Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Física

Heitor Gessner Mynssen Pinto Lopes

Padrão de Conectividade Funcional em Usuários Experientes de Ayahuasca Após Ingestão de Baixa Dose.

Rio de Janeiro - RJ
2019

Padrão de Conectividade Funcional em Usuários Experientes de Ayahuasca Após Ingestão de Baixa Dose.

Heitor Gessner Mynssen Pinto Lopes

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte das exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Física Médica.

Área de concentração:
Física Aplicada às Ciências Médicas
Orientador:
Prof. Dr. Tiago Arruda Sanchez

Rio de Janeiro - RJ
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

http://www.sibi.ufrj.br/info-ficha.html

Versão Original
Disponível em BIF - UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE FÍSICA
http://www.if.ufrj.br
email: ifisica@if.ufrj.br

Ata n^0 104 de defesa de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) para concessão de conceito final nesta disciplina, realizada em 11 de dezembro de 2019.

Aos 11 dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, na sala 312 do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio de Janeiro, o aluno HEITOR GESSNER MYNSSEN PINTO LOPES compareceu perante os membros da banca examinadora, para a defesa de seu trabalho intitulado *"Padrão de Conectividade Funcional em Usuários Experientes de Ayahuasca Após Ingestão de Baixa Dose"*, realizado sob orientação do Dr. Tiago Arruda Sanchez (HUCFF), para a obtenção do conceito final na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) da Graduação em Física Médica. A banca foi composta pelos professores Dr. Tiago Arruda Sanchez (HUCFF), Dr. Daniel Mograbi (PUC-Rio), Dr. Carlos Julio Tierra Criollo (COPPE-UFRJ), e Dr. Odair Dias Gonçalves (IF- UFRJ). O presidente da banca deu início aos trabalhos às 14:00h, dando-se a palavra ao candidato, tendo o mesmo cinquenta minutos para a exposição do trabalho. Após, o candidato foi argüido pela banca examinadora. Terminada essa etapa, a banca examinadora reuniu-se e, depois do julgamento, o candidato foi:

[X] aprovado, com média 8,0 (oito)

- [ ] sem exigências;
- [ ] com a exigência de fazer pequenas correções no trabalho;
- [X] com a exigência de fazer grandes modificações no trabalho;

  tendo o aluno o prazo de 30 dias para efetuar as correções e apresentá-las ao presidente da banca.

[ ] reprovado, com média ( ).

E, para constar, foi lavrada a presente Ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo candidato.

1- _____ (presidente, orientador)
2- _____
3- _____
4- _____
5- _____ (aluno)

Endereço: Instituto de Física da UFRJ
Av. Athos da Silveira Ramos, 149
Centro de Tecnologia - bloco A - Cidade Universitária - Rio de Janeiro – RJ
Tel: (021) 2562-7470
21941-972 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil.

RESUMO

Introdução: Ayahuasca é uma bebida de origem amazônica, de ação serotoninérgica, que provoca aumento de atividade em regiões frontais e subcorticais envolvidas na introspecção, no afeto positivo e nas percepções visuais, enquanto diminui a atividade da *Default Mode Network* envolvida em estados de auto-consciência e devaneio. Mais recentemente, surgiram evidencias do potencial terapêutico para casos de depressão refratária, apesar de ainda haver pouco entendimento sobre o mecanismo envolvido. A Ayahuasca possui na sua composição: N,N-Dimethyltryptamina (DMT), que é agonista de receptores 5HT2A, harmina e harmalina, que são inibidoras da monoamina oxidase-A (iMAO-A), e a Tetrahydroharmina (THH) que inibe fracamente a recaptação de serotonina. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito agudo de uma baixa dose de Ayahuasca nas principais redes de conectividade cerebral em usuários experientes. **Métodos**: Dezenove (19) voluntários experientes fizeram dois exames de neuroimagem por ressonância funcional (RMf), antes e após o uso da Ayahuasca, enquanto o voluntário permanecia em repouso durante o exame, de olhos fechados e orientado a manter o pensamento livre, sem se fixar em único assunto. O software FSL foi usado para realizar o pré-processamento das imagens de RMf e para o método de análise de componentes independentes (ICA) incluindo o teste T e um limiar p corrigido para as múltiplas comparações (FWE). Paralelamente ao processamento das imagens, as medidas comportamentais também foram analisadas por escalas psicométricas usando teste t no software Prism 6. **Resultados:** Nos resultados de ICA, observou-se um aumento da conectividade na rede de saliência (p-FWE=0,05) e na rede de controle executivo (p-FWE=0,03), enquanto outras redes identificadas, como a visual e sensório-motora não tiveram resultado significativo. Nas medidas psicométricas usando a escala VAMS, também foi observada uma diminuição da ansiedade e sedação mental após a ingestão da ayahuasca ($p<0,01$). **Discussão:** Foi observado o aumento da conectividade em duas modalidades de redes cerebrais, envolvidas tanto no processamento cognitivo do sistema de saliência quanto no processamento na rede de controle executivo central. Apesar dos achados sobre as mudanças sensoriais promovidas pela Ayahuasca, estudos recentes evidenciam os seus efeitos em processos cognitivos e emocionais. O aumento dos efeitos cognitivos e emocionais no presente estudo também são enfatizados pela redução na escala psicométrica de ansiedade

e sedação mental em associação com o aumento da rede de saliência, que inclui regiões cerebrais como córtex cingulado anterior, insula, amygdala e outras contribuintes para diversas funções complexas dependentes da integração de informações sensoriais, emocionais e cognitivas. Estes achados contribuem para a compreensão dos efeitos da Ayahuasca no comportamento humano, além de evidenciar um mecanismo de modulação cognitivo-emocional pela rede de saliência que pode ter aplicabilidade terapêutica a ser testada futuramente.

ABSTRACT

Introduction: Ayahuasca is a Brazilian beverage from Amazon that has serotonergic action. It increases brain activity in frontal and subcortical brain regions involved in insight, positive affection and visual perception, while reducing activity of the default mode network. Recently, evidences have been found that support its therapeutic potential in cases of refractory depression, however the understanding of the mechanisms involved in this process is unknown. The Ayahuasca is chemically composed of: N,N-Dimethyltryptamine (DMT), which is agonist to 5HT2A receptors, harmine and harmaline, inhibitors of monoamine-oxidase-A (iMAO-A), and Tetrahydroharmine (THH), weak inhibitor to serotonin receptors. The goal of this study is to evaluate the acute effects of a low dose of Ayahuasca on the main resting state functional networks. **Methods:** Nineteen (19) experienced volunteers underwent two neuroimaging acquisitions using functional MRI (fMRI), before and after Ayahuasca ingestion. All volunteers were instructed to maintain their eyes closed, to stay relaxed and not to keep a specific thought in mind. FSL software was used to preprocess all images and also to perform a Independent Component Analysis (ICA). Results were expressed in p value corrected for family-wise error (FWE). For the psychometric scales, a t test was performed for each categories of the scale, using the software Prism 6. **Results:** On the ICA, two networks increased their connectivity: the salience network (p-FWE = 0.05) and the executive control network (p-FWE = 0.03). Both visual and sensorimotor networks show neither increase or decrease on activity. No other networks were identified in this analysis. For psychometric scales measurements, the differences observed were on anxiety and mental sedation ($p<0.01$), both decreasing after Ayahuasca intake. **Discussion:** Although Ayahuasca is considered a psychedelic drug with sensory effects, subjects self report mainly a lack of these effects with low dose intake and ICA results also suggest that individuals didn't experience psychedelic sensory effects due to the lack of alteration of on both visual and sensorimotor networks. On the other hand, the observed increases in the salience network connectivity corroborate findings in literature that show its effects on cognitive and emotional processes. These are further reinforced by the psychometric reduction of anxiety and mental sedation. Also, salience network is known to be anatomically located on anterior cingulate cortex, amygdala and insula, which are brain

regions responsible for many complex functions related to sensory, emotional and cognitive informations. These findings contribute to a better understanding of the Ayahuasca effects on the human brain as well as to show a cognitive-emotional regulation, that may have therapeutic use in future research.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes comportamentos do vetor magnetização nos dois referenciais, A, inercial, e B, não-inercial. 9

Figura 2 - Exemplo de bobina hospitalar (Disponível em: siemens-healthineers.com/) 10

Figura 3 - Exemplo de possíveis curvas utilizando as equações 6 (superior) e 7 (inferior) considerando valores distintos de T1 e T2*, ambos com unidades arbitrárias. 12

Figura 4 - Sinal FID considerando unidades arbitrárias de tempo e intensidade de sinal. 14

Figura 5 - Imagem da curva HDR, adaptada de Huettel, 2008. 17

Figura 6 - Imagem da curva HDR ilustrando o efeito do prolongamento do estímulo, adaptada de Huettel, 2008. 18

Figura 7 - Esquema representando o processamento básico pelo método de ICA, retirado de BECKMAN et al., 2005. 21

Figura 8 - DMN (disponível em: findlab.stanford.edu/) em vermelho, posicionada sobre a imagem de um atlas de cérebro humano (disponível em: bic.mni.mcgill.ca/ServicesAtlases/) nas vistas sagital, coronal e transversal da esquerda para direita. As setas brancas, pretas e azuis indicam respectivamente o MPFC, PCC e IPL. 23

Figura 9 - Rede de saliência (disponível em: findlab.stanford.edu/) em amarelo, posicionada sobre a imagem de um atlas de cérebro humano (disponível em: bic.mni.mcgill.ca/ServicesAtlases/) nas vistas sagital, coronal e transversal da esquerda para direita. 24

Figura 10 - Rede de controle-executivo (disponível em: findlab.stanford.edu/) em verde, posicionada sobre a imagem de um atlas de cérebro humano (disponível em: bic.mni.mcgill.ca/ServicesAtlases/) nas vistas sagital, coronal e transversal da esquerda para direita. As setas brancas e pretas indicam respectivamente o DLPFC e PPC. 25

Figura 11 - Ilustração de item presente na escala VAMS e a reta (fora de escala) para ser riscada em ponto específico. 26

Figura 12 - Exemplo das imagens feitas com o protocolo BOSTON. Visualização em cortes transversais. 29

Figura 13 - Ilustração do posicionamento do voluntário para aquisição da imagem de iRM. 1 indica a máquina de iRM, 2, o voluntário, 3, a mesa que sustenta e permite posicionar a região de interesse no centro da máquina, 4, a separação entre as duas salas e 5, o computador para montar e selecionar os protocolos de aquisição da iRM. 30

Figura 14 - Fluxograma do processo de coleta de todos os dados. 31

Figura 15 - Fluxograma das etapas de processamento dos dados. 31

Figura 16 - Imagem anatômica bruta (A) e processada (B). 32

Figura 17 - Exemplo de seleção de região em um vista lateral do encéfalo. 35

Figura 18 - Exemplo do efeito da suavização espacial em corte um corte transversal com utilização de filtros gaussianos com larguras à meia altura (FWHM, do inglês, *Full Width at Half Maximum*) de 4, 6 e 8 milímetros (Disponível em: support.brainvoyager.com/). 35

Figura 19 - Exemplo de sinal em um voxel no domínio do tempo (adaptado de Huettel). 36

Figura 20 - Exemplo de sinal em um voxel no domínio da frequência (adaptado de Huettel). 37

Figura 21 - Ilustração da ativação de uma região (A) que teve sua aquisição feita de maneira alternada (B), em que as fatias ímpares foram adquiridas primeiro, seguido das pares, nesse exemplo estavam afastadas por intervalo de 3 segundo, ou seja, TR = 3 s. Se os dados coletados (D) forem corretamente corrigidos temporalmente, forma-se a HDR (C). 38

Figura 22 - Modelo utilizado como molde em cortes sagital (1), coronal (2) e transversal (3). 40

Figura 23 - Imagem dos contrastes utilizados para a análise de grupo. 41

Figura 24 - Redes funcionais encontradas no estudo: somatossensorial (1), saliência (9), DMN (8), controle-executivo (9) e visual (10). 42

Figura 25 - Tela inicial do GUI do FSL. 56

Figura 26 - Caixas de entrada de valores do FSL. De cima para baixo, as opções são: filtro passa-alta, suavização espacial e a correlação temporal das fatias. 57

Figura 27 - Organização dos dados para testes estatísticos entre grupos. 58

Figura 28 - Comando *dual_regression* no terminal. 59

Figura 29 - Comando *fslstats* no terminal. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Posição média e seu DP e deslocamento máximo e mínimo do crânio no decorrer da aquisição das imagens. 33

Tabela 2 - Resultados das médias e seus desvios padrões para cada uma das classes da escala VAMS, assim como o resultado estatístico de diferença dessas categorias. 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOLD	*Blood Oxygenation Level-dependent* (Dependente do nível de oxigênio sanguíneo)
CLI	*Command Line Interface*
DMT	N,N-Dimethyltryptamina
DP	Desvio Padrão
EEG	Eletroencefalografia
EPI	*Echo-planar Image*
FID	*Free Induction Decay*
fMRI	*functional Magnetic Resonance Imaging* (Ressonância Magnética funcional)
FWE	*Family-wise Error*
FWHM	*Full Width at Half Maximum* (Lagura à meia altura)
GLM	*General Linear Model* (Modelo linear geral)
GUI	*Graphical User Interface*
HRF	*Hemodynamic Response Function* (Função da resposta hemodinâmica)
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
ICA	*Independent Components Analysis* (Análise de Componentes Independentes)
IF	Instituto de Física
iMAO-A	monoamina oxidase A
iRM	imagens por ressonância magnética nuclear
PET	*Positron Emission Tomography*

PPCA	*Probabilistic Principal Component Analysis*
RM	Ressonância Magnética
RMf	Ressonância Magnética funcional
RSNs	*Resting-state Networks* (Redes de Conectividade Funcional)
SPECT	*Single Positron Emission Computerized Tomography*
SPMs	*Statistical Parametric Maps* (Mapas Estatísticos Paramétricos)
TE	Tempo ao eco
THH	*Tetrahydroharmina*
TR	Tempo de repetição
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **1**
OBJETIVOS 5
FUNDAMENTOS TEÓRICOS **6**
IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA 6
IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL 16
ANÁLISE DE COMPONENTES INDEPENDENTES 19
REDES DE CONECTIVIDADE FUNCIONAL 21
REDES SENSORIAIS 22
DEFAULT-MODE NETWORK (DMN) 22
REDE DE SALIÊNCIA 23
REDE DE CONTROLE EXECUTIVO CENTRAL 24
ESCALAS PSICOMÉTRICAS 25
MATERIAIS E MÉTODOS **27**
AMOSTRA 27
AQUISIÇÃO DE IMAGENS 28
MONTAGEM EXPERIMENTAL 29
PROCESSAMENTO DE DADOS 31
SELEÇÃO DOS VOXELS ENCEFÁLICOS 32
ANÁLISE DE MOVIMENTO 32
FILTRO ESPACIAL DE SUAVIZAÇÃO 34
FILTRO TEMPORAL 36
CORREÇÃO TEMPORAL PARA FATIAS 37
CORREGISTRO 38
NORMALIZAÇÃO 39
ANÁLISE DE GRUPO 40
CORREÇÃO DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES 41
RESULTADOS **43**
DISCUSSÃO **44**
CONCLUSÃO **46**
REFERÊNCIAS **47**
ANEXO 1 **53**
ANEXO 2 **56**
ANEXO 3 **57**

INTRODUÇÃO

Parte dos avanços científicos e tecnológicos vistos neste século e no anterior podem ser atribuídos a uma melhor integração entre áreas da ciência que antes caminhavam separadas. Uma dessas integrações deu origem à física médica, que é fruto da cooperação entre o conhecimento físico e as ciências médicas e que promoveu um crescente ganho de conhecimento em prol da saúde humana tanto no diagnóstico quanto na terapêutica.

A radiologia, a medicina nuclear e a radioterapia são áreas médicas que já se beneficiam dos conhecimentos físicos desde as suas origens com a descoberta dos raios-X e outras formas de radiações, que são usados para gerar diferentes formas de imagens e radioterapias. Por outro lado, a psiquiatria e outras áreas da medicina apenas recentemente vem se aproveitando de métodos científicos quantitativos, especialmente computacionais e de mais alta complexidade, para avaliar a fisiologia humana e desenvolver tanto a acurácia diagnóstica quanto a terapêutica (PRICE *et al.*, 2002).

De forma geral, o princípio físico de uma imagem parte do conceito de que é possível reconstruir uma matriz representativa da distribuição de um sinal. O Sinal é uma função que conduz as informações espaciais e/ou temporais de alguma grandeza física originária de um objeto de interesse. Cada elemento computacional dessa matriz representativa é denominado *pixel* ou *voxel,* que são os menores elementos (de área ou de volume, respectivamente) representativos de um sinal. Esses elementos recebem um valor numérico que pode ser associado a um brilho (normalmente pertencentes a uma escala de cinza) diretamente dependente da natureza, da ordem de grandeza e das características do sinal selecionado, contendo assim a informação desejada em prol do seu propósito diagnóstico (HANS-JORGEN; RANALLO, 1989).

Em primeira instância, a matriz construida possui valores numéricos que podem ser associados a uma única tonalidade de cor cinza e a diferença dos valores vizinhos e, consequentemente, das tonalidades de cinza, cria o contraste. A medicina então associa essa

representação matricial com a morfologia de doenças e lesões para o desenvolvimento do diagnóstico por examinação e que comumente utiliza-se do princípio do pareidolismo, capacidade de criar imagens mentais a partir de uma observação, para associar o padrão morfológico da imagem à uma percepção cerebral pre-concebida (MARANHAO-FILHO; VINCENT, 2009). Contudo, o sinal pode oferecer um maior número de informações se for processado computacionalmente, fornecendo um maior poder de predição e de acurácia diagnóstica. Portanto, através de estudos destes sinais, pode-se buscar um biomarcador, "característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica" (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001).

Uma neuroimagem é uma modalidade de imagem (tipo específico de sinal) que permite analisar características do sistema nervoso quantitativamente e, devido principalmente a sua capacidade de fazer um registro dinâmico da fisiologia cerebral, é considerada um potencial biomarcador para transtornos psiquiátricos (LIDEN, 2012). Portanto, conforme o padrão cerebral estabelecido em repouso ou durante a execução de uma tarefa cognitiva, é possível realizar estudos que avaliam a neurofisiologia dos processamentos perceptuais, emocionais e cognitivos no cérebro. Ou então, é possível avaliar a modulação deles sob efeito de tratamentos psiquiátricos, sejam eles medicamentosos ou psicoterapêuticos.

