



Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana



Informe Final de Pasantía de Grado

“Caracterización *in vitro* de los componentes principales de la Ayahuasca y su combinación como agentes antioxidantes y neuroprotectores”

Estudiante: Francisca Baroffio

Tutor: Patricia Esperón

Orientadora de Pasantía: Dra. Mariana Pazos

Co-orientadora: Dra. Giselle Prunell

Lugar de realización: Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Resumen

Los psicodélicos naturales han sido utilizados durante siglos con fines espirituales y medicinales, y han despertado interés científico por su potencial terapéutico. La ayahuasca es una bebida psicodélica de origen amazónico preparada por decocción de *P. viridis* y *B. caapi*. Se compone mayoritariamente de *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) y las β -carbolinas harmina (HAR), harmalina (HML) y tetrahidroharmina (THH). Numerosos estudios reportan su potencial para el tratamiento de depresión, uso problemático de sustancias y, de nuestro interés, la enfermedad de Parkinson, entre otros. Esto se ha vinculado al probable efecto neuroprotector de la ayahuasca y/o sus componentes, hipótesis en que nos basamos.

Dada la implicancia del estrés oxidativo (EO) en neurodegeneración, nos propusimos evaluar la actividad antioxidante de DMT, β -carbolinas mayoritarias y farmahuasca (FH) mediante el ensayo de ABTS, que relaciona la desaparición del radical coloreado ABTS* con la capacidad antioxidante del compuesto en estudio. Además, evaluamos su acción neuroprotectora contra peróxido de hidrógeno (generador de EO generalizado) y rotenona (inhibidor mitocondrial), utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT y la línea celular PC12 como modelo, ampliamente utilizada para estudiar neuroprotección.

Los resultados obtenidos señalan hacia una actividad antioxidante por parte de la DMT, HML, THH y FH, mientras que la HAR no mostro actividad antioxidante. De las concentraciones evaluadas, la DMT no mostro toxicidad para ninguna de ellas, la HAR lo hizo únicamente para la concentración más alta evaluada, 20uM, mientras que la FH resultó toxica para las concentraciones 0.5, 1 y 5uM. Finalmente, los ensayos de neuroprotección no mostraron que alguna de las concentraciones testeadas de FH, HAR o DMT tuvieran la capacidad de proteger a las células PC12 contra la rotenona o H₂O₂.

Palabras claves: ayahuasca; estrés oxidativo; neuroprotección

Introducción

Los psicodélicos naturales se han utilizado durante siglos por muchas culturas, tanto en ceremonias religiosas y espirituales como con fines medicinales (Brito-da-costa et al., 2020; Nichols, 2016). En los últimos años, los psicodélicos han vuelto a despertar enorme interés por su potencial uso para el tratamiento de una variedad de enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SNC), lo cual se ve reflejado en el aumento reciente y considerable en las publicaciones científicas relacionadas al tema (Aday et al., 2020; Belouin & Henningfield, 2018; Cameron & Olson, 2018; Carhart-Harris & Goodwin, 2017; Flanagan & Nichols, 2018; Inserra et al., 2021; Nutt et al., 2020; Vann Jones & O’Kelly, 2020).

La ayahuasca, cuyo nombre se traduce del quechua como “liana de los espíritus o de los muertos”, es una bebida originaria de la selva amazónica consumida por pueblos originarios en Brasil, Bolivia, Ecuador y Perú. Se prepara mediante la decocción de las hojas de *Psychotria viridis* y las raíces de *Banisteriopsis caapi* y luego se consume en forma de té. Originariamente se utilizó como elemento central de la religión, en ritos de iniciación y con fines medicinales por su capacidad de “conexión con lo divino”. En los años 1930s, esta bebida se expandió de sus usos chamánicos tradicionales en la selva amazónica al uso por grupos religiosos sincréticos en todo Brasil y, posteriormente, 4 décadas atrás, su uso se extendió a todo el mundo con fines espirituales, medicinales y religiosos (R. G. dos Santos & Hallak, 2021; Nižnanský et al., 2022).

En los últimos años, debido al renovado interés en el potencial terapéutico de los psicodélicos, la ayahuasca y sus componentes principales han captado la atención de la comunidad científica. Tanto estudios a nivel clínico como observacionales reportan el beneficioso uso de la ayahuasca o sus componentes para el tratamiento de depresión (de Osório et al., 2015; Domínguez-Clavé et al., 2022; Palhano-Fontes et al., 2019; Sanches et al., 2016; Zeifman et al., 2021), duelo (González et al., 2019), desórdenes alimenticios (Lafrance et al., 2017), uso problemático de sustancias (Apud, 2021; Apud Peláez, 2020; Barbosa et al., 2018; Fábregas et al., 2010) y enfermedad de Parkinson (EP) (Serrano-Dueñas et al., 2001), entre otros (Cameron & Olson, 2018; Domínguez-Clavé et al., 2016; R. G. dos Santos et al., 2017; R. G. dos Santos & Hallak, 2021; Inserra et al., 2021; Simão et al., 2019). Más aún, a nivel pre-clínico en modelos de animales de depresión (Cameron et al., 2018; Ferraz et al., 2019; Pic-Taylor et al., 2015) y auto-administración de alcohol (Gianfratti et al., 2022), se evidenciaron interesantes actividades de esta bebida y sus componentes. En esta línea, al día de hoy, son varios los estudios que reportan su seguridad fisiológica, permitiendo utilizar esta bebida con fines terapéuticos (Guimarães dos Santos, 2013; Nichols, 2016). Para citar algunos ejemplos, un estudio realizado en 2020 concluyó que la administración crónica de ayahuasca en concentraciones similares a las usadas en los rituales religiosos no presenta toxicidad en ratas Wistar (Colaço et al., 2020). Adicionalmente, una investigación sobre los efectos en personas de consumo frecuente de ayahuasca en Perú asoció esta práctica con longevidad, vigor físico y agudeza mental. Individuos pertenecientes a religiones sincréticas que utilizan Ayahuasca por más de 30 años no presentan problemas de salud debido a su consumo. Además, estudios sobre efectos a largo plazo en humanos muestran que no hay toxicidad fisiológica o alteraciones psicológicas y que se encuentran mejoras en lo que respecta a depresión, pensamiento cognitivo y mindfulness (Bouso et al., 2012; Estrella-Parra et al., 2019; Nižnanský et al., 2022).

En lo que refiere a su composición, los principales componentes de la ayahuasca son la *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) proveniente de *P. viridis* y alcaloides beta-carbolínicos (o alcaloides de harmala), siendo los mayoritarios harmina (HAR), tetrahydroharmina (THH) y harmalina (HML), provenientes de *B. capii* (fig. 1). La DMT es el principal compuesto psicoactivo mientras que las beta-carbolinas inhiben reversiblemente la enzima monoamina oxidasa A (MAO-A). Esta inhibición de la MAO-A es lo que permite la acción de la DMT en el sistema nervioso central cuando es consumida oralmente como en la Ayahuasca, ya que la DMT no es activa por esta vía dada a su degradación periférica por la MAO-A (Cameron & Olson, 2018; Rodríguez et al., 2022; B. W. L. Santos et al., 2022). De esta manera, la forma de preparación y composición de la ayahuasca aseguran la inhibición de esta enzima, lo que permite que la DMT llegue a su sitio de acción, el cerebro (Cameron & Olson, 2018; Samoylenko et al., 2010; Simão et al., 2019). Adicionalmente, las beta-carbolinas han demostrado actividad neuroprotectora, neurogénica, ansiolítica y antidepresiva, entre otras (Cameron & Olson, 2018; Samoylenko et al., 2010; B. W. L. Santos et al., 2022; Simão et al., 2019).

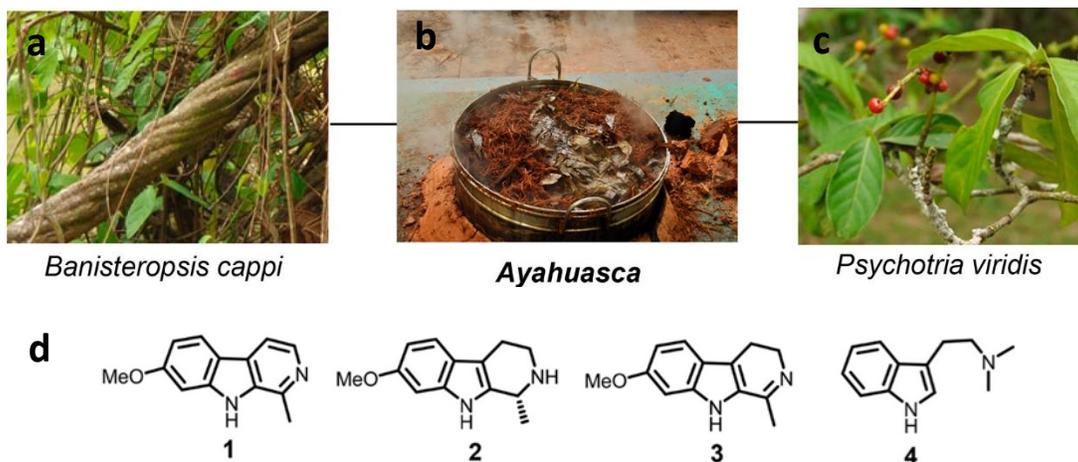


Figura 1. Ayahuasca (b) preparada a partir de *B. capii* (a) y *P. viridis* (c). Estructuras químicas de los principales componentes de la ayahuasca (d): HAR **1**, THH **2**, HML **3**, DMT **4**. Imágenes extraídas de ACS Omega 2022, 7, 14, 12307-12317.

A pesar de que los mecanismos moleculares que median los efectos terapéuticos mencionados de la ayahuasca no se conocen con claridad aún, se han relacionado a su capacidad de actuar sobre fenómenos relativos a la neuroplasticidad (Cameron & Olson, 2018) y neuroprotección evidenciados en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. En lo que refiere a su actividad neuroprotectora, ésta aún se encuentra poco explorada, pero se ha visto que tiene la capacidad de incrementar los niveles circundantes del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en humanos (de Almeida et al., 2019) y su expresión en el hipocampo de ratas (Colaço et al., 2020), efecto que se ha atribuido a la β -carbolina harmina presente en el brebaje (Fortunato et al., 2009, 2010). Por su parte, las β -carbolinas harmalina y harmalol han mostrado un efecto neuroprotector contra estrés oxidativo (EO) generado por la neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) en la línea celular PC12 (Lee et al., 2000), y la ayahuasca, la harmina y extractos separados de *B. capii* y *P. viridis* protegen las células de la línea SH-SY5Y contra el daño por EO generado por la 6-OHDA (Katchborian-Neto et al., 2020). Ambas líneas celulares son muy

utilizadas como modelos *in vitro* de neurodegeneración (Malagelada & Greene, 2008; Xicoy et al., 2017). La línea celular PC12 se utiliza como modelo de neurona catecolaminérgica mientras que las SH-SY5Y como modelo de neuronas dopaminérgicas. Recientemente se reportó la actividad neurogénica de la DMT *in vitro* e *in vivo* (Morales-García et al., 2020), actividad dependiente del receptor sigma 1 (σ 1-R), del cual la DMT es el único ligando endógeno conocido (Fontanilla et al., 2008).

