



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Emerson Andrade Ferreira dos Santos

**Aplicação da abordagem lipidômica no estudo do tratamento do
transtorno da depressão maior com Ayahuasca em pacientes resistentes
a antidepressivos convencionais**

**CAMPINAS
2024**

Emerson Andrade Ferreira dos Santos

Aplicação da abordagem lipidômica no estudo do tratamento do transtorno da depressão maior com Ayahuasca em pacientes resistentes a antidepressivos convencionais

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Sussulini

O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno Emerson Andrade Ferreira dos Santos e orientada pela Profa. Dra. Alessandra Sussulini.

**CAMPINAS
2024**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Sa59a Santos, Emerson Andrade Ferreira dos, 1990-
Aplicação da abordagem lipidômica no estudo do tratamento do transtorno da depressão maior com ayahuasca em pacientes resistentes a antidepressivos convencionais / Emerson Andrade Ferreira dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Alessandra Sussulini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Ayahuasca. 2. Depressão. 3. Lipidômica. I. Sussulini, Alessandra, 1981-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Application of the lipidomic approach in the investigation of the treatment of major depression with ayahuasca in patients resistant to conventional antidepressants

Palavras-chave em inglês:

Ayahuasca
Depression
Lipidomics

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Alessandra Sussulini [Orientador]

Taícia Pacheco Fill

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Gisele André Baptista Canuto

Renata Sebastiani

Data de defesa: 02-02-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2487-6894>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3897880947646658>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alessandra Sussulini (Orientadora)

Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill (Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira (Universidade Estadual de Campinas)

Profa. Dra. Gisele André Baptista Canuto (Universidade Federal da Bahia)

Profa. Dra. Renata Sebastiani (Universidade Federal de São Carlos)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno **Emerson Andrade Ferreira dos Santos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 2 de fevereiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Dra. Alessandra Sussulini por ter me aceitado como aluno de doutorado e por toda orientação recebida, e ao Instituto de Química da Unicamp pela estrutura fornecida. Também agradeço a Flávia Zandonadi pelo conhecimento transmitido, pelos trabalhos conjuntos e por todo apoio e companheirismo nesse trajeto. Agradeço também a Taynara Matos por toda a parceria e nessa mesma linha, é preciso citar Elisa Castañeda, Luidy Darllan, Henrique Caracho e Mariana Marques pelos trabalhos em equipe e auxílio mútuo. Agradeço também ao Thales Pereira, a Bruna Soldera, ao Patrick Ferreira, a Aline de Melo, a Isabelle Naomi pelas vivências, trocas, discussões científicas e bons momentos passados juntos e a todos os colegas do grupo LaBIOmics, como também aos técnicos Acácia Salomão e Marlon Marangon por fazer parte desse cotidiano e facilitar o trabalho laboratorial.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) – Código de Financiamento 142468/2018-5.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

A depressão é uma patologia que impacta 3,8 % da população mundial. A incidência entre adultos é de 5 %, dos quais 4 % são homens e 6 % são mulheres. A doença se caracteriza por uma alta complexidade, envolvendo diversos mecanismos e incluindo fatores biológicos, psíquicos e sociais. Um novo tipo de tratamento que vem surgindo nas últimas décadas é a aplicação de substâncias psicodélicas como LSD, psilocibina e cetamina. Estas vêm demonstrando efeitos antidepressivos mesmo após a administração de uma única dose. A Ayahuasca é uma bebida psicodélica preparada a partir da decocção de partes de duas plantas: as cascas de um cipó que contém compostos beta carbolínicos [*Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) Morton] e as folhas de um arbusto [*Psychotria viridis* Ruiz & Pav.] que apresenta altas concentrações de *N,N*-dimetiltriptamina (DMT). Originária dos povos indígenas da bacia amazônica, a Ayahuasca se expandiu pelo globo, e atualmente também vêm sendo estudada quanto a seus possíveis efeitos antidepressivos. Para uma investigação a nível molecular dos mecanismos por trás do transtorno da depressão maior, bem como do tratamento com Ayahuasca, foram realizadas análises lipidômicas e metabolômicas globais com amostras de soro sanguíneo de pacientes diagnosticados com depressão resistente ao tratamento (depressão refratária) e de indivíduos controle, aos quais foram administrados Ayahuasca ou placebo. Os resultados apresentam uma lista de 14 lipídios e 3 metabólitos diferenciais correlacionados a vias metabólicas já relatadas pela literatura científica como sendo importantes para a fisiopatologia da depressão e que também são essenciais para o bom funcionamento do sistema nervoso

central. Os resultados trazem, principalmente, diversos indícios do envolvimento do sistema imune na depressão, bem como indica a participação da histamina como composto ponte entre o sistema imune, a regulação de monoaminas e o eixo HPA, relacionando, desse modo, duas teorias bioquímicas vigentes sobre a depressão: a das monoaminas e a das citocinas.

ABSTRACT

Depression is a pathology that affects 3.8 % of the world population. The incidence among adults is 5 %, of which 4 % are men and 6 % are women. The disease is overly complex, involving various mechanisms and including biological, psychological and social factors. A new type of treatment that has emerged in recent decades is the use of psychedelics such as LSD, psilocybin, and ketamine. These have demonstrated antidepressant effects even after a single dose. Ayahuasca is a psychedelic beverage prepared from parts of two plants: the bark of a vine containing beta carboline compounds [*Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) Morton] and the leaves of a shrub [*Psychotria viridis* Ruiz & Pav.] with high concentrations of *N,N*-dimethyltryptamine (DMT). Originating from Indigenous people of the Amazon basin, Ayahuasca has spread across the globe and is currently being studied for its possible antidepressant effects. In order to investigate the mechanisms behind major depression disorder and Ayahuasca treatment at a molecular level, untargeted lipidomic and metabolomic analyses were carried out on blood serum samples from patients diagnosed with treatment-resistant depression and control subjects given Ayahuasca or placebo. The results indicate potential differential lipids and polar metabolites correlated with metabolic pathways already reported in the scientific literature as being important for the pathophysiology of depression and which are also essential for the proper functioning of the central nervous system. They also provide evidence of the involvement of the immune system in depression, as well as relating it to current biochemical theories on depression.

ZUSAMMENFASSUNG

Depression ist eine Krankheit, von der 3,8 % der Weltbevölkerung betroffen sind. Die Inzidenz bei Erwachsenen liegt bei 5 %, davon 4 % bei Männern und 6 % bei Frauen. Es handelt sich um eine hochkomplexe Krankheit, an der verschiedene Mechanismen beteiligt sind, darunter biologische, psychologische und soziale Faktoren. Eine neue Art der Behandlung, die in den letzten Jahrzehnten entstanden ist, ist der Einsatz von Psychedelika wie LSD, Psilocybin und Ketamin. Diese haben bereits nach einer einzigen Dosis antidepressive Wirkungen gezeigt. Ayahuasca ist ein psychedelisches Getränk, das aus zwei Pflanzen zubereitet wird: der Rinde einer Rebe, die Beta-Carbolin-Verbindungen enthält [*Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) Morton], und den Blättern eines Strauches [*Psychotria viridis* Ruiz & Pav.] mit hohen Konzentrationen an *N,N*-Dimethyltryptamin (DMT). Ayahuasca stammt ursprünglich von den indigenen Völkern des Amazonasbeckens, hat sich aber weltweit verbreitet und wird derzeit auf seine mögliche antidepressive Wirkung hin untersucht. Um die Mechanismen zu untersuchen, die einer schweren Depression und einer Ayahuasca-Behandlung auf molekularer Ebene zugrunde liegen, wurden *untargeted* Lipidom- und Metabolomanalysen an Blutserumproben von Kontrollpersonen und von Patienten, bei denen eine Depression diagnostiziert wurde, die Ayahuasca oder Placebo erhielten, durchgeführt. Die Ergebnisse weisen auf potenzielle differentielle Lipide und Metaboliten hin, die mit Stoffwechselwegen korrelieren, die in der wissenschaftlichen Literatur bereits als wichtig für die Physiopathologie der Depression beschrieben wurden und die auch für das ordnungsgemäße

Funktionieren des zentralen Nervensystems wesentlich sind. Die Ergebnisse liefern auch Beweise für die Beteiligung des Immunsystems an Depressionen und stellen einen Bezug zu den aktuellen biochemischen Theorien über Depressionen her.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Exemplos das oito classes principais de lipídios de acordo com a classificação do LIPID MAPS..... 25
- Figura 2.** Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 1**). Apenas os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL foram considerados.. 56
- Figura 3.** Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 2**). Foram considerados os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS¹ e de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL. 57
- Figura 4.** Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 3**). Apenas os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL foram considerados.. 58
- Figura 5.** Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 4**). Foram considerados os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS¹ e de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL. 59
- Figura 6.** Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 5**). Foram considerados os *features* anotados por meio da

comparação dos espectros de MS ¹ e de MS ² com a biblioteca interna do MS-DIAL.	61
Figura 7 Diagrama de Venn incluindo os <i>features</i> diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (Condição 6). Foram considerados os <i>features</i> anotados por meio da comparação dos espectros de MS ¹ e de MS ² com a biblioteca interna do MS-DIAL.	62
Figura 8. Gráfico de escores de PCA para as análises lipidômicas feitas no modo ESI negativo.	66
Figura 9. Gráfico de escores de PCA para as análises lipidômicas feitas no modo ESI positivo.	67
Figura 10. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação de pacientes e controles.	71
Figura 11. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação de pacientes antes e após a administração de Ayahuasca.	73
Figura 12. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação de pacientes antes e depois da administração de placebo.	74
Figura 13. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e depois da administração de Ayahuasca.	75

Figura 14. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e depois da administração de placebo.	76
Figura 15. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes com o grupo controle.....	77
Figura 16. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de Ayahuasca.....	78
Figura 17. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de placebo.	79
Figura 18. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e após a administração de Ayahuasca.....	80
Figura 19. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e após a administração de placebo.....	81

Figura 20. Estrutura e vias metabólicas dos lipídeos que tiveram suas identificações convertidas a KEGG ID no LIPEA. Cer 12:2;O2/14:1 teve duas identificações, assim como o LPS 18:4; as três fosfatidicoínas identificadas apresentaram o mesmo KEGG ID.....	91
Figura 21 Gráfico de escores de PCA para as análises metabolômicas feitas no modo ESI negativo.....	93
Figura 22 Gráfico de escores de PCA para as análises metabolômicas feitas no modo ESI positivo.	94
Figura 23. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle com o grupo de pacientes.....	96
Figura 24. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de Ayahuasca.....	97
Figura 25. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de placebo.	97
Figura 26. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os metabolitos polares diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para comparação do grupo controle antes e após a administração de Ayahuasca.	98

Figura 27. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os <i>features</i> diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e após a administração de placebo.....	99
Figura 28. Diagrama de Venn para os experimentos metabolômicos incluindo os <i>features</i> encontrados na comparação dos grupos C vs. D, C vs. CA, C vs. CP, D vs. DA e D vs. DP (aplicando a Condição 4). Foram considerados os <i>features</i> por meio da comparação dos espectros de MS ¹ e de MS ² com a biblioteca interna do MS-DIAL.....	100
Figura 29 Estruturas dos compostos comuns aos distúrbios causados pela depressão e às modulações disparadas pela Ayahuasca nos experimentos metabolômicos.	105
Figura 30. Relação dos lipídeos e metabólitos encontrados nesse trabalho. A miricetina é um flavonoide, não sendo produzida por humanos e estando diretamente relacionada à administração de Ayahuasca.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do número de replicatas biológicas por grupo.....	44
Tabela 2. Condições de processamento e números de <i>features</i> diferenciais encontrados para cada comparação de grupo	63
Tabela 3. Condições de processamento e números de <i>features</i> diferenciais em comum entre as alterações causadas pela depressão e as modulações causadas pela administração de Ayahuasca	63
Tabela 4. Valores de <i>raw</i> p-value, fold change e VIP score para os lipídios (<i>features</i>) encontrados na Condição 4	69
Tabela 5. <i>Features</i> diferenciais encontrados, KEGG ID e vias metabólicas associadas	82
Tabela 6. KEGG IDs dos lipídios encontrados e vias metabólicas associadas	84
Tabela 7. Valores de fold change, <i>raw</i> p-value e VIP score para os metabólitos polares encontrados.....	100
Tabela 8. Informações biológicas para os metabólitos hidrofílicos encontrados	101

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

5-HT – serotonina

5-HT_{1A} – receptor serotoninérgico 1A

5-HT_{2A} – receptor serotoninérgico 2A

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico (adrenocorticotropic hormone)

ANOVA – análise de variância (analysis of variance)

ASM – esfingomielinase ácida (acid sphingomyelinase)

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain Derived Neurotrophic Factor)

CRF – hormônio liberador de corticotrofina (Corticotrophin Releasing Factor)

CUMS – estresse leve crônico e imprevisível (Chronic Unpredictable Mild Stress)

DA – *Dalton* (unidade de medida de massa atômica e/ou molecular)

DAG – diacilglicerol (*1,2-diacylglycerol*)

DHA – ácido docosahexanóico (docosahexaenoic acid)

DMT – *N,N*-dimetiltryptamina

DSM-IV – Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

ESI – ionização por eletrospray (electrospray ionization)

FDR – taxa de falsa descoberta (False Discovery Rate)

FA – ácido graxo (fatty acyl)

GL – glicerolípido (glycerolipid)

GP – glicerofosfolípido (glicerophospholipid)

HAM-D – Escala de Depressão de Hamilton (Hamilton depression rating scale)

HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HMDB – Banco de Dados do Metaboloma Humano (Human Metabolome Database)

ICEFLU - Igreja do Culto Eclético da Fluente Luz Universal

IMAO – inibidor da monoamina oxidase

IL-6 – interleucina-6

IQR – intervalo interquartil (interquartile range)

ISRS – Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina

ISRSN – Inibidor Seletivo de Recaptação da Serotonina e da Norepinefrina

KEGG ID – identificação dentro da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Identification)

LDL – lipoproteína de baixa densidade (Low-Density Lipoprotein)

LSD – dietilamida de ácido lisérgico (lysergic acid diethylamide)

MDD – distúrbio da depressão maior (major depression disorder)

MADRS – Escala de Avaliação de Depressão de Montgomery-Åsberg (Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale)

MAO-A - monoamina oxidase A

MGDG – monogalactosil diglicerídeo

m/z – relação massa carga

MS – espectrometria de massas (mass spectrometry)

MTBE - éter tert-butil metílico (methyl tert-butylether)

PCA – Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis)

PK – policetídeo (polyketide)

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis)

PR – prenil (prenol lipid)

PUFA – ácido graxo poli-insaturado (polyunsaturated fatty acid)

QC – controle de qualidade (Quality Control)

RCT – estudo controlado e randomizado (Randomized Controlled Trial)

RSD – desvio padrão relativo (Relative Standard Deviation)

RNA – ácido ribonucleico - ribonucleic acid

ROS – espécie reativa de oxigênio (Reactive Oxygen Species)

SCID – Entrevista Clínica Estruturada para o Eixo I (*Structured Clinical Interview for DSM*)

SNC – sistema nervoso central

SIMPLEX – Extração Simultânea de Metabólitos, Proteínas e Lipídios (Simultaneous Metabolite, Protein, Lipid Extraction)

SL – sacarolipídio (saccharolipid)

SP – esfingolipídio (sphingolipid)

ST – esterol (sterol lipid)

TCA – antidepressivo tri ou tetracíclico (tri-, tetracyclic antidepressant)

TNF- α – fator de necrose tumoral α (Tumor Necroptosis Factor α)

UDV - União do Vegetal

UHPLC – cromatografia líquida de ultra alta eficiência (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

SUMÁRIO

1	Introdução	22
1.1	Lipidômica	22
1.2	Lipídios	24
1.3	Depressão	28
1.4	Ayahuasca	31
1.5	Potenciais da Ayahuasca no tratamento da depressão	35
2.	Objetivos	39
3.	Parte experimental	41
3.1	Aquisição e preparo de amostras	41
3.2	Análises por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas	45
3.3	Processamento e pré-tratamento dos dados	48
3.4	Análises estatísticas	49
3.5	<i>Features</i> diferenciais	50
3.6	Análise de vias metabólicas	51
4	Resultados e discussão	52
4.1	Análises univariadas	54
4.1.1	Investigação da fase orgânica	54
4.1.2	Análises multivariadas	65
4.1.3	Análises multivariadas dos <i>features</i> diferenciais	70
4.1.4	Avaliação das vias metabólicas associadas	82
4.2	Investigação da fase aquosa	92

4.2.1 Análises uni e multivariadas e interpretações de vias metabólicas	
.....	92
4.2.2 Análise por ANOVA	105
4.3 Interpretações biológicas gerais	106
4.4 Limitações do estudo	108
5. Conclusão e perspectivas	110
6. Referências bibliográficas	114
7. APÊNDICES	135
8. ANEXOS	155

1 Introdução

1.1 Lipidômica

Os biomarcadores, ou marcadores biológicos, são parâmetros medidos e analisados como indicadores de processos fisiológicos normais, patológicos ou gerados como resposta a intervenções terapêuticas - por exemplo, o uso da medida da concentração de glicose como reflexo da incidência de diabetes, bem como de seus diferentes estágios.¹

Devido ao grande avanço tecnológico dentro da química analítica no campo da genômica, da transcriptômica, da proteômica e, mais recentemente, da metabolômica, os biomarcadores vêm ganhando atenção como potenciais substitutos de pontos finais clínicos - por exemplo, elevadas concentrações das citocinas fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) no soro sanguíneo de pacientes com depressão-,² e trazem a possibilidade da correlação de diagnósticos clínicos e/ou efeitos gerados por intervenções terapêuticas com eventos fisiológicos a nível celular e molecular.³

O descobrimento de biomarcadores atualmente tem embasamento, principalmente, nas ciências ômicas. Estas buscam olhar para todo o conjunto de biomoléculas pertencentes a uma determinada classe (proteínas, metabólitos, RNAs) de um sistema biológico, e então investigar diferenças na concentração dessas biomoléculas entre os grupos de amostras estudados.^{4, 5, 6}

Entre genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma, o último é o mais representativo em relação ao fenótipo, constituindo-se por todos os compostos de baixa massa molecular (até 1500 DA) contidos em células participantes no

metabolismo geral.⁷ Do genoma (conjunto total dos genes) são sintetizados RNAs mensageiros (os quais compõem o transcriptoma) que sinalizam a síntese de proteínas (proteoma).⁸ Entretanto, nem todo gene desencadeia na produção de RNAs mensageiros, como também, nem toda proteína sintetizada apresenta atividades funcionais. Somando-se a isso, ainda há a influência bidirecional entre essas camadas biológicas, bem como a interferência do ambiente nelas⁹ e a complexidade do próprio sistema nervoso central. Assim, a análise dos metabólitos traz uma interpretação mais correlacionada ao fenótipo, permitindo uma visualização holística dos sistemas biológicos.

A metabolômica é uma ferramenta com um vasto espectro de aplicação, podendo ser usada para o estudo de reinos diversos: animal, vegetal, fungi; bem como para diferentes amostras biológicas (fluido cefalorraquidiano, sangue, urina e saliva, por exemplo, ou folhas, caules e raízes de plantas), permitindo a correlação de seu conteúdo biomolecular a algum estado fisiopatológico ou a alguma intervenção externa.

Dois abordagens gerais existem. A primeira é chamada de metabolômica *targeted*,¹⁰ ou metabolômica direcionada em Português, que foca na análise de metabólitos específicos ou de uma determinada classe. Tal abordagem exige um conhecimento prévio da biologia e da bioquímica por trás dos metabólitos investigados para a delimitação de um *design* de experimento que seja adequado. A segunda abordagem é denominada *untargeted*¹¹ ou metabolômica não direcionada, e consiste em uma investigação do conjunto de todo o metaboloma em um determinado material biológico com o intuito de se obter informações preliminares que permitam o planejamento de experimentos direcionados posteriores e investigações mais profundas.

Um ramo crescente dentro da área caracteriza-se pela lipidômica – o estudo do conjunto de todos os lipídios (lipidoma), das moléculas com as quais interagem e de suas funções dentro das células.¹² O fluxo de trabalho da metabolômica (e da lipidômica) consiste na coleta e a preparação das amostras que, em seguida, são separadas e submetidas à análise instrumental por técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida¹³ ou gasosa,¹⁴ acopladas à espectrometria de massas¹⁵ ou por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.¹⁶ Os dados instrumentais obtidos são submetidos a pré-tratamentos e pré-processamentos, seguidos da análise estatística e de sua interpretação dentro de um contexto biológico.¹⁷

Apesar de recentes, a metabolômica e a lipidômica vêm crescendo, apresentando continuamente novos *softwares*, novos modos de experimento e expandindo os bancos de dados utilizados constantemente. A lipidômica, apesar de ser ainda mais nova, apresenta grandes avanços, principalmente na questão de bancos de dados e *softwares*. Dessa forma, as duas abordagens se apresentam como ferramentas poderosas na investigação de alterações do metabolismo causados por estados fisio(pato)lógicos, bem como da resposta metabólica a tratamentos e intervenções terapêuticas, contribuindo com a expansão do conhecimento do funcionamento de sistemas biológicos.

1.2 Lipídios

Os lipídios consistem em um conjunto de biomoléculas hidrofóbicas, ou lipossolúveis, compostas por combinações de ácidos graxos ligados a várias outras estruturas químicas (**Figura 1**). Eles são classificados em oito classes

principais de acordo com o LIPID MAPS: ácidos graxos (do inglês *fatty acyls*, FA), glicerolipídios (do inglês *glycerolipids*, GL), glicerofosfolipídios (do inglês *glycerophospholipids*, GP), esfingolipídios (do inglês *sphingolipids*, SP), lipídios esteróis (do inglês *sterol lipids*, ST), lipídios prenóis (do inglês *prenol lipids*, PR), sacarolipídios (do inglês *saccharolipids*, SL) e policetídeos (do inglês *polyketides*, PK).^{18, 19}

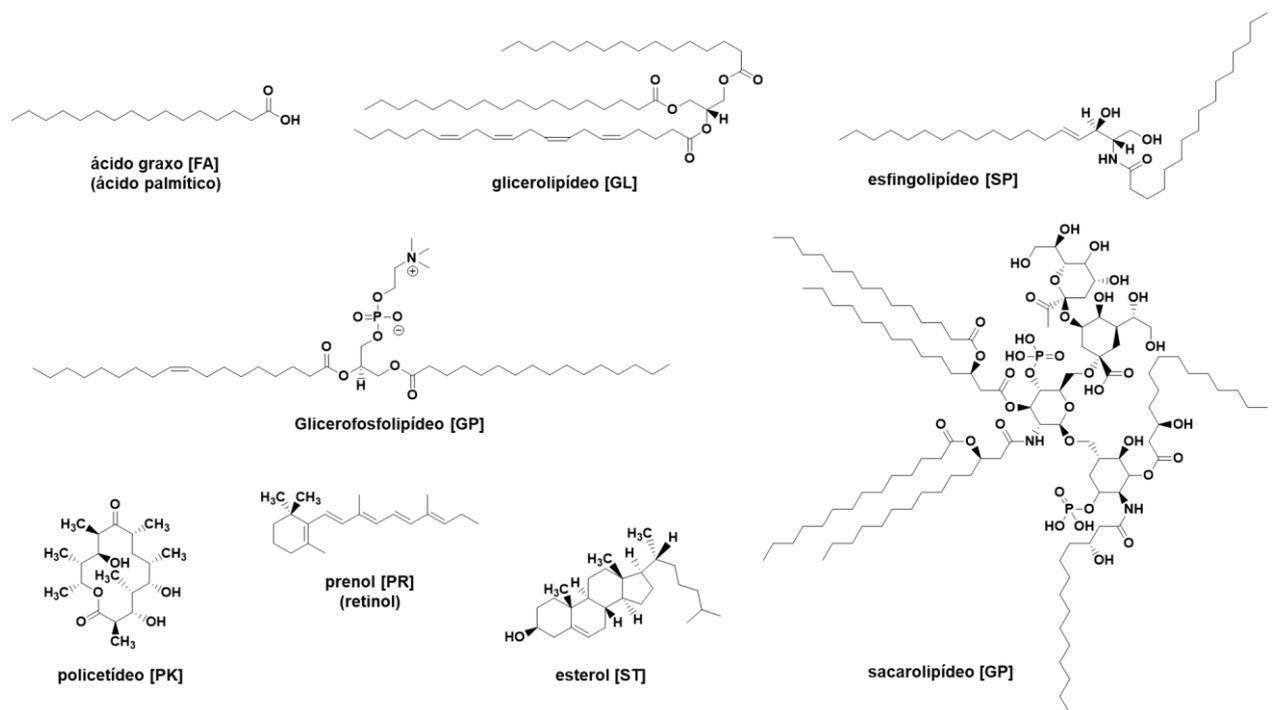


Figura 1 Exemplos das oito classes principais de lipídios de acordo com a classificação do LIPID MAPS.

De forma geral, os lipídios possuem importantes papéis em vias metabólicas, fazem parte das membranas celulares como componentes estruturais, estão envolvidos em reações bioquímicas como substratos, produtos ou cofatores, além de serem precursores de moléculas sinalizadoras importantes, como protectinas e resolvinas.^{12, 20} O cérebro é o local que possui a

maior proporção de lipídios após o tecido adiposo, com sua massa seca constituindo-se por uma proporção superior a 50 %, ¹² onde os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios são os principais constituintes das membranas neuronais.

Os glicerofosfolipídios (**Figura 1**) contribuem em cerca de 20 a 25 % em massa seca no cérebro de indivíduos adultos, sendo que nas membranas neuronais, juntamente com colesterol e glicolipídios, esse valor chega a ser de 50 a 60 %. ²¹ Também são encontrados na forma de esfingomielina na mielina, região que contém a maior quantidade de glicerofosfolipídios, ²² e são construídos a partir de uma molécula de glicerol ligado a um ácido graxo no carbono 2 e uma base fosforilada na posição três (colina, etanolamina, serina ou inositol).

Já os esfingolipídios (**Figura 1**) são lipídios compostos por uma cabeça polar e duas caudas formadas por cadeias hidrofóbicas e contém a esfingosina como base. São classificados tipicamente em ceramidas, esfingomielinas e glicoesfingolipídios e contribuem com cerca de 10 % na massa total de lipídios celulares. ²³ As esfingomielinas são constituintes importantes de membranas celulares no sistema nervoso central, apresentando altas concentrações na mielina, e são clivadas em ceramidas e fosfocolinas. ²⁴ Galactosilceramidas, uma subclasse das ceramidas, contribuem com até 2 % em massa seca na massa cinzenta do cérebro e com 12 % na massa branca, sendo componentes dos oligodendrócitos, os responsáveis pela formação de mielina. ²⁵

Os fosfolipídios são fundamentais para a arquitetura do cérebro, formando as bicamadas lipídicas que compõem as membranas celulares, gerando, assim, integridade estrutural para o órgão, como também são importantes para o bom

funcionamento do tecido cerebral, exercendo funções de estoque de energia. Além disso, são precursores de compostos mensageiros secundários como ácido araquidônico, ácido docosohexaenóico (DHA), ceramida, 1,2-diacilglicerol (do inglês *1,2-diacylglycerol*, DAG), ácido fosfatídico e ácido lisofosfatídico.²⁶

O primeiro lipídio a ser isolado e purificado (por cristalização) foi o colesterol no ano de 1834.²⁷ Desde esse primeiro isolamento, o interesse em torno dos lipídios e de suas funções cresceu. Atualmente, vários estudos relacionam distúrbios em seus metabolismos a patologias.^{28,29}

No campo das doenças psiquiátricas, interferências no metabolismo de lipídios, como o aumento de produtos provenientes da oxidação de lipídios causados por estresse oxidativo,³⁰ têm sido relacionadas com doenças neurodegenerativas como o transtorno da depressão maior (MDD).^{31,32} O estresse oxidativo ocorre quando há uma formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*, ROS) que excede a capacidade da célula de detoxificá-las.³³ O cérebro é considerado especialmente vulnerável a este processo, devido a sua alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (do inglês, *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) que apresentam vários sítios ativos de oxidação (ligações duplas).^{34,35}

Outros indícios fisiológicos da depressão compreendem alterações nas quantidades de lisofosfolipídios, monoglicerofosfolipídios e fosfoetanolaminas no soro sanguíneo de pacientes diagnosticados³⁶ e a correlação negativa entre as concentrações totais de colesterol e de lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein*, LDL) com sintomas depressivos.³⁷

Mesmo sendo descobertos há décadas atrás, muito ainda resta para se desvendar sobre os mecanismos envolvendo lipídios e a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, incluindo a depressão.

1.3 Depressão

A depressão é uma doença debilitante que pode levar ao suicídio e se manifesta em cerca de 3,8 % da população mundial, afetando a qualidade de vida de cerca de 280 milhões de pessoas e sendo um dos maiores responsáveis pelos problemas de saúde mundialmente.³⁸ Trata-se de uma doença de matriz complexa, na qual fatores biológicos, psíquicos e sociais estão envolvidos. Além de questões de pré-disposição genética,³⁹ por exemplo, estão fatores psicológicos, onde episódios de trauma durante o período da infância aumentam as chances de desenvolvimento da patologia na fase adulta. Pessoas que vivem em ambientes de alto estresse como em regiões de guerra também apresentam maior tendência de desenvolvê-la.⁴⁰

A depressão acarreta dificuldade em todos os aspectos e áreas da vida, incluindo as relações sociais, o campo do trabalho, o ambiente domiciliar e a escola. Seus sintomas se caracterizam por falta de concentração, excesso de sentimentos negativos como culpa ou de não validade, falta de esperança, problemas com sono, falta de energia, sensação de cansaço e pensamentos ruminantes e suicidas.⁴⁰ A patologia pode ser considerada leve, moderada ou forte dependendo da intensidade de seus sintomas, bem como pode ser classificada como refratária (ou resistente ao tratamento), quando o paciente já

passou por tratamentos com pelos menos dois antidepressivos pertencentes a classes distintas e não apresentou resposta de melhora.

Os primeiros avanços nos medicamentos para depressão se iniciaram em 1957 com a descoberta casual da atividade antidepressiva da isoniazida, um medicamento que era usado para o tratamento da tuberculose.⁴¹ Os antidepressivos tri e tetracíclicos (do inglês *tri-*, *tetracyclic antidepressants*, TCA), que apresentam sua atividade por meio da inibição da recaptação de noradrenalina e serotonina, e os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) foram desenvolvidos e utilizados por mais de trinta anos. Entretanto, devido à alta toxicidade dessas substâncias fez-se necessário o desenvolvimento de novos antidepressivos que apresentassem efeitos colaterais mais brandos.^{42,43}

Os TCAs apresentavam toxicidade ao disparar a atividade colinérgica e histaminérgica,^{44,45} enquanto que os IMAOs promovem o bloqueamento da degradação de neurotransmissores por períodos de até 14 dias, trazendo restrições de uso aos pacientes, devido ao efeito cruzado com outros medicamentos, como no caso de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs).

A ação conjunta de IMAOs com ISRSs pode levar à síndrome serotoninérgica que é causada por uma alta concentração de neurotransmissores na fenda sináptica, levando a um estado eufórico e causando confusão, rigidez muscular, convulsão, sudorese, balanços no ritmo cardíaco, podendo ser fatal.^{46, 47, 48} A ingestão de tiramisina junto com IMAOs também deve ser evitada, pois pode levar a um aumento da pressão sanguínea e a uma hemorragia cerebral.^{49, 50}

Posteriormente, outros antidepressivos, com mecanismos de atuação diferentes, e com efeitos colaterais menos nocivos (ganho de peso, distúrbios de sono e disfunção sexual),⁵¹ foram implementados no mercado farmacêutico como o ISRS⁵² e os inibidor seletivo de recaptção da serotonina e da norepinefrina (ISRSNs).⁵³ Independente da classe, os compostos antidepressivos apresentam eficácia semelhante, variando apenas em seus efeitos colaterais.

Além de a depressão ser muitas vezes diagnosticada de forma incorreta, menos de 50 % dos pacientes respondem a algum antidepressivo e muitos permanecem sob a medicação errada por muito tempo, trocam de medicamento muito rápido ou até o interrompem.^{54, 55} Nesse contexto, ainda há bastante campo para o desenvolvimento de novos antidepressivos, visto também que cerca de 2/3 dos pacientes são considerados resistentes ao tratamento, ou refratários, ou seja, já passaram por tratamento com pelo menos dois antidepressivos pertencentes a classes diferentes e não apresentaram respostas de melhora.^{56, 57}

A teoria decorrente do desenvolvimento dos primeiros antidepressivos é chamada de teoria das monoaminas^{58, 59} Segundo ela, casos de depressão são causados devido a uma redução da concentração de monoaminas na fenda sináptica. As monoaminas são neurotransmissores, e os antidepressivos foram desenvolvidos para a modulação de monoaminas como a serotonina e a dopamina, de forma a aumentar suas concentrações na fenda sináptica e reestabelecer seu reequilíbrio. Atualmente, porém, sabe-se que o reestabelecimento de tal equilíbrio ocorre de 24 a 48 horas após o início da

administração de antidepressivos, de forma que outros mecanismos devem estar envolvidos na fisiopatologia e no tratamento da depressão.^{60, 61}

Novas teorias bioquímicas vêm surgindo, dentre elas está a teoria das citocinas que relaciona os mecanismos de episódios de depressão a concentrações altas de agentes pró-inflamatórios no sistema nervoso central (SNC).⁶² Seus mecanismos estão sob investigação e também se relacionam ao envolvimento do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).^{63, 64} Este faz parte do sistema de resposta ao estresse, e quando ativado causa a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (do inglês *corticotrophin releasing factor*, CRF) no hipotálamo que causa a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (do inglês *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) pela glândula pituitária, disparando a liberação de glicocorticoides (cortisol) e também de monoaminas.⁶⁵

Com o avanço das tecnologias e o desenvolvimento de novas abordagens dentro da área científica, a complexidade do transtorno maior vem sendo progressivamente desvendada, possibilitando e auxiliando no desenvolvimento de medicamentos mais eficazes em seu tratamento e que apresentem menos efeitos colaterais. Porém, muito ainda há para ser descoberto sobre a fisiopatologia da doença.

1.4 Ayahuasca

A Ayahuasca é uma bebida psicodélica enteógena⁶⁶ preparada pela decocção das cascas do cipó *Banisteriopsis caapi* (*Spruce ex Griseb.*) Morton (Malpighiaceae)^a - o qual possui compostos alcaloides β -carbolínicos (harmina,

^a Os nomes científicos completos e a família das espécies foram consultadas no site Flora e Funga do Brasil (<https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/dr66>).

harmalina e tetrahydroharmina) - e pelas folhas do arbusto *Psychotria viridis Ruiz & Pav.* (Rubiaceae) - que possui altas quantidades do agonista serotoninérgico *N,N*-dimetiltryptamina (DMT),⁶⁷ duas plantas originárias da bacia amazônica. Seu nome tem origem no Quéchuá e pode ser traduzido como “cipó dos mortos” (*Aya* = morto, alma, espírito; *Waska* = cipó). Originalmente usada por povos ameríndios e mestiços diversos na bacia amazônica em rituais mágico-religiosos com diversas finalidades, como a de cura, divinação, contato com o sobrenatural, representa uma bebida sagrada e altamente respeitada pelos povos originários como pode ser notado no uso da bebida pelo povo Siona, onde o xamã toma a bebida e investiga o que ela traz para se ver. Caso as visões sejam de boa qualidade, o xamã distribui a bebida aos demais, que têm as mesmas visões, e os conduz por visitas a aldeias, confraternizações e aprendizados.⁶⁸

No povo Kaxinawá, o preparo da ayahuasca não é exclusivo do xamã e seu uso representa o meio de contato dos homens a partir da puberdade com o *yuxin*, o espírito que permeia tudo (as mulheres realizam tal contato através de desenhos). A bebida é utilizada para desprender o *bedun yuxin* (o próprio espírito) do corpo para que este esteja preparado para ir à aldeia celeste após a morte.⁶⁹

Já para o povo Tatuyo, a bebida é tomada para a realização de uma viagem ao tempo e lugar de origem, onde ainda não havia separação entre o Sol e as pessoas. A experiência vivida é a grande viagem primordial da sucuri como uma nova gênese do mundo, após a qual este se encontra forte e novo novamente.⁷⁰

A bebida adentrou o meio urbano brasileiro através do contato de trabalhadores rurais e seringueiros com indígenas na região amazônica do Acre e de Rondônia.^{71 - 76} Nesse contexto, um nome de destaque é Raimundo Irineu

Serra. Conhecido como mestre Irineu, foi o responsável pela fundação do Alto Santo, a primeira religião sincrética - integração de crenças cristãs, de origem africana e do espiritismo kardecista - a usar Ayahuasca como bebida sacramental.⁷⁷ O Alto Santo se restringe praticamente à região acreana, mas após a morte de mestre Irineu, houve a fundação da Igreja do Culto Eclético da Fluente Luz Universal (ICEFLU) por padrinho Sebastião, o qual ficou comumente conhecido como Santo Daime e se expandiu às demais regiões brasileiras, sendo mais popular do que sua igreja originária. Em 1945, ocorre a fundação da segunda religião ayahuasqueira, a Barquinha, por Daniel Pereira de Matos na zona rural de Rio Branco e, entre 1961 e 1965, se dá o processo de formação da União do Vegetal (UDV) por José Gabriel da Costa, conhecido como mestre Gabriel. As três religiões caracterizam um forte processo de sincretismo brasileiro, no qual crenças e práticas indígenas e oriundas do catolicismo, da umbanda, do espiritismo kardecista se mesclam consolidando um novo cenário religioso que se expande pelas demais regiões do país e ao exterior a partir da década de 1980 e atualmente se estabelece também nos Estados Unidos e em países da Europa, da Ásia e da África.^{78, 79} Tal expansão do uso da Ayahuaca implica em diversas questões étnico-sociais, incluindo a apropriação cultural desse conhecimento ancestral e o apagamento do uso indígena, a colheita predatória das espécies envolvidas, bem como de seu contrabando e adulteração da bebida.

Em termos da composição química da Ayahuasca, a DMT (oriunda da *P. viridis*) quando ingerida de forma isolada via oral é rapidamente metabolizada pela enzima monoamina oxidase A (MAO-A) encontrada no fígado e no intestino, não apresentando, portanto, seus efeitos psicoativos. Os compostos β -

carbolínicos provenientes da *Banisteriopsis caapi* encontrados na bebida inibem, entretanto, a atividade da MAO-A, de forma que as duas plantas apresentam um efeito sinérgico que permite com que as moléculas de DMT cheguem ao sistema nervoso central pela corrente sanguínea e se liguem aos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A/2A/2C}.^{80, 81}

Os efeitos psicodélicos alcançam seu máximo de intensidade entre uma hora e meia e duas horas após a ingestão e se caracterizam por alterações nas percepções cognitivas, um estado de consciência alterada transiente caracterizada por introspecção, visões, efeitos auditivos, maior velocidade de pensamento e maior facilidade para novas associações, emoções acentuadas e acesso à memória pessoal.^{82, 83} Os efeitos físicos englobam náusea e ocasionalmente *êmese*^b, a qual muitas vezes não é relatada como desconfortável e é vista como forma de limpeza física e espiritual. Pesquisas realizadas com usuários da Ayahuasca nas últimas duas décadas mostram que os ayahuasqueiros não apresentam sintomas de distúrbios psicológicos ou problemas neurocognitivos, mas, pelo contrário, apresentam funções cognitivas normais ou melhores, bem-estar maior e psicopatologias como depressão e ansiedade reduzidas.^{84, 85} Muitos também são os relatos de remissão de uso abusivo de substâncias, como álcool e cocaína.^{86, 87} A bebida se mostra segura quanto a surtos psicóticos, sendo raros os casos encontrados na literatura e quando relatados, foram facilmente contornados através de apoio psicológico-verbal ainda sob o efeito psicodélico. Os surtos psicóticos estão vinculados, de forma geral, a pré-disposições ou a pré-históricos familiares.^{88 - 90}

^b êmese: vômito

1.5 Potenciais da Ayahuasca no tratamento da depressão

O potencial terapêutico da Ayahuasca tem sido estudado nos últimos anos. O Projeto Hoasca,⁹¹ iniciado em 1993, foi o primeiro a investigar os mecanismos fisiológicos e psicológicos do seu uso e foi promovido pela colaboração de diversas instituições como o templo da UDV localizado na cidade de Manaus e centros de pesquisa, como o Departamento de Psiquiatria do Centro Médico UCLA Harbor, o Departamento de Neurologia da Escola de Medicina da Universidade de Miami, o Departamento de Psicologia da Universidade do Rio de Janeiro, o Departamento de Medicina Interna da Escola de Medicina da Universidade do Amazonas e o Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Kuopio na Finlândia.

O projeto foi um estudo piloto com 15 voluntários do sexo masculino que frequentavam a UDV há mais de 10 anos e 15 homens de status socioeconômico e idade semelhantes aos ayahuasqueiros e que não haviam tido contato prévio com a bebida. Os objetivos do estudo consistiram em obter dados preliminares sobre a bebida e seu consumo.

As concentrações dos alcaloides na bebida e no plasma sanguíneo foram medidas, bem como foram avaliadas a toxicidade da bebida e sua segurança sob seu efeito agudo e a longo prazo. Sob efeito agudo, as funções fisiológicas como batimento cardíaco, pressão sanguínea e diâmetro da pupila se mantiveram dentro dos parâmetros normais. Quanto aos resultados de longo prazo, os usuários de ayahuasca apresentaram melhor desempenho nas avaliações cognitivas e psicológicas, que compreenderam entrevistas diagnósticas, testes de personalidade e avaliações neurofisiológicas.^{82 - 85} Os

efeitos subjetivos e psicodélicos foram atribuídos à DMT pela correlação com seu pico de concentração no plasma sanguíneo. Porém, de acordo com as medidas fisiológicas, os efeitos são menos intensos do que os gerados pela aplicação de DMT isolada de forma intravenosa. Além disso, um aumento de receptores 5-HT foi identificado nos frequentadores da UDV quando comparado ao grupo controle por uma maior densidade de sítios serotoninérgicos nos ayahuasqueiros em relação ao grupo controle, indicando modificações na via da serotonina.^{71, 79, 92}

Estudos mais recentes apontam remissão quanto ao uso abusivo de substâncias, como álcool e cocaína, e deve-se destacar também seus efeitos ansiolítico e antidepressivo (já conhecidos pelos povos indígenas). Em 2007, dos Santos *et al.*⁹³ relataram que ayahuasqueiros pertencentes à UDV a longo prazo apresentam valores baixos para escalas de pânico e desesperança. Alguns anos depois, em 2016, Osório *et al.*⁹⁴ descreveram a redução de até 82 % em índices de escala de depressão em seis pacientes com depressão aguda após uma única dose da bebida nos dias 1, 7 e 21 subsequentes à ingestão em uma abordagem de estudo clínico aberto. Tal resultado foi corroborado posteriormente por Sanches *et al.*⁹⁵ em um trabalho semelhante envolvendo 17 pacientes.

