

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

EFEITOS DA MESCALINA E DA DIETILAMIDA DO ÁCIDO LISÉRGICO (LSD) NO FLUXO GLICOLÍTICO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Trabalho submetido por
Inês Filipa Ferra da Silva Martins
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

novembro de 2024

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

EFEITOS DA MESCALINA E DA DIETILAMIDA DO ÁCIDO LISÉRGICO (LSD) NO FLUXO GLICOLÍTICO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Trabalho submetido por
Inês Filipa Ferra da Silva Martins
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Trabalho orientado por
Doutor Alexandre Quintas

e coorientado por
Doutor Carlos Família e Doutora Catarina Almeida

novembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Paula e Urbano Martins, por me terem permitido estudar dentro da área que preenche o meu coração, por terem sido sempre os meus maiores fãs, por nunca me deixarem desistir nos momentos mais difíceis e por acreditarem sempre em mim com todas as suas forças, não só nos últimos anos, mas em todas as fases da minha vida. Agradeço também à minha irmã, Catarina Martins, pelo carinho e apoio incondicionais.

Ao meu namorado, Tomás João: obrigada por teres sido um pilar essencial nesta etapa, tal como sempre tens sido desde que entraste na minha vida. Obrigada por todo o amor que fazes questão de demonstrar todos os dias, por me ensinares tanto e por me ajudares a crescer. Sei que há muitas decisões pelas quais temos de passar ao longo do tempo, mas tenho a certeza que estar ao teu lado foi, é e será sempre a decisão mais acertada de todas.

Quero agradecer às seguintes pessoas por me acompanharem e nunca permitirem que me sinta só e desamparada: aos meus tios Miguel e Patrícia Cardoso, aos meus primos Tiago e Filipa Cardoso e aos meus “sogrinhos” Isidro e Fátima João. Irei sempre guardar-vos num cantinho muito especial do meu coração.

Costuma dizer-se que os amigos são a família que escolhemos e eu sei que escolhi a melhor família de todas. Agradeço com todo o meu coração aos meus amigos que sempre acreditaram em mim. A vida é mais bonita e menos complicada ao vosso lado. Adoro-vos para sempre.

Agradeço profundamente aos meus orientadores, Professor Doutor Alexandre Quintas, Professor Doutor Carlos Família e Professora Doutora Catarina Almeida, por terem sempre demonstrado o seu apoio, por estarem disponíveis quando precisei e por toda a dedicação e cuidado que demonstraram. Muito obrigada por terem sido os meus guias neste percurso e por terem confiado em mim para realizar este trabalho.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à Professora Doutora Edite Oliveira Torres por ter despertado o meu interesse relativamente ao estudo das substâncias de abuso e por me ter sempre incentivado a seguir os meus sonhos e o meu

caminho na área da investigação científica. Agradeço também todos os conselhos e o carinho com que sempre me tratou, dentro e fora da sala de aula.

Às professoras Mestres Joana Couceiro e Daniela Guerreiro e Doutoradas Madalena Oom e Paula Correia da Silva, agradeço a disponibilidade que sempre demonstraram para esclarecer qualquer dúvida que tenha surgido no decorrer do meu trabalho.

A todos os professores com quem me cruzei nos últimos cinco anos, o meu mais sincero obrigada por todos os conhecimentos transmitidos e por todas as aprendizagens que certamente levarei para o resto da vida. Gostaria de destacar o Doutor Samir Ahmad que, além de ter sido um professor ao nível da excelência, me proporcionou a oportunidade de participar num projeto extracurricular e, assim, trabalhar e aperfeiçoar as minhas capacidades e a minha autonomia enquanto investigadora científica.

É difícil utilizar poucas palavras para agradecer à técnica Daniela Rente, mas darei o meu melhor para ser breve. A Daniela foi uma pessoa que entrou na minha vida de repente e que rapidamente se tornou muito especial para mim. Obrigada por toda a paciência que tiveste comigo, obrigada por todo o apoio que me deste, obrigada por me teres ajudado a manter a cabeça erguida e obrigada, acima de tudo, por seres luz na vida daqueles que contigo se cruzam.

Aos meus colegas de mestrado, obrigada por esta viagem incrível. Gostei muito de partilhar esta jornada tão complexa, cheia de altos e baixos, alegrias e tristezas com todos vocês. Nunca vos esquecerei.

Por fim, mas não menos importante, quero expressar a minha enorme gratidão ao Instituto Universitário Egas Moniz da *Egas Moniz School of Health and Science* por ter sido a minha segunda casa no decorrer do meu percurso como estudante universitária. Foi um prazer fazer parte desta instituição e sei que me foi proporcionada a melhor educação possível, tanto a nível académico, como a nível pessoal. Obrigada a todos os docentes e funcionários por me terem permitido crescer enquanto profissional e enquanto pessoa com um apoio incondicional. Irei sempre recordar todos os momentos que aqui vivi com muita saudade.

CERTIFICADO DE ORIGINALIDADE

Certifico que sou responsável pelo trabalho submetido neste relatório e que o trabalho é original, não sendo copiado ou plagiado de outra fonte, excetuando o especificado nas referências. Adicionalmente, declaro que o trabalho em si contido não foi submetido anteriormente para qualquer outro propósito.

Inês Martins

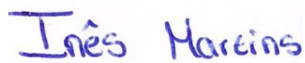
Data: 22/11/2024

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho académico é original e foi elaborado por mim própria, não se tendo recorrido a quaisquer outras fontes, para além das indicadas, usadas, adotadas literalmente ou adaptadas a partir dos seus originais (em fontes impressas, não impressas ou na internet) e encontram-se adequadas, identificadas e citadas, com observância das convenções do trabalho académico em vigor.

Mais declaro que esta Dissertação/Tese “Efeitos da Mescalina e da Dietilamida do Ácido Lisérgico no Fluxo Glicolítico de *Saccharomyces cerevisiae*” não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além da(s) diretamente envolvida(s) na sua elaboração, e que os conteúdos das versões impressa e eletrónica são inteiramente coincidentes.

Declaro, igualmente, encontrar-me ciente de que a inclusão, neste texto, de qualquer falsa declaração terá consequências legais.



Data: 22/11/2024

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Eu, Inês Filipa Ferra da Silva Martins, referente a Dissertação/Tese “Efeitos da Mescalina e da Dietilamida do Ácido Lisérgico no Fluxo Glicolítico de *Saccharomyces cerevisiae*” declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, política ou financeira.

A handwritten signature in blue ink that reads "Inês Martins". The signature is written in a cursive style with a blue highlight behind it.

Data: 22/11/2024

DECLARAÇÃO DE FINANCIAMENTO

Eu, Inês Filipa Ferra da Silva Martins, referente a Dissertação/Tese “Efeitos da Mescalina e da Dietilamida do Ácido Lisérgico no Fluxo Glicolítico de *Saccharomyces cerevisiae*” declaro que o meu trabalho se encontra financiado, no valor de 500€, pela *Egas Moniz School of Health and Science*.

Inês Martins

Data: 22/11/2024

RESUMO

A utilização de compostos psicadélicos em contextos rituais e religiosos é multicultural e tem uma origem pré-histórica. Nas sociedades humanas ancestrais, estas substâncias eram utilizadas para alterar o estado de consciência dos xamãs, colocando-os “em contacto com a divindade”. Estas substâncias foram proibidas durante governação de Richard Nixon em meados da década de 1970, tendo como consequência a estigmatização das mesmas. Avançando para finais da época de 1980, a utilização destes compostos em contexto clínico começou a renascer, com um crescimento mais acentuado nos últimos anos. O presente trabalho visa contribuir para a compreensão de mecanismos celulares e moleculares da mescalina e do LSD utilizando um modelo celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras apresentam mecanismos moleculares e celulares semelhantes às células humanas, traduzindo-se numa abordagem mais simples que permite compreender a bioquímica fundamental das células em diferentes condições. As metodologias empregues permitiram avaliar os parâmetros associados ao crescimento celular, bem como a sensibilidade e viabilidade celulares e a atividade metabólica na presença de concentrações crescentes de LSD e mescalina. Os resultados obtidos permitiram concluir que há um efeito exercido por ambos os compostos na atividade mitocondrial e, eventualmente, no fluxo glicolítico das leveduras estudadas. O presente trabalho mostra, pela primeira vez, um aumento do metabolismo celular na presença de LSD e mescalina. Esta observação poderá estar associada às melhorias detetadas clinicamente. Este é um estudo pioneiro e exploratório, pelo que será necessário repetir alguns ensaios para confirmar as conclusões apresentadas.

Palavras-chave: Ensaios de toxicidade; LSD; Mescalina; *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The use of psychedelic compounds in ritual and religious contexts is multicultural and has prehistoric origins. In ancient human societies, these substances were used to alter the state of consciousness of shamans, putting them “in touch with divinity”. These substances were banned during Richard Nixon’s administration in the mid-1970s, resulting in their stigmatization. Towards the end of the 1980s, the use of these compounds in a clinical context began to revive, with a more marked increase in recent years. This study aims to contribute to understanding the cellular and molecular mechanisms of mescaline and LSD using a cellular model of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. This yeast has similar molecular and cellular mechanisms to human cells, making this a simpler approach to understanding the fundamental biochemistry of cells under different conditions. The methodologies used made it possible to evaluate the parameters associated with cell growth, as well as cell sensitivity, viability, and metabolic activity in the presence of increasing concentrations of LSD and mescaline. The results obtained led to the conclusion that there is an effect exerted by both compounds on the mitochondrial activity and, eventually, on the glycolytic flux of the studied yeast. This study shows, for the first time, an increase in cellular metabolism in the presence of LSD and mescaline. This observation may be associated with the improvements detected clinically. This is a pioneering and exploratory study, so it will be necessary to repeat some tests to confirm the conclusions presented.

Keywords: Toxicity assays; LSD; Mescaline; *Saccharomyces cerevisiae*

ÍNDICE GERAL

Resumo.	1
Abstract.	3
Índice Geral.	5
Índice de Figuras.	7
Índice de Tabelas.	11
Lista de abreviaturas e siglas.	13
Capítulo I – Introdução.	15
1. Introdução às substâncias psicadélicas.	15
1.1. Terminologia.	15
1.2. Contexto histórico.	16
1.2.1. Mescalina.	17
1.2.2. Dietilamida do ácido lisérgico.	18
1.3. Aspetos farmacológicos.	20
1.3.1. Triptaminas indolaminas simples.	21
1.3.2. Triptaminas ergotaminas.	21
1.3.3. Fenetilaminas.	24
2. Psicadélicos, lei e relatórios de monitorização.	26
2.1. RASI 2023 e o tráfico de estupefacientes.	28
2.2. A atual situação europeia.	29
3. A possibilidade da terapia psicadélica.	30
3.1. Processos neurobiológicos.	33
3.1.1. Neuroplasticidade induzida por psicadélicos.	33
3.1.2. O envolvimento da <i>default mode network</i> .	35
3.1.3. Recetores alvo e imunomodulação.	35
a) Recetores 5-HT.	36
b) Recetores sigma-1.	37
c) Recetores associados a aminas vestigiais.	37
3.2. <i>Set e setting</i> terapêuticos.	38
3.3. Preparação dos indivíduos e sessão de dosagem.	38
3.4. Microdosagem.	39
3.5. Abordagem sem alucinações.	39
4. Limitações.	40

5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para estudos toxicológicos.	41
6. Objetivos e importância do estudo.	44
Capítulo II – Materiais e Métodos.	45
1. Lista de reagentes e materiais.	45
1.1. Reagentes.	45
1.2. Substâncias estudadas.	45
1.3. Materiais.	45
2. Cultura de células e ensaios de toxicidade.	46
2.1. Cultura celular em microplaca de <i>S. cerevisiae</i> para estudo da curva de crescimento na presença de mescalina e LSD.	46
2.2. Modelo de regressão logística para adaptação de ensaios de toxicidade. . .	48
3. <i>Spot assay</i> para estudo da sensibilidade celular.	48
4. Ensaio MTT para estudo da viabilidade celular.	50
5. Quantificação de ATP para estudo da atividade metabólica.	51
Capítulo III – Resultados e Discussão.	53
1. Cinéticas de crescimento celular.	53
2. <i>Spot assay</i> – teste de sensibilidade celular.	65
3. Estudo da viabilidade celular através da redução de MTT.	66
4. Estudo da atividade metabólica através da quantificação de ATP.	72
5. Discussão global.	73
Capítulo IV – Conclusões.	77
Referências.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas de psilocibina (à esquerda) e de DMT (à direita). Estes compostos incluem-se na classe das triptaminas indolaminas simples. Adaptado de Waters, 2021.	21
Figura 2 – Estrutura química de LSD. Este composto inclui-se na classe das triptaminas ergotaminas. Adaptado de Waters, 2021.	24
Figura 3 – Estrutura química de mescalina. Este composto inclui-se na classe das fenetilaminas. Adaptado de Waters, 2021.	26
Figura 4 – Instrumento utilizado para a transferência das culturas diluídas a partir de uma microplaca de 96 poços para uma placa de Petri de 50 mL contendo meio YNB 2% glucose agar.	50
Figura 5 – Curvas de crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 WT na ausência (à esquerda) e na presença (à direita) de DMSO a 0,4% (V/V). O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas.	53
Figura 6 – Curvas de crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de mescalina (10, 25, 50, 75 e 100 µM) – ensaio 1. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas. . . .	.55
Figura 7 – Curvas de crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de mescalina (20, 50, 100, 150 e 200 µM) – ensaio 2. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas . . .	.56
Figura 8 – Curvas de crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de mescalina (100, 200, 300, 400 e 500 µM) – ensaio 3. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas .	.57

Figura 9 – Variações gráficas das constantes K (à esquerda) e Td (à direita) correspondentes às curvas de crescimento apresentadas nas Figuras 6, 7 e 8 (ensaios 1, 2 e 3, respetivamente). 59

Figura 10 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de LSD (10, 25, 50, 75 e 100 μ M) – ensaio 1. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas 60

Figura 11 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de LSD (25, 50, 60, 75 e 100 μ M) – ensaio 2. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas 61

Figura 12 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de LSD (25, 50, 60, 75 e 100 μ M) – ensaio 3. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas 62

Figura 13 – Variações gráficas das constantes K (à esquerda) e Td (à direita) correspondentes às curvas de crescimento apresentadas nas Figuras 10, 11 e 12 (ensaios 1, 2 e 3, respetivamente). 64

Figura 14 – Resultados do teste de sensibilidade celular efetuado para os replicados biológicos 1, 2 e 3 (da esquerda para a direita) de células de levedura *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de diferentes concentrações de mescalina, para diferentes diluições. 65

Figura 15 – Resultados do teste de sensibilidade celular efetuado para os replicados biológicos 1, 2 e 3 (da esquerda para a direita) de células de levedura *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de diferentes concentrações de LSD, para diferentes diluições. 66

Figura 16 – Representação gráfica, em *box plot*, do MTT reduzido em cada fase de crescimento ao longo das diferentes concentrações de mescalina testadas. O eixo XX corresponde à concentração de mescalina (em μ M) e o eixo YY corresponde ao valor de MTT reduzido (em percentagem). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). 67

Figura 17 – Representação gráfica, em *box plot*, do MTT reduzido em cada fase de crescimento ao longo das diferentes concentrações de LSD testadas. O eixo XX corresponde à concentração de mescalina (em μM) e o eixo YY corresponde ao valor de MTT reduzido (em percentagem). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). 70

Figura 18 – Representações gráficas da variação do conteúdo de ATP, em mmol/L, em função das concentrações estudadas, em ng/mL, de mescalina (à esquerda) e de LSD (à direita). 72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela representativa da microplaca utilizada para a realização das culturas celulares de *S. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de composto. Nos espaços em azul, “C” significa “cultura” e os números 1, 2 e 3 diferenciam as três culturas utilizadas, que foram analisadas em triplicado. Na linha B3-B11 foi colocada a cultura controlo e nas linhas C3-C11, D3-D11, E3-E11, F3-F11 e G3-G11 foram colocadas as culturas contendo os padrões de mescalina/LSD de 1 a 5, respetivamente, sendo 1 correspondente à concentração mais baixa e 5 à concentração mais alta **46**

Tabela 2 – Tabela representativa da microplaca utilizada para a preparação das culturas celulares de *S. cerevisiae* para a realização do teste de sensibilidade. Na linha B4-B9 foram efetuadas as diluições da cultura controlo e nas linhas C4-C9, D4-D9, E4-E9, F4-F9 e G4-G9 foram diluídas as culturas contendo os padrões de mescalina/LSD de 1 a 5, respetivamente, sendo 1 correspondente à concentração mais baixa e 5 à concentração mais alta. **49**

Tabela 3 – Volumes de cultura celular de *S. cerevisiae*, de meio YNB 2% glucose e de composto adicionados a cada poço, de modo a obter as diluições pretendidas. **49**

Tabela 4 – Valores obtidos para o tempo de duplicação (Td), para a taxa de crescimento (r) e para a biomassa final (K) das curvas de crescimento representadas na Figura 5. . **54**

Tabela 5 – Valores obtidos para o tempo de duplicação (Td), para a taxa de crescimento (r) e para a biomassa final (K) das curvas de crescimento de *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de concentrações crescentes de mescalina (representadas nas Figuras 6, 7 e 8, que correspondem aos ensaios 1, 2 e 3, respetivamente). **58**

Tabela 6 – Valores obtidos para o tempo de duplicação (Td), para a taxa de crescimento (r) e para a biomassa final (K) das curvas de crescimento de *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de concentrações crescentes de LSD (representadas nas Figuras 10, 11 e 12, que correspondem aos ensaios 1, 2 e 3, respetivamente). **63**

Tabela 7 – Valores de tempo de duplicação (Td), biomassa final (K), MTT reduzido e conteúdo de ATP obtidos para cada concentração testada de mescalina e LSD. **74**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)

a.C. – antes de Cristo

ATP – Adenosina Trifosfato (do inglês *Adenosine Triphosphate*)

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

CIA – Agência de Inteligência Central (do inglês *Central Intelligence Agency*)

CSM – Mistura de Aminoácidos (do inglês *Complete Supplement Mixture*)

DGPJ – Direção-Geral de Política de Justiça

DAT – Transportadores de Dopamina (do inglês *Dopamine Transporters*)

DMN – Rede de Modo Padrão (do inglês *Default Mode Network*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMT – *N,N*-dimetiltriptamina

D.O. – Densidade ótica

INFARMED – Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

LSD – Dietilamida do Ácido Lisérgico (do inglês *Lisergic Acid Diethylamide*)

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetraol

NET – Transportadores de Norepinefrina (do inglês *Norepinephrine Transporters*)

Nor-LSD – N-desmetil-LSD

OEDT – Observatório Europeu das Drogas e da Toxicodependência

OPC – Órgão de Polícia Criminal

RASI – Relatório Anual de Segurança Interna

SERT – Transportadores de Serotonina (do inglês *Serotonin Transporters*)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SSRIs – Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (do inglês *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*)

TAAR – Recetores Associados a Aminas Vestigiais (do inglês *Trace Amine-Associated Receptors*)

UE – União Europeia

UV – Ultravioleta

WT – Tipo Selvagem (do inglês *Wild Type*)

YNB – Base Nitrogenada de Levedura sem Aminoácidos (do inglês *Yeast Nitrogen Base without Amino Acids*)

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1. Introdução às substâncias psicadélicas

1.1 Terminologia

O termo “psicadélico” surge em 1956, numa carta escrita por Humphry Osmond, sendo derivado das antigas palavras gregas *psyche* (ψυχή) e *delein* (dhleîn). A primeira é traduzida como “alma” ou “mente” e a segunda como “revelar” ou “manifestar”, concluindo-se que a tradução literal corresponde a “manifestação da mente” ou “revelação da alma” (Rucker et al., 2018).