Do ponto de vista fisiológico, a emoção é tratada como um repertório de comportamentos e reações fisiológicas que promovem a sobrevivência e a adaptação do indivíduo em diversas situações ameaçadoras ou apetitivas, sendo benéficas aos organismos (LANG, 1995). Em geral, na perspectiva da neurociência do comportamento humano, sinais e sintomas comportamentais têm um fundamento neurofisiológico associado à desordem do processamento dessas emoções no cérebro. Nos primeiros estudos realizados em animais eram retiradas sistematicamente regiões cerebrais e avaliadas mudanças de comportamentos quanto a situações de perigo e quanto a situações apetitosas (por exemplo, no interesse pelo alimento ou em parceiros sexuais). Por outro lado, em humanos era necessário esperar casos

raros de acidentes para se conseguir informações. Um exemplo é o Phineas Gage que teve seu comportamento alterado de dócil, confiável, honesto e equilibrado para instável e destemperado (DAMÁSIO *et al.*, 1994).

Mais recentemente, os estudos são feitos com o auxílio de técnicas como SPECT (*Single Positron Emission Computerized Tomography*), PET (*Positron Emission Tomography*), EEG (Eletroencefalografia) e iRM (imagens por ressonância magnética nuclear). Através delas foi possível mapear o cérebro humano detalhando diversas regiões, também chamadas de redes, de processamento de sinais corporais (SMITH *et al*., 2013). Tais redes estão envolvidas no processamento das emoções humanas e estudo delas e de suas alterações permite entender o mecanismo de funcionamento de certas doenças psiquiátricas, como a depressão (WEI *et al*., 2017).

Da mesma forma que a compreensão das redes é essencial, saber como alterá-las também é, e uma das formas de fazê-lo pode ser através do uso de substâncias psicodélicas, palavra originada do Grego *psyche* (mente) e *delein* (despertar ou manifestar), ou seja, substâncias que causam a "manifestação da mente" ou o "despertar da mente". A Ayahuasca é uma destas substâncias psicodélicas. Ela é uma bebida de origem amazônica de interesse científico crescente nas últimas decadas, que possui ação serotoninérgica, tem apresentado potencial uso em tratamentos psiquiátricos, tais como em: alcoolismo, abuso de drogas, violência doméstica (GROB *et al.*, 1996). Mais recentemente, foi observado o seu efeito potente no tratamento de depressão refratária (OSÓRIO *et al.*, 2015), doença considerada em 2017 como a principal causa não-letal de perda de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al*., 2017). Apesar dos holofotes sobre a depressão, estudos recentes mostram que há baixa eficiência das atuais drogas usadas na terapia dessa doença quando comparadas com placebos (PIGOT *et al*., 2010), o que ressalta a relevância de estudos com outras drogas.

Utilizando a RMf (Ressonância Magnética funcional), uma técnica moderna de neuroimagem que utiliza iRM, e ferramentas computacionais e matemáticas de análise estatística, uni-se o potencial médico desejado com a metodologia científica necessária. Em

específico, pode-se ressaltar a análise de conectividade cerebral que consiste em mapear o cérebro em regiões que tragam informações sobre processamento de sinais emocionais, sensoriais, cognitivos, entre outros. O estudo com Ayahuasca, como faz parte de um conjunto de substâncias com potencial terapêutico, se beneficia diretamente desse processo.

Recentemente, o nosso grupo no Laboratório de Neuroimagem e Psicofisiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) publicou três estudos de conectividade funcional em neurociência usando diferentes métodos de neuroimagem. No primeiro estudo do tipo realizado pelo grupo, utilizaram o método de análises de redes de mundo pequeno para caracterizar três redes (no BA10 do córtex pré-frontal, no BA37 do lobo temporal e no córtex visual primário incluindo BA17, BA18 e BA19) envolvidas na modulação da atividade do córtex visual durante uma experiência psicofisiológica sensorial sob efeito de um agonista serotoninérgico seletivo à receptores $5HT_{2A}$ (DE ARAÚJO *et al*., 2011). Em um outro estudo sobre percepção temporal, usaram um pêndulo físico realístico em comparação com um pêndulo com periodicidade variante a cada ciclo e foram pioneiros em mostrar a anticorrelação dos padrões neurofisiológicos das redes de *positive task* e *default mode network* em relação a imprevisibilidade do estímulo e a aprendizagem do mesmo (CARVALHO *et al*., 2016). No terceiro estudo, mostraram uma menor anticorrelação de pacientes com embotamento emocional após alta médica, em comparação com um grupo controle de pacientes após alta mas sem queixas desses sintomas sutis, dos padrões neurofisiológicos das redes de *task positive* e *task negative network* (associada à *default mode network*) durante um teste cognitivo de memória de trabalho intercalado com repouso (DELAVEAU *et al*., 2017).

A partir dessa bagagem experimental, foi proposto um novo estudo para que se pudesse fazer uma análise da conectividade funcional do cérebro humano. Mais especificamente, um estudo sobre como esse padrão de conectividade funcional é modificado ou não na presença da Ayahuasca.

OBJETIVOS

O objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso é testar a hipótese de que diferentes redes cerebrais de repouso envolvidas em funções como percepção, emoção e cognição possam ser modificadas pela ação aguda de uma estimulação serotoninérgica usando a Ayahuasca incluindo diversas redes de conectividade cerebral, dentre elas: a rede de processamento basal, também chamada de *Default Mode Network* (DMN), a rede de saliência, a rede de atenção e as redes somato-sensoriais.

Para isso, é necessário estudar a formação de imagens por Ressonância Magnética e as aplicações dos métodos avançados de processamento e análise de sinal em estudos de neurociência usando os princípios de conectividade de redes de informações, especificamente por análises de componentes independentes (ICA, do inglês, *Independent Component Analysis*). Espera-se com esse trabalho compreender com detalhe as técnicas utilizadas em estudos da conectividade cerebral e também conseguir correlacionar os dados dessas redes com as informações psicométricas dos indivíduos.

Esse trabalho é parte de um projeto maior do Laboratório de Neuroimagem e Psicofisiologia da UFRJ, priorizando o processamento destas imagens pelo método de ICA e, então, seu início se deu após já ter sido realizada a coleta de dados dos voluntários. Ainda assim, consta no trabalho a metodologia da coleta pois ela seria fundamental para a discussão de quaisquer resultados que viessem a ser encontrados.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

A construção deste capítulo foi baseada no livro *A Non-Mathematical Approach to MRI* de Smith e Ranallo de 1989. Algumas referências são, entretanto, citadas ao longo do texto para conteúdos específicos e para alguns complementos ao livro.

As imagens por ressonância magnética nuclear (iRM) estão baseadas em uma propriedade magnética intrínseca da matéria, o *spin* (Griffiths, 1994), para gerar um sinal, que fornecerá informações sobre o meio biológico usando a interação das partículas desse meio com um fóton na faixa da radiofrequência. É necessário, entretanto, atingir as condições adequadas para permitir tanto a interação do fóton com a partícula de interesse quanto para decodificar o sinal gerado e construir a imagem.

Existem duas equações que podem descrever o comportamento quântico do sistema: a primeira descreve a diferença de energia entre essas populações e a outra determina qual será a razão entre o número de moléculas em cada uma das populações, ambas considerando que o meio está em um campo magnético B_0, campo este que é gerado por um supercondutor refrigerado a hélio líquido.

O principal elemento a ser estudado na RM é o próton do núcleo de hidrogênio, e para essa partícula existem somente dois estados possíveis de energia para o núcleo, *spin up* e *spin down*. Essas duas possíveis energias para os estados *up* e *down* são calculadas usando-se as energias potenciais U que cada um dos momentos magnéticos ($\mu = \gamma I$, gerados pelos *spins*) possuem.

$$U = -\mu \cdot B_0 \qquad (1)$$

Considerando-se agora a transição entre os dois possíveis estados da componente z (υ_z) do momento de spin que se alinha com o campo externo principal da máquina, B_0, encontra-se a seguinte diferença de energia entre esses estados:

$$\Delta E = 2\mu B_0$$
$$\Delta E = 2\gamma I B_0$$
$$\Delta E = 2\gamma(\frac{hm_I}{2\pi})B_0$$
$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 \quad (2)$$

Onde γ é a constante giromagnética, I é o vetor spin e h é a constante de planck. Dessa maneira, um fóton só deve interagir com o núcleo de um átomo quando este possuir exatamente a diferença de energia entre esses dois estados, o que determina que a frequência do fóton deve ser:

$$E = hf = \hbar\gamma B_0$$
$$f = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (3)$$

A razão das populações é dada por uma distribuição de Boltzmann. Segue dessa distribuição que para cada Tesla do campo B_0, existe 1 partícula a mais no estado paralelo ($N_{paralelo}$) do que no antiparalelo ($N_{antiparalelo}$) a cada um milhão de partículas. A equação depende tanto da diferença de energia (ΔE) quando da temperatura (T) do corpo:

$$\frac{N_{paralelo}}{N_{antiparalelo}} = e^{E/k_bT} \quad (4)$$

Além dessa parte quântica, o fenômeno possui um comportamento macroscópico resultante que pode ser descrito classicamente e que ajuda a descrever o sinal resultante destas alterações nestas populações de spin. Nesse caso, o momento angular υ sofre um torque causado por B_0 que é um vetor resultado do produto externo entre o próprio momento com o campo. Como o torque é a derivada temporal do momento angular, a atuação desse torque sobre o momento magnético causa um movimento de precessão, assim como um peão

com momento angular sofrendo a ação de um campo gravitacional. A partir da relação entre o torque, $N = \upsilon \times B$, é possível chegar na seguinte relação entre a frequência angular, w, de precessão e o campo:

$$w = \gamma B_0 \tag{5}$$

Utilizando-se as equações 2 e 5 é possível descrever o comportamento individual de cada próton, mas é de grande interesse se estudar o comportamento coletivo das mesmas. Assim, sintetiza-se o movimento dos diversos υ contidos em uma unidade de volume, *voxel*, como o movimento único de um vetor resultante chamado magnetização, $M = \Sigma \mu$. Além disso, pode-se extrair da eq. 5 a frequência de Larmor que é simplesmente a divisão de w por 2π.

A magnetização também faz uma precessão em torno de B_0 com a frequência de Larmor e, para que se facilite a descrição dos possíveis movimentos da magnetização, toma-se um referencial que se oriente de tal forma que a componente z do novo referencial acompanhe (esteja na mesma direção e sentido) com a mesma frequência de precessão o vetor magnetização no estado de equilíbrio com B_0. Dessa forma, os comportamentos da magnetização podem ser descritos em termos da componente direcionada ao longo de z', M_z, e das componentes contidas em no plano transversal ao eixo z', M_{xy}, o que facilita a descrição do fenômeno que ocorre na RM.

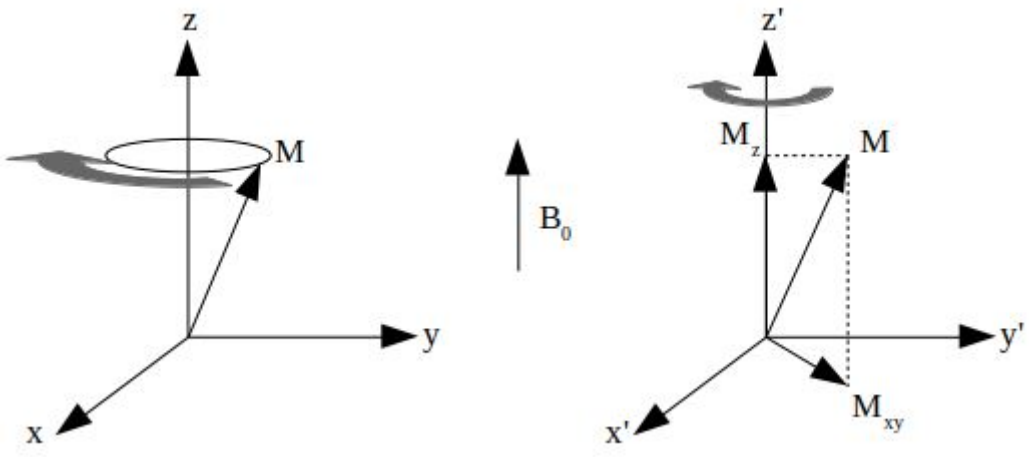

Figura 1 - Diferentes comportamentos do vetor magnetização nos dois referenciais, inercial (A) e não-inercial (B).

Após a magnetização atingir uma situação de equilíbrio e precessar em torno de B_0, as bobinas que geram B_1 são ligadas. Este campo, quando visto do referencial da sala, é um campo circular que percorre sua trajetória com frequência de Larmor, porém, visto do novo referencial, é um campo que não varia espacialmente. Ele é gerado pelas bobinas que se encontram mais próximas do paciente ou voluntário de quem será feito a imagem, motivo pelo qual estas são também as responsáveis pela aquisição do sinal, utilizando a corrente induzida pela variação da magnetização, que formará a imagem.

Figura 2 - Exemplo de bobina hopitalar (Disponível em: siemens-healthineers.com/).

B_1 cede então energia para o sistema, trazendo o vetor magnetização para o plano x'y', ou seja, aumentando M_{xy} e reduzindo M_z. Quando B_1 é desligado, a magnetização cede energia ao meio para voltar ao estado inicial, alinhando-se com B_0 novamente. Pode-se descrever esse processo de retorno ao estado inicial observando tanto o crescimento da M_z (relaxação longitudinal) quando a diminuição de M_{xy} (relaxação transversal).

Ambos os casos as magnitudes de M_{xy} e M_z são caracterizadas por um comportamento exponencial e as constantes que ponderam a variável (tempo) da função são chamadas de T1, no caso da magnitude de M_z, e T2* no outro caso.

$$M_z(t) = M_0 \,.\, (1 - e^{-\frac{t}{T1}}) \tag{6}$$

$$M_{xy}(t) = M_0 \,.\, e^{-\frac{t}{T2*}} \tag{7}$$

Ao se estudar os diferentes materiais que contenham hidrogênio e que, portanto, possuem valores diferentes para essas constantes, percebe-se a mudança no comportamento da função como exemplificado na figura 3. Esses diferentes comportamentos são encontrados quando se analisa o sinal obtido de diferentes tecidos biológicos e, por causa dessa diferença de comportamento da função, é possível então se obter contrastes na imagem. Isso porque no instante de captura do sinal cada tecido possuirá um valor distinto de intensidade ao qual será atribuído valor específico de cor cinza.

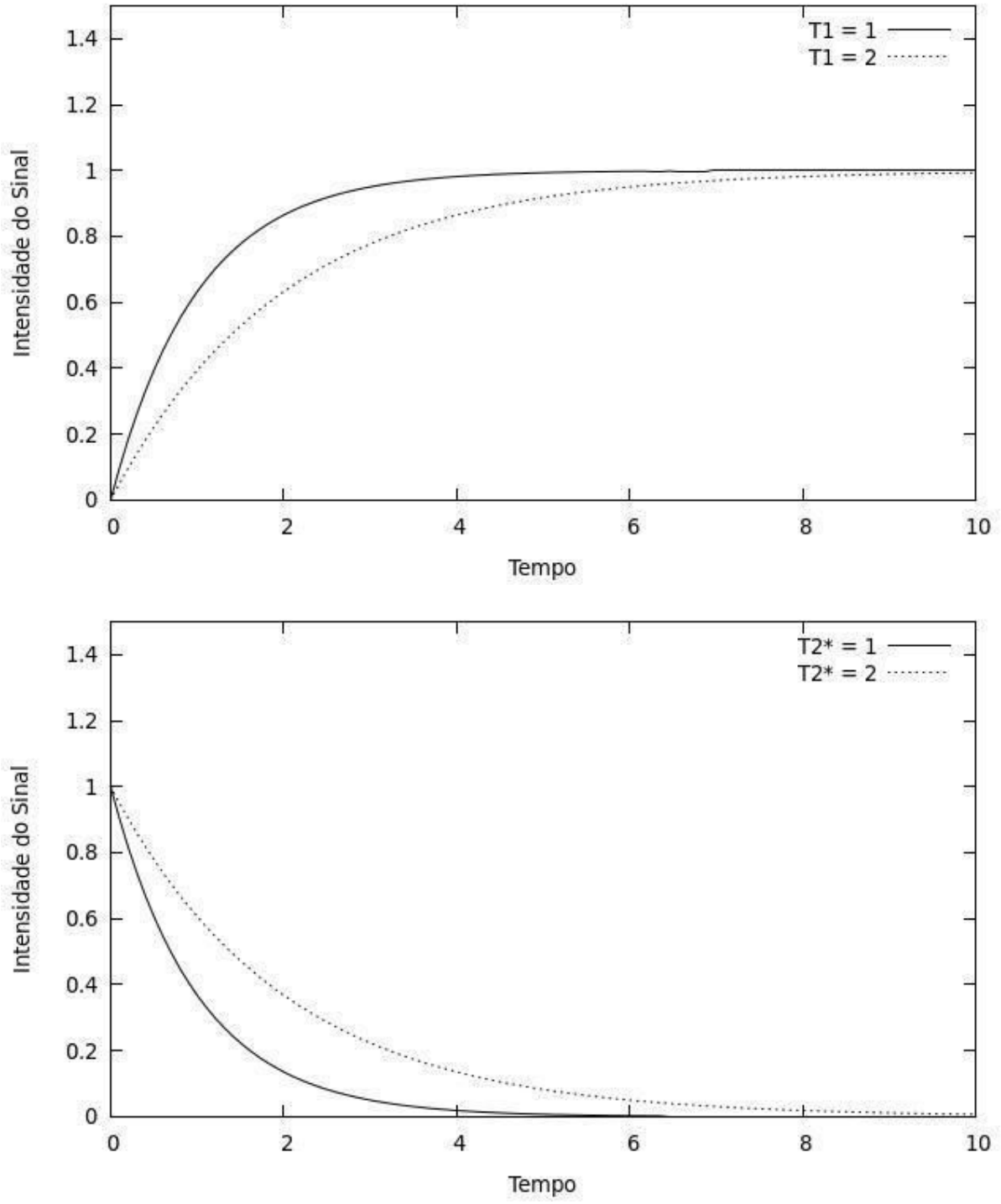

Figura 3 - Exemplo de possíveis curvas utilizando as equações 6 (superior) e 7 (inferior) considerando valores distintos de T1 e T2*, ambos com unidades arbitrárias.

No caso do T2*, ele pode ainda ser dividido em duas componentes: uma componente que depende somente das interações moleculares e atômicas com o meio (T2) e outra que depende das inomogeneidades de campo magnético aplicado (T_{inom}).

$$\frac{1}{T2*} = \frac{1}{T2} + \frac{1}{T_{inom}} \tag{8}$$

O primeiro termo do lado direito da igualdade (1/T2) diz respeito ao retorno de M_{xy} para o eixo longitudinal, isto é, a mudança do sinal de M_{xy} para M_z. Dessa forma, esta componente também diz respeito às componentes de ruído do meio que perturbam a magnetização com uma frequência próxima a frequência de Larmor.