Em 2018, o primeiro trabalho com placebo duplo-cego envolvendo 33 pacientes com MDD resistentes ao tratamento relatou diminuição em índices de escala de depressão, como o HAM-D (*Hamilton Depression Rating Scale*) e MADRS (*Montgomery Åsberg Depression Rating Scale*) sob o efeito agudo e 1, 2 e 7 dias após aplicação de uma única dose de Ayahuasca (Palhano Fontes *et al.*)⁹⁶ Níveis basais de cortisol foram medidos, onde os pacientes apresentaram

maiores valores em comparação ao grupo controle. Os valores subiram para os dois grupos durante o efeito agudo da Ayahuasca, porém, dois dias após a administração os níveis baixaram e não houve distinção entre os dois grupos.⁹⁷ Embora os níveis de BDNF não puderam discriminar o grupo controle e de pacientes, a administração da Ayahuasca aumentou sua concentração em ambos os grupos que apresentou uma correlação negativa com os sintomas depressivos no grupo de pacientes.⁹⁸ A proteína reativa C, um biomarcador de inflamação, também foi medida, estando em maior concentração no grupo de pacientes, e a qual foi baixada em ambos os grupos com a administração de Ayahuasca e apresentou correlação com a diminuição dos sintomas depressivos.⁹⁹

Os efeitos antidepressivos e ansiolíticos da bebida podem ser associados aos alcaloides inibidores da MAO-A - abordagem conhecida para o tratamento desse distúrbio - e à função inibidora de recaptção de serotonina da tetrahydroharmina - mecanismo de antidepressivos convencionais - que aumentam a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica e contribuem para o efeito antidepressivo.¹⁰⁰ Outro possível sítio de ação ansiolítica e antidepressiva da bebida seria o receptor Sigma-1, o qual poderia ser em parte responsável pelos efeitos, já que alguns antidepressivos como fluvoxamina são agonistas desse receptor.¹⁰¹

A ação da DMT no receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} é majoritariamente pré-sináptica e tem sido associada à atividade inibitória. O receptor 5-HT_{2A} é o que caracteriza uma substância psicodélica e quando acionado, aumenta o disparo neuronal através de potenciais e correntes excitatórias pós-sinápticas, estando envolvido também nos efeitos antidepressivos.¹⁰²

Apesar de seus potenciais, os estudos laboratoriais acerca da Ayahuasca estão ainda em seu início. A bebida contendo DMT mostra resultados promissores quanto ao seu uso terapêutico. Uma grande vantagem da sua aplicação no tratamento do distúrbio depressivo é que o composto, assim como outras substâncias psicodélicas – LSD, psilocibina e cetamina – apresenta efeitos antidepressivos e ansiolíticos poucas horas após sua ingestão,¹⁰³ o que contrasta com o tempo de efeito dos antidepressivos convencionais que podem ser de dias a semanas, ou até mesmo não surtirem efeito.^{104, 105}

A aplicação das ciências ômicas no estudo do uso da Ayahuasca como potencial tratamento alternativo ao MDD mostra a possibilidade da investigação dos mecanismos fisiológicos envolvidos em tal patologia e na ação antidepressiva dos alcaloides encontrados na bebida, como também abre margens ao desenvolvimento de um tratamento baseado na medicina personalizada, auxiliando no diagnóstico e no tratamento da doença.¹⁰⁶

2. Objetivos

Os objetivos gerais desse trabalho consistiram na investigação dos distúrbios metabólicos causados pela depressão refratária, bem como dos efeitos modulatórios no metabolismo da administração da bebida psicodélica Ayahuasca. Para isso, os objetivos específicos consistiram em:

- Extrair amostras de soro sanguíneo e separá-las em suas fases orgânica (lipídios), aquosa (metabólitos) e sólida (proteína).
- Analisar as fases orgânica e aquosa por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS).
- Converter, tratar e processar os dados obtidos com o auxílio de ferramentas computacionais.
- Anotar putativamente os *features*
- Analisar e comparar os grupos de pacientes e controle entre si.
- Analisar e comparar o grupo de pacientes antes e depois da administração de Ayahuasca e de placebo.
- Analisar e comparar o grupo controle antes e depois da administração de Ayahuasca e de placebo.

- Comparar os resultados obtidos das comparações acima para excluir os *features* que foram modulados por placebo.
- Analisar os compostos e as vias metabólicas comuns entre a depressão e a administração de Ayahuasca.
- Interpretar os resultados obtidos bioquimicamente.

3. Parte experimental

Este trabalho é uma análise secundária de um estudo controlado e randomizado (RCT) no qual o potencial antidepressivo da ayahuasca foi investigado em indivíduos saudáveis (controles) e em pacientes com depressão refratária.⁹⁶ O estudo foi realizado no Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Brasil e registrado em <http://clinicaltrials.gov> (NCT02914769, registrado em 23/09/2016) com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Médica do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP/HUOL) (nº 579.479) (Anexos). O estudo obedeceu aos padrões éticos estabelecidos pelos comitês nacionais e institucionais relevantes para experimentação humana e seguiu os princípios da Declaração de Helsinque de 1975, revisada em 2008. Uma declaração de consentimento por escrito foi obtida de todos os participantes.

3.1 Aquisição e preparo de amostras

Amostras de soro sanguíneo

As amostras de soro sanguíneo de pacientes com depressão, tratados com placebo ou com Ayahuasca, e de indivíduos saudáveis foram obtidas em colaboração com os Professores Dráulio Barros de Araújo e Nicole Leite Galvão Coelho (Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal), compreendendo 51 voluntários (P, n= 20 e C, n = 31), todos dentro da faixa etária de 18 a 60 anos. Nenhum dos participantes havia tido contato prévio com nenhum psicodélico clássico como ayahuasca, LSD, psilocibina ou mescalina.

Todos os participantes foram submetidos a avaliações clínicas abrangentes de saúde mental e entrevistas com psiquiatras treinados para garantir que os critérios de inclusão e exclusão fossem rigorosamente observados. A Entrevista Clínica Estruturada para o Eixo I (SCID; DSM-IV) foi usada para avaliar esses critérios em todos os participantes. Para os pacientes, a SCID também foi usada para confirmar o diagnóstico de depressão maior unipolar, e a gravidade de seus sintomas foi avaliada com a Escala de Avaliação de Depressão de Montgomery-Åsberg (MADRS).

O grupo de controle (indivíduos saudáveis) foi composto por adultos que atenderam aos seguintes critérios de inclusão: sem distúrbios neuropsiquiátricos ou histórico de distúrbios neuropsiquiátricos, sem doenças inflamatórias ou metabólicas atuais ou gravidez e sem uso de medicamentos que afetem as funções cognitivas, de humor, neurovegetativas, imunológicas ou endócrinas.

Os pacientes incluídos no estudo estavam atualmente sofrendo de um episódio depressivo moderado a grave, conforme indicado por uma pontuação de 17 ou mais na Escala de Depressão de Hamilton (HAM-D). Eles também tinham um diagnóstico confirmado de depressão resistente ao tratamento, definido como uma resposta inadequada, ou seja, incapacidade de alcançar a remissão, após pelo menos dois tratamentos com antidepressivos de classes diferentes.

Os critérios de exclusão para os pacientes incluíam gravidez, distúrbios neurológicos atuais ou anteriores, histórico pessoal ou familiar de esquizofrenia, transtorno afetivo bipolar, mania ou hipomania, transtornos por uso de substâncias e suicídio. Durante o estudo, todos os pacientes foram submetidos

a uma fase de "washout"^c de duas semanas, na qual tiveram de interromper a medicação antidepressiva. A duração dessa fase de "washout" foi adaptada à meia-vida da medicação anterior dos pacientes para garantir a eliminação completa do organismo.

Aos participantes foi administrada Ayahuasca ou placebo em seções de 8 horas de duração (das 8:00 às 16:00, com a administração ocorrendo às 10:00 após um café da manhã leve) em uma sala confortável equipada com cama, poltrona reclinável, ar condicionado e iluminação natural e reduzida. Eles também foram informados que poderiam receber Ayahuaca ou placebo e que poderiam ou não sentir alguma coisa independente da bebida administrada. O experimento ocorreu em um *design* duplo-cego, onde nem os participantes, nem os administradores sabiam da identidade da bebida oferecida.

Ayahuasca

Para o estudo, foi utilizado um único lote de Ayahuasca preparada e fornecida sem custo por uma filial da Igreja da Barquinha localizada em Ji-Paraná-RO, Brasil. As concentrações exatas dos ingredientes da bebida foram determinadas por espectrometria de massas e foram as seguintes: $0,36 \pm 0,01$ mg/ml de DMT, $1,86 \pm 0,11$ mg/ml de harmina (HME), $0,24 \pm 0,03$ mg/ml de harmalina (HML) e $0,20 \pm 0,05$ mg/ml de tetrahydroharmina (THH). Acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AB8AC9C (Anexos).

^c Washout: lavagem

Placebo

Como placebo foi utilizada uma mistura amarga de coloração marrom composta por água, fermento, ácido cítrico, sulfato de zinco e corante caramelo com o intuito de simular as propriedades organolépticas (cor e sabor) da ayahuasca.

Os indivíduos participantes do estudo receberam doses de Ayahuasca ou de placebo de 1ml/Kg e foram divididos em quatro grupos: indivíduos controles que foram submetidos à ingestão de uma dose de Ayahuasca, controles submetidos à ingestão de placebo e dois outros grupos submetidos aos mesmos tratamentos, porém, compostos de pacientes com depressão resistente ao tratamento, que ingeriram ayahuasca e que ingeriram placebo. Destes indivíduos, foram coletadas amostras de sangue no tempo basal (tempo zero, pré-tratamento) e no tempo 48 h (em relação à ingestão das doses de placebo ou Ayahuasca), totalizando 76 amostras. A **Tabela 1** apresenta o número de replicatas biológicas presentes em cada grupo.

Tabela 1. Descrição do número de replicatas biológicas por grupo

Controle basal (C)	Depressão basal (D)	Depressão Ayahuasca (DA)	Depressão Placebo (DP)	Controle Ayahuasca (CA)	Controle Placebo (CP)
24	10	7	8	13	14

*Em experimentos de metabólômica são utilizadas replicatas biológicas, ou seja, amostras de indivíduos na mesma condição fisio(pato)lógica, de modo que não necessariamente a soma de amostras nos grupos após administração de Ayahuasca ou placebo se iguale ao número de amostras nos grupos basais correspondentes.

Após a coleta do soro, as amostras foram mantidas em biofreezer a -80 °C até o momento das análises para as quais as amostras foram preparadas por meio de extração líquido-líquido em microescala, utilizando os solventes clorofórmio, metanol, éter tert-butil metílico (MTBE) e uma solução 0,1 % (m/m) de acetato de amônio, com base no método de extração simultânea de metabólitos, proteínas e lipídios (SIMPLEX).¹⁰⁷ Neste tipo de extração, 225 µL de metanol e 750 µL de MTBE são adicionados a 30 µL da amostra a 0 ° C, seguida de agitação vigorosa por 5 segundos, após a qual 188 µL de uma solução de acetato de amônio 0,1 % são adicionados, seguidos de nova agitação e, então, centrifugação por 10 min (12000 g, 4 °C). Ao fim, obtém-se um sistema de três fases: uma fase superior orgânica, na qual os lipídios são extraídos da amostra, uma fase aquosa intermediária contendo os metabólitos e uma terceira fase, sólida, contendo as proteínas. As fases orgânica e aquosa foram separadas e seus solventes evaporados com auxílio de um concentrador centrífugo a vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) para posteriormente serem ressuspendidas e analisadas.

3.2 Análises por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

As análises dos lipídios e dos metabólitos previamente extraídos das amostras de soro foram realizadas usando-se um espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador de massas do tipo Orbitrap (Orbitrap Q-Exactive, Thermo Scientific, Waltham, EUA) acoplado a um

cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UltiMate™ 3000 RSLCano system, Thermo Scientific, Waltham, EUA).

Para a separação dos lipídios, foi usada uma coluna cromatográfica C18 ACQUITY UPLC® BEH C18 com dimensões 2,1 x 50 mm, tamanho de partícula 1,7 µm (Waters, Milford, MA, EUA), uma fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila e água (40:60) com 10 mmol L⁻¹ de acetato de amônio (Fase A) e outra composta por uma mistura de acetonitrila e isopropanol (10:90) com 10 mmol L⁻¹ de acetato de amônio (Fase B) e programação de gradiente constituindo-se em 40 % de B por 2 minutos, 50 % de B por 3 minutos, aumento gradativo até 70 % de B por 2 minutos, 70 % de B por 1 minuto, aumento gradativo até 100 % de B por 2 minutos, 100 % por 1 minuto, diminuição gradativa até 40 % de B por 1 minuto e 40 % de B por 2 minutos, totalizando a duração de 14 minutos. As análises por espectrometria de massas foram realizadas em modo ESI positivo e negativo, visando abranger diferentes classes de lipídios.

Para a separação dos metabólitos, a mesma coluna cromatográfica foi utilizada, porém usando-se uma solução aquosa de acetato de amônio na concentração de 10 mmol L⁻¹ como fase móvel A e acetonitrila como fase B (apesar da coluna utilizada não ser a ideal para análises metabolômicas, a mesma foi utilizada como um teste e modo de adquirir informações adicionais, já que o foco principal do trabalho foram as análises lipidômicas). Para a corrida cromatográfica foi feita a seguinte programação: 10 % de B por 2 minutos, aumento gradativo de 10 % a 90 % de B em 5 minutos, 90 % de B por 2 minutos, 10 % de B por 2 minutos e mais 2 minutos de 10 % de B finais, totalizando 13

minutos por corrida. As análises por espectrometria de massas também foram realizadas nos modos ESI negativo e positivo.

Para ambos os experimentos lipidômicos e metabolômicos, foi programada a obtenção do espectro de fragmentação (MS^2) dos cinco íons mais intensos de cada pico cromatográfico (*data-dependent acquisition mode*) com obtenção de razões m/z de 50 a 1500 Da no modo *profile*. Os parâmetros de ESI foram voltagem de spray de 3.5 kV para o modo positivo e de -3.2 kV para o modo negativo, temperatura do capilar de 300 °C, fluxo do gás de arraste de 35 unidades arbitrárias, fluxo do gás auxiliar de 10 unidades arbitrárias e level de *S-Lens RF* de 50.

As amostras foram ressuspensas em 400 μ L de uma mistura das fases móveis A e B (60:40) de acordo com sua classificação (fase orgânica ou aquosa) e analisadas em batelada e de modo randomizado. Visando assegurar a qualidade dos dados obtidos, controles de qualidade (QCs) e brancos foram analisados repetidamente e intercaladamente com as amostras clínicas. Os QCs foram preparados a partir da extração de uma mistura de 5 μ L de todas as amostras analisadas no trabalho e foram utilizados dois tipos de branco diferentes, um consistindo em metanol e outro foi o resultado do processo de extração aplicado a frascos vazios, de modo que qualquer viés introduzido às amostras durante a extração, também fosse introduzido nestas amostras de branco. As amostras de QC e branco foram analisadas intercaladamente com as amostras reais, sendo repetidas sempre após a análise de 10 amostras. Padrões internos não foram utilizados neste trabalho.

3.3 Processamento e pré-tratamento dos dados

Os dados metabolômicos obtidos pelo sistema de UHPLC-Orbitrap-MS foram tratados diretamente no *software* MS-DIAL,¹⁰⁸ enquanto que os dados lipidômicos foram convertidos de .RAW para .mzML por meio do *software* MSConvertGUI da Proteowizard.¹⁰⁹ Os parâmetros utilizados para conversão foram *Binary encoding precision*: 64 bit, *SIM as spectra*, *SRM as spectra*, os filtros foram *MS levels*: 1 e 2, *Analyzer type*: orbi, e *Scan polarity* foi ajustada em negativo e positivo para cada um dos conjuntos de dados, respectivamente.

Os dados convertidos foram submetidos ao *software* MS-DIAL¹⁰⁸ para alinhamento, correções do tempo de retenção e da razão *m/z*, bem como para anotação putativa por meio da comparação dos espectros dos íons moleculares e dos espectros de fragmentação (MS/MS) dos cinco íons mais intensos de cada pico cromatográfico com uma biblioteca interna do *software* para experimentos de lipidômica. Para *Mass accuracy*, *MS1 tolerance* e *MS² tolerance* foram ajustados em 0,02 Da e 0,06 Da; para *Data collection parameters (Advanced)*, *Retention time begin* e *Retention time end* foram ajustados em 0 min e 14 min, *MS1 mass range begin* e *MS1 range end* foram 0 Da e 1500 Da, *MS/MS mass range begin* e *MS/MS mass range end* foram 0 Da e 1200 Da. Em *Peak detection parameters*, *Minimum peak height* foi ajustado para 100000 e *Mass slice width* para 0,1 Da. Em *Deconvolution parameters*, *Sigma window value* foi ajustado em 0,5 e *MS/MS abundance cut off* para 30. Os adutos selecionados, nos modos negativo e positivo foram [M-H]⁻, [M-H₂O-H]⁻, [M+Na-2H]⁻, [M+Cl]⁻, [M+K-2H]⁻, [M+Br]⁻, [M+CH₃COONa-H]⁻, [2M-H]⁻, [3M-H]⁻, [M-2H]⁻, [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺, [M+CH₃OH+H]⁺, [M+K]⁺, [M+Li]⁺, [M+ACN+H]⁺, [M+H-H₂O]⁺, [M+2Na-

H]⁺, [M+IsoProp+H]⁺, [M+ACN+Na]⁺, [M+2K-H]⁺, [M+2ACN+H]⁺, [M+IsoProp+Na+H]⁺, [M-C₆H₈O₆+H]⁺, [2M+H]⁺, [2M+NH₄]⁺, [2M+Na]⁺, [2M+3H₂O+2H]⁺, [2M+K]⁺, [2M+ACN+H]⁺, [2M+ACN+Na]⁺, [2M+H]²⁺, [M+H+NH₄]²⁺, [M+H+Na]²⁺, [M+H+K]²⁺, [M+ACN+2H]²⁺, [M+2Na]²⁺, [M+2ACN+2H]²⁺, [M+3ACN+2H]²⁺, [M+3H]³⁺, [M+2H+Na]³⁺, [M+H+2Na]³⁺ e [M+3Na]³⁺. Para as análises de metabolômica, o aduto [M-3H]³⁻ também foi selecionado. Em *Alignment parameters setting*, a amostra QC2_1 foi selecionada como *Reference file*, *Retention time tolerance* foi 0,5 min e *MS1 tolerance* foi 0,02 Da. Em *Advanced*, *Remove features based on blank information* foi selecionado.

Os dados processados foram exportados em forma de uma tabela no formato .csv, com as amostras organizadas em colunas e os *features* (tempos de retenção e *m/z*) em linhas, contendo informações sobre adutos, aquisição de MS², ontologia, e anotação putativa baseada na nomenclatura do LipidMaps.¹¹⁰ A tabela foi, então, submetida ao *software* online MetaboAnalyst 5.0 para realização das análises estatísticas.

3.4 Análises estatísticas

Com base na tabela exportada pelo MS-DIAL, tabelas contendo dois e três grupos foram extraídas, de modo a realizar análises estatísticas uni e multivariadas. As tabelas extraídas consistiram nas seguintes combinações de grupos: C vs. D vs. CA, C vs. D vs. CP, C vs. D vs. DA, C vs. D vs. DP, C vs. D, C vs. CA, C vs. CP, D vs. DA e D vs. DP.

As tabelas foram então submetidas ao *software* online MetaboAnalyst versão 5.0 para as análises estatísticas que consistiram na aplicação de análises univariadas, ANOVA para as tabelas contendo três grupos e *Volcano Plot* para as tabelas contendo dois grupos, e análises multivariadas como PCA e PLS-DA. A análise de agrupamento hierárquico (*hierarchical clustering analysis*, HCA) também foi aplicada aos conjuntos de *features* diferenciais encontrados para cada comparação de grupos.

3.5 *Features* diferenciais

Os *features* diferenciais foram extraídos das análises univariadas e seus valores de *p-value* e *fold change* foram combinados com os valores de *VIP score* dos modelos de PLS-DA.

Com exceção de uma comparação (C vs. D vs. DA) nas análises metabolômicas no modo negativo, nenhuma análise por ANOVA apresentou *features* diferenciais. Assim, para avaliar possíveis metabólitos em comum entre a depressão e as intervenções nos dois grupos no estudo, os *features* diferenciais obtidos pelas análises de *Volcano Plot* para as cinco comparações de grupo dois a dois foram submetidos à análise por diagrama de Venn, construídos com a ferramenta disponível em: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Tais *features* diferenciais apresentaram valores de *VIP* maiores que 1 nos modelos de PLS-DA para as mesmas comparações.

3.6 Análise de vias metabólicas

Os lipídios que se mostraram em comum entre os distúrbios causados pela depressão e pelas alterações causadas pela intervenção com Ayahuasca em um ou em ambos os grupos (controle e pacientes com depressão) foram submetidos ao *software* online LIPEA (<https://lipea.biotec.tu-dresden.de/home>)¹¹¹ para enriquecimento e análise das vias metabólicas associadas aos mesmos.

Quanto aos metabólitos, após anotados, informações acerca de suas atividades biológicas foram procuradas em artigos científicos.

4 Resultados e discussão

Para a realização das análises estatísticas, inicialmente, diferentes condições foram testadas, a fim de se observar seus impactos nos modelos estatísticos construídos. Tais condições envolveram a aplicação das análises estatísticas aos dados obtidos por UHPLC-MS em modo ESI negativo e em modo ESI positivo de maneira unificada (juntando-se as tabelas após o processamento pelo MS-DIAL para ambos os modos), e também tratando-se os dados em tabelas separadas; a utilização somente de *features* anotados por meio de espectros de MS², bem como da aplicação também daqueles que foram anotados apenas com informações de MS¹; e a aplicação ou não de filtros como *Relative Standard Deviation* (RSD) e *Interquartile Range* (IQR), resultando em 6 condições distintas.

Sobre o panorama do trabalho, essas condições foram aplicadas inicialmente em análises multivariadas por ANOVA comparando-se grupos três a três tendo sempre os grupos basais (D e C) comparados a cada um dos tratamentos (DA, DP, CA e CP), resultando em quatro conjuntos de análises estatísticas para cada condição (D vs. C vs. CA, D vs. C vs. CP, D vs. C vs. DA, D vs. C vs. DP). Entretanto, estas análises por ANOVA das comparações de grupos três a três não apresentaram *features* diferenciais para nenhuma comparação (exceto para D vs. C vs. DA no experimento de metabolômica no modo ESI negativo em somente uma das seis condições). Devido a este resultado único, modelos de Volcano Plot foram aplicados a comparações de grupos dois a dois (D vs. C, DA vs. D, DP vs. D, CA vs. C e CP vs. CP) para a obtenção de *features* diferenciais que discriminassem os grupos comparados.

Os mesmos grupos dois a dois também foram submetidos a análises multivariadas de PLS-DA para confirmação dos *features* diferenciais por seus valores de VIP score.

Quanto aos modelos (multivariados) de PLS-DA construídos, estes não apresentaram valores de figuras de mérito aceitáveis quando aplicados aos conjuntos de todas as variáveis, principalmente os valores de Q^2 que, majoritariamente, foram negativos. Ainda assim, seus valores de VIP score para os *features* diferenciais que também foram encontrados por *Volcano Plot* foram avaliados e apresentaram valores maiores que 1. Estes *features* diferenciais foram extraídos das tabelas originais e resubmetidos à análise estatística, resultando em modelos de PLS-DA com valores de figura de mérito aceitáveis, incluindo valores satisfatórios para algumas comparações (D vs. C, DA vs. D e DP vs. D).

Após a obtenção dos *features* diferenciais por *Volcano Plot* e confirmação por PLS-DA para cada uma das comparações de grupos dois a dois, estes *features* foram submetidos a um diagrama de Venn (para cada uma das condições testadas), com o intuito de se observar os *features* diferenciais comuns entre os distúrbios causados pela depressão refratária e seu tratamento com Ayahuasca, bem como de sua prevenção (D vs. C, DA vs. D e CA vs C) e excluir aqueles que também se apresentassem comuns aos grupos aos quais foi administrado placebo (DP e CP). Do diagrama de Venn da melhor condição (aquela que resultou no maior número de *feautres* diferenciais), os *features* diferenciais comuns entre os grupos de interesse foram obtidos e submetidos a análises de vias metabólicas para o entendimento dos processos biológicos e

bioquímicos envolvendo a depressão, seu tratamento e prevenção com Ayahuasca.

4.1 Análises univariadas

4.1.1 Investigação da fase orgânica

De modo geral, nos modelos univariados de Volcano Plot construídos para as comparações de grupos dois a dois, não foi possível a avaliação de falsos positivos, sendo que as listas contendo *features* diferenciais só puderam ser obtidas por meio de seus valores de *raw p-value*. A aplicação de *false discovery rate* (FDR) nos modelos de *Volcano Plot* do MetaboAnalysyt resultou em apenas um *feature* diferencial para a comparação D vs. C e outro para a comparação CA vs. C nos experimentos de lipidômica, cujas identificações foram PI 16:3_32:9 (KEGG ID C01194) e FA 9:0, respectivamente. Apesar do fosfatidilinositol PI 16:3_32:9 alterado pela depressão já estar correlacionado a vias metabólicas como metabolismo de glicerofosfolípidios,¹¹² metabolismo de fosfato de inositol¹¹³ e autofagia¹¹⁴ que já foram relatadas na literatura científica como envolvidas em casos de depressão, este *feature* diferencial foi exclusivo para a comparação D vs. C e não apresenta um composto comum entre os distúrbios causados pela doença e pelas modulações metabólicas geradas pela Ayahuasca. Do mesmo modo, o ácido pelargônico (FA 9:0, HMDB0000847), um ácido graxo, é vinculado à ontologia da esquizofrenia de acordo com o HMDB, porém, foi um *feature* diferencial exclusivo para as alterações da aplicação de

Ayahuasca ao grupo controle, não consistindo em um ponto em comum com a depressão.

Para o primeiro teste de análises, as tabelas exportadas pelo programa MS-DIAL para o modo ESI negativo e para o modo ESI positivo foram unificadas com utilização do *software* R. Ambas as tabelas foram carregadas no *software*, combinadas com a função *cbind* e exportadas em uma tabela única com a função *write.csv*. Da tabela unificada, as sub-tabelas contendo os grupos a serem comparados foram, então, extraídas e submetidas às análises estatísticas no *software* MetaboAnalyst, à princípio, apenas com os lipídios que foram anotados pelo MS-DIAL por meio da comparação de espectros MS² obtidos com uma biblioteca interna (**Condição 1**). Nenhum filtro foi usado, apenas a normalização na mediana, a transformação logarítmica e o escalamento do tipo Pareto (realizado subtraindo-se de cada elemento de uma coluna o valor médio da respectiva coluna e dividindo a subtração pela raiz quadrada do desvio padrão dessa coluna).¹¹⁵ Comparando-se os *features* diferenciais encontrados nas cinco comparações (D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D) em um diagrama de Venn (**Figura 2**), verificou-se que nenhum lipídio (*feature*) se mostrou comum entre as alterações causadas pela depressão e as intervenções do estudo (Ayahuasca ou placebo) em ambos os grupos (pacientes e controles), porém, dois lipídios se mostraram comuns entre as modulações causadas pela administração de Ayahuasca a ambos os grupos controle e de pacientes, PC 38:6|PC 16:0_22:6 e PC 36:4|PC 16:0_20:4.

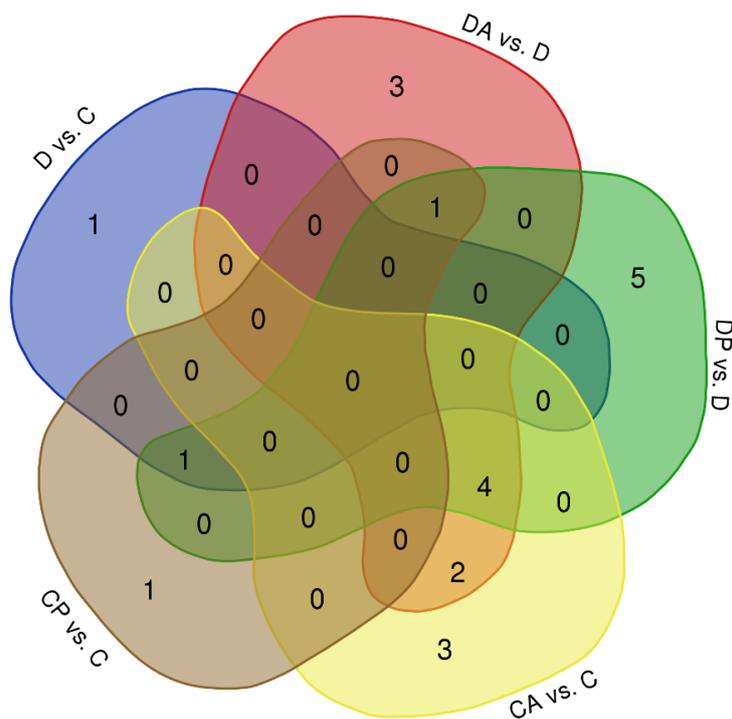


Figura 2. Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 1**). Apenas os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL foram considerados.

Uma nova análise foi feita com as mesmas condições (sem filtro, normalização na mediana, transformação logarítmica na base 10 e escalamento do tipo Pareto), porém, incluindo também os *features* que foram anotados apenas por MS¹ (**Condição 2**). Os resultados retornaram um número maior de *features* diferenciais encontrados para cada comparação e, observando-se os *features* diferenciais apontados pelo diagrama de Venn (**Figura 3**), dois lipídios comuns às alterações causadas pela depressão e pela administração de Ayahuasca a pacientes depressivos foram observados: NAGlySer 8:0;O(FA 16:2) e AAHFA 18:5/15:3;O.

um diagrama de Venn (**Figura 4**), não houve nenhum que se apresentou comum entre a depressão e ao tratamento com Ayahuasca, em ambos os grupos de pacientes e controle.

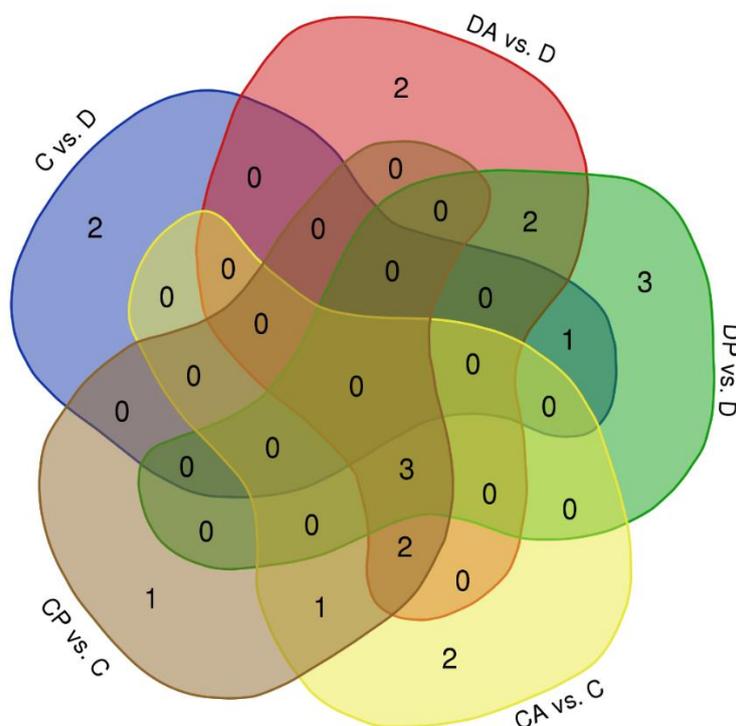


Figura 4. Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 3**). Apenas os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL foram considerados.

Passou-se, então, à análise das tabelas contendo também os dados de *features* anotados apenas por espectros de MS¹ (**Condição 4**). Devido ao baixo número de *features* encontrados nas análises estatísticas aplicadas às tabelas separadamente contendo informações de MS² (**Condição 3**), nenhum filtro foi aplicado, a princípio, às tabelas contendo também as informações de MS¹. Um número maior de *features* diferenciais foi encontrado para cada uma das

comparações dois a dois (**Figura 5**). Sete lipídios se apresentaram comuns aos distúrbios causados pela doença e pela administração de Ayahuasca ao grupo de pacientes (HexCer 16:0;O2/19:2, NAGlySer 8:0;O(FA 16:2), SL 12:2;O/32:6, AAHFA 18:5/15:3;O, NAGlySer 20:2;O, LPS-N (FA 7:0)8:0 e PS 25:3) e três lipídios se mostraram comuns entre a depressão e a aplicação de Ayahuasca ao grupo controle (SPB 16:1;O3; Cer 12:2;O2/14:1 e LPS 18:4). Além disso, três lipídios se mostraram comuns entre as modificações causadas pela administração de Ayahuasca em ambos os grupos controle e de pacientes (PC O-20:4_22:6;O3; PC O-12:0_22:4;O1 e PC O- PC O-14:0_22:4;O1).

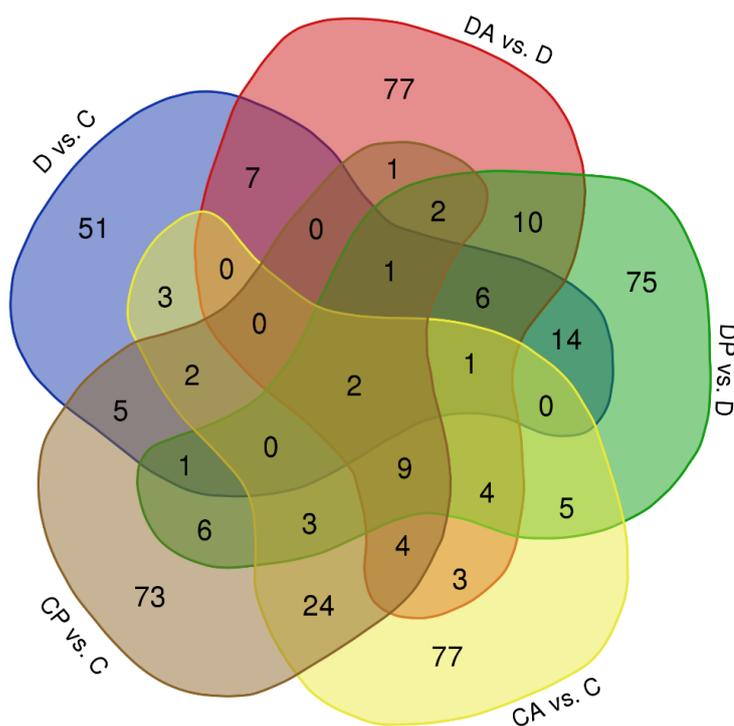


Figura 5. Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 4**). Foram considerados os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS¹ e de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL.

Comparando-se as **Condições 2** (unificada, MS¹ e MS², sem filtro) e **4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro), nota-se que a análise dos dados obtidos separadamente retornou melhores resultados quando comparada à análise dos dados de maneira unificada, visto que esta foi a única diferença entre as duas condições. Dessa forma, considerando a **Condição 4**, foram aplicados filtros estatísticos aos dados para averiguação de seus impactos sobre os resultados obtidos, uma vez que a aplicação dos mesmos aumenta a rigorosidade dos modelos construídos, pois excluem uma parcela das variáveis.

Assim, a **Condição 5** (separada, MS¹ e MS², RSD) consistiu na aplicação do filtro de desvio padrão relativo (RSD) de 25 % e a **Condição 6** (separada, MS¹ e MS², IQR) consistiu na aplicação do filtro de IQR com exclusão de 40 % das variáveis (20 % de cada cauda da gaussiana). De acordo com a **Figura 6**, com a aplicação de RSD (**Condição 5**), dois lipídios se mostram comuns entre a depressão e a aplicação de Ayahuasca ao grupo controle: NAGlySer 8:0;O(FA 22:6) e MGDG O-26:7_2:0.

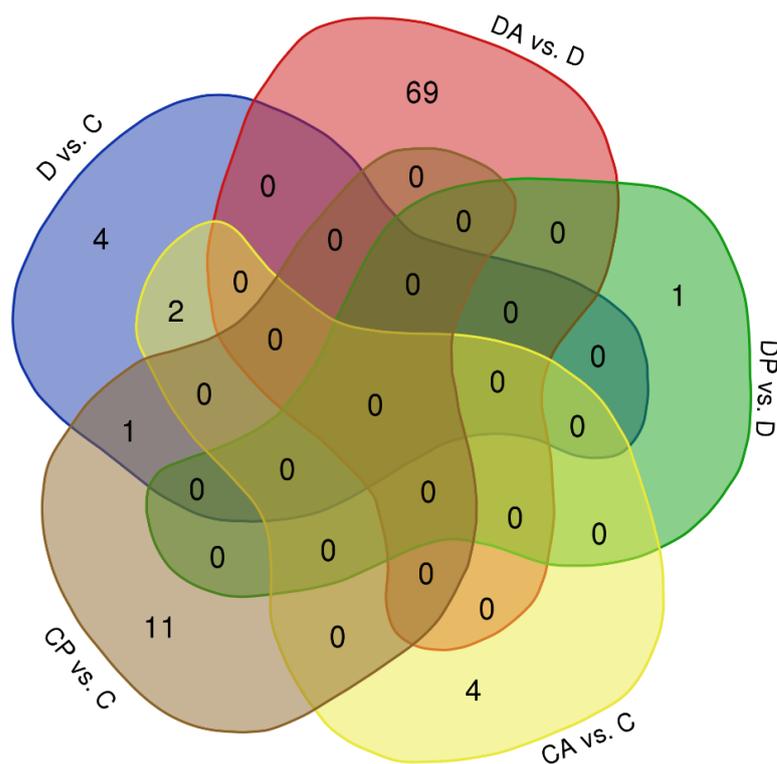


Figura 6. Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 5**). Foram considerados os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS¹ e de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL.

Com a aplicação do filtro IQR (**Condição 6, Figura 7**), dois lipídios (NAGlySer 8:0;O(FA 16:2) e AAHFA 18:5/15:3;O) se apresentaram comuns entre depressão e a aplicação de Ayahuasca ao grupo de pacientes e um lipídio (SPB 16:1;O3) entre depressão e a aplicação de Ayahuasca ao grupo controle.

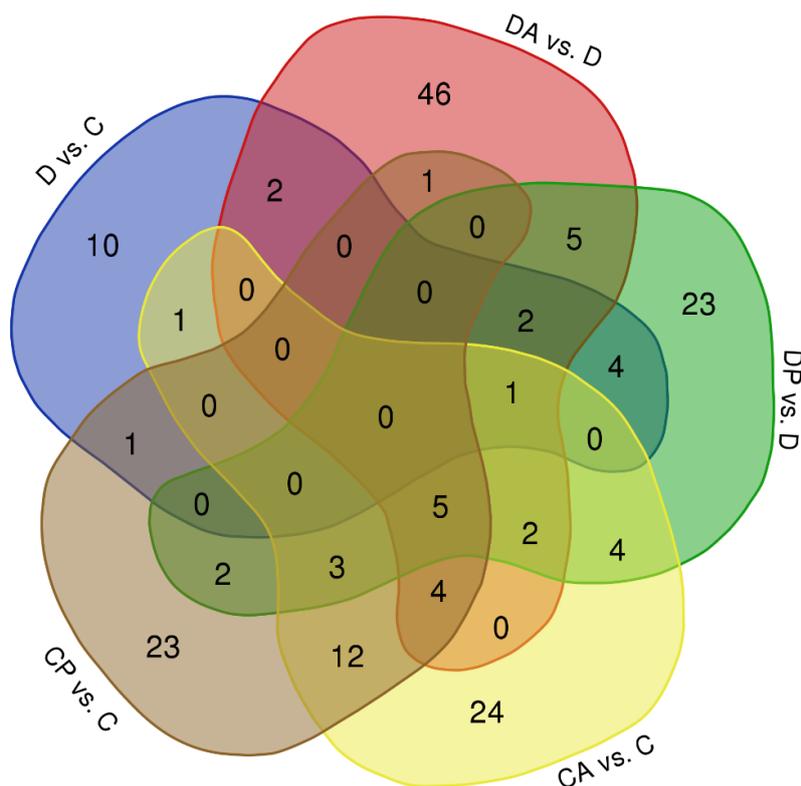


Figura 7 Diagrama de Venn incluindo os *features* diferenciais encontrados na comparação dos grupos D vs. C, CA vs. C, CP vs. C, DA vs. D e DP vs. D (**Condição 6**). Foram considerados os *features* anotados por meio da comparação dos espectros de MS¹ e de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL.

As **Tabelas 2 e 3** resumem as condições e os resultados encontrados nas análises estatísticas realizadas para as condições testadas.

Tabela 2. Condições de processamento e números de *features* diferenciais encontrados para cada comparação de grupo

	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5	Condição 6
Tabela	unificada	unificada	separada	separada	separada	separada
Análise MS	apenas MS ²	MS ¹ e MS ²	apenas MS ²	MS ¹ e MS ²	MS ¹ e MS ²	MS ¹ e MS ²
Filtro	-	-	-	-	RSD	IQR
C vs. D	1	7	3	92	7	20
D vs. DA	10	44	9	126	69	68
D vs. DP	10	41	9	138	1	50
C vs. CA	9	35	8	136	5	56
C vs. CP	2	24	7	132	12	51

Tabela 3. Condições de processamento e números de *features* diferenciais em comum entre as alterações causadas pela depressão e as modulações causadas pela administração de Ayahuasca

	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5	Condição 6
Tabela	unificada	unificada	separada	separada	separada	separada
Análise MS	apenas MS ²	MS ¹ e MS ²	apenas MS ²	MS ¹ e MS ²	MS ¹ e MS ²	MS ¹ e MS ²
Filtro	-	-	-	-	RSD	IQR
C vs. D e D vs. DA	-	2	-	7	-	2
C vs. D e C vs. CA	-	-	-	3	2	1
C vs. CA e D vs. DA	2	-	-	3	-	0

Como já mencionado, as análises estatísticas trouxeram um maior número de *features* diferenciais quando aplicadas às tabelas contendo os dados adquiridos no modo ESI negativo e no modo ESI positivo tratadas separadamente (**Condições** de **3** a **6**). A análise das tabelas com os dados unificados, trouxe apenas dois lipídios em cada condição (**Condição 1** e **Condição 2**). Os *features* diferenciais da **Condição 6** (separada, MS¹ e MS², IQR) também foram identificados entre os *features* diferenciais da **Condição 4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro). Tal relação já era esperada, visto que a **Condição 6** é a modificação da **Condição 4** por meio da aplicação do filtro de IQR, ou seja, a diferença entre as duas condições consiste no número de variáveis utilizadas para a construção dos modelos.