Alucinações são, por definição, “falsas percepções” cuja natureza patológica é tipicamente desconhecida e cuja ocorrência é efetuada na ausência de um estímulo correspondente externo. Uma vez que não correspondem a uma característica única ou típica de uma experiência psicadélica, o termo “alucinogénio” deve ser aplicado unicamente a substâncias que provocam somente alucinações, devendo evitar-se a sua aplicação a compostos psicadélicos. Além disso, são conhecidas outras substâncias capazes de causar alucinações além das psicadélicas (Karch, 1998), como, por exemplo, os canabinoides.

Também o termo “psicomimético/psicotomimético” é inadequado quando se trata de substâncias psicadélicas, uma vez que coloca demasiado ênfase em elementos individuais de um estado subjetivo multifacetado (Rucker et al., 2018).

De qualquer forma, os termos “alucinogénio”, “psicadélico” e “psicomimético” são utilizados para classificar certas substâncias de acordo com a sua habilidade para alterar o pensamento, a percepção e o humor a níveis que não são tóxicos (Waters, 2021).

Psicadélicos clássicos, como é o caso da dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e da mescalina, apresentam diferentes características, mas são frequentemente agrupados devido à ação comum que exercem nos recetores de serotonina 2A (5-HT_{2A}) (Johansen et al., 2022). Também apresentam afinidade mais reduzida nos recetores 5-HT_{2B} (Kozłowska et al., 2022), bem como em determinados recetores de dopamina, assunto que será abordado mais adiante.

1.2 Contexto histórico

A utilização de compostos psicadélicos em contextos rituais e religiosos em várias culturas tem uma origem pré-histórica (van Elk & Yaden, 2022). Nas sociedades humanas ancestrais, estas substâncias eram utilizadas para alterar o estado de consciência dos xamãs, colocando-os “em contacto com a divindade” (Mastinu et al., 2023). No caso destas culturas xamânicas, os psicadélicos de origem natural, como a psilocibina e a mescalina, eram e são usados em cerimónias terapêuticas, além das referidas anteriormente, havendo evidências arqueológicas com mais de 5 000 anos (Kelly et al., 2023). Na verdade, a evidência direta mais antiga que prova a utilização de plantas psicotrópicas data de há 5 700 anos, tendo sido encontrados botões de cato peiete e feijões vermelhos contendo mescalina em grutas destinadas à habitação humana, na região nordeste do México (Rucker et al., 2018).

A época de ouro para os compostos psicadélicos teve lugar nos anos 50 e na primeira metade dos anos 60 do século passado, altura em que foram observados efeitos promissores no tratamento de dependências e também na resolução de problemas dos foros psicológico e psiquiátrico (Henríquez-Hernández et al., 2023). Na época referida, o LSD e a psilocibina foram sintetizados para investigação farmacológica e comportamental (Kwan et al., 2022).

Em finais de 1960, verificou-se um aumento das restrições ao acesso a compostos psicadélicos, culminando com a criminalização dos mesmos em 1970, durante a governação de Richard Nixon, tendo sido originada uma diminuição significativa, que durou cerca de 20 anos, nas investigações psicadélicas em seres humanos, bem como uma estigmatização das mesmas (Henríquez-Hernández et al., 2023; Johansen et al., 2022). Este momento da história é marcado pela publicação de artigos com informações incorretas e sem validade científica, o que levou ao surgimento de um receio generalizado destes compostos, por parte da sociedade (Henríquez-Hernández et al., 2023). Além da pesquisa com psicadélicos ter sido banida mundialmente nesta fase, esta classe de compostos ficou classificada como perigosa e sem valor medicinal (Kozłowska et al., 2022). Já em 1990, vários estudos com participantes saudáveis conseguiram aprovações éticas para a realização de ensaios com psicadélicos menos notórios do que o LSD, como a psilocibina, a *N,N*-dimetiltryptamina (DMT) e a mescalina (Johansen et al., 2022).

Historicamente, existe uma relação entre o estudo da ação dos compostos psicadélicos e da neuroquímica do cérebro, sendo que se verificam vastas implicações aquando de descobertas relativas aos locais de ação e aos efeitos destas substâncias. Na verdade, em pesquisas que envolveram o mecanismo de ação dos psicadélicos já foram abordadas estruturas neurológicas importantes, como os neurónios piramidais da camada em V presentes no córtex pré-frontal, que consistem numa população celular com significado funcional no processamento afetivo, cognitivo e sensorial (Slocum et al., 2022).

O atual conhecimento relativamente à paleodieta e paleoecologia dos primeiros homínídeos, à filogenia primata dos comportamentos micofágicos e automedicamentosos e, ainda, à biogeografia dos fungos que contêm psilocibina, permite verificar que os cogumelos (incluindo espécies bioativas) têm sido um recurso relevante para o ser humano desde o Plioceno, altura em que foi intensificada a exploração de alimentos do solo nas florestas (Rodríguez & Winkelman, 2021).

1.2.1 Mescalina

O primeiro registo relativamente à utilização de um psicadélico clássico foi realizado em 1895, nos Estados Unidos, quando Prentiss e Morgan relataram o uso cerimonial de botões do cato peiote por parte de indígenas da América Central. Por sua vez, em 1896, Arthur Heffter isolou o componente ativo do peiote, isto é, a mescalina, sendo que as menções sobre a mesma foram escassas na literatura medicinal inglesa até 1913, ano em que um estudo realizado por Alwyn Knauer permitiu registar os relatos de vários pacientes relativamente às alucinações experienciadas após injeção subcutânea desta substância (Rucker et al., 2018). Heffter foi o primeiro a isolar a mescalina, em 1896, mas o primeiro a administrar esta substância como medicamento experimental foi o psiquiatra alemão Kurt Beringer, na época de 1920 (Henríquez-Hernández et al., 2023; Vamvakopoulou et al., 2023). Em 1936, Erich Guttman efetuou a primeira observação relativamente ao potencial terapêutico da mescalina, tendo utilizado uma grande variedade de indivíduos com diferentes estados mentais. Não foram publicados resultados objetivos, mas o autor do estudo reconheceu a importância da mescalina para os psiquiatras que pretendiam obter um melhor entendimento relativamente às psicoses (Rucker et al., 2018). Já terminada a Segunda Guerra Mundial, começaram a surgir publicações médicas que anunciavam a estreia pública da mescalina (Karch, 1998).

A mescalina apresenta uma elevada relevância histórico-cultural para vários povos, cujas práticas incluem peregrinações anuais de centenas de quilómetros com o objetivo de obter botões de cato que são utilizados nos rituais semanais, sendo característico que todos os adultos conheçam e exerçam “práticas mágicas” (Escohotado, 1995). Além deste uso ritual e religioso, os povos indígenas e índio-americanos, desde há muitos séculos, também utilizam a mescalina no tratamento de doenças físicas como, por exemplo, queimaduras, feridas, dores de dentes e febre, o que permite salientar os potenciais benefícios de saúde deste composto (Vamvakopoulou et al., 2023). De facto, estima-se que o consumo sacramental de mescalina realizado pelos povos nativo-americanos, através da ingestão do cato peiote *Lophophora williamsii*, ocorre desde há 5 milénios (Johansen et al., 2022), tal como referido anteriormente, em relação aos botões de cato peiote e feijões vermelhos que foram encontrados em grutas destinadas à habitação humana.

1.2.2 Dietilamida do ácido lisérgico

“Tudo no meu campo de visão oscilava e era distorcido como se fosse visto num espelho de casa de diversões. Tive também a sensação de não me poder mexer do sítio. No entanto, o meu assistente disse-me mais tarde que tínhamos andado de bicicleta muito depressa.” – Albert Hofmann (2013) sobre a viagem até casa após ter ingerido propositadamente uma pequena dose de LSD (Hofmann, 2013).

A dietilamida do ácido lisérgico foi primeiramente sintetizada por Albert Hofmann, em 1938, no decorrer de uma investigação sistemática sobre compostos derivados dos alcaloides da cravagem do centeio, com o objetivo de sintetizar um estimulante respiratório e circulatório (Lowe et al., 2022; Rucker et al., 2018). Foi o 25º derivado do ácido lisérgico identificado, explicando, assim, a designação “LSD-25”. Os alcaloides referidos foram responsáveis por vários envenenamentos na Europa medieval, uma vez que as pessoas ingeriam cereais que se encontravam afetados pelo fungo *Claviceps purpurea* (Rucker et al., 2018).

Avançando até 1943, ano em que o LSD foi considerado psicologicamente irrelevante após a realização de testes em animais, Hofmann teve um “pressentimento peculiar” relativamente a esta substância, pensando que poderia “possuir propriedades além daquelas estabelecidas nos primeiros testes farmacológicos” (Hofmann, 2013).

Assim sendo, Hofmann decidiu sintetizar o composto uma vez mais e, no dia 16 de abril de 1943, teve de abandonar o seu trabalho e ir para casa, devido aos efeitos psíquicos incomuns pelos quais estava a passar, após ter contactado diretamente com a substância, por acidente – talvez durante o processo de cristalização da dietilamida do ácido lisérgico, que consiste no último passo da síntese deste composto (Hofmann, 2013; Rucker et al, 2018). No dia 19 de abril de 1943, o cientista decidiu efetuar uma autoexperiência com o LSD, de modo a comprovar se, de facto, tinha sido esta a substância responsável pelos acontecimentos anteriores (Hofmann, 2013). Após a ingestão de 0,25 mg de LSD, Hofmann constatou os seus efeitos totais e notavelmente potentes, concluindo, ainda, que o composto não era fisiologicamente tóxico (Rucker et al., 2018). O LSD ficou, então, conhecido como a substância neuroativa mais potente nesta época, sendo necessário menos de 1 µg/kg para que os seus efeitos se realizem (Karch, 1998).

Em 1947, os Laboratórios Sandoz, onde Hofmann realizou a sua investigação, publicitaram e distribuíram LSD como uma substância psiquiátrica para o tratamento de neuroses e alcoolismo (Lowe et al., 2022). Assim, a partir de 1950 e ao longo dos anos de 1960, a investigação clínica desta substância criou a ideia de que se tinha descoberto uma nova ferramenta passível de ser utilizada por vários profissionais de saúde mental, especialmente em casos de resistência aos tratamentos habituais da época. Na verdade, cerca de 1 000 casos clínicos foram publicados na altura mencionada, sendo discutido o tratamento de cerca 40 000 indivíduos maioritariamente recorrendo ao LSD; nestes ensaios, foram reportadas taxas muito baixas de efeitos adversos (Nichols & Grob, 2018).

Ainda durante as décadas de 1940 e 1950, o LSD chegou mesmo a ser testado, pelos Estados Unidos, como “psicoquímico” para um potencial papel na guerra não convencional, sendo que a *Central Intelligence Agency* (CIA) também efetuou uma investigação para utilizar este composto como “soro da verdade” durante interrogatórios (Waters, 2021).

Já em 1967, começaram a surgir relatos de que o LSD provocava danos cromossómicos, mas esta informação polémica foi refutada posteriormente (Karch, 1998). Nesse mesmo ano, o LSD passou a ser uma substância proibida, começou a

“Guerra Contra as Drogas” e todas as pesquisas científicas e utilizações terapêuticas onde se recorria a este composto foram terminadas (Hofmann, 2013).

1.3 Aspectos psicofarmacológicos

Em termos de estrutura, as substâncias psicadélicas apresentam uma amina substituída que se encontra separada de um núcleo aromático por dois carbonos alifáticos. Quando ocorrem pequenas modificações na molécula-mãe, podem ser originados derivados de menor potência ou inativos e, apesar de existirem diferentes estruturas moleculares, os psicadélicos apresentam efeitos subjetivos semelhantes e a afinidade elevada com os recetores de serotonina mantém-se comum entre os mesmos (Karch, 1998).

A atividade neuronal é afetada por interações neuroquímicas e os compostos neuroativos, uma vez ligados aos recetores, apresentam-se como sendo substratos dos circuitos neuronais. Assim, tal como se verifica na presença de outros fármacos, as substâncias psicadélicas ionizam-se nos locais recetores, formando complexos de transferência de carga e modificando, desta forma, o fluxo local de eletrões e, consequentemente, a transmissão de informação neuronal (Karch, 1998).

Os efeitos psicológicos mais comuns associados às substâncias psicadélicas são efeitos percetuais (mudanças na perceção de tempo e espaço), despersonalização, distorções, ilusões (interpretações erradas de um estímulo sensorial), intensificações percetuais e alucinações (auditivas, visuais ou experiências sensoriais que são originadas sem qualquer estímulo externo). A ocorrência de distúrbios visuais é referida como uma “viagem” ou “*trip*”, sendo possível experienciar os designados “*flashbacks*” dias ou mesmo semanas após a ingestão inicial de um composto psicadélico. Estes podem estar entre uma ilusão visual agradável ou aterradora. Além disso, apesar de ser pouco frequente, é possível que ocorram efeitos psicóticos agudos, havendo já relatos de indivíduos que sofreram de psicose prolongada após a utilização de psicadélicos (Waters, 2021).

Quimicamente, os psicadélicos eram classificados em dois grupos: as indolalquilaminas, que incluem as triptaminas e as ergotaminas, e as fenetilaminas (Karch, 1998). No entanto, atualmente, estes compostos são divididos nas categorias de

triptaminas indolaminas simples, triptaminas ergotaminas e fenetilaminas (Waters, 2021).

1.3.1 Triptaminas indolaminas simples

O triptofano é um aminoácido que pode ser decomposto em triptaminas naturais, incluindo a serotonina. Em termos de estrutura, estas apresentam um anel indol, ligado no carbono-3, a um grupo 2-aminoetil, partilhando algumas semelhanças com as fenetilaminas (Waters, 2021).

A presença de alcaloides indol é comum em várias plantas, animais e microrganismos. As triptaminas, correspondentes a grande parte das substâncias psicadélicas, possuem propriedades neuroativas e apresentam uma alquilação na cadeia secundária da etilamina, que tem uma ampla gama de movimento molecular. A psicoatividade é determinada pelos locais de substituição importantes do anel indol, dos carbonos das cadeias laterais e do azoto alifático (Karch, 1998).

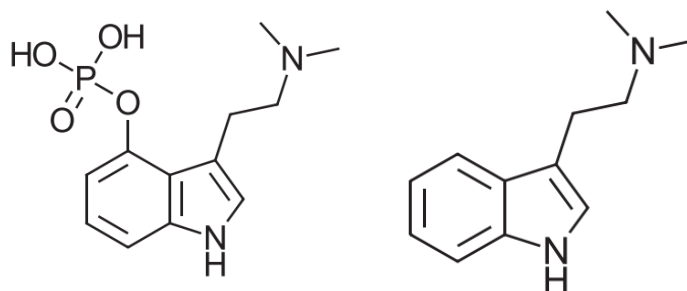


Figura 1 – Estruturas químicas de psilocibina (à esquerda) e de DMT (à direita). Estes compostos incluem-se na classe das triptaminas indolaminas simples. Adaptado de Waters, 2021.

1.3.2 Triptaminas ergotaminas

A designação destas moléculas deve-se à sua origem, isto é, ao fungo da cravagem do centeio. Este grupo apresenta uma estrutura mais complexa do que as triptaminas simples, devido à presença de um sistema indol, que corresponde a uma combinação bicíclica de benzeno com um anel pirrólico, e de um anel tetracíclico, resultando numa estrutura semelhante à serotonina (Waters, 2021).

Relativamente ao fungo referido, *Claviceps purpurea* é um fungo parasítico que cresce no centeio, bem como noutras gramíneas. A sua utilização desde a antiguidade tem sido feita com o objetivo de recorrer às suas propriedades abortivas, uma vez que as

ergotaminas são poderosas contratoras do útero, cujo tecido é rico em recetores de serotonina (Karch, 1998).

O LSD é um composto semissintético, sendo obtido a partir do ácido lisérgico (através da reação entre o ácido carboxílico e a dietilamina) proveniente da ergotamina, um alcaloide natural extraído do fungo referido (Schlag et al., 2022). Em termos de recetores, o LSD apresenta agonismo total para o recetor 5-HT_{1A}, agonismo parcial para os 5-HT₂ e, ainda, afinidade para o 5-HT_{1D}. Também tem a capacidade de se ligar com elevada afinidade aos recetores da dopamina D₁ e D₂ (Karch, 1998). Desta forma, este composto é considerado um alucinogénio atípico, pois, para produzir os seus efeitos psicoativos, interage com recetores serotoninérgicos e dopaminérgicos (Lowe et al., 2022). Além disso, o LSD possui afinidade para o recetor α_2 (Waters, 2021).

O LSD pode ser ingerido na forma de comprimido oral, líquido ou em pedaços de papel embebidos no composto (Waters, 2021). Fisiologicamente, é considerado extremamente seguro quando são utilizadas doses moderadas (entre 50 e 200 μ g) em ambientes controlados, sendo que os únicos efeitos observados são pequenas elevações da pressão arterial, da frequência cardíaca e da temperatura corporal (Nichols & Grob, 2018). Sendo um composto de elevada potência, o estado de êxtase provocado pelo LSD, bem como a sinestesia audiovisual (mistura de sentidos como “ver sons” e “ouvir cores”), a desrealização e a despersonalização, podem ser significativamente mais intensos (Waters, 2021).

A absorção de LSD ocorre de forma rápida e completa no trato gastrointestinal, apresentando uma biodisponibilidade oral de aproximadamente 71% e atingindo a concentração plasmática máxima 1,5 h após ingestão oral. Dependendo da dose, os efeitos desta substância têm uma duração entre 6 e 12 h e a cinética de eliminação é linear (Marta, 2019; Waters, 2021). A semivida de eliminação é de aproximadamente 3 h e o metabolito principal, isto é, o 2-oxo-3-hidroxi-LSD, pode manter-se ativo e estar presente na urina durante um período mais longo (Waters, 2021). Quanto ao volume de distribuição, este foi reportado como sendo baixo, correspondendo a 0,28 L/kg (Marta, 2019).

O fígado é o local onde ocorre a metabolização de LSD, principalmente através de N-desalquilação e/ou processos de oxidação, sendo esta bastante extensa, já que

apenas 1% deste composto é excretado na sua forma não-alterada através da urina. Nos seres humanos, o processo mais comum é a N-desmetilação na posição 6, levando à formação de N-desmetil-LSD (Nor-LSD), cuja semivida é de cerca de 10 h, valor bastante superior à semivida do LSD. Este metabolito já foi detetado em amostras de urina e plasma. Por outro lado, a hidroxilação aromática (nas posições 13 e 14) é um processo que leva à formação de outros dois metabolitos bastante comuns: 13-hidroxi-LSD e 14-hidroxi-LSD. Tal como o Nor-LSD, estes metabolitos apresentam uma semivida superior à do LSD. Um outro metabolito já mencionado é o 2-oxo-3-hidroxi-LSD, sendo este considerado como marcador principal na identificação do consumo de LSD, devido às elevadas concentrações (16 a 43 vezes superior ao LSD) e à janela de deteção superior (Marta, 2019).