Esta acumulación de datos en las últimas 2 décadas sobre diferentes propiedades de la ayahuasca y sus componentes es de suma relevancia en relación a las enfermedades neurodegenerativas. Estas patologías se caracterizan por el daño y pérdida progresiva de células neuronales, llevando a funciones cognitivas y motoras comprometidas. Dentro de estas enfermedades encontramos a la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras (Liu et al., 2017). A pesar de que el desarrollo de estas patologías afecta regiones distintas del cerebro y tienen etiologías diferentes, se han observado similitudes en los procesos moleculares y celulares que conducen a la neurodegeneración. Una de las características que se ha observado que comparten todas ellas es el EO resultante de un aumento en los niveles de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) (Teleanu et al., 2022). Las ROS son moléculas químicamente reactivas generadas naturalmente en las células, principalmente por la mitocondria como un subproducto de la respiración celular, y juegan un rol importante en mediar actividades celulares como la inflamación, la supervivencia celular y respuestas al estrés, entre otros. En condiciones normales, sus niveles intracelulares son mantenidos bajos mediante sistemas antioxidantes (Liu et al., 2017; Teleanu et al., 2022), sin embargo, cuando existe una disfunción mitocondrial, estrés de retículo o neuroinflamación, el balance redox de la célula se tiende a romper y se acumulan ROS o radicales libres. Este aumento lleva al deterioro oxidativo de varias moléculas involucradas en diferentes procesos regulativos, causando EO, que se define como una ruptura en el balance de los niveles entre pro-oxidantes y antioxidantes (Liu et al., 2017; Teleanu et al., 2022). El EO afecta el funcionamiento celular y eventualmente puede llevar a su muerte.

A pesar de que las ROS no parecen ser un factor desencadenante de las enfermedades neurodegenerativas, es muy probable que sí exacerben la progresión de las mismas mediante el daño oxidativo, promoviendo alteraciones mitocondriales y la acumulación de proteínas mal plegadas. La acumulación de proteínas mal plegadas lleva a su vez a una respuesta inflamatoria en el cerebro que exacerba la generación de ROS y consecuentemente de EO (Liu et al., 2017). Por lo tanto, debido a que las neuronas son particularmente sensibles al EO por sus bajos niveles de antioxidantes y alto metabolismo (Chen☆ et al., 2012), este jugaría un rol clave en la patogénesis de estas enfermedades.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, la ayahuasca y/o sus componentes podrían ser una estrategia efectiva para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, por lo que resulta sumamente relevante profundizar en las capacidades antioxidantes y neuroprotectoras de la ayahuasca y sus componentes individuales.

Es así que el objetivo general de este trabajo es caracterizar la actividad antioxidante y neuroprotectora de la farmahuasca (preparado sintético que emula la composición de la Ayahuasca) y sus componentes mayoritarios. Para llevar a cabo esto, en una primera etapa se

evaluó la capacidad de la farmahuasca (FH), DMT, HAR, HML y THH de atrapar el radical catiónico ABTS como indicativo de su efecto antioxidante directo. Luego, en una segunda etapa, se evaluó la capacidad neuroprotectora de estos compuestos contra peróxido de hidrogeno y rotenona en cultivos de células PC12 diferenciadas. En todos los casos, se evaluó previamente la toxicidad de estos tratamientos en esta misma línea celular.

Materiales y métodos

Dado que tanto la DMT como la Ayahuasca son sustancias controladas en nuestro país, es relevante aclarar que se cuenta con las habilitaciones correspondientes para el trabajo con DMT y, por no contar con la habilitación para trabajar con Ayahuasca, se utilizó FH para realizar este trabajo.

1. Farmahuasca y componentes principales

La HAR y HML utilizadas para las preparaciones son comerciales (Sigma-Aldrich), la DMT y THH fueron sintetizados en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química, UdelaR, con el cual tenemos una colaboración activa. La FH utilizada fue preparada en nuestro laboratorio. Los compuestos individuales en forma de sales fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar las soluciones stock 10mM. La THH y HAR se usaron como clorhidratos y la DMT como sal de fumarato en una relación 2:1.

Para la preparación de la FH, se pesó la cantidad de mg de cada componente que corresponde a su proporción en la ayahuasca para una concentración final de DMT de 10mM (la concentración de cada componente se ajusta según las relaciones de la Tabla 1 y provienen del trabajo realizado por el grupo del Dr. Carrera en la Facultad de Química (Rodríguez et al., 2022)) y se disolvió en DMSO. Para la HAR, como se encuentra en muy baja proporción, se preparó una solución 10mM y se agregó el volumen que correspondía a la proporción presente en la ayahuasca.

Alcaloide	mg/g de Ayahuasca	Porcentaje (%)
DMT	1.195	12.3
Harina	5.845	59.5
Tetrahidroharmina	2.595	26.8
Harmalina	0.142	1.5

Tabla 1. Alcaloides mayoritarios de la ayahuasca y su proporción por mg de ayahuasca y relativa.

2. Actividad antioxidante

El primer ensayo que se realizó fue el ensayo de ABTS (ABTS: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato atacando). Este ensayo se utiliza ampliamente para evaluar la capacidad antioxidante de productos naturales como frutas, verduras, plantas medicinales, aceites, entre otros, debido a su aplicabilidad en fases acuosas y lipídicas. Es una técnica que se basa en la decoloración del catión radical ABTS+, el cual se produce por la oxidación de ABTS con persulfato de amonio durante 24 horas (Moon & Shibamoto, 2009). Este ABTS+ tiene una absorción de cromóforo azul-verde con un máximo de absorción a una longitud de onda de 734nm. Cuando a esta solución de ABTS+ se le agrega un agente antioxidante, el catión radical del ABTS inestable se reduce y pierde su color azul-verde característico (Re et al., 1999), evidenciado por una disminución de la absorbancia a 734nm y puede relacionarse con el poder antioxidante del compuesto en

evaluación. Se expresa como porcentaje (%) de inhibición del radical ABTS*+: cuanto mayor sea el % de inhibición, evidenciado por la pérdida de color del radical ABTS+, mayor capacidad antioxidante. Es decir, si el compuesto a evaluar tiene capacidad antioxidante, será capaz de captar este radical libre y reducirlo.

En este sentido, se probaron diferentes concentraciones de los componentes principales de la ayahuasca individualmente (DMT, HAR, HML y THH) y de la FH, en referencia a un blanco con el fin de determinar su capacidad antioxidante.

El rango de concentraciones utilizado fue de 1uM a 50uM para todos los componentes individuales. Para la FH se utilizó el mismo rango de concentraciones expresado como concentración de DMT.

3. Protocolo ensayo de ABTS

Para este ensayo primero se preparó la solución de ABTS*. Para esto, se realizó, por un lado, una solución de ABTS a partir de 19mg de ABTS en polvo y 5mL de H₂O mQ, y por otro lado se preparó una solución oxidante con 8mg persulfato de amonio, (NH₄)₂S₂O₈, y 250uL H₂O mQ. Para preparar finalmente la solución de ABTS*, a la solución de ABTS en H₂O se le agregaron 88uL de la solución de persulfato de amonio. Esto se agitó y se dejó reposar toda la noche en la oscuridad tapado con parafilm. Pasadas las 24hs y previo a utilizar esta solución, la misma fue filtrada y posteriormente diluida en PBS 5mM hasta lograr una absorbancia de 0.7 +/- 0.05 UA. Con esta solución de ABTS* se ensayaron los compuestos de interés. Para ello, se prepararon soluciones en DMSO de los compuestos tal que al diluirlos 100 veces (100x) con ABTS* (de absorbancia ajustada a 0.7±0.05) las concentraciones finales fueran: 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 50uM. Las soluciones en ABTS* se agitaron con vortex, se pasaron 200uL/pocillo a una placa multiwell de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 734nm en un lector de micro placas de fluorescencia (Varioskan Flash, Thermo Scientific). Se midieron 2 réplicas por cada solución y como control (inhibición de 0%) se utilizó una solución vehículo (DMSO) en ABTS*.

4. Cultivo celular PC12

Para evaluar la capacidad neuroprotectora de la FH y sus componentes principales, se utilizaron cultivos celulares diferenciados de la línea celular PC12. Esta línea celular deriva de un feocromocitoma de médula adrenal de rata y una característica que la hace muy aprovechable es su capacidad de responder al factor de crecimiento nervioso (NGF). Cuando se cultivan únicamente en medio RPMI con sueros, estas células tienen una morfología redonda y proliferan a una gran densidad celular. Sin embargo, cuando se les agrega NGF al medio, estas se diferencian: dejan de dividirse y adquieren varias características de neuronas maduras, como son la excitabilidad, la formación de neuritas y de redes neuronales (Teng et al., 2006). Esta línea celular es frecuentemente utilizada como modelo de neurona por su fácil uso y manejo, es éticamente conveniente ya que no se utilizan animales de experimentación y responden a toxinas usadas comúnmente en ensayos para evaluar neuroprotección y neurodegeneración como son las toxinas mitocondriales 6-hidroxidopamina o la rotenona. Adicionalmente, es una línea celular con la cual el grupo tiene amplia experiencia. Estas ventajas y considerando que estamos en etapas de screening, las convierten en un muy buen modelo a pesar de no representar un tejido neuronal *in vivo*.

PC12 naïve (PC12n)

a. Preparación del sustrato:

Las células PC12 son células adherentes y para su adhesión al sustrato (en nuestro caso: botellas de 25cm² y placas multiwell de 96 pocillos) requieren que placas y botellas se recubran previamente con colágeno. Para esto, se preparó una solución de colágeno con las siguientes proporciones por mL de solución: 860uL de H₂O estéril, 100uL de ácido acético 0.2% y 40uL de colágeno concentrado (preparado en el laboratorio y previamente evaluado para determinar su dilución adecuada para ser usado como sustrato para estas células). Las botellas se recubrieron con 2mL de esta solución y las placas con 80uL por pocillo. Se las incubó en estufa entre 2 y 48 horas, se lavaron con H₂O estéril y pueden utilizarse o almacenarse en heladera a 4°C por hasta un mes.

b. Mantenimiento de la línea (Fig. 2):

Las células desdiferenciadas (PC12 naïve) se cultivaron en RPMI (85%), suero de caballo (HS, 10%), suero bovino fetal (FBS, 5%) y antibiótico (penicilina/estreptomocina, p/s, 0.1%). En el día 1 se sembraron 1x10⁶ células en 7.5mL de medio en una botella de 25cm² previamente recubierta con colágeno y se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Al día 5 se las alimentó reemplazando la mitad del medio por medio de cultivo nuevo y termostatzado. En el día 7 se las repicó, repitiendo procedimiento de cultivo anterior (día 1, Fig.2).