Os *features* diferenciais encontrados na **Condição 2** (unificada, MS¹ e MS², sem filtro) também foram identificados nas **Condições 4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro) e **6** (separada, MS¹ e MS², IQR). Ao contrário da diferença entre a **Condição 4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro) e a **Condição 6** (separada, MS¹ e MS², IQR), a diferença da **Condição 2** (unificada, MS¹ e MS², sem filtro) para a **Condição 4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro) não era esperada, porém, mostrou que, no trabalho em questão, a análise dos dados separadamente retornou melhores resultados do que as análises dos dados unificados.

A aplicação de RSD (**Condição 5**, separada, MS¹ e MS², RSD) trouxe dois *features* diferenciais comuns entre as alterações causadas pela depressão e pelas modulações causadas pela administração de Ayahuasca ao grupo controle. Um desses lipídios, NAGlySer 8:0;O(FA 22:6), foi identificado também nas demais condições. O segundo, MGDG O-26:7_2:0, porém, foi identificado apenas nessa **Condição 5** (separada, MS¹ e MS², RSD), indicando a influência

do filtro não somente nas variáveis utilizadas para a construção do modelo, mas também com seu impacto nos resultados obtidos.

A **Condição 1** (unificada, MS², sem filtro) retornou dois *features* comuns entre a aplicação de Ayahuasca a ambos os grupos, porém sem estarem envolvidas nos distúrbios da depressão. Esses dois *features* não foram encontrados em nenhuma das outras condições e apresentaram duas possibilidades de anotação putativa cada (PC 38:6 ou PC 16:0_22:6 e PC 36:4 ou PC 16:0_20:4).

4.1.2 Análises multivariadas

Foram realizadas análises estatísticas multivariadas não supervisionada, PCA, e supervisionada, PLS-DA. Para verificar a estabilidade do equipamento durante as análises cromatográficas, gráficos de escores de PCA contendo todas as amostras e todos os controles de qualidade (QC) foram plotados, uma para cada modo de ionização usado nas análises, ESI negativo (**Figura 8**) e ESI positivo (**Figura 9**). Para facilitar a visualização das amostras QC no gráfico de escores, as demais amostras foram classificadas apenas como controle ou depressão, sem suas discriminações entre amostras basais ou coletadas após 48 horas, bem como sem a indicação de qual tratamento (Ayahuasca ou placebo) foi aplicado.

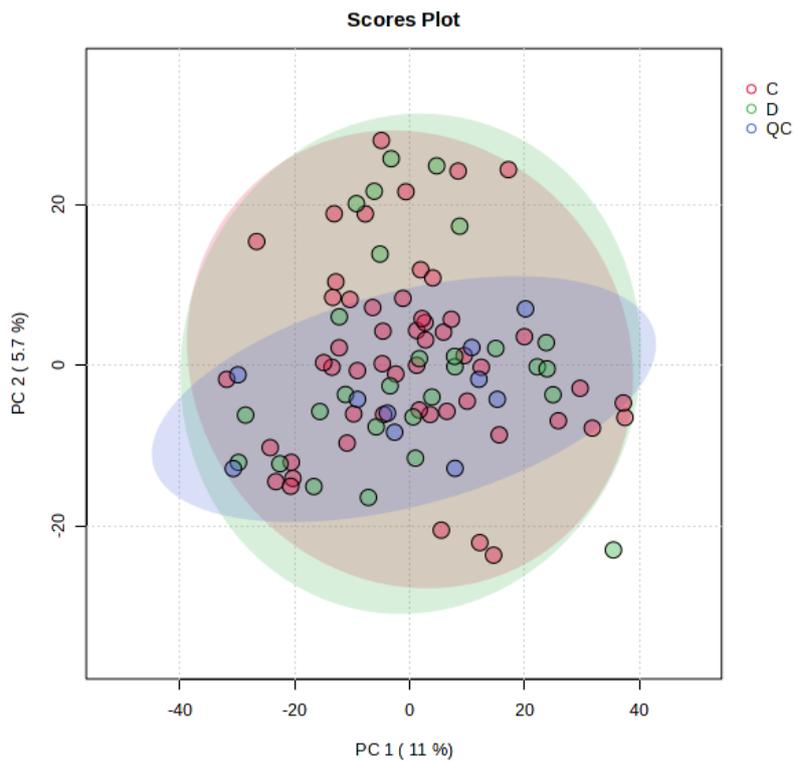


Figura 8. Gráfico de escores de PCA para as análises lipidômicas feitas no modo ESI negativo.

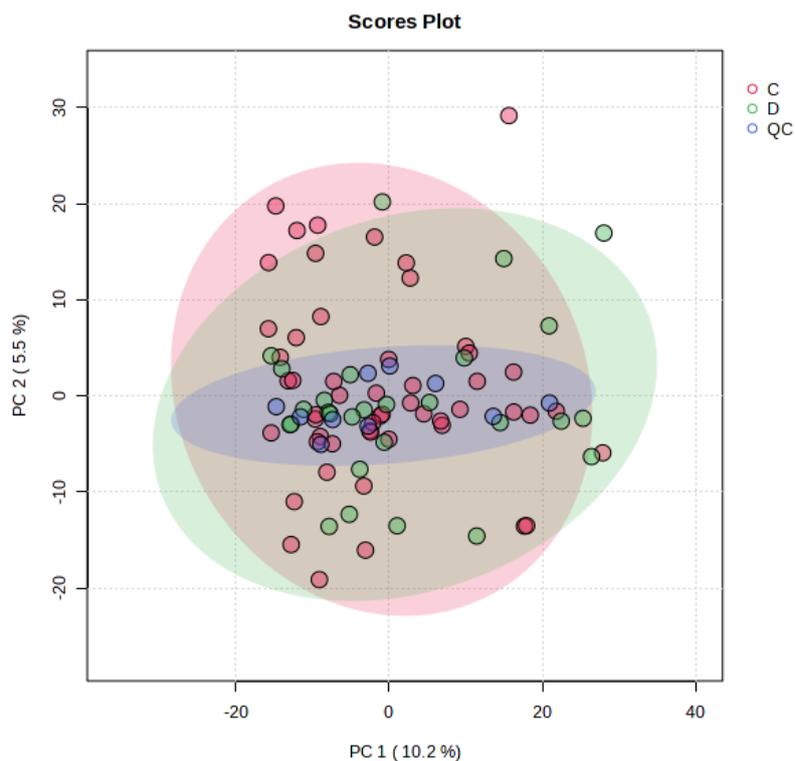


Figura 9. Gráfico de escores de PCA para as análises lipidômicas feitas no modo ESI positivo.

Observando-se as **Figuras 8 e 9**, nota-se que houve uma variação instrumental durante as análises em ambos os modos ESI negativo e positivo na componente principal 1 (PC1), observada pela dispersão das amostras de QC nesta componente. A dispersão das amostras de QC na componente principal 2 (PC2) foi de menor magnitude do que a dispersão das amostras analisadas.

O mau agrupamento das amostras de QC traz viés para as análises, e provavelmente corresponde a flutuações instrumentais associadas a variações de pressão que ocorreram durante a aquisição dos dados. Devido à raridade e pouco conteúdo das amostras usadas neste trabalho, não foi possível uma nova realização dos experimentos com o equipamento mais estável, de forma, que mesmo com as variações presentes, os dados continuaram a ser tratados.

Contribuições para as variações de QC observadas também podem ter sido adicionadas no processo de tratamento de dados, de forma que um tratamento diferente poderia trazer resultados mais satisfatórios.

De forma geral, os gráficos de escores de PCA para as análises de comparação de grupos dois a dois não demonstraram separação em nenhuma das comparações de grupos realizadas - os gráficos para a **Condição 4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro) se encontram nos Apêndices. Quanto às análises de PLS-DA, nenhum dos modelos construídos para as discriminações apresentou figuras de mérito satisfatórias, apresentando, em sua grande maioria, valores de Q² negativo (quando valores acima de 0,5 são esperados como aceitáveis) (Apêndices).¹¹⁶ Além disso, devido à matriz de covariância presente nos cálculos envolvidos no modelo depender das variáveis envolvidas,^{117, 118} as diferentes condições aplicadas resultaram em listas de VIP score com ordens de importância dos *features* diferentes para o mesmo grupo de comparação. A **Tabela 4** traz os valores de VIP score obtidos para os *features* diferenciais comuns à depressão a à administração de Ayahuasca, considerando a condição em que um maior número de *features* diferenciais foi identificado (**Condição 4**), incluindo-se o lipídio que foi identificado apenas na **Condição 5** (MDGD).

Tabela 4. Valores de *raw p-value*, *fold change* e *VIP score* para os lipídios
(*features*) encontrados na **Condição 4**

Lipídio	Aduto	KEGG ID	Ontologia	Fold Change	log ₂ Fold Change	Raw p-value	VIP score
D vs. C e DA vs. D							
HexCer 16:0;O2/19:2	[M+H] ⁺	-	HexCer_NDS	2,8954 (C vs. D)	1,5338 (C vs. D)	0,0127 (C vs. D)	2,3192 (C vs. D)
				0,3657 (D vs. DA)	-1,4512 (D vs. DA)	0,0486 (D vs. DA)	2,2065 (D vs. DA)
NAGlySer 8:0;O(FA 16:2)	[M-H] ⁻	-	NAGlySer	2,4082 (C vs. D)*	1,2680 (C vs. D)	0,0003 (C vs. D)	2,4760 (C vs. D)
				2,0988 (C vs. D)*	1,0696 (C vs. D)	0,0084 (C vs. D)	1,8923 (C vs. D)
				0,3682 (D vs. DA)	-1,4413 (D vs. DA)	0,0160 (D vs. DA)	1,9069 (D vs. DA)
SL 12:2;O/32:6	[M+H] ⁺	-	SL	0,4513 (C vs. D)	-1,1479 (C vs. D)	0,0403 (C vs. D)	2,0403 (C vs. D)
				2,4437 (D vs. DA)	1,2891 (D vs. DA)	0,0456 (D vs. DA)	2,0100 (D vs. DA)
AAHFA 18:5/15:3;O	[M-H] ⁻	-	FAHFA	0,4404 (C vs. D)	-1,1830 (C vs. D)	0,0228 (C vs. D)	1,8219 (C vs. D)
				0,4080 (D vs. DA)	-1,2934 (D vs. DA)	0,0356 (D vs. DA)	1,6565 (D vs. DA)
NAGlySer 20:2;O	[M+IsoProp+Na+H] ⁺ , [M+H] ⁺ e [M+Na] ⁺	-	NAGlySer	0,4835 (C vs. D)	-1,0485 (C vs. D)	0,0149 (C vs. D)	1,7458 (C vs. D)
				2,2332 (D vs. DA)*	1,1591 (D vs. DA)	0,0087 (D vs. DA)	2,0233 (D vs. DA)
				0,4477 (D vs. DA)*	-1,1595 (D vs. DA)	0,0293 (D vs. DA)	1,7343 (D vs. DA)
LPS-N (FA 7:0)8:0	[M-H] ⁻	-	LNAPS	0,4799 (C vs. D)*	-1,0593 (C vs. D)	0,0005 (C vs. D)	2,8953 (C vs. D)
				0,4751 (C vs. D)*	-1,0737 (C vs. D)	0,0022 (C vs. D)	2,5665 (C vs. D)
				2,2646 (D vs. DA)	1,1793 (D vs. DA)	0,0216 (D vs. DA)	2,1277 (D vs. DA)
PS 25:3	[M+H] ⁺	C02737	PS	0,1674 (C vs. D)	-2,5783 (C vs. D)	0,0360 (C vs. D)	2,5669 (C vs. D)
				7,2495 (D vs. DA)	2,8579 (D vs. DA)	0,0085 (D vs. DA)	3,0903 (D vs. DA)
D vs. C e CA vs. CA							
SPB 16:1;O3	[M+H] ⁺	-	PhytoSph	2,0232 (C vs. D)	1,0167 (C vs. D)	0,0190 (C vs. D)	2,1245 (C vs. D)
				2,3283 (C vs. CA)*	1,2193 (C vs. CA)	0,0204 (C vs. CA)	2,4095 (C vs. CA)
				2,1628 (C vs. CA)*	1,1129 (C vs. CA)	0,0260 (C vs. CA)	1,8771 (C vs. CA)
Cer 12:2;O2/14:1	[M+H] ⁺	C00195 C12126	Cer_NS	0,4217 (C vs. D)	-1,2456 (C vs. D)	0,0484 (C vs. D)	2,8463 (C vs. D)
				0,3261 (C vs. CA)	-1,6164 (C vs. CA)	0,0458 (C vs. CA)	2,7544 (C vs. CA)
LPS 18:4	[M-H] ⁻	C00195 C12126	LPS	2,6898 (C vs. D)	1,4275 (C vs. D)	0,0445 (C vs. D)	3,2502 (C vs. D)
				3,5570 (C vs. CA)	1,8307 (C vs. CA)	0,0111 (C vs. CA)	3,4380 (C vs. CA)
MGDG O-26:7_2:0 **	[M+H] ⁺	-	EtherMGDG	2,3438 (C vs. D)	1,2289 (C vs. D)	0,0292 (C vs. D)	1,0941 (C vs. D)
				32,1320 (C vs. CA)	5,0059 (C vs. CA)	0,0361 (C vs. CA)	2,4440 (C vs. CA)

CA vs. C e DA vs. D							
PC O-20:4_22:6;O3	[M-H] ⁻	C05212	EtherOxPC	0,2941 (C vs. CA) 0,3948 (D vs. DA)	-1,7658 (C vs. CA) -1,3410 (D vs. DA)	0,0033 (C vs. CA) 0,0235 (D vs. DA)	2,9737 (C vs. CA) 2,7729 (D vs. DA)
PC O-12:0_22:4;O1	[M-H] ⁻	C05212	EtherOxPC	0,2551 (C vs. CA) 0,2475 (D vs. DA)	-1,9710 (C vs. CA) -2,0146 (D vs. DA)	0,0346 (C vs. CA) 0,0399 (D vs. DA)	2,4534 (C vs. CA) 2,5953 (D vs. DA)
PC O-14:0_22:4;O1	[M-H] ⁻	C05212	EtherOxPC	0,0585 (C vs. CA) 0,079 (D vs. DA)	-4,0947 (C vs. CA) -3,6552 (D vs. DA)	0,0113 (C vs. CA) 0,0312 (D vs. DA)	3,7091 (C vs. CA) 3,8829 (D vs. DA)

**features* identificados mais de uma vez dentro da mesma comparação

lipídio encontrado apenas na **Condição 5

4.1.3 Análises multivariadas dos *features* diferenciais

Para investigar se os *features* diferenciais encontrados na análise de *Volcano Plot* seriam suficientes para discriminar os grupos em cada comparação, novos modelos de PLS-DA foram construídos usando-os como variáveis para os modelos (todas as variáveis selecionadas por *Volcano Plot* apresentaram valores de *VIP score* maiores do que 1 nos modelos de PLS-DA construídos previamente).

Tal processo pode ser visto como a aplicação de um filtro (modelo univariado de *Volcano Plot*) aplicado a todas as variáveis para seleção daquelas com maior poder discriminante entre os grupos e sua submissão ao modelo multivariado de PLS-DA, com o intuito da obtenção de figuras de mérito melhores para estes modelos de PLS-DA construídos com variáveis selecionadas quando comparados às figuras de mérito dos modelos de PLS-DA construídos com todas as variáveis. Para isso, as tabelas contendo apenas os *features* diferenciais foram ressubmetidas ao *MetaboAnalyst* separadamente, usando-se os parâmetros da **Condição 4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro), a condição que resultou em um maior número de *features* diferenciais.

Para a comparação de D vs. C, houve uma tendência de separação nos gráficos de escores da PCA, no qual o modo positivo quase alcançou uma separação completa (**Figura 10a**). As figuras de mérito das análises de PLS-DA (**Figura 10b**) também apresentaram valores aceitáveis, com valores de Q^2 superiores a 0,6, porém relativamente distantes dos valores de R^2 . Quanto aos gráficos de HCA, ambos os modos apresentaram bom agrupamento, porém não completamente correta, onde o modo positivo teve duas amostras erroneamente classificadas: ORG21_POS e ORG101_POS (**Figura 10c**).

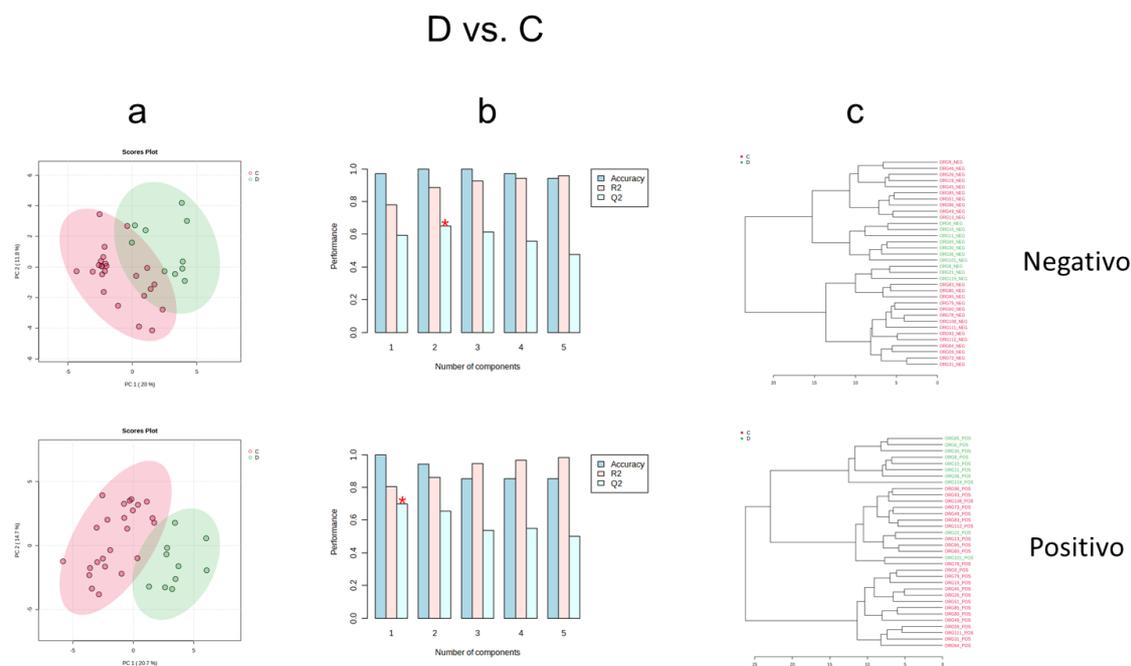


Figura 10. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação de pacientes e controles.

Para as comparações dos grupos de pacientes antes e depois da administração de Ayahuasca, houve completa separação nos gráficos de

escores da PCA (**Figura 11a**), indicando a habilidade do modelo de discriminar o grupo de pacientes entre antes e depois das duas intervenções (Ayahuasca e placebo). Os valores para as figuras de mérito dos modelos de PLS-DA também foram satisfatórios, apresentando valores de Q^2 próximos a 0,8 e mais próximos dos valores de R^2 (**Figura 11b**). O valor de R^2 indica o quão próximos os dados analisados estão da linha de regressão ajustada construída no modelo e o valor de Q^2 indica a qualidade de previsão do modelo, sendo que quão mais altos e mais próximos estiverem os valores de R^2 e Q^2 , maior é a capacidade e qualidade de previsão. As amostras também apresentaram um bom agrupamento nos gráficos de HCA, com exceção da amostra ORG_20_NEG e da ORG_119_POS, que apresentaram maior semelhança com amostras pertencentes à classe oposta. ORG_20_NEG pertence ao grupo DA, porém, apresentou maiores semelhanças ao grupo D. Da mesma forma, a amostra ORG_119_POS pertence ao grupo D, mas apresentou maiores semelhanças ao grupo DA.

DA vs. D

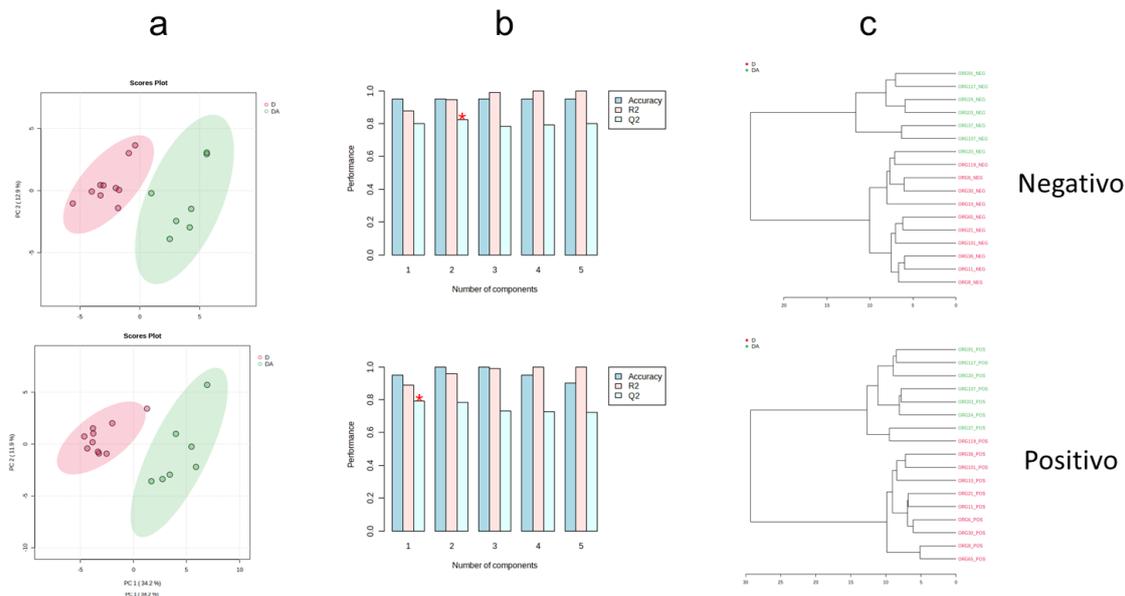


Figura 11. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação de pacientes antes e após a administração de Ayahuasca.

Para a comparação dos grupos de pacientes antes e depois da administração de placebo, novamente bons resultados foram obtidos com o emprego das variáveis diferenciais (**Figura 12**). Os gráficos de escores dos modelos de PCA apresentaram separação das amostras (**Figura 12a**), as figuras de mérito apresentaram valores satisfatórios, com valores de Q^2 acima de 0,8 e bem próximos dos valores de R^2 (**Figura 12b**). Quanto aos gráficos de HCA, o modo ESI negativo apresentou um excelente agrupamento, enquanto o modo positivo agrupou erroneamente apenas uma amostra: ORG_42_POS (**Figura 12c**).

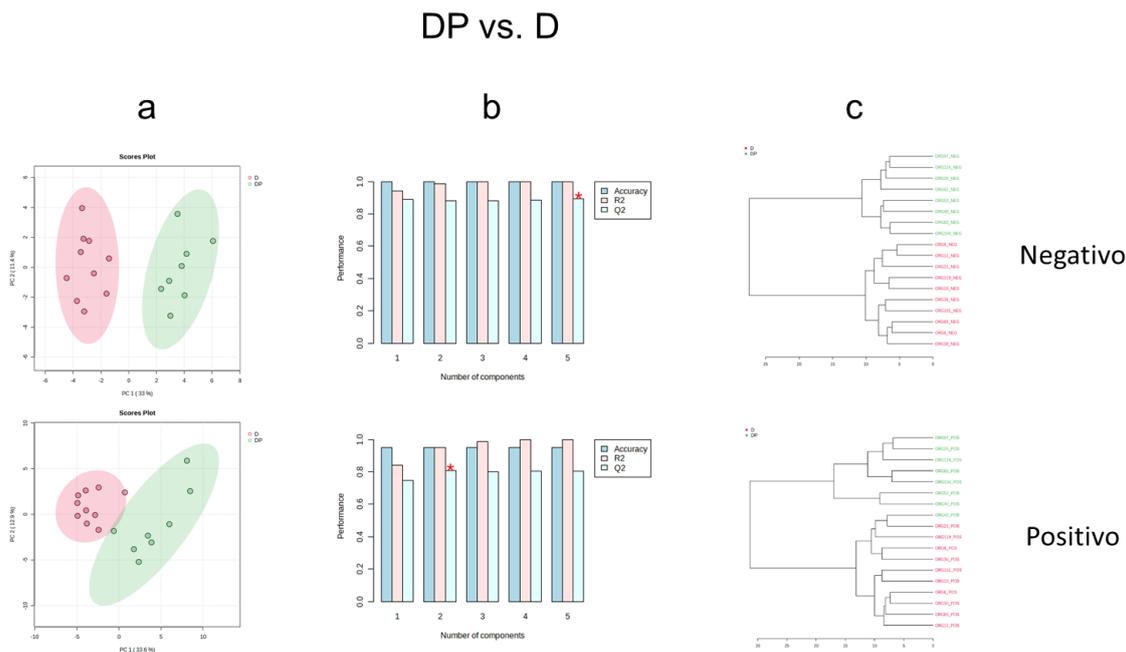


Figura 12. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação de pacientes antes e depois da administração de placebo.

As análises para os grupos controles, tanto para o tratamento com Ayahuasca (**Figura 13**) como para a aplicação de placebo (**Figura 14**), não mostraram resultados tão promissores quanto os anteriores. Os gráficos de escores da PCA não apresentaram separação dos grupos (**Figuras 13a e 14a**), da mesma forma que a análise por HCA não apresentou agrupamento correto para as amostras (**Figura 13c e 14c**). Figuras de mérito aceitáveis para o modelo de PLS-DA foram obtidas para o modo ESI positivo da comparação C vs. CA (**Figura 13b**) e para os modos negativo e positivo da comparação C vs. CP (**Figura 14b**), porém com diferenças consideráveis entre os valores de Q^2 e R^2 .

CA vs. C

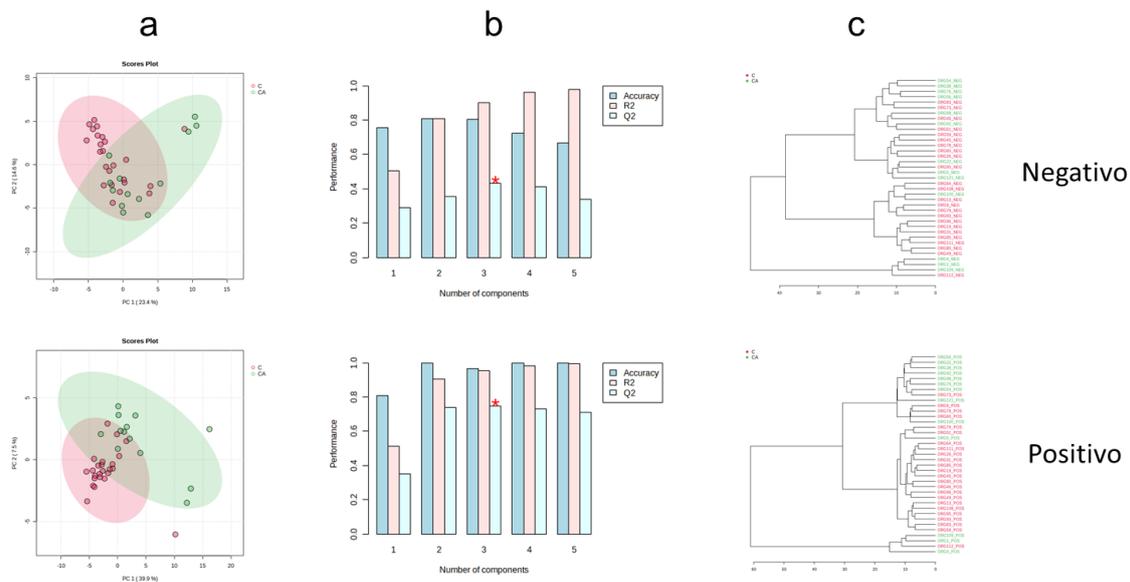


Figura 13. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e depois da administração de Ayahuasca.

CP vs. C

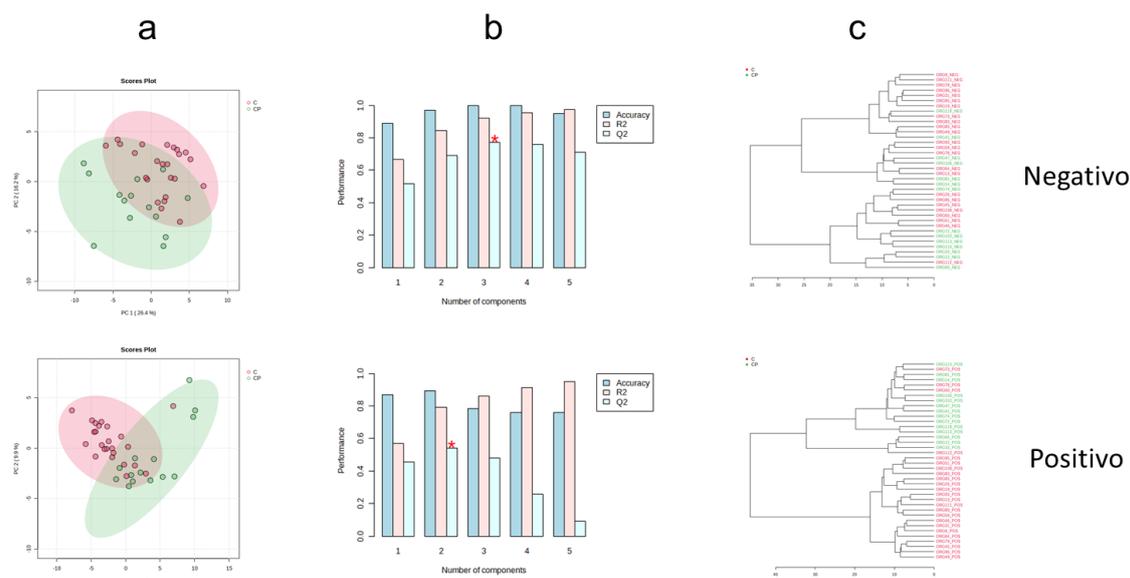


Figura 14. (a) Gráfico de escores de PCA, (b) figuras de mérito de PLS-DA e (c) gráficos de HCA para as análises feitas nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e depois da administração de placebo.

Como uma última análise, os *features* diferenciais do modo ESI negativo e do modo ESI positivo para cada comparação foram combinados em uma única tabela e resubmetidos às análises estatísticas. Os resultados obtidos foram ainda melhores, com separação nos modelos de PCA e agrupamento nos modelos de HCA completos para as comparações D vs. C (**Figura 15**), DA vs. D (**Figura 16**) e DP vs. D (**Figura 17**). Os valores de Q^2 para tais comparações foram aceitáveis, sendo maiores do que 0,8 e próximos aos valores de R^2 . Quanto às comparações CA vs. C (**Figura 18**) e CP vs. C (**Figura 19**), apesar dos valores de Q^2 serem aceitáveis (acima de 0,5), não houve separação ou agrupamento correto nos modelos de PCA e de HCA, respectivamente.

D vs. C

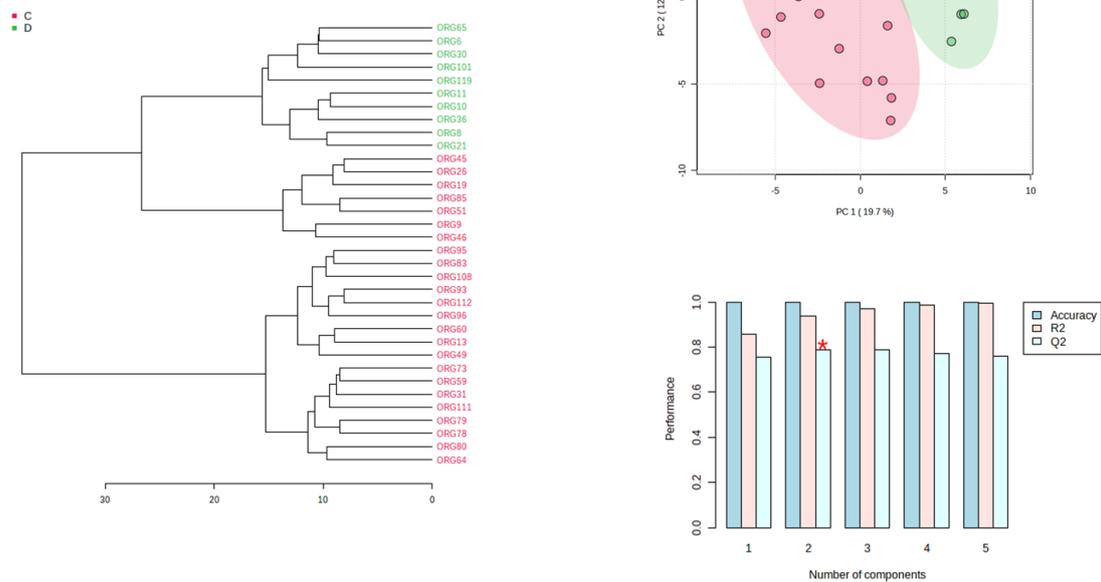


Figura 15. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes com o grupo controle.

DA vs. D

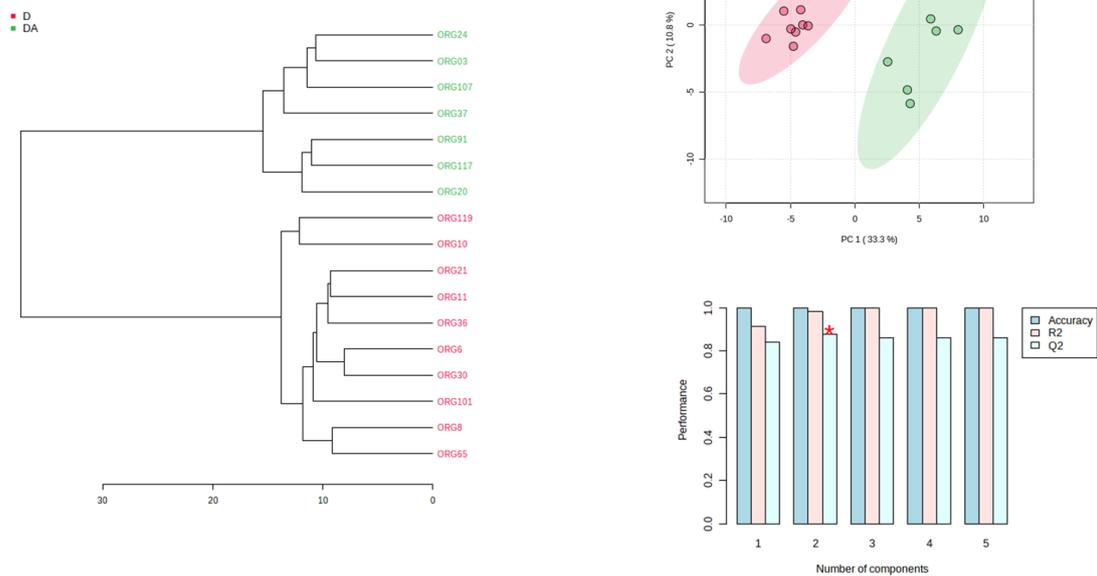


Figura 16. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de Ayahuasca.

DP vs. D

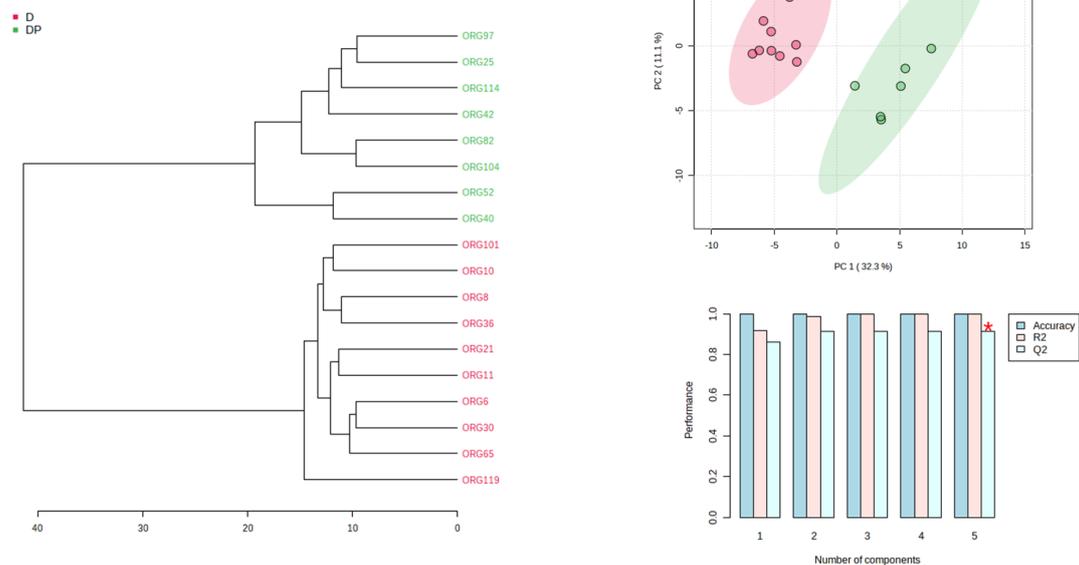


Figura 17. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de placebo.

CA vs. C

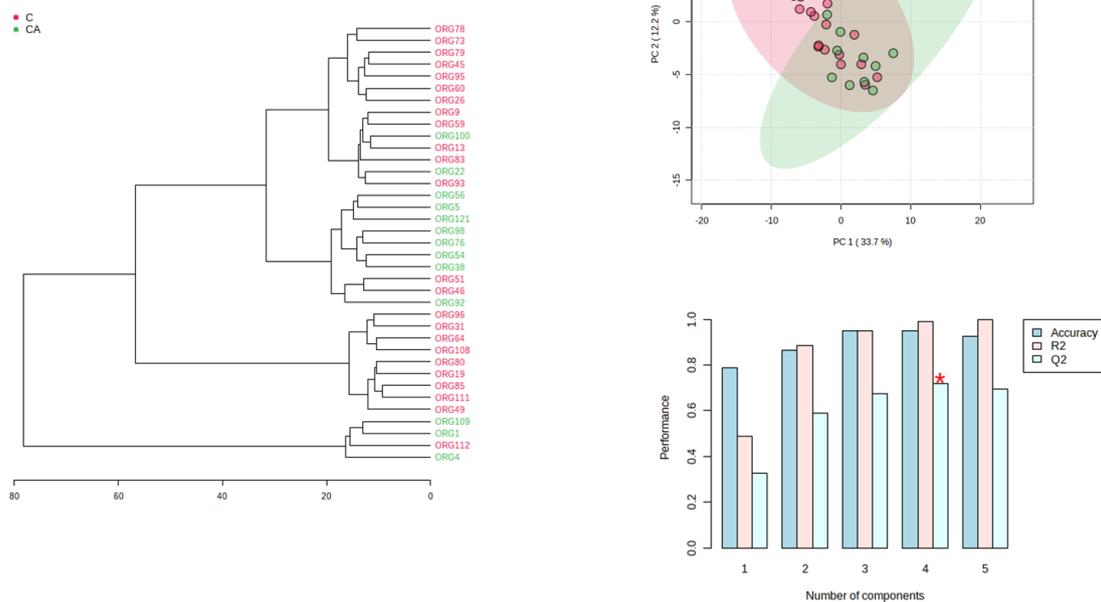


Figura 18. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e após a administração de Ayahuasca.

CP vs. C

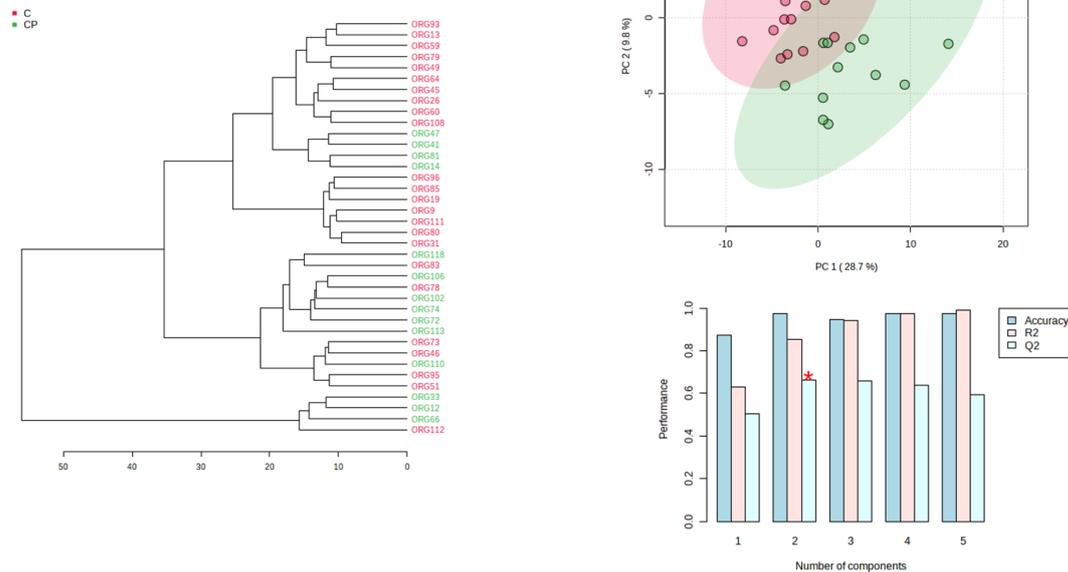


Figura 19. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e após a administração de placebo.

De forma geral, os *features diferenciais* combinados e resubmetidos à análise estatística trazem melhores resultados do que quando são tratados separadamente. Fato contrário às análises com todas as variáveis, onde o tratamento dos dados de modo separado apresentou melhores resultados. Outro ponto a se atentar é que as amostras controle não apresentaram separação nos modelos de PCA, nem bom agrupamento nas análises de HCA, tanto para o tratamento com placebo, quanto para a administração de Ayahuasca. Tal fato pode sugerir uma maior susceptibilidade de pacientes que sofrem depressão apresentarem metabolismos menos estáveis por estarem sob uma condição patológica e, assim, serem mais suscetíveis a intervenções, já que para ambos

os tratamentos, Ayahuasca ou placebo, foi possível separar e discriminar bem os grupos por meio dos *features* diferenciais. Tais diferenças se referem exclusivamente a mudanças metabólicas nos grupos analisados e não trazem indícios diretos de alterações psico-cognitivas causadas pelas administrações.

4.1.4 Avaliação das vias metabólicas associadas

Treze *features* diferenciais encontrados na **Condição 4** mais um *feature* diferencial encontrado apenas na **Condição 5** foram submetidos ao *software* online LIPEA para a conversão das identificações por abreviação para identificações do tipo KEGG ID e para visualização das vias metabólicas associadas. Dos lipídios submetidos, 6 foram convertidos e associados a vias metabólicas (**Tabelas 5 e 6**).

