. As amostras de soro e plasma foram separadas dos elementos figurados em um período de tempo inferior a duas horas após a colheita do sangue e conservadas em geladeira até o momento da análise.

Os parâmetros bioquímicos analisados foram AST, ALT, Fosfatase Alcalina, Gama-Glutamil-Transferase e Albumina séricos, através da aplicação de técnicas de rotina de acordo com a literatura especializada. Tais análises contaram com a colaboração do Laboratório de Análises Clínicas.

A análise estatística da micrometria foi realizada com auxílio dos softwares *GraphPadInstat*®, *Statgraphics*® e *Prisma*® através do teste paramétrico t-student não pareado. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

Como o formato do núcleo do hepatócito é aproximadamente esférico, seu volume ($V = \frac{4\pi r^3}{3}$) foi estimado a partir de sua área ($A = \pi r^2$). O volume

nuclear relativo é a relação entre o volume nuclear do hepatócito e o volume total do hepatócito.

Na análise bioquímica, utilizou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney Test* com nível de significância $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em ambos os grupos, na análise qualitativa hepática através da microscopia de luz foram observados lóbulos hepáticos íntegros, com espaço-porta íntegro e veias hepáticas bem definidas, cordões sinusóides presentes, íntegros, confluindo para veia centro-lobular. Observou-se ainda células hepáticas normais, com um ou mais núcleos íntegros e centralizados, e nucléolos bem evidentes.

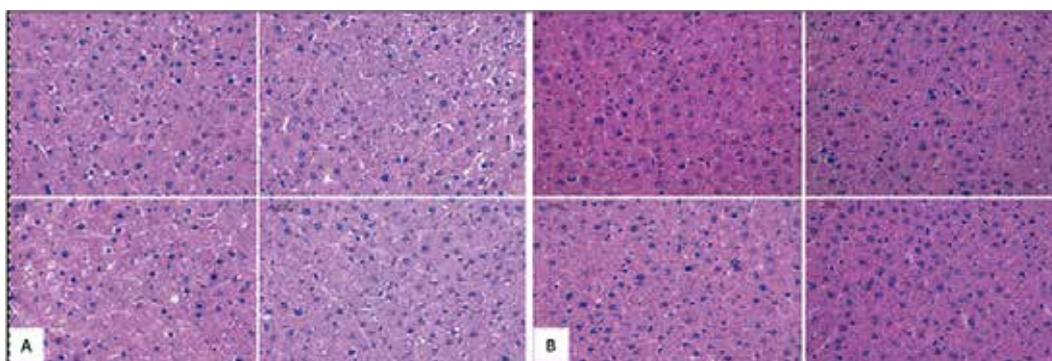


Figura 1. (A) Fotomicrografias do fígado de ratos pertencentes ao grupo controle. (B) Fotomicrografias do fígado de ratos pertencentes ao grupo tratado. Eosina-Hematoxilina. 400X.

Tabela 1. Valores das Medidas Estimadas do Volume do Hepatócito (em milhares de micrômetros cúbicos); do Volume do Núcleo do Hepatócito (micrômetros cúbicos); e do Volume Nuclear Relativo em Ratos do Grupo Controle e Grupo Tratado

	Grupo	Média	Erro padrão	<i>p</i>
Volume do Hepatócito	Controle	21,38	0,8869	0,0234*
	Tratado	18,51	0,7779	
Volume do núcleo Do hepatócito	Controle	939,2	28,33	0,0048**
	Tratado	838,2	13,13	
Volume nuclear Relativo	Controle	4,878	0,2609	0,1861
	Tratado	5,712	0,5530	

Na análise morfométrica do volume hepático, foi observada redução significativa do grupo tratado em relação ao grupo controle.

Na análise morfométrica do volume nuclear do hepatócito, foi observada redução com significância estatística do grupo tratado em relação ao grupo controle.

Através de uma relação entre a análise morfométrica do volume nuclear do hepatócito com seu volume celular, foi observado um aumento nessa relação, entretanto sem significância estatística ($p > 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros Bioquímicos Hepáticos em U/L da TGO/AST, TGP/ALT, Fosfatase Alcalina, Gama GT, Albumina em Ratos do Grupo Controle e do Grupo Tratado

	Grupos	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo	Mann-Whitney Test
TGO/AST	Controle	123	125,5	128	136,75	146	0,9397
	Tratado	99	110,25	132	141,5	165	
TGP/ALT	Controle	33	40,5	45	47,75	52	0,6775
	Tratado	34	38,25	43,5	47,25	49	
Fosfatase alcalina	Controle	332	426,25	453	491,75	654	0,0232
	Tratado	263	319,75	366,5	406,75	482	
Gama GT	Controle	1	3	4	5	12	0,008
	Tratado	0,5	1	2	2,75	3	
Albumina	Controle	2,7	2,825	2,95	3,175	3,3	0,3243
	Tratado	2,8	2,95	3,1	3,25	3,4	

3.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS HEPÁTICOS

A análise dos valores de TGO/AST mostra o grupo tratado com limites máximos e mínimos mais afastados em relação ao grupo controle, porém não houve valores estatisticamente significativos.