O outro termo ($1/T_{inom}$) representa os efeitos causados por pequenas diferenças no campo magnético sentido pelos *spins* contidos em um voxel. Por exemplo, um dos *spins* de um dos hidrogênios da água, que compõe a magnetização, pode sofrer os efeitos da presença do outro átomo de hidrogênio da própria molécula de água porém um outro *spin*, que também componha a magnetização, de uma molécula que não seja água pode não ter átomos de hidrogênio próximos o suficiente para sofrer essa interação, assim, há uma diferença no campo local magnético sentido por cada um desses *spins*. Essa diferença de campo, quando sentida por tempo o suficiente, é responsável por criar um efeito chamado perda de coerência, que é medido como uma diminuição da M_{xy} da magnetização. Esse tipo de ruído magnético ambiente é chamado de ruído de baixa frequência. Entretanto, o ruído de baixa frequência não implica em um aumento correspondente de M_z, ou seja, existe uma independência nas relaxações transversal e longitudinal.

Contrastando-se T2* com T2 percebe-se que T2* será sempre menor do que T2, afinal é natural que T_{inom} seja maior que zero. De fato, considerando exames médicos para diagnósticos no coração humano, T2* é em torno de 1,5 vezes menor que T2 em máquinas de 1,5 Tesla. Portanto, as informações contidas em imagens ponderadas em T2 e em T2* não são equivalentes.

Uma vez explicado o comportamento do vetor magnetização, pode-se partir para a análise do sinal que será gerado na bobina e captado pela bobina. Este sinal terá um comportamento senoidal amortecido, chamado *Free Induction Decay* (FID), devido à:

- Perpendicularidade da componente M_{xy} em relação às bobinas de B1;
- Rotação dessa componente em relação às bobinas;
- Redução do módulo de M_{xy}.

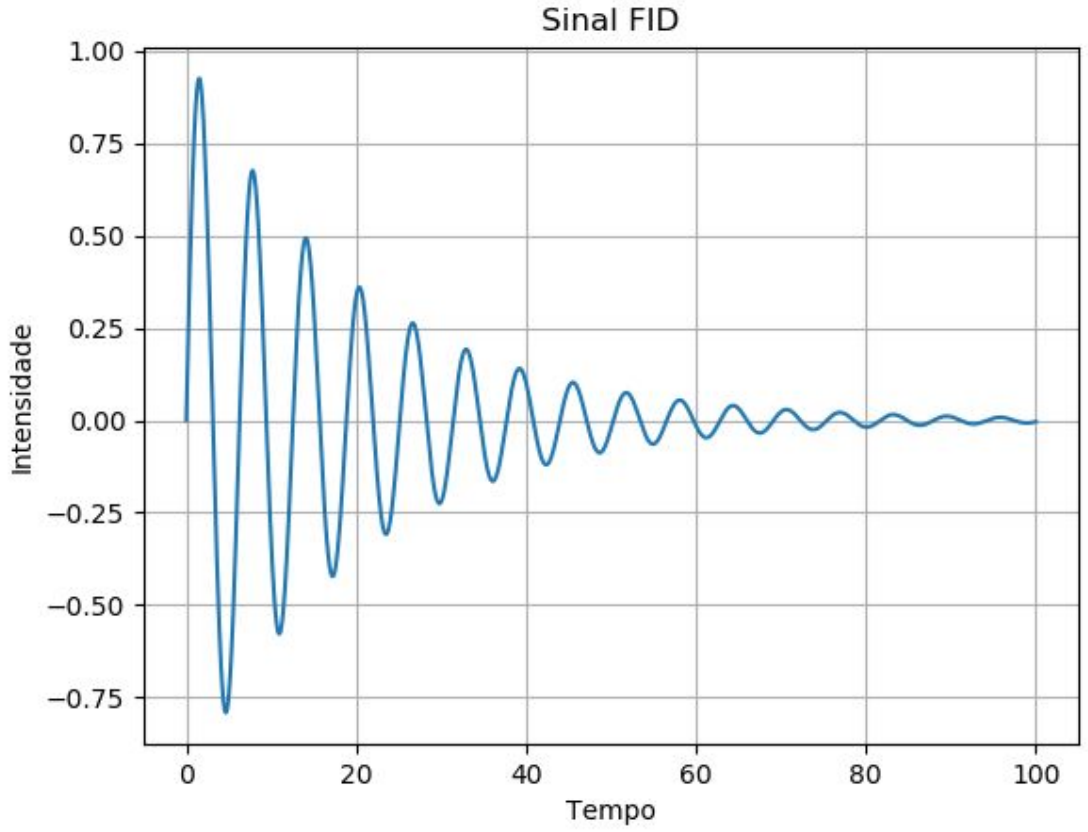

Figura 4 - Sinal FID considerando unidades arbitrárias de tempo e de intensidade de sinal.

A complexidade do sinal adquirido pode variar com o uso de uma sequência de pulsos, isto é, o uso repetido e periódico de pulsos de excitação permitem manipular o vetor magnetização para que se consiga extrair informações além do FID. Um desses pulsos é o pulso de eco, que é uma excitação no vetor magnetização capaz de reverter o processo de perda de coerência.

O tempo necessário para se provocar a excitação e obter o sinal de resposta do voxel é chamado de Tempo ao Eco (TE). Como uma imagem de ressonância é constituída em geral por mais de um *pixel*, esse processo pode ser repetido e o intervalo entre cada uma dessas repetições é chamado Tempo de Repetição (TR).

As imagens da ressonância trazem informações da relaxação transversal (chamadas ponderadas em T2) ou da vertical (chamadas ponderadas em T1). A quantidade de informação de cada uma relaxações varia em função do ajuste dos valores de TE e TR dos protocolos de aquisição das máquinas de RM. Dessa forma, imagens ponderadas em T1 ou em T2 podem fazer uso de sequências semelhantes de excitação e aquisição desde que sejam controlados parâmetros como tempo de excitação e captura do sinal reemitido. Como exemplo pode-se citar as sequências de Spin-Echo que é utilizada para diversas regiões do corpo e, portanto, é capaz de extrair diversas informações sobre uma grande variedade de tecidos.

Deve-se notar que o sinal reemitido de cada *voxel* deve possuir alguma característica que permita identificar espacialmente os sinais de cada *voxels*, permitindo a construção da matriz que formará a imagem. Essas características são a frequência e a fase da precessão da magnetização, que são alteradas com bobinas auxiliares, chamadas de bobinas de frequência de fase.

A primeira bobina, a de frequência, é usada para criar um campo magnético no sentido oposto de B_0 de tal forma que haja um gradiente linear de campo magnético. Esse gradiente faz com que regiões diferentes ao longo do eixo z, alinhado com B_0, possuam diferentes frequências de Larmor e que portanto serão excitados por fótons com diferentes energias. Escolhendo-se a faixa de frequência dos fótons que farão a excitação, pode-se então escolher qual região ao longo de z que gerará o sinal. Outra bobina de frequência é utilizada para criar um segundo gradiente, dessa vez ao longo do eixo x que. de maneira similar, permite escolher a região ao longo do eixo x.

Já para a localização ao longo do eixo y, é geralmente utilizada uma bobina de fase que nesse caso é o ângulo formado pelo vetor de magnetização e o próprio eixo y assim que a bobina de fase é ligada. Utilizando essas bobinas auxiliares em conjunto é possível identificar cada *voxel* da imagem de maneira única para construir a imagem de RM.

IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL

Este capítulo foi escrito usando como base o livro acadêmico *Functional magnetic resonance imaging* de Huettel de 2008. Algumas das referências usadas para a escrita do livro são explicitadas ao longo do texto e, para maiores, detalhes o leitor pode recorrer ao oitavo capítulo desse livro.

No iRM são utilizadas estratégias para minimizar os efeitos da perda de coerência de fase em prol da obtenção do melhor sinal das imagens provenientes de T1 e T2. Entretanto a perda de coerência de fase, descrito pela constante T2*, se torna extremamente importante na Ressonância Magnética funcional (RMf) pois ela permite medir e caracterizar o nível de concentração de oxi-hemoglobina (hemoglobina ligada à molécula de oxigênio) e desoxi-hemoglobina (hemoglobina não-ligada à molécula de oxigênio) no sangue devido a demanda metabólica em uma região do cérebro. Essas duas moléculas possuem propriedades magnéticas distintas: a desoxi-hemoglobina é paramagnética enquanto a oxi-hemoglobina é diamagnética (PAULING; CORYELL, 1936). Assim, o T2* do sangue desoxigenado é menor do que o T2* do sangue oxigenado.

As imagens de RM que realçam essa propriedade ganham o nome de imagens com contraste BOLD (*Blood Oxygenation Level-dependent contrast*) (OGAWA *et al*., 1990) e seu sinal de resposta é descrito matematicamente pela curva de resposta hemodinâmica (HDR, do inglês, *Hemodynamic Response*). A curva começa a ter um aumento de sinal de 1 a 2 segundos após a apresentação do estímulo, atinge um valor de pico em 5 a 7 segundos e retorna à linha de base após 12 segundos de quando foi iniciado o estímulo (HUETTEL; MCCARTHY, 2000). Apesar da curva possuir este comportamento bem estabelecido, 2 fatores afetam seu comportamento: a altura do pico é maior tanto quanto maior for a atividade

neuro-vascular cerebral e a largura da resposta é maior tanto quanto mais duradouro for o estímulo.

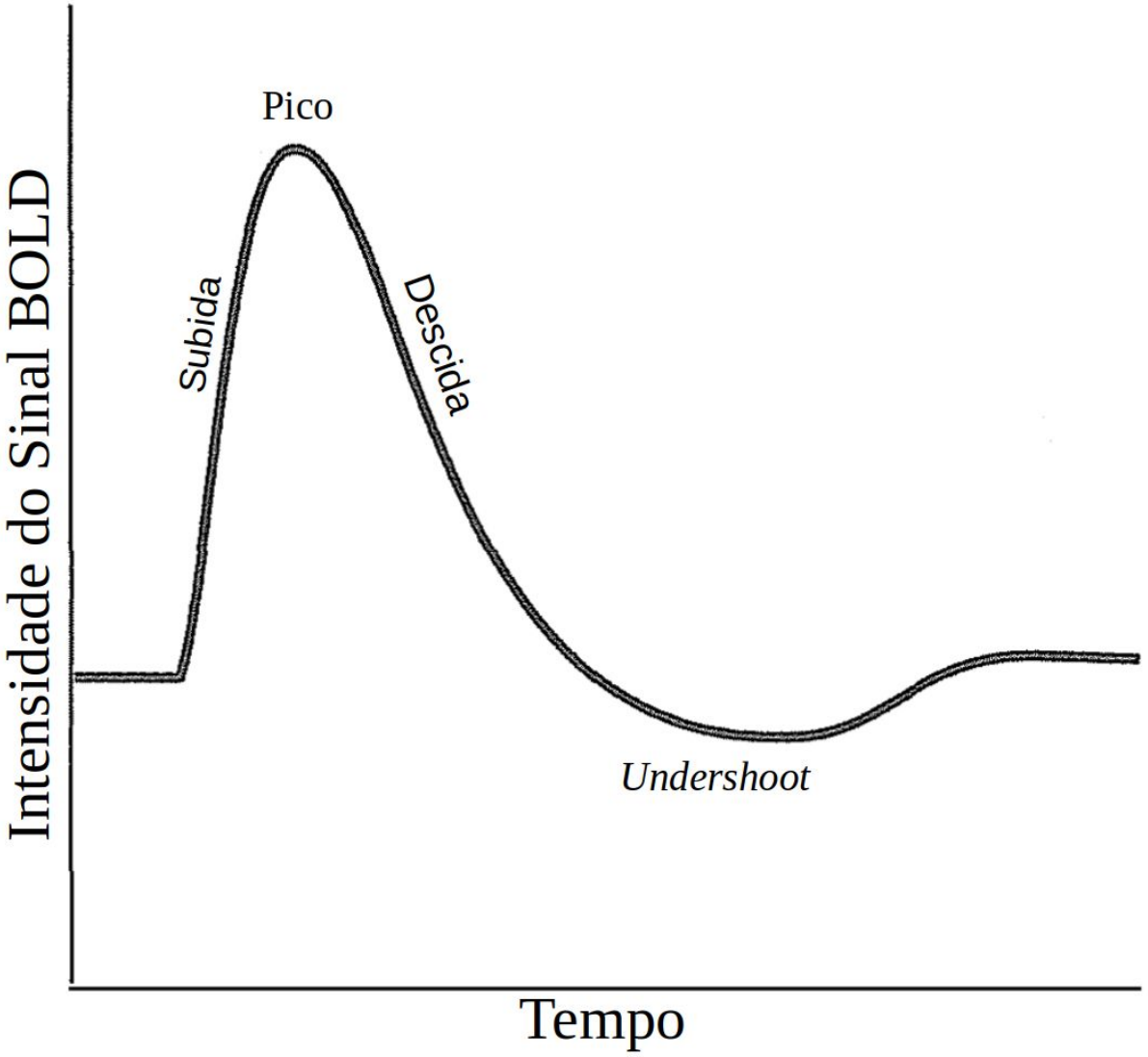

Figura 5 - Imagem da curva HDR, adaptada de Huettel, 2008.

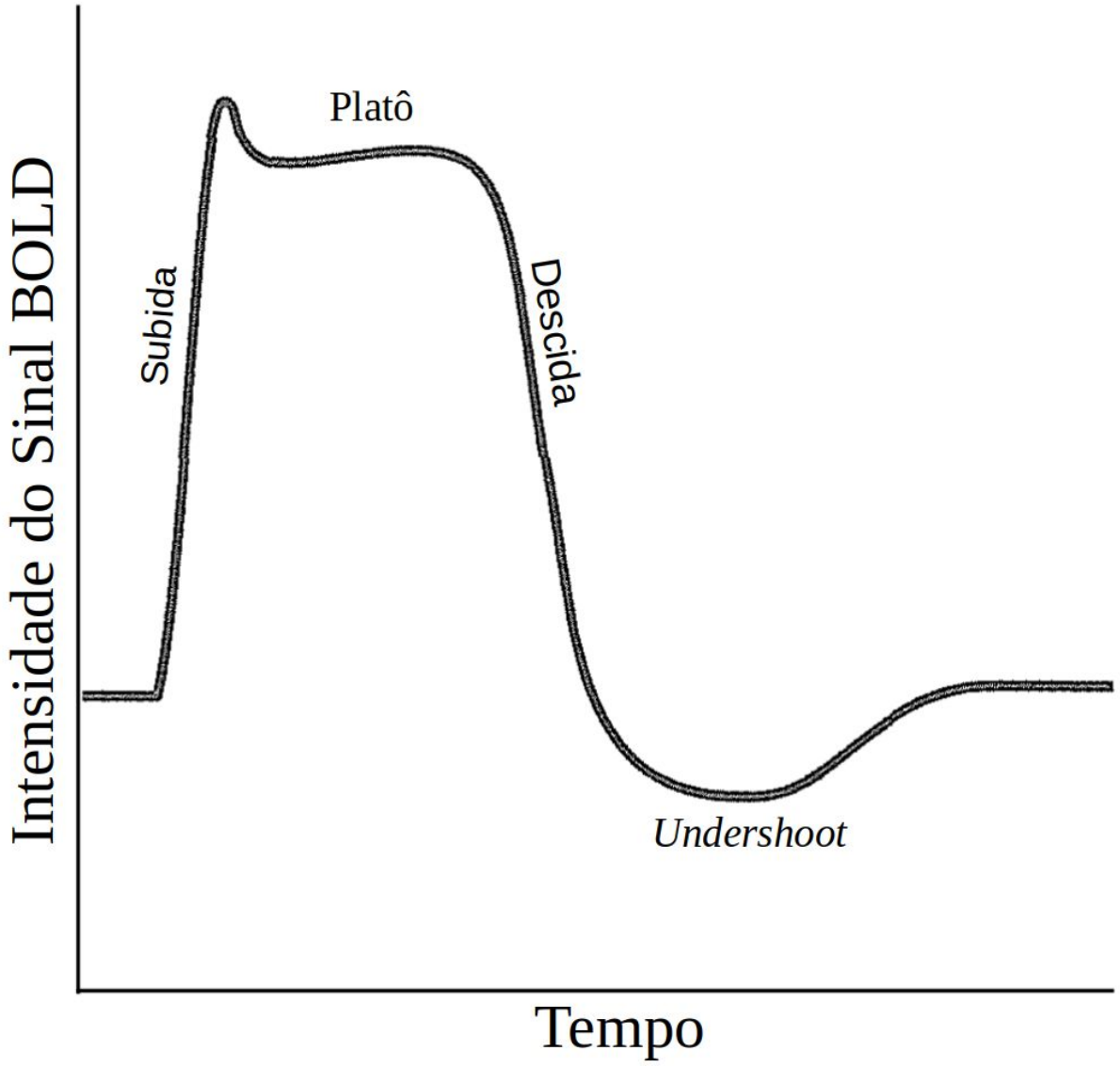

Figura 6 - Imagem da curva HDR ilustrando o efeito do prolongamento do estímulo, adaptada de Huettel, 2008.

O aumento da altura do pico, entretanto, pode ser diferente em certas regiões cerebrais devido a diferenças nas respostas fisiológicas no processamento dos estímulos. Isto é, nem todas as regiões são hiperperfundidas (aumento do fluxo sanguíneo) quando aumentam sua atividade metabólica, formando o sinal de BOLD positivo (figuras 5 e 6). Na verdade, algumas regiões são hipoperfundidas (redução do fluxo sanguíneo) e não seguem o padrão de comportamento esperado de hiperperfusão e geram uma inversão no sinal do HDR (BOLD negativo). Foram indicadas 4 causas para esse fenômeno: redução do fluxo sanguíneo por

inibição neuronal, redirecionamento do fluxo para outras regiões, aumento do consumo de oxigênio local sem aumento e/ou compensação correspondente do fluxo sanguíneo e aumento de neurotransmissores vasoconstritores em regiões subcorticais (KIM; OGAWA, 2012).

Desta forma, iniciaram-se pesquisas que avaliam atividades ligada ao funcionamento cerebral de grupos clínicos ou saudáveis com características específicas em estados homeostáticos de repouso ou por estimulação cerebral usando tarefas distintas, sejam elas: cognitivas, motoras, sensoriais, etc (YANG *et al*., 2000).

ANÁLISE DE COMPONENTES INDEPENDENTES

As pesquisas em neurociência utilizando a técnica de RMf permitiram a identificação de diferentes funções cerebrais, que estão relacionadas a partir de uma conectividade funcional, isto é, relacionadas temporalmente em seu padrão de atividade. Assim, a RMf nada mais é do que a aquisição de neuroimagens durante um certo período e que, portanto, contém dados de conectividade.