De acordo com estudos citados por Nichols e Grob (2018), a dose oral letal de LSD para o ser humano corresponde a 100 mg e a ingestão de uma dose fatal deste composto é 800-1600 vezes superior à dose habitual de venda, que varia entre 200 e 400 µg. Os autores reportam vários casos de mortes associadas ao LSD, mas referem sempre que a causa de morte em si não se deve à ingestão da substância mencionada; ao invés, indicam outros motivos, como, por exemplo, morte por asfixia devido a imobilização ou asfixia posicional em casos em que os indivíduos precisavam de ser fisicamente imobilizados devido à *bad trip* pela qual estavam a passar. Mesmo em casos onde o médico legista refere uma causa de morte associada à toxicidade de LSD, existem sempre problemas nos exames *post-mortem* que levam os autores a considerar que o óbito pode não ter ocorrido devido ao consumo do composto referido. Assim, é feita a sugestão de que se deve considerar quais são as concentrações de LSD atingidas após a administração de uma dose típica do mesmo, para que futuras mortes não sejam atribuídas à toxicidade desta substância. Os autores concluem que o LSD não tem o alegado grau de toxicidade fisiológica que tem sido reportado na literatura e nos *media*, indicando que é necessária uma compreensão clara e exata da toxicidade genuína do composto, pois, em humanos, esta toxicidade tem demonstrado ser muito baixa (Nichols & Grob, 2018).

Um dos maiores desafios que as toxicologias clínica e forense enfrentam é o consumo de derivados de LSD em doses recreativas. Este problema surge devido à semelhança de metabolitos que se verifica entre estes compostos e o próprio LSD. Assim, é importante que se faça uma análise rigorosa aquando da obtenção de um

resultado positivo para LSD, pois pode não ser decorrido do consumo desta substância (Marta, 2019).

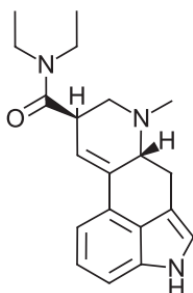


Figura 2 – Estrutura química de LSD. Este composto inclui-se na classe das triptaminas ergotaminas. Adaptado de Waters, 2021.

1.3.3 Fenetilaminas

As fenetilaminas são caracterizadas por uma estrutura central de fenetilamina com um ou mais átomos de hidrogénio na estrutura substituídos por outro grupo funcional (Lowe et al., 2022).

A mescalina (3,4,5-trimetoxifenetilamina) é um alcaloide natural que pode ser encontrado em várias espécies de *Cactaceae*, incluindo, como já referido anteriormente, o cato norte-americano peiote (*Lophophora williamsii*) e o cato sul-americano São Pedro (*Echinopsis pachanoi*) (Waters, 2021). Na opinião pública, esta substância não é tão estigmatizada como o LSD, talvez pela sua menor potência, já que os efeitos psicoativos da primeira são 2000 vezes menos intensos do que os efeitos do segundo (Schlag et al., 2022; Waters, 2021).

A mescalina não tem sido estudada da mesma forma que outros psicadélicos, mas, em termos de recetores, pensa-se que é agonista dos recetores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{1A}, agonista total do 5-HT_{2C} e, ainda, que exerce ação no recetor adrenérgico α _{2A} (Vamvakopoulou et al., 2023; Waters, 2021). Os principais efeitos alucinogénios provenientes da mescalina devem-se ao agonismo desta com o recetor 5-HT_{2A} (Vamvakopoulou et al., 2023).

Além dos recetores já mencionados, a mescalina apresenta ainda baixa afinidade com os recetores de dopamina D₁, D₂ e D₃, com o recetor adrenérgico α _{1A} e com o recetor TAAR1, isto é, o recetor associado a amins vestigiais 1, responsável pela regulação da transmissão de dopamina, noradrenalina e serotonina. Por fim, o composto

em questão também apresenta baixa afinidade com os transportadores de dopamina (DAT), norepinefrina (NET) e serotonina (SERT) (Vamvakopoulou et al., 2023).

A mescalina compõe 0,4% do peiote fresco e 3-6% do peiote seco, sendo a maior concentração encontrada nos botões do cato. Uma vez que é um composto menos potente, os efeitos farmacológicos são 2000 e 20 vezes menos intensos do que o LSD e do que a psilocibina, respetivamente (Waters, 2021).

Entre todos os compostos psicadélicos, é possível afirmar que a mescalina surge como uma anomalia, no sentido em que é necessária uma dose extremamente elevada para que se verifique a sua eficácia. Além disso, mesmo entre as próprias fenetilaminas, a mescalina é única no que diz respeito aos seus efeitos psicoativos (Karch, 1998), uma vez que é a única molécula dentro desta classe que permite experienciar as cores “mais bonitas”, bem como toda uma variedade de fenómenos envolvendo cores, como, por exemplo, “sentir o sabor” das mesmas (Vamvakopoulou et al., 2023).

As doses de mescalina variam bastante, não existindo um consenso exato quanto à dose média. No entanto, esta pode variar entre os 20 e os 500 mg, equivalendo a cerca de 3 a 6 botões de cato, ou entre os 10 e os 20 g, no caso de se tratar de peiote seco (Waters, 2021). Não são conhecidos casos de mortes que tenham ocorrido em consequência da ingestão do cato ou da administração do alcaloide, pelo que não existe conhecimento quanto a uma dose letal de mescalina (Escohotado, 1995).

A absorção desta substância ocorre rapidamente no trato gastrointestinal, sendo que uma elevada percentagem da dose ingerida é distribuída para os rins e fígado. A combinação com proteínas hepáticas atrasa a chegada de mescalina ao sangue e aumenta a sua semivida, resultando num retardamento dos seus efeitos (Vamvakopoulou et al., 2023). Por sua vez, os efeitos ocorrem entre 1-3 h após ingestão e, embora menos intensos, podem ter uma duração de cerca de 10 a 12 h (Waters, 2021).

Existem vários alcaloides presentes nos catos que, segundo se acredita, podem aumentar os efeitos da mescalina, apesar de alguns não apresentarem qualquer atividade farmacológica por si só. Um dos alcaloides mais comuns encontrados nos catos é a pelotina, que apresenta propriedades sedativas/hipnóticas. Outro exemplo corresponde à hordenina, cujas propriedades são antibióticas. Esta substância encontra-se na cevada (*Hordeum vulgare*), sendo possível encontrá-la na cerveja e detetá-la em sangue e urina

humanos após o consumo desta bebida. Desta forma, a hordenina pode ser utilizada para provar o consumo de cerveja através de uma análise toxicológica forense, motivo pelo qual este composto é utilizado como marcador forense qualitativo e quantitativo para cerveja (Vamvakopoulou et al., 2023).

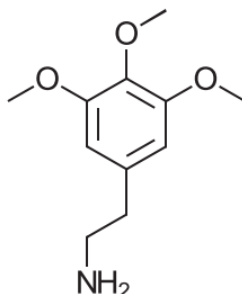


Figura 3 – Estrutura química de mescalina. Este composto inclui-se na classe das fenetilaminas. Adaptado de Waters, 2021.

2. Psicadélicos, lei e relatórios de monitorização

O surgimento de leis nacionais rigorosas de controlo de substâncias psicadélicas teve a sua origem na globalização destes compostos além dos seus países e culturas nativos. Estas leis foram responsáveis pela construção social negativa associada aos psicadélicos e pela criação de regulamentos governamentais que impediram o estudo científico dos mesmos (Lowe et al., 2022).

A Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e de Substâncias Psicotrópicas, aprovada em 1988, representa um instrumento de direito internacional público, tendo sido criadas várias leis devido à mesma (Decreto-Lei nº15/93). Esta Convenção teve como objetivo “promover a cooperação entre as Partes a fim de que possam fazer face, de forma mais eficaz, aos diversos aspetos do tráfico ilícito de estupefacientes e substâncias psicotrópicas de âmbito internacional” (Resolução da Assembleia da República nº 29/91).

Em Portugal, a mescalina e o LSD são substâncias sujeitas a controlo, de acordo com as tabelas anexas presentes no Decreto-Lei nº 15/93, de 22 de janeiro, cujo objeto é “a definição do regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas”. A mescalina é mencionada na Tabela II-A e o ácido lisérgico na Tabela V. O artigo 4º do diploma em questão define licenciamentos, condicionamentos e autorizações, sendo este o artigo onde se pode consultar quais as

entidades responsáveis que permitem a realização de trabalhos científicos como o presente estudo. Em termos de fiscalização de todas as atividades devidamente autorizadas em que estejam envolvidas plantas, substâncias e preparações compreendidas nas tabelas I a VI, cabe ao Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED) a realização deste ato, segundo consta no artigo 5º do DL nº 15/93. Por outro lado, a fiscalização relativamente às substâncias compreendidas nas tabelas V e VI deve ser efetuada pela Inspeção-Geral das Atividades Económicas, sem prejuízo das competências das autoridades policiais e administrativas (Decreto-Lei nº 15/93).

A Portaria nº 94/96, de 26 de março, consiste num diploma que possui uma relação direta com o DL nº 15/93, uma vez que define os “procedimentos de diagnóstico e dos exames periciais necessários à caracterização do estado de toxicodependência”, bem como o “modo de intervenção dos serviços de saúde especializados no apoio às autoridades policiais e judiciárias” e os “limites quantitativos máximos para cada dose média individual diária das plantas, substâncias ou preparações constantes das tabelas I a IV anexas ao Decreto-Lei nº 15/93, de 22 de janeiro, de consumo mais frequente” (Portaria nº 94/96). Relativamente às substâncias estudadas no decorrer deste projeto de dissertação, uma vez que a mescalina não corresponde a uma das substâncias mais comumente consumidas em Portugal, a Portaria nº 94/96 apenas refere o limite quantitativo máximo para cada dose individual diária de LSD, sendo este correspondente a 50 µg (Portaria nº 94/96).

Em 2000, foi criada a Lei nº 30/2000, de 29 de novembro, onde se define o “regime jurídico aplicável ao consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, bem como a proteção sanitária e social das pessoas que consomem tais substâncias sem prescrição médica”, sendo ainda referido que “as plantas, substâncias e preparações sujeitas ao regime previsto neste diploma são as constantes das tabelas I a IV anexas ao Decreto-Lei nº 15/93, de 22 de janeiro” (Lei nº 30/2000). Assim, a Lei nº 30/2000, de 29 de novembro, acaba por estar também relacionada com o DL já mencionado, tal como a Portaria indicada no parágrafo anterior. É possível encontrar, nesta Lei, artigos relativamente à apreensão e identificação, ao juízo sobre a natureza e circunstâncias do consumo, à sujeição a tratamento (por parte do toxicodependente), bem como artigos que indicam as sanções e coimas associadas a estupefacientes e substâncias psicotrópicas. Mais do que um diploma sobre o controlo de substâncias, esta Lei

consiste num diploma cuja aplicação é direcionada aos indivíduos envolvidos com as mesmas. É importante mencionar o artigo 29º da Lei nº 30/2000, onde é referida a descriminalização aprovada pela mesma, cuja entrada em vigor se realizou a partir do dia 1 de julho de 2001 (Lei nº 30/2000).

Uma vez que já se verificam mudanças em termos de construção social, bem como alterações nas políticas dos governos, as oportunidades de investimento na indústria psicadélica e na pesquisa científica têm vindo a aumentar (Lowe et al., 2022).

2.1 RASI 2023 e o tráfico de estupefacientes

O Relatório Anual de Segurança Interna (RASI) consiste num documento onde são apresentados os resultados do trabalho de diversas entidades que concorrem para a Segurança Interna em Portugal. Este relatório apresenta os dados de criminalidade anuais (de janeiro a dezembro) e tem por base a “informação coligida e centralizada pela DGPJ¹ a partir dos dados disponibilizados pelos OPC², aos quais se aplicam técnicas e processos estatísticos (...), agregando resultados a partir da informação desagregada e de pormenor oriunda de cada um” (Sistema de Segurança Interna, 2023).

No RASI de 2023, relativamente ao tráfico de estupefacientes, é referida a “continuação de um elevado número de ocorrências na costa algarvia e um número significativo de organizações criminosas.” Além disso, é mencionado o facto de o território nacional português possuir “características geográficas muito específicas que propiciam operações de tráfico destas substâncias”, sendo referida especificamente a entrada de “quantidades significativas de cocaína e haxixe em território nacional.” São ainda destacados “aumentos no número de detidos por tráfico de estupefacientes (+9,2%) e das apreensões efetuadas (+13,6%)” (Sistema de Segurança Interna, 2023). Tais aumentos demonstram a complexidade que as Forças de Segurança continuam a enfrentar para combater este tipo de criminalidade. Enquanto a cocaína, o ecstasy e o haxixe sofreram aumentos na quantidade de apreensões (31,4%, 47,3% e 62,3% respetivamente), houve uma diminuição de 43,5% nas apreensões de heroína (Sistema de Segurança Interna, 2023).

¹Direção-Geral de Política de Justiça

²Órgão de Polícia Criminal

Relativamente ao LSD e à mescalina, estas substâncias não são mencionadas no RASI de 2023, uma vez que este apenas avalia os quatro principais tipos de drogas ilícitas, que correspondem, como referido, à heroína, à cocaína, à canábis e ao ecstasy. Assim, não é possível obter informação relativamente ao tráfico, ao consumo e às apreensões destas substâncias em território português nos últimos anos.

2.2 A atual situação europeia

O *European Drug Report 2024*, criado pela *European Union Drugs Agency*, destaca o interesse acrescido relativamente ao potencial terapêutico dos psicadélicos, sendo referido o facto de estarem a decorrer vários estudos clínicos não só europeus, como internacionais, que pretendem explorar uma vasta gama de substâncias psicadélicas no tratamento de variadas condições mentais. Apesar de já se terem verificado resultados promissores que apoiam o eventual valor que estes compostos possam ter no tratamento de doenças neuropsiquiátricas específicas, a agência salienta que surgem certas preocupações associadas; dada a atenção considerável que os *media* têm fornecido a este tema, é possível que as pessoas se sintam “encorajadas” a experimentar substâncias psicoativas potentes (nas quais se incluem os psicadélicos) sem apoio médico apropriado. Isto pode fazer com que os indivíduos que ingressem nestas experiências corram o risco de sofrer consequências adversas. Além disso, são também mencionados neste relatório programas não regulamentados onde se recorre à utilização de psicadélicos de modo a atingir o bem-estar e em intervenções ditas terapêuticas ou espirituais, que estão a decorrer na União Europeia (UE) e noutros locais. Desta forma, surge a recomendação de uma fortificação na monitorização destas situações, dadas as consequências que poderão afetar indivíduos vulneráveis com condições mentais pré-existentes (European Union Drugs Agency, 2024).

Em relação ao consumo de LSD, o relatório refere que a prevalência estimada deste composto (e de cogumelos mágicos) entre jovens adultos, entre os 15 e os 34 anos de idade, é igual ou inferior a 1%, sendo que, após a realização de um inquérito cuja amostra não é representativa de todos os consumidores, os dados indicam que 20% dos indivíduos utilizaram LSD no último ano. Em 2022, 15 centros pertencentes a 12 dos 17 Estados-Membro da UE, bem como a Noruega, procederam a notificações nas quais o LSD esteve envolvido numa estimativa de 0,7% das apresentações, sendo que três quartos destas foram em homens e 4 em cada 10 tinham menos de 25 anos. Além disso,

uma em cada 3 apresentações foi admitida nos cuidados intensivos (European Union Drugs Agency, 2024).

Em toda a Europa, não são monitorizadas, de forma coerente, as apreensões de substâncias alucinogénias e dissociativas; na verdade, as limitadas informações disponíveis são fornecidas pelo Observatório Europeu das Drogas e da Toxicodependência (OEDT) e são incompletas, divergentes e difíceis de generalizar. No ano de 2022, foram registadas 1 700 apreensões de LSD na Europa (total de 99 700 unidades e 2,1 kg) (European Union Drugs Agency, 2024).

3. A possibilidade da terapia psicadélica

A utilização de substâncias psicadélicas é particularmente estigmatizada, sendo esta questão importante dada a ilegalidade das mesmas, surgindo um obstáculo para quem prescreve e quem consome (Lowe et al., 2022). Assim, a mudança que se verifica no *status quo* relativamente aos compostos psicadélicos é extremamente importante, uma vez que cada vez mais é discutida a sua utilização terapêutica. Estas substâncias apresentam baixa toxicidade fisiológica, respostas psicológicas seguras³, baixo potencial de dependência/adicção, baixa probabilidade de défices neurológicos após uso, não se verificando efeitos fisiológicos ou psicológicos adversos persistentes associados durante ou após a utilização (Lowe et al., 2022; Psiuk et al., 2021). Adicionalmente, uma outra vantagem apresentada pelas substâncias psicadélicas no tratamento de doenças psiquiátricas reside no facto de os seus efeitos se iniciarem de forma rápida (num intervalo de 24h), ocorrerem após uma única dose ou um pequeno número de doses e durarem bastante tempo após a sua eliminação do organismo (Olson, 2022).

O facto de existir uma grande diversidade de substâncias psicadélicas pode criar uma certa “discussão sobre qual destas é a melhor”, isto é, qual apresenta menos falhas ou menos características que sejam prejudiciais, por exemplo. Lowe e colegas (2022) afirmam que se deve reconhecer que “a questão não é se um psicadélico é globalmente melhor do que outro”. Os autores referem que, tal como existem vários antidepressivos para o tratamento da depressão, os psicadélicos – cujas estruturas químicas e

³A ocorrência de uma resposta psicológica segura significa que não se verificam reações ou efeitos psicológicos adversos, como, por exemplo, situações de ansiedade extrema, crises de paranoia ou psicose temporária (Johnson et al., 2008).

mecanismos de ação também variam – podem ser mais adequados a determinados subconjuntos de pacientes dependendo das suas características clínicas (Lowe et al., 2022).

Uma das perturbações mais comuns no mundo consiste na depressão, cuja etiologia permanece desconhecida (Psiuk et al., 2021). Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) são os antidepressivos prescritos com maior frequência e produzem efeitos secundários graves, como, por exemplo, o aumento do risco de suicídio e de hemorragias internas (devido à capacidade reduzida de coagulação). Além disso, também os antidepressivos tricíclicos são correntemente prescritos, apresentando efeitos secundários igualmente graves, como é o caso de distúrbios na frequência cardíaca e tonturas que podem resultar em quedas. Ambos os medicamentos referidos podem representar um potencial risco para o feto, em casos de gravidez, bem como podem levar a um aumento de interações medicamentosas (Lowe et al., 2022).

Alguns ensaios clínicos recentes demonstraram resultados promitentes em relação aos benefícios terapêuticos de psicadélicos clássicos numa série de perturbações psiquiátricas, sendo que foi maioritariamente estudada a psicoterapia assistida por psicadélicos, onde um destes agentes é administrado em conjunto com terapia/apoio psicológico (Johansen et al., 2022). Em comparação com os fármacos anteriormente mencionados, os psicadélicos produzem efeitos secundários ligeiros e, além disso, os efeitos terapêuticos são alcançados mais rapidamente, não se verificando o mesmo nos atuais tratamentos de primeira linha – as alterações dos sintomas podem demorar semanas ou meses a manifestar-se – e podem, ainda, ser produzidos efeitos positivos e duradouros após uma única dose/sessão de terapia (Johansen et al., 2022; Lowe et al., 2022). No entanto, é importante referir que há um elevado potencial de abuso relativamente às substâncias psicadélicas, principalmente em ambientes recreativos (Lowe et al., 2022).