Tabela 5. *Features* diferenciais encontrados, KEGG ID e vias metabólicas associadas

Lipídio	Ontologia	KEGG ID	Via metabólica
HexCer 16:0;O2/19:2	HexCer_NDS	-	-
NAGlySer 8:0;O(FA 16:2)	NAGlySer	-	-
SL 12:2;O/32:6	SL	-	-
AAHFA 18:5/15:3;O	FAHFA	-	-
NAGlySer 20:2;O	NAGlySer	-	-
LPS-N (FA 7:0)8:0	LNAPS	-	-

PS 25:3	PS	C02737	Metabolismo de glicina, serina e treonina Metabolismo de glicerofosfolípidios
SPB 16:1;O3	PhytoSph	-	-
Cer 12:2;O2/14:1	Cer_NS	C00195, C12126	Via de sinalização de esfingolípídios Metabolismo de esfingolípídios Via de sinalização AGE-RAGE em complicações diabéticas Via de sinalização da neurotrofina Via de sinalização de adipocitocinas Necroptose Resistência à insulina
LPS 18:4	LPS	C18125, C05974	Metabolismo de glicerofosfolípidios
MGDG O-26:7_2:0	EtherMGDG	-	-
PC O-20:4_22:6;O3	EtherOxPC	C05212	Metabolismo de lípidios de éter
PC O-12:0_22:4;O1	EtherOxPC	C05212	Metabolismo de lípidios de éter
PC O-14:0_22:4;O1	EtherOxPC	C05212	Metabolismo de lípidios de éter

Tabela 6. KEGG IDs dos lipídios encontrados e vias metabólicas associadas

Via metabólica	Composto
Metabolismo de glicerofosfolipídios	C02737, C18125 ou C05974
Metabolismo de lipídios de éter	C05212
Metabolismo de esfingolipídios	C00195 ou C12126
Metabolismo de glicina, serina e treonina	C02737
Via de sinalização de adipocitocinas	C00195 ou C12126
Necroptose	C00195 ou C12126
Via de sinalização de esfingolipídios	C00195 ou C12126
Via de sinalização da neurotrofina	C00195 ou C12126
Via de sinalização AGE-RAGE em complicações diabéticas	C00195 ou C12126
Resistência à insulina	C00195 ou C12126

Observando-se **Tabela 4**, nota-se que dentre os sete lipídios comuns entre os distúrbios causados pela depressão e as modulações disparadas pela Ayahuasca, cinco deles apresentam valores de \log_2 Fold Change com sinais contrários, indicando que os efeitos da doença e da bebida são majoritariamente contrários entre si. O mesmo padrão não é observado quando se compara a depressão com a aplicação de Ayahuasca ao grupo controle, onde os 4 lipídios identificados apresentaram o mesmo sinal.

As análises estatísticas quando aplicadas ao grupo controle, não trouxeram resultados tão promissores quando comparados ao grupo de pacientes, além do metabolismo ser algo complexo, de forma que mais investigações devem ser feitas para entender a relação das concentrações dos lipídios na aplicação da Ayahuasca a indivíduos não depressivos.

Analisando-se os lipídios que foram comumente alterados na administração de Ayahuasca a ambos os grupos de pacientes e controle, nota-se que houve a mesma variação (diminuição das concentrações de fosfolinas), indicando efeitos anti-inflamatórios da bebida semelhantes no metabolismo de pacientes e de indivíduos saudáveis.

O composto HexCer 16:0;O2/19:2 (**Tabela 5**) é um glicosíngolípido pertencente à classe das hexosilceramidas. Esta já foi relatada como alterada em casos de depressão,¹¹⁹ relacionada a respostas inflamatórias,¹²⁰ e foi também modulada pelo antidepressivo fluoxetina em um modelo de depressão em macacos.¹²¹ O lipídio AAHFA 18:5/15:3;O é um éster de ácido graxo, cujo aumento da concentração foi recentemente relacionado a doenças neurodegenerativas como Alzheimer.¹²² O sulfonolípido SL 12:2;O/32:6 é comumente encontrado na membrana externa de bactérias Gram-negativas do tipo *Phylum Bacteroidetes*, encontradas no microbioma,^{123, 124} e apresenta atividades pró-inflamatórias.¹²⁵

O lipídio LPS-N (FA 7:0)8:0 pertence às lisofosfatidilserinas,¹²⁶ as quais apresentam atividade imunológica, regulando diversas funções no cérebro, como a liberação de histamina de mastócitos,^{127 - 129} regulação da proliferação de células T (linfócitos)^{129 - 131} do fluxo de glicose em adipócitos e mioblastos,¹³² e da alteração da atividade enzimática do citocromo P450 entre mono-oxigenase e fosfolipase.¹³³ Seu desbalanço metabólico é frequentemente associado a doenças,¹³⁴ onde sua concentração está diretamente correlacionada à ativação da microglia e à resposta inflamatória.¹³⁵ Seus níveis também são diretamente

correlacionados com a concentração de serotonina¹³⁶ no sangue e vem sendo investigada quanto a seus efeitos antidepressivos.¹³⁷

A partir da observação das **Tabelas 5 e 6**, nota-se a alteração das vias de metabolismo da glicina, serina e treonina, metabolismo de glicerofosfolipídios, metabolismo e sinalização de esfingolipídios, de sinalização de neurotrofina e de adipocitocinas.

Distúrbios no metabolismo de aminoácidos,¹³⁸ incluindo o metabolismo de glicina,¹³⁹ serina e treonina já foram relatados na literatura científica como correlacionados a sintomas de depressão, especialmente aos casos de depressão resistente ao tratamento (depressão refratária).^{140, 141} Deng *et al.* relataram alterações desta via em um modelo de depressão em macacos.¹⁴² Jianguo *et al.* mostraram que alterações nos níveis de aminoácidos, incluindo treonina e serina, estão correlacionados a alterações no metaboloma fecal em um modelo de estresse leve crônico e imprevisível (do inglês *chronic unpredictable mild stress*, CUMS) em ratos, indicando o envolvimento da microbiota na patologia.¹⁴³ Huang *et al.* demonstraram que glicina e L-serina exógenos atenuam sintomas depressivos e que o efeito antidepressivo da cetamina está relacionado à concentração de glicina.¹⁴⁴ A D-serina também apresenta efeito antidepressivo e correlação com os efeitos antidepressivos da cetamina.^{145, 146}

Os metabolismos de glicerofosfolipídios¹⁴⁷ e de esfingolipídios¹⁴⁸ também já foram reportados na literatura como sendo alterados na depressão.¹⁴⁹ Os glicerofosfolipídios são constituintes de membranas neuronais e desempenham um papel crucial na regulação de funções sinápticas.^{150, 151} Trabalhos recentes mostram a alteração da concentração de glicerofosfolipídios no córtex pré-frontal

de ratos com depressão pós-AVC¹⁵² e no hipocampo de ratos com depressão de início tardio,¹⁵³ onde o metabolismo de glicerofosfolipídios provavelmente desempenha uma função de ponte entre a microbiota, o intestino, o fígado e o cérebro^{154, 155} Tian *et al.* relataram alterações nos níveis de glicerofosfolipídios no soro sanguíneo e no hipocampo de ratos com depressão, concomitantemente com alterações encontradas nas fezes, corroborando o envolvimento da microbiota na patologia.¹⁵⁶ Ye *et al.* mostraram que o estresse imunológico altera a composição da microbiota em frangos de forma significativa e que esta estaria envolvida na via de metabolismo do D-glutamato.¹⁵⁷

Os esfingolipídios são a classe de lipídios mais encontrada nas membranas de células cerebrais,¹⁵⁸ estão envolvidos em processos de modulação da neurotransmissão sináptica¹⁵⁹ e existem em diferentes formas como a esfingomielina, que é convertida à ceramida pela enzima ceramidase ácida e, então, metabolizada à esfingosina pela enzima esfingomielinase ácida (ASM).¹⁶⁰ Alterações no metabolismo de esfingolipídios vêm sendo demonstrados em casos de depressão, onde concentrações elevadas de ceramidas são associadas a sintomas da patologia,¹⁶¹ e à redução da concentração de esfingosina e ceramida correlacionada a efeitos antidepressivos,^{162, 163} gerados pela inibição indireta das enzimas ASM e da ceramidase ácida.^{164 - 166} Observando-se a **Tabela 4**, nota-se que os valores logarítmicos do *fold change* da ceramida anotada (Cer 12:0;O2/21:0, C vs. D e C vs. CA) apresentaram sinais negativos, o que indica uma diminuição do composto tanto no caso de depressão, quanto na administração de Ayahuasca ao grupo controle. Tal efeito é incongruente àquele descrito na literatura

científica, segundo o qual a depressão aumenta e os tratamentos diminuem as concentrações de ceramidas.¹⁵⁹

O lipídio SPB 16:1;O3 pertence à classe de fitoesfingosinas. Estas, juntamente com esfingosina, esfinganina e outros homólogos e derivados, apresentam funções biológicas, sendo intermediárias no metabolismo de esfingolípídios e na sinalização celular.¹⁶⁷ Montenegro-Burke *et al.* demonstraram atividade anti-inflamatória da fitoesfingosina *in vitro*, bem como a diminuição da inflamação em um modelo de colite após sua administração.¹⁶⁸

A mesma ceramida associada ao metabolismo de esfingolípídios (KEGG IDs C00195 e C12126, **Tabela 5**) foi também associada à via de sinalização de neurotrofinas. As neurotrofinas são proteínas liberadas pelo sistema nervoso e possuem um papel fundamental na neurogênese e neuroplasticidade.¹⁶⁹ Alterações no fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), uma neurotrofina, vêm sendo associadas a casos de depressão¹⁷⁰ e a administração de Ayahuasca, assim como a de outras substâncias psicodélicas como cetamina, psilocibina e LSD, tem apresentado efeito reverso, aumentando a concentração de BDNF poucas horas após sua administração.¹⁷¹

Outra via associada à ceramida foi a de sinalização de adipocitocinas. O tecido adiposo, além de suas funções de proteção, armazenamento de energia e isolamento térmico, também é uma glândula endócrina.¹⁷² Suas células constituintes, os adipócitos, secretam substâncias (hormônios, proteínas, citocinas) no sistema circulatório que são denominadas adipocinas ou adipocitocinas.¹⁷³ Estas, após secretadas na corrente sanguínea, podem interagir com a barreira hematoencefálica e atuar no SNC, onde podem estar

envolvidas na modificação do metabolismo de monoaminas e na indução da secreção de cortisol (envolvimento do eixo HPA).¹⁷⁴ O desregulamento da via de adipocitocinas vem sendo investigado em doenças psiquiátricas¹⁷⁵ e em modelos de depressão.¹⁷⁶ Duas adipocitocinas bem estudadas até o momento são a adiponectina,¹⁷⁷ a qual apresenta efeitos anti-inflamatórios e foi identificada como indicador do mecanismo antidepressivo de tratamentos com cetamina, inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs) e inibidores seletivos de recaptção da serotonina e da norepinefrina (ISRSN);¹⁷⁸ e a leptina^{179, 180} que é um composto pró-inflamatório e também relacionado a homeostase energética.¹⁸¹

Dmitrzak-Weglarz *et al.*¹⁸² mostraram a correlação da baixa concentração de adiponectina no sangue com episódios de depressão em pacientes com transtorno bipolar. A administração de cetamina aumentou a concentração de adiponectina e diminuiu a concentração de outra adipocitocina, a resistina; enquanto que o tratamento com terapia eletroconvulsiva (tratamento para depressão refratária) baixou ambos os níveis de adiponectina e resolvina. Independente do tratamento, as alterações nos níveis de adipocitocinas foram correlacionadas a melhoras nos sintomas de depressão. Permoda-Pachuta *et al.* também relataram mudanças nas concentrações de adiponectina, resistina, como também de BDNF, após o tratamento com terapia eletroconvulsiva, onde os efeitos antidepressivos e as mudanças de concentrações foram correlacionadas com a severidade dos sintomas e ao tipo de depressão.¹⁸³

A via da necroptose também já foi relatada como estando envolvida em modelos de depressão.¹⁸⁴ Diferentemente da apoptose, a necroptose é uma morte celular programada que ocorre causando uma forte resposta

inflamatória,^{185, 186} aumentando, assim, os mecanismos bioquímicos pró depressão.¹⁸⁷ Zeb *et al.* mostraram que um dos mecanismos antidepressivos da fluoxetina é pela inibição indireta dessa via.¹⁸⁸

Além disso, a administração de Ayahuasca em ambos os grupos controle e de pacientes apresentou alterações comuns ao metabolismo de éter lipídios. Apesar de apenas um KEGG ID ser associado a esta via metabólica, três compostos diferentes pertencentes à classe das fosfocolinas, porém muito semelhantes (PC O-20:4_22:6;O3, PC O-12:0_22:4;O1 e PC O-14:0_22:4;O1), foram associados ao mesmo código KEGG ID (C05212) (**Tabela 7**). Tal código se refere a compostos do tipo 1-alkil-sn-glicero-3-fosfocolina, uma classe de fosfocolinas envolvidas em processos inflamatórios. São substratos da enzima 1-alkil-sn-glicero-3-fosfocolina:acetil-CoA acetiltransferase, que é responsável pela formação de fatores de ativação de plaquetas.^{189 - 191} Apesar de ter sido descoberta na década de 1970, pesquisas a seu respeito vem crescendo atualmente, devido às suas funções sinalizadoras e de sua mediação em processos pró-inflamatórios.¹⁹² Observando-se a **Tabela 4**, nota-se que essas substâncias são reduzidas pela administração de Ayahuasca a ambos os grupos de pacientes e controle, indicando a atuação da bebida em processos anti-inflamatórios.

Outro indicativo do envolvimento do sistema inflamatório foi a anotação putativa do MGDG O-26:7_2:0 (apenas na **Condição 5**, separada, MS¹ e MS¹, RSD). Se trata de um éter lipídico de monogalactosil diglicerídeo com propriedades anti-inflamatórias,^{193, 194} é encontrado em oligodendrócitos e está envolvido no processo de mielinização que ocorre através da ativação da proteína quinase C pelo MGDG, o qual é um biomarcador para o processo.¹⁹⁵

Recentemente, Zhang *et al.*¹⁹⁶ relataram baixa concentração de MDGD em pacientes depressivos quando comparados ao grupo controle. Zhou *et al.*¹⁹⁷ também relataram baixos níveis de MGDG em ratos usando um modelo de estresse crônico, como também a normalização de sua concentração após a administração de cetamina. Neste trabalho, tanto a depressão quanto a administração de Ayahuaca ao grupo controle aumentaram a concentração de MGDG O-26:7_2:0, porém este aumento foi bem mais acentuado para a administração de Ayahuasca (**Tabela 4**).

A **Figura 20** apresenta as estruturas dos lipídios que tiveram suas identificações convertidas a KEGG ID e foram associados a vias metabólicas.

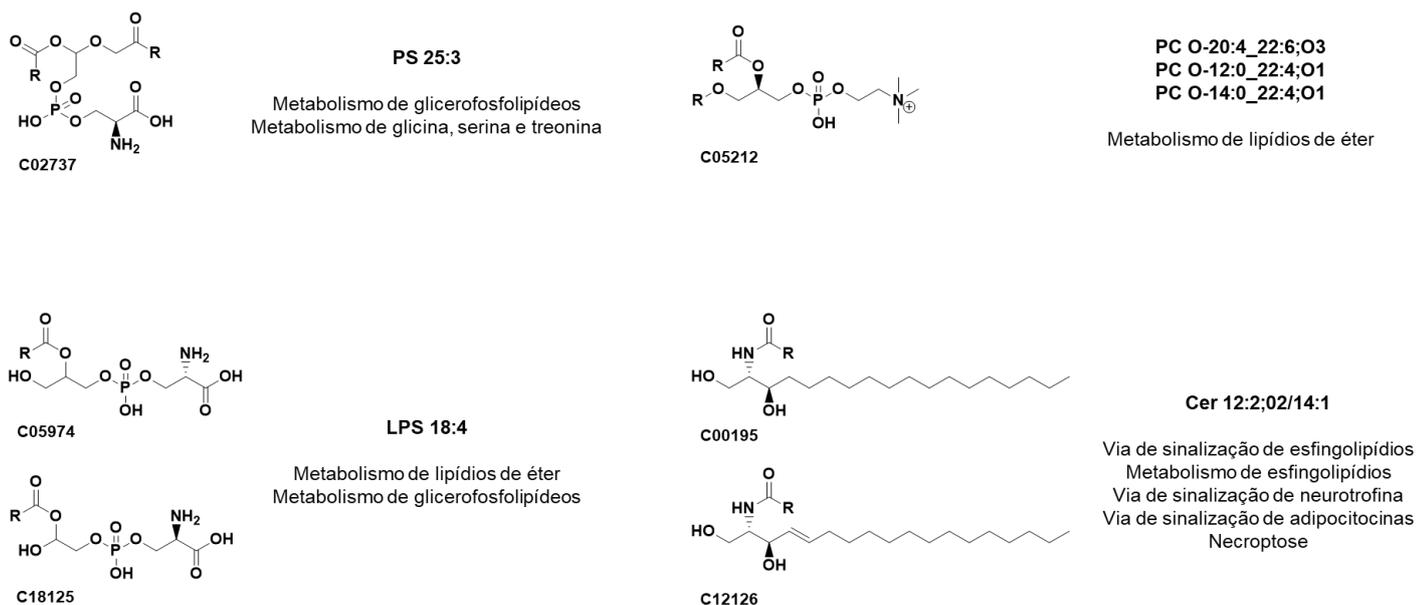


Figura 20. Estrutura e vias metabólicas dos lipídeos que tiveram suas identificações convertidas a KEGG ID no LIPEA. Cer 12:2;02/14:1 teve duas identificações, assim como o LPS 18:4; as três fosfatidicoínas identificadas apresentaram o mesmo KEGG ID.

Apesar de 14 compostos terem sido submetidos à análise de vias metabólicas, apenas 6 tiveram suas identificações convertidas (**Tabela 5**).

Dessas seis identificações, dois KEGG IDs (C00195 e C12126) foram associados à ceramida Cer 12:2;O2/14:1 e outros dois (C05974 e C18125) foram associados à lisofosfatidilserina LPS 18:4. Fora isso, as três fosfatidilcolinas identificadas foram convertidas a um mesmo KEGG ID e conseqüentemente a uma única estrutura. Quanto aos demais lipídios (que não tiveram suas identidades convertidas a KEGG ID), suas estruturas não foram encontradas na literatura e não foram incluídas neste trabalho, a fim de se evitar equívocos.

4.2 Investigação da fase aquosa

4.2.1 Análises uni e multivariadas e interpretações de vias metabólicas

Os parâmetros da **Condição 4** (separada, MS¹ e MS², sem filtro) também foram aplicados para a análise metabolômica das amostras, ou seja, para a investigação de possíveis alterações metabólicas indicadas por metabólitos que se encontram na porção aquosa extraída das amostras de soro sanguíneo. Para averiguação também da estabilidade do equipamento na aquisição dos dados metabolômicos, gráficos de PCA para visualização dos agrupamentos das amostras QC foram plotados (**Figuras 21 e 22**).^d

^d Os gráficos de PCA para os experimentos metabolômicos foram construídos com o MetaboAnalyst 6.0.

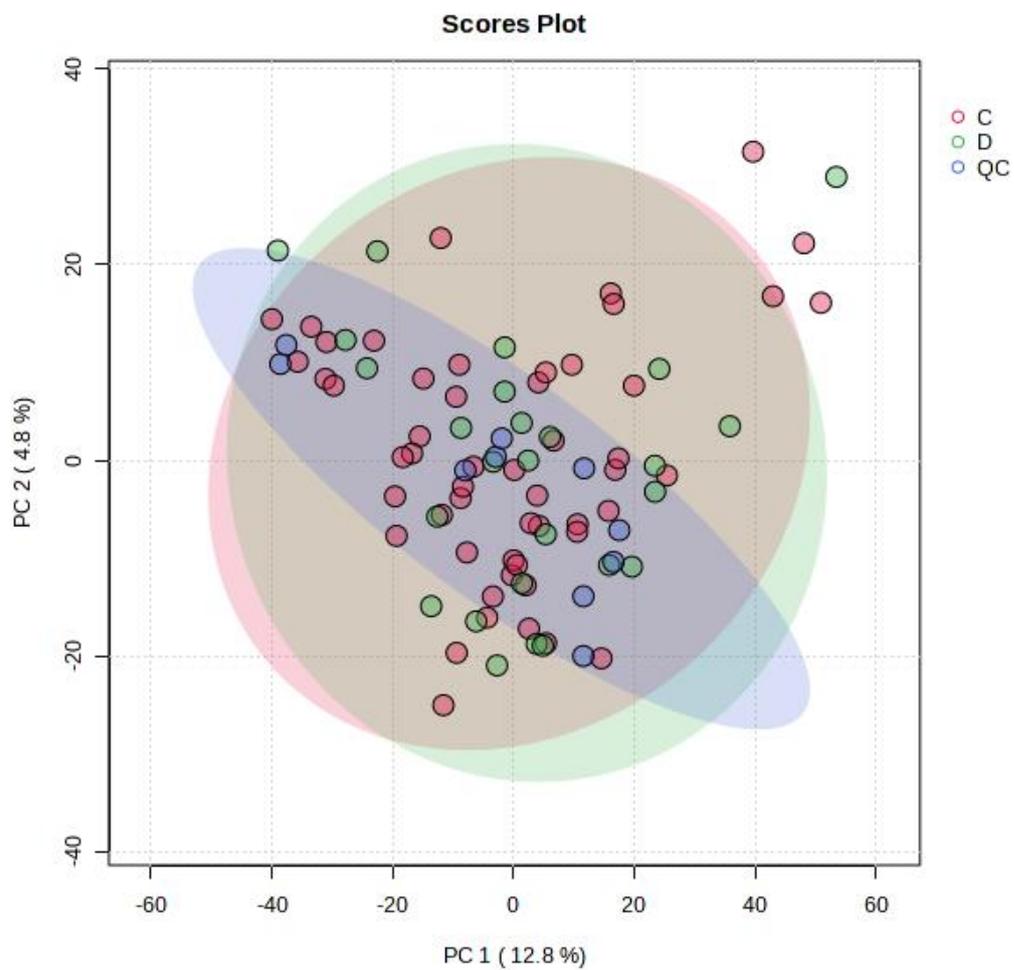


Figura 21 Gráfico de escores de PCA para as análises metabolômicas feitas no modo ESI negativo.

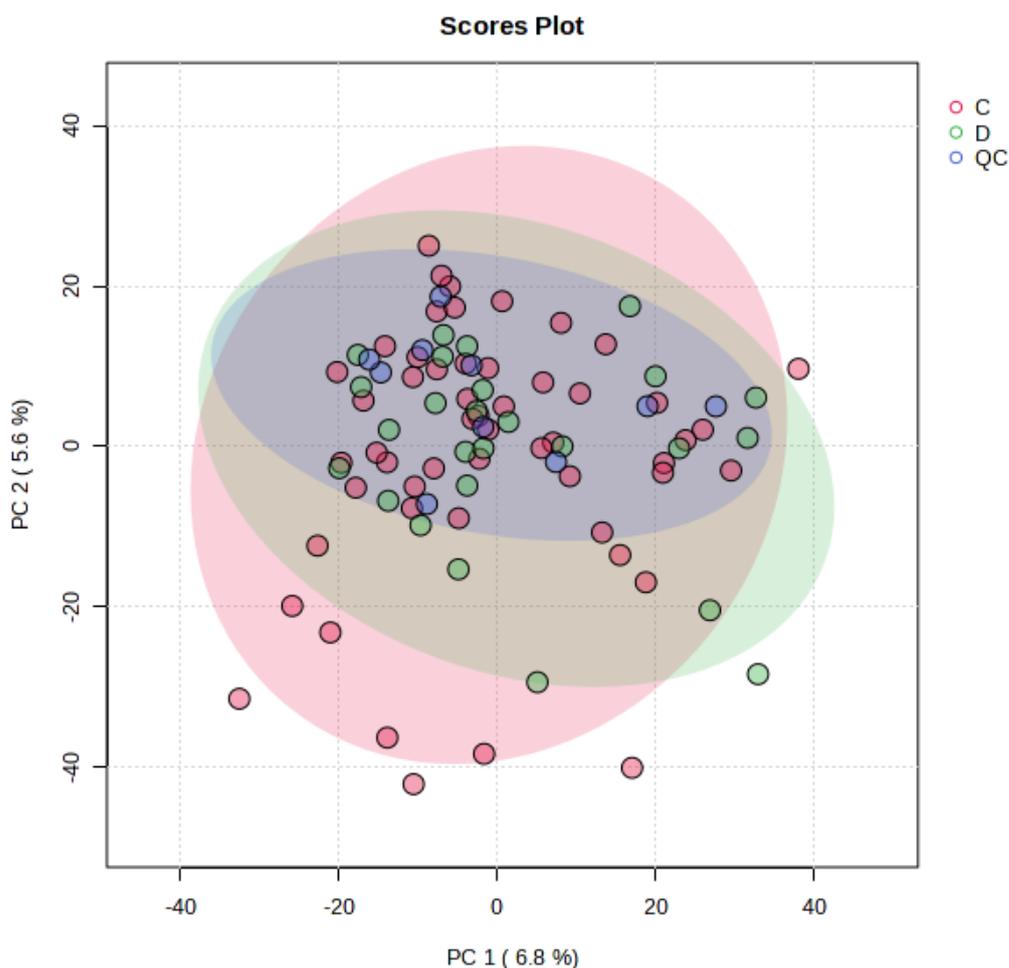


Figura 22 Gráfico de escores de PCA para as análises metabolômicas feitas no modo ESI positivo.

A flutuação do equipamento observada na aquisição dos dados lipidômicos também esteve presente na aquisição dos dados metabolômicos, sendo indicada pela dispersão das amostras de QC nos gráficos de PCA (**Figuras 21 e 22**). Novamente houveram maiores variações na PC1, sendo esta mais acentuada para as aquisições no modo negativo.

Do mesmo modo que para a investigação lipidômica, os modelos de PLS-DA construídos com todas as variáveis não apresentaram valores de figura de

mérito aceitáveis (Anexos), de forma que os *features* diferenciais (*Volcano Plot*) para cada comparação de grupo também foram extraídos das tabelas originais e compuseram novas tabelas que foram submetidas ao MetaboAnalyst para novas análises estatísticas (PCA, HCA e PLS-DA). Os resultados obtidos se encontram nas **Figuras 23 a 27**.

Os resultados não foram tão satisfatórios quanto aqueles encontrados para os *features* da fase orgânica. Mesmo juntando-se os *features* diferenciais para os modos ESI negativo e positivo para as análises estatísticas, houve apenas uma tendência de separação do grupo de pacientes do grupo controle no gráfico de escores de PCA (**Figura 23**), diferentemente dos *features* diferenciais da fase orgânica que, em conjunto, puderam separar completamente os dois grupos (**Figura 15**). A análise por HCA também não discriminou as amostras adequadamente, porém o modelo de PLS-DA apresentou valores de mérito aceitáveis, com um valor de Q^2 em torno de 0,5, mas distante do valor de R^2 . De fato, apenas nas comparações dos grupos de pacientes, antes e após a administração de Ayahuasca (**Figura 24**) ou de placebo (**Figura 25**), estes resultados foram bem satisfatórios, com exceção da amostra AQ10_NEG que foi classificada erroneamente (**Figura 25**) no modelo de HCA. Os modelos de PCA apresentaram os grupos totalmente separados.

Para a administração de Ayahuasca (**Figura 26**) ou de placebo (**Figura 27**) ao grupo controle, os resultados obtidos não apresentaram nenhuma tendência de separação nos gráficos de escores de PCA. Do mesmo modo, as análises por HCA não puderam discriminar as amostras corretamente, e as figuras de mérito dos modelos de PLS-DA apresentaram valores não satisfatórios.

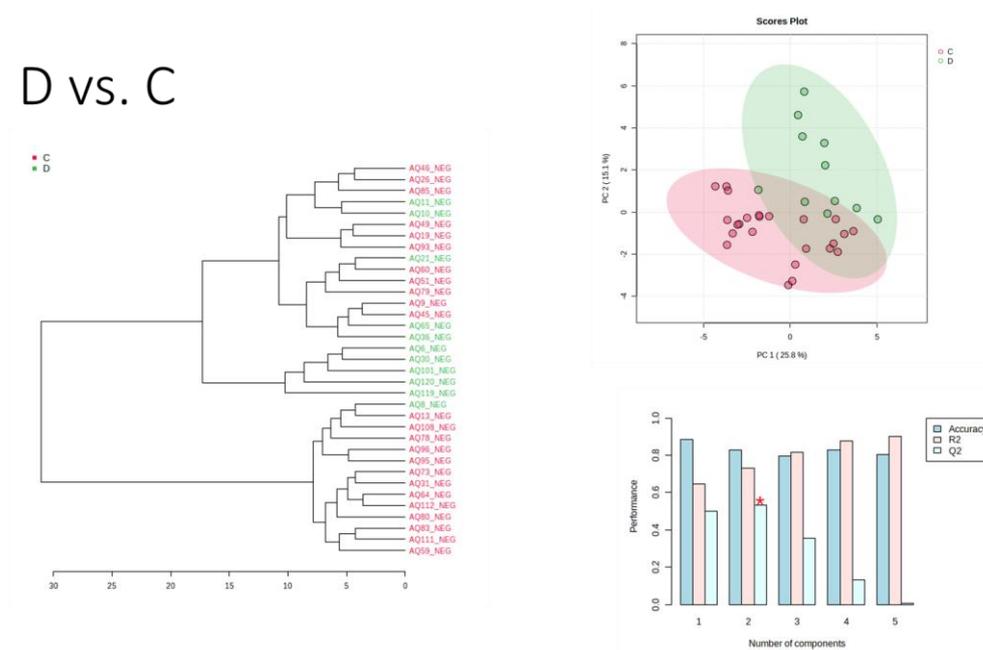


Figura 23. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle com o grupo de pacientes.

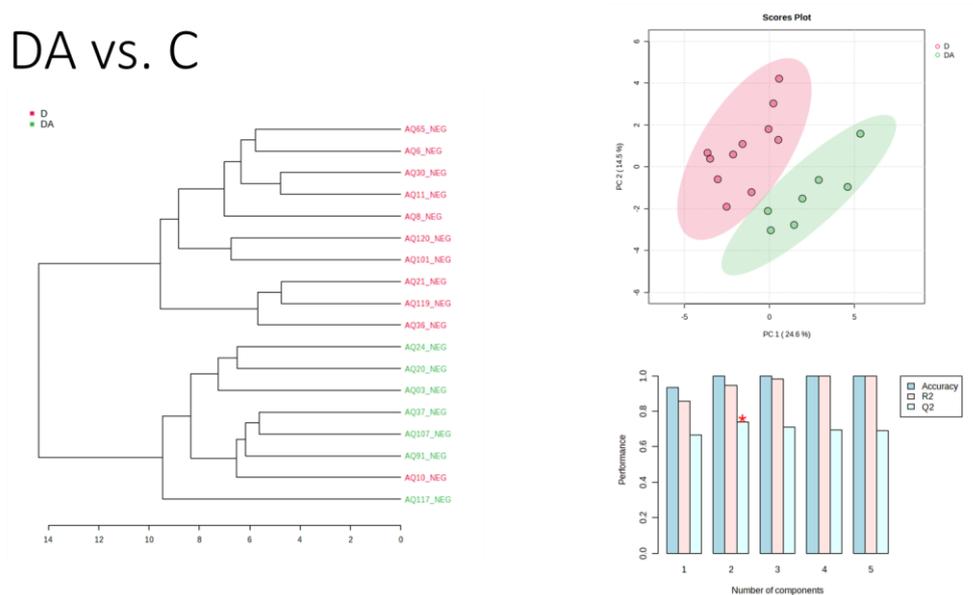


Figura 24. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de Ayahuasca.

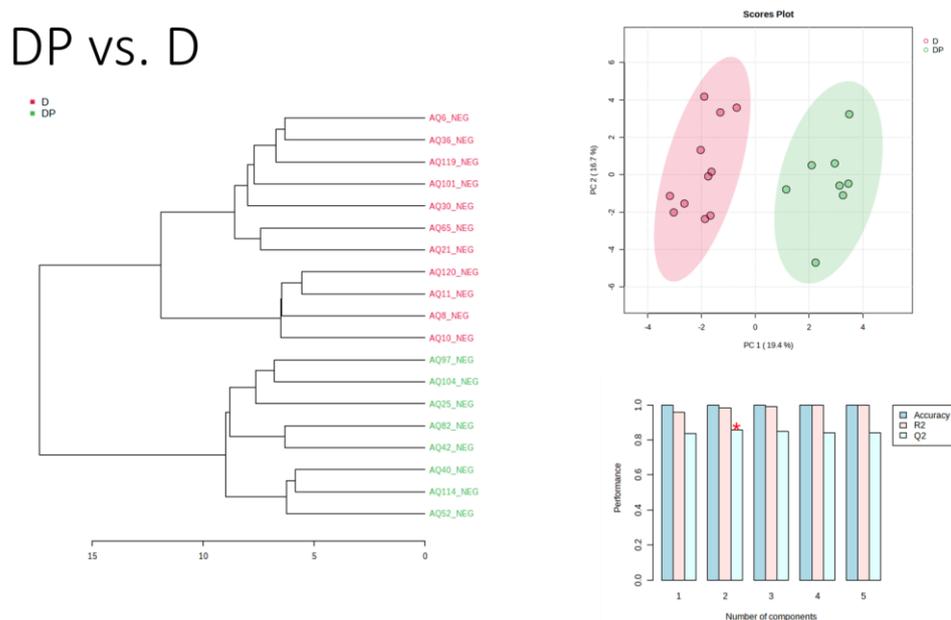


Figura 25. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados

nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo de pacientes antes e após a administração de placebo.

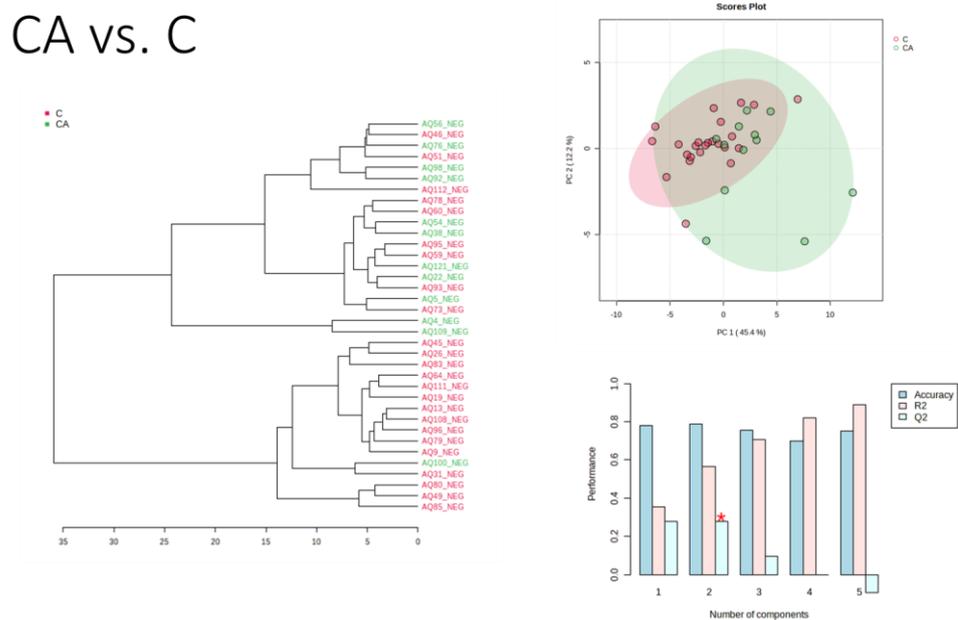


Figura 26. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os metabolitos polares diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para comparação do grupo controle antes e após a administração de Ayahuasca.

CP vs. C

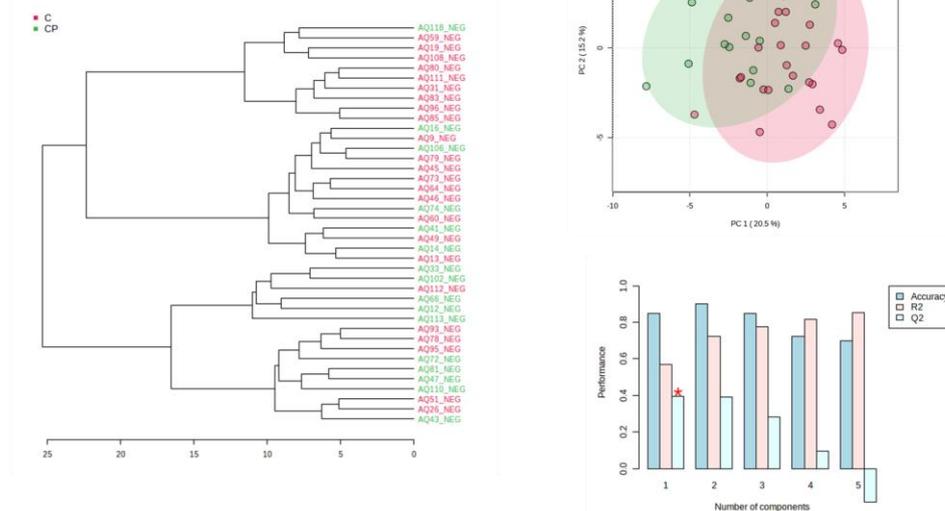


Figura 27. Gráfico de HCA, gráficos de escores de PCA e figuras de mérito de PLS-DA para a análise feita combinando os *features* diferenciais encontrados nos modos ESI negativo e positivo para a comparação do grupo controle antes e após a administração de placebo.

Um diagrama de Venn foi criado para visualização do número de metabólitos encontrados em cada comparação de grupo 2 a 2, como também para evidenciar aqueles em comum entre a depressão e o tratamento com Ayahuasca (**Figura 28**). No total, 4 *features* diferenciais foram identificados, sendo três deles comuns entre as alterações causadas pela depressão e pelo tratamento com Ayahuasca no grupo de pacientes (angoletina, ácido quiodectônico e ácido perfluorohexanóico) e um comum entre a depressão e a aplicação de Ayahuasca ao grupo controle (histamina). A **Tabela 7** resume as informações estatísticas de tais metabólitos e **Tabela 8** as informações biológicas.

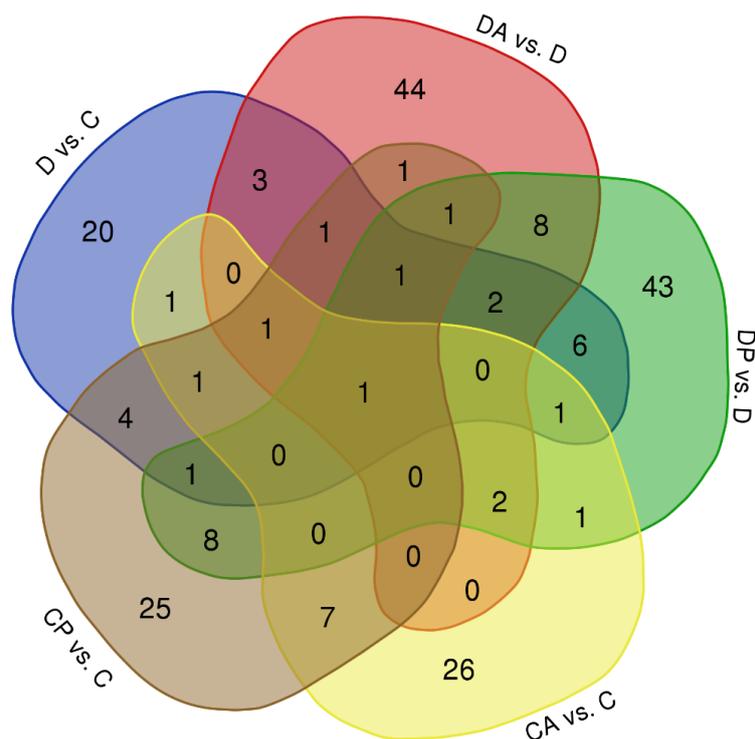


Figura 28. Diagrama de Venn para os experimentos metabolômicos incluindo os *features* encontrados na comparação dos grupos C vs. D, C vs. CA, C vs. CP, D vs. DA e D vs. DP (aplicando a **Condição 4**). Foram considerados os *features* por meio da comparação dos espectros de MS¹ e de MS² com a biblioteca interna do MS-DIAL.

Tabela 7. Valores de *fold change*, *raw p-value* e VIP score para os metabólitos polares encontrados

Metabólito	Aduto	KEGG ID	Ontologia	Fold Change	log ₂ Fold Change	Raw p-value	VIP score**
D vs C e DA vs D							
angoletina	[M+H] ⁺	-	2'-Hidroxi-dihidrocalconas	0,3513 (C vs. D) 2,0343 (D vs. DA)	-1,5091 (C vs. D) 1,0246 (D vs. DA)	9,97E-05 (C vs. D) 0,0283 (D vs. DA)	3,1735 (C vs. D) 2,1936 (D vs. DA)
ácido quiodectônico	[M-H] ⁻	-	Naftofuranos	2,2058 (C vs. D) 2,3016 (D vs. DA)	1,1413 (C vs. D) 1,2026 (D vs. DA)	0,0391 (C vs. D) 0,0491 (D vs. DA)	2,7512 (C vs. D) 2,8641 (D vs. DA)

ácido perfluorohexanóico	[M-H] ⁻	-	Ácido perfluoroalquilcarboxílico e derivados	3,9492 (C vs. D) 2,0702 (D vs. DA)	1,9816 (C vs. D) 1,0498 (D vs. DA)	0,0436 (C vs. D) 0,0387 (D vs. DA)	2,7475 (C vs. D) 3,4319 (D vs. DA)
D vs C e CA vs C							
histamina	[M+H] ⁺	C00388	2-ariletilamina	0,4977 (C vs. D) 0,4548 (C vs. CA)	-1,0066 (C vs. D) -1,1368 (C vs. CA)	0,0012 (C vs. D) 0,0011 (C vs. CA)	2,5648 (C vs. D) 3,1546 (C vs. CA)

Tabela 8. Informações biológicas para os metabólitos hidrofílicos encontrados

Metabólito	Bioquímica
angoletina	Inibidor da RNase H e da RDDP do HIV-1
ácido quiodectônico	Pigmento natural encontrado em plantas, pertence à classe das antraquinonas
ácido perfluorohexanóico	Polímero poluente e xenobiótico, rapidamente bioacumulado
histamina	Neurotransmissor envolvido em processos inflamatórios

A angoletina (**Figura 29**) é um flavonoide encontrado em espécies como *Ceratiola ericoides* Michx. (Ericaceae), *Myrica gale* L. (Myricaceae) e *Uvaria angolensis* Welw. ex. Oliv. ou *Uva angolensis* (Welw. ex Oliv.) Kuntze (Annonaceae)^e, 198, 199 Há pouco sobre sua atividade biológica na literatura científica. Porém, um estudo recente indicou seu potencial como inibidor das funções da polimerase transcriptase reversa associada ao DNA - do inglês (RT)-associated DNA polymerase (RDDP) -, e da ribonuclease H (Rnase H) em ensaios *in vitro*. Tais funções são essenciais para a replicação do genoma viral do HIV-1.^{200, 201} Observando-se a **Tabela 7**, nota-se que a administração de

^e Nomes científicos completos e famílias foram obtidas no site *Plants of the World Online* (<https://powo.science.kew.org/>), já que não são plantas brasileiras e, por isso, não foram encontradas no site Flora e Funga do Brasil.