Os métodos de avaliação da conectividade funcional são baseados em uma análise temporal do sinal hemodinâmico BOLD que distingue e mede as redes cerebrais, regiões que trabalham coordenadamente para execução de uma ou mais funções, existentes no encéfalo (GUERRA-CARRILLO; MACKEY; BUNGE, 2014).

No estudo dessas redes, surgiu um interesse no comportamento das componentes de frequência do sinal em cada *voxel* (Dado Original na figura 8) por uma análise de componentes independentes (ICA, do inglês, *Independent Component Analysis*). O método por ICA usa as informações periódicas das flutuações de brilho do sinal de cada *voxel* para comparar quais deles são estatisticamente semelhantes no tempo e, em caso positivo, isso possibilita criar uma associação entre esses *voxels* em diferentes componentes e redes devido a coerência no comportamento da série temporal do sinal. Dessa forma, torna-se viável investigar os mapas da atividade de diferentes redes cerebrais.

As flutuações do sinal de cada *voxel* produzem distribuições de valores de intensidade que são utilizadas em uma análise matemática para determinar qual função de densidade de probabilidade (PDF, do inglês, *Probability Density Function*; indicado por PPCA, *Probabilistic Principal Component Analysis*, na figura 8) gerou essas distribuições, assim, cada PDF será uma componente independente da análise. As possíveis PDFs são combinações lineares de duas distribuições gama, que modelam o sinal de ativação BOLD (uma para BOLD positivo e outra para BOLD negativo), com uma distribuição gaussiana, que modela o ruído do sinal (WOOLRICH *et al*., 2005). Um certo conhecimento prévio de sobre quais são as possíveis combinações lineares que trazem um resultado biológico significativo deve agilizar o processo de busca, conforme é indicado como informação prévia na figura 8.

A série temporal do sinal de cada *voxel* deve possuir valores ótimos para alguma(s) das possíveis combinações lineares, e, aqueles *voxels* que possuírem a mesma PDF serão agrupados em grupo de similaridade. Após se determinar os grupos, os *voxels* agrupados formarão um mapa estatístico de *z-score* (estatística Z na figura 8) que é construído pela simples normalização em relação ao desvio padrão da componente gaussiana presente na combinação, ou seja, o desvio padrão do ruído. Escolhendo-se um valor de corte para o mapa estatístico de *z-score*, obtém-se o resultado final a ser analisado, como exemplificado por PICA *map* na figura 8 (BECKMAN *et al.*, 2005).

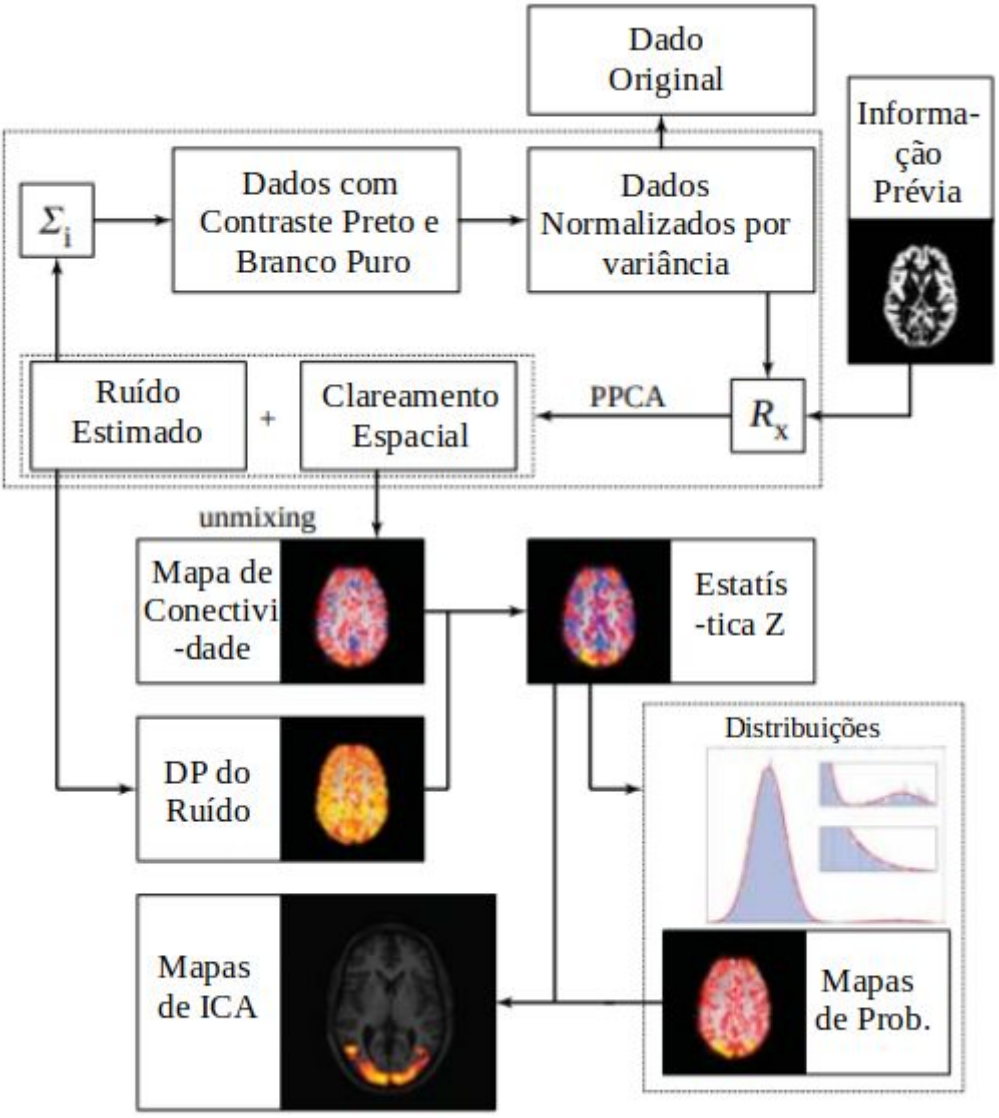

Figura 7 - Esquema representando o processamento básico pelo método de ICA, retirado de BECKMAN *et al.*, 2005.

REDES DE CONECTIVIDADE FUNCIONAL

Existem 2 tipos de redes no cérebro: anatômicas e funcionais. A primeira se refere ligações físicas por sinapses entre neurônios enquanto a segunda a regiões que tenham variação simultânea de ativação (BRESSLER; MENON, 2010), que ocorre devido a flutuações sincronizadas de sinal BOLD (HUETTEL, 2008). Quando os voluntários são instruídos a permanecer relaxados e sem manter o pensamento fixo em algo, as redes funcionais ganham nome de redes de conectividade funcional em repouso (RSNs,

Resting-state Networks). Algumas das redes características de RSNs são as rede de saliência, somatossensorial, *Default-mode Network* (DMN), visual, entre outras (GUERRA-CARRILLO; MACKEY; BUNGE, 2014). As figuras 9, 10 e 11 mostram distribuições topológicas de redes que podem ser usadas como guias para a identificação por inspeção visual dessas mesmas redes, uma vez que se tenha feito o ICA e se sobreponha os mapas de ICA nas imagens anatômicas.

REDES SENSORIAIS

O encéfalo além de receber diversos tipos de sinais provenientes dos órgãos sensoriais, também é capaz de criar situações imaginadas desses sentidos. Pode-se citar como redes que estão relacionadas a esses processos as redes auditiva, visual e somatossensorial. Essas encontram-se localizadas no córtex auditivo, córtex visual e córtex sensório-motor, respectivamente.

DEFAULT-MODE NETWORK (DMN)

A DMN está associada a um estado passivo de atividade cerebral ou a tarefas que requeiram uma desconexão de estímulos específicos, ou seja, tarefas passivas em que se monitora o ambiente ao seu redor de maneira inespecífica. Essa rede está anatomicamente localizada principalmente no córtex pré-frontal medial (MPFC, do inglês, *Medial Prefrontal Cortex*), córtex cingulado posterior (PCC, do inglês, *Posterior Cingulate Cortex*) e lobo parietal inferior (IPL, do inglês, *Inferior Parietal Lobe*) (BUCKNER; ANDREWS-HANNA; SCHACTER, 2008; MENON *et al*., 2010).

Essa rede participa de representações mentais de processos relevantes, isto é, na construção de modelos internos e do ambiente, que são usados para se lembrar de eventos passados, criar cenários futuros e fazer inferências de sobre o que outras pessoas pensam. Existem certas doenças, como Alzheimer e autismo, que estão associadas a disfunção dessas simulações (BUCKNER; ANDREWS-HANNA; SCHACTER, 2008).

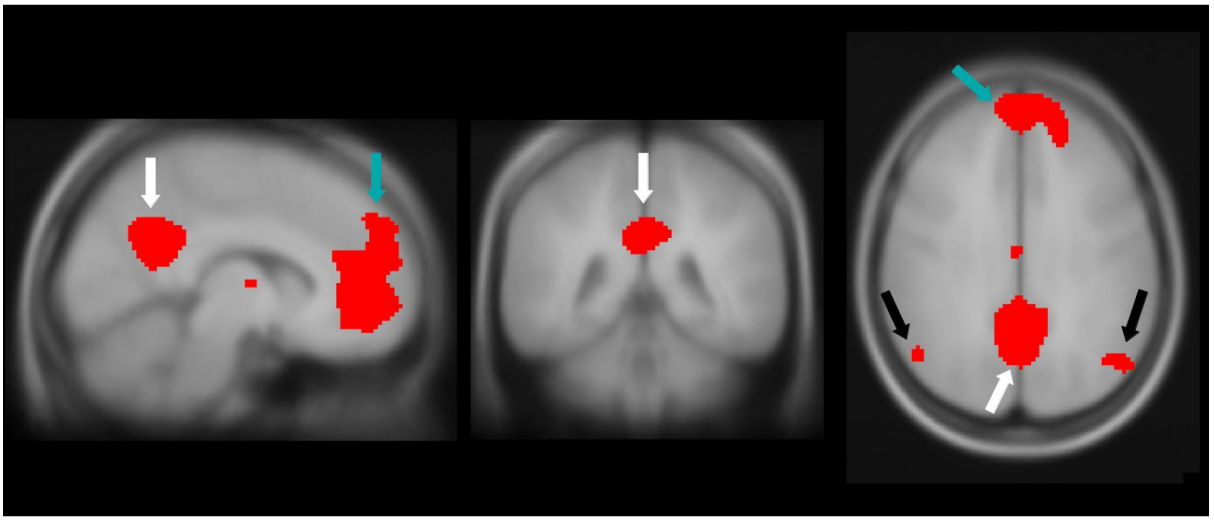

Figura 8 - DMN (disponível em: findlab.stanford.edu/) em vermelho, posicionada sobre a imagem de um atlas de cérebro humano (disponível em: bic.mni.mcgill.ca/ServicesAtlases/) nas vistas sagital, coronal e transversal da esquerda para direita. As setas brancas, pretas e azuis indicam respectivamente o MPFC, PCC e IPL.

REDE DE SALIÊNCIA

Esta rede identifica estímulos internos e externos que são os mais relevantes para guiar o comportamento individual e está localizada anatomicamente principalmente nas regiões da ínsula anterior (AI) e córtex cingulado anterior (ACC). Há nodos nessas regiões que estão associadas a saliência subjetiva humana além de outros que mostram uma importante regulação para a alteração da atividade de duas importantes redes, a rede de controle centro-executivo e a DMN. De maneira resumida, a primeira é a responsável pelas atividades de maior demanda cognitiva enquanto a segunda pelo oposto (MENON; UDDIN, 2010).

O estudo dessa rede é extremamente relevante na psiquiatria, especialmente por alterações em sua atividade e mudanças em suas regiões de ocorrência anatômica estarem associadas a distúrbios como depressão, bipolaridade e esquizofrenia (PETERS *et al*., 2016).

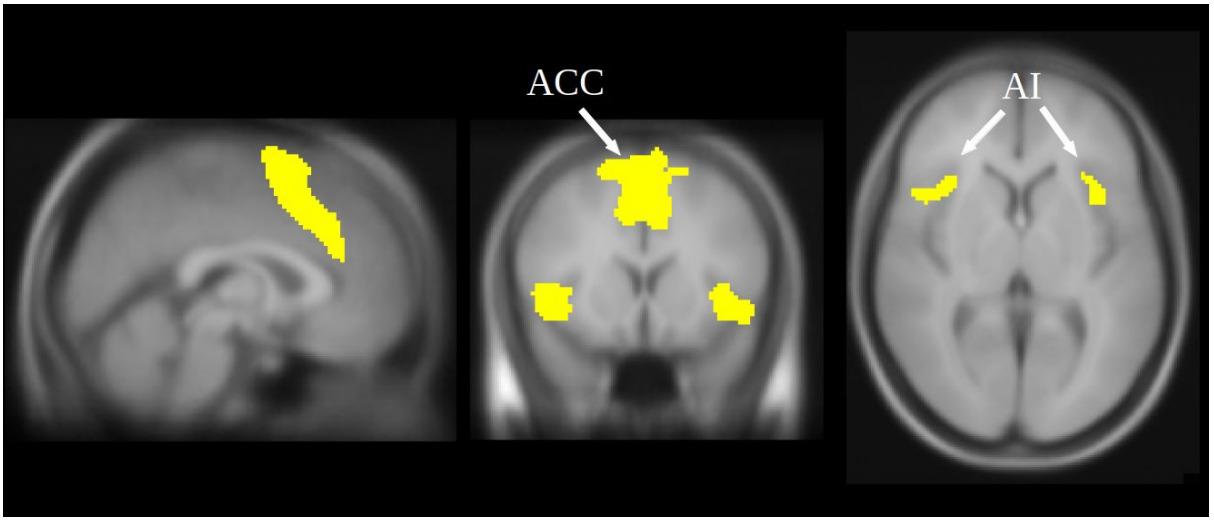

Figura 9 - Rede de saliência (disponível em: findlab.stanford.edu/) em amarelo, posicionada sobre a imagem de um atlas de cérebro humano (disponível em: bic.mni.mcgill.ca/ServicesAtlases/) nas vistas sagital, coronal e transversal da esquerda para direita.

REDE DE CONTROLE EXECUTIVO CENTRAL

A rede de controle executivo central, ou, em inglês, *central-executive control*, tem importância crítica para o controle e retenção de informação na memória de trabalho, assim como julgamento e tomada de decisões emotivas, como dito por Menon e Uddin, 2010. Também foi mostrado que através de estimulação magnética transcraniana dessa rede é possível causar uma redução da atividade da DMN (CHEN *et al*., 2013).

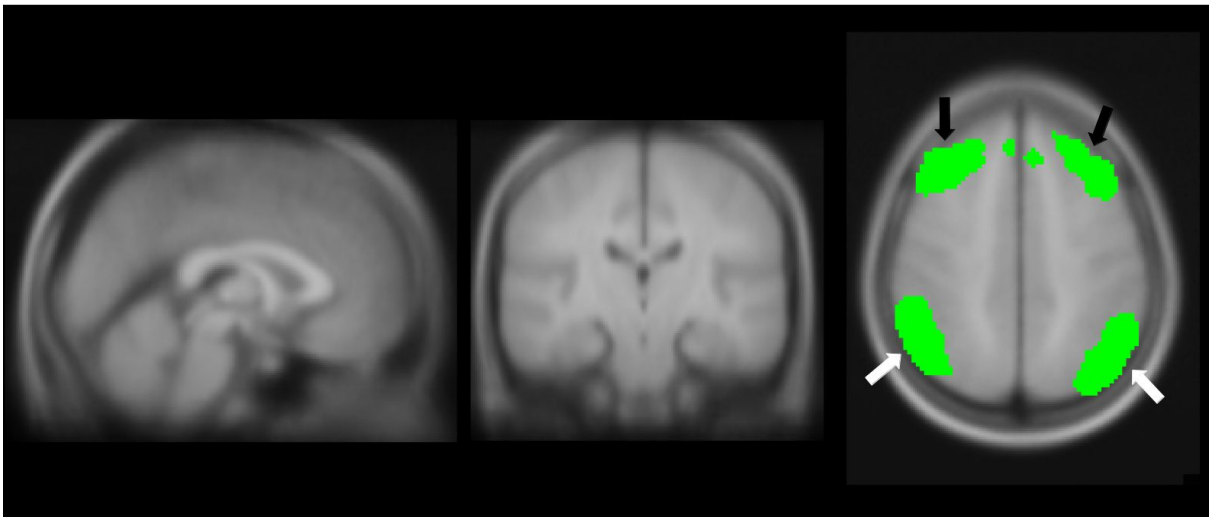

Figura 10 - Rede de controle executivo central (disponível em: findlab.stanford.edu/) em verde, posicionada sobre a imagem de um atlas de cérebro humano (disponível em: bic.mni.mcgill.ca/ServicesAtlases/) nas vistas sagital, coronal e transversal da esquerda para direita. As setas brancas e pretas indicam respectivamente o DLPFC e PPC.

ESCALAS PSICOMÉTRICAS

As escalas psicométricas são ferramentas auto-avaliativas, em que a pessoa lê, interpreta e responde sem interferência do avaliador, usadas para avaliar um estado ou um traço subjetivo individualmente e possivelmente avaliar a correspondência desta avaliação com medidas fisiológicas. Nesse experimento todos os voluntários preencheram a escala VAMS (NORRIS, 1971) traduzida para português brasileiro (ZUARDI; KARNIOL, 1981). Nela, cada indivíduo é instruído e treinado para marcar um ponto em uma linha reta de 10 centímetros, que é colocada entre duas palavras que descrevem estados extremos do humor correspondente a estas palavras. A marcação é medida com uma régua e seu estado vai ser uma função da distância em relação ao ponto de origem (começo da reta). A VAMS contém 16 itens divididos em 4 classes: ansiedade (3 itens), sedação mental (2 itens), prejuízo cognitivo (7 itens) e desconforto (4 itens).

A escala VAMS foi desenvolvida e testada considerando uma liberdade de interpretação do leitor para cada item e visou minimizar o viés interpretativo para permitir uma comparação fidedigna. Apesar de se poder fazer a medição de cada um dos itens de

humor independentemente, o agrupamento das classes reduz ainda mais esse viés apesar de se perder parte da especificidade dos humores sendo analisados.

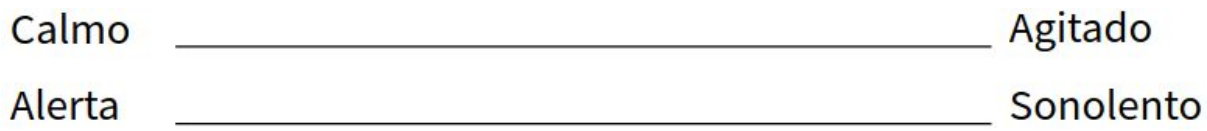

Figura 11 - Ilustração de item presente na escala psicométrica VAMS e a reta (fora de escala) para ser riscada em ponto específico que represente o seu estado atual.