Kozłowska e colegas (2021) demonstraram os resultados benéficos do tratamento psicadélico para a perturbação depressiva grave, tendo tido como foco os processos nos microambientes do tecido neural que podem ser afetados pelos psicadélicos, que incluem a indução da neurogénese e da neuroplasticidade, bem como a redução da inflamação e do stress oxidativo. Desta forma, os psicadélicos podem

desempenhar um papel fundamental no restabelecimento do equilíbrio saudável a longo prazo em indivíduos deprimidos. Foram, ainda, destacadas potenciais áreas de ação terapêutica na neurodegeneração específica do cérebro em que os psicadélicos podem ser benéficos, incluindo o stress oxidativo e a inflamação, como referido anteriormente, a rutura da barreira hematoencefálica e a perda de oligodendrócitos e de mielina (Kozłowska et al., 2022).

Existem outras perturbações, além da depressão, que afetam mundialmente milhões de pessoas. Alguns psicadélicos, como o caso do LSD e da psilocibina, têm demonstrado capacidades promissoras no que diz respeito ao tratamento de perturbações do humor e da ansiedade, neurodegenerativas, de consumo de álcool e, ainda, de várias substâncias. Tal observação é acentuada em pacientes que são resistentes aos tratamentos e/ou que enfrentam doenças terminais (Lowe et al., 2022). Também foram efetuados ensaios clínicos em humanos para testar os potenciais benefícios dos psicadélicos no tratamento das perturbações de stress pós-traumático e obsessivo-compulsiva e da ideação suicida (Waters, 2021). Nestes ensaios, as conclusões apontaram para o sucesso das substâncias estudadas – entre elas, MDMA, *ayahuasca*, psilocibina e vários psicadélicos clássicos – no tratamento de diversos problemas de génese psicológica (Danforth et al., 2018; Gill et al., 2020; Mithoefer et al., 2018; Palhano-Fontes et al., 2019).

A hipótese de utilizar compostos psicadélicos no tratamento de doenças neurodegenerativas e lesões cerebrais foi já colocada, sendo discutidas a neuroplasticidade, a neurogénese e a gliogénese induzidas pelas referidas substâncias. De facto, as doenças neurodegenerativas são um grave e crescente fenómeno para as sociedades modernas, sendo que não se verifica um desenvolvimento de terapêuticas eficazes para a resolução deste problema como se verifica para doenças cardiovasculares e para o cancro, por exemplo. Assim, é necessário recorrer a novos candidatos e os psicadélicos podem corresponder à tão necessária nova abordagem terapêutica, uma vez que algumas destas substâncias já demonstraram eficácia terapêutica numa variedade de ensaios clínicos, além de serem utilizadas de forma segura por populações indígenas, como referido no contexto histórico, há séculos (Kozłowska et al., 2022).

Uma das evidências que serve de apoio à terapia com recurso a substâncias psicadélicas consiste no facto de os efeitos terapêuticos dos psicadélicos serem acompanhados por alterações neurológicas na estrutura e na função cerebral – aumento do significado pessoal, da atenção plena, da introspeção e mudança positiva na perspetiva de vida. Por outro lado, é importante ter em conta que pacientes com histórico familiar de distúrbios psicóticos e/ou qualquer grau de comportamento suicida são menos prováveis de beneficiar do tratamento psicadélico e devem ser excluídos deste tipo de terapia (Lowe et al., 2022). Além disso, a restrição do uso de psicadélicos também se aplica a indivíduos com doenças cardíacas graves (Galvão-Coelho et al., 2021).

O potencial terapêutico do LSD e dos seus derivados já foi investigado em relação ao tratamento de doenças caracterizadas por inflamação crónica, como o Alzheimer, entre outras, e de comportamento criminal, perturbações sexuais, autismo e outras perturbações – cefaleias em salvas, enxaquecas, cefaleias vasculares, dor fantasma nos membros e dependências (Lowe et al., 2022).

Relativamente à mescalina, há estudos que relatam melhorias no bem-estar e na capacidade de superar o alcoolismo após utilização desta substância em contextos naturalísticos ou religiosos, o que sugere um certo potencial terapêutico (Vamvakopoulou et al., 2023).

3.1 Processos neurobiológicos

3.1.1 Neuroplasticidade induzida por psicadélicos

Os compostos psicadélicos influenciam funções essenciais no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo este um motivo que tem levado ao aumento do reconhecimento destes como agentes terapêuticos para condições psiquiátricas. Assim, tal como referido anteriormente, os psicadélicos podem afetar a neuroplasticidade. A plasticidade neural refere-se às alterações que ocorrem na conectividade neural funcional, sendo que os mecanismos responsáveis pelas mesmas são maioritariamente associados a células neurais, apesar de o processo ir além da plasticidade das sinapses neurais (Kozłowska et al., 2022). De facto, o interesse pelos efeitos dos psicadélicos na morfologia das espinhas dendríticas tem vindo a ressurgir devido à observação frequente de que os fármacos antidepressivos convencionais, como, por exemplo, os SSRIs, alteram a

morfologia da coluna dendrítica após administração aguda e crónica (Slocum et al., 2022).

Sabe-se que as substâncias psicadélicas podem induzir um elevado estado de entropia cerebral, levando a um aumento da capacidade de aprendizagem e “desaprendizagem” de certas informações; esta ação pode ser terapêutica, estando associada a um aumento dos mecanismos de plasticidade neural a nível celular. Além disso, já foi demonstrado em modelos *in vitro* e *in vivo* que os psicadélicos e a ativação do recetor 5-HT_{2A} podem induzir alterações agudas na densidade e complexidade da arquitetura sináptica, através de diversos mecanismos (Kozłowska et al., 2022).

Os efeitos duradouros da terapia psicadélica não se encontram devidamente justificados, mas é possível que estejam relacionados com mudanças na expressão genética e/ou com fatores epigenéticos subjacentes à manutenção dos processos neurais normalizados pelo tratamento. De facto, existem vários genes que estão envolvidos na plasticidade sináptica, cuja expressão é alterada em resposta às substâncias psicadélicas e, além disso, a neurogénese também pode ser um fator relacionado com os efeitos duradouros. No seu conjunto, as vias de sinalização neurotrófica e de promoção da neuroplasticidade ativadas pelos psicadélicos são consideradas fundamentais para os mecanismos de ação dos seus efeitos terapêuticos (Kozłowska et al., 2022).

O envolvimento das células da microglia no alcance dos efeitos terapêuticos consiste num potencial componente mecanicista essencial, apesar de não ser frequentemente considerado, pois quase toda a atenção é dirigida para os neurónios no mecanismo de ação da psilocibina e de outros psicadélicos. As células da microglia são específicas para determinado tecido e renovam-se, correspondendo ao tipo macrófago do SNC; além disso, são diferentes de outros tipos de células, pois o seu surgimento ocorre no cérebro e na medula espinal durante o desenvolvimento fetal. Estas células, ao longo da sua vida no SNC, desenvolvem características e funções específicas de células imunitárias, apresentando uma mobilidade bastante elevada que permite uma análise contínua do ambiente que, por sua vez, permite dar resposta a lesões e infeções. As células da microglia também participam de forma ativa na reorganização sináptica e na regeneração do tecido neural, modulando a eliminação de ligações desnecessárias e a formação de novas ligações. Assim, é possível que os psicadélicos estimulem a plasticidade neural através da regulação das células da microglia, sendo esta hipótese

suportada pela existência de recetores que são alvo de certos psicadélicos – 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₇ e sigma-1 –, como a psilocibina e o LSD, nas células da microglia (Kozłowska et al., 2022).

3.1.2 O envolvimento da *default mode network*

Existe um grupo de regiões cerebrais, conhecido por *default mode network* (DMN), que demonstra atividade acrescida durante a fase de descanso e atividade decrescida durante a realização de tarefas cognitivamente exigentes. A atividade e a conectividade funcional interna na DMN é acentuadamente reduzida, segundo vários estudos, na presença de psicadélicos clássicos, o que leva a uma redução potencial da ruminação abstrata (perceptualmente dissociada) e autorreferencial, que consiste numa característica do pensamento depressivo. Também se verificaram mudanças semelhantes após a administração de sertralina, o que pode indicar que estas não são específicas dos psicadélicos. O estado psicadélico produz co-ativação entre a DMN e as designadas *task positive networks*, que consistem numa rede de regiões cerebrais que se ativam durante tarefas que exigem atenção, sendo que, normalmente, estas duas redes são anti-correlacionadas (Johansen et al., 2022).

3.1.3 Recetores alvo e imunomodulação

As substâncias psicadélicas modificam a dinâmica das atividades neurais através da ativação de vários recetores. Especificamente, o agonismo com o recetor 5-HT_{2A} exerce um aumento na excitabilidade neuronal por meio de diversos mecanismos, como despolarização da membrana e diminuição da pós-hiperpolarização. Por outro lado, alguns psicadélicos também possuem a capacidade de se ligar a outros recetores, cujas consequências funcionais são opostas às referidas. Desta forma, a abundância relativa e a distribuição subcelular dos diferentes subtipos de recetores são fatores cruciais no que diz respeito aos efeitos destes compostos nas atividades elétricas de um neurónio (Kwan et al., 2022).

Os recetores da serotonina, bem como os recetores sigma-1 e os recetores associados a aminas vestigiais (TAAR), estão presentes no SNC e noutros tecidos, incluindo células de imunidade inata e adaptativa, e são responsáveis pela imunomodulação, isto é, pela mediação da resposta imunológica. Os psicadélicos clássicos interagem com os referidos recetores e a serotonina é considerada como sendo

crítica para a homeostasia imunitária. Desta forma, estas substâncias podem regular as respostas imunitárias adaptativas e inatas, pois os recetores mencionados desempenham um papel importante na resposta imunitária e todos eles podem ser estimulados por psicadélicos (Kozłowska et al., 2022).

a) Recetores 5-HT

A serotonina apresenta-se como um dos mais críticos fatores durante o desenvolvimento do cérebro fetal e durante a neurogénese, sendo responsável pela formação de axónios e dendrites. Além de atuar como neurotransmissor, a serotonina tem um efeito endócrino na regulação da homeostasia corporal, afetando a frequência cardíaca, a motilidade intestinal e a resposta imunitária (Kozłowska et al., 2022).

Em 1960, surgiu a hipótese da serotonina, segundo a qual os distúrbios do humor e da ansiedade seriam o resultado de défices nos níveis de serotonina no cérebro. A partir desta hipótese, foram desenhados os antidepressivos para aumentar os níveis deste neurotransmissor e reverter os referidos distúrbios. Atualmente, é aceite pela comunidade científica que existem vários fatores que afetam os diversos distúrbios mentais – fatores genéticos, ambientais e outros sistemas biológicos, como o caso do sistema da norefedrina e do dopaminérgico (Lowe et al., 2022).

Os recetores de serotonina são responsáveis pela mediação das emoções e do humor, como a ansiedade e a agressão, da cognição, da memória de aprendizagem, do apetite e de muitos outros processos biológicos, neurológicos e neuropsiquiátricos (Lowe et al., 2022). Estes recetores localizam-se nos sistemas nervosos central e periférico e estão presentes na maioria dos diferentes tipos de células do SNC, sendo que são alvo de numerosos compostos recreativos e medicamentos, tais como alucinogénios, empatógenos, antipsicóticos, antidepressivos, antieméticos, etc. (Kozłowska et al., 2022; Lowe et al., 2022).

A descrição primária dos recetores da serotonina associa-se com a capacidade destes para ativarem as vias pró-inflamatórias; no entanto, também apresentam propriedades anti-inflamatórias quando ativados por certos agentes psicadélicos. Assim, surge a hipótese que indica que os psicadélicos recrutam e ativam vias de sinalização anti-inflamatórias efectoras, enquanto a serotonina por si só recruta vias pró-inflamatórias (Kozłowska et al., 2022).

O recetor de serotonina mais associado aos psicadélicos corresponde ao 5-HT_{2A}, uma vez que estes exercem os seus efeitos através de agonismo com o mesmo. A afinidade com o recetor 5-HT_{1A} também se verifica, mas não foi demonstrado o mesmo nível de psicoatividade (Waters, 2021).

b) Recetores sigma-1

Os recetores sigma-1 são proteínas transmembranares localizadas nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático, estando abundantemente presentes no SNC, nomeadamente em neurónios, astrócitos, oligodendrócitos e células da microglia, onde exercem efeitos neuroprotetores. A atividade destes recetores promove o funcionamento e a sobrevivência neural através da modulação da homeostasia do cálcio (Ca²⁺), da atenuação do stress oxidativo, da regulação da gliose, da neuroplasticidade e da atividade do glutamato (Kozłowska et al., 2022).

Quando os recetores sigma-1 de células progenitoras de oligodendrócitos são estimulados ocorre a diferenciação de oligodendrócitos; por sua vez, a estimulação destes recetores em astrócitos melhora a secreção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Assim, seleccionar os recetores sigma-1 pode ser uma estratégia terapêutica promissora para condições psiquiátricas e neurodegenerativas; para isso, poder-se-á recorrer a agonistas destes recetores, como é o caso do DMT (Kozłowska et al., 2022).

c) Recetores associados a aminas vestigiais

Os TAARs são recetores associados a proteínas G e encontram-se de forma abundante no SNC, sendo que, na maioria dos seres vertebrados, existem em nove isoformas (Kozłowska et al., 2022).

O TAAR1 é o único recetor deste tipo que foi estudado em profundidade, sendo conhecido por ser relativamente não-seletivo e por ter afinidade para as aminas vestigiais endógenas, para os neurotransmissores clássicos serotonina e dopamina e para várias substâncias psicoativas, incluindo anfetaminas, derivados da ergolina, psilocina, DMT e mescalina. Este recetor específico é responsável pela modulação da neurotransmissão induzida por recetores canónicos de dopamina, serotonina e glutamina e, quando ocorrem variantes raras, estas podem contribuir para a etiologia da

esquizofrenia. O TAAR1 é expresso além do SNC, em tecidos como a tireoide, o estômago, o pâncreas e o intestino, onde pode regular as funções corporais de forma endócrina. Além da esquizofrenia, existem dados que sugerem o envolvimento de anormalidades na expressão ou na função dos TAARs noutras condições neuropsiquiátricas (Kozłowska et al., 2022).

Os recetores TAA encontram-se em células imunitárias e podem exibir efeitos imunomodulatórios, mas o conhecimento relativamente a estes recetores e às respostas imunitárias é escasso (Kozłowska et al., 2022).

3.2 Set e setting terapêuticos

O contexto em que ocorre a terapia assistida por psicadélicos pode ser um fator determinante nos resultados da mesma, isto é, estes resultados são fortemente influenciados pelo *set* e pelo *setting* nos quais decorrerá a experiência. O *set* corresponde à mentalidade do participante, nomeadamente as suas expectativas, suposições e intenções relativamente à “viagem” psicadélica, bem como à sua personalidade e eventual presença de psicopatologias. Por outro lado, o *setting* refere-se ao ambiente físico, social e cultural no qual ocorre a experiência (Johansen et al., 2022).

3.3 Preparação dos indivíduos e sessão de dosagem

Primeiramente, os participantes são acompanhados em várias sessões de psicoterapia para que se sintam preparados para a experiência psicadélica e capacitados para responder de forma construtiva à mesma, estabelecendo-se, assim, uma relação entre o participante e os terapeutas. Uma vez realizada e terminada a sessão psicadélica, os indivíduos recebem assistência através de novas sessões de psicoterapia com o objetivo de integrar a experiência (Johansen et al., 2022).

A sessão de dosagem psicadélica é efetuada através de uma abordagem terapêutica não-diretiva, ou seja, a concentração dos participantes é dirigida para o seu próprio interior. Adicionalmente, o envolvimento com quaisquer pensamentos ou memórias que possam surgir é encorajado pelos terapeutas (Johansen et al., 2022).

Em relação à dosagem propriamente dita, importa referir que, no geral, as dosagens terapêuticas benéficas dos compostos psicadélicos demonstraram ser bem

toleradas e apresentam um perfil de segurança favorável no tratamento de uma série de doenças (Kozłowska et al., 2022).

3.4 Microdosagem

As microdoses contêm concentrações muito baixas de um determinado composto psicadélico, não atingindo o limiar dos efeitos comportamentais perceptíveis. Normalmente, estas doses correspondem a 10% das doses recreativas ativas (no caso do LSD, 10-15 µg) que são administradas até três vezes por semana (Kozłowska et al., 2022).

Pensa-se que a microdosagem melhora o pensamento criativo, a função cognitiva e o bem-estar psicológico geral, sendo descrita maioritariamente, por entusiastas saudáveis, no contexto da autoaplicação. Por outro lado, existem poucos estudos controlados de forma rigorosa sobre a microdosagem e os efeitos terapêuticos deste tipo de doses psicadélicas para o tratamento de perturbações psiquiátricas são questionáveis (Kozłowska et al., 2022).

3.5 Abordagem sem alucinações

Já foi proposta a associação direta entre os efeitos alucinogénios das substâncias psicadélicas e o potencial terapêutico das mesmas na abordagem psicoterapêutica assistida por psicadélicos. No entanto, surge um problema relativamente aos efeitos psicotrópicos destes compostos quando os indivíduos em causa sofrem de neurodegenerescência específica do cérebro, pois esses mesmos efeitos podem apresentar-se como sendo uma limitação grave, principalmente se for necessário, devido à fisiologia da doença, administrar o medicamento com maior frequência e utilizar doses mais elevadas (Kozłowska et al., 2022).

A potência já demonstrada que os psicadélicos exercem em múltiplos modelos animais de diferentes doenças sugere que a eliminação dos comportamentos alucinogénios das moléculas eficazes pode não ser necessária, uma vez que a dose é tão baixa que os efeitos sobre os comportamentos não seriam observados a níveis terapêuticos relevantes. Apesar disso, foi sugerida a possibilidade de afastar os efeitos alucinogénios dos efeitos terapêuticos, de forma a desenvolver agonistas do recetor 5-HT_{2A} não-alucinogénios com potencial anti-inflamatório; este desenvolvimento iria

permitir a utilização de doses mais elevadas, especialmente no caso de psicadélicos cuja potência é menor, permitindo, por sua vez, uma maior eficácia em determinadas circunstâncias (Kozłowska et al., 2022), como as discutidas no parágrafo anterior. Por outro lado, já foi demonstrado que os efeitos dos alucinogénios serotoninérgicos podem ser bloqueados através da administração de antagonistas do recetor 5-HT₂, como é o caso da cetanserina e da pirenperona (Waters, 2021), por isso, talvez este seja um dos caminhos promissores a considerar para resolver o problema das alucinações na terapia psicadélica.

4. Limitações

O grande obstáculo inicial que se encontra por ultrapassar é a falta de elucidação relativamente aos mecanismos de ação neurobiológicos e fisiológicos dos compostos psicadélicos (Lowe et al., 2022). Além disso, sabe-se que a ativação dos recetores 5-HT_{2A} é responsável pelos efeitos alucinogénios destas substâncias e pode mediar alguns dos efeitos terapêuticos; no entanto, não existem estudos clínicos que tenham testado explicitamente a base molecular dos potenciais efeitos terapêuticos dos psicadélicos no ser humano (Kwan et al., 2022).

Outro ponto a considerar consiste no facto de muitas substâncias psicadélicas ativarem o recetor 5-HT_{2C}, cuja expressão é elevada e que regula a função dos neurónios dopaminérgicos. Devido às diferenças que podem ocorrer no RNA, ou seja, devido ao *splicing* alternativo que ocorre no gene do recetor 5-HT_{2C}, existem várias isoformas do mesmo, mas não é possível diferenciar estes recetores dos 5-HT_{2A} pois não existem ferramentas farmacológicas que permitam efetuar essa distinção. Adicionalmente, também não existem agonistas potentes, nem antagonistas seletivos do recetor 5-HT_{2A} (Kwan et al., 2022), sendo este um outro obstáculo para proceder à diferenciação entre este e o 5-HT_{2C}.