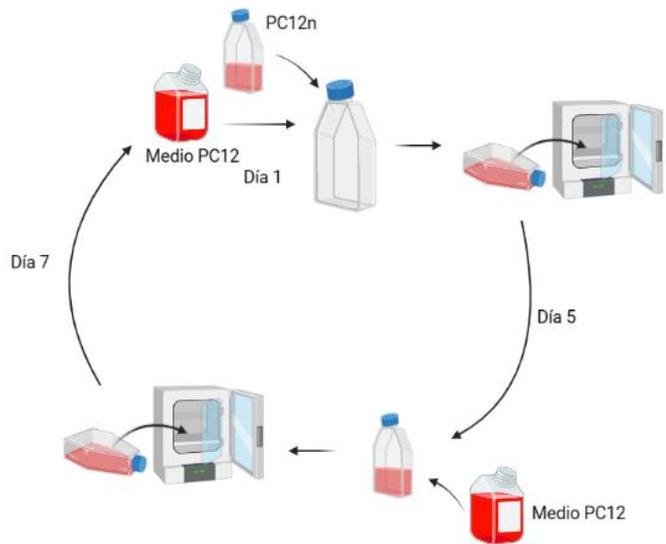


Figura 2. Esquema del mantenimiento de la línea celular PC12 desdiferenciada (PC12n).

PC12 diferenciadas (PC12dif) (Fig. 3)

Para diferenciar a las células PC12n, en el día 1 se sembraron 2x10⁶ células naïve en una botella de 25cm² previamente recubierta con colágeno y en un volumen total final de 5mL de RPMI sin suero, con 0.1% de p/s y 2uL de NGF por mL. Se les agregó igual volumen de NGF cada 48 horas (días 1, 3 y 5 del procedimiento). El día 5 se las dejó incubar por 72 horas en estufa a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se las sembró en placas de 96 pocillos, a una densidad de 25000 células y 80uL por pocillo, en RPMI sin suero, con 0.1% de p/s y 2uL/mL de NGF, para realizar los experimentos (Día 1, Fig. 4).

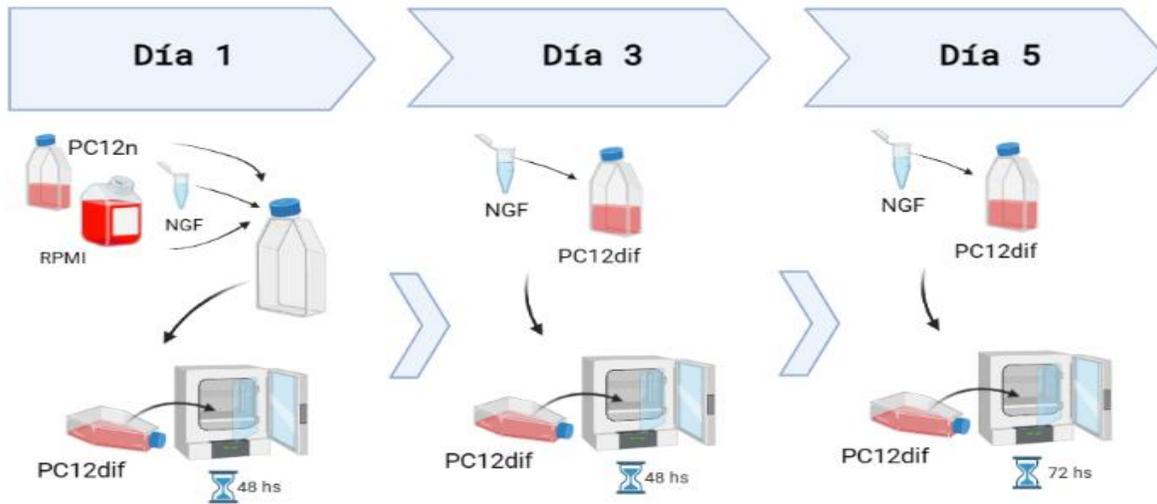


Figura 3. Esquema del protocolo de diferenciación de las células PC12n

5. Evaluación de la viabilidad/toxicidad

Cuando se desea evaluar neuroprotección por un compuesto determinado, es crucial comenzar por examinar la toxicidad de las drogas en cuestión, de manera de conocer el rango de concentraciones que no afectan, en este caso, a las células PC12 diferenciadas. Para esto se realizó el ensayo de viabilidad de MTT ((4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro de tetrazolio). Este método mide la actividad metabólica de las células e involucra la reducción del MTT (de color amarillo, soluble en agua) a formazán (de color púrpura, insoluble), por la acción de las reductasas mitocondriales (Kumar et al., 2018). Las células viables son capaces de reducir el MTT a formazán, mientras que las no viables no. El formazán se disuelve en DMSO y la viabilidad de las células se relaciona con la medida de absorbancia del formazán a 540nm. A mayor color violeta (mayor absorbancia a 540nm), mayor viabilidad celular, denotando una baja toxicidad de la droga hacia las células. Este método es extensamente utilizado gracias a su simplicidad y efectividad. Para esta investigación, se evaluaron diferentes concentraciones de FH, de su componente mayoritario, HAR, y su componente psicoactivo, DMT, en el rango 0.01 a 10uM.

Para testear la toxicidad de los compuestos en investigación se realizó un procedimiento de 5 días (Fig. 4A) en el cual el día 1 se sembraron las células PC12dif en placas de 96 pocillos, previamente recubiertas con colágeno y en el día 3 se trataron con los compuestos. Se realizaron diferentes soluciones a partir de las soluciones stock 10mM en DMSO de forma tal que la concentración final una vez que se agregaran a la placa fueran las deseadas. En nuestro caso, las concentraciones finales fueron en un rango de 0.05uM a 20uM para la HAR, 0.01uM a 5uM para la FH y 0.01uM a 10uM para la DMT. Se hicieron réplicas de 4 pocillos para cada concentración por compuesto. Además, se agregaron pocillos control en los que las células recibieron únicamente RPMI y vehículo. Esta placa se incubó por 48hs en estufa con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al quinto día se realizó el ensayo de MTT según el procedimiento descrito en el punto 6.

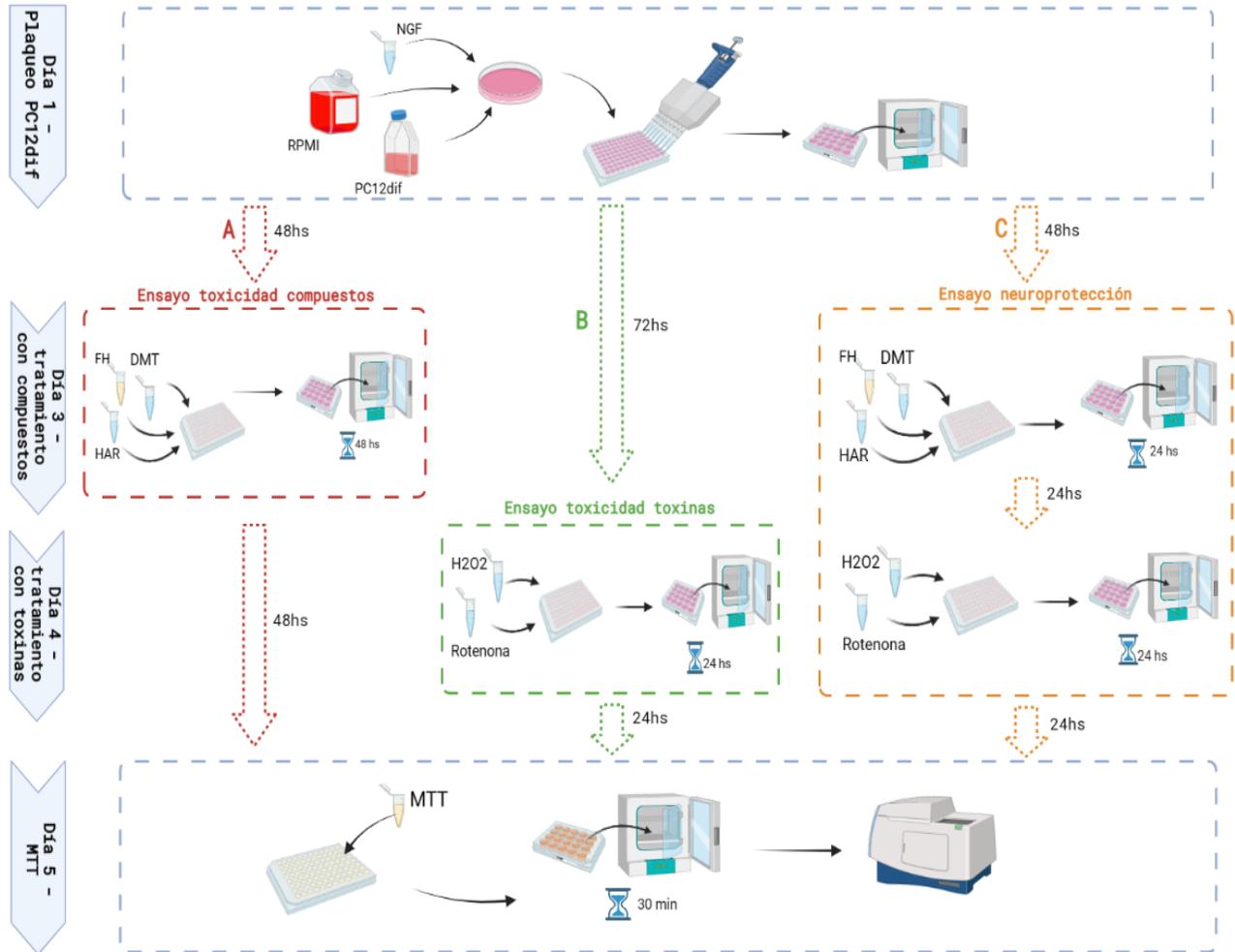


Figura 4. Esquema del protocolo de toxicidad y neuroprotección en células PC12dif.

- A. Protocolo ensayo de toxicidad de los compuestos (DMT, HAR y FH)
- B. Protocolo ensayo de toxicidad de las toxinas (Rotenona y H₂O₂)
- C. Protocolo ensayo de neuroprotección

Días 1 y 5 común a todos los protocolos.