A análise de grupo dessas escalas pode ser feita com um Teste T de Student para os grupos pré e pós ingestão de Ayahuasca. As médias a serem testadas são calculadas com os próprios comprimentos encontrados em cada uma das classes, medidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos e o paradigma experimental deste estudo foram aprovados pelo comitê de ética e de pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - CAAE: 34772414.9.0000.5257. Todos os voluntários assinaram e concordaram com os termos de consentimento (APÊNDICE 1). Os membros do Laboratório de Psicofisiologia e Neuroimagem da UFRJ fizeram a coleta dos dados entre os anos 2014 e 2016.

AMOSTRA

Os requisitos de seleção dos voluntários foram: não possuir doença neurológica ou psiquiátrica diagnosticada; não ter passado por uma situação de grande estresse próximo à data da coleta; não usar medicamentos ou outras substâncias que afetem o sistema vascular ou nervoso; ser apto a realizar um exame de RMf, ou seja, não possuir nenhuma limitação que coloque em risco a saúde do paciente como ser portador de marca-passo ou ter tatuagem com tinta que contenha ferro; ter experiência no uso da Ayahuasca nos últimos dois (2) anos e por pelo menos 24 vezes.

A amostra inicial foi constituída por 23 voluntários do sexo masculino, para se evitar variações do fluxo sanguíneo atribuídos pelo ciclos femininos de hormônios, e usuários experientes da Ayahuasca. Destes, 4 voluntários foram excluídos devido à incorreta realização da tarefa, desistência ou movimentação durante o exame, resultando numa amostra final de 19 voluntários. Estes 19 voluntários possuíam uma idade média de 31,5 anos (Desvio Padrão (DP) = 10,7, mínimo = 23, máximo = 68) e massa corporal média de 67,8 kg (DP = 8,1 kg, mínimo = 55 kg e máximo = 85 kg). Todos tomaram uma dose reconhecidamente baixa de Ayahuasca (abaixo de 0,5 mg de Ayahuasca por kg corporal) em um 31 mL (DP = 3 mL, mínimo = 25 mL e máximo = 35 mL) com a seguinte concentração de alcalóides: DMT = 0,721 mg/mL, Harmina = 1,022 mg/mL, Harmalina = 0,049 mg/mL, THH = 1,015 mg/mL, medidas por cromatografia gasosa.

AQUISIÇÃO DE IMAGENS

A aquisição de imagens de todos os voluntários foi realizada no serviço de radiologia do HUCFF em um aparelho de RM de 1,5 Tesla (Avanto Siemens, Alemanha), sendo utilizadas duas sequências: BOSTON e EPI (*Echo-planar Imaging*).

A imagem anatômica (BOSTON) foi feita a partir de um protocolo de imageamento ponderado em T1 (TE = 3,26 ms; TR = 2730,00 ms; Matriz = 256x256; ângulo de inclinação = 7º; FOV = 256 mm^2). Foram adquiridos 128 cortes, de 1,33 mm de espessura, tendo essa sequência 8 minutos e 16 segundos de duração.

186 imagens funcionais de RMf foram adquiridas com o protocolo *EPI*, um protocolo ponderado em T2* (TE = 30,00 ms; TR = 3290,00 ms; Matriz = 648 x 648; ângulo de inclinação = 85º; FOV = 216 mm^2). Essas imagens possuíam 36 cortes no total com 3 mm de espessura e levaram 10 minutos e 15 segundos no total para serem adquiridas por voluntário.

Todos os voluntários tiveram suas cabeças fixadas na própria bobina de radiofrequência (RF) da máquina de RM com auxílio de um travesseiro para diminuir artefatos de movimento. Além disso, eram usados protetores de ouvido para minimizar os efeitos de interferências sonoras do ambiente.

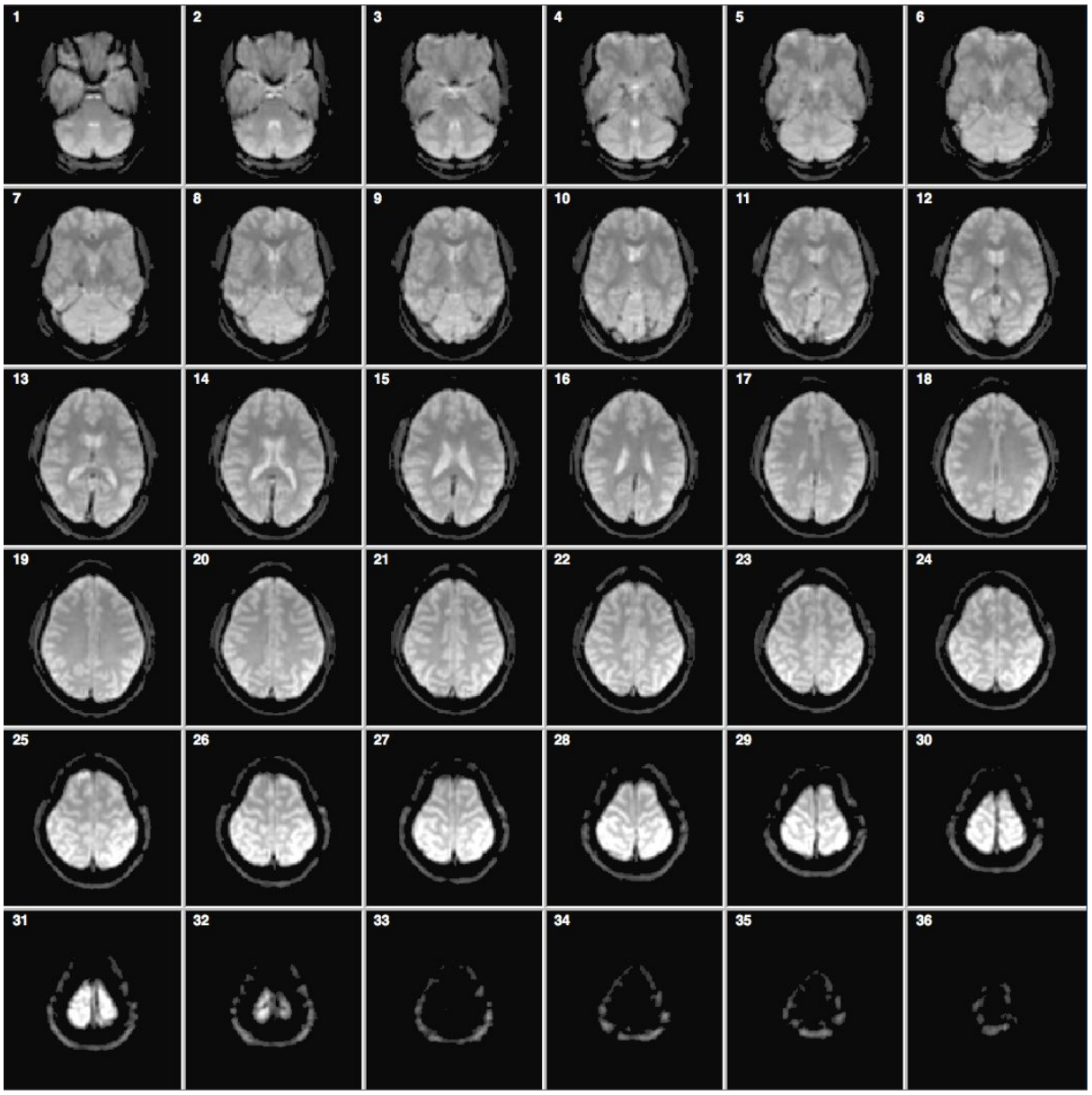

Figura 12 - Exemplo das imagens EPI baseadas no contraste BOLD. Visualização em cortes transversais.

MONTAGEM EXPERIMENTAL

Os voluntários vinham ao laboratório (Laboratório de Neuroimagem e Psicofisiologia) para receber as explicações da pesquisa, esclarecer eventuais dúvidas e, quando de acordo, assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Em

seguida, era preenchida a ficha de identificação do voluntário (Anexo 2) e uma escala de avaliação psicométrica.

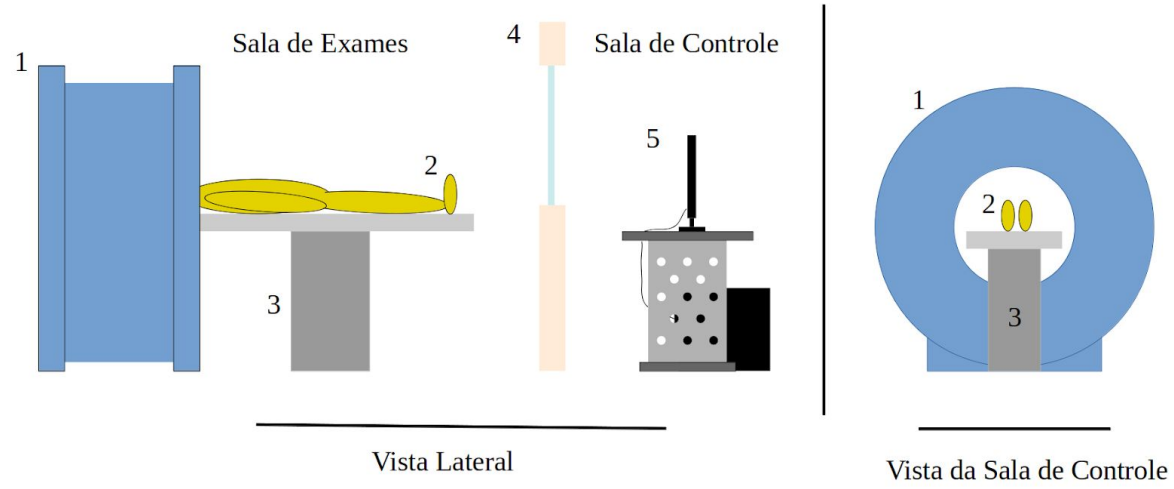

Figura 13 - Ilustração do posicionamento do voluntário para a aquisição da imagem de iRM. 1 indica a máquina de iRM, 2, o voluntário, 3, a mesa que sustenta e permite posicionar a região de interesse no centro da máquina, 4, a separação entre as duas salas e 5, o computador para montar e selecionar os protocolos de aquisição da iRM.

A pesquisa consistia apenas em exames de RMf em repouso, nos quais o voluntário era posicionado em decúbito dorsal, com a cabeça colocada em uma bobina de RF para crânio. Essas imagens eram tomadas em dois (2) momentos distintos: antes e 40 minutos depois da ingestão de baixa dose de Ayahuasca. A administração da Ayahuasca era feita no mesmo laboratório, que havia sido adaptado para maior conforto do voluntário com exclusividade do ambiente para o voluntário, baixa iluminação local, músicas e imagens comumente usadas por eles em cerimônias com Ayahuasca e tapete de ioga. Após realizar o segundo turno de aquisição de imagens, o voluntário preenchia a mesma escala psicométrica mais uma vez.

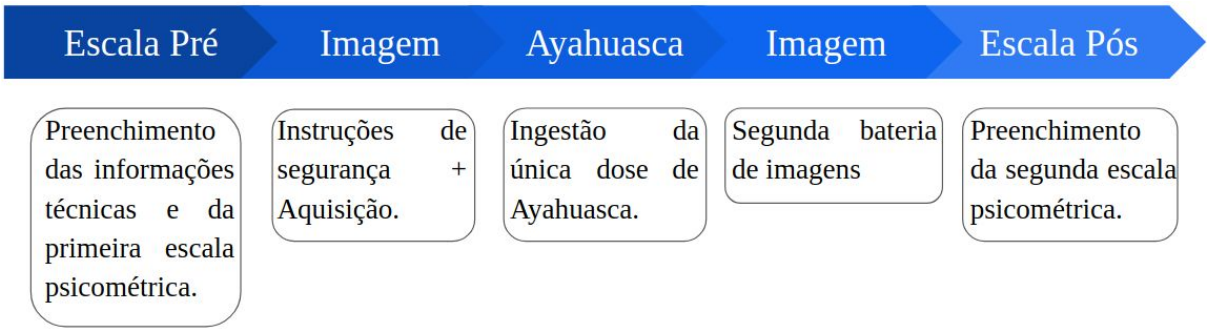

Figura 14 - Fluxograma do processo de coleta de todos os dados.

PROCESSAMENTO DE DADOS

Os mapas de ICA foram feitos a partir do software MELODIC FSL (disponível em: fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/). Nele, foram escolhidas a opção de *Multi-session temporal concatenation* que permite analisar os múltiplos voluntários que participaram levando em consideração que fizeram 2 seções. Todos os encéfalos tinham sido anteriormente separados dos demais tecidos e órgãos da imagem e inspecionados visualmente para controle de qualidade.

Depois, com o resultado das análises, cada um dos mapas estatísticos foram classificados, determinando assim quais dessas correspondiam de fato a redes cerebrais que existem e quais eram apenas ruído. Após essa inspeção, os dados eram levados para a análise de grupo. Um detalhamento maior das etapas está contido no Anexo 3.

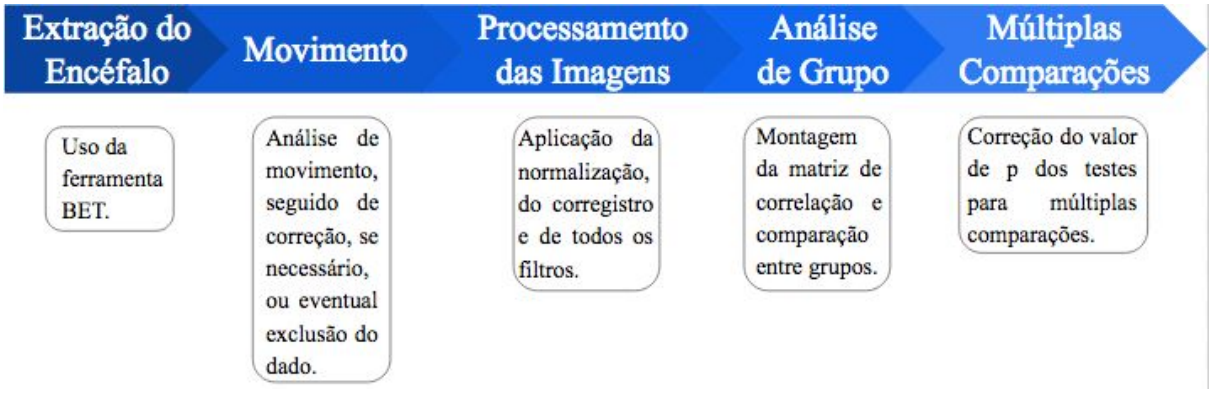

Figura 15 - Fluxograma das etapas de processamento dos dados.

SELEÇÃO DOS *VOXELS* ENCEFÁLICOS

A ferramenta BET (*Brain Extraction Tool*) (Smith, 2002) foi utilizada para que fossem analisados somente os *voxels* correspondentes a região do cérebro. Esse processo é importante para reduzir o risco de possíveis contaminações no sinal com informações de regiões que não são de interesse como pescoço, olhos e até mesmo o crânio.

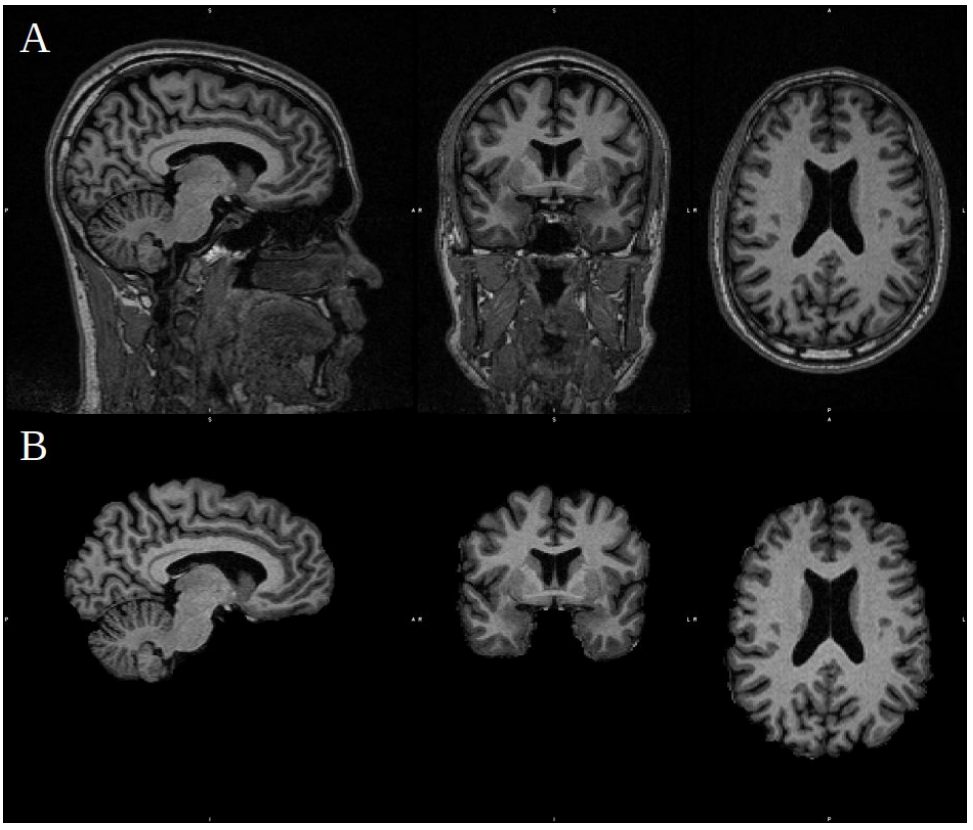

Figura 16 - Imagem anatômica bruta (A) e processada (B).

ANÁLISE DE MOVIMENTO

Ao se lidar com o paciente humano, mesmo havendo restrição de movimento pelo posicionamento do crânio do voluntário na máquina pelo uso da bobina, ainda é possível que haja pequenos movimentos. Por esse motivo, as movimentações individuais foram analisadas com os dados gerados pelas ferramentas de medição de movimentação do MELODIC FSL. A análise final deve levar em consideração se os deslocamentos calculados pelo software

atingem ou superam o limiar de 1 mm que, de acordo com Maziero *et al*. (2016), indica um comprometimento no potencial de estudo dos dados de MRf.

Como o uso da Ayahuasca poderia estar associado a alguma alteração no grau de agitação dos voluntários, tanto aumento quanto diminuição, um teste de controle de qualidade dos dados foi feito previamente para garantir que o grau de movimentação dos voluntários não seja capaz de causar um falso positivo ou negativo na análise dos dados. Por esse motivo, foi realizado um teste T de Student (intervalo de confiança = 0,05, número de voluntários = 19) para avaliar se a média de deslocamento dos pacientes pré-ingestão é diferente da média pós-ingestão. A hipótese nula nesse caso é de que não há diferença entre as médias enquanto a alternativa é de que há diferença.