No que diz respeito a estudos que têm por base a terapia assistida por substâncias psicadélicas, o problema reside no facto de que muitos dos ensaios completos até hoje têm sido estudos abertos ou estudos-piloto, com pequenos tamanhos de amostra. Adicionalmente, nenhum ensaio demonstra a utilização de um controlo ativo e estudos onde são utilizados placebos ou controlos não-psicoativos correm o risco de permitir aos participantes a identificação da substância que ingeriram, devido à

natureza psicoativa dos psicadélicos. Simultaneamente, é necessário realizar uma pesquisa exploratória que permita compreender a forma como os “avanços emocionais” derivados da terapia assistida por psicadélicos afetam os respetivos resultados terapêuticos, principalmente em indivíduos depressivos (Johansen et al., 2022).

Os psicoestimulantes, que incluem os psicadélicos, podem alterar a arquitetura dendrítica, como vimos noutros pontos desta introdução, e as exposições crónicas podem levar à perda de espinhas dendríticas corticais. Assim, a compreensão da plasticidade neural induzida por psicadélicos é crucial para a descoberta de medicamentos, uma vez que pode ser utilizada como biomarcador de remodelação estrutural. Além disso, o papel dos tipos de células nas respostas neurais às substâncias psicadélicas não é claro, pois os registos neurofisiológicos foram realizados numa altura em que a diversidade celular era menos estudada (Kwan et al., 2022).

Para terminar, é de salientar que uma das maiores limitações das pesquisas que envolvem psicadélicos prende-se com o pouco conhecimento atual que temos relativamente à ligação entre as suas ações neurobiológicas e os seus efeitos comportamentais, não existindo uma compreensão dos alvos dos recetores, dos processos de plasticidade ou dos tipos de células responsáveis pelos efeitos benéficos dos ensaios clínicos (Kwan et al., 2022).

5. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para estudos toxicológicos

As leveduras têm sido indispensáveis, nomeadamente, na produção de pão, cerveja e vinho, sendo que existe alguma discordância quanto à fase em que primeiramente se recorreu a estes seres vivos para a referida produção. Por um lado, há quem acredite que a sua utilização ocorre desde 14 000 – 13 000 a.C. (Vanderwaeren et al., 2022); por outro lado, pensa-se que as primeiras cervejas tenham sido produzidas na China por volta de 7 000 a.C. e na Mesopotâmia e no Egito por volta de 3 500 – 3 100 a.C. Já a produção de pão utilizando leveduras apresenta fortes evidências que podem ser datadas de 10 000 a.C. (Nielsen, 2019). Independentemente de quando, de facto, se iniciou a utilização de leveduras em processos de produção de alimentos, a verdade é que não há como negar a importância destas células para os mesmos. Foi apenas no século XIX que Louis Pasteur demonstrou o papel essencial das leveduras no processo de fermentação, tendo observado que a formação de álcool durante a produção de

cerveja e vinho não decorria de forma espontânea, mas sim graças a células vivas que convertiam os açúcares derivados de cereais em etanol e dióxido de carbono (Nielsen, 2019; Vanderwaeren et al., 2022).

Um dos primeiros organismos eucariotas a ter o seu genoma completamente sequenciado e publicado, em 1996, foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ting et al., 2023). Tendo sido introduzida como organismo experimental na época de 1930 por Herschel Roman e colegas, esta é a espécie de levedura mais utilizada atualmente em estudos fundamentais e como fábrica de células (Gaikani et al., 2024; Nielsen, 2019). Já em finais de 1940, os estudos genéticos efetuados por Øjvind Winge e Carl Lindegren ajudaram a preparar o terreno para adoção das leveduras como modelo de sistemas (Gaikani et al., 2024).

Em 1987, foi demonstrado que um mutante de levedura com defeito no ciclo celular podia ser complementado por um gene humano, o que, por sua vez, demonstrou a alta conservação verificada nos mecanismos de controlo do ciclo celular entre leveduras e seres humanos (Vanderwaeren et al., 2022). O sucesso da utilização de leveduras como organismo modelo é atribuído a este elevado grau de conservação de vários processos celulares essenciais entre a levedura e as células humanas – por exemplo, autofagia, translocação e secreção de proteínas, degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático, etc. (Nielsen, 2019). Além disso, existem cerca de 32% de identidade na sequência de aminoácidos das proteínas entre a levedura e o ser humano no genoma completo e também se verifica um elevado grau de conservação, pois 47% dos 414 genes da levedura com um ortólogo humano 1:1 podem ser substituídos pelos mesmos (Nielsen, 2019; Vanderwaeren et al., 2022). Na verdade, apesar de estarem separados por cerca de mil milhões de anos, em termos evolutivos, mais de um terço do genoma da levedura tem uma parte homóloga no ser humano (Vanderwaeren et al., 2022).

Os estudos em leveduras utilizam uma abordagem imparcial e os conhecimentos adquiridos através dos mesmos podem ser transferidos para o ser humano, confirmando os dados obtidos com recurso a uma abordagem orientada num modelo celular humano (Yu & Nielsen, 2020). Por exemplo, a *S. cerevisiae* tornou-se fundamental para estudar

o metabolismo, a morfologia, a divisão celular, a secreção e outras funções celulares essenciais (Gaikani et al., 2024). Existem várias características da levedura que a tornam altamente adequada para estudos de biologia de sistemas, nomeadamente a capacidade para exercer um controlo preciso sobre a composição dos nutrientes, o fluxo metabólico e a taxa de crescimento das células. Assim, a análise de conjuntos de dados multiómicos é facilitada, pois as variáveis referidas são eliminadas, melhorando a qualidade dos dados, e o controlo ortogonal das mesmas permite obter novos conhecimentos biológicos (Yu & Nielsen, 2020).

Enquanto os três aspetos-chave da biologia celular – crescimento celular, metabolismo e expressão genética – estão altamente ligados e atuam de forma concertada para dar origem a fenómenos biológicos, o recurso à biologia de sistemas de leveduras permite dissecar as suas dinâmicas e interações através da manipulação cuidadosa das condições experimentais e da análise de dados. O elevado grau de conservação dos principais processos celulares entre a levedura e as células humanas permite que os modelos de células humanas (incluindo amostras primárias de doentes) sejam utilizados de forma mais eficaz em experiências de validação simples e bem concebidas (Yu & Nielsen, 2020).

Outras vantagens associadas à utilização de *S. cerevisiae* como modelo experimental prendem-se com o facto de estas células serem fáceis de cultivar em condições laboratoriais, pois não necessitam de um meio complexo para crescer. Além disso, as células dividem-se rapidamente, em intervalos de cerca de 90 min, se as condições laboratoriais forem ótimas. Esta divisão decorre, durante a mitose, através de um processo em que células filhas mais pequenas e geneticamente idênticas “emergem” das células mãe (Vanderwaeren et al., 2022).

É importante referir que a utilização de leveduras como organismo modelo para organismos mais complexos apresenta alguns “riscos”, no sentido em que os resultados nem sempre podem ser traduzidos sem verificação. Por exemplo, a maioria dos estudos com leveduras são efetuados em haploides, mas os organismos mais complexos, como é o caso dos seres humanos, são diploides (Vanderwaeren et al., 2022). Outro problema que se pode verificar na transposição de resultados “leveduras-humanos” consiste no facto de diferentes tecidos humanos, apesar de terem códigos genéticos semelhantes, exibirem propriedades anatómicas e fisiológicas distintas, sendo que ainda não se

compreende totalmente os processos bioquímicos específicos e as biomoléculas associadas que diferenciam vários tecidos, tal como não é ainda compreendida a extensão a que um organismo unicelular, como é o caso da levedura, pode ser utilizado como modelo para estes processos dentro de cada tecido (Mohammadi et al., 2015). No entanto, apesar de pequenos problemas que possam surgir, a levedura mantém-se como modelo fundamental para uma diversidade de questões experimentais, como, por exemplo, desvendar os mecanismos moleculares das proteínas que funcionam na resposta aos danos no DNA, bem como para explorar melhor a coordenação e a regulação da resposta a esses danos (Vanderwaeren et al., 2022).

6. Objetivos e importância do estudo

O presente trabalho visa contribuir para a compreensão de mecanismos celulares e moleculares da mescalina e do LSD utilizando como modelo celular leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras apresentam mecanismos moleculares e celulares semelhantes às células humanas, traduzindo-se numa abordagem mais simples que permite compreender a bioquímica fundamental das células em diferentes condições. Desta forma, estes seres vivos podem ser utilizados como modelo em estudos de mecanismos moleculares envolvidos em várias doenças humanas (Ferreira et al., 2019). Pretende-se, assim, verificar que alterações ocorrem nos padrões metabólicos das leveduras quando expostas aos compostos psicadélicos referidos, através da análise das alterações da taxa de crescimento e do metabolismo celular. As vantagens de utilizar as leveduras *S. cerevisiae*, além da sua semelhança com as células humanas, prendem-se com o facto de ser possível implementar metodologias mais rápidas e económicas, bem como com o facto de ser possível um estudo mais profundo a nível molecular. Os resultados deste estudo permitirão posteriormente desenhar outros estudos em modelos mais complexos como células humanas ou modelos animais.

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

1. Lista de reagentes e materiais

1.1 Reagentes

A base nitrogenada de levedura sem aminoácidos (YNB – Difco™ *Yeast Nitrogen Base without Amino Acids*) e o agar (Bacto™) foram adquiridos através da Quilaban (referências: 291940 e 214010, respectivamente). A glucose foi adquirida à Panreac (referência: 143140.1211) e a mistura de aminoácidos (CSM – *Complete Supplement Mixture*) foi adquirida à MP Biomedicals (referência: 4500-022). O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido a partir da VWR Chemicals (referência: 23486.297). O reagente de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetraol (MTT) foi adquirido à Sigma-Aldrich (referência: M5655-1G) e, para o ensaio de quantificação de adenosina trifosfato (ATP), foi utilizado o *ATP Colorimetric Assay Kit*, pertencente à Elabscience® (referência: E-BC-K157-S).

1.2 Substâncias estudadas

A mescalina (lote: 2-GHB-47-4) e o LSD (lote: 1222287) foram adquiridos através do LGC GmbH (Louis Pasteur Str. 30, 14943, Luckenwalde, Alemanha).

1.3 Materiais

Os materiais utilizados durante o manuseamento de células foram esterilizados recorrendo a uma autoclave (MLS-3780, Sanyo), sendo que o ciclo de esterilização tinha uma duração de 15 min a 121°C. A manipulação dos materiais foi efetuada em ambiente estéril, utilizando uma câmara de segurança biológica (SafeFAST Classic 212).

As células foram incubadas numa incubadora orbital (Agitorb 200IC, Norconcessus) e as microplacas numa incubadora orbital de microplacas com espectrofotómetro de ultravioleta (UV) (Biotek ELx 808). Por sua vez, as leituras de absorvância a 492 nm efetuadas no decorrer do ensaio do MTT foram realizadas com recurso a uma incubadora orbital de microplacas com espectrofotómetro UV distinta (TECAN, Infinite 200 Pro).

2. Cultura de células e ensaios de toxicidade

O presente trabalho foi desenvolvido com recurso a células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 *Wild Type* (WT). As propriedades citotóxicas do LSD e da mescalina foram investigadas através da avaliação das curvas de crescimento celular e da viabilidade celular na presença de concentrações crescentes de cada composto.

2.1 Cultura celular em microplaca de *S. cerevisiae* para estudo das curvas de crescimento na presença de LSD e mescalina

O modelo seguidamente descrito é utilizado no *Forensic, Biochemistry and Toxicology Lab*, de acordo com as especificações previamente publicadas (Ferreira et al., 2019). As culturas celulares foram efetuadas recorrendo a microplacas de fundo plano de 96 poços. As substâncias estudadas foram o LSD e a mescalina, tendo sido obtidas várias curvas de crescimento com diferentes concentrações. Cada microplaca foi preparada utilizando 3 pré-culturas, as quais foram analisadas em triplicado, obtendo-se um total de 9 replicados para cada concentração. A tabela representativa da microplaca pode ser consultada na Tabela 1.

Tabela 1 – Tabela representativa da microplaca utilizada para a realização das culturas celulares de *S. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de composto. Nos espaços em azul, “C” significa “cultura” e os números 1, 2 e 3 diferenciam as três culturas utilizadas, que foram analisadas em triplicado. Na linha B3-B11 foi colocada a cultura controlo e nas linhas C3-C11, D3-D11, E3-E11, F3-F11 e G3-G11 foram colocadas as culturas contendo os padrões de mescalina/LSD de 1 a 5, respetivamente, sendo 1 correspondente à concentração mais baixa e 5 à concentração mais alta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B (0 µM)	H ₂ O	YNB	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	H ₂ O
C (P1)	H ₂ O	YNB	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	H ₂ O
D (P2)	H ₂ O	YNB	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	H ₂ O
E (P3)	H ₂ O	YNB	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	H ₂ O
F (P4)	H ₂ O	YNB	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	H ₂ O
G (P5)	H ₂ O	YNB	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Para a mescalina, foram realizados 3 ensaios, sendo que o leque de concentrações das soluções padrão do primeiro ensaio correspondeu a 10, 25, 50, 75 e

100 µM; no segundo ensaio, foram utilizadas concentrações de 20, 50, 100, 150 e 200 µM; no terceiro e último ensaio, utilizaram-se concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µM. Para o LSD, foram realizados 3 ensaios, sendo que os padrões utilizados no primeiro ensaio apresentavam concentrações de 10, 25, 50 75 e 100 µM. Para os restantes ensaios, as concentrações utilizadas foram de 25, 50, 60, 75 e 100 µM.

O procedimento iniciou-se com a inoculação de uma colónia isolada de *S. cerevisiae* BY4741 WT em 3 mL de meio YNB (1% base nitrogenada de levedura sem aminoácidos; 2% glucose; CSM em concentração recomendada pelo fornecedor), seguindo-se uma incubação a 30°C com agitação orbital de 200 rpm, durante 6 h. Uma vez que se pretendia obter uma pré-cultura celular cujo valor de densidade ótica a 600 nm ($D.O_{600nm}$) inicial correspondesse a 0,002 ($\approx 1,67 \times 10^5$ células/mL), o inóculo foi diluído no mesmo meio após a realização dos cálculos efetuados através da Equação 1, a qual também permite que, no dia seguinte, o valor de $D.O_{600nm}$ final seja aproximadamente 0,4 ($\approx 3,34 \times 10^8$ células/mL). Os valores 0,002 e 0,4 permitiram obter culturas em fase de crescimento exponencial. A Equação 1 apresenta a relação entre os valores de $D.O.$ inicial e final, bem como os tempos de crescimento e de duplicação. $D.O._i$ corresponde à concentração do inóculo, $D.O._f$ à concentração pretendida no dia seguinte, T ao tempo, em horas, do intervalo que vai desde o momento da diluição até à realização da cultura e Td ao tempo de duplicação, também em horas.

$$D.O._i = \frac{D.O._f}{2^{(T/Td)}} \quad \text{Equação 1}$$

Assim, considerando as condições Td = 2 h, T = 16 h e $D.O._f$ = 0,4, foi realizada a diluição do inóculo, recorrendo a 3 mL de meio YNB. Seguiu-se uma incubação a 30°C com agitação orbital de 200 rpm, durante 16 h. Uma vez decorrido este intervalo de tempo, procedeu-se à realização das culturas finais, utilizando o mesmo meio de cultura e as pré-culturas, sendo o valor de $D.O_{600nm}$ pretendido correspondente a aproximadamente 0,03 ($2,5 \times 10^4$ células/mL).

Depois de efetuados os cálculos com recurso à Equação 1, foram transferidos os volumes necessários de meio YNB, de pré-cultura e de LSD/mescalina em DMSO (percentagem final de 0,4%) para uma microplaca de 96 poços, de modo que o volume final de cada poço correspondesse a 100 µL. A microplaca foi incubada a 30°C e 200 rpm durante 24 h, num leitor de microplacas. A medição do valor de $D.O_{600nm}$ foi

efetuada a cada hora decorrida. Os dados foram recolhidos com recurso ao *software* de análise de dados *Gene 5*. A análise dos resultados teve como base uma representação gráfica em dispersão, sendo apresentada a cinética de crescimento em função do tempo.

2.2 Modelo de regressão logística para adaptação de ensaios de toxicidade

As curvas de crescimento foram ajustadas à forma padrão da equação logística (Equação 2) após subtração do valor mínimo, através do pacote *growthcurver* v.0.2.1 para R v.3.5.0 (Sprouffske & Wagner, 2016).

$$N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right)e^{-rt}} \quad \text{Equação 2}$$

Na equação anterior, r corresponde ao valor da taxa de crescimento (h^{-1}), N_0 à biomassa inicial da população e K à biomassa final. O valor do tempo de duplicação (T_d , em h) foi calculado a partir da taxa de crescimento, r , utilizando a fórmula $\text{Ln}2/r$.

3. *Spot assay* para estudo da sensibilidade celular

As concentrações testadas no decorrer deste procedimento correspondem às utilizadas nos últimos ensaios de cinética de crescimento, ou seja, 100, 200, 300, 400 e 500 μM para a mescalina e 25, 50, 60, 75 e 100 μM para o LSD. Para a realização dos testes de sensibilidade, foi utilizado o mesmo procedimento descrito em 2.1 até ao passo em que é realizada a medição do valor de D.O. após 16 h de crescimento a 200 rpm e 30°C. De seguida, foi preparada uma microplaca de 96 poços para cada replicado biológico, ou seja, cada ensaio procedeu à preparação de três microplacas, utilizando um rácio de diluição de 10^0 a 10^{-5} , de acordo com o seguinte esquema (Tabela 2):

Tabela 2 – Tabela representativa da microplaca utilizada para a preparação das culturas celulares de *S. cerevisiae* para a realização do teste de sensibilidade. Na linha B4-B9 foram efetuadas as diluições da cultura controlo e nas linhas C4-C9, D4-D9, E4-E9, F4-F9 e G4-G9 foram diluídas as culturas contendo os padrões de mescalina/LSD de 1 a 5, respetivamente, sendo 1 correspondente à concentração mais baixa e 5 à concentração mais alta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B (0 µM)				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
C (P1)				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
D (P2)				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
E (P3)				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
F (P4)				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
G (P5)				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
H												

Para que fosse possível obter o rácio de diluição pretendido, foram adicionados os seguintes volumes aos respetivos poços (Tabela 3):

Tabela 3 – Volumes de cultura celular de *S. cerevisiae*, de meio YNB 2% glucose e de composto adicionados a cada poço, de modo a obter as diluições pretendidas.

Diluições	Sem composto	Com composto
10 ⁰	100 µL pipetados diretamente do replicado biológico para o poço	99,6 µL pipetados diretamente do replicado biológico para o poço + 0,4 µL de composto
10 ⁻¹	10 µL pipetados diretamente do replicado biológico para o poço + 90 µL de meio YNB 2% glucose	10 µL pipetados diretamente do replicado biológico para o poço + 89,6 µL de meio YNB 2% glucose + 0,4 µL de composto
10 ⁻²	1 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻¹) + 109 µL de meio YNB 2% glucose	1 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻¹) + 108,6 µL de meio YNB 2% glucose + 0,4 µL de composto
10 ⁻³	10 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻²) + 100 µL de meio YNB 2% glucose	10 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻²) + 99,6 µL de meio YNB 2% glucose + 0,4 µL de composto
10 ⁻⁴	10 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻³) + 100 µL de meio YNB 2% glucose	10 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻³) + 99,6 µL de meio YNB 2% glucose + 0,4 µL de composto
10 ⁻⁵	10 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻⁴) + 90 µL de meio YNB 2% glucose	10 µL pipetado a partir do poço anterior (10 ⁻⁴) + 89,6 µL de meio YNB 2% glucose + 0,4 µL de composto

Uma vez preparadas as microplacas, com recurso ao objeto apresentado na Figura 4 (A e B), foram transferidas as culturas diluídas para uma placa de Petri de 50 mL contendo meio YNB 2% glucose agar. As placas foram colocadas na estufa a 30°C, durante 3 dias.