6. Protocolo ensayo de MTT:

Se agregaron 10uL/pocillo de una solución 20mg/mL de MTT (menos a los pocillos utilizados como blanco) y se dejó incubar en estufa por 30 minutos. Pasado este tiempo, se descartó el medio de cultivo y se agregaron 100uL/pocillo de DMSO. Se homogeneizó mediante agitación suave unos minutos y se midió la absorbancia a 540nm en un lector de micro placas de fluorescencia (Varioskan Flash, Thermo Scientific).

7. Actividad neuroprotectora en PC12dif

A partir de los resultados del ensayo de toxicidad se determinaron las concentraciones a utilizar en los ensayos de neuroprotección. Para estos ensayos, se utilizaron peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y rotenona como toxinas, ambas muy usadas como modelos de neurodegeneración *in*

vitro (Echeverry et al., 2015a, 2021; Giordano et al., 2012; Martínez-Busi et al., 2019; Sherer et al., 2003). El esquema general del ensayo consistió en el uso del ensayo de MTT para comparar la viabilidad de células PC12 dif pre-tratadas con los compuestos de interés contra las que solo recibieron una u otra toxina y así determinar su potencial neuroprotector. En este sentido, fue importante definir previamente la concentración de cada toxina a utilizar, para cual se realizaron curvas de dosis, como se detalla a continuación.

8. Ensayos de toxicidad de rotenona y H₂O₂

Previo a realizar los ensayos de actividad neuroprotectora, se realizaron ensayos de toxicidad para determinar la concentración de las toxinas a utilizar, de forma que la toxina mate un porcentaje de células lo suficientemente elevado como para poder observar una diferencia de sobrevivencia con el control, pero no tanto como para que el daño provocado resulte irreversible. Se busca que la toxina mate entre 50% y 70% de las células.

La rotenona es un inhibidor sistémico del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que genera una deprivación de energía en la célula y causa EO (Cannon et al., 2009; Perucho et al., 2017). Por su parte, el peróxido de hidrógeno es un generador de EO generalizado: es un agente oxidante en sí mismo y, si bien no es un radical libre, cuando interacciona con diferentes metales dentro de la célula, puede ser convertido fácilmente a OH^{*}, uno de los radicales libres más tóxicos para la célula, generando un estado de estrés generalizado dentro de la célula (Chen☆ et al., 2012; Ransy et al., 2020; Sanders & Greenamyren, 2013).

Para el caso de la rotenona, se testearon dos concentraciones, 40 y 50 μM, ya que son las concentraciones usualmente utilizadas en nuestro laboratorio y se partió de una solución stock de concentración 100 mM. En el caso del H₂O₂, como su respuesta resulta más variable, realizamos una curva de toxicidad, donde las concentraciones fueron de 20 μM hasta 100 μM, y se partió de una solución stock con concentración 26 mM. Como estas son las concentraciones finales que deseamos una vez que se agregan las soluciones a la placa, realizamos soluciones 21 veces más concentradas.

El protocolo experimental utilizado es análogo al que se usó para evaluar la toxicidad de los compuestos con un único cambio: en vez de tratar las células con los compuestos en el día 3, se agrega 4 μL/pocillo de cada dilución de cada toxina en el día 4 y se deja incubar en estufa por 24 hs. Luego se realiza el ensayo de MTT como se describió previamente (Fig. 4B).

9. Ensayo de neuroprotección:

Para llevar a cabo los experimentos de neuroprotección contra peróxido de hidrógeno y rotenona se realizó un protocolo análogo al de toxicidad, pero con la adición del tratamiento con las toxinas en el día 4: pasadas las 24 hs de haber tratado a las células con los compuestos de interés a las concentraciones determinadas previamente, se las trató con rotenona o H₂O₂. A cada pocillo se le agregó 4 μL de la toxina, salvo a los pocillos de control. A las 24 horas, en el día 5 del protocolo, se realizó el ensayo de MTT como se explicó anteriormente (Fig. 4C).

10. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando el GraphPad Prism 5.0.

Para los ensayos de actividad antioxidante, los datos se graficaron como porcentaje de inhibición de ABTS (%inhABTS^{*}) en función de la concentración de cada compuesto (μM). Además, se

calculó la concentración efectiva 50 (EC50), que se define como la concentración a la cual se inhibe el 50% del radical ABTS, para cada compuesto.

Para los resultados de los ensayos de toxicidad (tanto de los compuestos como de las toxinas), estos fueron analizados en relación al vehículo, por lo que 1 corresponde al 100% de viabilidad y 0 al 0%. En el caso de los datos de neuroprotección, se analizaron de la misma manera, pero en relación al tratamiento con la toxina en cuestión, ya que se deseaba saber si había diferencia de supervivencia cuando eran pre-tratadas con los compuestos en comparación a cuando no. Los datos se analizaron mediante 1-way ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Dunnett. En todos los casos, los valores se expresan media \pm desvío estándar, y se consideró una diferencia como significativa (*) cuando $p \leq 0.05$.

Resultados

Actividad antioxidante

Como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, se ensayaron las concentraciones 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 μ M para cada compuesto. Los resultados obtenidos se muestran todos en conjunto en la Figura 5 e individualmente para cada compuesto en la Figura 6, como % de inhibición del radical ABTS* (%inhABTS*) vs. concentración. Se observó que la DMT, HML y THH tienen actividad antioxidante y son capaces de inhibir al radical ABTS* casi en su totalidad a 50 μ M (Fig. 6A, C y D). Por su parte, la HAR no mostró capacidad de atrapar al radical libre y reducirlo (Fig. 6B). Asimismo, la FH también mostró actividad antioxidante (Fig. 6E). Un resultado interesante es que el EC50 de la FH fue menor al de los componentes individuales (Fig. 6F), lo que nos llevó a cuestionarnos si habría una sinergia entre los compuestos que hiciera descender la EC50 (4.1 μ M para FH vs 15.4 μ M para DMT, 33.1 μ M para HML, 13 μ M para THH). En esta línea, preparamos una solución nueva conteniendo únicamente DMT y THH, los dos componentes mayoritarios de FH con actividad inhibitoria de ABTS* y una concentración final de 4.1 μ M de DMT y su correspondencia de THH, 8.9 μ M. Los resultados obtenidos mostraron que efectivamente, con esa concentración de DMT y THH, se alcanzaba el EC50 de la FH (Fig. 5, DMT+THH).

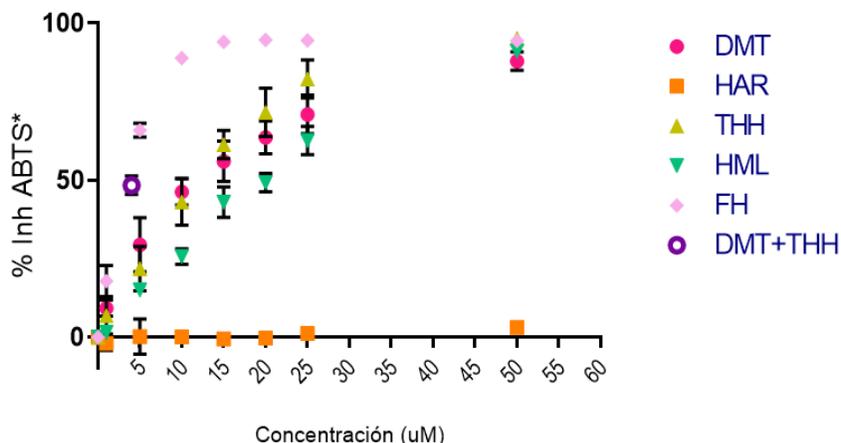


Figura 5. Gráfica de % de inhibición del radical ABTS* (%inhABTS*) vs. Concentración (uM) de todas las concentraciones testeadas para todos los compuestos individuales y la FH. N = 4

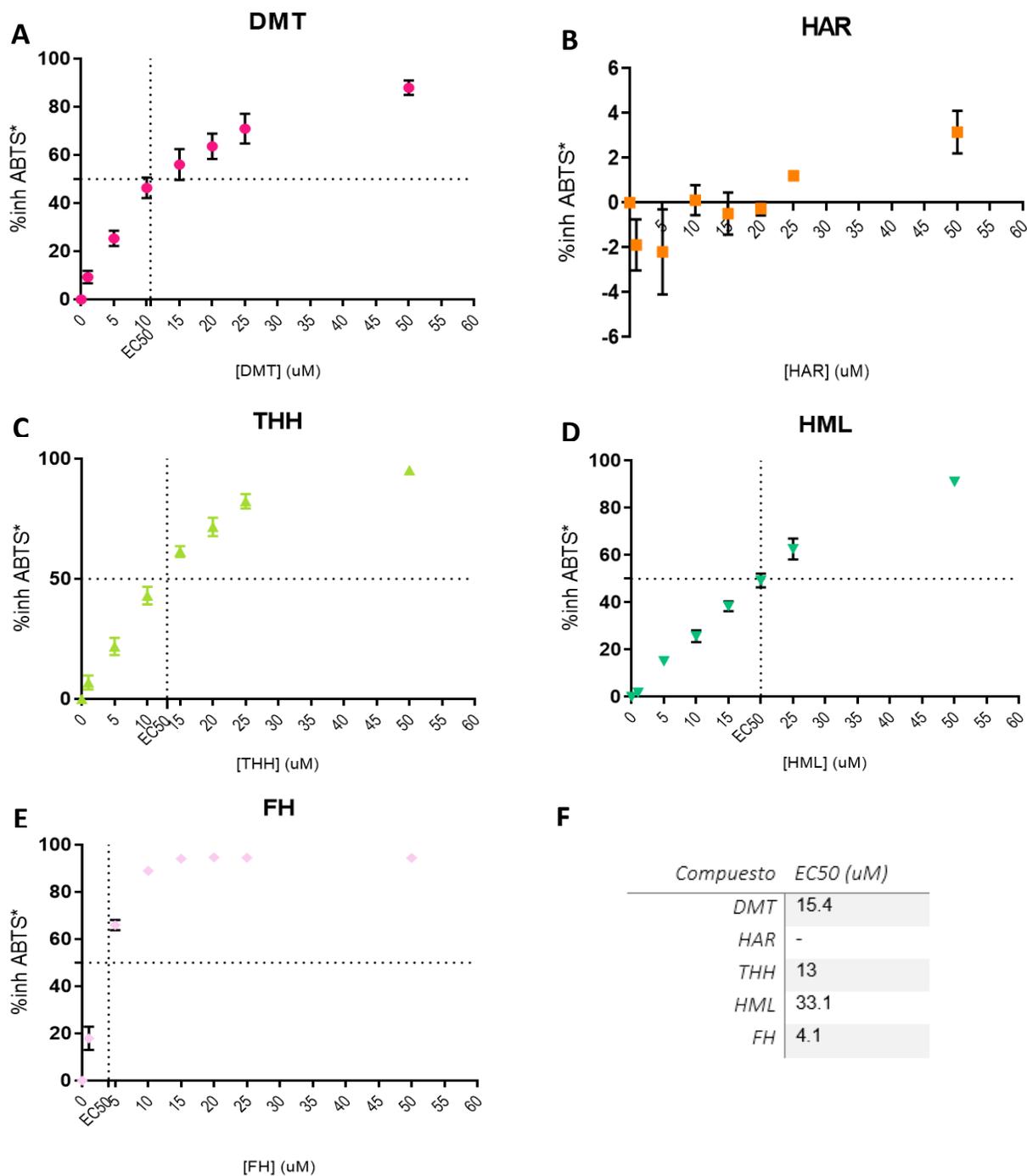


Figura 6. Graficas de % de inhibición del radical ABTS* (%inhABTS*) vs. Concentración (uM) para cada componente testado: DMT (A), HAR (B), THH (C), HML (D), FH (E). Las líneas punteadas marcan el EC50 para cada uno de ellos. (F) Tabla con los EC50 de los componentes mayoritarios y la FH. N = 4