A tabela 1 mostra o resultado da análise deste teste de qualidade dos dados sobre movimentação das cabeças dos voluntários exibindo os valores médios, DP da posição de cada grupo, pré e pós-ingestão. A partir desses valores foi então feito o teste t para verificar se houve diferença entre a movimentação dos voluntários antes e após a ingestão de Ayahuasca, também mostrado na tabela.

	Valores de deslocamento		Resultado Estatístico T	Intervalo de confiança	Valor p
Grupos	Média	DP			
Pré	0,38	0,32	0,08	- 0,25	0,974
Pós	0,39	0,42		0,23	

Tabela 1 - Posição média e seu DP e deslocamento máximo e mínimo do crânio no decorrer da aquisição das imagens. O teste T foi realizado considerando 19 voluntários e, portanto, o intervalo de confiança vai de aproximadamente -0,25 a 0,23.

Portanto, o teste estatístico da movimentação dos voluntários para a comparação entre as imagens, antes e após a ingestão da Ayahuasca, observou-se que os dados obtidos previamente a análise por ICA sobre as redes funcionais não apresentam diferença entre as duas condições experimentais.

FILTRO ESPACIAL DE SUAVIZAÇÃO

Como descrito por MIKL *et al*. (2008), essa etapa do processamento consiste em convoluir um *kernel* gaussiano, uma versão discretizada de uma função gaussiana bidimensional, com a imagem obtida por iRM. Esse procedimento, apesar de reduzir a resolução de contraste e fundir picos de sinais próximos, é essencial pois:

- Reduz componentes de alta frequência espacial na imagem e, consequentemente, aumenta a razão sinal-ruído;
- Reduz artefatos de redimensionamento (mudança de escala);
- Aumenta a validade dos Mapas Estatísticos Paramétricos (SPMs, do inglês, *Statistical Parametric Maps*) a serem calculados por esses obedecerem a teoria de campos gaussianos;
- Viabilizar a comparação de duas regiões cerebrais. Por exemplo, dado uma certa região de interesse a ser estudada em dois cérebros distintos, ao receber um certo estímulo, dificilmente o mesmo pixel dessa região seria estimulado (Figura 16). Dessa maneira, ao se aplicar esse filtro, o sinal é distribuído para regiões vizinhas, aumentando a probabilidade de que essas áreas sejam correlacionadas.

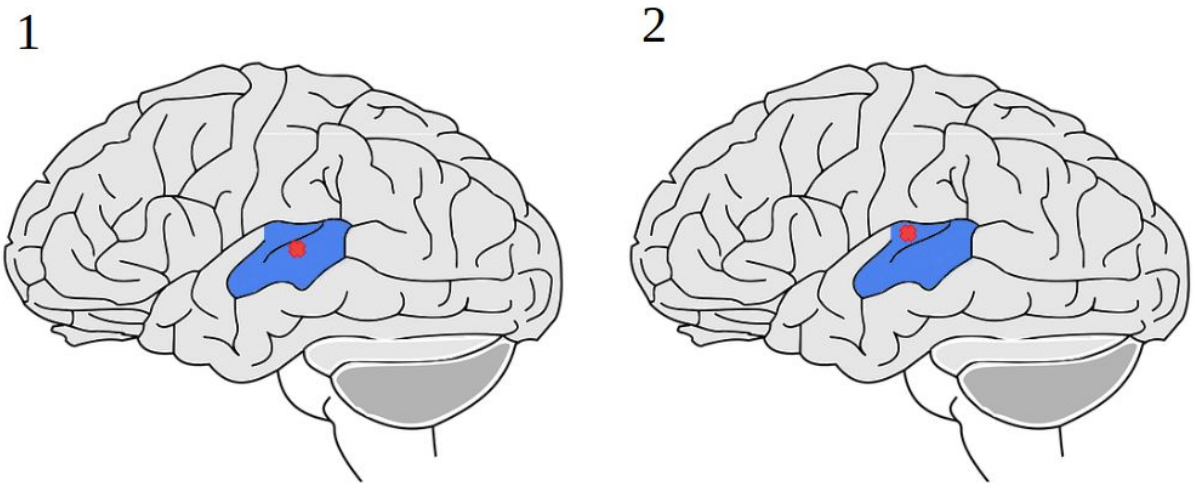

Figura 17 - Exemplo de seleção de região em um vista lateral do encéfalo.

Deve-se escolher a largura a filtro a ser utilizada, dependendo do que se deseja otimizar, como, por exemplo, preservação de resolução da imagem, melhor correlação entre sujeitos ou outros. Para este estudo, o FWHM escolhido foi de 6 mm que se mostrou como o melhor candidato em estudo prévio (MIKL *et al*., 2008).

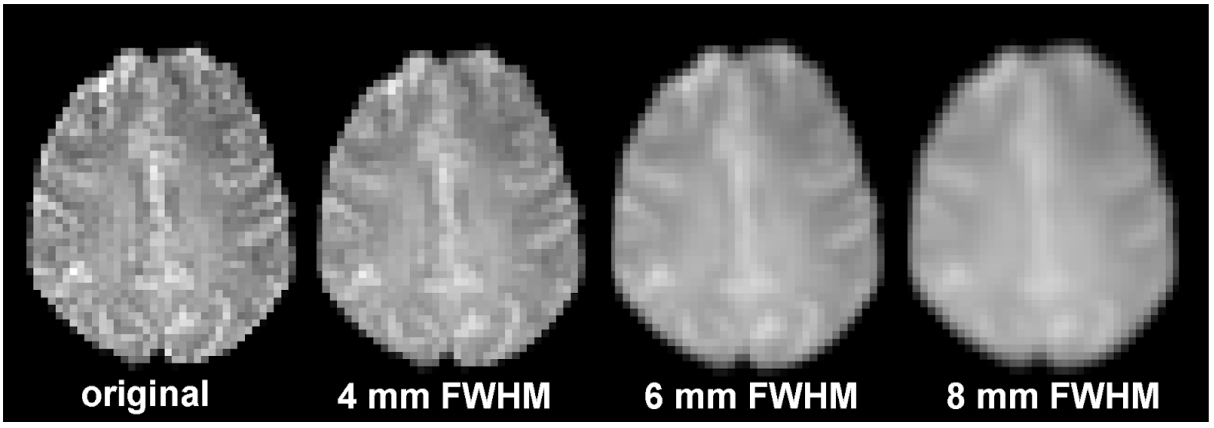

Figura 18 - Exemplo do efeito da suavização espacial em corte um corte transversal com utilização de filtros gaussianos com larguras à meia altura (FWHM, do inglês, *Full Width at Half Maximum*) de 4, 6 e 8 milímetros (Disponível em: support.brainvoyager.com/brainvoyager/).

FILTRO TEMPORAL

Em uma aquisição de MRf, estuda-se o comportamento de um indivíduo em certo intervalo de tempo. Porém, nesse intervalo, tanto as informações que são relevantes para o estudo quanto aquelas que o atrapalham são adquiridas. Existem diversos fatores que podem influenciar na contaminação do sinal desejado, por exemplo, os parâmetros de aquisição e a intensidade do campo principal (RAJ *et al*., 2001).

Tendo em mente que esse sinal pode ser transformado do domínio do tempo para o domínio da frequência por uma transformada de Fourier, é possível utilizar então filtros de frequência para eliminar parte do sinal oriundos de frequências indesejadas, como por exemplo aplicar um filtro elimina banda na faixa da frequência respiratória (HUETTEL, 2008).

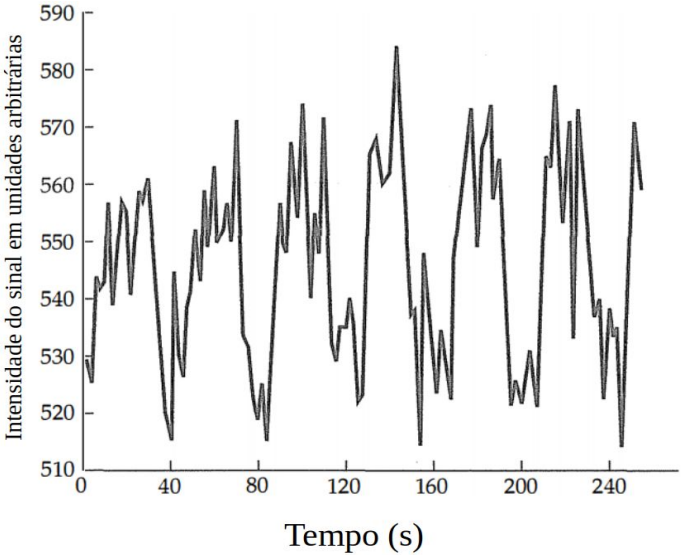

Figura 19 - Exemplo de sinal em um voxel no domínio do tempo, adaptado de Huettel (2008).

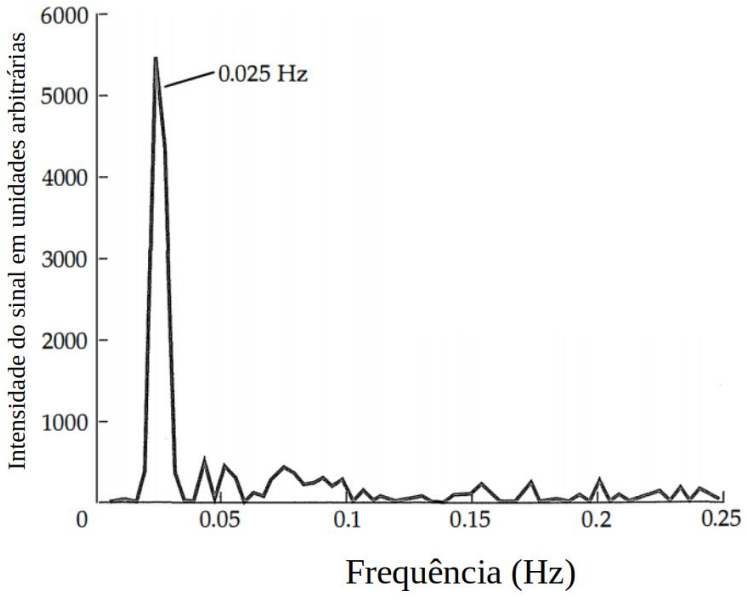

Figura 20 - Exemplo de sinal em um voxel no domínio da frequência, adaptado de Huettel (2008).

Para o pré-processamento das imagens adquiridas nesse experimento, foram usados filtros para remover as frequências abaixo de 10 mHz (100 s).

CORREÇÃO TEMPORAL PARA FATIAS

No momento em que ocorre a seleção e a excitação por um pulso de radiofrequência em uma determinada fatia na RM, também costumam ocorrer esses dois fenômenos nas regiões próximas a essa fatia, ou seja, nas fatias adjacentes. Dessa maneira, se as fatias fossem adquiridas em sequência, uma dada fatia *n+1* sofreria a com uma contaminação com os pulsos que foram dados para a fatia *n* (PARKER *et al*., 2014).

Visando reduzir essa contaminação, a aquisição das fatias é feita não sequencialmente, sendo o mais comum fazer a aquisição (e utilizada nesse trabalho) de todas as fatias ímpares seguido das pares. Esse processo, entretanto, acaba introduzindo um segundo problema: as fatias *n* e *n+1* estão afastadas temporalmente e, dessa maneira, ao montar-se a imagem inteira da ressonância, haveria uma falta de coerência entre a sequência

de fatias. Essa distorção é, porém, corrigida por interpolação temporal das fatias (HUETTEL, 2008).

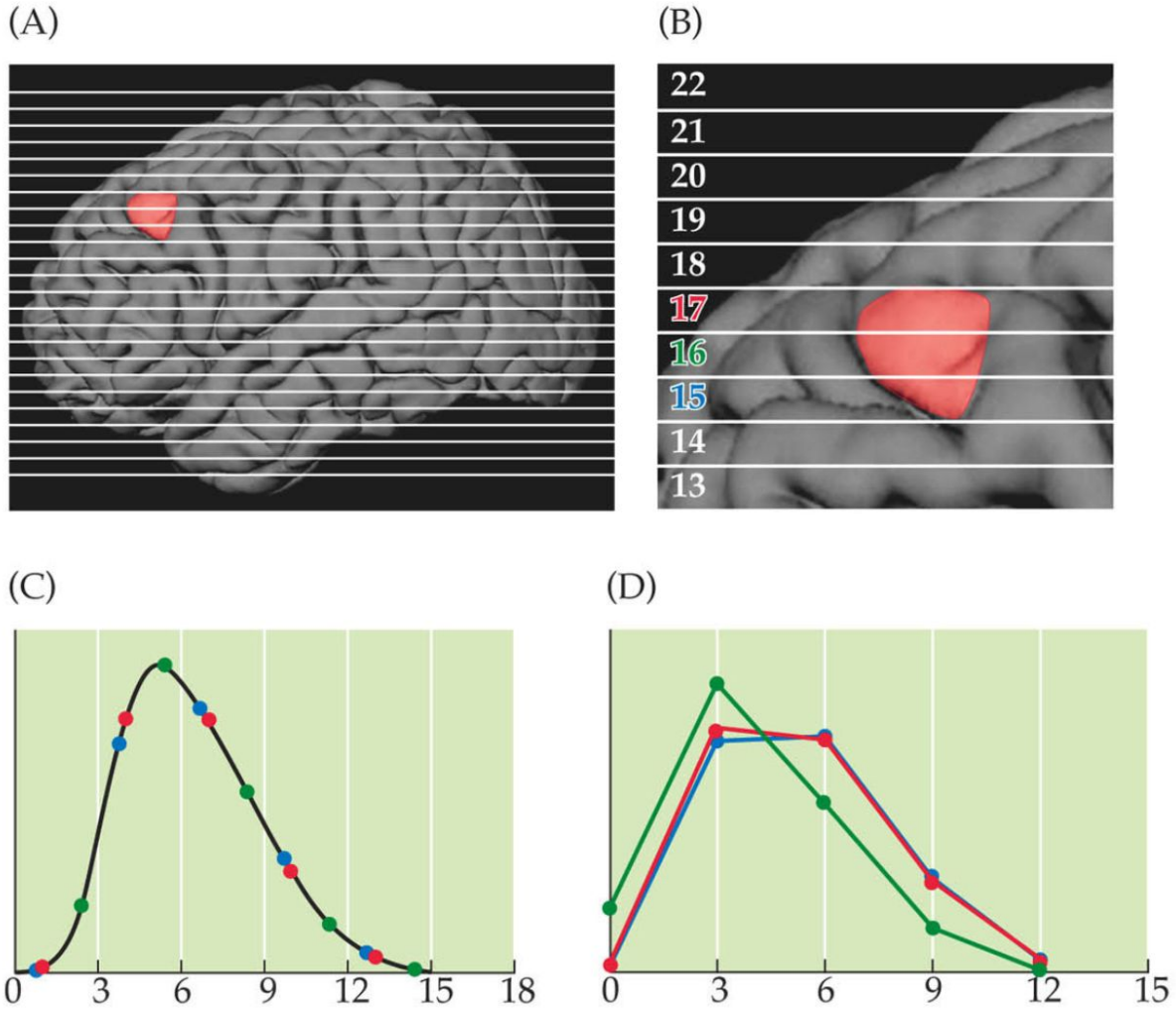

Figura 21 - Ilustração retirada de Huettel (2008) da ativação de uma região (A) que teve sua aquisição feita de maneira alternada (B), em que as fatias ímpares foram adquiridas primeiro, seguido das pares; nesse exemplo estavam afastadas por intervalo de 3 segundo, ou seja, TR = 3 s. Se os dados coletados (D) forem corretamente corrigidos temporalmente, forma-se a HDR (C).

CORREGISTRO

São usados dois protocolos de aquisição na RM, um fará a aquisição da imagem de RMf, que possui resolução temporal alta e espacial baixa, e o outro para a imagem anatômica, que possuiu a relação inversa entre as duas resoluções. É necessário então que se combine as

duas imagens adquiridas com os diferentes protocolos para conseguir correlacionar uma ativação detectada pela RMf com sua devida região cerebral.

NORMALIZAÇÃO

Para que seja possível comparar os cérebros de cada voluntário é preciso normalizá-los, isto é, é preciso compensar os diferentes tamanhos e formatos para que haja uma correspondência entre as regiões cerebrais, possibilitando posteriormente. Existem dois principais modelos para se fazer a normalização: Talairach (Talairach & Tournoux, 1988) e ICBM-152 (Mazziotta *et al*., 2001).

Para o estudo foi utilizado o ICBM-152 6^{th} generation que é um molde (*template*) criado a partir de uma média de 7000 indivíduos normais de diferentes etnias, países e sexos e dos quais 342 eram gêmeos (metade mono e metade dizigótico). Todos se encontram na faixa etária de 18 a 90 anos de idade. Com um número tão grande de indivíduos e seguindo o Teorema do Limite Central é possível se aproximar da variância populacional (MAZZIOTTA *et al*., 2001). Essa abordagem para criação do molde é chamada de probabilística e se contrasta da abordagem usada na criação dos primeiros moldes, que era o estudo um único indivíduo com delimitação manual de cada uma das regiões cerebrais (MAZZIOTTA *et al*., 1995).

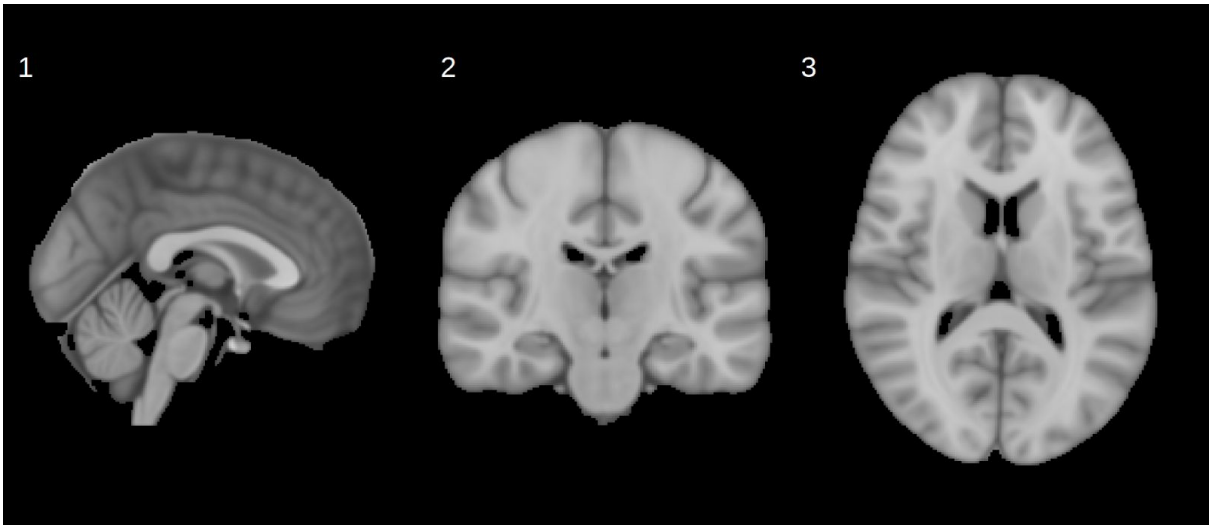

Figura 22 - Modelo utilizado como molde em cortes sagital (1), coronal (2) e transversal (3).