Na análise do parâmetro TGP/ALT pode-se verificar limites máximos e mínimos próximo ao grupo controle e com valores sem significância estatística.

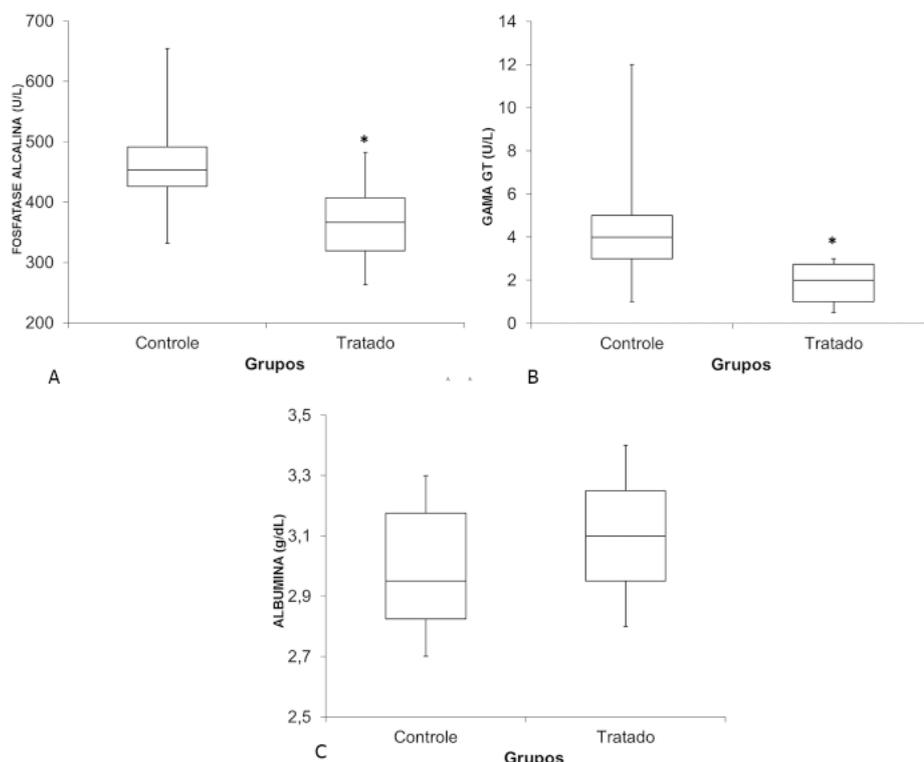


Gráfico 1. (A) Comparação dos níveis de fosfatase alcalina em U/L entre os grupos controle e tratado. (B) Comparação dos níveis de gama GT em U/L entre os grupos controle e tratado. (C) Comparação dos níveis de albumina em g/dL entre os grupos controle e tratado.

Os valores de fosfatase alcalina do grupo tratado são notoriamente diminuídos em relação ao grupo controle, havendo significância estatística, conforme gráfico 1(A).

Na análise do parâmetro gama-glutamyl-transferase (Gama GT), observa-se que o grupo tratado apresenta um limite máximo bem inferior ao grupo controle, com valores estatisticamente significativos, como observado no gráfico 1(B).

No parâmetro albumina, quando analisada no gráfico 1(C), observa-se valores pouco discrepantes entre grupos controle e tratado, sem significância estatística.

4 DISCUSSÃO

O chá de Ayahuasca tem sido usado para diversas finalidades fora do contexto religioso, dentre elas como terapêutico contra abuso de drogas (CARLINI et al., 2006) ou até mesmo como recreação pelos efeitos alucinógenos (FIGUEROA, 2012). Dessa maneira, o chá de Ayahuasca pode ser ingerido em quantidades menores ou maiores em relação ao contexto do ritual.

A dose quatro vezes superior durante 15 dias pode mostrar na microscopia hepática congestão (14,3%), degeneração hidrópica (28,6%), esteatose (28,6%), infiltrado inflamatório (14,3%) e necrose (14,3%) (MORAIS, 2014).

O fígado, nesse trabalho, mostrou-se sem alterações morfológicas na análise microscópica, entretanto ocorreu uma redução significativa estatisticamente do volume do hepatócito e do núcleo do hepatócito, porém o volume nuclear relativo mostrou-se aumentado, embora sem significância ($p = 0,18$).

Em outra pesquisa em que o chá de Ayahuasca foi utilizado, observou-se que o peso do fígado do grupo tratado era menor em relação ao grupo controle ($p = 0,14$) (FIGUEROA, 2012), possivelmente a redução do volume dos hepatócitos encontrada na atual pesquisa tenha relação com a redução do peso hepático.