Evaluación de la toxicidad de los compuestos y de las toxinas

Para la evaluación de la toxicidad de los compuestos se seleccionaron diferentes concentraciones de FH, por ser la solución que imita a la ayahuasca, y cinco concentraciones de HAR y DMT: la

primera por ser el componente mayoritario de la FH y el segundo por ser el componente psicoactivo de la misma.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7 como viabilidad celular vs tratamiento recibido. Como se puede ver, no hay disminución significativa de la viabilidad con respecto al vehículo para ninguna de las concentraciones de DMT ensayadas. Por su parte, la HAR mostró toxicidad únicamente a la concentración más alta ensayada, 20uM. Los resultados de toxicidad de la FH mostraron que solamente las concentraciones de 0.01uM y 0.1uM no son tóxicas, mientras que 0.5, 1 y 5uM mostraron una disminución significativa de la viabilidad (0.67 ± 0.19 , 0.81 ± 0.48 , 0.28 ± 0.21 respectivamente).

A partir de estos resultados seleccionamos las concentraciones de los compuestos a utilizar para los ensayos de neuroprotección. Para la DMT seleccionamos las concentraciones 1, 5 y 10uM mientras que para HAR y FH decidimos probar con 4 y 1uM respectivamente.

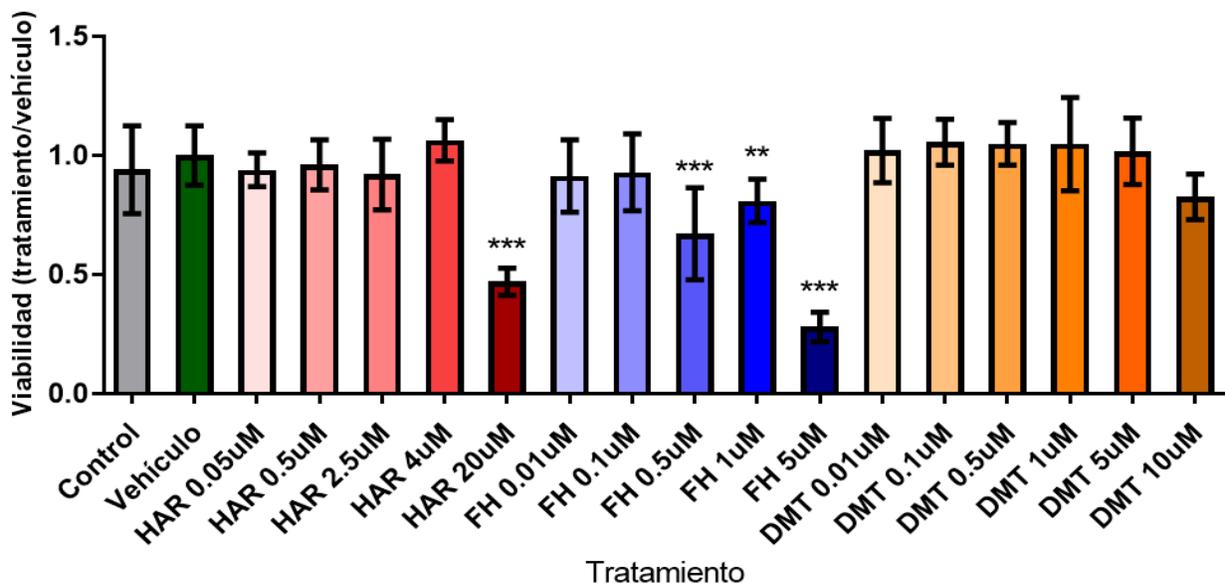


Figura 7. Ensayo de toxicidad de los compuestos. Grafica de viabilidad celular vs. Concentración de tratamiento recibido (uM). La viabilidad de las células está expresada de 0 a 1, siendo 0 0% de viabilidad y 1 100%. (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$, (****) $p \leq 0.0001$, con relación al vehículo. Barras de error corresponden al desvío estándar de la media. N = 3.

En la Figura 8 se pueden observar los resultados de los ensayos de toxicidad de la rotenona y del peróxido de hidrogeno. A partir de estos resultados, decidimos utilizar la concentración de 50nM para la rotenona ya que mataba un 56% de las células. Por otro lado, para el H_2O_2 decidimos utilizar dos concentraciones intermedias: 40uM, la cual deja una sobrevivencia del 50%, y 60uM que mata el 63% aproximadamente de las células. La concentración de 20uM no la utilizamos ya que la disminución de la viabilidad no es significativa, mientras que las concentraciones de 80 y 100uM eliminaban más del 80% de las células, por lo que sería difícil revertir el daño provocado.

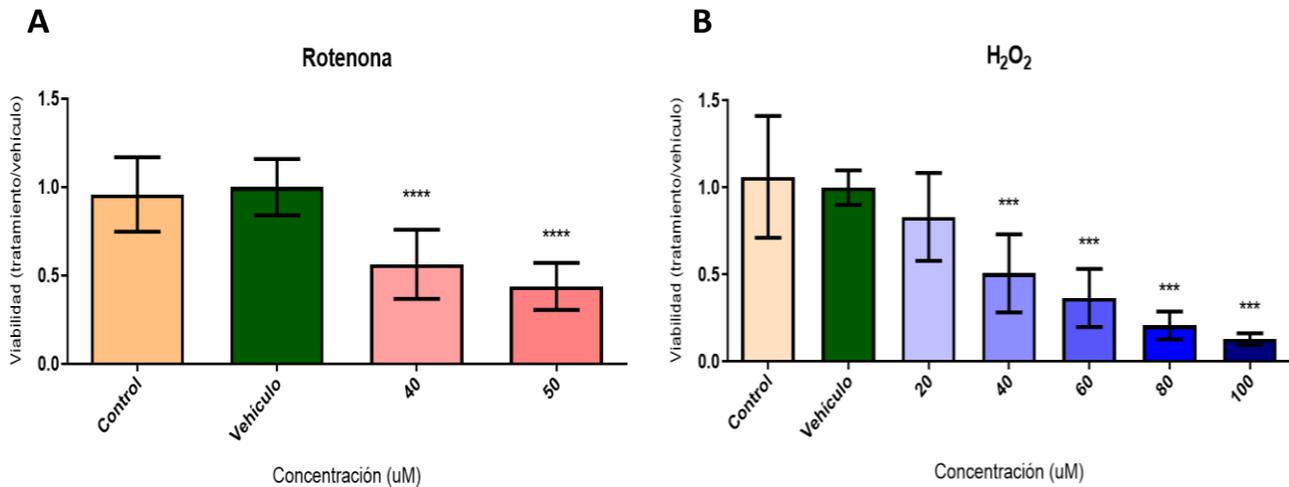


Figura 8. Ensayo de toxicidad de las toxinas Rotenona y H₂O₂. Grafica de viabilidad celular vs. Concentración de tratamiento recibido (uM). La viabilidad de las células esta expresada de 0 a 1, siendo 0 0% de viabilidad y 1 100%. (A) Ensayo de toxicidad rotenona. N = 5. (B) Curva de toxicidad H₂O₂. N = 3. (*) p≤0.05, (**) p≤0.01, (***) p≤0.001, (****) p≤0.0001, con relación al vehículo.

Neuroprotección contra Rotenona o peróxido de hidrogeno

Respecto a los resultados del estudio de neuroprotección contra rotenona 50nM (Rot50) ninguna de las concentraciones probadas mostró un aumento significativo de la viabilidad celular. Además, la FH 1uM disminuyó significativamente la viabilidad (Fig. 9A).

Por su parte, en los experimentos en los que se utilizó H₂O₂ 40uM o 60uM como toxina, los compuestos tampoco mostraron neuroprotección contra estos (Fig. 9B y C).