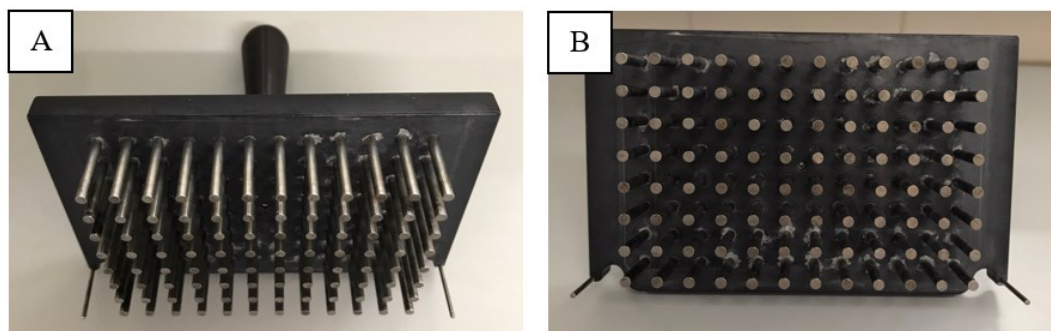


Figura 4 – Instrumento utilizado para a transferência das culturas diluídas a partir de uma microplaca de 96 poços para uma placa de Petri de 50 mL contendo meio YNB 2% glucose agar.

4. Ensaio MTT para estudo da viabilidade celular

O ensaio MTT baseia-se na redução, por células viáveis, do sal amarelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, resultando na formação de cristais violeta de formazano. Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as concentrações de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 μM para a mescalina e de 0, 25, 50, 60, 75 e 100 μM para o LSD. A solução de MTT foi preparada numa concentração de 5 mg/mL em água desionizada.

Tal como no ensaio de crescimento celular, este protocolo iniciou-se com a inoculação de colónias de BY4741 WT em meio YNB 2% glucose, seguindo-se as incubações de 6 h e de 16 h, já mencionadas em 2.1. Depois do cálculo para saber quais os volumes de cultura a transferir para os *erlenmeyers*, estes foram incubados a 30°C e 100 rpm. Cada substância foi sujeita a quatro ensaios distintos, uma vez que se pretendia a recolha de leveduras em diferentes fases de crescimento. Assim, as recolhas foram realizadas 1 h e 30 min (fase de crescimento inicial), 4 h (fase exponencial), 7 h (fase médio-exponencial) e 24 h (fase estacionária) após o início do crescimento. A densidade ótica foi medida em cada recolha efetuada. Na fase de crescimento inicial, foram recolhidos 1500 μL , nas fases exponenciais foram recolhidos 1000 μL e na fase estacionária foram recolhidos 500 μL , seguindo-se uma centrifugação a 11 200 g durante 3 min. A recolha de diferentes volumes serve para compensar o crescimento das

culturas, ou seja, serve para que não haja diferenças no número de células analisado. Prosseguiu-se com uma lavagem recorrendo a água desionizada fria, seguida de uma ressuspensão em 100 µL de água, aos quais foram adicionados 10 µL de solução MTT. Depois desta preparação, os tubos foram incubados no escuro durante 3 h, a uma temperatura de 30°C e com agitação orbital de 100 rpm. Uma vez decorridas as 3 h de incubação, foram efetuadas uma nova centrifugação a 4032 g durante 3 min e uma nova ressuspensão em 100 µL de DMSO. Por fim, realizou-se a medição da redução do MTT num comprimento de onda de 492 nm, recorrendo a um leitor de microplacas.

De forma a garantir que o ensaio decorria como esperado, foi também preparado e analisado um controlo positivo. Assim, foi utilizada uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 5% (V/V), uma vez que, em estudos anteriores, já foi verificada uma perda de viabilidade celular entre os 85 e os 90% na presença deste composto em leveduras *S. cerevisiae* (Valério et al., 2020).

Os valores do MTT reduzido foram calculados através da normalização dos valores obtidos para a absorvância pelo máximo (controlo negativo) e pelo mínimo (controlo positivo), recorrendo à Equação 3, em que A corresponde à amostra (culturas de levedura contendo mesalina/LSD), CN corresponde ao controlo negativo (culturas de levedura sem adição de qualquer composto) e CP corresponde ao controlo positivo (culturas de levedura contendo SDS a 5% (V/V)).

$$A = \frac{A-CN}{CP-CN} \quad \text{Equação 3}$$

5. Quantificação de ATP para estudo da atividade metabólica

Para quantificar o ATP, recorreu-se ao *ATP Colorimetric Assay Kit* da Elabscience®, cujo princípio de deteção tem por base a catálise do ATP e da creatina, realizada pela creatina quinase, sendo produzido fosfato de creatina, que é detetado por colorimetria do ácido fosfomolibdico. Este ensaio foi efetuado utilizando as concentrações de 0, 100 e 500 µM no caso da mesalina e de 0, 25 e 100 µM no caso do LSD.

Mais uma vez, este protocolo começou pela inoculação de colónias de BY4741 WT em meio YNB 2% glucose, seguindo-se as incubações de 6 h e de 16 h, mencionadas em 2.1. Após o cálculo de volumes a transferir para novos *falcons*,

procedeu-se a uma incubação de 7 h, a 30°C e 200 rpm. Desta forma, a recolha de 1500 µL de amostra foi realizada na fase de crescimento médio-exponencial, à qual se seguiu uma centrifugação a 12 100 g e 4°C, durante 5 min e uma lavagem com água desionizada. Após o descarte do sobrenadante, os sedimentos celulares foram imediatamente congelados em azoto líquido até ao dia seguinte. O protocolo prosseguiu com a ressuspensão dos sedimentos celulares, utilizando a *buffer solution* cedida pelo *kit*. A lise celular foi realizada recorrendo a um volume idêntico de esferas de vidro, através de 5 etapas consecutivas de agitação em vórtex (15 s) e refrigeração em gelo. Para que fosse possível separar os sedimentos celulares e as esferas de vidro do sobrenadante, foi efetuada uma centrifugação a 12 100 g e 4°C, durante 2 min. A quantificação de ATP prosseguiu de acordo com as instruções fornecidas no *kit*. O cálculo da concentração de ATP foi efetuado de acordo com a Equação 4, considerando uma massa de amostra correspondente a 1 g, em que c corresponde à concentração do padrão (1 mmol/L), m corresponde ao peso líquido de amostra, V_1 corresponde ao volume utilizado de solução de extração durante o pré-tratamento da amostra e f corresponde ao fator de diluição.

$$ATP \text{ (mmol/kg)} = \frac{D.O.amostra - D.O.controlo}{D.O.padrão - D.O.branco} \times c \times \frac{m}{V_1} \times f \quad \text{Equação 4}$$

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Curvas de crescimento celular

O presente trabalho pretendia avaliar a curva de crescimento celular de leveduras *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de diferentes concentrações de mescalina e de LSD. Dada a baixa solubilidade dos referidos compostos em água, foi utilizado DMSO como solvente, de forma a permitir a solubilização das moléculas no meio em contacto com as células. O DMSO é um solvente orgânico anfipático que possui a capacidade de dissolver vários compostos orgânicos e inorgânicos, sendo que já foram efetuados estudos que indicam que a utilização de baixas percentagens deste solvente, por norma até 0,4% (V/V), não implica uma toxicidade significativa para as células (Kakolyri et al., 2016; Sadowska-Bartosz et al., 2013). Assim, a percentagem de DMSO utilizada neste estudo foi exatamente de 0,4% (V/V), estando de acordo com os protocolos já instituídos no *Forensic, Biochemistry and Toxicology Lab* da *Egas Moniz School of Health and Science*. Não obstante, de forma a garantir que este solvente não afetaria os resultados dos ensaios pretendidos, foram realizadas duas curvas de crescimento num ensaio comum, com e sem adição de DMSO – Figura 5.

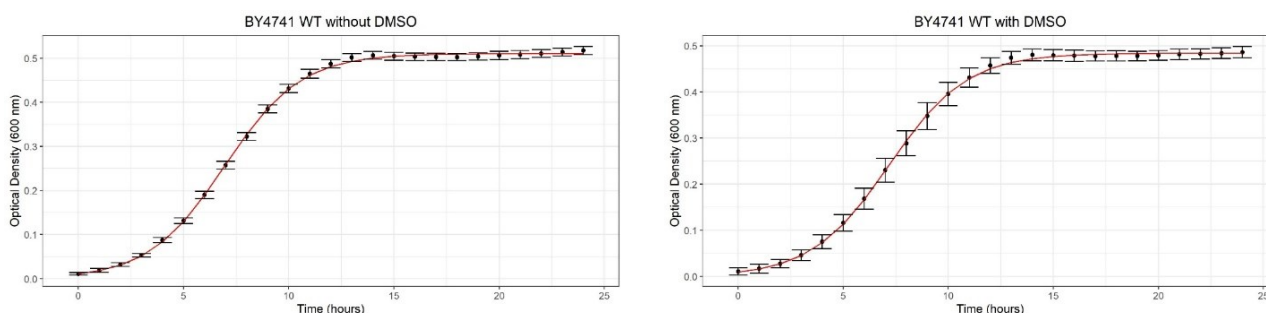


Figura 5 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (à esquerda) e na presença (à direita) de DMSO a 0,4% (V/V). O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas.

A análise visual das curvas de crescimento acima representadas não aparenta demonstrar diferenças entre a curva controlo (sem DMSO) e a curva onde foi adicionado DMSO à cultura celular. No entanto, é necessário verificar os parâmetros associados às curvas de crescimento. Na Tabela 4, são demonstrados os valores de tempo de duplicação (T_d), taxa de crescimento (r) e biomassa final (K) obtidos para as curvas de crescimento de levedura na ausência e na presença de DMSO. Estes valores foram calculados com recurso à Equação 2, apresentada no ponto 2.2 do Capítulo II,

que permitiu efetuar o ajuste dos dados cinéticos dos crescimentos das leveduras na presença e na ausência de DMSO.

Tabela 4 – Valores obtidos para o tempo de duplicação (Td), para a taxa de crescimento (r) e para a biomassa final (K) das curvas de crescimento representadas na Figura 5.

C (% V/V)	Td (min)	r (h⁻¹)	K (D.O._{600nm})
0	75,0	0,553 ± 0,006	0,510 ± 0,001
0,4	76,8	0,540 ± 0,010	0,484 ± 0,002

Os parâmetros obtidos mostram diferenças muito ligeiras entre os tempos de duplicação e as taxas de crescimento. Apesar da diferença ser diminuta, ocorre um ligeiro impacto negativo no valor de biomassa final. Como este valor é o resultado do crescimento celular durante 24 horas, qualquer diferença, mesmo sendo ligeira, na taxa de crescimento terá diferenças potencialmente significativas na biomassa final.

Foram efetuadas três curvas de crescimento de células de levedura *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência e na presença de mescalina, sendo as concentrações testadas de 0 (controlo negativo), 10, 25, 50, 75 e 100 µM no primeiro ensaio; 0, 20, 50, 100, 150 e 200 µM no segundo ensaio e 0, 100, 200, 300, 400 e 500 µM no terceiro ensaio. As Figuras 6, 7 e 8 correspondem às curvas de crescimento obtidas para os referidos ensaios, respetivamente.

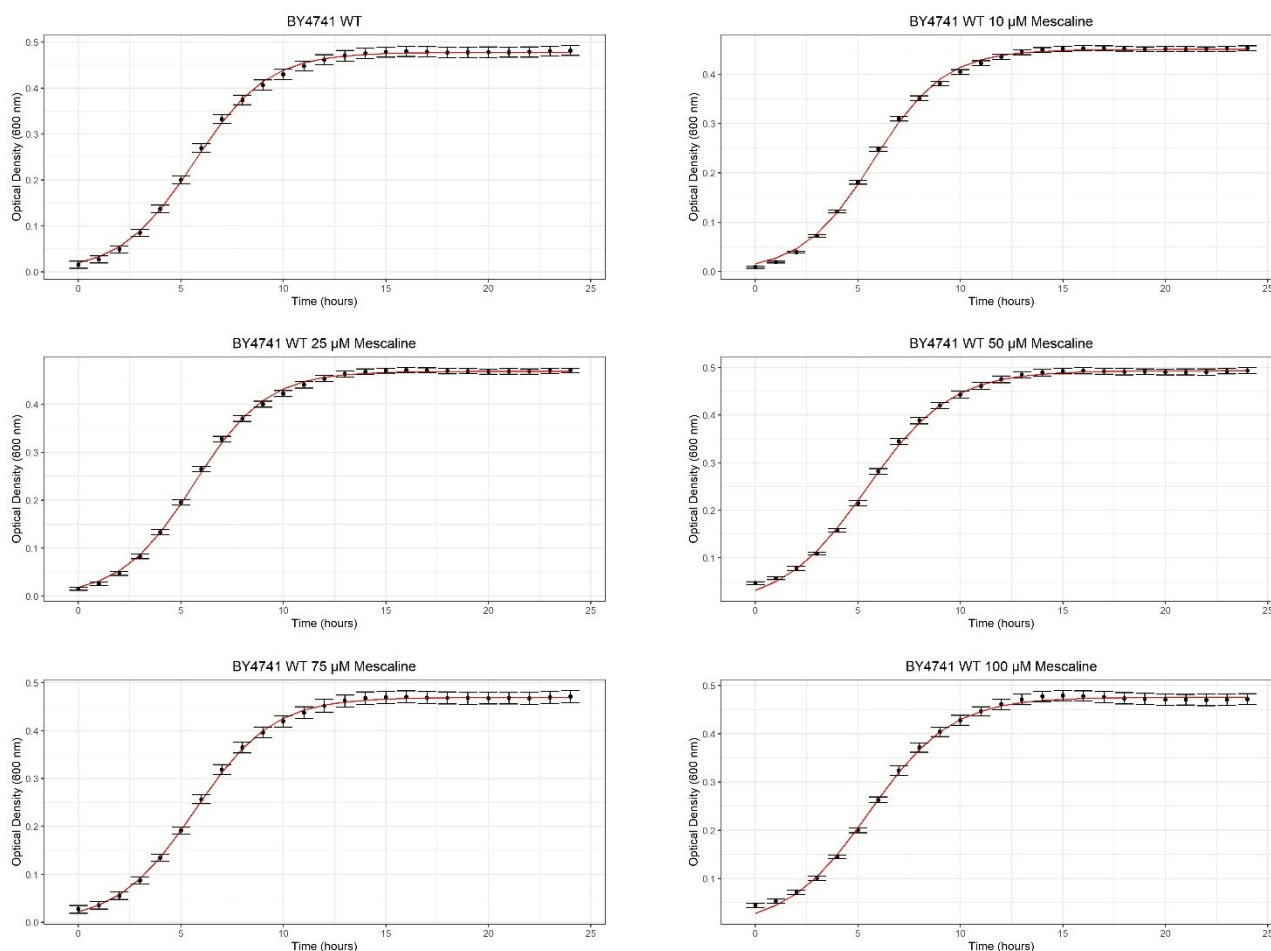


Figura 6 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de mescalina (10, 25, 50, 75 e 100 μM) – ensaio 1. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas.

A análise visual dos gráficos correspondentes ao primeiro ensaio efetuado com concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 μM de mescalina permite aferir que não existem diferenças entre a biomassa final de cada curva, uma vez que todas apresentam uma fase estacionária com valores de densidade ótica próximos de 0,5. A escolha do intervalo de concentrações utilizadas neste primeiro ensaio foi feita de acordo com aquelas já instituídas no protocolo em questão. No entanto, a dose necessária para produzir efeitos é, normalmente, mais elevada para a mescalina do que para outros compostos com ação psicofarmacológica. Por este motivo, foi realizado um segundo ensaio, no qual se procedeu ao aumento das concentrações das soluções padrão, no sentido de perceber se a substância em estudo não afeta o crescimento das células ou se, no primeiro ensaio, não se verificaram alterações devido ao uso de baixas concentrações.

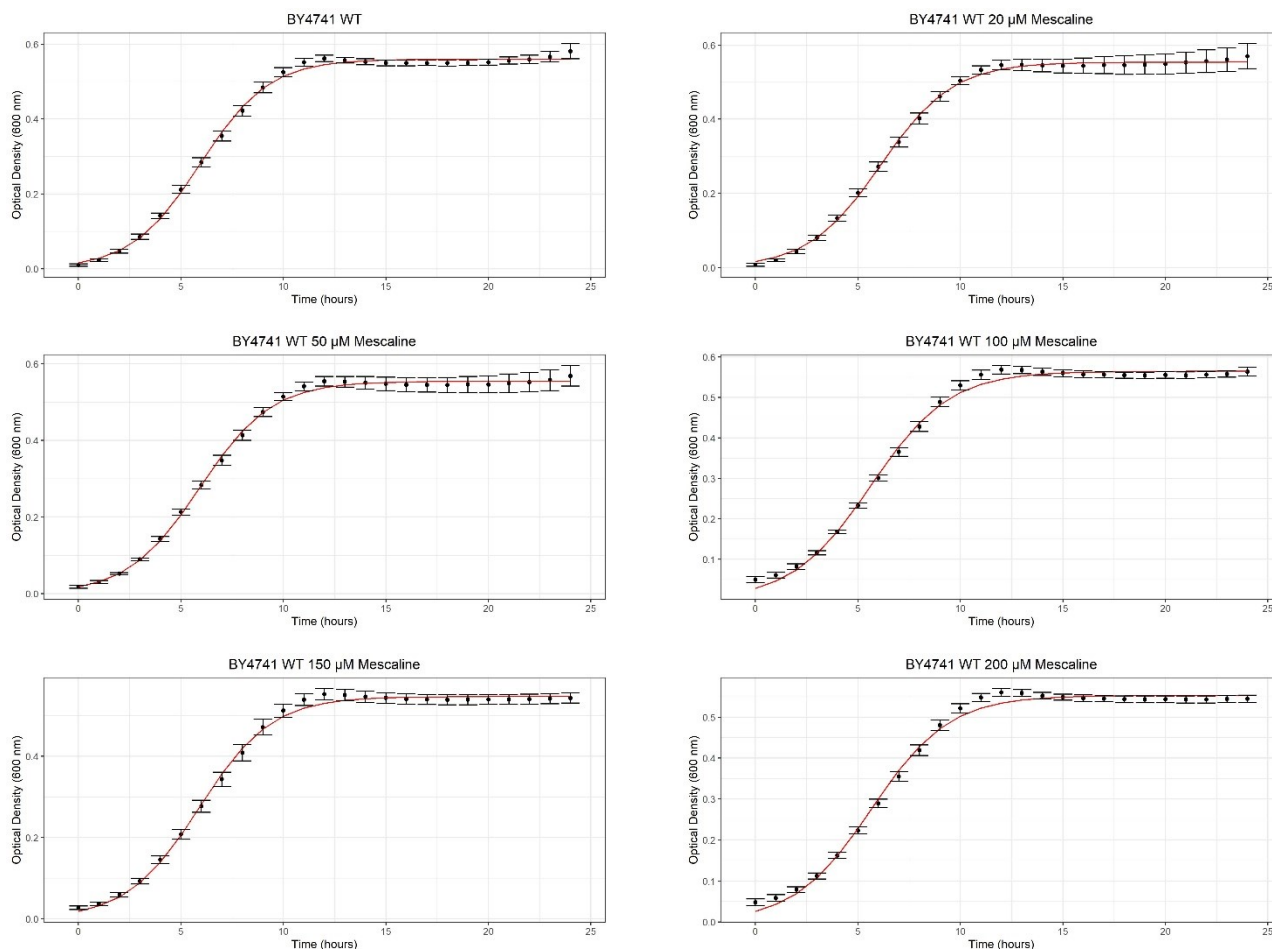


Figura 7 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de mescalina (20, 50, 100, 150 e 200 µM) – ensaio 2. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas.