ANÁLISE DE GRUPO

A análise de grupos é feita com duas ferramentas do software FSl denominadas Dual Regression e Randomise. A primeira ferramenta realiza uma *back reconstruction* para cada indivíduo, tanto espacial e temporalmente, utilizando os dados encontrados pelo MELODIC sobre cada uma das redes (BECKMAN, 2009). Assim, a Dual Regression consiste em criar mapas de rede para cada indivíduo a partir dos dados médios de rede.

Uma vez que os mapas temporais e espaciais estão construídos, o Randomise se encarrega de realizar *n* permutações comparando as distribuições probabilísticas dos *voxels* de uma determinada rede de um grupo que neste estudo foram os grupos pré-ingestão e pós-ingestão. As comparações são Testes T de Student que posteriormente são transformados em valor de p (WINKLER *et al*., 2014).

A matriz de correlação entre sujeitos e grupos foi feita criada com o FEAT (fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FEAT) e foram feitos duas (2) comparações entre grupos, uma considerando-se a hipótese de que haveria um aumento na conectividade das redes cerebrais dos voluntários antes do uso da Ayahuasca e, na outra hipótese, de que haveria uma diminuição na conectividade destas redes.

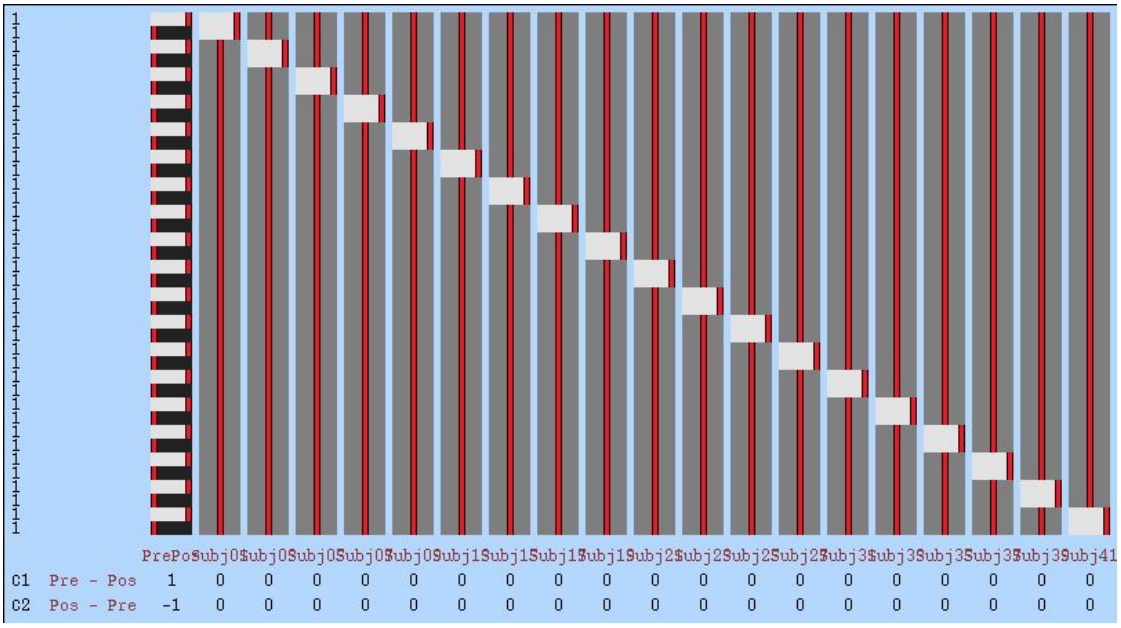

Figura 23 - Imagem dos contrastes utilizados para a análise de grupo.

CORREÇÃO DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES

O número de *voxels* a serem analisados em uma imagem de ressonância depende do número de fatias e do tamanho da matriz. No protocolo realizado neste estudo, o menor número de *voxels* a ser trabalhado é gerado pelo protocolo com matriz e número de fatias de 256x256 e 128, respectivamente. Com esses valores o número de *voxels* é de 256 x 256 x 128, que é aproximadamente 8,4 milhões.

Com um número tão grande de *voxels* para passarem por testes estatísticos, é provável que haja um número considerável de resultados falso-positivos. Usando o caso anterior e considerando um nível de significância de 0,05, é possível que sejam encontrados mais de 400 mil falsos-resultados.

A fim de se corrigir o valor de p encontrado nos múltiplos testes estatísticos encontrados, foi estimado o valor *Family-wise Error* (FWE) com o método de Bonferroni e apresentado o valor de p já corrigido.

RESULTADOS

Foram encontradas no total 30 redes pelo MELODIC. Dessas apenas 4 foram classificadas como redes funcionais cerebrais já conhecidas, apresentadas na figura 24. Das 4 redes, apenas as redes de saliência e a de controle executivo mostraram resultado significativo, considerando um valor de significância de 5%, no teste que comparou um aumento da atividade no momento posterior a ingestão da Ayahuasca. Os valores de p-corrigidos para múltiplas comparações foram de 0,03 e 0,05, respectivamente.

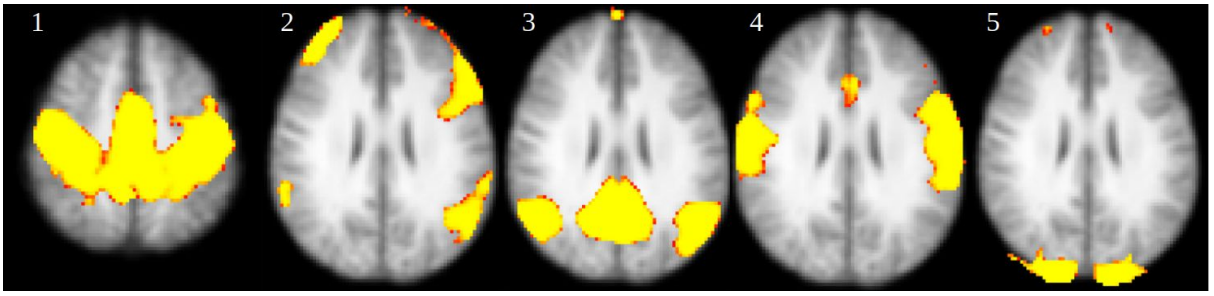

Figura 24 - Redes funcionais encontradas no estudo: somatossensorial (1), controle-executivo (2) , DMN (3), saliência (4) e visual (5).

Na análise das escalas psicométricas, houve uma diminuição significativa apenas para a classe de ansiedade, considerando-se um nível de significância de 5% em um teste bi-caudal. Os resultados são apresentados na tabela 2.

	Pré-ingestão		Pós-ingestão		
Classes	Média	DP	Média	DP	Valor p
Ansiedade	23,25	12,27	14,91	12,40	0.01*
Sedação Mental	35,57	18,38	23,83	18,30	0.01*
Prejuízo Cognitivo	26,48	12,35	22,86	13,67	0.34
Desconforto	17,19	10,47	14,05	12,78	0.20

Tabela 2 - Resultados das médias e seus desvios padrões para cada uma das classes da escala VAMS, assim como o resultado estatístico de diferença dessas categorias.* - indica resultado positivo no teste.

DISCUSSÃO

Em primeira instância, nota-se que as redes visual e a somatossensorial foram encontradas pelo FSL, tanto antes quanto após a ingestão da Ayahuasca. Em estudos anteriores, foram observadas mudanças na conectividade dessas duas redes associadas aos efeitos da ingestão da Ayahuasca (DE ARAÚJO *et al*., 2012, RIBA *et al*., 2003, DOS SANTOS *et al*., 2016) e também por outros psicodélicos como psilocibina e MDMA (ROSEMAN *et al*., 2014). Portanto, a ausência de modulação dessas redes sensoriais pela ingestão da Ayahuasca, seja aumento ou redução, sugere que a dose ingerida pelos voluntários pode ter sido baixa o suficiente para não promover os efeitos sensoriais geralmente observados no uso da Ayahuasca e outros psicodélicos.

Além dessas redes sensoriais, ressalta-se as 3 redes mais representativas da conectividade em repouso (DAMOISEAUX *et al*., 2006, GREICIUS *et al*., 2008, VARGAS; LÓPEZ-JARAMILLO; VIETA, 2013) das quais as redes de controle-executivo e saliência tiveram um aumento de conectividade no presente estudo, enquanto não foi observada uma diferença significativa para a rede DMN antes e após a ingestão da Ayahuasca. A identificação das 3 redes características do estudos em repouso também sugere, além do discutido, que de fato a montagem experimental do estudo ocorreu de maneira adequada, ou seja, os voluntários seguiram as instruções fornecidas para que permanecessem em repouso.

A DMN se mostra como uma importante componente na psiquiatria para os estudos de psicodélicos (PALHANO-FERNANDES *et al*., 2015, NOUR; CARHART-HARRIS, 2017, BOUSO *et al*., 2015). Alterações no padrão de conectividade dessa rede DMN, assim como nas redes sensoriais (visual e somatossensorial), podem estar relacionados com a mudança do estado de consciência individual (PALHANO-FONTES *et al*., 2015). Portanto, ausência de diferença no resultado da análise por ICA para esta rede DMN pode reforçar os resultados observados nas redes sensoriais, com ausência de modulação dessas redes antes e após a ingestão, além da evidência auto-relatada pelos voluntários de que os efeitos sensoriais

após a ingestão da Ayahuasca foram raramente reportados. Portanto, baseado numa dose baixa, era esperado que não fosse encontrado um resultado nessa rede DMN.

As duas outras redes observadas, de controle-executivo e de saliência, estão associadas a retenção de memória de trabalho e processamento de emoções pelo cérebro e possuem papel central em estudos que avaliam tratamentos para pacientes portadores de doenças mentais como distúrbio depressivo maior. Na literatura, vem sendo mostrado uma associação entre um maior nível de conectividade cerebral nessas duas redes de pessoas saudáveis em relação a pacientes com depressão (BRAKOWSKI *et al*., 2017). Em especial, no caso da rede de saliência, por ela incluir anatomicamente a ínsula, deve-se dar ainda mais relevância para este estudo visto que essa região é responsável por boa parte do processamento emocional de dor e de medo (MENON; UDDIN, 2011). Essas características relevantes para se entender distúrbios psicológicos e, eventualmente, sugerir-se tratamentos (PETERS et al., 2016). Afinal, a rede de saliência proporciona uma mudança da percepção individual do ambiente ao seu redor. Por exemplo, pode-se pensar no seguinte caso: a capacidade distinguir barulhos não preocupantes, como o som do impacto de um lápis ao cair no chão, de outros que sejam preocupantes, como uma explosão. Na primeira parte do exemplo, não é de se esperar um susto tão grande nem a mudança para um estado ansioso. Na segunda, por outro lado, é de se esperar maior ansiedade, maior atenção ou, como a própria rede indica, maior saliência.

Os testes estatísticos das escalas psicométricas mostram que não houve aumento de desconforto ou de prejuízo cognitivo. Assim percebe-se que os voluntários foram suficientemente engajados no experimento, que não ingeriram uma dose tão alta e, também que eles não se sentiram menos acordados ou menos concentrados para a aquisição do segundo exame de RMf.

Ainda na análise das escalas, observa-se uma redução do grau de ansiedade e do grau de sedação mental. Esse resultado corrobora as análises feitas por ICA, uma vez que tem sido mostrado a correlação entre uma baixa atividade da redes funcionais na região da amígdala e no córtex pré-frontal com uma variedade de distúrbios de ansiedade (HAHN *et al*. 2011;

SYLVESTER *et al*. 2012). Utilizando a perspectiva mostrada por essa evidência, é então possível supor que o aumento da atividade das redes de saliência e de controle-executivo estejam relacionados com a redução da ansiedade relatada pelos voluntários. A junção de ambas as análises, de escalas e de ICA, trilha o mesmo caminho de outras pesquisas que revelam o potencial terapêutico deste chá, Ayahuasca, antidepressivo, de aumento do bem-estar individual e outros (DOS SANTOS *et al*., 2016).

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados tanto pela análise de conectividade quanto pelas escalas psicométricas fortalecem o entendimento de que a Ayahuasca tem potencial de facilitar as funções cognitivo-emocionais. Em especial as funções envolvidas nas redes de saliência e de controle executivo central como, por exemplo, controle da atenção e julgamento e tomada de decisões emotivas. Entretanto, ainda será necessário que estudos futuros façam uma investigação mais profunda para os efeitos causados pela variação da dose ingerida, assim como uma diversificação da amostragem populacional para que se possa tirar conclusões sobre um público mais abrangente, como, por exemplo, uma população portadora de depressão.

REFERÊNCIAS

BARBANOJ, Manel J. et al. Daytime Ayahuasca administration modulates REM and slow-wave sleep in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 196, n. 2, p. 315-326, 2008.

BECKMANN, Christian F. et al. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1457, p. 1001-1013, 2005.

BECKMANN, Christian F. et al. Group comparison of resting-state FMRI data using multi-subject ICA and dual regression. **Neuroimage**, v. 47, n. Suppl 1, p. S148, 2009.

BRAKOWSKI, Janis et al. Resting state brain network function in major depression–depression symptomatology, antidepressant treatment effects, future research. **Journal of psychiatric research**, v. 92, p. 147-159, 2017.

BRESSLER, Steven L.; MENON, Vinod. Large-scale brain networks in cognition: emerging methods and principles. **Trends in cognitive sciences**, v. 14, n. 6, p. 277-290, 2010.

BOUSO, José Carlos et al. Long-term use of psychedelic drugs is associated with differences in brain structure and personality in humans. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 483-492, 2015.

BUCKNER, Randy L.; ANDREWS‐HANNA, Jessica R.; SCHACTER, Daniel L. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1124, n. 1, p. 1-38, 2008.

CHEN, Ashley C. et al. Causal interactions between fronto-parietal central executive and default-mode networks in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 49, p. 19944-19949, 2013.

DAMASIO, Hanna et al. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1102-1105, 1994.

DAMOISEAUX, Jessica S. et al. Consistent resting-state networks across healthy subjects. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 103, n. 37, p. 13848-13853, 2006.

DE ARAUJO, Draulio B. et al. Seeing with the eyes shut: neural basis of enhanced imagery following ayahuasca ingestion. **Human brain mapping**, v. 33, n. 11, p. 2550-2560, 2012.

DOS SANTOS, Rafael G. et al. The current state of research on ayahuasca: A systematic review of human studies assessing psychiatric symptoms, neuropsychological functioning, and neuroimaging. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 12, p. 1230-1247, 2016.

GUERRA-CARRILLO, Belén; MACKEY, Allyson P.; BUNGE, Silvia A. Resting-state fMRI: a window into human brain plasticity. **The Neuroscientist**, v. 20, n. 5, p. 522-533, 2014.

GREICIUS, Michael. Resting-state functional connectivity in neuropsychiatric disorders. **Current opinion in neurology**, v. 21, n. 4, p. 424-430, 2008.

HAHN, Andreas et al. Reduced resting-state functional connectivity between amygdala and orbitofrontal cortex in social anxiety disorder. **Neuroimage**, v. 56, n. 3, p. 881-889, 2011.

HUETTEL, Scott A. et al. **Functional magnetic resonance imaging**. 2. ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2008.

HUETTEL, Scott A.; MCCARTHY, Gregory. Evidence for a refractory period in the hemodynamic response to visual stimuli as measured by MRI. **Neuroimage**, v. 11, n. 5, p. 547-553, 2000.

KIM, Seong-Gi; OGAWA, Seiji. Biophysical and physiological origins of blood oxygenation level-dependent fMRI signals. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1188-1206, 2012.

LANG, Peter J. The emotion probe: studies of motivation and attention. **American psychologist**, v. 50, n. 5, p. 372, 1995.

MAZIERO, Danilo et al. Towards motion insensitive EEG-fMRI: Correcting motion-induced voltages and gradient artefact instability in EEG using an fMRI prospective motion correction (PMC) system. **NeuroImage**, v. 138, p. 13-27, 2016.

MAZZIOTTA, John et al. A probabilistic atlas and reference system for the human brain: International Consortium for Brain Mapping (ICBM). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1412, p. 1293-1322, 2001.

MAZZIOTTA, John C. et al. A probabilistic atlas of the human brain: Theory and rationale for its development: The international consortium for brain mapping (icbm). **Neuroimage**, v. 2, n. 2, p. 89-101, 1995.

MENON, Vinod; UDDIN, Lucina Q. Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function. **Brain Structure and Function**, v. 214, n. 5-6, p. 655-667, 2010.

MIKL, Michal et al. Effects of spatial smoothing on fMRI group inferences. **Magnetic resonance imaging**, v. 26, n. 4, p. 490-503, 2008.

NOUR, Matthew M.; CARHART-HARRIS, Robin L. Psychedelics and the science of self-experience. **The British Journal of Psychiatry**, v. 210, n. 3, p. 177-179, 2017.

OGAWA, Seiji et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 24, p. 9868-9872, 1990.

PALHANO-FONTES, Fernanda et al. The psychedelic state induced by ayahuasca modulates the activity and connectivity of the default mode network. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0118143, 2015.

PALHANO-FONTES, Fernanda et al. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. **Psychological medicine**, v. 49, n. 4, p. 655-663, 2019.

PARKER, David et al. Retrospective detection of interleaved slice acquisition parameters from fMRI data. In: **2014 IEEE 11th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)**. IEEE, 2014. p. 37-40.

PAULING, Linus; CORYELL, Charles D. The magnetic properties and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 22, n. 4, p. 210-216, 1936.

PETERS, Sarah K.; DUNLOP, Katharine; DOWNAR, Jonathan. Cortico-striatal-thalamic loop circuits of the salience network: a central pathway in psychiatric disease and treatment. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 10, p. 104, 2016.

PIGOTT, H. Edmund et al. Efficacy and effectiveness of antidepressants: current status of research. **Psychotherapy and psychosomatics**, v. 79, n. 5, p. 267-279, 2010.

PRICE, Ronald R. et al. Practical aspects of functional MRI (NMR Task Group# 8). **Medical Physics**, v. 29, n. 8, p. 1892-1912, 2002.