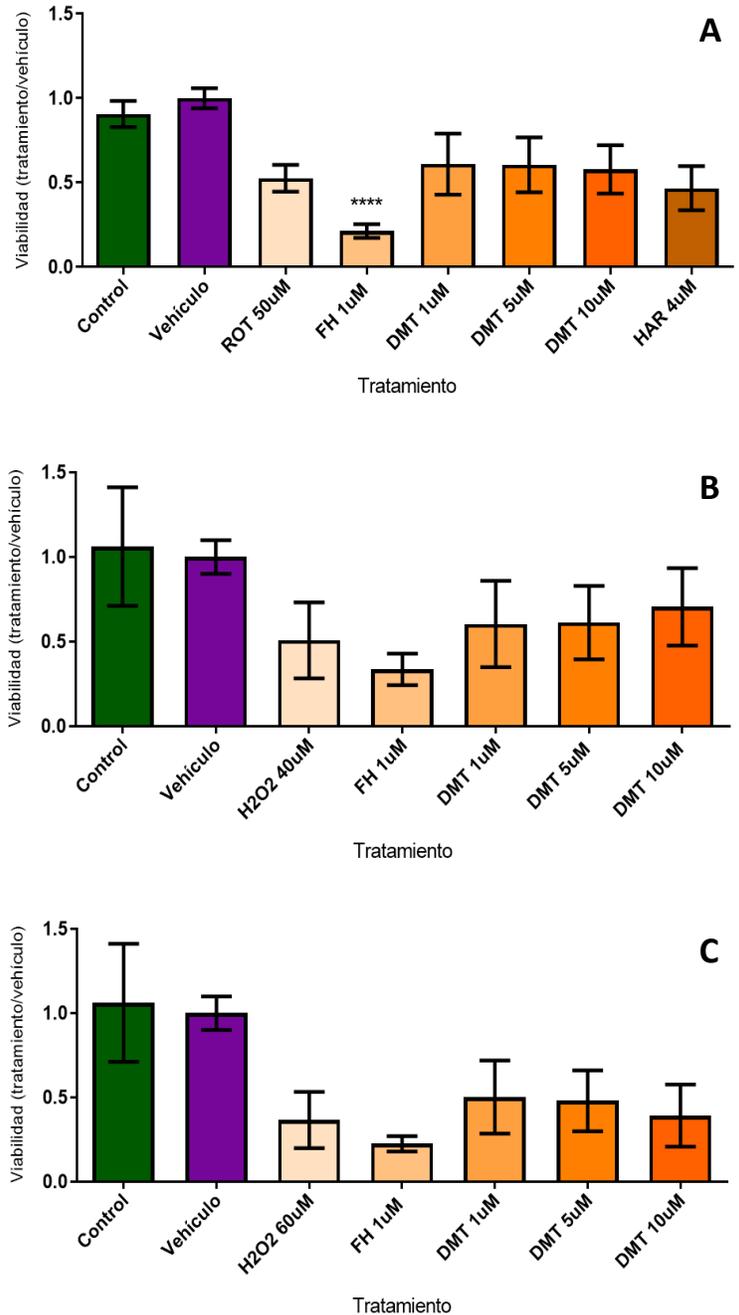
Discusión

Las enfermedades mentales, incluyendo las neurodegenerativas, son un gran problema para la salud pública y también una gran carga económica a nivel mundial. Por ejemplo, la EP afecta a 450 personas de cada 100.000 habitantes aproximadamente en diferentes países europeos. Su tratamiento con L-DOPA es caro, trae efectos secundarios luego de algunos años de uso y la terapia es únicamente sintomática, por lo que este tratamiento hoy en día es incapaz de frenar la neurodegeneración o prevenir la progresión natural de la enfermedad. Por lo tanto, identificar nuevas estrategias terapéuticas es de interés para el sistema de salud pública, especialmente para las patologías mentales para las cuales no hay, al día de hoy, tratamientos eficaces.

En los últimos 30 años ha surgido un renovado interés en la aplicación de compuestos psicodélicos naturales en el área de la psiquiatría y esto ha traído una gran cantidad de trabajos sobre la acción farmacológica y terapéutica de estas moléculas. Una de las razones del interés en el uso de psicodélicos es su seguridad (Brito-da-costa et al., 2020; Nichols, 2004, 2016). Sin embargo, actualmente, el volumen de trabajos científicos sobre ayahuasca para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se podría considerar bajo, tanto a nivel clínico como preclínico. Además, también es baja la cantidad de trabajos que se enfoquen en psicodélicos naturales utilizando todo el producto y no únicamente sus componentes individuales aislados. Una ventaja de la ayahuasca es la cantidad de compuestos bioactivos que contiene, ya que esto señala hacia un mecanismo combinado de varios blancos, lo que se conoce como terapia

polifarmacológica (Frecska et al., 2016), por lo que es de suma relevancia la investigación llevada a cabo. El enfoque del trabajo en caracterizar los principales componentes de la ayahuasca y su combinación como agentes antioxidantes y neuroprotectores es de interés ya que estas actividades permitirían postularlos como potenciales agentes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EP o Alzheimer.

Los resultados obtenidos durante esta investigación aportan nueva información acerca de la ayahuasca y sus componentes principales. Por un lado, los resultados del ensayo de actividad antioxidante mostraron que tanto la DMT como la HML, THH y FH tienen capacidad antioxidante mientras que la HAR no. Además, observamos como el EC50 de la FH era menor en comparación al de los compuestos individuales y como se alcanzaba este EC50 cuando generamos una nueva solución que contenía únicamente 4.1uM de DMT y 8.9uM de THH (valores que se corresponden a las concentraciones presentes en la EC50 de la FH). La estructura química de estos cuatro compuestos principales individuales podría explicar en parte estos resultados. El ensayo utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de las soluciones es puramente químico por lo que las diferentes actividades antioxidantes frente al ABTS* corresponden a la capacidad de cada compuesto de reaccionar químicamente con el radical libre, y en esto entra en juego la estructura química de los mismos. En este sentido, nuestros resultados coinciden con que la DMT, THH y HML permiten reaccionar químicamente con un radical libre ya que son oxidables, mientras que no lo hace la HAR debido a su aromaticidad y estabilidad, y por lo tanto poco reactiva frente al radical ABTS. Estos resultados coinciden también con investigaciones anteriores donde se reporta que en alguna medida, todas las β -carbolinas



tienen actividad antioxidante pero que su eficacia depende de sus estructuras químicas y del ensayo, es decir el radical libre, que se utilice para evaluarla (Lee et al., 2000; Moura et al., 2007; Senhaji et al., 2022).

Uno de los resultados obtenidos que cabe destacar es la actividad antioxidante de la DMT. Este dato es de relevancia por dos motivos. Por un lado, porque, hasta el momento, la cantidad de trabajos científicos que se enfoquen en esta propiedad de la DMT son escasos. Por otro lado, sabiendo que el EO es causado por ROS, por un desbalance en el que un exceso de radicales pro-oxidantes daña a las células, es más que interesante ver que la DMT tiene la capacidad de “atrapar” a esos radicales libres. En este sentido, estos resultados son novedosos y de interés en la temática.

Siguiendo en esta línea, los resultados de la actividad antioxidante vista en la FH y especialmente en la solución generada únicamente por DMT y THH, resultan interesantes. Estos datos muestran como la combinación de las β -carbolinas junto con la DMT (la FH) tiene mayor capacidad antioxidante en comparación a la capacidad antioxidante de cada compuesto individual. En este sentido, el EC50 de la FH resultó ser menor que el EC50 de los compuestos individuales. Este EC50 obtenido para la FH resulta sumamente interesante ya que si se lo compara con antioxidantes de referencia, como es la quercetina que tiene un EC50 de 4.4 μ M (Echeverry et al., 2015b), nuestros datos muestran la buena actividad antioxidante que tiene la FH.

Con el objetivo de tratar de entender estos resultados, fue que generamos una solución que contenía únicamente DMT y THH, compuestos con los EC50 más bajos individualmente, en concentraciones equivalentes a las halladas en la concentración de la solución de FH que alcanza el EC50 (4.1 μ M). Los resultados del ensayo de ABTS* para esta solución mostraron que efectivamente a esas concentraciones de DMT y THH se alcanzaba el EC50 de la FH, por lo que sugeriría que la combinación de estos dos compuestos, por un lado, son los responsables del EC50 de la FH, y, por otro lado, generaría una posible sinergia que aumentaría la capacidad de la FH de atrapar radicales libres en comparación a los compuestos individuales.

Estos resultados aportan a seguir entendiendo los mecanismos de acción de la ayahuasca. Al día de hoy, en la literatura no se encuentran reportes de actividad antioxidante de la DMT y lo que se encuentra reportado para la Ayahuasca, se lo atribuyen a las β -carbolinas presentes en la bebida, sin darle relevancia a la DMT en esta actividad (Trevisani et al., 2021). A esta última se le atribuye propiedades relacionadas al EO pero debido a su interacción con diferentes receptores (Frecka et al., 2016), no por su capacidad de atrapar radicales libres. Por lo tanto, la obtención de estos datos en esta investigación respecto a la capacidad antioxidante de la DMT y su importancia en la ayahuasca aportan información novedosa. Estos resultados alientan a seguir investigando esta propiedad de la DMT, preguntándonos si esta capacidad produciría algún efecto en el estrés oxidativo celular y también cuestionarse el mecanismo de acción del compuesto.

Con respecto a lo obtenido sobre la toxicidad de los compuestos, estos también son alentadores y coinciden con investigaciones pasadas de otros grupos (Katchborian-Neto et al., 2020; Simão et al., 2020) donde a concentraciones similares tampoco se encontró toxicidad para la DMT y únicamente se reportó para las concentraciones más altas de HAR.

Uno de los resultados que llama la atención es la toxicidad por parte de la FH 0.5 y 1 μ M ya que, a estas concentraciones, las cantidades de HAR y DMT no son tóxicas cuando se ensayan

individualmente (corresponden a las concentraciones 2.5 y 5uM de HAR y 0.5 y 1uM de DMT, respectivamente), por lo que nuevamente nos estaría dando la pauta de una posible sinergia entre los compuestos que hiciera que la FH sea toxica para las células. En el caso de FH 5uM, su toxicidad es más esperable ya que contiene 25uM de HAR y ya a 20uM de la misma observamos toxicidad. En la misma línea, otro resultado a tener en cuenta es la EC50 de FH en el ensayo de ABTS, 4uM, ya que a esta concentración es esperable que sea tóxica en nuestro modelo, ya que su concentración de HAR, 20uM, es toxica.

Por último, los resultados de los ensayos de neuroprotección no fueron los que esperábamos luego de los buenos resultados de actividad antioxidante obtenidos. A pesar de no haber observado neuroprotección por parte de DMT, HAR y FH, los resultados aportan valiosa información en la temática.

La concentración de los compuestos a utilizar se basó en la toxicidad de los compuestos individuales por si solos. Por esta razón, siendo la HAR el componente mayoritario en la bebida, seleccionamos la concentración más alta testeada en el ensayo de toxicidad que no fuera tóxica, 4uM, y su correspondiente concentración de DMT y FH, 1uM en ambos casos. Además, se seleccionaron las concentraciones de 5 y 10uM para la DMT para evaluar su capacidad neuroprotectora individualmente.

Más allá de los resultados obtenidos, el hecho de haber utilizado dos modelos de toxinas diferentes para testear la protección neuronal por parte de estos compuestos aporta novedosa información en el tema. En este sentido, el no haber obtenido resultados positivos de neuroprotección para ninguno de los dos modelos en las concentraciones testeadas, podría estar indicando sobre el mecanismo de acción por parte de los compuestos ya que en la línea celular PC12 hay reportes de protección pero utilizando dopamina como toxina (Lee et al., 2000). Por lo tanto, podríamos hipotetizar que estos compuestos podrían tener acción neuroprotectora, pero frente a determinado tipo de generadores de EO o ROS, ya que las 3 toxinas, H₂O₂, rotenona y dopamina, tienen mecanismos diferentes de generar ROS intracelular, y por lo tanto EO. Además, se ha reportado previamente que la actividad antioxidante de los compuestos es necesaria pero no suficiente por si sola para generar neuroprotección en modelos celulares (Echeverry et al., 2015a), y tampoco hay que dejar de lado el hecho de que durante esta investigación se testeó únicamente en una línea celular.