Na análise bioquímica através dos resultados obtidos não houve evidências de lesão hepática, pois não houve aumento dos parâmetros AST, ALT, Gama GT, Fosfatase alcalina; podemos ainda excluir a colestase pelo fato da Gama GT e Fosfatase alcalina não se elevarem. Contudo, ocorreu redução estatisticamente

significante da Gama GT (*Mann-Whitney Test* = 0,008) e da Fosfatase Alcalina (*Mann-Whitney Test* = 0,0232). Esses parâmetros podem ter uma relação com a alteração histológica através da redução do hepatócito e de seu núcleo, através da interferência em algum processo da produção dessas enzimas, que pode ser na transcrição ou em outro local da síntese hepática das mesmas. No estudo da síntese hepática, o parâmetro albumina sérica não se alterou, o que pode indicar que não há alteração de síntese no fígado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a dose e o tempo de exposição não foram encontradas alterações morfológicas nesse estudo.

O estudo morfométrico mostrou alterações significativas no volume do hepatócito e de seu núcleo, onde ocorreu diminuição do volume do grupo tratado em relação ao grupo controle.

Observou-se uma redução estatisticamente significativa nos parâmetros da Gama-glutamyl-transferase e Fosfatase Alcalina.

Não ocorreu lesão hepática, nem alteração da síntese hepática, contudo algumas enzimas como a Gama-glutamyl-transferase e Fosfatase Alcalina tiveram seus valores reduzidos no grupo tratado ao se comparar com os valores do grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ANDREA, C. E.; TORRES-BLEGGI, L. F.; ALVES, M. T. S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **J Bras Patol Med Lab.**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 51-57, fev. 2008.
- BRITO, G. S. Farmacologia humana da hoasca (chá preparado de plantas alucinógenas usado em contexto ritual no Brasil). In: LABATE, B. C.; ARAÚJO, W. S. **O uso ritual da Ayahuasca**. 2. ed. Campinas: Mercado de Letras, 2004. p. 623-671.
- CARLINI, E. A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Rev Bras Farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, suplemento, p. 690-695, dez. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000500016&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 30 ago. 2015.
- COSTA, M. C. M.; FIGUEIREDO, C. M.; CAZENAVE, S. O. S. Ayahuasca: uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. **Arch Clin Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, n. 6, p. 310-318, novembro/dezembro 2005.
- FIGUEROA, A. R. M. **Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá Ayahuasca**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- GOULART, S. L. **Contastes e continuidade em uma tradição Amazônica: as religiões da Ayahuasca**. 2004. 315f. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- LABIGALINE, E. Jr. **O uso de Ayahuasca em um contexto religioso por ex-dependentes de álcool**. 1998. 68f. Dissertação (Mestrado em Saúde Mental) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.
- MACKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of Ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 111-129, maio 2004.
- MCILHENNY, E. H. **Ayahuasca characterization, metabolism in humans, and relevance to endogenous N,N-dimethyltryptamines**. 2012. 205f. Dissertação (Doutorado em Filosofia) - Universidade do Estado de Louisiana, Baton Rouge, 2012. Disponível em: <<http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-06252012-143806/unrestricted/EthanMcIlhennyDissertationFinal.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

MORAIS, J. A. **Toxicidade aguda e crônica do chá Ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*), por análise histológica em ratos Wistar.** 2014. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

OLIVEIRA, C. D. R.; MOREIRA, C. Q.; DE SÁ, L. R. M.; SPINOSA, H. S.; YONAMINE, M. Maternal and Developmental Toxicity of Ayahuasca in Wistar Rats. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.**, Hoboken, v. 89, n. 3, p. 207-212, maio 2010.

ROSA, H.; NORMANHA, L. M. Fígado e vias biliares: Exames Complementares. In: PORTO, C. C.; PORTO, A. L. **Semiologia Médica.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 742-743.

SANTOS, R. G. Ayahuasca: neuroquímica e farmacologia. **Rev Eletr Saúde Mental Álcool Drog.**, Ribeirão Preto, v. 3, n. 1, p. 1-11, fev. 2007. Disponível em: <<http://pepsic.bvsalud.org/pdf/smad/v3n1/v3n1a07.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

SANTOS, R. G.; GRASA, E.; VALLE, M.; BALLESTER, M. R.; BOUSO, J. C.; NOMDEDÉU, J. F.; HOMS, R.; BARBANOJ, M. J.; RIBA, J. Pharmacology of Ayahuasca administered in two repeated doses. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 219, n. 4, p. 1039-1053, fev. 2012.

SOUZA, V. M. **Ayahuasca, identificando sentidos: o uso ritual da bebida na União do Vegetal.** 2010. 179f. Dissertação (Mestrado em Ciências Sociais) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

STRASSMAN, R. **DMT: the spirit molecule.** Rochester: Park Street Press, 2001.

Recebido em: 21 de julho de 2015

Aceito em: 13 de setembro de 2015