Ayahuaca aumentou a concentração de angoletina no soro sanguíneo, indicando que esta pode estar contida também em uma ou em ambas as plantas da bebida.

Dois dos metabólitos comuns entre as alterações causadas pela depressão e pela administração de Ayahuasca ao grupo de pacientes foram o ácido quiodectônico^{202 - 204} e o ácido perfluorohexanóico (**Figura 29**).^{205 - 207} O primeiro é um pigmento amarelo avermelhado encontrado principalmente em fungos liquenizados. O segundo se trata de um polímero, sendo, portanto, um composto sintético e que é rapidamente bioacumulado. Este foi adicionado a bancos de dados como o HMDB por Dinesh Kumar Barupal e Oliver Fiehn. Os dois realizaram uma busca por publicações nos bancos de dados do NCBI com intuito de mapear o exposoma²⁰⁸ humano e como resultado registraram 65957 compostos a 50 bancos de dados relacionados a vias metabólicas.²⁰⁹

Nem a depressão, por estar associada a mudanças fisiológicas, bioquímicas e psíquicas; nem a Ayahuasca, por ser preparada a partir de plantas, podem ser responsáveis por alterações nos níveis de concentração de ácido perfluorohexanóico, de forma que as condições experimentais possam ter permitido a visualização de um composto que esteja em concentrações relativas diferentes entre o grupo de pacientes e o grupo controle devido a outros motivos, diferentes daqueles causados pelo *design* do estudo. Há uma grande possibilidade de uma anotação putativa equivocada do composto, visto que os *features* diferenciais comuns foram identificados apenas pela comparação de espectros de MS¹ com a biblioteca interna do MS-DIAL (apesar da inclusão de *features* assinados por espectros de MS¹ e de MS², os *features* comuns entre depressão e Ayahuasca foram anotados apenas com base nos espectros de MS¹).

Por fim, a histamina (**Figura 29**) foi identificada como alterada pela depressão e também modulada pela administração de Ayahuasca ao grupo controle. Esta é responsável pela regulação de funções cerebrais como sono, ciclo circadiano, fome, temperatura corporal, mecanismos neuroendócrinos e locomoção.^{210 - 214} Se trata do neurotransmissor ligado a processos neuroinflamatórios e apresenta quatro receptores (H₁R, H₂R, H₃R e H₄R), os quais possuem diferentes funções, porém todos já foram relacionados à patologia da depressão, onde o antagonismo do receptor H₁R e o agonismo do receptor H₃R podem apresentar efeitos ansiolíticos.²¹⁵

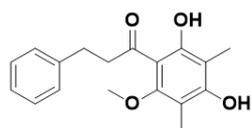
A partir da atividade do auto receptor pré-sináptico H₃R, a histamina é sintetizada a partir de L-histidina pela histidina decarboxilase²¹⁶ no núcleo tuberomamilar situado no hipotálamo e é enviada para todo o SNC.²¹⁷ O H₃R também atua como um heteroreceptor, modulando a transmissão de outros neurotransmissores como serotonina,^{218, 219} noradrelanina, dopamina,^{220, 221} GABA e N-metil-D-aspartato (receptores de aspartato), que são afetados em casos de depressão.^{222, 223} Estresse e inflamação aumentam a atividade histaminérgica no SNC que inibe a transmissão de serotonina via atividade do receptor H₃R.²²⁴

O receptor H₄R, por sua vez, é encontrado em células do sistema imunológico (mastócitos, células T, células dendríticas)²²⁵ e está ligado a processos pró-inflamatórios, onde seu agonismo aumenta a atividade de transportadores de glutamato instantaneamente.²²⁶ A modulação dos receptores H₁R e H₂R causa a liberação de glutamato nos astrócitos, enquanto a ativação do receptor H₃R suprime neurônios glutamatérgicos.^{227, 228}

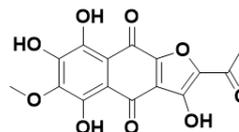
O glutamato vem sendo correlacionado a casos de depressão e de seu tratamento.²²⁹ A administração de cetamina²³⁰ aumenta a liberação de glutamato através da inibição do receptor NMDA,²³¹ que através de uma cascata bioquímica leva à produção de BDNF,²³² neurofina ligada à neurogênese e à plasticidade e que se encontra baixa em episódios de depressão^{233, 234} e que é rapidamente aumentada pela administração de psicodélicos pela ativação do receptor 5-HT_{2A}.^{235, 236}

A histamina se apresenta, portanto, como uma ponte entre duas teorias bioquímicas vigentes sobre a depressão: a das monoaminas²³⁷ e a das citocinas.²³⁸ A primeira relaciona sintomas de depressão com concentrações baixas de monoaminas na fenda sináptica, principalmente norepinefrina, dopamina e serotonina; a segunda evidencia a relação do sistema imune e a liberação de compostos pró-inflamatórios a sintomas de estresse e depressão.

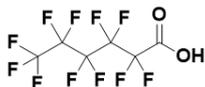
Mesmo com fortes evidências do envolvimento do sistema histaminérgico em casos de depressão, os mecanismos envolvidos em tal via sob a patologia ainda estão sob investigação e até o momento trazem resultados inconclusivos. Um exemplo é que alta liberação de histamina no sistema nervoso central já foi correlacionada à sintomas de estresse e de depressão,²³⁹ porém, também já foi correlacionada a efeitos ansiolíticos.²⁴⁰



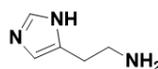
angoletina



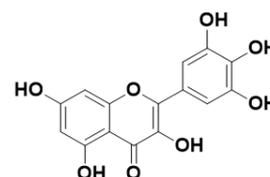
ácido quiodectônico



ácido perfluorohexanóico



histamina



miricetina

Figura 29 Estruturas dos compostos comuns aos distúrbios causados pela depressão e às modulações disparadas pela Ayahuasca nos experimentos metabolômicos.

4.2.2 Análise por ANOVA

Das análises por ANOVA, apenas uma comparação (C vs. D vs. DA) nos experimentos de metabolômica no modo negativo trouxe um metabólito diferencial, cuja anotação putativa através da comparação do espectro de MS¹ foi miricetina (**Figura 29**) (p-valor = $5,44 \times 10^{-5}$, FDR = 0,0198). Se trata de um flavonoide encontrado em diversas plantas, bebidas, chás, alimentos e ervas medicinais.²⁴¹ Como outros flavonoides, apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiapoptótica e neuroprotetiva.^{242, 243} Modula a serotonina através da inibição da serotonina N-acetiltransferase (enzima responsável pela conversão de serotonina a N-acetilserotonina).²⁴⁴ Sua atividade neuroprotetiva ocorre pela inibição da inflamação, do estresse oxidativo e da liberação excessiva de glutamato (o qual é excitotóxico)^{245 - 248}. Jang *et al.*²⁴⁹ relataram a

diminuição de compostos pró-inflamatórios e citocinas em ratos com neuroinflamação induzida por liposacarídeos (LPS) após administração de miricetina. Além disso, o composto normaliza baixas concentrações de BDNF²⁵⁰ no hipocampo, apresentando grande potencial antidepressivo.²⁵¹

4.3 Interpretações biológicas gerais

Os *features* diferenciais em comum entre as alterações metabólicas causadas pela depressão e as modulações causadas pela administração de Ayahuasca indicam o envolvimento de vias importantes para os casos de depressão, como a dos glicerofosfolipídios, dos esfingolipídios, das adipocitoquinas e da necroptose. A análise de ambas as fases (orgânica e aquosa) também evidencia a participação da neurotrofina BDNF que se encontra em baixas concentrações na patologia e é aumentada por tratamentos antidepressivos. Vários compostos anotados nesse estudo (level 3 de identificação)²⁵² apresentam atividades anti ou pró-inflamatória, evidenciando a participação do sistema imune em casos de depressão. A histamina, neurotransmissor identificado entre os metabólitos, também participa nos processos inflamatórios, além de estar envolvida na modulação de outros neurotransmissores.

O surgimento dos primeiros antidepressivos na década de 1970 se deu pela formulação da teoria das monoaminas, ligando sintomas da patologia à baixos níveis de monoaminas (neurotransmissores) na fenda sináptica. Sabe-se que o reequilíbrio dos neurotransmissores ocorre de 24 a 48 horas após a administração dos antidepressivos, porém, seus efeitos necessitam de dias ou

semanas para poderem surtir. Tal fato indica uma maior complexidade nos casos de depressão e devido a vários estudos indicando a relação do sistema imune a episódios de depressão, recentemente surgiu uma nova teoria bioquímica em torno da patologia: a das citocinas.

A teoria das citocinas relaciona concentrações excessivas de compostos pró-inflamatórios a sintomas da depressão e vem ganhando embasamento conforme o número de publicações científicas aumentam. A histamina, além de ser o principal neurotransmissor ligado à neuroinflamação, também regula a transmissão de outros neurotransmissores e tem seu sistema com origem no hipotálamo, onde está é sintetizada e liberada para todo o SNC. A atividade histaminérgica também está ligada ao funcionamento do sistema de estresse, ativando o sistema endócrino no hipotálamo e causando a liberação de cortisol. Desse modo, a histamina faz uma ponte entre as teorias das monoaminas e das citocinas, bem como indica o envolvimento do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em casos de depressão (**Figura 30**).

A **Figura 30** apresenta as relações dos compostos identificados neste trabalho. A mielina é metabolizada em ceramida pela ASM e ativa o sistema inflamatório, assim como sulfonolipídios, hexosilxeramidas e fosfatidilcolinas (PCOs). O MGDG, a miricetina e a fitoesfingosina apresentam atividade anti-inflamatória, sendo que a mirectina também combate ao estresse oxidativo e modula a concentração de serotonina. A lisofosfatidilserina regula o sistema histaminérgico e tem concentrações positivamente correlacionadas com os níveis de serotonina. Já a histamina regula a inflamação pelo receptor H4R e modula neurotransmissores pelo H3R, ativando o eixo hipotálamo-pituitária-

adrenal (HPA). Efeitos antidepressivos estão associados à produção de BDNF e psicodélicos clássicos (os quais incluem a DMT encontrada na Ayahuasca) levam à produção de BDNF pela ativação do receptor 5-HT_{2A}, enquanto a cetamina através do receptor NMDAR.

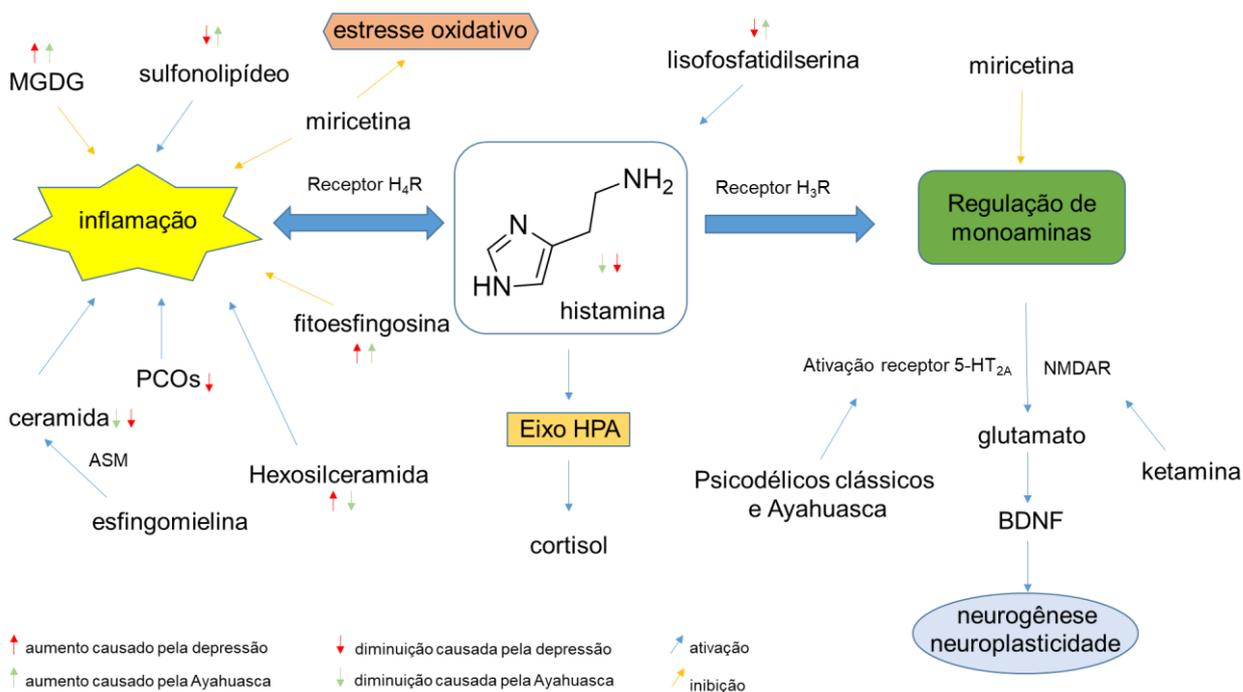


Figura 30. Relação dos lipídeos e metabólitos encontrados nesse trabalho. A miricetina é um flavonoide, não sendo produzida por humanos e estando diretamente relacionada à administração de Ayahuasca.

4.4 Limitações do estudo

Apesar de os *features* diferenciais encontrados concordarem com dados encontrados na literatura acerca da depressão e do tratamento com psicodélicos, o presente trabalho apresenta limitações em várias de suas etapas de realização. A primeira limitação diz respeito ao número de amostras, que foi

pequeno para cada grupo comparado. A análise com uma amostragem maior contribuiria para a construção de modelos com maior poder estatístico.

A segunda limitação diz respeito a variação instrumental indicado pela dispersão das amostras de QCs nos gráficos de PCA.

A terceira limitação se refere ao fato de os *features* diferenciais encontrados nas comparações de grupo terem suas identificações obtidas apenas por meio da comparação de seus espectros de MS¹ com a biblioteca interna do MS-DIAL (identificação putativa de level 3),²⁵² o que traz incerteza quanto a suas reais identificações.

A quarta limitação consiste na qualidade dos modelos estatísticos construídos. Os modelos de PLS-DA não apresentaram figuras de mérito aceitáveis quando aplicados ao conjunto de todas as variáveis para as comparações de grupo e não foi possível obter *features* validados através dos modelos de *Volcano Plot* (dentro do próprio programa MetaboAnalyst). Os modelos de PLS-DA só apresentaram figuras de mérito aceitáveis quando construídos apenas com os *features* diferenciais para cada comparação.

Por fim, existe a limitação quanto ao banco de dados KEGG. Nem todos os lipídios anotados pelo MS-DIAL possuem um KEGG ID, além de um mesmo composto poder possuir dois KEGG IDs diferentes ou de um mesmo KEGG ID ser representativo para mais de uma molécula. Este último caso ocorre, porque muitos dos compostos encontrados na biblioteca KEGG possuem cadeias laterais genéricas em suas estruturas, de modo que moléculas semelhantes sejam enquadradas dentro do mesmo código de identificação.

5. Conclusão e perspectivas

No presente trabalho, pôde-se obter indícios de lipídios e metabólitos associados a vias metabólicas alteradas em episódios de depressão e que também foram moduladas pela administração de Ayahuasca. Tais lipídios, metabólitos e vias associadas se apresentam como potenciais alvos para o tratamento da patologia, não só com Ayahuasca, mas também através de outras intervenções terapêuticas.

A administração de placebo ao grupo de pacientes também causou alterações metabólicas comuns com aquelas disparadas pela depressão. Estas vias foram excluídas daquelas que também foram moduladas pela Ayahuasca, a fim de se entender os mecanismos exclusivos da bebida, porém, se correlacionam com os resultados trazidos por Palhano Fontes *et. al.*,⁹⁶ onde o grupo de pacientes ao qual foi administrado placebo também apresentou redução dos índices de depressão. Esta foi menos acentuada quando comparada à redução dos índices de depressão relatados para a administração de Ayahuasca, entretanto, e também demonstrou tendência de retorno ao nível basal após 7 dias. De toda forma, uma mudança no metabolismo dos pacientes causada pelo placebo também foi observada e pode indicar uma maior susceptibilidade de pacientes depressivos a alterações metabólicas, já que o mesmo fenômeno não foi observado no grupo de pacientes.

De forma geral, o trabalho corrobora com dados da literatura acerca da depressão e de seu tratamento com psicodélicos, evidenciando a participação do sistema imune na patologia e de sua correlação com o desbalanço de neurotransmissores. Tal correlação é evidenciada pela histamina, que é um

biomarcador de neuroinflamação e também modula a transmissão de outros neurotransmissores como serotonina, dopamina e glutamato, ativando também o eixo HPA.

Mesmo se tratando de uma abordagem não direcionada (*untargeted*) dos experimentos de lipidômica e metabolômica e da identificação dos *features* ser apenas putativa, foi possível obter indícios da atividade antidepressiva e, principalmente, anti-inflamatória da Ayahuasca por meio da correlação de vários lipídios e metabólitos anotados com suas vias metabólicas ou com suas atividades biológicas apresentadas em artigos científicos. Os resultados também trouxeram indícios da correlação das variações nas concentrações de BDNF e, conseqüentemente, na neuroplasticidade e neurogênese, na patologia e em seu tratamento. O envolvimento do eixo HPA, da microbiota e do estresse oxidativo na patologia também foi identificado, de forma que o trabalho reúne vários aspectos acerca da depressão que já foram reportados na literatura e apresenta uma correlação entre elas.

Uma abordagem direcionada (*targeted*) poderia confirmar as anotações putativas dessas moléculas, como também averiguar mais profundamente as diferenças de concentrações entre os grupos estudados com a aplicação de técnicas quantitativas, possibilitando interpretações biológicas mais acuradas.

A lipidômica e a metabolômica são abordagens novas e vêm apresentando um desenvolvimento constante, no qual novos *softwares* e novos métodos são apresentados continuamente na literatura científica, além também da expansão dos bancos de dados e do aprimoramento do planejamento dos experimentos. Dessa forma, com a evolução da área, é bem provável que novos

experimentos lipidômicos e metabolômicos realizados no futuro com os mesmos dados utilizados nesse trabalho também tragam melhores e novos resultados.

Quanto ao panorama das pesquisas em torno da Ayahuasca, o número de publicações vem crescendo acentuadamente nas últimas duas décadas, incluindo diversas áreas dentro da saúde, das ciências naturais e das ciências sociais (principalmente da antropologia) e revelando diversos potenciais da Ayahuasca, como no tratamento do uso abusivo de substâncias psicotrópicas, em distúrbios alimentares como anorexia e no tratamento de questões psicológicas, dos quais uma parcela pode ser exemplificada por pessoas que adquiriram alguma questão psicológica devido ao descobrimento de uma doença crônica e que utilizam Ayahuasca para lidar melhor com suas condições e encontrar a “cura”.

O conhecimento a respeito da bebida vem crescendo paralelamente a diversas consequências derivadas da expansão de seu uso. As plantas utilizadas para a preparação da bebida são nativas da bacia amazônica e pertencem ao conhecimento indígena ameríndio. Hoje, entretanto, são cultivadas em outros continentes devido ao seu uso em pesquisas, pela sua globalização e pela difusão das religiões ayahuasqueiras a outros continentes.

Como consequência, diversos aspectos problemáticos surgiram dessa globalização, dos quais alguns exemplos são o aumento da invasão de territórios indígenas por não indígenas, a colheita predatória das plantas que as coloca em perigo de extinção, e a possível apropriação cultural que ocorre no uso da bebida sem o reconhecimento de sua origem ancestral e do conhecimento indígena existente. Desse modo, muita cautela deve ser tomada na execução de pesquisas envolvendo Ayahuasca, durante as quais sempre deve ser lembrado

que se trata de uma bebida com alto potencial terapêutico, mas que, porém, esse potencial já é conhecido e utilizado pelos povos indígenas há muito tempo, sendo a bebida uma composição dentre diversas plantas que podem ser aplicadas contra a depressão de acordo com o conhecimento indígena. Além disso, as plantas envolvidas (principalmente a *Banisteriopsis caapi*) estão ligadas a processos intrínsecos à cosmovisão desses povos e para eles a Ayahuasca se trata de uma bebida sagrada.

6. Referências bibliográficas

- ¹ Ramachandra Bhat, L., Vedantham, S., Krishnan, U. M., Rayappan, J. B. B. Methylglyoxal - An emerging biomarker for diabetes mellitus diagnosis and its detection methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 133(15), 107-124 (2019). DOI: 10.1016/j.bios.2019.03.010
- ² Garden, G. A., & Campbell, B. M. Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia*, 64(10), 1755–1771 (2016). DOI: 10.1002/glia.22998
- ³ Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Zeger, S. L. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95 (2001). DOI:10.1067/mcp.2001.113989
- ⁴ Matthews, H., Hanison, J., Nirmalan, N. “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. *Proteomes*, 12;4(3):28 (2016). DOI: 10.3390/proteomes4030028
- ⁵ Olivier, M., Asmis, R., Hawkins, G. A., Howard, T. D., Cox, L. A. The Need for Multi-Omics Biomarker Signatures in Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 26;20(19):4781 (2019). DOI: 10.3390/ijms20194781
- ⁶ Bravo-Merodio, L., Williams, J. A., Gkoutos, G. V., Acharjee, A. -Omics biomarker identification pipeline for translational medicine. *Journal of Translational Medicine*, May;17(1):155 (2019). DOI: 10.1186/s12967-019-1912-5
- ⁷ Patel, S. & Ahmed, S. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 63–74 (2015). DOI: 10.1016/j.jpba.2014.12.020.
- ⁸ Wu, H.-Y., Lu, C.-T., Kao, H.-J., Chen, Y.-J., Chen, Y.-J., Lee, T.-Y. Characterization and identification of protein O-GlcNAcylation sites with substrate specificity. *BMC Bioinformatics*, 15 Suppl 16(Suppl 16):S1. DOI:10.1186/1471-2105-15-s16-s1
- ⁹ dos Santos, E. A. F., Santa Cruz, E. C., Ribeiro, H. C., Barbosa, L. D., Zandonadi, F. S., Sussulini, A. Multi-omics: An Opportunity to Dive into Systems Biology. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 7 (29), 18-44 (2020). DOI: 10.30744/brjac.2179-3425.RV-03-2020
- ¹⁰ Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., Clish, C. B. Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 98(1), 30.2.1–30.2.24 (2012). DOI:10.1002/0471142727.mb3002s98
- ¹¹ Vinayavekhin, N., & Saghatelian, A. Untargeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology* (2010). DOI:10.1002/0471142727.mb3001s90
- ¹² Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Kochanek, P. M., Pitt, B. R., Kagan, V. E., Bayär, H. Mass spectrometry based oxidative lipidomics and lipid imaging: Applications in traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 115(6), 1322–1336 (2010). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.07055.x
- ¹³ Røberg-Larsen, H., Lundanes, E., Nyman, T. A., Berven, F. S., Wilson, S. R.. Liquid chromatography, a key tool for the advancement of single-cell omics

analysis. *Analytica Chimica Acta*, 15:1178:338551 (2021). DOI:10.1016/j.aca.2021.338551

¹⁴ Koek, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Tas, A. C., Hankemeier, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics*, Sep;7(3):307-328 (2011). DOI: 10.1007/s11306-010-0254-3

¹⁵ Girolamo, F., Lante, I., Muraca, M., & Putignani, L. The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Current Organic Chemistry*, 17(23), 2891–2905 (2013). DOI:10.2174/138527281788813111816

¹⁶ Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G. A. N., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., Wishart, D. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9(7): 123 (2019). DOI:10.3390/metabo9070123

¹⁷ Dunn, W. B. & Ellis, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(4), 285–294 (2005). DOI: 10.1016/j.trac.2004.11.021

¹⁸ Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., Subramaniam, S. Lipid Classification, Structures and Tools. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811 (11), 637–647 (2011). DOI:10.1016/j.bbalip.2011.06.009.

¹⁹ Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H. Jr, Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., Dennis, E. A. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, May;46(5):839-61 (2005). DOI: 10.1194/jlr.E400004-JLR200.

²⁰ Rolim, A. E. H., Henrique-Araújo, R., Ferraz, E. G., de Araújo Alves Dultra, F. K., Fernandez, L. G. Lipidomics in the study of lipid metabolism: Current perspectives in the omic sciences. *Gene*, 554(2), 131–139 (2015). DOI: 10.1016/j.gene.2014.10.039

²¹ Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., Farooqui, T. Glycerophospholipids in Brain: Their Metabolism, Incorporation into Membranes, Functions, and Involvement in Neurological Disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*, 106 (1), 1–29 (2000). DOI:10.1016/S0009-3084(00)00128-6.

²² Schmitt, S., Cantuti Castelvetti, L., & Simons, M. (2015). Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(8), 999–1005. doi:10.1016/j.bbalip.2014.12.016

²³ Babenko, N. A., Shevereva, V. M., Gar'kavenko, V. V. Changes in the Sphingolipid Content in Tissues and Behavioral Modifications of Rats Subjected to Neurogenic Stress: Role of Sphingomyelinases. *Neurophysiology*, 48, 390–398 (2016). DOI:10.1007/s11062-017-9615-0

²⁴ Müller, C. P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Gulbins, E., Kornhuber, J. Brain Membrane Lipids in Major Depression and Anxiety Disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851 (8), 1052–1065 (2015). DOI:10.1016/j.bbalip.2014.12.014.

²⁵ Narayan, S. Sphingolipid Abnormalities in Psychiatric Disorders: A Missing Link in Pathology? *Frontiers in Bioscience*, 16 (1), 1797 (2011). DOI:10.2741/3822.

- ²⁶ Adibhatla, R. M., Hatcher, J. F. Role Of Lipids In Brain Injury And Diseases. *Future Lipidology*, 2 (4), 403–422 (2007). DOI:10.2217/17460875.2.4.403.
- ²⁷ Dawson, G. Measuring Brain Lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851 (8), 1026–1039 (2015). DOI:10.1016/j.bbalip.2015.02.007.
- ²⁸ Alabdulkarim, B., Bakeet, Z. A. N., Arzoo, S.. Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. *Journal of King Saud University - Science*, 24(4), 319–329 (2012). DOI:10.1016/j.jksus.2012.03.001
- ²⁹ Leuti, A., Fazio, D., Fava, M., Piccoli, A., Oddi, S., Maccarrone, M. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 133-169 (2020). DOI:10.1016/j.addr.2020.06.028
- ³⁰ Yager, S., Forlenza, M. J., & Miller, G. E.. Depression and oxidative damage to lipids. *Psychoneuroendocrinology*, 35(9), 1356–1362 (2010). DOI:10.1016/j.psyneuen.2010.03.01
- ³¹ Bhatt, S., Nagappa, A. N., Patil, C. R. Role of oxidative stress in depression. *Drug Discovery Today*, 25 (7), 1270–1276 (2020). DOI:10.1016/j.drudis.2020.05.001
- ³² Maria Michel, T., Pulschen, D., Thome, J. The Role of Oxidative Stress in Depressive Disorders. *Current Pharmaceutical Design*, 18(36), 5890–5899 (2012). DOI:10.2174/138161212803523554
- ³³ Gandhi, S., Abramov, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012;2012:428010 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/428010>.
- ³⁴ Joffre, C. Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in the Brain and Brain Cells. In *Feed Your Mind - How Does Nutrition Modulate Brain Function throughout Life?* In: Bosch-Bouju, C., Layé, S., Pallet, V. (Eds.), IntechOpen, 2019. DOI:10.5772/intechopen.88232.
- ³⁵ Bazinet, R., Layé, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 771–785 (2014). DOI:10.1038/nrn3820
- ³⁶ Petrovchich, I., Sosinsky, A., Konde, A., Archibald, A., Henderson, D., Maletic-Savatic, M., Milanovic, S. Metabolomics in Schizophrenia and Major Depressive Disorder. *Frontiers in Biology*, 11(3), 222–231 (2016). DOI: 10.1007/s11515-016-1400-8
- ³⁷ Kale, A. B., Kale, S. B., Chalak, S. S. S. R. T., Bang, G., Agrawal, M., Kaple, M. Lipid parameters - significance in patients with endogenous depression. *Journal of Clinical Diagnostic Research*, Jan;8(1):17-9 (2014). DOI: 10.7860/JCDR/2014/4059.3911.
- ³⁸ Mitchell, A. J., Vaze, A., Rao, S. Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis. *The Lancet*, 374(9690), 609–619 (2009). DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60879-5
- ³⁹ Shnayder, N. A., Novitsky, M. A., Neznanov, N. G., Limankin, O. V., Asadullin, A. R., Petrov, A. V., Dmitrenko, D. V., Narodova, E. A., Popenko, N. V., Nasyrova, R. F. Genetic Predisposition to Schizophrenia and Depressive Disorder Comorbidity. *Genes (Basel)*, 2;13(3):457 (2022). DOI:10.3390/genes13030457.

- ⁴⁰ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (acessado pela última vez em 20 de outubro de 2023).
- ⁴¹ El-Hage, W., Leman, S., Camus, V., Belzung, C. Mechanisms of antidepressant resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 22;4:146 (2013). DOI: 10.3389/fphar.2013.00146.
- ⁴² Gareri, P., Falconi, U., De Fazio, P., De Sarro, G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Progress in Neurobiology*, Jul;61(4):353-96 (2000). DOI: 10.1016/s0301-0082(99)00050-7.
- ⁴³ Spina, E., Perucca, E. Newer and Older Antidepressants. *CNS Drugs* 2, 479–497 (1994). DOI:10.2165/00023210-199402060-00008
- ⁴⁴ Feighner, J. P. Mechanism of action of antidepressant medications. *Journal of Clinical Psychiatry*, 1999;60 Suppl 4:4-11; discussion 12-3. PMID: 10086478.
- ⁴⁵ Preskorn, S.H. Sudden death and tricyclic antidepressants (TCA): A rare adverse event linked to high TCA plasma levels. *Nordic Journal of Psychiatry*, 47(sup30), 49-55 (1993). DOI:10.3109/08039489309104125.
- ⁴⁶ R.A. Ener, S.B. Meglathery, W.A.V. Decker, R.M. Gallagher, Serotonin syndrome and other serotonergic disorders, *Pain Medicine* 4(1) (2003) 63-74. doi:10.1046/j.1526-4637.2003.03005.x.
- ⁴⁷ Eisinger, G., Botros, M., Branditz, L. (2020). Serotonin Syndrome: When the Happy Hormone Gets Angry. In: Kaide, C., San Miguel, C. (Eds.), *Case Studies in Emergency Medicine*. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-030-22445-5_54
- ⁴⁸ Dy P, Arcega V, Ghali W, Wolfe W. Serotonin syndrome caused by drug to drug interaction between escitalopram and dextromethorphan. *BMJ Case Reports*, Aug;2017:bcr-2017-221486 (2017). DOI: 10.1136/bcr-2017-221486.
- ⁴⁹ Gillman, P. K. A reassessment of the safety profile of monoamine oxidase inhibitors: elucidating tired old tyramine myths. *Journal of Neural Transmission*, 125(11), 1707-1717 (2018). DOI:10.1007/s00702-018-1932-y
- ⁵⁰ Tedeschi, D. H., Fellows, E. J. Monoamine oxidase inhibitors: augmentation of pressor effects of peroral tyramine. *Science*, 144(3623), 1225-1226 (1964). DOI:10.1126/science.144.3623.1225
- ⁵¹ Ferguson, J. M. SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*, Feb;3(1):22-27 (2001). DOI: 10.4088/pcc.v03n0105.
- ⁵² Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *International Clinical Psychopharmacology*, Mar;9 Suppl 1:19-26 (1994). DOI: 10.1097/00004850-199403001-00004.
- ⁵³ Stahl, S., Grady, M., Moret, C., Briley, M. SNRIs: The Pharmacology, Clinical Efficacy, and Tolerability in Comparison with Other Classes of Antidepressants. *CNS Spectrums*, 10(9), 732-747 (2005). DOI:10.1017/S1092852900019726
- ⁵⁴ Gadad, B. S., Jha, M. K., Czysz, A., Furman, J. L., Mayes, T. L., Emslie, M. P., Trivedi, M. H. Peripheral biomarkers of major depression and antidepressant treatment response: Current knowledge and future outlooks. *Journal of Affective Disorders*, 233 (June 2017), 3–14 (2018). DOI: 10.1016/j.jad.2017.07.001

- ⁵⁵ Liu, X., Zheng, P., Zhao, X., Zhang, Y., Hu, C., Li, J., Xu, G. Discovery and validation of plasma biomarkers for major depressive disorder classification based on liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 14(5), 2322–2330 (2015). DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00144
- ⁵⁶ Shelton, R. C. Treatment options for refractory depression. *Journal of Clinical Psychiatry*, 1999;60 Suppl 4:57-61; discussion 62-3. PMID: 10086483.
- ⁵⁷ Berman, R. M., Narasimhan, M., Charney, D. S. Treatment-refractory depression: Definitions and characteristics. *Depression and Anxiety*, 5(4), 154–164 (1997). DOI:10.1002/(sici)1520-6394(1997)5:4<154::aid-da2>3.0.co;2-d
- ⁵⁸ Mulinari, S. Monoamine Theories of Depression: Historical Impact on Biomedical Research. *Journal of the History of the Neurosciences*, 21:4, 366-392 (2012). DOI: 10.1080/0964704X.2011.623917
- ⁵⁹ Hindmarch, I. Beyond the monoamine hypothesis: Mechanisms, molecules and methods. *European Psychiatry*, 17(S3), 294s-299s (2002). DOI:10.1016/S0924-9338(02)00653-3
- ⁶⁰ Yildiz, A., Gönül, A.S., Tamam, L. Mechanism of actions of antidepressants: beyond the receptors, *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 12(4), 194-200 (2002).
- ⁶¹ Harmer, C. J., Duman, R. S., & Cowen, P. J. How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches. *The Lancet Psychiatry*, 4(5), 409–418 (2017). DOI:10.1016/s2215-0366(17)30015-9
- ⁶² Wang, H., Li, P., Zhang, Y., Zhang, C., Li, K., Song, C. Cytokine changes in different types of depression: Specific or general? *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, 36, 39–51 (2020). DOI:10.1016/j.npbr.2020.02.009
- ⁶³ Chrousos, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye memorial lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 311–335 (1998). DOI:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x
- ⁶⁴ Meaney, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1161–1192 (2001). DOI: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1161
- ⁶⁵ Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 434–445 (2009). DOI: 10.1038/nrn2639
- ⁶⁶ Ruck, C. A. P., Bigwood, J., Staples, D., Ott, J., Wasson, G. Entheogens. *Journal of Psychoactive Drugs*, 11(1–2), 145–146 (1979). DOI: 10.1080/02791072.1979.10472098
- ⁶⁷ Ruffell, S., Netzband, N., Bird, C., Young, A. H., Juruena, M. F. The pharmacological interaction of compounds in ayahuasca: a systematic review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 42(6), 646-656 (2020). DOI: 10.1590/1516-4446-2020-0884
- ⁶⁸ Langdon, E. J. A tradição narrativa e aprendizagem com yagé (ayahuasca) entre os índios Siona da Colômbia. In: Labate, B.C., Araújo, W. S. (org.). *O Uso Ritual da Ayahuaca*. 2 ed. Campinas: Mercado de Letras; São Paulo: Fapesp, 2002.

- ⁶⁹ Kefeinein, B. Nixi pae como participação sensível no princípio de transformação da criação primordial entre os índios Kaxinawá no leste do Peru. *In: Labate, B.C., Araújo, W. S. (org.). O Uso Ritual da Ayahuaca. 2 ed. Campinas: Mercado de Letras; São Paulo: Fapesp, 2002.*
- ⁷⁰ Luz, P. Uso Ameríndio do Caapi.. *In: Labate, B.C., Araújo, W. S. (org.). O Uso Ritual da Ayahuaca. 2 ed. Campinas: Mercado de Letras; São Paulo: Fapesp, 2002.*
- ⁷¹ McKenna, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics*, May;102(2):111-29 (2004). DOI:10.1016/j.pharmthera.2004.03.002. PMID: 15163593.
- ⁷² Dobkin de Rios, M. (1973). Curing with ayahuasca in an urban slum. *In: Harner, M. (Ed.), Hallucinogens and Shamanism (pp. 67 – 85). London: Oxford Univ. Press.*
- ⁷³ deRios, M. D. Drug Tourism in the Amazon. *Anthropology of Consciousness*, 5(1), 16–19 (1994). doi:10.1525/ac.1994.5.1.16
- ⁷⁴ Luna, L. E. The concept of plants as teachers among four mestizo shamans of Iquitos, northeastern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, Jul;11(2):135-56 (1984). DOI: 10.1016/0378-8741(84)90036-9. PMID: 6492831.
- ⁷⁵ Luna, L. E. The healing practices of a Peruvian shaman. *Journal of Ethnopharmacology*, Jul;11(2):123-33 (1984). DOI:10.1016/0378-8741(84)90035-7. PMID: 6387284.
- ⁷⁶ Luna, L.E. Vegetalismo: Shamanism Among the Mestizo Population. Dissertação de doutorado – Universidade de Estocolmo, Estocolmo (1986). Disponível em: <https://www.arte-amazonia.com/shamanism/vegetalismo> (ultimo acesso em: 28.10.22)
- ⁷⁷ Oliveira, I. Um desafio ao respeito e à tolerância: reflexões sobre o campo religioso daimista na atualidade. *Religião e Sociedade*, 31(2), 154–178 (2011). DOI:10.1590/S0100-85872011000200008.
- ⁷⁸ Domínguez-Clavé, E., Soler, J., Elices, M., Pascual, J. C., Álvarez, E., de la Fuente Revenga, M., Riba, J. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. *Brain Research Bulletin*, 126, 89–101 (2016). DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.03.002
- ⁷⁹ Andrade, E. & Maia, L. O. AYAHUASCA: um panorama sobre usos, efeitos e potenciais terapêuticos. *In: Psicodélicos no Brasil: Ciência e Saúde. 1ª ed. Curitiba – Brasil: Editora CRV, 2020. 83-103.*
- ⁸⁰ Riba, J. Human Pharmacology of Ayahuasca: Subjective and Cardiovascular Effects, Monoamine Metabolite Excretion, and Pharmacokinetics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(1), 73–83 (2003). DOI: 10.1124/jpet.103.049882
- ⁸¹ Horák, M., Hasíková, L., Verter, N. Therapeutic Potential Ascribed to Ayahuasca by Users in the Czech Republic. *Journal of Psychoactive Drugs*, Nov-Dec;50(5):430-436 (2018). DOI:10.1080/02791072.2018.1511878.
- ⁸² Yritia, M., Riba, J., Ortuño, J., Ramirez, A., Castillo, A., Alfaro, Y., de la Torre, R., Barbanoj, M. J. Determination of N,N-dimethyltryptamine and beta-carboline

alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, 5;779(2), 271-81 (2002). DOI:10.1016/s1570-0232(02)00397-5.

⁸³ Riba, J., Valle, M., Urbano, G., Yritia, M., Morte, A., Barbanoj, M. J. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Jul;306(1):73-83 (2003). DOI:10.1124/jpet.103.049882.

⁸⁴ Grob, C. S., McKenna, D. J., Callaway, J. C., Brito, G. S., Neves, E. S., Oberlaender, G., Saide, O. L., Labigalini, E., Tacla, C., Miranda, C. T., Strassman, R.J., Boone, K. B. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, Feb;184(2):86-94 (1996). DOI: 10.1097/00005053-199602000-00004.

⁸⁵ Barbosa, P. C., Cazorla, I. M., Giglio, J. S., Strassman, R. A six-month prospective evaluation of personality traits, psychiatric symptoms and quality of life in ayahuasca-naïve subjects. *Journal of Psychoactive Drugs*, 2009 Sep;41(3):205-12. doi: 10.1080/02791072.2009.10400530. PMID: 19999673.

⁸⁶ Bouso, J.C., Riba, J. (2014). Ayahuasca and the Treatment of Drug Addiction. In: Labate, B.C., Cavnar, C. (eds) *The Therapeutic Use of Ayahuasca*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40426-9_6

⁸⁷ Nunes, A. A., dos Santos, R. G., Osório, F. L., Sanches, R. F., Crippa, J. A. S., & Hallak, J. 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*, 48(3), 195–205 (2016). DOI:10.1080/02791072.2016.1188225

⁸⁸ Bouso, J. C. & Riba, J. 2011. An overview of the literature on the pharmacology and neuropsychiatric long term effects of ayahuasca. In: dos Santos, R. G. (Ed.) *The Ethnopharmacology of Ayahuasca*. Trivandrum: Transworld Research Network.

⁸⁹ dos Santos, R.G. The pharmacology of ayahuasca: A review. *Brasília Médica*, 47(2), 188–95 (2010).

⁹⁰ Gable, R. S. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction (Abingdon, England)*, Jan;102(1):24-34 (2007). DOI: 10.1111/j.1360-0443.2006.01652.x. PMID: 17207120.

⁹¹ Labate, B. C. (2008). *Brazilian Literature on Ayahuasca Religions*: translated by Robin Wright, revised by Kenneth W. Tupper. *Fieldwork in Religion*, 2(3), 200-234. DOI:10.1558/firn.v2i3.200

⁹² Callaway, J. C., Airaksinen, M. M., McKenna, D. J., Brito, G. S., Grob, C. S. Platelet serotonin uptake sites increased in drinkers of ayahuasca. *Psychopharmacology*, 116(3),385-7 (1994). DOI:10.1007/BF02245347.