Avaliando visualmente as curvas de crescimento presentes na Figura 7, os valores de densidade ótica atingidos na fase estacionária aparentam ser semelhantes para as curvas de controlo e de 20, 50 e 100 µM. Por outro lado, para os gráficos em que a concentração de mescalina corresponde a 150 e 200 µM, parece existir uma ligeira diminuição destes valores no decorrer da fase estacionária.

Foi realizado um terceiro ensaio onde, mais uma vez, se recorreu ao aumento das concentrações das soluções padrão, com o pretexto de confirmar se ocorrem diferenças nos crescimentos utilizando soluções de mescalina mais concentradas.

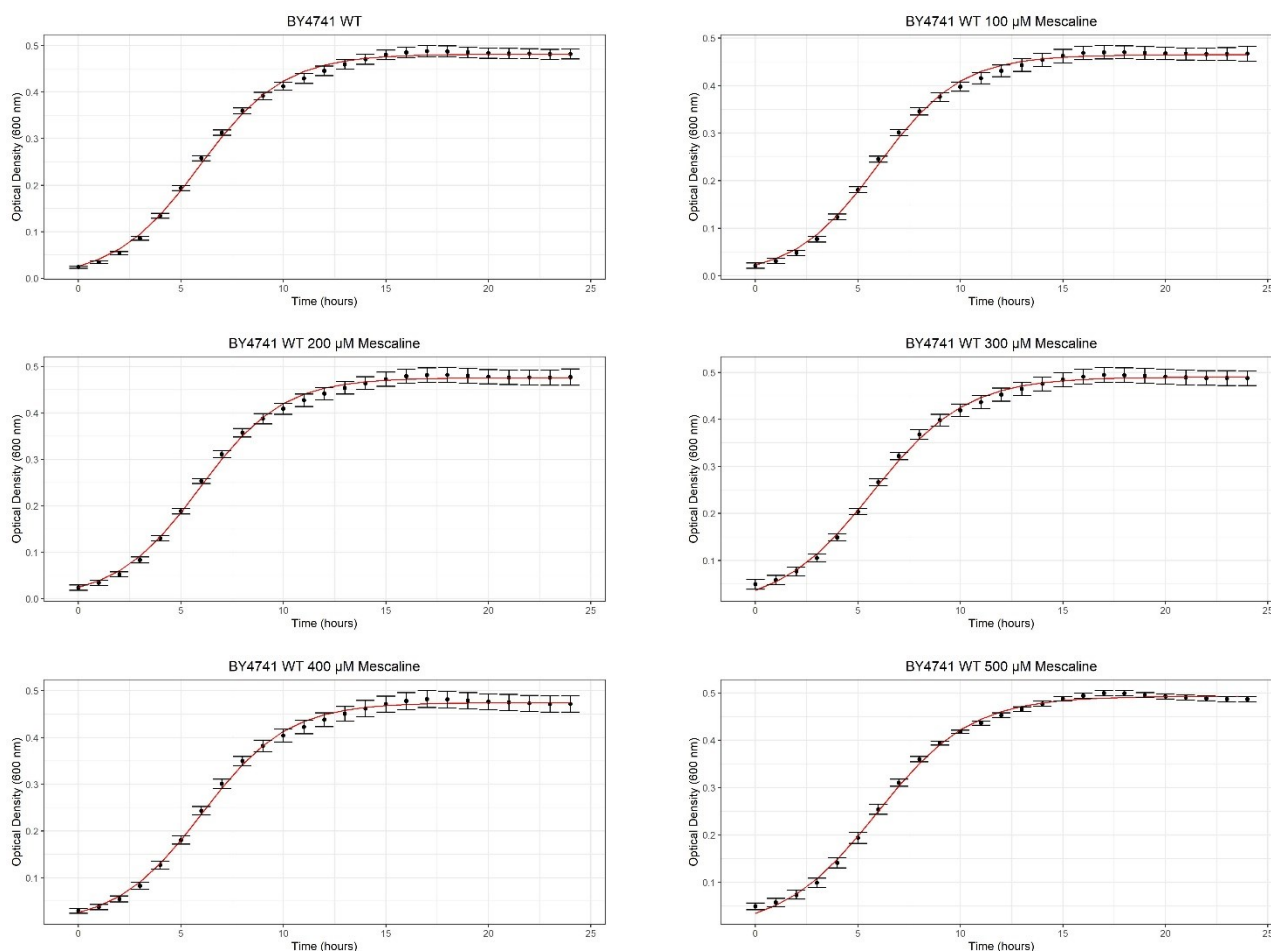


Figura 8 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de mescalina (100, 200, 300, 400 e 500 μM) – ensaio 3. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas.

Visualmente, observa-se que as fases estacionárias obtidas para os seis crescimentos do ensaio realizado com concentrações de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 μM de mescalina atingiram valores de densidade ótica muito próximos, o que poderá ser uma indicação de que nenhuma das concentrações de mescalina afetou o ciclo de vida das leveduras.

A análise visual de gráficos não é a forma mais fiável de se interpretar qualquer resultado, principalmente em casos como o que aqui se verifica, em que as curvas de crescimento se apresentam muito semelhantes, dificultando, ou até mesmo impossibilitando, a distinção.

Na Tabela 5, são demonstrados os valores de tempo de duplicação (T_d), taxa de crescimento (r) e biomassa final (K) obtidos para as curvas de crescimento de levedura na ausência e na presença de mescalina. Estes valores foram calculados com recurso à

Equação 2, apresentada no ponto 2.2 do Capítulo II, que permitiu efetuar o ajuste dos dados cinéticos dos crescimentos das leveduras na presença e na ausência de mescalina.

Tabela 5 – Valores obtidos para o tempo de duplicação (Td), para a taxa de crescimento (r) e para a biomassa final (K) das curvas de crescimento de *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de concentrações crescentes de mescalina (representadas nas Figuras 6, 7 e 8, que correspondem aos ensaios 1, 2 e 3, respetivamente).

Ensaio	C (μM)	Td (min)	r (h^{-1})	K (D.O. _{600nm})
1	0	74,4	$0,559 \pm 0,007$	$0,477 \pm 0,001$
	10	72,0	$0,577 \pm 0,005$	$0,450 \pm 0,001$
	25	73,2	$0,567 \pm 0,005$	$0,469 \pm 0,001$
	50	84,6	$0,492 \pm 0,004$	$0,494 \pm 0,001$
	75	78,0	$0,531 \pm 0,007$	$0,469 \pm 0,001$
	100	82,8	$0,501 \pm 0,006$	$0,476 \pm 0,001$
2	0	69,6	$0,596 \pm 0,009$	$0,560 \pm 0,001$
	20	72,6	$0,570 \pm 0,012$	$0,554 \pm 0,002$
	50	72,6	$0,572 \pm 0,012$	$0,555 \pm 0,002$
	100	79,8	$0,522 \pm 0,008$	$0,565 \pm 0,001$
	150	73,2	$0,568 \pm 0,012$	$0,547 \pm 0,002$
	200	78,6	$0,530 \pm 0,010$	$0,553 \pm 0,002$
3	0	85,2	$0,487 \pm 0,006$	$0,482 \pm 0,001$
	100	84,0	$0,497 \pm 0,008$	$0,465 \pm 0,001$
	200	84,0	$0,495 \pm 0,008$	$0,475 \pm 0,001$
	300	94,2	$0,440 \pm 0,007$	$0,490 \pm 0,002$
	400	87,0	$0,479 \pm 0,008$	$0,475 \pm 0,002$
	500	95,4	$0,437 \pm 0,005$	$0,493 \pm 0,001$

A obtenção dos valores presentes na tabela anterior permitiu traçar gráficos onde é possível observar visualmente a variação dos parâmetros de tempo de duplicação e de biomassa final de cada ensaio efetuado com mescalina. Estes gráficos podem ser consultados na Figura 9.

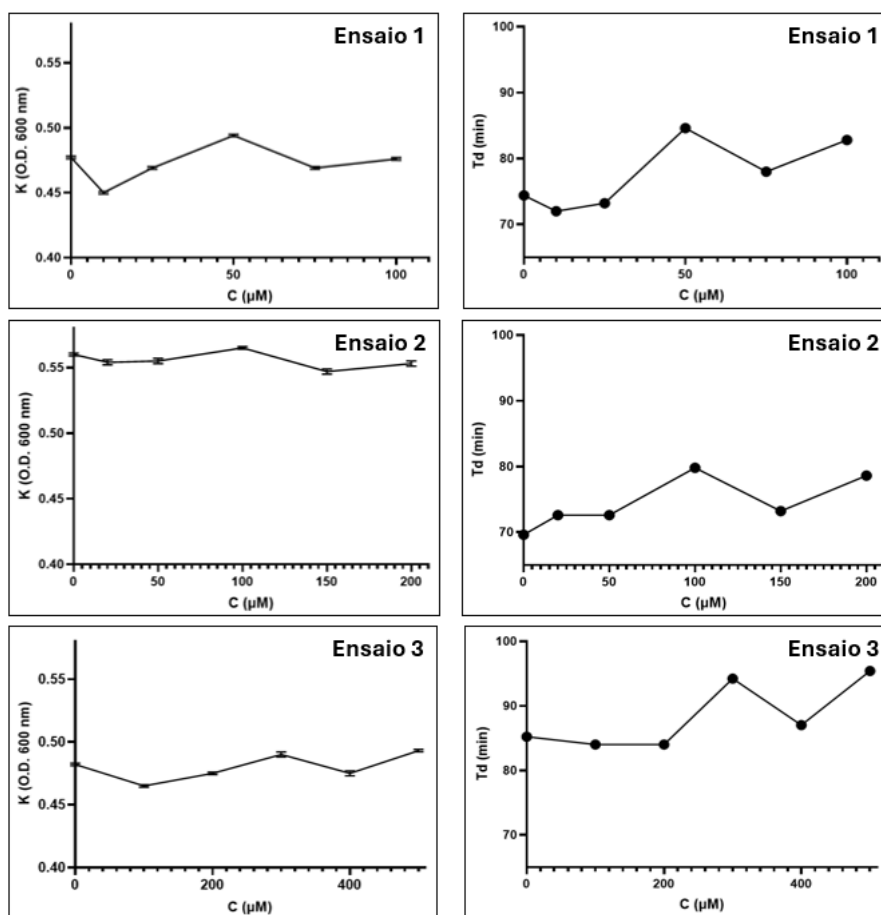


Figura 9 – Variações gráficas das constantes K (à esquerda) e Td (à direita) correspondentes às curvas de crescimento apresentadas nas Figuras 6, 7 e 8 (ensaios 1, 2 e 3, respetivamente).

Os valores obtidos para os parâmetros referentes às curvas de crescimento efetuadas com mescalina revelam algumas diferenças entre a curva controlo de cada ensaio e as respetivas curvas com adição de diferentes concentrações de mescalina. No caso do primeiro ensaio, verifica-se um aumento de Td, sendo que K se mantém relativamente semelhante, excetuando nas concentrações de 10 e 50 μM , onde houve uma diminuição e um aumento substancial, respetivamente, de biomassa final. No segundo ensaio, em termos de Td, verificam-se diferenças entre a curva controlo e todas as concentrações de mescalina testadas, salientando-se uma diferença mais acentuada relativamente às concentrações de 100 e 200 μM . Por sua vez, os valores de biomassa final mantêm-se constantes. Por fim, os valores do terceiro ensaio demonstram diferenças entre o controlo e as concentrações de 300 e 500 μM , tendo-se verificado um aumento de Td. Os valores de K, por sua vez, apresentam aumentos ligeiros para as concentrações de 300 e 500 μM e uma diminuição ligeira no caso da concentração de 100 μM . É possível verificar, olhando para os três ensaios em conjunto, que as

concentrações de 75, 150 e 400 μM de mescalina não mantêm a tendência que se observa nas concentrações imediatamente inferiores e superiores às mesmas. Assim, é provável que tenha ocorrido alguma falha de equipamento, uma vez que estas amostras, apesar de pertencentes a diferentes ensaios, foram posicionadas nos mesmos poços, de acordo com o esquema apresentado na Tabela 1. Fica, assim, destacada a importância de avaliar os parâmetros associados aos crescimentos celulares, pois, apesar da análise visual indicar, aparentemente, que não há diferenças, a análise do tempo de duplicação e da biomassa final permitiu averiguar o contrário.

Nas Figuras 10, 11 e 12, estão dispostas as curvas de crescimento de células de levedura obtidas na ausência e na presença de LSD, com as concentrações de 0 (controle negativo), 10, 25, 50, 75 e 100 μM para a Figura 10 e de 0, 25, 50, 60, 75 e 100 μM para as Figuras 11 e 12.

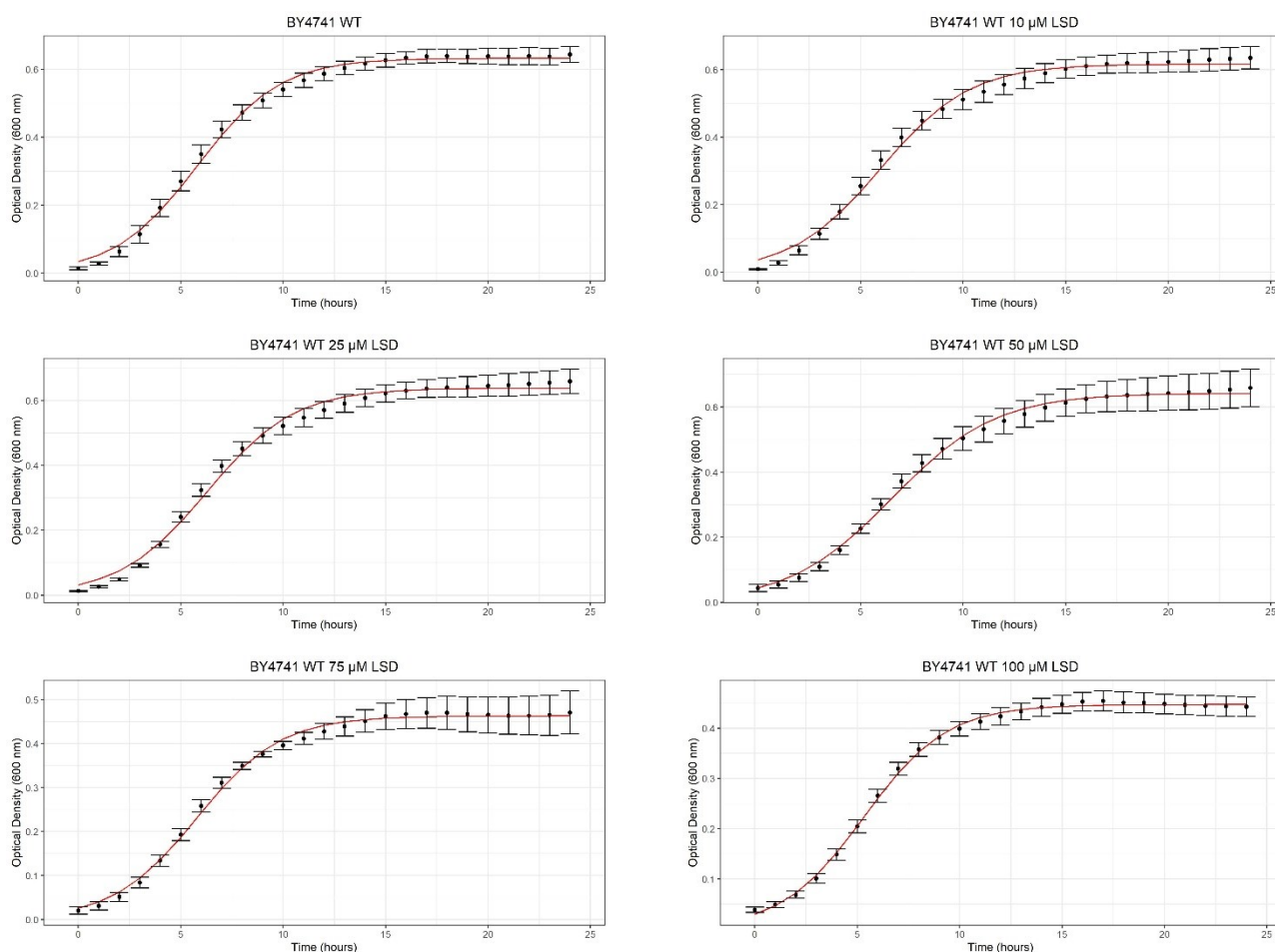


Figura 10 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de LSD (10, 25, 50, 75 e 100 μM) – ensaio 1. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas.

Avaliando visualmente os gráficos da Figura 10, aparentemente, não existem diferenças entre a biomassa final das curvas, excetuando as curvas cuja concentração utilizada corresponde a 75 e a 100 μM . Ambas as curvas referidas apresentam uma diminuição da biomassa final, pois os valores de densidade ótica da fase estacionária encontram-se próximos de 0,5, enquanto, nas restantes curvas, os valores são relativamente superiores a 0,6. Uma vez que a diferença ocorre entre as concentrações de 50 e 75 μM , foi efetuado um novo ensaio utilizando uma concentração intermédia de 60 μM , tendo sido descartada a concentração de 10 μM .