Conclusiones

Resumiendo, en el presente trabajo se demostró, mediante el ensayo de ABTS, que la DMT, HML, THH y FH presentan actividad antioxidante mientras que la HAR no. Asimismo, que la actividad antioxidante de la FH es mayor comparada a los compuestos individuales, evidenciado en el EC50. Además, se evaluó la toxicidad de la HAR y la DMT junto con la FH, así como su posible potencial neuroprotector en células PC12 dif. Los resultados sobre la citotoxicidad arrojaron que la DMT no es tóxica en las concentraciones testeadas mientras que la HAR lo es únicamente para la concentración de 20uM. La FH por su parte resulta tóxica a partir de la concentración 0.5uM, resultados que no eran de esperar ya que la cantidad de DMT y HAR presente en las concentraciones 0.5 y 1uM de FH no resultan tóxicas cada una por separado. Finalmente, los ensayos de neuroprotección no mostraron que alguna de las concentraciones testeadas de FH, HAR o DMT tuvieran la capacidad de proteger contra la rotenona o H₂O₂.

Más allá de si los resultados eran los esperados o no, creo que el objetivo del trabajo de caracterizar la actividad antioxidante y neuroprotectora de la FH y sus alcaloides principales se cumplió, ya que estos resultados aportan información acerca de la actividad de estos compuestos en células PC12, modelo muy utilizado para el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Además, el uso de dos toxinas diferentes (ambas altamente utilizadas como modelos de neurodegeneración), que tienen mecanismos de inducción de muerte celular diferentes, aporta sobre el posible mecanismo de acción que tienen tanto los compuestos individuales como la FH.

Perspectivas

De los resultados obtenidos en nuestras investigaciones y de los reportados en la literatura, surge la necesidad de seguir investigando acerca de las capacidades antioxidantes y neuroprotectoras de la Ayahuasca y sus alcaloides principales aislados, principalmente por el hecho de la cantidad de materiales bioactivos que contiene la bebida. Es por esto que creo importante seguir investigando no solo en los componentes individuales aislados sino también en la utilización de todo el producto.

En este sentido, respecto a la capacidad antioxidante y la toxicidad de la FH, sería interesante investigar la sinergia de los compuestos individuales que están presentes en la ayahuasca. Una forma de realizar esto podría ser mediante ensayos en donde se testeé la toxicidad de los compuestos combinados de a dos, respetando las concentraciones presentes en la FH, y así poder determinar: por un lado, si existe sinergia entre los compuestos, y, por otro lado, si tal sinergia existe, entre qué compuestos y cómo afecta a las células. Además, sería recomendable testear una concentración más baja de FH ya que la testeada durante esta investigación resultó tóxica. Nuestros resultados de toxicidad podrían relacionarse con los resultados de actividad antioxidante de la FH evidenciándose la posible sinergia entre los compuestos: mientras que esta sinergia aumentaría la actividad antioxidante de la FH en relación a los compuestos individuales, al mismo tiempo aumentaría la toxicidad de la misma, siendo más tóxica a concentraciones a las cuales los compuestos individuales no lo son. Por lo tanto, tal vez a concentraciones aún menores de FH se observe neuroprotección.

Respecto a la capacidad neuroprotectora, y en relación a la acción antioxidante caracterizada, se podría seguir investigando este punto mediante el ensayo de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para observar el atrapamiento de ROS intracelular por parte de los compuestos. Y finalmente, un cuarto ensayo que resultaría de interés es el analizar la cantidad de compuesto dentro de la célula cuando son tratadas con las toxinas, para determinar si hay presencia intracelular de ellos o no. Para esto se podría marcar a los compuestos con un isótopo radiactivo y luego revelar su presencia a diferentes tiempos de cultivo (Alberts et al., 2002). Asimismo, sería relevante la evaluación de la capacidad neuroprotectora de ayahuasca y sus componentes en neuronas primarias, ya que, el no haber observado neuroprotección en células PC12 en nuestros estudios, no implica que estos compuestos puedan ser neuroprotectores para otros linajes neuronales.

Existe una necesidad de aumentar el volumen de investigaciones con el fin de poder esclarecer con más seguridad cuales son los mecanismos que utilizan estos compuestos, su actividad biológica, cual es la interacción entre ellos y con la maquinaria celular, y así poder entender mejor

su posible potencial como agentes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como son el EP o Alzheimer.

Bibliografía

- Aday, J. S., Bloesch, E. K., & Davoli, C. C. (2020). Can Psychedelic Drugs Attenuate Age-Related Changes in Cognition and Affect? *Journal of Cognitive Enhancement*, 4(2), 219–227. <https://doi.org/10.1007/s41465-019-00151-6>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Visualizing Molecules in Living Cells. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. (Vol. 1777, pp. 1–9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26893/>
- Apud, I. (2021). Ayahuasca as an Addiction Treatment in Catalonia: Cognitive and Cultural Perspectives. *Ayahuasca Healing and Science*, 153–170. https://doi.org/10.1007/978-3-030-55688-4_9
- Apud Peláez, I. E. (2020). Personality Traits in Former Spanish Substance Users Recovered with Ayahuasca. *Journal of Psychoactive Drugs*, 52(3), 264–272. <https://doi.org/10.1080/02791072.2020.1752960>
- Barbosa, P. C. R., Tófoli, L. F., Bogenschutz, M. P., Hoy, R., Berro, L. F., Marinho, E. A. V., Areco, K. N., & Winkelman, M. J. (2018). Assessment of alcohol and tobacco use disorders among religious users of ayahuasca. *Frontiers in Psychiatry*, 9(APR), 136. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2018.00136/BIBTEX>
- Belouin, S. J., & Henningfield, J. E. (2018). Psychedelics: Where we are now, why we got here, what we must do. *Neuropharmacology*, 142, 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.018>
- Bouso, C., Arau, W. S., Barbosa, R., Miguel, A., Ce, P., & Riba, J. (2012). *Personality , Psychopathology , Life Attitudes and Neuropsychological Performance among Ritual Users of Ayahuasca : A Longitudinal Study*. 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042421>
- Brito-da-costa, A. M., Dias-da-silva, D., Gomes, N. G. M., Dinis-oliveira, R. J., & Madureira-carvalho, Á. (2020). Toxicokinetics and toxicodynamics of ayahuasca alkaloids N,N-dimethyltryptamine (DMT), harmine, harmaline and tetrahydroharmine: Clinical and forensic impact. In *Pharmaceuticals* (Vol. 13, Issue 11, pp. 1–39). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph13110334>
- Cameron, L. P., Benson, C. J., Dunlap, L. E., & Olson, D. E. (2018). Effects of N, N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(7), 1582–1590. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00134>
- Cameron, L. P., & Olson, D. E. (2018). Dark Classics in Chemical Neuroscience: N, N-Dimethyltryptamine (DMT). In *ACS Chemical Neuroscience* (Vol. 9, Issue 10, pp. 2344–2357). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00101>

- Cannon, J. R., Tapias, V., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E., & Greenamyre, J. T. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *34*(2), 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.01.016>
- Carhart-Harris, R. L., & Goodwin, G. M. (2017). The Therapeutic Potential of Psychedelic Drugs: Past, Present, and Future. *Neuropsychopharmacology*, *42*(11), 2105–2113. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.84>
- Chen☆ X., Kong, J. M., Xp, C., Cy, G., Kong, J. M., Chen, X., & Guo, C. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*, *7*(5), 376–385. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374>
- Colaço, C. S., Alves, S. S., Nolli, L. M., Pinheiro, W. O., de Oliveira, D. G. R., Santos, B. W. L., Pic-Taylor, A., Mortari, M. R., & Caldas, E. D. (2020). Toxicity of ayahuasca after 28 days daily exposure and effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in brain of Wistar rats. *Metabolic Brain Disease*, *35*(5), 739–751. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00547-w>
- de Almeida, R. N., Galvão, A. C. de M., da Silva, F. S., Silva, E. A. dos S., Palhano-Fontes, F., Maia-de-Oliveira, J. P., de Araújo, D. B., Lobão-Soares, B., & Galvão-Coelho, N. L. (2019). Modulation of serum brain-derived neurotrophic factor by a single dose of ayahuasca: Observation from a randomized controlled trial. *Frontiers in Psychology*, *10*(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.01234>
- de Osório, F. L., Sanches, R. F., Macedo, L. R., dos Santos, R. G., Maia-De-Oliveira, J. P., Wichert-Ana, L., de Araujo, D. B., Riba, J., Crippa, J. A., & Hallak, J. E. (2015). Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: A preliminary report. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *37*(1), 13–20. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2014-1496>
- Domínguez-Clavé, E., Soler, J., Elices, M., Franquesa, A., Álvarez, E., & Pascual, J. C. (2022). Ayahuasca may help to improve self-compassion and self-criticism capacities. *Human Psychopharmacology*, *37*(1). <https://doi.org/10.1002/HUP.2807>
- Domínguez-Clavé, E., Soler, J., Elices, M., Pascual, J. C., Álvarez, E., de la Fuente Revenga, M., Friedlander, P., Feilding, A., & Riba, J. (2016). Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 126, pp. 89–101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.002>
- dos Santos, R. G., Bouso, J. C., & Hallak, J. E. C. (2017). Ayahuasca, dimethyltryptamine, and psychosis: a systematic review of human studies. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, *7*(4), 141–157. <https://doi.org/10.1177/2045125316689030>
- dos Santos, R. G., & Hallak, J. E. C. (2021). Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. In *Epilepsy and Behavior* (Vol. 121). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.04.053>
- Echeverry, C., Arredondo, F., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J. A., Midiwo, J., & Dajas, F. (2015a). Antioxidant Activity, Cellular Bioavailability, and Iron and Calcium Management of Neuroprotective and Nonneuroprotective Flavones. *Neurotoxicity Research*, *27*(1), 31–42.