⁹³ dos Santos, R. G., Osório, F. L., Crippa, J. A. S., Hallak, J. E. C. Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 38(1), 65–72 (2016). DOI: 10.1590/1516-4446-2015-1701

- ⁹⁴ Osório, F. de L., Sanches, R. F., Macedo, L. R., Santos, R. G., Maia-de-Oliveira, J. P., Wichert-Ana, L., Araujo, D. B., Riba, J., Crippa, J. A., Hallak, J. E. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 37(1), 13-20 (2015). DOI: 10.1590/1516-4446-2014-1496
- ⁹⁵ Sanches, R. F., de Lima Osório, F., dos Santos, R. G., Macedo, L. R. H., Maia-de-Oliveira, J. P., Wichert-Ana, L., de Araujo, D. B., Riba, J., Crippa, J. A., Hallak, J. E. Antidepressant Effects of a Single Dose of Ayahuasca in Patients With Recurrent Depression: A SPECT Study. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 36(1), 77–81 (2016). DOI: 10.1097/JCP.0000000000000436
- ⁹⁶ Palhano-Fontes, F., Barreto, D., Onias, H., Andrade, K. C., Novaes, M. M., Pessoa, J. A., Mota-Rolim, S. A., Osório, F. L., Sanches, R., Dos Santos, R. G., Tófoli, L. F., de Oliveira Silveira, G., Yonamine, M., Riba, J., Santos, F. R., Silva-Junior, A. A., Alchieri, J. C., Galvão-Coelho, N. L., Lobão-Soares, B., Hallak J. E. C., Arcoverde, E., Maia-de-Oliveira, J. P., Araújo, D. B. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. *Psychological Medicine*, 49(4), 655-663 (2018). DOI: 10.1017/S0033291718001356
- ⁹⁷ Galvão, A. C. D. M., De Almeida, R. N., Silva, E. A. D. S., Freire, F. A. M., Palhano-Fontes, F., Onias, H., Arcoverde, E., Maia-de-Oliveira, J. P., De Araújo, D. B., Lobão-Soares, B., Galvão-Coelho, N. L. Cortisol Modulation by Ayahuasca in Patients With Treatment Resistant Depression and Healthy Controls. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 185 (2018). DOI:10.3389/fpsy.2018.00185.
- ⁹⁸ Almeida, R. N. D., Galvão, A. C. D. M., Da Silva, F. S., Silva, E. A. D. S., Palhano-Fontes, F., Maia-de-Oliveira, J. P.; De Araújo, L.-S. B., Lobão-Soares, B., Galvão-Coelho, N. L. Modulation of Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor by a Single Dose of Ayahuasca: Observation From a Randomized Controlled Trial. *Frontiers in Psychology*, 10, 1234 (2019). DOI:10.3389/fpsyg.2019.01234.
- ⁹⁹ Galvão-Coelho, N. L., De Menezes Galvão, A. C., De Almeida, R. N.; Palhano-Fontes, F., Campos Braga, I., Lobão Soares, B., Maia-de-Oliveira, J. P., Perkins, D., Sarris, J., De Araujo, D. B. Changes in Inflammatory Biomarkers Are Related to the Antidepressant Effects of Ayahuasca. *Journal of Psychopharmacology*, 34 (10), 1125–1133 (2020). DOI:10.1177/0269881120936486.
- ¹⁰⁰ Elhwuegi, A. S. Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(3), 435–451 (2004). DOI: 10.1016/j.pnpbp.2003.11.018
- ¹⁰¹ Hindmarch, I., Hashimoto, K. Cognition and depression: the effects of fluvoxamine, a sigma-1 receptor agonist, reconsidered. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 25(3), 193–200 (2010). DOI: 10.1002/hup.1106
- ¹⁰² dos Santos, R. G., Hallak, J. E., Baker, G., Dursun, S. Hallucinogenic/psychedelic 5HT_{2A} receptor agonists as rapid antidepressant therapeutics: Evidence and mechanisms of action. *Journal of Psychopharmacology*, 35(4), 453-458 (2021). DOI: 10.1177/0269881120986422

- ¹⁰³ Witkin, J. M., Martin, A. E., Golani, L. K., Xu, N. Z., Smith, J. L.. Rapid-acting antidepressants. *Advances in Pharmacology*, 2019;86:47-96 (2019). DOI:10.1016/bs.apha.2019.03.002
- ¹⁰⁴ Lam, R. W. Onset, time course and trajectories of improvement with antidepressants. *European Neuropsychopharmacology*, 22, S492–S498 (2012). DOI:10.1016/j.euroneuro.2012.07.0
- ¹⁰⁵ Al-Harbi, K. S. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*, 2012;6:369-88. DOI: 10.2147/PPA.S29716.
- ¹⁰⁶ Hood, L., Friend, S. H. Predictive, personalized, preventive, participatory (p4) cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(3), 184–187 (2011). DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.227
- ¹⁰⁷ Coman, C., Solari, F. A., Hentschel, A., Sickmann, A., Zahedi, R. P., Ahrends, R. Simultaneous Metabolite, Protein, Lipid Extraction (SIMPLEX): A Combinatorial Multimolecular Omics Approach for Systems Biology. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(4), 1453–1466 (2016). DOI: 10.1074/mcp.M115.053702
- ¹⁰⁸ Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGehynst, J., Fiehn, O., Arita, M. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12, 523–526 (2015). DOI: 10.1038/nmeth.3393
- ¹⁰⁹ Adusumilli, R., Mallick, P. Data Conversion with ProteoWizard msConvert. *Methods in Molecular Biology*, 1550, 339–368 (2017). DOI: 10.1007/978-1-4939-6747-6_23
- ¹¹⁰ Liebisch, G., Fahy, E., Aoki, J., Dennis, E. A., Durand, T., Ejsing, C. S., Fedorova, M., Feussner, I., Griffiths, W. J., Köfeler, H., Alfred H. Jr., M., Murphy, R. C., O'Donnel, V. B., Oskolkova, O., Subramaniam, S., Wakelam, M. J.O. Spener, F. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J. Lipid Res.*, 61(12), 1539–1555 (2020). DOI:10.1194/jlr.s120001025
- ¹¹¹ Acevedo, A., Durán, C., Ciucci, S., Gerl, M., Cannistraci, C. V. LIPEA: Lipid Pathway Enrichment Analysis. *bioRxiv*, (2018). DOI:10.1101/274969.
- ¹¹² Gong, X., Huang, C., Yang, X., Chen, J., Pu, J., He, Y., Xie, P. Altered Fecal Metabolites and Colonic Glycerophospholipids Were Associated With Abnormal Composition of Gut Microbiota in a Depression Model of Mice. *Front. Neurosci.*, 2021, 15, 701355. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.701355>.
- ¹¹³ Mukai, T., Kishi, T., Matsuda, Y., Iwata, N., A meta-analysis of inositol for depression and anxiety disorders. *Hum. Psychopharmacol Clin Exp*, 29, 55-63 (2014). <https://doi.org/10.1002/hup.2369>
- ¹¹⁴ Gassen, N. C., Rein, T. Is There a Role of Autophagy in Depression and Antidepressant Action? *Front. Psychiatry*, 10 (2019). doi:10.3389/fpsyt.2019.00337
- ¹¹⁵ Ferreira, M. M. C. Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2015.
- ¹¹⁶ Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., Savarin, P. PLS/OPLS models in metabolomics: the

impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular Biosystems*, 11(1),13-9 (2015). DOI: 10.1039/c4mb00414k

¹¹⁷ Walach, J., Filzmoser, P., Hron, K. Data Normalization and Scaling: Consequences for the Analysis in Omics Sciences. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 82, 165-196 (2018). DOI: 10.1016/bs.coac.2018.06.004

¹¹⁸ Choulakian, V., Stephens, M. A. Goodness-of-Fit Tests for the Generalized Pareto Distribution. *Technometrics*, 43(4), 478–484 (2001). DOI: 10.1198/00401700152672573

¹¹⁹ Liu, X., Li, J., Zheng, P., Zhao, X., Zhou, C., Hu, C., Hou, X., Wang, H., Xie, P., Xu, G. Plasma Lipidomics Reveals Potential Lipid Markers of Major Depressive Disorder. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408 (23), 6497–6507 (2016). DOI:10.1007/s00216-016-9768-5

¹²⁰ Reemst, K., Broos, J. Y., Abbink, M. R., Cimetti, C., Giera, M., Kooij, G., Korosi, A. Early-Life Stress and Dietary Fatty Acids Impact the Brain Lipid/Oxylipin Profile into Adulthood, Basally and in Response to LPS. *Frontiers in Immunology*, 13, 967437 (2022). DOI: 10.3389/fimmu.2022.967437

¹²¹ Tkachev, A., Stekolshchikova, E., Bobrovskiy, D. M., Anikanov, N., Ogurtsova, P., Park, D. I., Horn, A. K. E., Petrova, D., Khrameeva, E., Golub, M. S., Turck, C. W., Khaitovich, P. Long-Term Fluoxetine Administration Causes Substantial Lipidome Alteration of the Juvenile Macaque Brain. *International Journal of Molecular Science*, 22 (15), 8089 (2021). DOI: 10.3390/ijms22158089

¹²² Dakterzada, F., Jové, M., Huerto, R., Carnes, A., Sol, J., Pamplona, R., Piñol-Ripoll, G. Changes in Plasma Neutral and Ether-Linked Lipids Are Associated with The Pathology and Progression of Alzheimer's Disease. *Aging and Disease*, 1;14(5):1728-1738 (2023). DOI: 10.14336/AD.2023.0221

¹²³ Radka, C. D., Miller, D. J., Frank, M. W., Rock, C. O. Biochemical characterization of the first step in sulfonolipid biosynthesis in *Alistipes finegoldii*. *Journal of Biological Chemistry*, Aug;298(8):102195 (2022). DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102195.

¹²⁴ Johnson, E. L., Heaver, S. L., Walters, W. A., Ley, R. E. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine*, Jan;95(1):1-8 (2017). DOI: 10.1007/s00109-016-1492-2.

¹²⁵ Hou, L., Tian, H. Y., Wang, L., Ferris, Z. E., Wang, J., Cai, M., Older, E. A., Raja, M. R. K., Xue, D., Sun, W., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., Chen, H., Fan, D., Tang, X., Li, J. Identification and Biosynthesis of Pro-Inflammatory Sulfonolipids from an Opportunistic Pathogen *Chryseobacterium gleum*. *ACS Chemical Biology*, May 20;17(5):1197-1206 (2022). DOI: 10.1021/acscchembio.2c00141.

¹²⁶ Shanbhag, K., Mhetre, A., Khandelwal, N., Kamat, S. S. The Lysophosphatidylserines—An Emerging Class of Signalling Lysophospholipids. *The Journal of Membrane Biology*, 253 (5), 381–397 (2020). DOI:10.1007/s00232-020-00133-2.

- ¹²⁷ Chakravarty, N., Goth, A., Sen, P. Potentiation of dextran-induced histamine release from rat mast cells by phosphatidyl serine. *Acta Physiologica Scandinavica*, 88:469–480 (1973). DOI:10.1111/j.1748-1716.1973.tb05476.x
- ¹²⁸ Bruni, A., Bigon, E., Battistella, A., Boarato, E., Mietto, L., Toffano, G. Lysophosphatidylserine as histamine releaser in mice and rats. *Agents Actions*, 14:619–625 (1984). DOI:10.1007/BF019 78896
- ¹²⁹ Mietto, L., Battistella, A., Toffano, G., Bruni, A. Modulation of lysophosphatidylserine-dependent histamine release. *Agents Actions*, 14:376–378 (1984). DOI:10.1007/BF01973832
- ¹³⁰ Barnes, M. J., Cyster, J. G. Lysophosphatidylserine suppression of T-cell activation via GPR174 requires Gas proteins. *Immunology & Cell Biology*, 96:439–445 (2018). DOI:10.1111/imcb.12025
- ¹³¹ Barnes, M. J., Li, C. M., Xu, Y., An, J., Huang, Y., Cyster, J. G. The lysophosphatidylserine receptor GPR174 constrains regulatory T cell development and function. *Journal of Experimental Medicine*, Jun 29;212(7):1011-20 (2015). DOI:10.1084/jem.20141827.
- ¹³² Yea, K., Kim, J., Lim, S., Kwon, T., Park, H. S., Park, K. S., Suh, P.-G., Ryu, S. H. Lysophosphatidylserine regulates blood glucose by enhancing glucose transport in myotubes and adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(4), 783–788 (2009). DOI:10.1016/j.bbrc.2008.11.122
- ¹³³ Cho, E. Y., Yun, C.-H., Chae, H.-Z., Chae, H.-J., Ahn, T. Lysophosphatidylserine-induced functional switch of human cytochrome P450 1A2 and 2E1 from monooxygenase to phospholipase D. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(3), 584–589 (2008). DOI:10.1016/j.bbrc.2008.09.023
- ¹³⁴ Rivera, R., Chun, J. Biological effects of lysophospholipids. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2008;160:25-46. doi: 10.1007/112_0507. PMID: 18481029 (2008).
- ¹³⁵ Minamihata, T., Takano, K., Nakamura, Y., Seto, R., Moriyama, M. Increase in Cellular Lysophosphatidylserine Content Exacerbates Inflammatory Responses in LPS-Activated Microglia. *Neurochemical Research*, 47 (9), 2602–2616 (2022). DOI:10.1007/s11064-021-03425-8.
- ¹³⁶ Kurano, M., Dohi, T., Nojiri, T., Kobayashi, T., Hirowatari, Y., Inoue, A., Kano, K., Matsumoto, H., Igarashi, K., Nishikawa, M., Miyauchi, K., Daida, H., Ikeda, H., Aoki, J., Yatomi, Y. Blood levels of serotonin are specifically correlated with plasma lysophosphatidylserine among the glycerol-lysophospholipids. *BBA Clinical*, 20;4:92-8 (2015). DOI:10.1016/j.bbacli.2015.08.003
- ¹³⁷ Komori, T. The Effects of Phosphatidylserine and Omega-3 Fatty Acid-Containing Supplement on Late Life Depression. *Mental Illness*, Apr 1;7(1):5647 (2015). DOI:10.4081/mi.2015.5647..
- ¹³⁸ Song, J., Ma, W., Gu, X., Zhao, L., Jiang, J., Xu, Y., Zhang, L., Zhou, M., Yang, L. Metabolomic Signatures and Microbial Community Profiling of Depressive Rat Model Induced by Adrenocorticotrophic Hormone. *Journal of Translational Medicine*, 17 (1), 224 (2019). DOI:10.1186/s12967-019-1970-8.

- ¹³⁹ Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., Wu, G. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids*, Sep;45(3):463-77 (2013). DOI:10.1007/s00726-013-1493-1.
- ¹⁴⁰ Maes, M., Verkerk, R., Vandoolaeghe, E., Lin, A., Scharpé, S. Serum Levels of Excitatory Amino Acids, Serine, Glycine, Histidine, Threonine, Taurine, Alanine and Arginine in Treatment-Resistant Depression: Modulation by Treatment with Antidepressants and Prediction of Clinical Responsivity. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 97(4), 302–308 (1998). DOI:10.1111/j.1600-0447.1998.tb10004.x.
- ¹⁴¹ Maes, M., Verkerk, R., Vandoolaeghe, E., Lin, A., Scharpe, S. Serumlevelsof excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 97,302–308 (1998). DOI: 10.1111/j.1600-0447.1998.tb10004.x
- ¹⁴² Deng, F.-L., Pan, J.-X., Zheng, P., Xia, J.-J., Yin, B.-M., Liang, W.-W., Li, Y.-F., Wu, J., Xu, F., Wu, Q.-Y., Qu, C.-H., Li, W., Wang, H.-Y., Xie, P. Metabonomics Reveals Peripheral and Central Short-Chain Fatty Acid and Amino Acid Dysfunction in a Naturally Occurring Depressive Model of Macaques. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 15, 1077–1088 (2019). DOI: 10.2147/NDT.S186071.
- ¹⁴³ Jianguo, L., Xueyang, J., Cui, W., Changxin, W., Xuemei, Q. Altered Gut Metabolome Contributes to Depression-like Behaviors in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress. *Translational Psychiatry* 2019, 9 (1), 40. DOI:10.1038/s41398-019-0391-z.
- ¹⁴⁴ Huang, N., Wang, Y., Zhan, G., Yu, F., Li, S., Hua, D., Jiang, R., Li, S., Wu, Y., Yang, L., Zhu, B., Hua, F., Luo, A., Yang, C. Contribution of Skeletal Muscular Glycine to Rapid Antidepressant Effects of Ketamine in an Inflammation-Induced Mouse Model of Depression. *Psychopharmacology*, 236(12), 3513–3523 (2019). DOI:10.1007/s00213-019-05319-8.
- ¹⁴⁵ MacKay, M.-A. B., Kravtsenyuk, M., Thomas, R., Mitchell, N. D., Dursun, S. M., Baker, G. B. D-Serine: Potential Therapeutic Agent and/or Biomarker in Schizophrenia and Depression? *Frontiers in Psychiatry*, 6;10:25 (2019). DOI:10.3389/fpsy.2019.00025.
- ¹⁴⁶ Hashimoto, K., Yoshida, T., Ishikawa, M., Fujita, Y., Niitsu, T., Nakazato, M., Watanabe, H., Sasaki, T., Shiina, A., Hashimoto, T., Kanahara, N., Hasegawa, T., Enohara, M., Kimura, A., Iyo, M. Increased Serum Levels of Serine Enantiomers in Patients with Depression. *Acta Neuropsychiatrica*, 28(3), 173–178 (2016). DOI:10.1017/neu.2015.59.
- ¹⁴⁷ Chen, X., Liu, Y., Pu, J., Gui, S., Wang, D., Zhong, X., Chen, W., Tao, W., Chen, Y., Chen, X., Xie, P. Proteomics reveals mitochondrial dysfunction and energy metabolism disturbance of intestine in a nonhuman primate model of depression. *Journal of Affective Disorders*, 333, 562-570 (2023). DOI: 10.1016/j.jad.2023.04.031
- ¹⁴⁸ Su, D., Song, Y., Lai, M., Zhou, L., Liu, Y., Liao, L., Zhang, Z., Zhu, G., Yang, M., Luo, X., Ai, Z. Atorvastatin prevents depressive behavior improving the sphingolipid metabolism and triggering neurovascular coupling via Apolipoprotein E. *Authorea*, DOI: 10.22541/au.165157026.67760952/v1 (2022).

- ¹⁴⁹ Wen, L., Yan, C., Zheng, W., Li, Y., Wang, Y., Qu, M. Metabolic Alterations and Related Biological Functions of Post-Stroke Depression in Ischemic Stroke Patients. *Neuropsychiatry Disease and Treatment*, 6;19:1555-1564 (2023). DOI:10.2147/NDT.S415141.
- ¹⁵⁰ Romme, I. A., de Reus, M. A., Ophoff, R. A., Kahn, R. S., van den Heuvel, M. P. Connectome Disconnectivity and Cortical Gene Expression in Patients With Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 15;81(6):495-502 (2017). DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.07.012.
- ¹⁵¹ Lee, J. C., Park, S. M., Kim, I. Y., Sung, H., Seong, J. K., Moon, M. H. High-fat diet-induced lipidome perturbations in the cortex, hippocampus, hypothalamus, and olfactory bulb of mice. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, Sep;1863(9):980-990 (2018). DOI: 10.1016/j.bbailip.2018.05.007.
- ¹⁵² Jiang, W., Chen J, Gong L, Liu F, Zhao H, Mu J. Alteration of Glycerophospholipid Metabolism in Hippocampus of Post-stroke Depression Rats. *Neurochemical Research*, 47(7), 2052-2063 (2022). DOI: 10.1007/s11064-022-03596-y
- ¹⁵³ Wu, X., Xu, H., Zeng, N., Li, H., Yao, G., Liu, K., Yan, C., Wu, L. Luteolin alleviates depression-like behavior by modulating glycerophospholipid metabolism in the hippocampus and prefrontal cortex of LOD rats. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, Sep 16 (2023). DOI:10.1111/cns.14455.
- ¹⁵⁴ Xie, J., Zhong, Q., Wu, W. T., Chen, J. J. Multi-omics data reveals the important role of glycerophospholipid metabolism in the crosstalk between gut and brain in depression. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 93 (2023). DOI: 10.1186/s12967-023-03942-w
- ¹⁵⁵ Zheng, P., Wu, J., Zhang, H., Perry, S. W., Yin, B., Tan, X., Chai, T., Liang, W., Huang, Y., Li, Y., Duan, J., Wong, M.-L., Licinio, J., Xie, P. The Gut Microbiome Modulates Gut–Brain Axis Glycerophospholipid Metabolism in a Region-Specific Manner in a Nonhuman Primate Model of Depression. *Molecular Psychiatry*, 26(6), 2380–2392 (2021). DOI:10.1038/s41380-020-0744-2.
- ¹⁵⁶ Tian, T., Mao, Q., Xie, J., Wang, Y., Shao, W. H., Zhong, Q., Chen, J. J. Multi-omics data reveals the disturbance of glycerophospholipid metabolism caused by disordered gut microbiota in depressed mice. *Journal of Advanced Research*, Jul;39:135-145 (2022). DOI:10.1016/j.jare.2021.10.002.
- ¹⁵⁷ Ye, J., Yang, H., Hu, W., Tang, K., Liu, A., Bi, S. Changed Cecal Microbiota Involved in Growth Depression of Broiler Chickens Induced by Immune Stress. *Poultry Science*, 102(5), 102598 (2023). DOI:10.1016/j.psj.2023.102598.
- ¹⁵⁸ Dinoff, A., Saleem, M., Herrmann, N., Mielke, M. M., Oh, P. I., Venkata, S. L. V., Haughey, N. J., Lanctôt, K. L. Plasma sphingolipids and depressive symptoms in coronary artery disease. *Brain and Behavior*, 7(11), e00836 (2017). DOI: 10.1002/brb3.836
- ¹⁵⁹ Kornhuber, J., Müller, C. P., Becker, K. A., Reichel, M., Gulbins, E. The ceramide system as a novel antidepressant target. *Trends in Pharmacological Sciences*, Jun;35(6):293-304 (2014). DOI:10.1016/j.tips.2014.04.003.

- ¹⁶⁰ Osherovich, L. Depressing sphingolipids. *Science-Business eXchange* 6, 675 (2013). DOI: 10.1038/scibx.2013.675
- ¹⁶¹ Dinoff, A., Herrmann, N., Lanctôt, K. L. Ceramides and depression: A systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 213, 35-43 (2017). DOI: 10.1016/j.jad.2017.02.008
- ¹⁶² Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Lüth, A., Böhmer, C., Amato, D., Müller, C. P., Tischbirek, C. H., Groemer, T. W., Tabatabai, G., Becker, K. A., Tripal, P., Staedtler, S., Ackermann, T. F., van Brederode, J., Alzheimer, C., Weller, M., Lang, U. E., Kleuser, B., Grassmé, H., Kornhuber, J. Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nature Medicine*, 19(7), 934-8 (2013). DOI:10.1038/nm.3214. Epub 2013 Jun 16. PMID: 23770692.
- ¹⁶³ Jaddoa, E., Masania, J., Masiero, E., Sgamma, T., Arroo, R., Sillence, D., Zetterström, T. Effect of Antidepressant Drugs on the Brain Sphingolipid System. *Journal of Psychopharmacology*, 34(7), 716–725 (2020). DOI:10.1177/0269881120915412.
- ¹⁶⁴ Beckmann, N., Sharma, D., Gulbins, E., Becker, K. A., Edelman, B. Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogs. *Frontiers in Physiology*, Sep 2;5:331 (2014). DOI:10.3389/fphys.2014.00331. PMID: 25228885; PMCID: PMC4151525
- ¹⁶⁵ Elojeimy, S., Holman, D. H., Liu, X., El-Zawahry, A., Villani, M., Cheng, J. C., Mahdy, A., Zeidan, Y., Bielwaska, A., Hannun, Y. A., Norris, J. S. New insights on the use of desipramine as an inhibitor for acid ceramidase. *FEBS Letters*, Aug 21;580(19):4751-6 (2006). DOI:10.1016/j.febslet.2006.07.071.
- ¹⁶⁶ Zoicas, I., Mühle, C., Schumacher, F., Kleuser, B., Kornhuber, J. Development of Comorbid Depression after Social Fear Conditioning in Mice and Its Effects on Brain Sphingolipid Metabolism. *Cells*, 12(10), 1355 (2023). DOI:10.3390/cells12101355.
- ¹⁶⁷ Merrill, A. H., Caligan, T. B., Wang, E., Peters, K., Ou, J. Analysis of sphingoid bases and sphingoid base 1-phosphates by high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, 2000;312:3-9 (2000). DOI:10.1016/s0076-6879(00)12894-0.
- ¹⁶⁸ Montenegro-Burke, J. R., Kok, B. P., Guijas, C., Domingo-Almenara, X., Moon, C., Galmozzi, A., Kitamura, S., Eckmann, L., Saez, E., Siuzdak, G. E., Wolan, D. W. Metabolomics Activity Screening of T Cell–Induced Colitis Reveals Anti-Inflammatory Metabolites. *Science Signaling*, 28;14(702):eabf6584 (2021). DOI: 10.1126/scisignal.abf6584.
- ¹⁶⁹ Skaper, S. D. The Neurotrophin Family of Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, 846, 1–12 (2012). DOI: 10.1007/978-1-61779-536-7_1
- ¹⁷⁰ Shi, Y., Luan, D., Song, R., Zhang, Z. Value of peripheral neurotrophin levels for the diagnosis of depression and response to treatment: A systematic review and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology*, 41, 40-51 (2020). DOI:10.1016/j.euroneuro.2020.09.633
- ¹⁷¹ de Vos, C. M. H., Mason, N.L., Kuypers, K. P. C. Psychedelics and Neuroplasticity: A Systematic Review Unraveling the Biological Underpinnings of

Psychedelics. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 724606 (2021). DOI: 10.3389/fpsy.2021.724606

¹⁷² Cinti, S. The endocrine adipose organ. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23(1):1-4(2022). DOI:10.1007/s11154-022-09709-w.

¹⁷³ Tilg, H., Moschen, A. R. Adipocytokines: Mediators Linking Adipose Tissue, Inflammation and Immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 772–783 (2006). DOI:10.1038/nri1937.

¹⁷⁴ Catena-Dell'Osso, M., Rotella, F., Dell'Osso, A., Fagiolini, A., Marazziti, D. Inflammation, serotonin and major depression. *Current Drugs Targets*, 14(5), 571-7 (2013). DOI:10.2174/13894501113149990154. PMID: 23531160.

¹⁷⁵ Huber, K., Szerenos, E., Lewandowski, D., Toczyłowski, K., Sulik, A. The Role of Adipokines in the Pathologies of the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19):14684 (2023). DOI:10.3390/ijms241914684

¹⁷⁶ Ji, L., Zhang, L., Liang, Z., Zhong, S., Liu, X., Liu, Z., Poon, W. S., Song, Y., Chen, B., Wang, R. Role of Omentin-1 in Susceptibility to Anxiety and Depression like Behaviors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 574:111990 (2023). DOI:10.1016/j.mce.2023.111990.

¹⁷⁷ Hu, Y., Dong, X., Chen, J. Adiponectin and depression: A meta-analysis. *Biomedical Reports*, Jan;3(1):38-42 (2015). DOI: 10.3892/br.2014.372.

¹⁷⁸ Benedetti, F., Branchi, I., Poletti, S., Lorenzi, C., Bigai, G., Colombo, C., Zanardi, R. Adiponectin predicts poor response to antidepressant drugs in major depressive disorder. *Human Psychopharmacology*, 36(6), e2793 (2021). DOI:10.1002/hup.2793.

¹⁷⁹ Elmquist, J. K., Bjørbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., Saper, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 395(4), 535-47 (1998). DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19980615)395:4<535::aid-cne9>3.0.co;2-2

¹⁸⁰ Lu, X.-Y. The Leptin Hypothesis of Depression: A Potential Link between Mood Disorders and Obesity? *Current Opinion in Pharmacology*, 7(6), 648–652 (2007). DOI:10.1016/j.coph.2007.10.010.

¹⁸¹ Wilhelm, C. J., Choi, D., Huckans, M., Manthe, L., Loftis, J. M. Adipocytokine Signaling Is Altered in Flinders Sensitive Line Rats, and Adiponectin Correlates in Humans with Some Symptoms of Depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 643–651 (2013). DOI:10.1016/j.pbb.2012.11.001.

¹⁸² Dmierzak-Węglarz, M., Tyszkiewicz-Nwafor, M., Rybakowski, F., Permoda-Pachuta, A. Changes in Adipokine Concentrations in Antidepressant-Resistant Bipolar Depression after Ketamine Infusion and Electroconvulsive Therapy. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 24(4), 267–279 (2023). DOI:10.1080/15622975.2022.2097739.

¹⁸³ Permoda-Pachuta, A., Malewska-Kasprzak, M., Skibińska, M., Rzepski, K., Dmierzak-Węglarz, M. Changes in Adipokine, Resitin, and BDNF Concentrations in Treatment-Resistant Depression after Electroconvulsive Therapy. *Brain Sciences*, 13(10), 1358 (2023). DOI:10.3390/brainsci13101358.

- ¹⁸⁴ Cao, H., Zuo, C., Huang, Y., Zhu, L., Zhao, J., Yang, Y., Jiang, Y., Wang, F. Hippocampal Proteomic Analysis Reveals Activation of Necroptosis and Ferroptosis in a Mouse Model of Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression. *Behavioural Brain Research*, 11;407:113261 (2021). DOI:10.1016/j.bbr.2021.113261.
- ¹⁸⁵ Houry, M. K., Gupta, K., Franco, S. R., Liu, B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *American Journal of Pathology*, 190(2), 272-285 (2020). DOI:10.1016/j.ajpath.2019.10.012.
- ¹⁸⁶ Newton, K., Manning, G. Necroptosis and Inflammation. *Annual Review of Biochemistry*, 2(85), 743-63 (2016). DOI:10.1146/annurev-biochem-060815-014830.
- ¹⁸⁷ Yu, Z., Jiang, N., Su, W., Zhuo, Y. Necroptosis: A Novel Pathway in Neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 12;12:701564 (2021). DOI: 10.3389/fphar.2021.701564.
- ¹⁸⁸ Zeb, S., Ye, H., Liu, Y., Du, H. P., Guo, Y., Zhu, Y. M., Ni, Y., Zhang, H.L., Xu, Y. Necroptotic kinases are involved in the reduction of depression-induced astrocytes and fluoxetine's inhibitory effects on necroptotic kinases. *Frontiers in Pharmacology*, 4;13:1060954 (2023). DOI:10.3389/fphar.2022.1060954.
- ¹⁸⁹ Lee, T.C. Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(20), 10952-55 (1985). DOI: 10.1016/S0021-9258(17)39128-7
- ¹⁹⁰ Domenech, C., Machado-De Domenech, E., Söling, H. D. Regulation of acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine O²-acetyltransferase (lyso-PAF-acetyltransferase) in exocrine glands. Evidence for an activation via phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5671-6 (1987). DOI: 10.1016/S0021-9258(18)45627-X
- ¹⁹¹ Tran, K., D'Angelo, A. F., Choy, P. C., Chan, A. C. Vitamin E enhances the acylation of 1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine in human endothelial cells. *The Biochemical Journal*, 298, 115-9 (1994). DOI: 10.1042/bj2980115
- ¹⁹² Tremblay, M. È., Almsherqi, Z. A., Deng, Y. Plasmalogens and platelet-activating factor roles in chronic inflammatory diseases. *Biofactors*, 48(6),1203-1216 (2022). DOI: 10.1002/biof.1916
- ¹⁹³ Lenti, M., Gentili, C., Pianezzi, A., Marcolongo, G., Lalli, A., Cancedda, R., Cancedada, F. C. Monogalactosyldiacylglycerol anti-inflammatory activity on adult articular cartilage. *Natural Product Research*, 23:754–62 (2009). DOI: 10.1080/14786410802456956
- ¹⁹⁴ Ulivi, V., Lenti, M., Gentili, C., Marcolongo, G., Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F. Anti-inflammatory activity of monogalactosyldiacylglycerol in human articular cartilage in vitro: activation of an anti-inflammatory cyclooxygenase2 (COX-2) pathway. *Arthritis Research & Therapy*, 13:R92 (2011). DOI: 10.1186/ar3367
- ¹⁹⁵ Schmidt-Schultz, T., Althaus, H. H. Monogalactosyl Diglyceride, a Marker for Myelination, Activates Oligodendroglial Protein Kinase C. *Journal of*

Neurochemistry, 62 (4), 1578–1585 (2008). DOI: 10.1046/j.1471-4159.1994.62041578.x.

¹⁹⁶ Zhang, T., Guo, L., Li, R., Wang, F., Yang, W., Yang, J., Cui, Z., Zhou, C., Chen, Y., Yu, H., Peng, Z., Tan, Q. Alterations of Plasma Lipids in Adult Women With Major Depressive Disorder and Bipolar Depression. *Frontiers in Psychiatry*, 13, 927817 (2022). DOI: 10.3389/fpsy.2022.927817

¹⁹⁷ Zhou, C., Zhao, X., Ma, X., Ma, H., Li, R., Hu, G., Wang, H., Peng, Z., Cai, M. Effects of (S)-Ketamine on Depression-like Behaviors in a Chronic Variable Stress Model: A Role of Brain Lipidome. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17:1114914. DOI: 10.3389/fncel.2023.1114914 (2023).

¹⁹⁸ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Angoletin> (acessado em 08 de outubro de 2023)

¹⁹⁹ Tanrisever, Nesrin. Plant Germination and Growth Inhibitors From *Ceratiola Ericoides* and *Calamintha Ashei* (Herbicides, Allelopathy, Monoterpenes, Phenolics). LSU Historical Dissertations and Theses, 4211 (1986). Disponível em: https://repository.lsu.edu/gradschool_disstheses/4211 (último acesso em 28.10.23)

²⁰⁰ Ngoutane Mfopa, A., Corona, A., Elo, K., Tramontano, E., Frau, A., Boyom, F. F., Caboni, P., Tocco, G. *Uvaria Angolensis* as a Promising Source of Inhibitors of HIV-1 RT-Associated RNA-Dependent DNA Polymerase and RNase H Functions. *Natural Product Research*, 32 (6), 640–647 (2018). DOI: 10.1080/14786419.2017.1332615

²⁰¹ Chinsebu, K. C. Chemical Diversity and Activity Profiles of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors from Plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 29, 4: 504–28 (2019). DOI: 10.1016/j.bjp.2018.10.006

²⁰² Tibell, Leif. Caliciales. *Flora Neotropica*, 69, 1–78 (1996). JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/4393866>.

²⁰³ Ranković, Branislav, org. *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Cham: Springer International Publishing, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-16814-8

²⁰⁴ Fernandes, R. F., Ferreira, G. R., Spielmann, A. A., Edwards, H. G. M., de Oliveira, L. F. C. FT-Raman spectroscopy of the *Candelaria* and *Pyxine* lichen species: A new molecular structural study. *Journal of Molecular Structure*, 1102, 57–62 (2015). DOI: 10.1016/j.molstruc.2015.08.04

²⁰⁵ Takemine, S., Matsumura, C., Yamamoto, K., Suzuki, M., Tsurukawa, M., Imaishi, H., Nakano, T., Kondo, A. Discharge of perfluorinated compounds from rivers and their influence on the coastal seas of Hyogo prefecture, Japan. *Environmental Pollution*, Jan;184:397-404, (2014). DOI:10.1016/j.envpol.2013.09.016.

²⁰⁶ Klaunig J. E., Shinohara, M., Iwai, H., Chengelis, C. P., Kirkpatrick, J. B., Wang, Z., Bruner, R. H. Evaluation of the chronic toxicity and carcinogenicity of perfluorohexanoic acid (PFHxA) in Sprague-Dawley rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 43(2):209-220 (2015). DOI: 10.1177/0192623314530532.

²⁰⁷ Zhao, S., Fang, S., Zhu, L., Liu, L., Liu, Z., Zhang, Y. Mutual impacts of wheat (*Triticum aestivum* L.) and earthworms (*Eisenia fetida*) on the bioavailability of

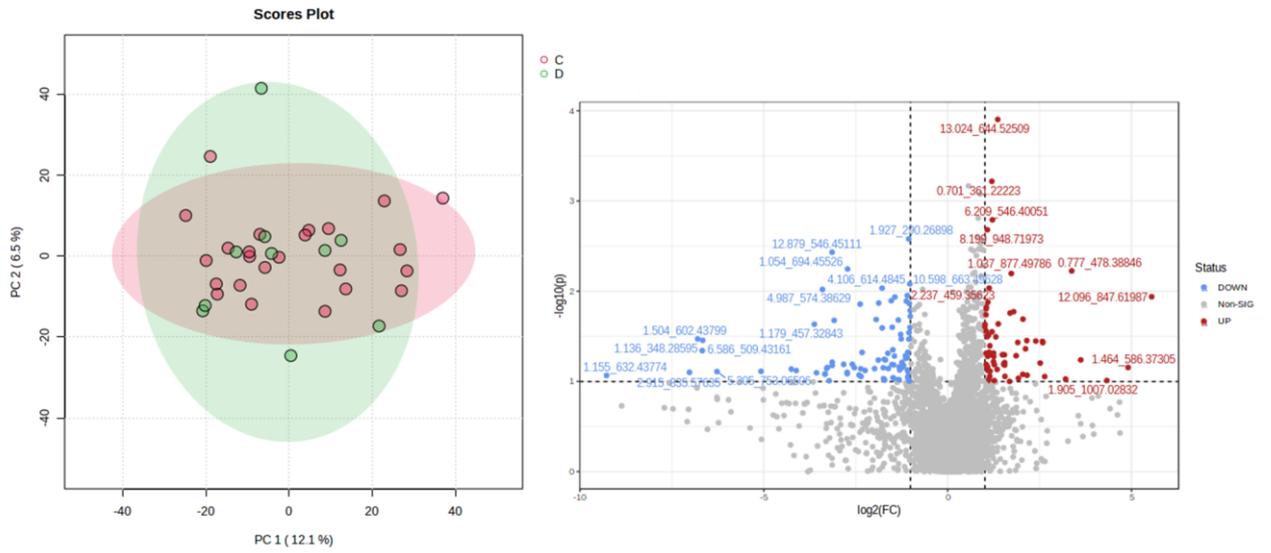
- perfluoroalkyl substances (PFASs) in soil. *Environmental Pollution*, 184, 495–501 (2014). DOI: 10.1016/j.envpol.2013.09.032
- ²⁰⁸ Vineis, P., Robinson, O., Chadeau-Hyam, M., Dehghan, A., Mudway, I., Dagnino, S. What is new in the exposome? *Environmental International*, Oct;143:105887 (2020). DOI:10.1016/j.envint.2020.105887.
- ²⁰⁹ Barupal, D. K., Fiehn, O. Generating the Blood Exposome Database Using a Comprehensive Text Mining and Database Fusion Approach. *Environmental Health Perspectives*, 127(9), 97008 (2019). DOI:10.1289/EHP4713. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31557052; PMCID: PMC6794490.
- ²¹⁰ Schneider, E. H., Neumann, D., Seifert, R. Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H(1)R-and H(2)R-deficient mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 42:252–66 (2014). DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.009
- ²¹¹ Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L., Stark, H., Thurmond, R. L., Hass, H. International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 67:601–55 (2015). DOI: 10.1124/pr.114.010249
- ²¹² Tabarean, I.V. Functional pharmacology of H1 histamine receptors expressed in mouse preoptic/anterior hypothalamic neurons. *British Journal of Pharmacology*, 170:41525 (2013). DOI: 10.1111/bph.12286
- ²¹³ Benarroch, E. E. Histamine in the CNS: multiple functions and potential neurologic implications. *Neurology*, 75:1472–9 (2010). DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181f884b1
- ²¹⁴ Chikahisa, S., Kodama, T., Soya, A., Sagawa, Y., Ishimaru, Y., Sei, H., Nishino, S. Histamine from brain resident MAST cells promotes wakefulness and modulates behavioral states. *PLoS One*, 8:e78434 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0078434
- ²¹⁵ Ito, C. The role of brain histamine in acute and chronic stresses. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 54(5):263-7 (2000). DOI: 10.1016/S0753-3322(00)80069-4
- ²¹⁶ Huang, H., Li, Y., Liang, J., Finkelman, F.D. Molecular regulation of histamine synthesis. *Frontiers in Immunology*, 9, 1392 (2018). DOI: 10.3389/fimmu.2018.01392
- ²¹⁷ Fujita, A., Bonnavion, P., Wilson, M. H., Mickelsen, L. E., Bloit, J., de Lecea, L., Jackson, A. C. Hypothalamic tuberomammillary nucleus neurons: electrophysiological diversity and essential role in arousal stability. *Journal of Neuroscience*, 37:9574–92 (2017). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0580-17.2017
- ²¹⁸ Threlfell, S., Cragg, S. J., Kallo, I., Turi, G. F., Coen, C. W., Greenfield, S. A. Histamine H3 receptors inhibit serotonin release in substantia nigra pars reticulata. *Journal of Neuroscience*, 24:8704–10 (2004). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2690-04.2004
- ²¹⁹ Spaethling, J. M., Piel, D., Dueck, H., Buckley, P. T., Morris, J. F., Fisher, S. A., Lee, J., Sul, J.-Y., Kim, J., Bartfai, T., Beck, S. G., Eberwine, J. H. Serotonergic neuron regulation informed by in vivo single-cell transcriptomics. *The FASEB Journal*, 28:771–80 (2014). DOI: 10.1096/fj.13-240267

- ²²⁰ Kononoff, V. J., Nuutinen, S., Tuominen, M., Panula, P. Histamine h3 receptor regulates sensorimotor gating and dopaminergic signaling in the striatum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 357:264–72 (2016). DOI: 10.1124/jpet.115.230771
- ²²¹ Ferrada, C., Moreno, E., Casado, V., Bongers, G., Cortes, A., Mallol, J., Canela, E. I., Leurs, R., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 157:64–75 (2009). DOI: 10.1111/j.14765381.2009.00152.xw7
- ²²² Pochwat B, Nowak G, Szewczyk B. An update on NMDA antagonists in depression. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 19:1055–67 (2019). DOI: 10.1080/14737175.2019.1643237
- ²²³ Li CT, Yang KC, Lin WC. Glutamatergic dysfunction and glutamatergic compounds for major psychiatric disorders: evidence from clinical neuroimaging studies. *Frontiers in Psychiatry*, 9:767 (2018). DOI: 10.3389/fpsy.2018.00767
- ²²⁴ Hersey, M., Reneaux, M., Berger, S. N., Mena, S., Buchanan, A. M., Ou, Y., Tavakoli, N., Reagan, L. P., Clopath, C., Hashemi, P. A Tale of Two Transmitters: Serotonin and Histamine as in Vivo Biomarkers of Chronic Stress in Mice. *Journal of Neuroinflammation*, 19 (1), 167 (2022). DOI: 10.1186/s12974-022-02508-9
- ²²⁵ Hofstra, C. L., Desai, P. J., Thurmond, R. L., Fung-Leung, W.-P. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305, 1212–1221 (2003). DOI: 10.1124/jpet.102.046581
- ²²⁶ Yeni, Y., Cakir, Z., Hacimuftuoglu, A., Taghizadehghalehjoughi, A., Okkay, U., Genc, S., Yildirim, S., Saglam, Y. S., Calina, D., Tsatsakis, A., Docea, A. O. A Selective Histamine H4 Receptor Antagonist, JNJ7777120, Role on Glutamate Transporter Activity in Chronic Depression. *Journal of Personalized Medicine*, 12 (2), 246 (2022). <https://doi.org/10.3390/jpm12020246>
- ²²⁷ Lu, C. W., Lin, T. Y, Chang, C. Y., Huang, S. K, Wang, S. J. Ciproxifan, a histamine H3 receptor antagonist and inverse agonist, presynaptically inhibits glutamate release in rat hippocampus. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 5(319), 12-21 (2017). DOI:10.1016/j.taap.2017.01.017. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28132918.
- ²²⁸ Karpati, A., Yoshikawa, T., Nakamura, T., Iida, T., Matsuzawa, T., Kitano, H., Harada, R., Yanai, K. Histamine elicits glutamate release from cultured astrocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137, 122–128 (2018). DOI: 10.1016/j.jphs.2018.05.002
- ²²⁹ Onalapo, A. Y., Onalapo, O. J. Glutamate and depression: Reflecting a deepening knowledge of the gut and brain effects of a ubiquitous molecule. *World Journal of Psychiatry*, 19;11(7):297-315 (2021). doi: 10.5498/wjp.v11.i7.297.
- ²³⁰ Haroon, E., Miller, A. H. Inflammation Effects on Brain Glutamate in Depression: Mechanistic Considerations and Treatment Implications. In: Dantzer, R., Capuron, L. (eds) *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*. Current Topics in Behavioral Neurosciences, vol 31. Springer, Cham, 2016. DOI:10.1007/7854_2016_40