RAJ, Devesh; ANDERSON, Adam W.; GORE, John C. Respiratory effects in human functional magnetic resonance imaging due to bulk susceptibility changes. **Physics in Medicine & Biology**, v. 46, n. 12, p. 3331, 2001.

RIBA, Jordi et al. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 73-83, 2003.

ROSEMAN, Leor et al. The effects of psilocybin and MDMA on between-network resting state functional connectivity in healthy volunteers. **Frontiers in human neuroscience**, v. 8, p. 204, 2014.

SEELEY, William W. et al. Dissociable intrinsic connectivity networks for salience processing and executive control. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 9, p. 2349-2356, 2007.

SMITH, Hans-Jorgen; RANALLO, Frank N. **A non-mathematical approach to basic MRI**. Medical Physics Publishing Corporation, 1989.

SMITH, Stephen M. Fast robust automated brain extraction. **Human brain mapping**, v. 17, n. 3, p. 143-155, 2002.

SMITH, Stephen M. et al. Resting-state fMRI in the human connectome project. **Neuroimage**, v. 80, p. 144-168, 2013.

SYLVESTER, C. M. et al. Functional network dysfunction in anxiety and anxiety disorders. **Trends in neurosciences**, v. 35, n. 9, p. 527-535, 2012.

TALAIRACH, Jean. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain-3-dimensional proportional system. **An approach to cerebral imaging**, 1988.

VARGAS, Cristian; LÓPEZ-JARAMILLO, Carlos; VIETA, Eduard. A systematic literature review of resting state network—functional MRI in bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 150, n. 3, p. 727-735, 2013.

WEI, Maobin et al. Abnormal dynamic community structure of the salience network in depression. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 45, n. 4, p. 1135-1143, 2017.

WINKLER, Anderson M. et al. Permutation inference for the general linear model. **Neuroimage**, v. 92, p. 381-397, 2014.

WOOLRICH, Mark William et al. Mixture models with adaptive spatial regularization for segmentation with an application to fMRI data. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 24, n. 1, p. 1-11, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. World Health Organization, 2017.

YANG, Yihong et al. A CBF-based event-related brain activation paradigm: Characterization of impulse–response function and comparison to BOLD. **Neuroimage**, v. 12, n. 3, p. 287-297, 2000.

ANEXO 1

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA – DEPTO. DE RADIOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EFEITOS DA AYAHUASCA NO CÉREBRO.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO PACIENTE:_____

O Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa científica, que busca investigar a os efeitos da ayahuasca nas emoções em um estudo por imagem. Nesta pesquisa serão avaliadas possíveis diferenças na resposta emocional antes e após a ingestão da Ayahuasca por meio da técnica de imagem por Ressonância Magnética (RM) e de questionários psicológicos,objetivando identificar o potencial do uso da Ayahuasca no tratamento da depressão.

Para estar apto a participar, você não deve:

- Apresentar história de diagnóstico para doenças neurológicas ou psiquiátricas.

- Fazer uso de medicamentos ou outras drogas com ação no SNC.

- Possuir implantes metálicos no corpo (ex. marcapasso, próteses, stents, clipes de aneurisma, projétil de arma de fogo, dentre outros.

- Ter claustrofobia.

Justificativa do estudo: identificar alguns riscos e benefícios no uso da Ayahuasca.

Este estudo será realizado em duas etapas, sem nenhum custo ao paciente. Etapa 1: ressonância magnética (duração estimada de 40 minutos) pré e após a ingestão de Ayahuasca - realizada no serviço de Ressonância Magnética do Setor de Radiodiagnóstico do Hospital Universitário (HUCFF), em um dia a ser definido; Etapa 2: avaliação psicológica (duração estimada de 15 minutos) por questionários no mesmo dia do exame de ressonância.

O Sr.(a) será solicitado(a) a comparecer no local descrito no período da tarde, em um horário previamente agendado, que vai das 12 às 19 horas, de uma segunda-feira ou sábado. A avaliação tem duração total de aproximadamente 2 horas.

Caso concorde voluntariamente de participar desse projeto, será solicitado a responder algumas perguntas sobre seus dados pessoais e história clínica. Depois, responderá alguns questionários que visam avaliar os traços psicológicos relacionados ao estado emocional, humor, ansiedade e nível de *stress* de acordo com perguntas específicas. Os questionários psicológicos não oferecem nenhum risco a sua integridade física.

Vale ressaltar que o tipo de ressonância que será realizada pelo estudo não tem importância de conduta clínica,somente finalidade de pesquisa científica.

Você não terá nenhum benefício imediato, ao realizar o exame. Porém, ao participar desse estudo, estará contribuindo grandemente para o avanço científico em descobrir os efeitos da Ayahuasca de caráter emocional no cérebro humano, e quais os possíveis benefícios e aplicações medicinais que a bebida pode trazer.Quando publicado, estes dados poderão contribuir para novos estudos ou métodos de tratamento.

A sua participação neste estudo não envolve nenhum tipo de risco à sua saúde.O exame de ressonância não usa radiação, apenas campos magnéticos. Também, não será administrado material de contraste para o exame.O único desconforto poderá ocorrer com pessoas claustrofóbicas, já que será necessário permanecer por cerca de 40 minutos,deitado e imóvel, dentro de um tubo fechado, sob barulho frequente. As pessoas que tiverem sensação de claustrofobia podem interromper o exame a qualquer momento sem qualquer prejuízo.

Esclarecemos que, caso alguma anormalidade seja detectada durante RMf ou testagem neuropsicológica, garantimos que estas informações serão fornecidas a você e, se autorizar, também ao seu médico.

Os dados obtidos serão utilizados apenas para os fins da presente pesquisa, e serão mantidos em sigilo. A sua identidade também será mantida em total sigilo. Isso significa que seu nome nunca será revelado e você vai sempre ser identificado por um número e três letras, das suas iniciais, em todos os relatórios ou publicações que possam ser produzidos a partir desta pesquisa.

O Sr (a). tem a garantia de que se surgirem dúvidas sobre a pesquisa durante qualquer período seja antes ou durante o curso do estudo, elas serão prontamente solucionadas, basta perguntar.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável - Prof. Dr. Tiago Arruda Sanchez- que poderá ser encontrado através do telefone: **(21) 98173-7000**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.º 255 – Cidade Universitária/ Ilha do Fundão – Sala 01D-46/1º andar – pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas, ou através do email: cep@hucff.ufrj.br .

O Sr.(a) possui o direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, bem como tem total liberdade de aceitar ou não a participação no experimento, o que inclui a possibilidade de desistência a qualquer momento.

Não haverá despesa pessoal referente aos procedimentos, já que os custos do experimento são arcados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ. Não há remuneração para qualquer fase da avaliação, visto que não é permitido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Todo dinheiro gasto pelo Sr (a). ou por seus acompanhantes decorrente da sua participação na pesquisa, como transporte e alimentação, serão reembolsados em dinheiro pelo pesquisador principal.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos nesse estudo e que seja devidamente comprovado, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o Prof. Dr. Tiago Arruda Sanchez, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e outra ficará com a pesquisadora responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e a pesquisadora responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar a última página.

Nome do Participante ou Representante Legal: _____

_____
Assinatura do Participante ou Representante Legal

Data ___/___/___

_____
Prof. Dr. Tiago Arruda Sanchez (Pesquisador Responsável)

Data ___/___/___

ANEXO 2

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Faculdade de Medicina – Departamento de Radiologia

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

Laboratório de Neuroimagem Convencional e Avançada

QUESTIONÁRIO SOBRE O VOLUNTÁRIO

Nome:_____Data:_____CÓDIGO: _____
Telefone/Celular:_____
E-mail:_____
Data de nascimento: _____ ( )Destro ( )Canhoto Sexo: ( )M ( )F
Profissão/ formação: _____
Possui algum metal ou próteses no corpo? Qual onde? _____
Já fez alguma cirurgia? Qual?_____
Você usa óculos ou lentes de contato? ( )Sim ( )Não Qual grau?_____
Qual o tipo de alteração oftalmológica?
( )Miopia ( )Astigmatismo ( )Estrabismo ( )Hipermetropia ( ) Outra alteração:_____
Você teve uma dessas doenças neurológicas ou psiquiátricas diagnosticadas por um médico?
( )Depressão ( )Ansiedade ( )Pânico ( )Fobia ( )Distúrbio maníaco-depressivo

( )Distúrbio obsessivo-compulsivo ( ) Outra? Qual ? _____

Você apresenta tontura frequente? ( )Sim ( )Não
Você passou por alguma situação de grande estresse recentemente?
( ) Não ( ) Sim O quê? _____Quando? _____
Faz uso de continuado de medicamentos e outras drogas (lÍcitas ou ilícitas)?
( ) Não ( ) Sim Qual?
_____
Você ingere bebidas alcoólicas frequentemente? Quantas vezes por semana? _____
Você é fumante? ( ) Sim ( ) Não

OBSERVAÇÕES

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

ANEXO 3

O MELODIC-FSL é uma ferramenta que pode ser utilizada tanto por linha de comando (CLI, do inglês, *Command Line Interface*) quanto por interface gráfica (GUI, do inglês, *Graphical User Interface*; figura 25). O CLI permite criar *scripts* (linhas de comando de programação a serem executadas pelo sistema operacional) para se fazer o processamento de maneira mais automática, assim como, utilizar cada uma das etapas de processamento de maneira independente e manipulá-las de maneira mais detalhada. O GUI é mais simples e seguro de se usar pois limita o usuário, porém não traz essas vantagens de uso independente das ferramentas e todas elas devem ser usadas seguindo uma sequÊncia pré-determinada.

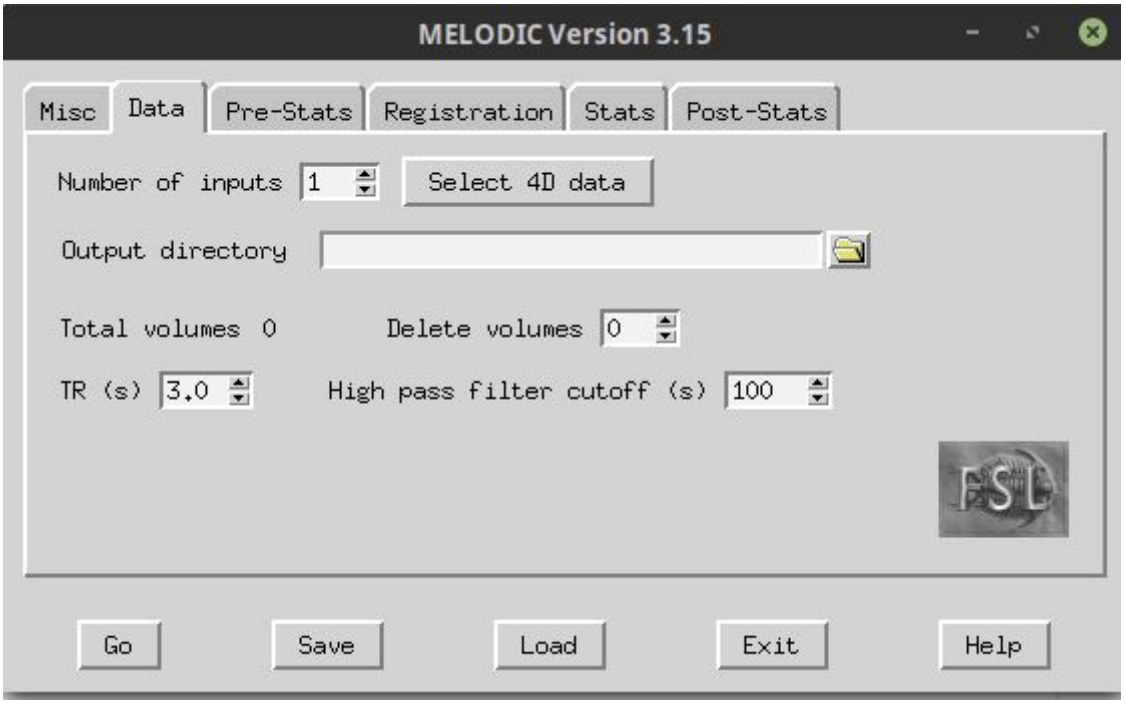

Figura 25 - Tela inicial do GUI do FSL.

Como esse foi o primeiro estudo a ser realizado com o MELODIC-FSL pelo laboratório, optou-se por usar o GUI para assegurar que não haveria um erro de processamento causado por má utilização do software. O GUI contém regiões para a entrada de cada um dos dados necessários para a análise: imagens de RMf brutas, imagens do encéfalo já selecionado (apesar de existir a opção de selecionar os *voxels* do encéfalo a partir

de uma imagem anatômica bruta e que é indicado pela opção BET) e a imagem que contém template normalizado.

As opções de filtros a serem escolhidos também podem ser selecionadas com facilidade com a simples inserção dos valores desejados em caixas dedicadas a suas respectivas variáveis, como mostrado na figura 26. Para o filtro passa-alta, insere-se o valor de corte medido em segundos, para a suavização espacial, o valor da largura a meia altura do borramento gaussiano, e para a correlação temporal, a ordem de contagem apropriada das fatias.

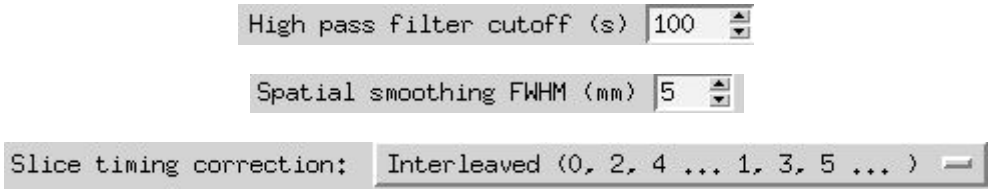

Figura 26 - Caixas de entrada de valores do FSL. De cima para baixo, as opções são: filtro passa-alta, suavização espacial e a correlação temporal das fatias.

As informações obtidas na saída de dados do MELODIC-FSL são médias das redes que compuseram a entrada de dados funcionais de RMf de todos os grupos a serem analisados. Com esses resultados em mãos é possível então partir para a análise de grupo que começa pela criação de uma matriz de correlação entre sujeitos dos grupos através da ferramenta GLM-FSL, como indicado na figura 27. Note que nesse exemplo, os *inputs* 1 a 4 são as imagens de RMf na mesma ordem em que foram colocados no MELODIC-FSL. Portanto, se o *input* 1 estiver pareado com o *input* 2, isto é, pertencerem ao mesmo indivíduo (indicado por EV1) e quiser-se testar a diferença entre eles, isso deve ser indicado como valores 1 e -1 na matriz de seleção, também indicado na figura 27.

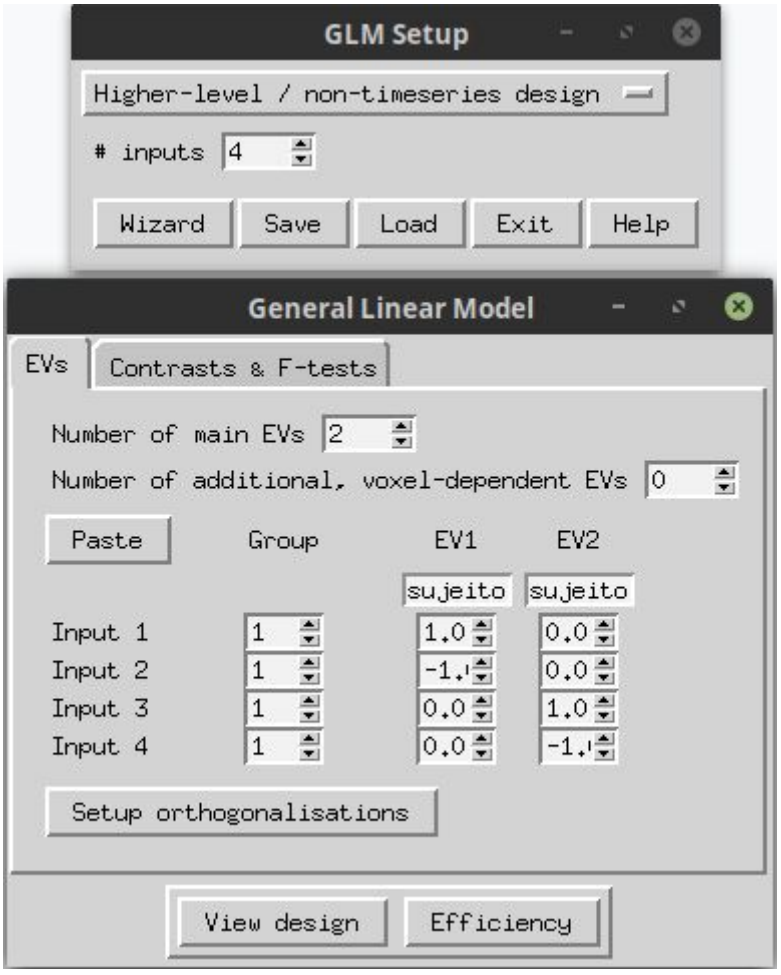

Figura 27 - Organização dos dados para testes estatísticos entre grupos.

Com a matriz de correlação criada, o passo seguinte envolve necessariamente o uso de CLI para realizar a reconstrução das redes, desta vez para cada grupo, utilizando os dados do MELODIC-FSL. Somente então pode-se fazer o teste de hipótese. O comando a ser rodado é o *dual_regression*, que recebe, nesta ordem, os seguintes argumentos:

- Direção da pasta que contém o *output* do MELODIC-FSL;
- Número inteiro 0 ou 1 para se fazer um normalização temporal dos dados;
- Matriz de organização dos dados dos *inputs* de cada indivíduo;
- Matriz que determina qual teste deve ser realizado (diferença entre grupos ou outro teste);
- Número de permutações que devem ser feitas;
- Direção da pasta para salvar os resultados da análise de grupo;

- Direção de todos os arquivos que contém os dados de RMf de todos os indivíduos de todos os grupos.

```
~ $ dual_regression melodic_output.gica/groupmelodic.ica/melodic_IC 1 designs/de
sign.mat designs/design.con 5000 dualreg_output `cat melodic_output.gica/.fileli
st`
```

Figura 28 - Comando *dual_regression* no terminal.

O resultado final pode então ser analisado com um outro comando, o *fslstats*. Os resultados numéricos mostram os menores e maiores valores de 1-p, note que não é o valor de p em si, que foram encontrados nas comparações feitas entre grupos por cada rede encontrada no MELODIC-FSL. As redes em si são diferenciadas por serem arquivos distintos e seguem a mesma ordem das redes geradas pelo MELODIC-FSL.

```
~ $ fslstats dualreg_output/dr_stage3_ic00${i}_tfce_corrp_tstat2.nii.gz -R;
```

Figura 29 - Comando *fslstats* no terminal.