<https://doi.org/10.1007/s12640-014-9483-y>

- Echeverry, C., Arredondo, F., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J. A., Midiwo, J., & Dajas, F. (2015b). Antioxidant Activity, Cellular Bioavailability, and Iron and Calcium Management of Neuroprotective and Nonneuroprotective Flavones. *Neurotoxicity Research*, 27(1), 31–42. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9483-y>
- Echeverry, C., Prunell, G., Narbondo, C., de Medina, V. S., Nadal, X., Reyes-Parada, M., & Scorza, C. (2021). A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT_{1A} Receptors. *Neurotoxicity Research*, 39(2), 335–348. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00277-y>
- Estrella-Parra, E. A., Almanza-Pérez, J. C., & Alarcón-Aguilar, F. J. (2019). Ayahuasca: Uses, Phytochemical and Biological Activities. *Natural Products and Bioprospecting*, 9(4), 251–265. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0210-5>
- Fábregas, J. M., González, D., Fondevila, S., Cutchet, M., Fernández, X., Barbosa, P. C. R., Alcázar-Córcoles, M. Á., Barbanoj, M. J., Riba, J., & Bouso, J. C. (2010). Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. *Drug and Alcohol Dependence*, 111(3), 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.03.024>
- Ferraz, C. A. A., de Oliveira Júnior, R. G., Picot, L., da Silva Almeida, J. R. G., & Nunes, X. P. (2019). Pre-clinical investigations of β -carboline alkaloids as antidepressant agents: A systematic review. *Fitoterapia*, 137(March), 104196. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104196>
- Flanagan, T. W., & Nichols, C. D. (2018). Psychedelics as anti-inflammatory agents. *International Review of Psychiatry*, 30(4), 363–375. <https://doi.org/10.1080/09540261.2018.1481827>
- Fontanilla, D., Johannessen, M., Hajipour, A. R., Cozzi, N. V., Jackson, M. B., & Ruoho, A. E. (2008). The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1126/science.1166127>
- Fortunato, J. J., Réus, G. Z., Kirsch, T. R., Stringari, R. B., Fries, G. R., Kapczinski, F., Hallak, J. E., Zuardi, A. W., Crippa, J. A., & Quevedo, J. (2010). Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. *Journal of Neural Transmission*, 117(10), 1131–1137. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0451-2>
- Fortunato, J. J., Réus, G. Z., Kirsch, T. R., Stringari, R. B., Stertz, L., Kapczinski, F., Pinto, J. P., Hallak, J. E., Zuardi, A. W., Crippa, J. A., & Quevedo, J. (2009). Acute harmine administration induces antidepressant-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.07.021>
- Frecska, E., Bokor, P., & Winkelman, M. (2016). The therapeutic potentials of ayahuasca: Possible effects against various diseases of civilization. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 7, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00035>
- Gianfratti, B., Tabach, R., Sakalem, M. E., Stessuk, T., Maia, L. O., & Carlini, E. A. (2022). Ayahuasca blocks ethanol preference in an animal model of dependence and shows no

- acute toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 285, 114865.
<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114865>
- Giordano, S., Lee, J., Darley-USmar, V. M., & Zhang, J. (2012). Distinct Effects of Rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on Cellular Bioenergetics and Cell Death. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044610>
- González, D., Carvalho, M., Cantillo, J., Aixalá, M., & Farré, M. (2019). Potential Use of Ayahuasca in Grief Therapy. *Omega (United States)*, 79(3), 260–285.
<https://doi.org/10.1177/0030222817710879>
- Guimarães dos Santos, R. (2013). Safety and Side Effects of Ayahuasca in Humans-An Overview Focusing on Developmental Toxicology. *Journal of Psychoactive Drugs*, 45(1), 68–78.
<https://doi.org/10.1080/02791072.2013.763564>
- Inserra, A., De Gregorio, D., & Gobbi, G. (2021). Psychedelics in Psychiatry: Neuroplastic, Immunomodulatory, and Neurotransmitter Mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 73(1), 202–277. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000056>
- Katchborian-Neto, A., Santos, W. T., Nicácio, K. J., Corrêa, J. O. A., Murgu, M., Martins, T. M. M., Gomes, D. A., Goes, A. M., Soares, M. G., Dias, D. F., Chagas-Paula, D. A., & Paula, A. C. C. (2020). Neuroprotective potential of Ayahuasca and untargeted metabolomics analyses: applicability to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 255, 112743.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112743>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Lafrance, A., Loizaga-Velder, A., Fletcher, J., Renelli, M., Files, N., & Tupper, K. W. (2017). Nourishing the Spirit: Exploratory Research on Ayahuasca Experiences along the Continuum of Recovery from Eating Disorders. *Journal of Psychoactive Drugs*, 49(5), 427–435. <https://doi.org/10.1080/02791072.2017.1361559>
- Lee, C. S., Han, E. S., Jang, Y. Y., Han, J. H., Ha, H. W., & Kim, D. E. (2000). Protective Effect of Harmalol and Harmaline on MPTP Neurotoxicity in the Mouse and Dopamine-Induced Damage of Brain Mitochondria and PC12 Cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), 521–531.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750521.x>
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., & Zuo, L. (2017). *Review Article Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases : From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*. 2017(Figure 1).
- Malagelada, C., & Greene, L. A. (2008). PC12 Cells as a model for parkinson's disease research. In *Parkinson's Disease* (pp. 375–387). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374028-1.00029-4>
- Martínez-Busi, M., Arredondo, F., González, D., Echeverry, C., Vega-Tejjido, M. A., Carvalho, D., Rodríguez-Haralambides, A., Rivera, F., Dajas, F., & Abin-Carriquiry, J. A. (2019). Purification, structural elucidation, antioxidant capacity and neuroprotective potential of the main polyphenolic compounds contained in *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C.

- (Compositae). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(12), 2579–2591.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.047>
- Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 57, Issue 5, pp. 1655–1666).
<https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Morales-Garcia, J. A., Calleja-Conde, J., Lopez-Moreno, J. A., Alonso-Gil, S., Sanz-SanCristobal, M., Riba, J., & Perez-Castillo, A. (2020). N,N-dimethyltryptamine compound found in the hallucinogenic tea ayahuasca, regulates adult neurogenesis in vitro and in vivo. *Translational Psychiatry*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01011-0>
- Moura, D. J., Richter, M. F., Boeira, J. M., Pêgas Henriques, J. A., & Saffi, J. (2007). Antioxidant properties of β -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22(4), 293–302. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem016>
- Nichols, D. E. (2004). Hallucinogens. *Pharmacology and Therapeutics*, 101(2), 131–181.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.11.002>
- Nichols, D. E. (2016). Psychedelics. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 264–355.
<https://doi.org/10.1124/pr.115.011478>
- Nižnanský, L., Nižnanská, Ž., Kuruc, R., Szórádová, A., Šikuta, J., & Zummerová, A. (2022). Ayahuasca as a Decoction Applied to Human: Analytical Methods, Pharmacology and Potential Toxic Effects. *Journal of Clinical Medicine*, 11(4), 1147.
<https://doi.org/10.3390/jcm11041147>
- Nutt, D., Erritzoe, D., & Carhart-Harris, R. (2020). Psychedelic Psychiatry's Brave New World. *Cell*, 181(1), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.020>
- 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., ... Araújo, D. B. (2019). Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: A randomized placebo-controlled trial. *Psychological Medicine*, 49(4), 655–663. <https://doi.org/10.1017/S0033291718001356>
- Perucho, J., Alarcón, F., Mena, M. Á., Garcia de Yébenes, J., & Casarejos, M. J. (2017). Is Ayahuasca a Potential Ethnic Plant for the Treatment of Parkinson's Disease? In *Article in Journal of Pharmacology and Toxicology*.
<https://www.researchgate.net/publication/321311671>
- Pic-Taylor, A., da Motta, L. G., de Moraes, J. A., Junior, W. M., Santos, A. de F. A., Campos, L. A., Mortari, M. R., von Zuben, M. V., & Caldas, E. D. (2015). Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behavioural Processes*, 118, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.05.004>
- Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., & Bouillaud, F. (2020). Use of H₂O₂ to cause oxidative stress, the catalase issue. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239149>

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). *Original Contribution ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY*.
- Rodríguez, L., López, A., Moyna, G., Seoane, G. A., Davyt, D., Vázquez, Á., Hernández, G., & Carrera, I. (2022). New Insights into the Chemical Composition of Ayahuasca. *ACS Omega*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00795>
- Samoylenko, V., Rahman, M. M., Tekwani, B. L., Tripathi, L. M., Wang, Y. H., Khan, S. I., Khan, I. A., Miller, L. S., Joshi, V. C., & Muhammad, I. (2010). Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, *127*(2), 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.030>
- Sanches, R. F., De Lima Osório, F., Santos, R. G. D., Macedo, L. R. H., Maia-De-Oliveira, J. P., Wichert-Ana, L., De Araujo, D. B., Riba, J., Crippa, J. A. S., & Hallak, J. E. C. (2016). Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a SPECT study. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *36*(1), 77–81. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000436>
- Sanders, L. H., & Greenamyren, J. T. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*, *62*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003>
- Santos, B. W. L., Moreira, D. C., Borges, T. K. dos S., & Caldas, E. D. (2022). Components of Banisteriopsis caapi, a Plant Used in the Preparation of the Psychoactive Ayahuasca, Induce Anti-Inflammatory Effects in Microglial Cells. *Molecules*, *27*(8), 2500. <https://doi.org/10.3390/molecules27082500>
- Senhaji, S., Lamchouri, F., Akabli, T., & Toufik, H. (2022). In vitro antioxidant activities of five β -carboline alkaloids, molecular docking, and dynamic simulations. *Structural Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11224-022-01886-3>
- Serrano-Dueñas, M., Cardozo-Pelaez, F., & Sánchez-Ramos, J. R. (2001). Effects of Banisteriopsis caapi extract on Parkinson's disease. *Scientific Review of Alternative Medicine*, *5*(3), 127–132.
- Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., Miller, G. W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., & Greenamyre, J. T. (2003). Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, *23*(34), 10756–10764. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-34-10756.2003>
- Simão, A. Y., Gonçalves, J., Gradillas, A., García, A., Restolho, J., Fernández, N., Rodilla, J. M., Barroso, M., Duarte, A. P., Cristóvão, A. C., & Gallardo, E. (2020). Evaluation of the cytotoxicity of ayahuasca beverages. *Molecules*, *25*(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235594>
- Simão, Gonçalves, Duarte, Barroso, Cristóvão, & Gallardo. (2019). Toxicological Aspects and Determination of the Main Components of Ayahuasca: A Critical Review. *Medicines*, *6*(4), 106. <https://doi.org/10.3390/medicines6040106>

- Teleanu, D. M., Niculescu, A., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vlad, O., Roza, E., Cost, B., Grumezescu, A. M., & Teleanu, R. I. (2022). *An Overview of Oxidative Stress , Neuroinflammation , and Neurodegenerative Diseases*.
- Teng, K. K., Angelastro, J. M., Cunningham, M. E., & Greene, L. A. (2006). *Cultured for Neuronal PC12 Cells: A Model Function, Differentiation, and Survival*.
- Trevisani, A. C., Trevisani, J. P. C., Haverroth, M., Melo, A. D. C., Santos, I. C. dos, Barbosa, L. N., & Gonçalves, D. D. (2021). A Systematic Literature Review of the Potential Therapeutic Effects of Ayahuasca Tea Prepared From the Use of Banisteriopsis Caapi and Psychotria Viridis. *Journal of Agricultural Studies*, 9(1), 112. <https://doi.org/10.5296/jas.v9i1.17910>
- Vann Jones, S. A., & O'Kelly, A. (2020). Psychedelics as a Treatment for Alzheimer's Disease Dementia. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12(August), 10–15. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00034>
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1, pp. 1–11). <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>
- Zeifman, R. J., Singhal, N., dos Santos, R. G., Sanches, R. F., de Lima Osório, F., Hallak, J. E. C., & Weissman, C. R. (2021). Rapid and sustained decreases in suicidality following a single dose of ayahuasca among individuals with recurrent major depressive disorder: results from an open-label trial. *Psychopharmacology*, 238(2), 453–459. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05692-9>