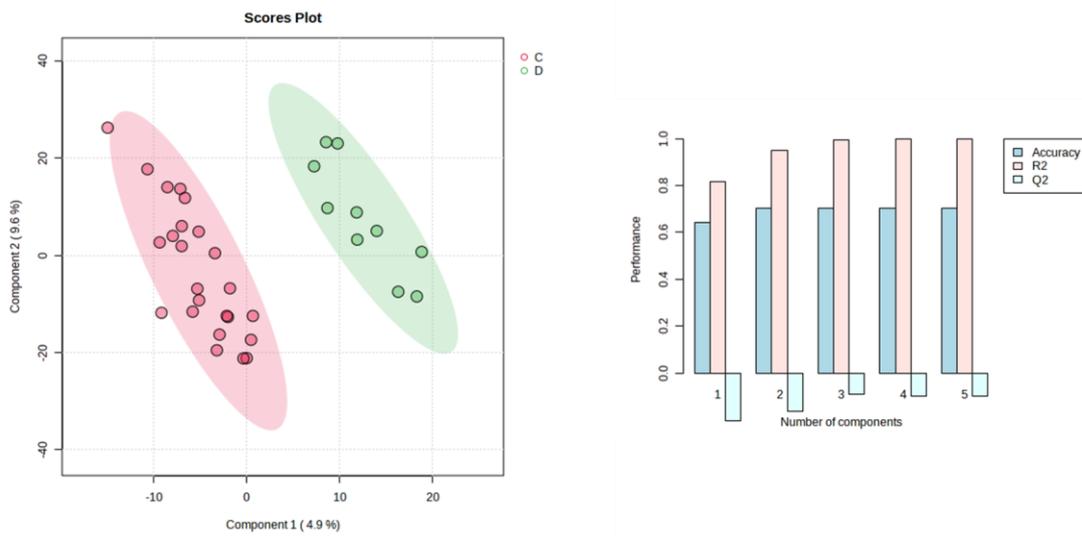
- ²³¹ Jelen, L. A., Stone, J. M. Ketamine for depression. *International Review of Psychiatry*, 33(3), 207–228 (2021). DOI: 10.1080/09540261.2020.1854194
- ²³² Haile, C. N., Murrough, J. W., Iosifescu, D. V., Chang, L. C., Al Jurdi, R. K., Foulkes, A., Iqbal, S., Mahoney 3rd, J. J., De La Garza 2nd, R., Charney, D. S., Newton, T. F., Mathew, S. J. Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(2):331-6 (2014). DOI: 10.1017/S1461145713001119.
- ²³³ Rana, T., Behl, T., Sehgal, A. Sri Vastava, P., Bungay, S. Unfolding the Role of BDNF as a Biomarker for Treatment of Depression. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(10):2008-2021 (2021). DOI: 10.1007/s12031-020-01754-x
- ²³⁴ Castrén, E., Monteggia, L. M. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biological Psychiatry*, 90(2), 128–136 (2021). DOI: 10.1016/j.biopsych.2021.05.008
- ²³⁵ Moliner, R., Giryh, M., Brunello, C. A., Kovaleva, V., Biojone, C., Enkavi, G., Antenucci, L., Kot, E. F., Goncharuk, S. A., Kaurinkoski, K., Kuutti, M., Fred, S. M., Elsilä, L. V., Sakson, S., Cannarozzo, C., Diniz, C. R. A. F., Seiffert, N., Rubiolo, A., Haapaniemi, H., Meshi, E., Nagaeva, E., Öhman, T., Róg, T., Kankuri, E., Vilar, M., Varjosalo, M., Korpi, E. R., Permi, P., Mineev, K. S., Saarna, M., Vattulainen, I., Casarotto, P. C., Castrén, E. Psychedelics promote plasticity by directly binding to BDNF receptor TrkB. *Nature Neuroscience*, 26(6), 1032-1041 (2023). doi: 10.1038/s41593-023-01316-5. Epub 2023 Jun 5. PMID: 37280397; PMCID: PMC10244169.
- ²³⁶ Olson, D. E. Biochemical Mechanisms Underlying Psychedelic-Induced Neuroplasticity. *Biochemistry*, 61 (3), 127–136 (2022). DOI: 10.1021/acs.biochem.1c00812
- ²³⁷ Shai, M. Monoamine Theories of Depression: Historical Impact on Biomedical Research. *Journal of the History of the Neurosciences*, 21:4, 366-392 (2012). DOI: [10.1080/0964704X.2011.623917](https://doi.org/10.1080/0964704X.2011.623917)
- ²³⁸ Koo, J., Marangell, L. B., Nakamura, M., Armstrong, A., Jeon, C., Bhutani, T., Wu, J. J. Depression and suicidality in psoriasis: review of the literature including the cytokine theory of depression. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(12), 1999–2009 (2017). DOI: 10.1111/jdv.14460
- ²³⁹ Malmberg-Aiello, P., Ipponi, A., Bartolini, A., Schunack, W. Mouse light/dark box test reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H1 receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavioral*, 71, 313–318 (2002). DOI: 10.1016/s0091-3057(01)00691-8
- ²⁴⁰ Bahi, A., Schwed, J. S., Walter, M., Stark, H., Sadek, B. Anxiolytic and antidepressant-like activities of the novel and potent non-imidazole histamine H(3) receptor antagonist ST-1283. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 627–637 (2014). DOI: 10.2147/DDDT.S63088
- ²⁴¹ Ong, K.C., Khoo, H.E. Biological effects of myricetin. *General Pharmacology*, 29, 121–126 (1997). DOI: 10.1016/s0306-3623(96)00421-1

- ²⁴² Semwal, D.K., Semwal, R.B., Combrinck, S., Viljoen, A. Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*, 8(2), 90 (2016). DOI: 10.3390/nu8020090
- ²⁴³ Sun, L., Xu, P., Fu, T., Huang, X., Song, J., Chen, M., Tian, X., Yin, H., Han, J. Myricetin against ischemic cerebral injury in rat middle cerebral artery occlusion model. *Molecular Medicine Reports*, 17, 3274–3280 (2018). DOI: 10.3892/mmr.2017.8212
- ²⁴⁴ Shin, J.C., Jung, H.Y., Harikishore, A., Kwon, O.D., Yoon, H.S., Kim, K.T., Choi, B.H. The flavonoid myricetin reduces nocturnal melatonin levels in the blood through the inhibition of serotonin N-acetyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440, 312–316 (2013). DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.076
- ²⁴⁵ Andrew, R. D., Farkas, E., Hartings, J. A., Brennan, K. C., Herreras, O., Müller, M., Kirov, Sergei. A., Ayata, C., Ollen-Bittle, N., Reiffurth, C., Revah, O., Robertson, R. M., Dawson-Scully, K. D., Ullah, G., Dreier, J. P. Questioning Glutamate Excitotoxicity in Acute Brain Damage: The Importance of Spreading Depolarization. *Neurocritical Care*, 37 (S1), 11–30 (2022). DOI: 10.1007/s12028-021-01429-4.
- ²⁴⁶ Green, J. L., Dos Santos, W. F., Fontana, A. C. K. Role of Glutamate Excitotoxicity and Glutamate Transporter EAAT2 in Epilepsy: Opportunities for Novel Therapeutics Development. *Biochemical Pharmacology*, 193, 114786 (2021). DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114786.
- ²⁴⁷ Belov Kirdajova, D., Kriska, J., Tureckova, J., Anderova, M. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 51 (2020). DOI: 10.3389/fncel.2020.00051.
- ²⁴⁸ Pitt, D., Werner, P., Raine, C. S. Glutamate Excitotoxicity in a Model of Multiple Sclerosis. *Nature Medicine*, 6 (1), 67–70 (2000). DOI: 10.1038/71555.
- ²⁴⁹ Jang, J.-H., Lee, S. H., Jung, K., Yoo, H., Park, G. Inhibitory Effects of Myricetin on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Brain Sciences*, 10 (1), 32 (2020). DOI: 10.3390/brainsci10010032.
- ²⁵⁰ Sur, B., Lee, B. Myricetin Inhibited Fear and Anxiety-Like Behaviors by HPA Axis Regulation and Activation of the BDNF-ERK Signaling Pathway in Posttraumatic Stress Disorder Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–11 (2022). DOI: 10.1155/2022/8320256.
- ²⁵¹ Ma, Z., Wang, G., Cui, L., Wang, Q. Myricetin Attenuates Depressant-Like Behavior in Mice Subjected to Repeated Restraint Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28377–28385 (2015). DOI: 10.3390/ijms161226102.
- ²⁵² Malinowska, J. M., Viant, M. R. Confidence in Metabolite Identification Dictates the Applicability of Metabolomics to Regulatory Toxicology. *Current Opinion in Toxicology*, 16, 32–38. DOI:10.1016/j.cotox.2019.03.006.

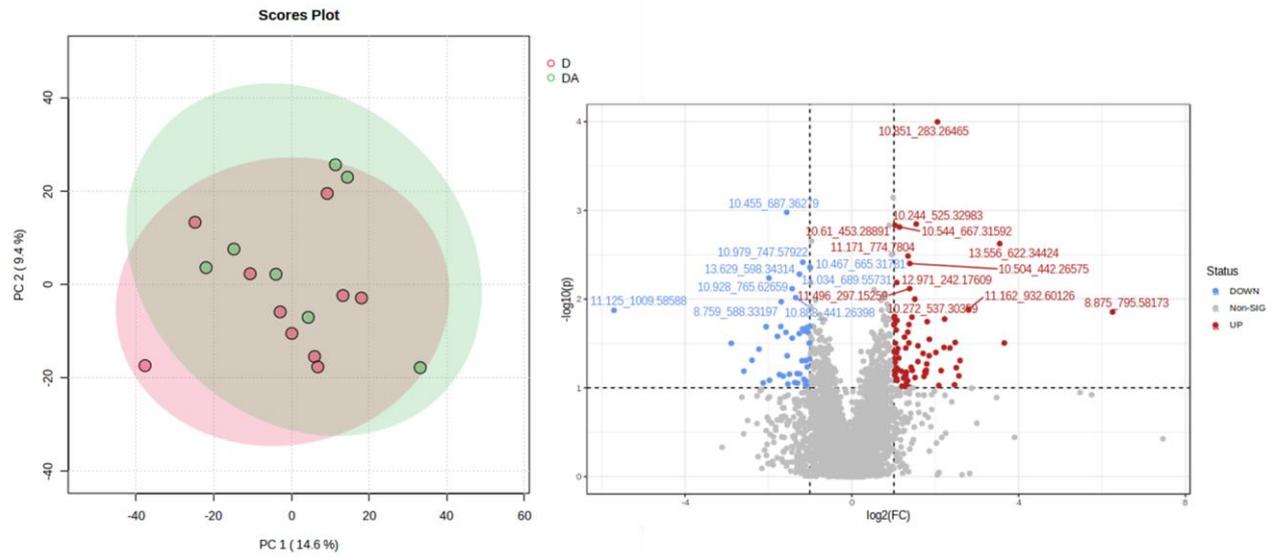
D vs. C (modo positivo)



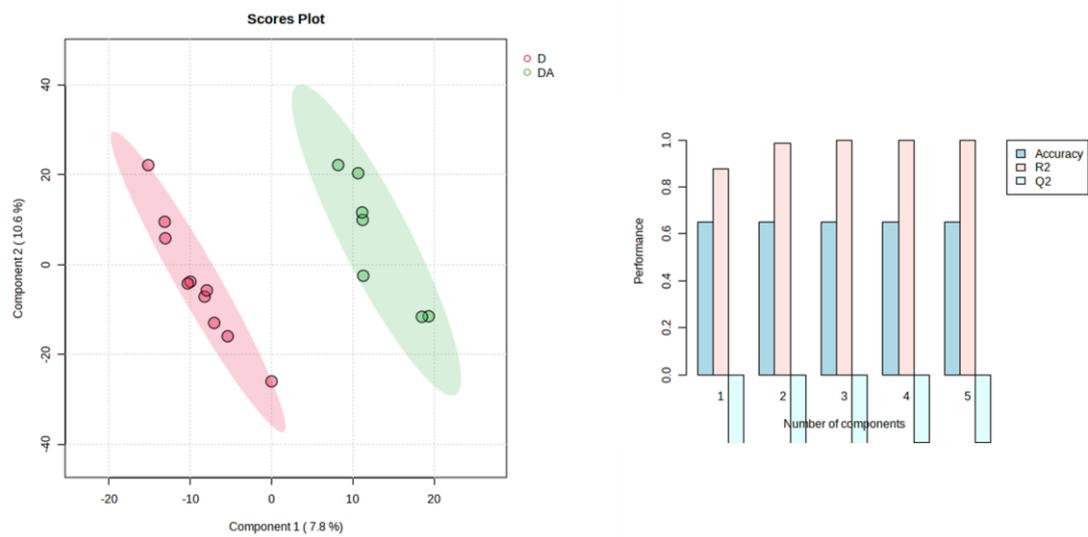
D vs. C (modo positivo)



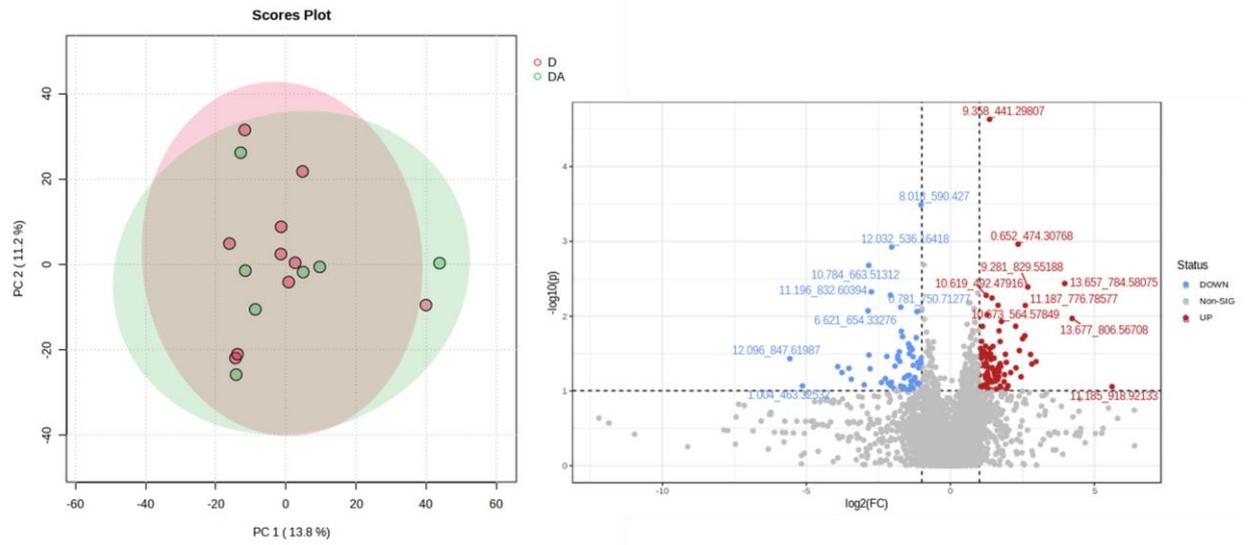
DA vs. D (modo negativo)



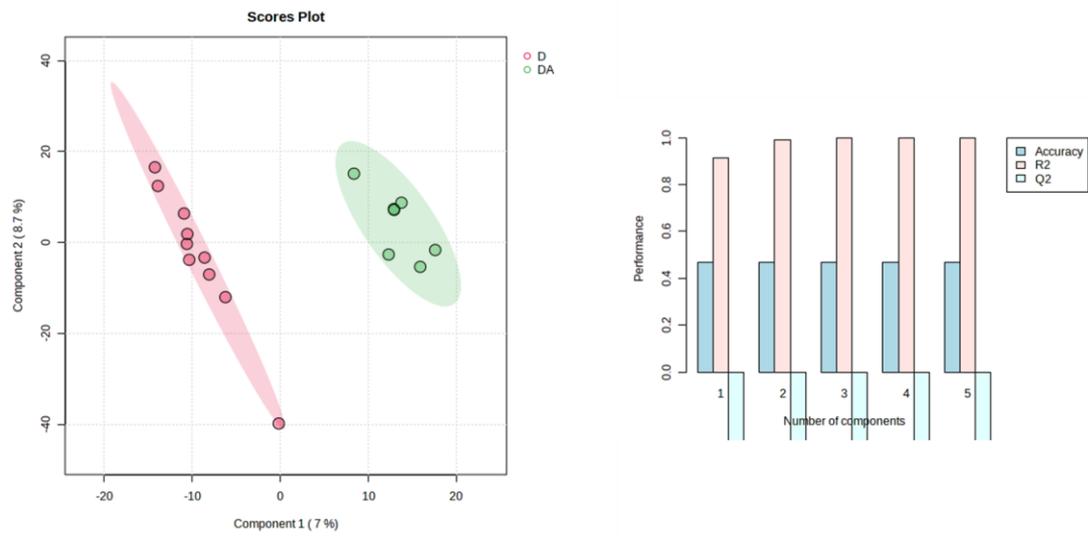
DA vs. D (modo negativo)



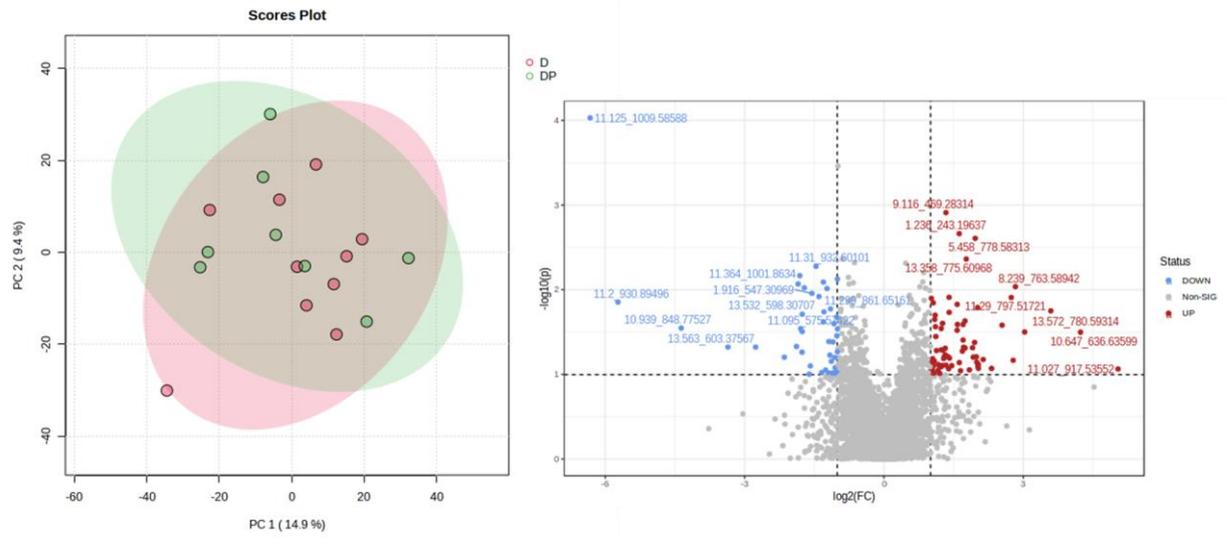
DA vs. D (modo positivo)



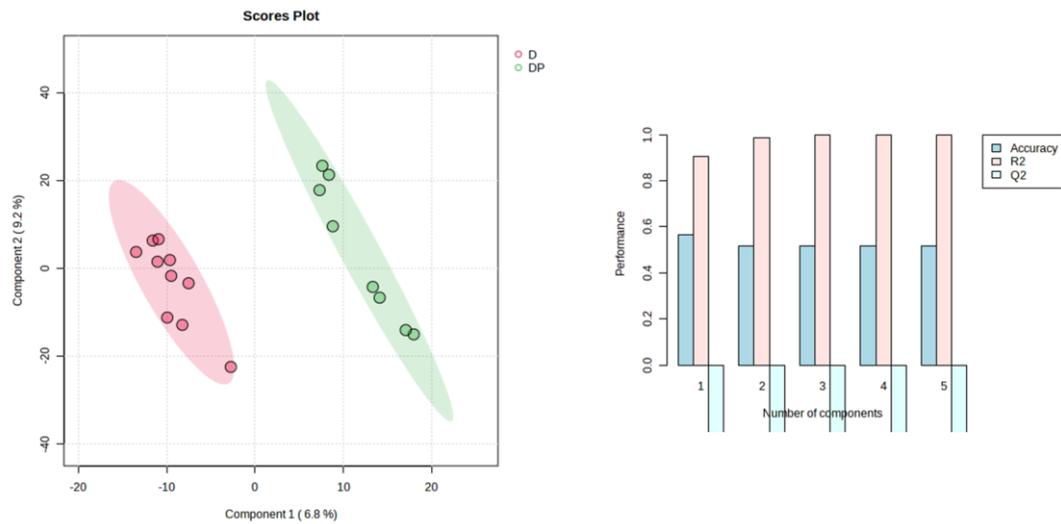
DA vs. D (modo positivo)



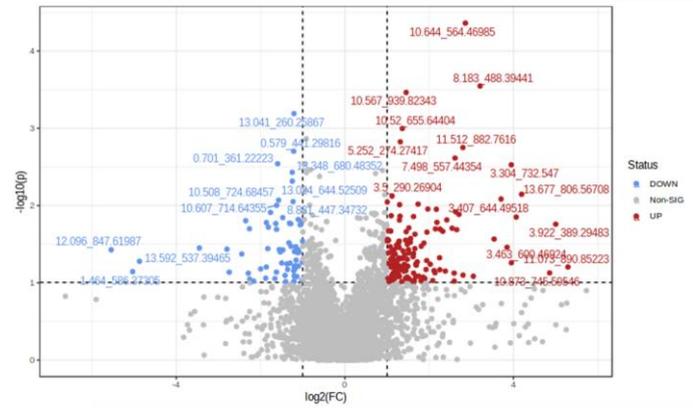
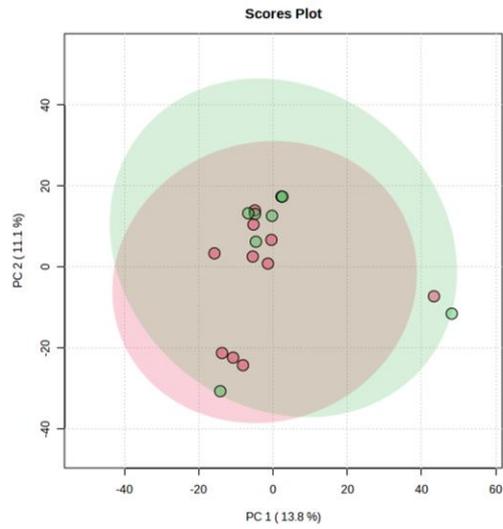
DP vs. D (modo negativo)



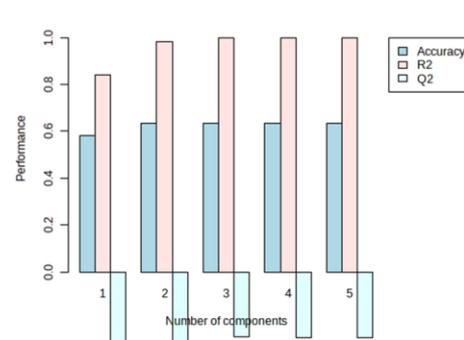
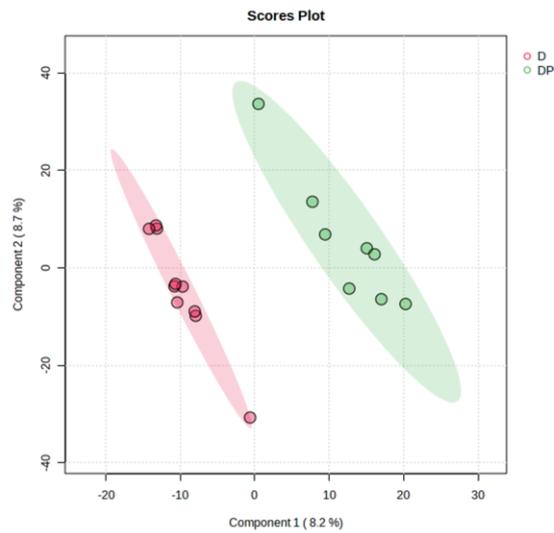
DP vs. D (modo negativo)



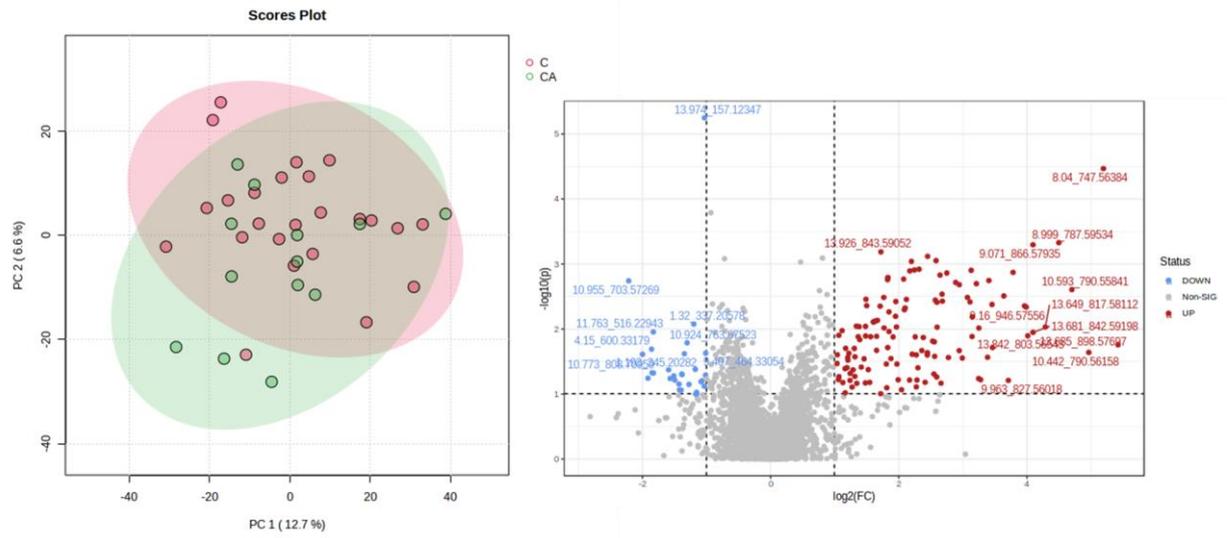
DP vs. D (modo positivo)



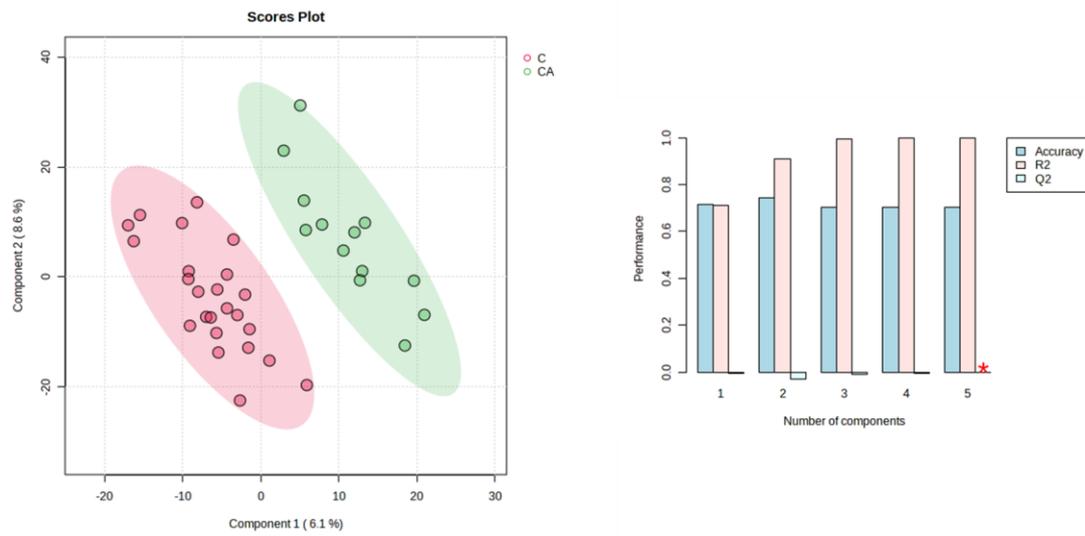
DP vs. D (modo positivo)



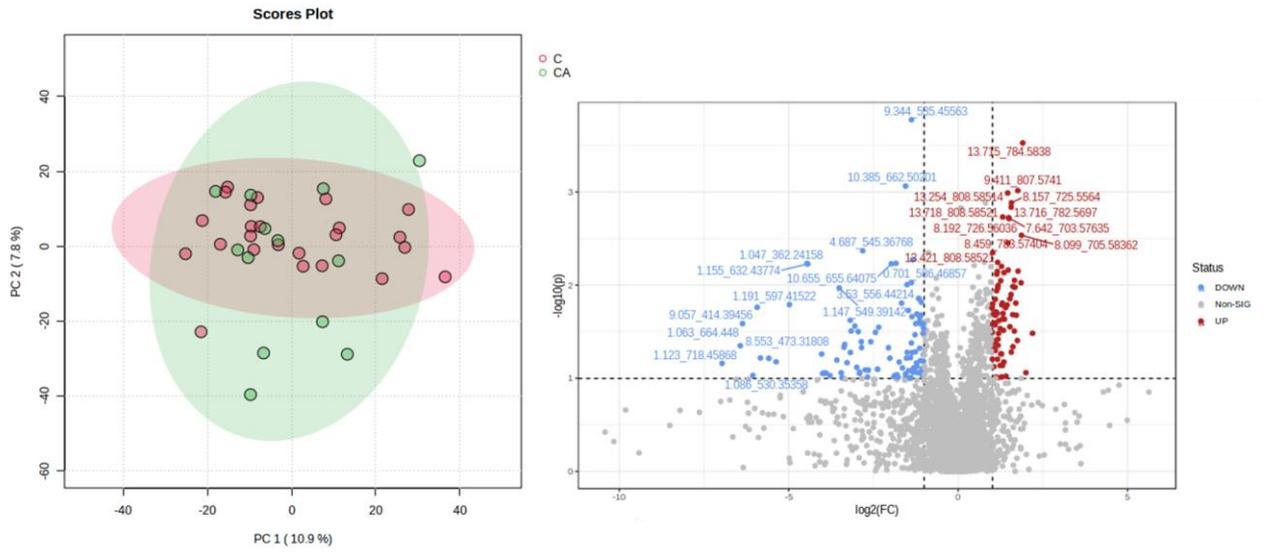
CA vs. C (modo negativo)



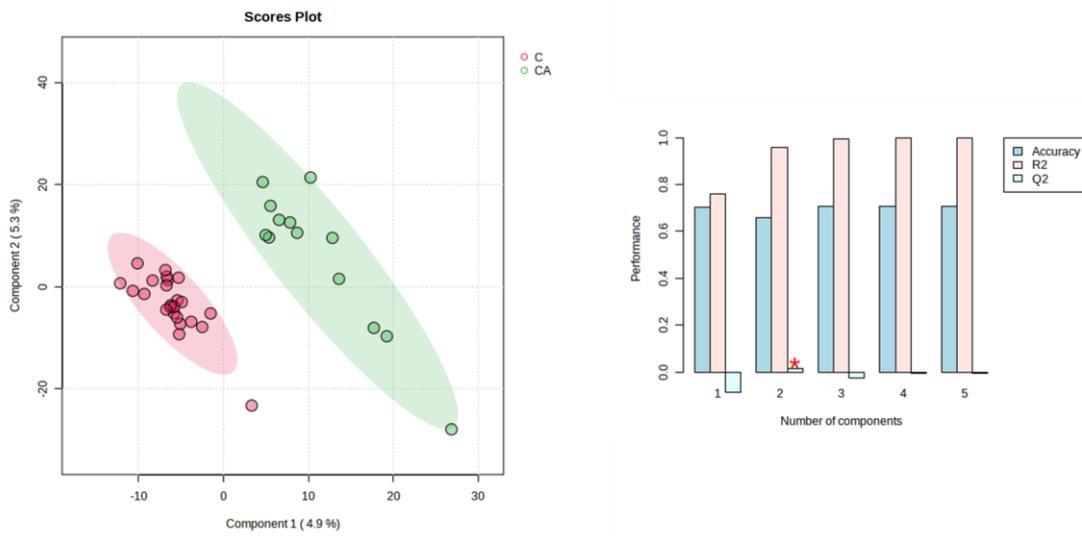
CA vs. C (modo negativo)



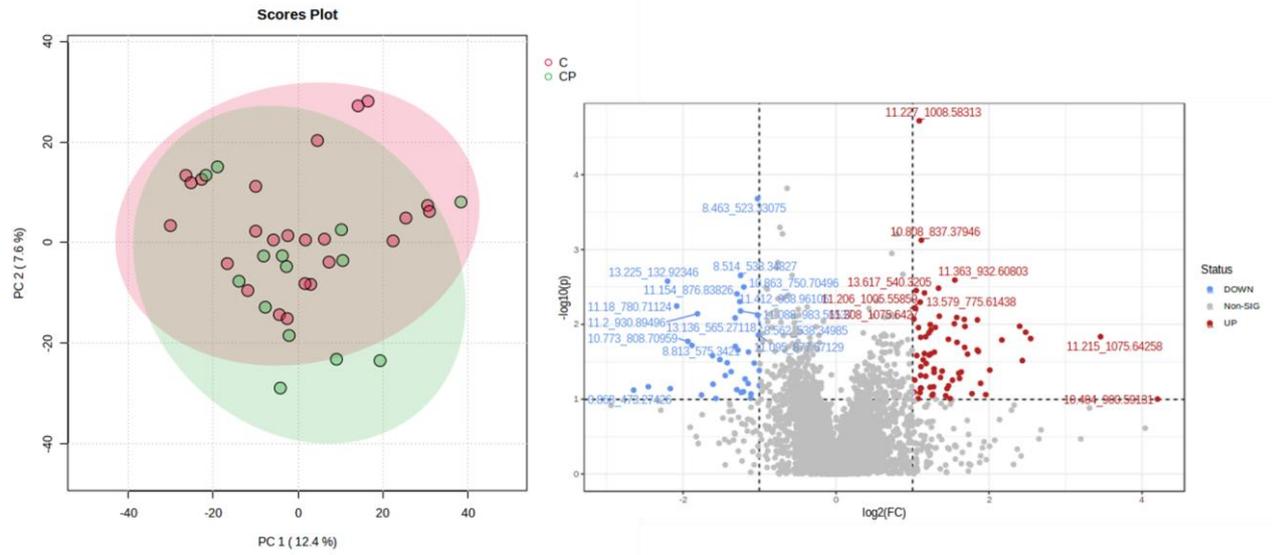
CA vs. C (modo positivo)



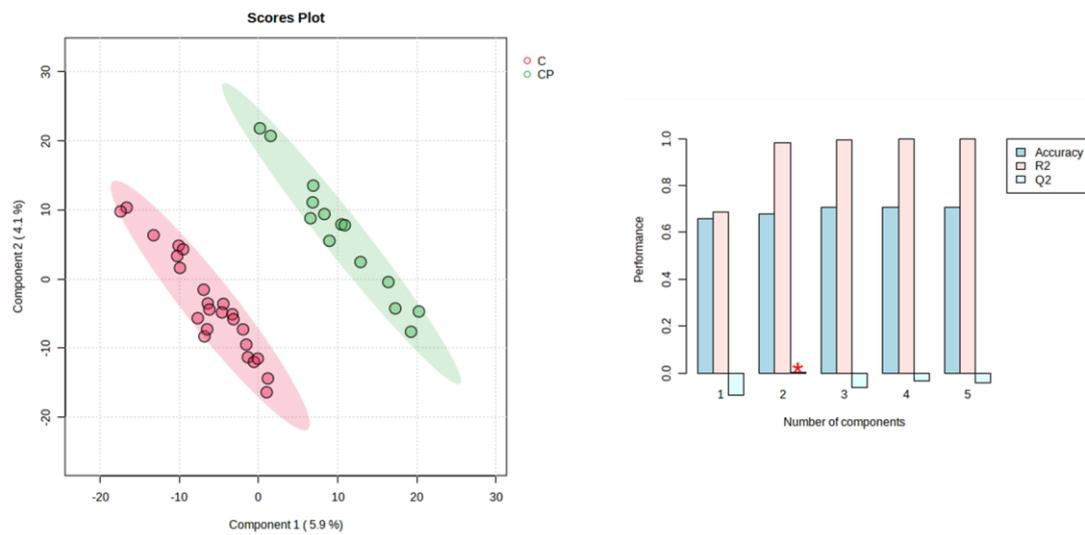
CA vs. C (modo positivo)



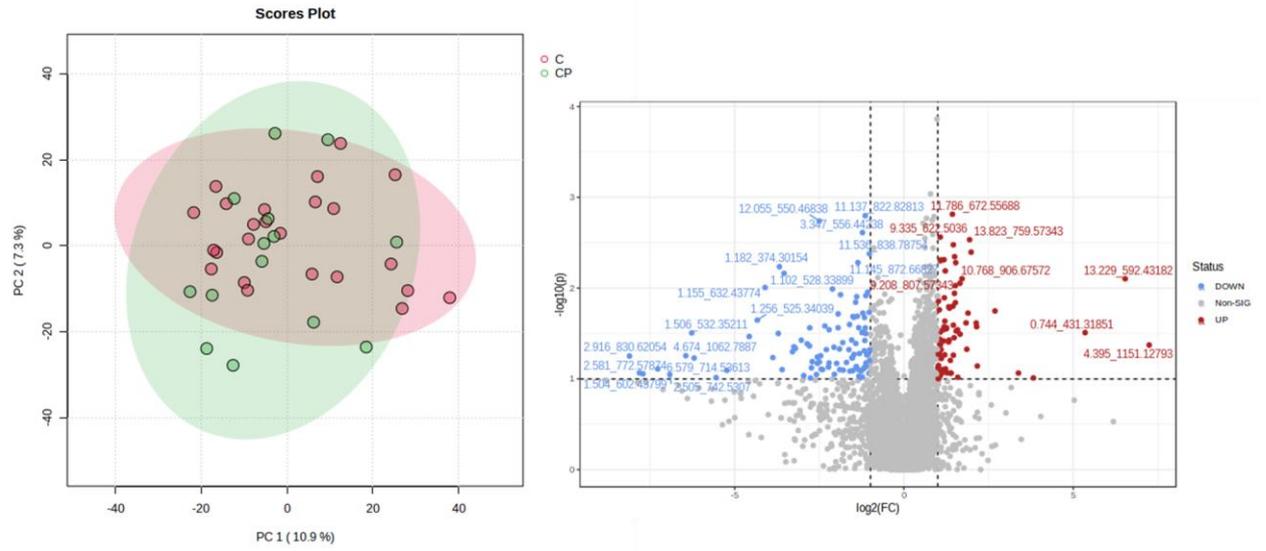
CP vs. C (modo negativo)



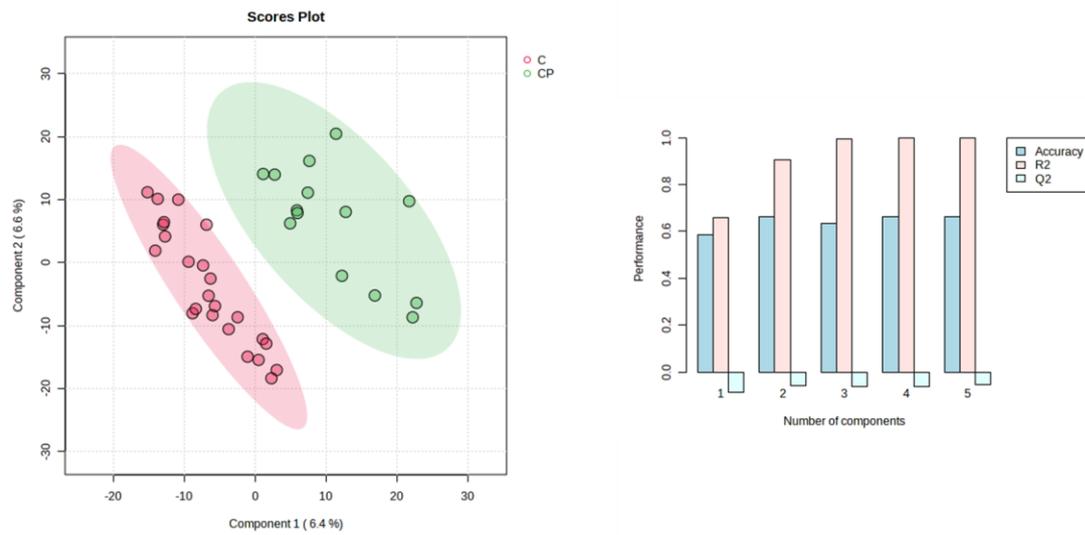
CP vs. C (modo negativo)



CP vs. C (modo positivo)

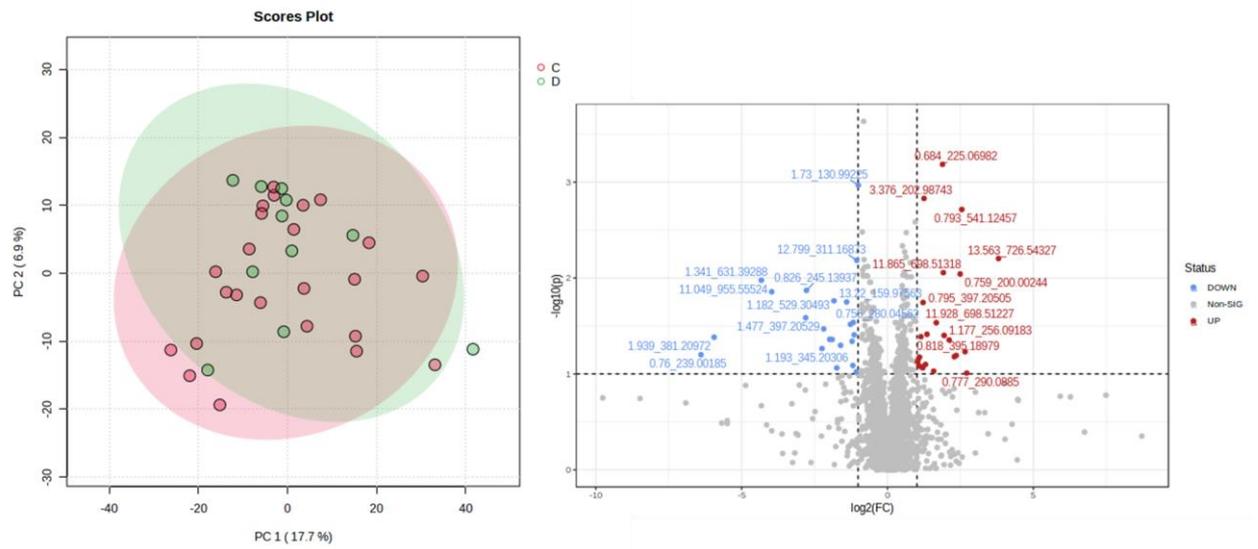


CP vs. C (modo positivo)

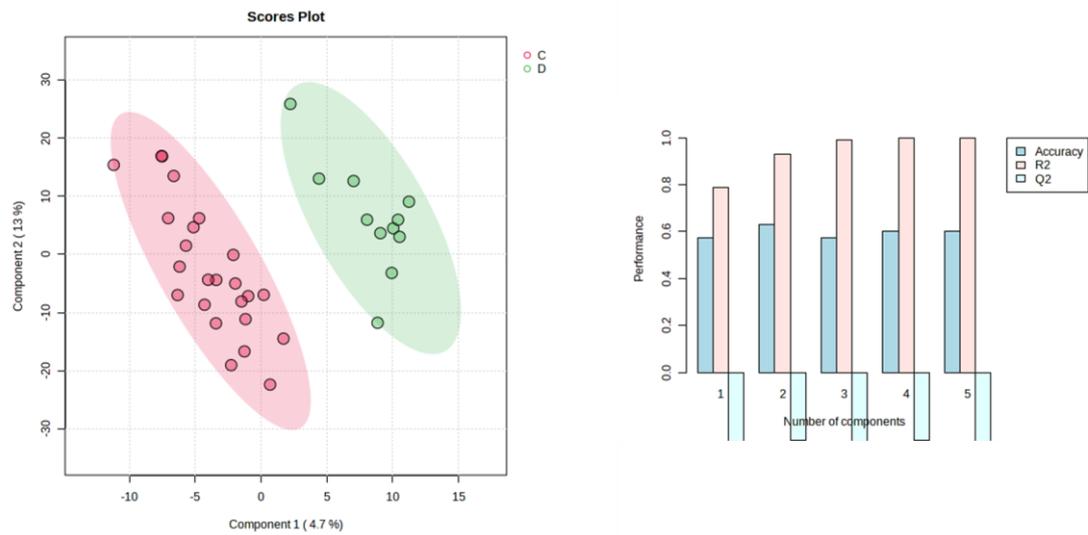


FASE AQUOSA

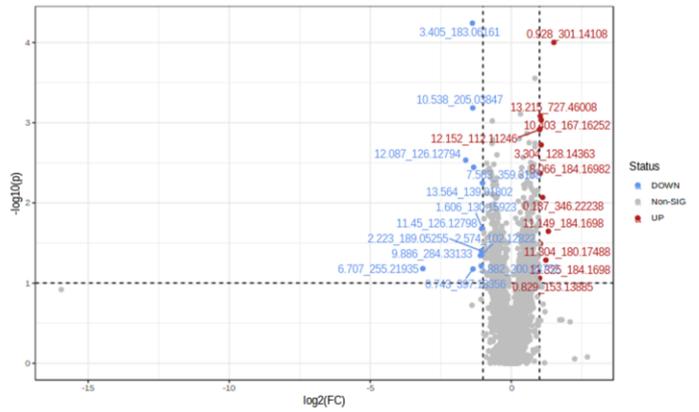
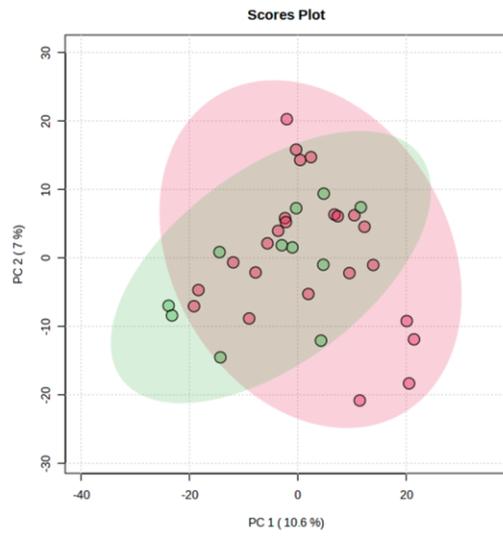
D vs. C (modo negativo)



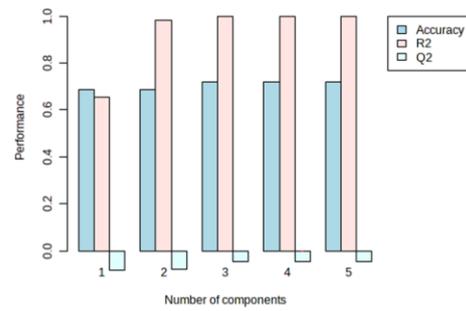
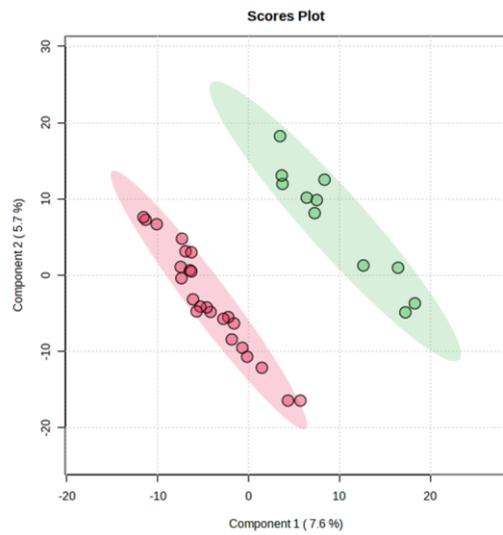
D vs. C (modo negativo)



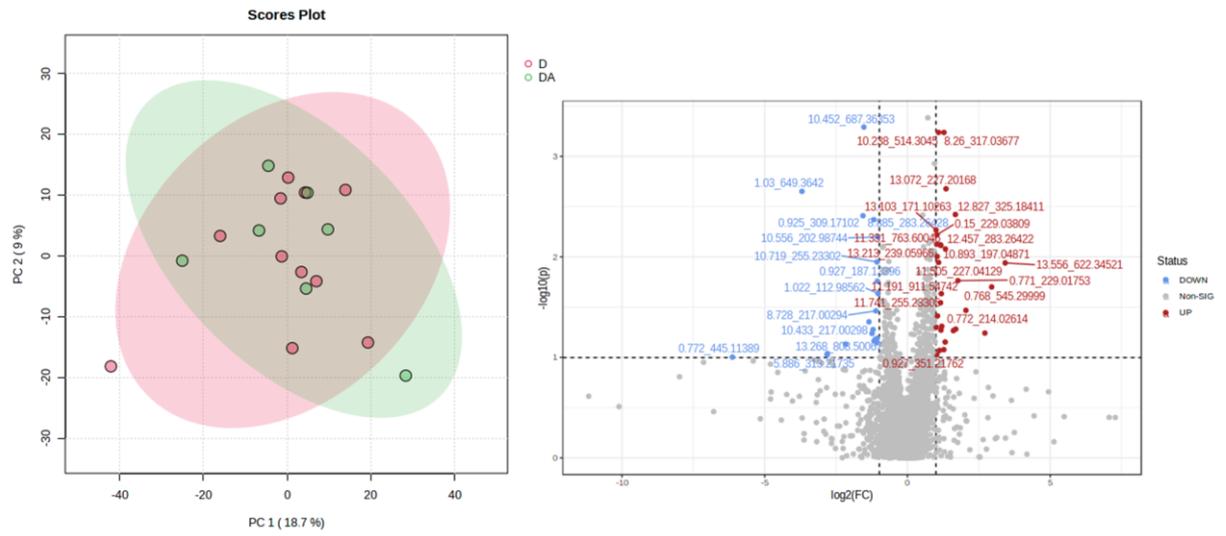
D vs. C (modo positivo)



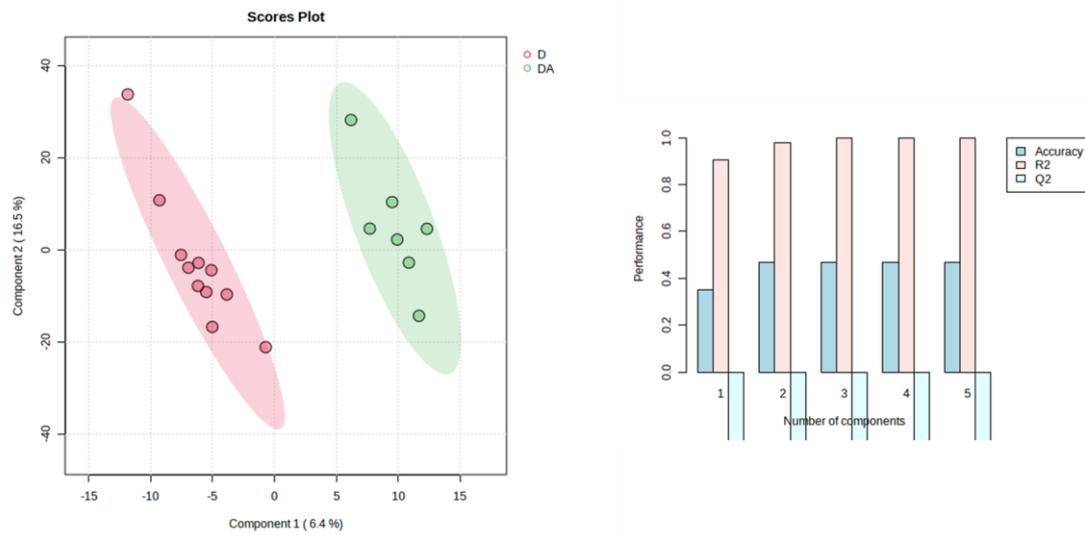
D vs. C (modo positivo)



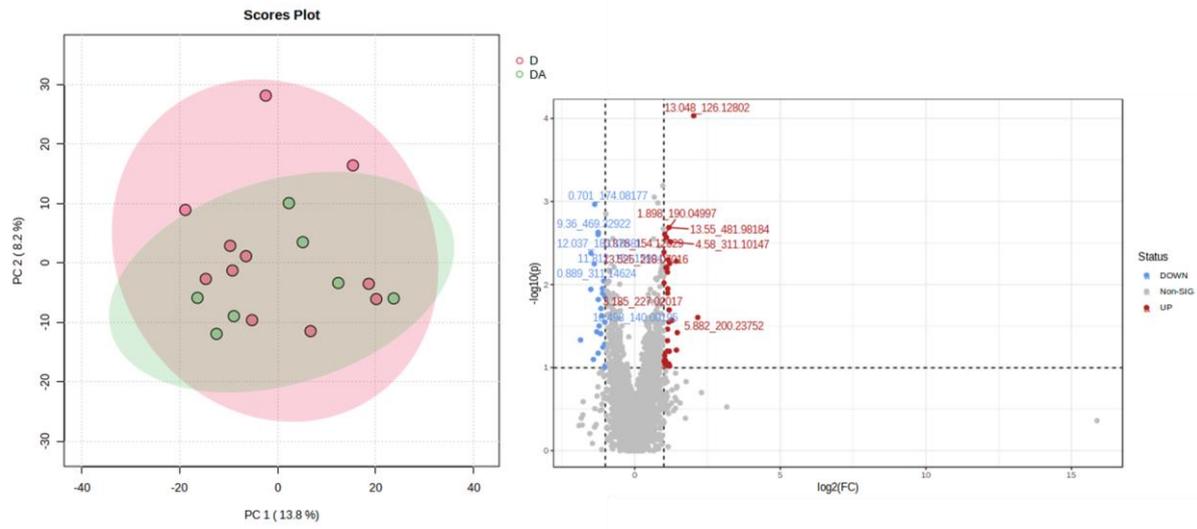
DA vs. D (modo negativo)



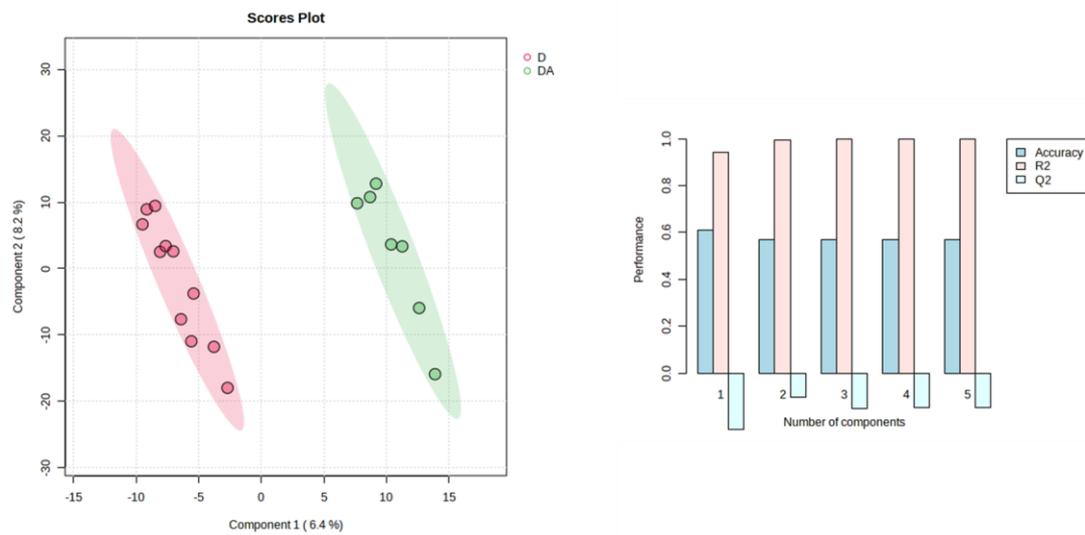
DA vs. D (modo negativo)



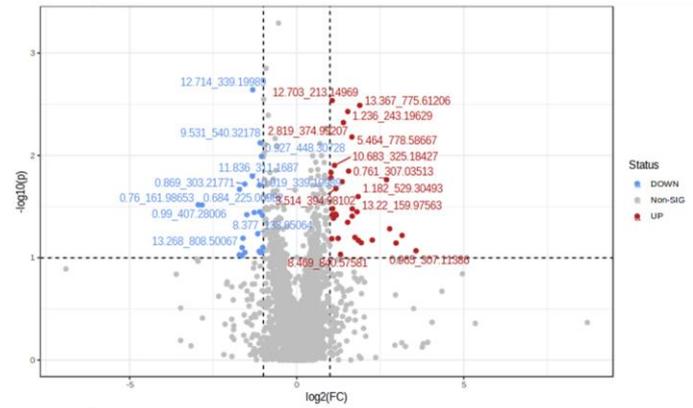
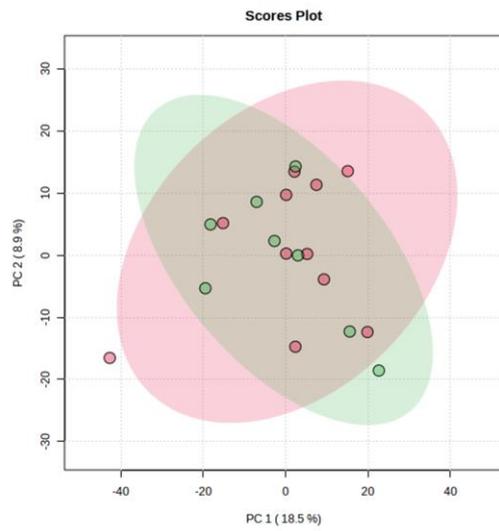
DA vs. D (modo positivo)



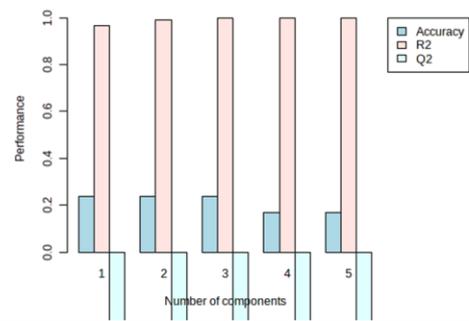
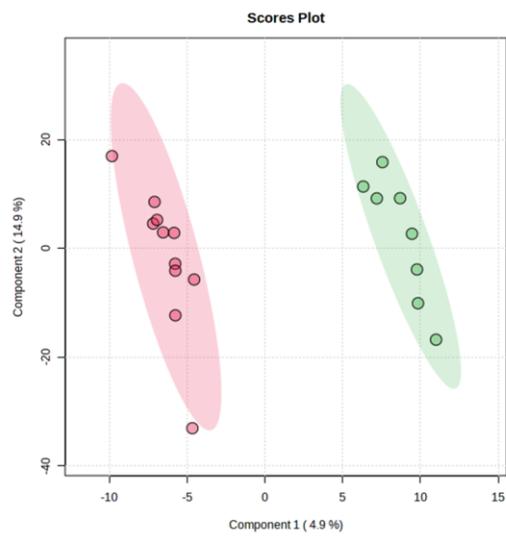
DA vs. D (modo positivo)



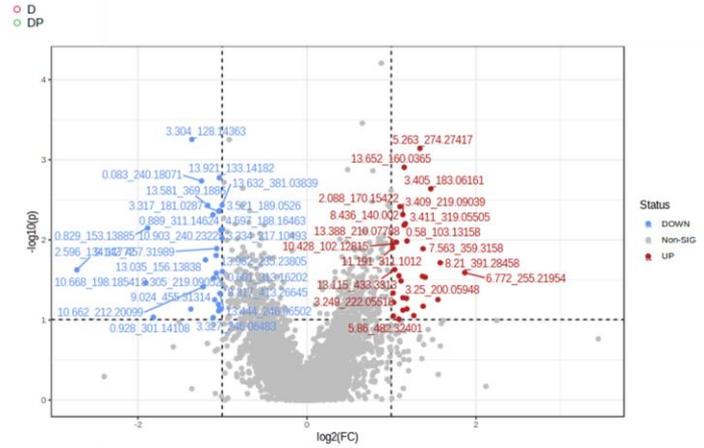
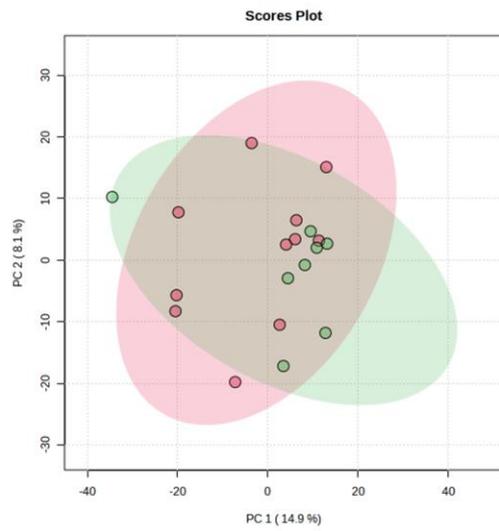
DP vs. D (modo negativo)



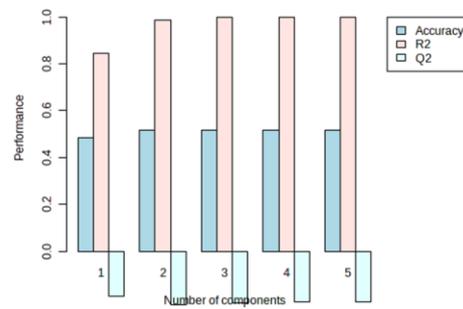
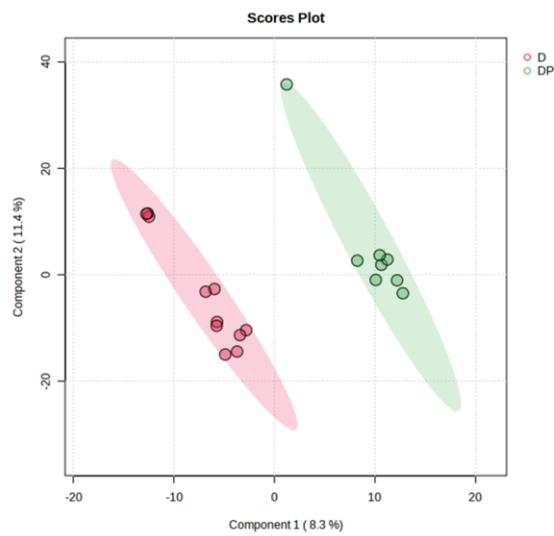
DP vs. D (modo negativo)



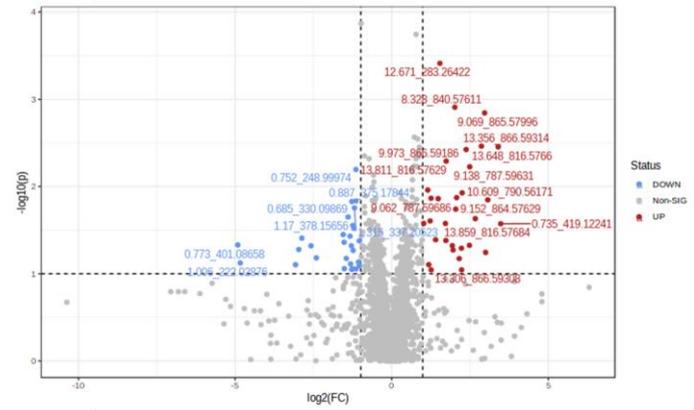
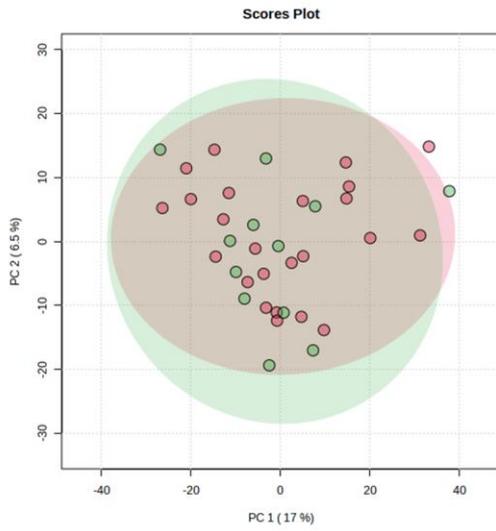
DP vs. D (modo positivo)



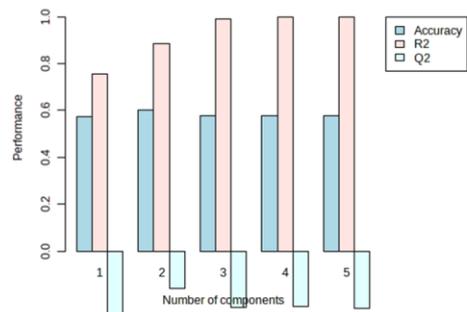
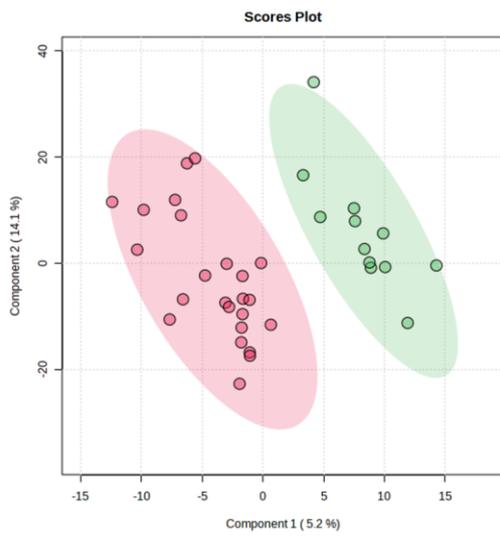
DP vs. D (modo positivo)



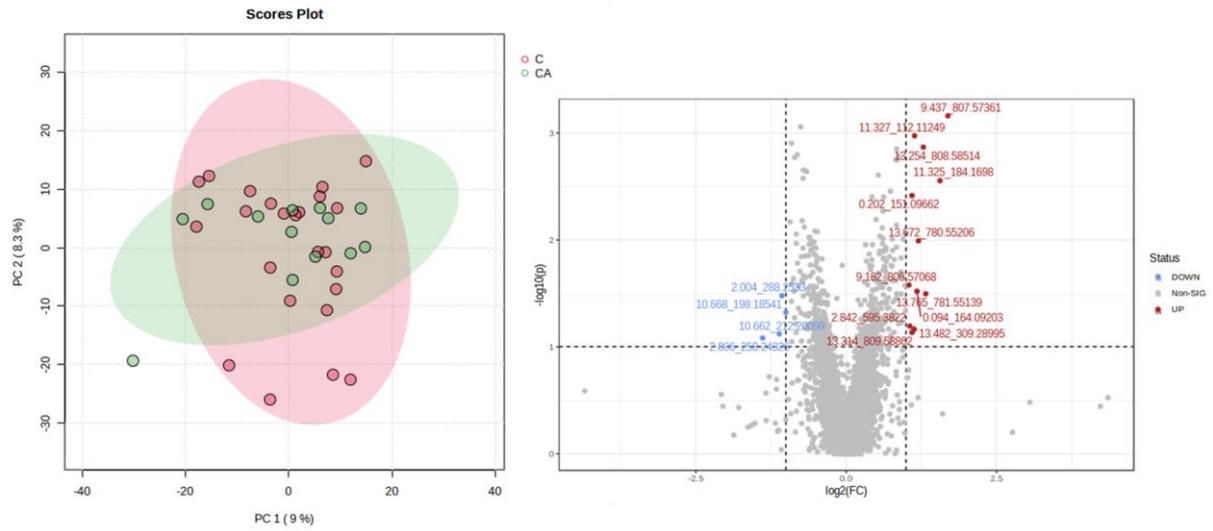
CA vs. C (modo negativo)



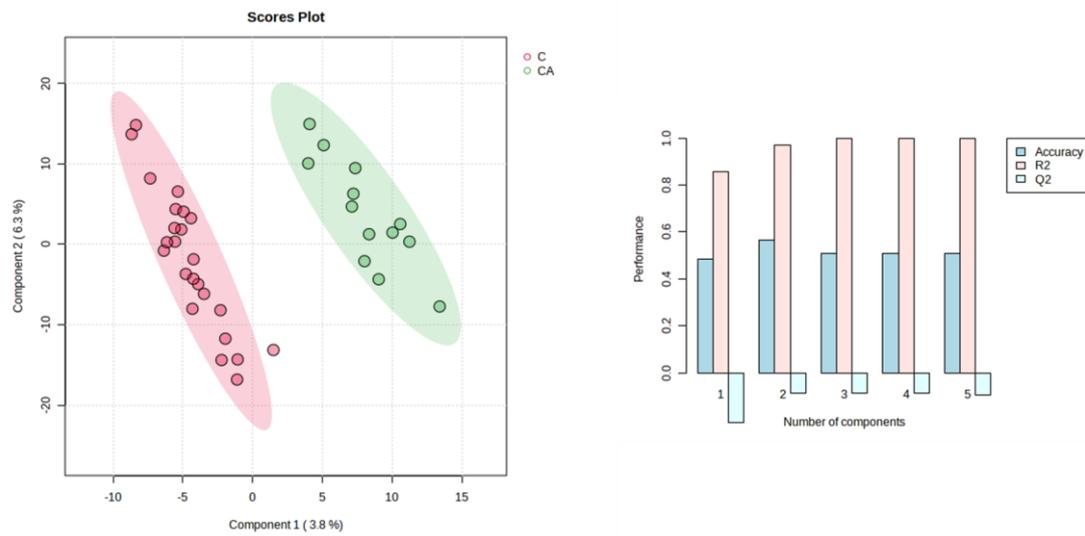
CA vs. C (modo negativo)



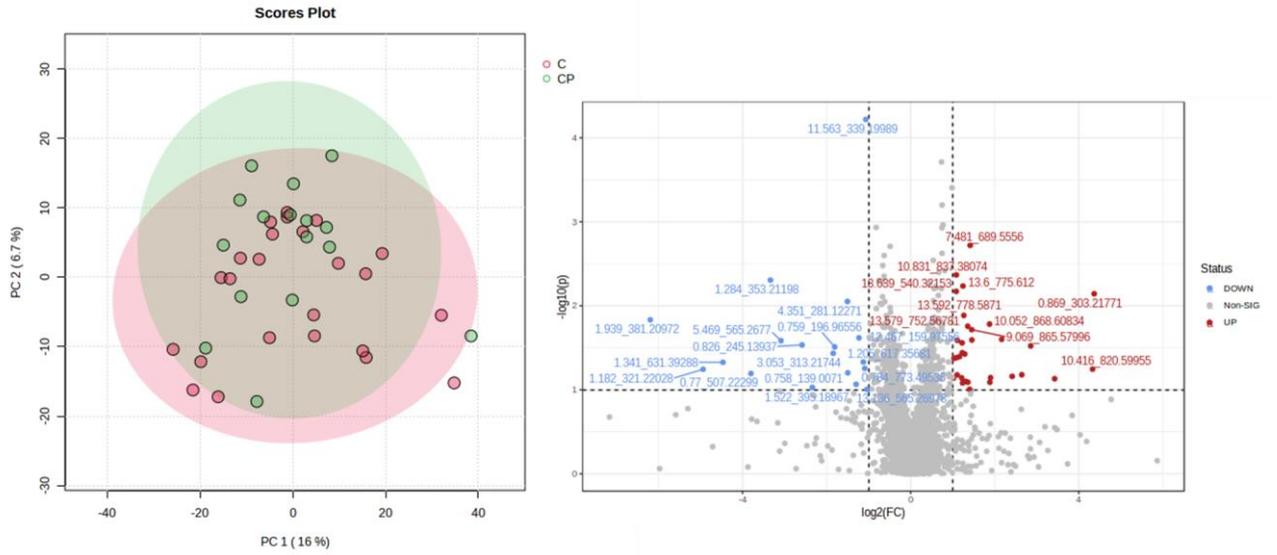
CA vs. C (modo positivo)



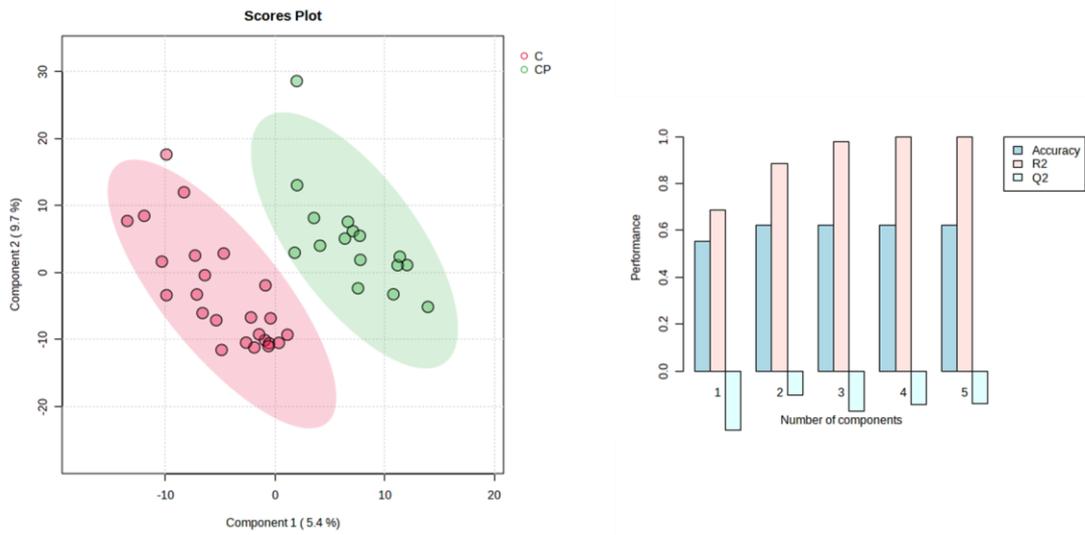
CA vs. C (modo positivo)



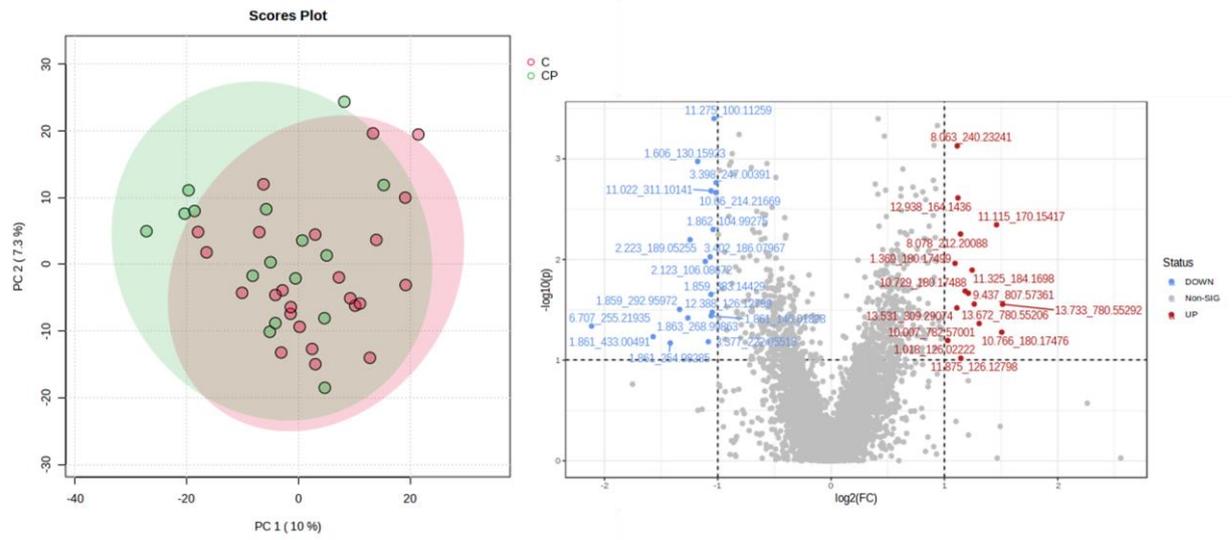
CP vs. C (modo negativo)



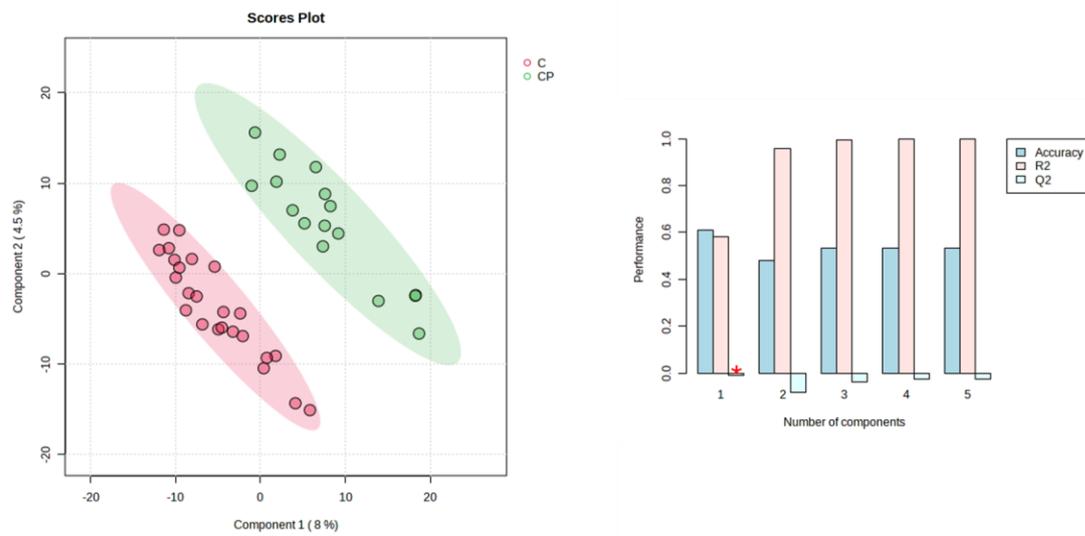
CP vs. C (modo negativo)



CP vs. C (modo positivo)



CP vs. C (modo positivo)



8. ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de Marcadores Eletrofisiológicos, de Neuroimagem, Neuropsicológicos e Bioquímicos sobre o Potencial Terapêutico de uma nova Substância para a Depressão Maior.

Pesquisador: Dráulio Barros de Araújo

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 4

CAAE: 01266012.8.0000.5292

Instituição Proponente: Hospital Universitário Onofre Lopes

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO
Instituto do Cérebro
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 579.479

Data da Relatoria: 29/11/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo duplo-cego, randomizado, placebo controlado, envolvendo 60 sujeitos (40 pacientes internados na enfermaria de psiquiatria do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL, que apresentem diagnóstico de transtorno depressivo recorrente e 20 indivíduos sem história de diagnóstico de doenças psiquiátricas. O estudo será duplo cego para os avaliadores e para o paciente, com respeito ao tratamento que eles receberão.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar o efeito de dose única do DMAOi em pacientes com diagnóstico de depressão maior por meio da avaliação de diferentes marcadores bioquímicos, de eletroencefalografia, polisonografia, imagem por ressonância magnética, medidas psicométricas e testes neuropsicológicos.

ESPECÍFICOS:

- a. Validar liofilização e encapsulamento de composto DMAOi para uso clínico.
- b. Correlacionar a severidade da depressão aferida por medidas psicométricas com alterações

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo

Bairro: Petrópolis

CEP: 59.012-300

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3342-5003

Fax: (84)3202-3941

E-mail: cep_huol@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 579.479

quantitativas de diferentes marcadores bioquímicos, de eletroencefalografia, polisonografia, de imagem por ressonância magnética e testes neuropsicológicos na fase basal (antes da sessão experimental com DMAOi).

c. Observar diferenças em medidas quantitativas de marcadores bioquímicos, de eletroencefalografia, polisonografia, de imagem por ressonância magnética e testes neuropsicológicos e psicométricos entre o grupo controle e o grupo de pacientes com depressão antes da sessão experimental.

d. Investigar as possíveis alterações agudas dos diferentes marcadores bioquímicos, de eletroencefalografia, polisonografia, de imagem por ressonância magnética, testes neuropsicológicos e medidas psicométricas nos pacientes com depressão refratária a medicação e submetidos à ingestão pontual de DMAOi.

e. Correlacionar a possível redução aguda de sintomas depressivos aferidos por medidas psicométricas nos pacientes tratados com DMAOi, com alterações quantitativas dos biomarcadores sanguíneos, de eletroencefalografia e testes neuropsicológicos.

f. Identificar possíveis alterações em biomarcadores sanguíneos, de eletroencefalografia, polisonografia, de imagem por ressonância magnética, testes neuropsicológicos e medidas psicométricas em função do tratamento com DMAOi nos pacientes depressivo.

g. Contribuir para validação de biomarcadores sanguíneos, de eletroencefalografia, polisonografia, de imagem por ressonância magnética e testes neuropsicológicos e psicométricos para diagnóstico e acompanhamento de terapia medicamentosa da depressão.

h. Buscar por correlações, usando estratégias de bioinformática, entre os marcadores bioquímicos, eletroencefalográficos, de imagem por ressonância magnética, neuropsicológicos e psicométricos a fim de identificar conjunto de medidas características da clínica depressão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Bem redigidos e claros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

todos presentes e claros

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo

Bairro: Petrópolis

CEP: 59.012-300

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3342-5003

Fax: (84)3202-3941

E-mail: cep_huol@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 579.479

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

NATAL, 03 de Abril de 2014

Assinador por:
Paulo Moreira Silva Dantas
(Coordenador)

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo

Bairro: Petrópolis

CEP: 59.012-300

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3342-5003

Fax: (84)3202-3941

E-mail: cep_huol@yahoo.com.br



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AB8AC9C

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AB8AC9C**
Usuário: **Alessandra Sussulini**
CPF/CNPJ: **300.957.748-66**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Banisteriopsis caapi

Psychotria viridis

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Estudos metabolômicos de pacientes com depressão tratados com ayahuasca e das plantas que compõem esta bebida**

Equipe

Alessandra Sussulini	UNICAMP
Taynara Simão Matos	Unicamp
Flávia da Silva Zandonadi	Unicamp
Luidy Darllan Barbosa	Unicamp
Emerson Andrade Ferreira dos Santos	Unicamp
Draulio Barros de Araújo	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Luís Fernando Farah de Tófoli	Unicamp

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Quantification of N,N-Dimethyltryptamine and 1**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Preliminary study of the exometabolomic profil**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Multi-omics data integration for in vitro studies**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Aplicação da abordagem lipidômica no estudo**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Avaliação da proliferação em linhagens celular**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Understanding ayahuasca effects in major depre**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Human primary astrocytes finger- and footprint**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Differentiation of ayahuasca samples according**

Outros resultados

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

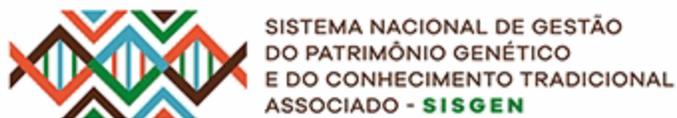
Identificação do meio onde foi divulgado: **Chemical Composition of Traditional and Analc**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Preliminary biochemical pathway analysis from**

Data do Cadastro: **30/11/2022 11:27:12**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:18** de **19/04/2023**.





**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AB8AC9C

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AB8AC9C**
Usuário: **Alessandra Sussulini**
CPF/CNPJ: **300.957.748-66**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Banisteriopsis caapi

Psychotria viridis

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Estudos metabólicos de pacientes com depressão tratados com ayahuasca e das plantas que compõem esta bebida**

Equipe

Alessandra Sussulini	UNICAMP
Taynara Simão Matos	Unicamp
Flávia da Silva Zandonadi	Unicamp
Luidy Darllan Barbosa	Unicamp
Emerson Andrade Ferreira dos Santos	Unicamp

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	Quantification of N,N-Dimethyltryptamine and 1
Identificação do meio onde foi divulgado:	Preliminary study of the exometabolomic profil
Identificação do meio onde foi divulgado:	Multi-omics data integration for in vitro studies
Identificação do meio onde foi divulgado:	Aplicação da abordagem lipidômica no estudo
Identificação do meio onde foi divulgado:	Avaliação da proliferação em linhagens celular
Identificação do meio onde foi divulgado:	Understanding ayahuasca effects in major depri
Identificação do meio onde foi divulgado:	Human primary astrocytes finger- and footprint
Identificação do meio onde foi divulgado:	Differentiation of ayahuasca samples accordin

Outros resultados

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	Chemical Composition of Traditional and Analc
Identificação do meio onde foi divulgado:	Preliminary biochemical pathway analysis from

Data do Cadastro: **30/11/2022 11:27:12**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:17** de **19/04/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**