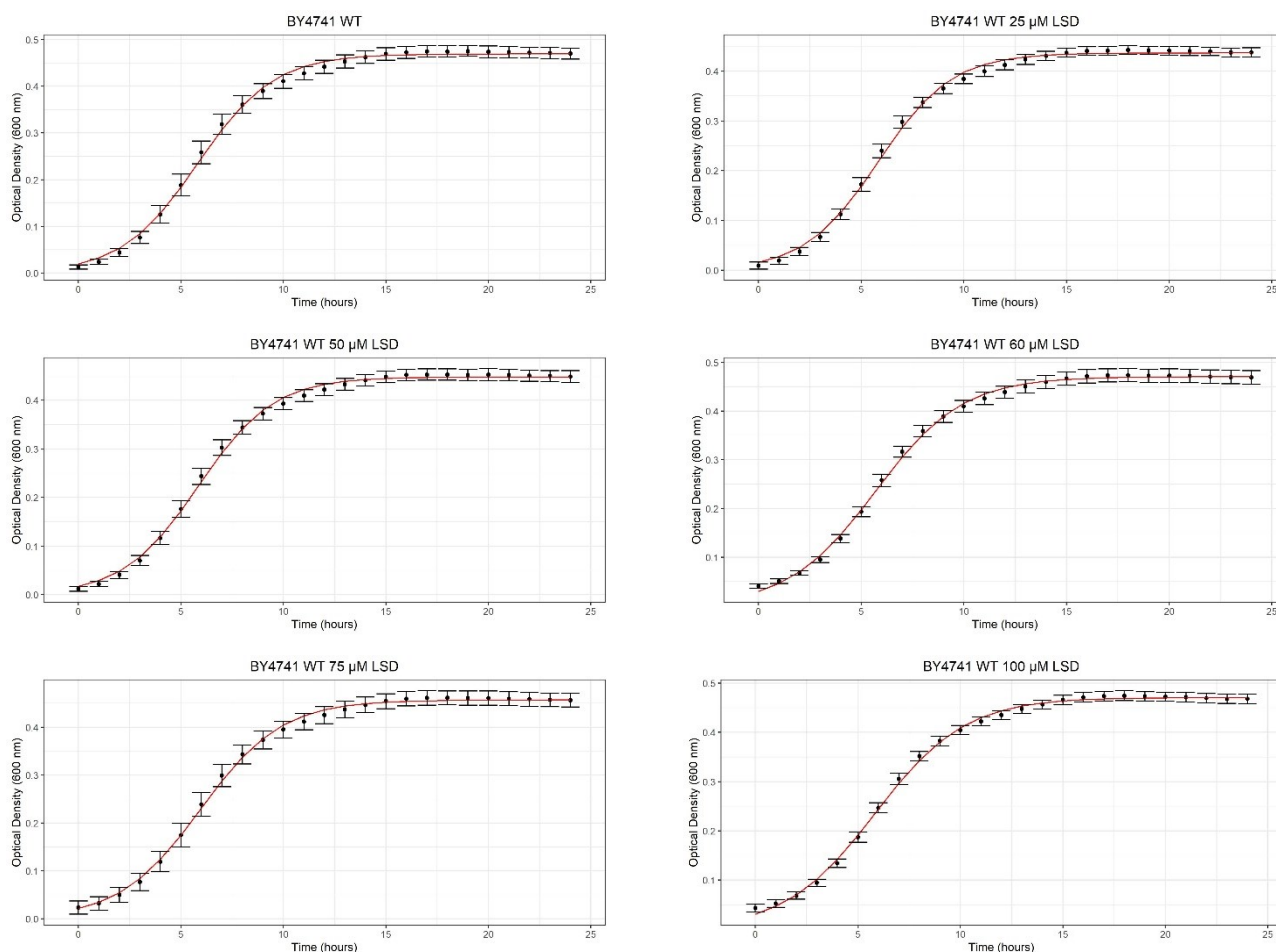


Figura 11 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de LSD (25, 50, 60, 75 e 100 μM) – ensaio 2. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica, medida a 600 nm, e o eixo XX corresponde ao tempo, em horas.

Na Figura 11, não se verifica diminuição da biomassa final em nenhuma das curvas de crescimento, pois todos os valores de densidade ótica da fase estacionária estão próximos de 0,5. A discordância verificada entre ambos os ensaios para as curvas

de 75 e 100 μM foi o motivo pelo qual se efetuou um terceiro ensaio, utilizando as mesmas concentrações do segundo.

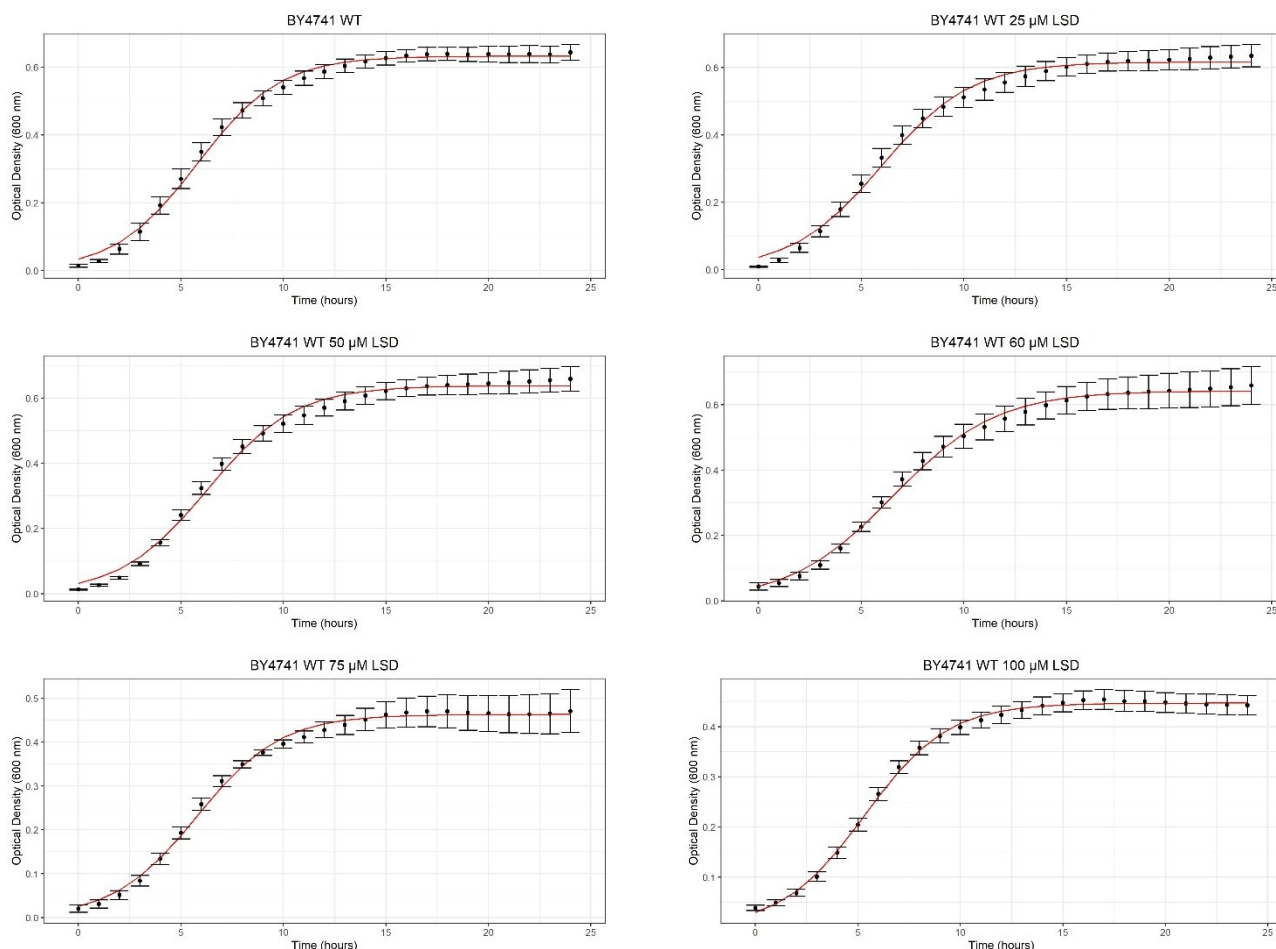


Figura 12 – Curvas de crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 WT na ausência (identificado como BY4741 WT) e na presença de diferentes concentrações de LSD (25, 50, 60, 75 e 100 μM) – ensaio 3. O eixo YY corresponde ao valor de densidade ótica medida a 600 nm e o eixo XX corresponde ao tempo em horas.

As curvas de crescimento obtidas após a realização do terceiro ensaio com LSD demonstram, tal como no primeiro ensaio, uma diminuição da biomassa final nas curvas de 75 e 100 μM , já que os valores de D.O._{600nm} de ambas se encontram abaixo de 0,5, ao contrário das restantes, onde estes valores são superiores a 0,6.

Mais uma vez, torna-se necessário recorrer à avaliação dos parâmetros associados às curvas de crescimento para que seja possível efetuar, ou não, uma distinção entre os ensaios. Assim, na Tabela 6, apresentam-se os valores de tempo de duplicação (T_d), taxa de crescimento (r) e biomassa final (K) obtidos para as curvas de crescimento de levedura na ausência e na presença de LSD. Estes valores foram calculados com recurso à Equação 2, apresentada no ponto 2.2 do Capítulo II, que

permitiu efetuar o ajuste dos dados cinéticos dos crescimentos das leveduras na presença e na ausência de LSD.

Tabela 6 – Valores obtidos para o tempo de duplicação (Td), para a taxa de crescimento (r) e para a biomassa final (K) das curvas de crescimento de *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de concentrações crescentes de LSD (representadas nas Figuras 10, 11 e 12, que correspondem aos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente).

Ensaio	C (μM)	Td (min)	r (h^{-1})	K (D.O. _{600nm})
1	0	84,0	$0,494 \pm 0,011$	$0,632 \pm 0,002$
	10	90,6	$0,459 \pm 0,013$	$0,617 \pm 0,003$
	25	88,8	$0,469 \pm 0,012$	$0,638 \pm 0,003$
	50	105,0	$0,397 \pm 0,013$	$0,642 \pm 0,004$
	75	85,2	$0,489 \pm 0,017$	$0,463 \pm 0,003$
	100	84,0	$0,494 \pm 0,010$	$0,447 \pm 0,002$
2	0	76,8	$0,540 \pm 0,011$	$0,469 \pm 0,002$
	25	74,4	$0,559 \pm 0,009$	$0,436 \pm 0,001$
	50	76,2	$0,546 \pm 0,010$	$0,448 \pm 0,001$
	60	88,2	$0,472 \pm 0,007$	$0,471 \pm 0,001$
	75	82,2	$0,505 \pm 0,011$	$0,457 \pm 0,002$
	100	91,2	$0,455 \pm 0,006$	$0,471 \pm 0,001$
3	0	64,8	$0,644 \pm 0,027$	$0,578 \pm 0,003$
	25	67,2	$0,618 \pm 0,030$	$0,578 \pm 0,004$
	50	59,4	$0,698 \pm 0,021$	$0,537 \pm 0,002$
	60	72,6	$0,573 \pm 0,009$	$0,530 \pm 0,001$
	75	70,8	$0,588 \pm 0,007$	$0,504 \pm 0,001$
	100	76,2	$0,546 \pm 0,007$	$0,516 \pm 0,001$

Tal como para a mescalina, foram também traçados gráficos de acordo com os valores presentes na Tabela 6, onde é possível observar visualmente a variação dos parâmetros de tempo de duplicação e de biomassa final de cada ensaio efetuado com LSD. Estes gráficos podem ser consultados na Figura 13.

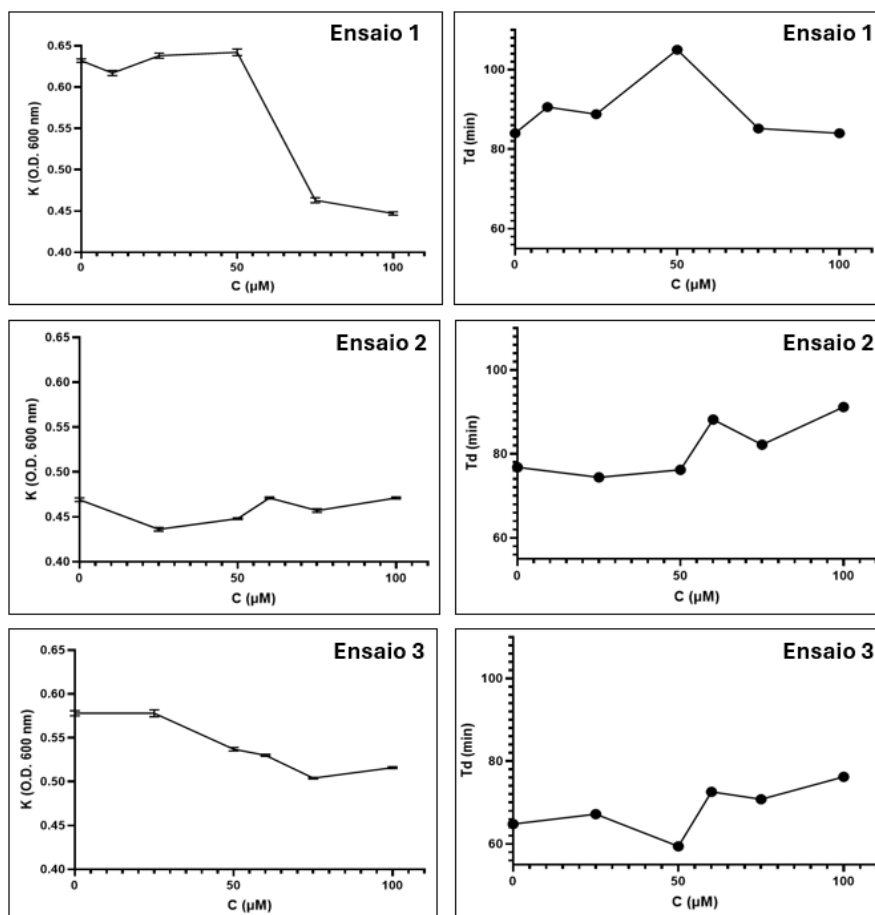


Figura 13 – Variações gráficas das constantes K (à esquerda) e Td (à direita) correspondentes às curvas de crescimento apresentadas nas Figuras 10, 11 e 12 (ensaios 1, 2 e 3, respectivamente).

Os valores obtidos para os parâmetros correspondentes às curvas de crescimento realizadas com LSD apresentam certas diferenças entre a curva controlo de cada ensaio e as respetivas curvas efetuadas com diferentes concentrações de LSD. No primeiro ensaio, verifica-se um ligeiro aumento de Td na concentração de 10 μM e um aumento notório na concentração de 50 μM. O valor de K mantém-se mais ou menos constante até atingir as concentrações de 75 e 100 μM, onde ocorreu um decréscimo significativo de biomassa final. No segundo ensaio, em termos de Td, verificam-se diferenças entre a curva controlo e as concentrações de 60, 75 e 100 μM. Por sua vez, os valores de biomassa final mantêm-se relativamente semelhantes, apesar de serem observadas pequenas variações. Finalmente, no terceiro ensaio, verificam-se diferenças entre a curva controlo e três concentrações mais elevadas, sendo que os valores de Td aumentaram com o aumento da concentração. Em relação aos valores de K, estes apresentam um decréscimo a partir da concentração de 50 μM.

2. *Spot assay* – teste de sensibilidade celular

O ensaio de sensibilidade celular permitiu testar a suscetibilidade das células de levedura quando sujeitas a diferentes concentrações dos compostos em estudo, neste caso, LSD e mescalina. Este ensaio pressupõe uma avaliação meramente qualitativa, uma vez que a sensibilidade celular é avaliada através da observação macroscópica entre as células-controlo e as células incubadas com LSD e mescalina. O tempo de incubação de 3 dias foi escolhido devido ao facto de ser o tempo necessário para que as leveduras apresentem colónias adequadas para avaliação visual.

Na Figura 14 é possível verificar os resultados do crescimento dos três replicados de *S. cerevisiae* BY4741 WT com a adição de mescalina.

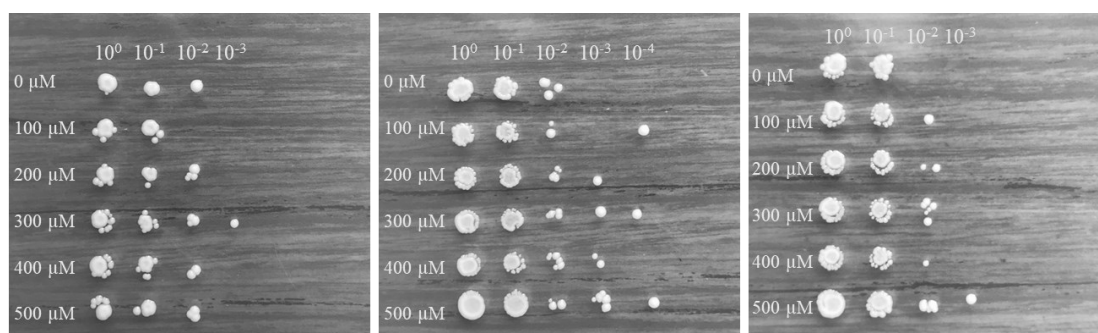


Figura 14 – Resultados do teste de sensibilidade celular efetuado para os replicados biológicos 1, 2 e 3 (da esquerda para a direita) de células de levedura *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de diferentes concentrações de mescalina, para diferentes diluições.

Primeiramente, é de destacar que a quantidade de colónias presentes na diluição 10^0 do primeiro replicado biológico é inferior ao esperado, o que pode ser explicado pela recolha de pouco líquido a partir das culturas presentes nos poços da microplaca. Não obstante, é possível observar que nenhuma das concentrações levou a uma inibição do crescimento celular, à semelhança do que se verifica nos restantes replicados.

Na Figura 15 são apresentados os resultados do crescimento dos três replicados de *S. cerevisiae* BY4741 WT com a adição de LSD.

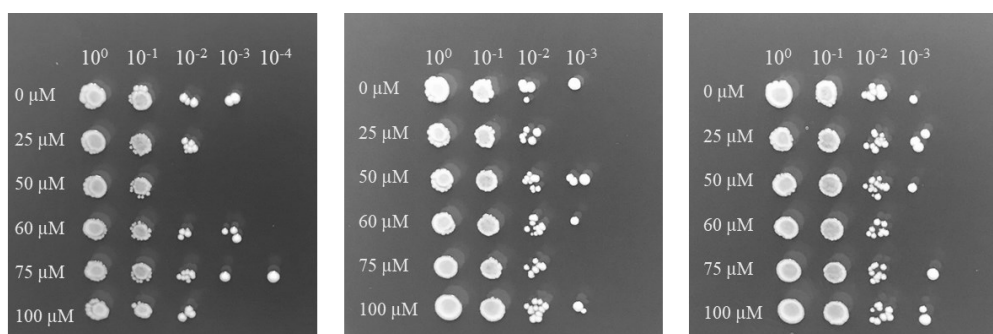


Figura 15 – Resultados do teste de sensibilidade celular efetuado para os replicados biológicos 1, 2 e 3 (da esquerda para a direita) de células de levedura *S. cerevisiae* BY4741 WT na presença de diferentes concentrações de LSD, para diferentes diluições.

No caso do LSD, os resultados apontam para a não-toxicidade desta substância, uma vez que em nenhum dos replicados biológicos se verifica sensibilidade celular por parte das leveduras a qualquer concentração do composto em causa.

3. Estudo da viabilidade celular através da redução de MTT

Tal como referido no ponto 4 do Capítulo II, este ensaio baseia-se na redução, por células viáveis, do sal amarelo MTT, resultando na formação de cristais violeta de formazano. Pretende-se, então, medir a viabilidade celular, de forma indireta, através da atividade mitocondrial das células, uma vez que o sal é reduzido por enzimas presentes nas mitocôndrias. Na verdade, sabe-se que a quantidade de formazano gerada por cada célula depende do nível de metabolismo energético mitocondrial e que células ativas produzem mais formazano do que células inativas (Sánchez & Königsberg, 2006).

Foram efetuados ensaios para cada substância em estudo, utilizando todas as concentrações presentes nas últimas curvas de crescimento, ou seja, foram utilizadas as concentrações de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 μM e de 0, 25, 50, 60, 75 e 100 μM para a mescalina e para o LSD, respetivamente. Para cada ensaio, foram obtidos resultados em diferentes fases de crescimento celular, nomeadamente, na fase inicial de crescimento (1 h e 30 min), na fase exponencial (4 h), na fase médio-exponencial (7 h) e na fase estacionária (24 h), com o objetivo de perceber as diferenças de redução de MTT ao longo do crescimento das células sujeitas a diferentes concentrações de mescalina e LSD.

Na Figura 16, são apresentados os gráficos, em formato *box plot*, obtidos para cada fase de crescimento celular na presença das diferentes concentrações de mescalina

estudadas. Os valores da redução de MTT foram normalizados através da densidade celular das amostras. Os resultados apresentados foram calculados considerando o controlo negativo (concentração de 0 μM) como aquele cuja percentagem de MTT reduzido corresponde a 100%.

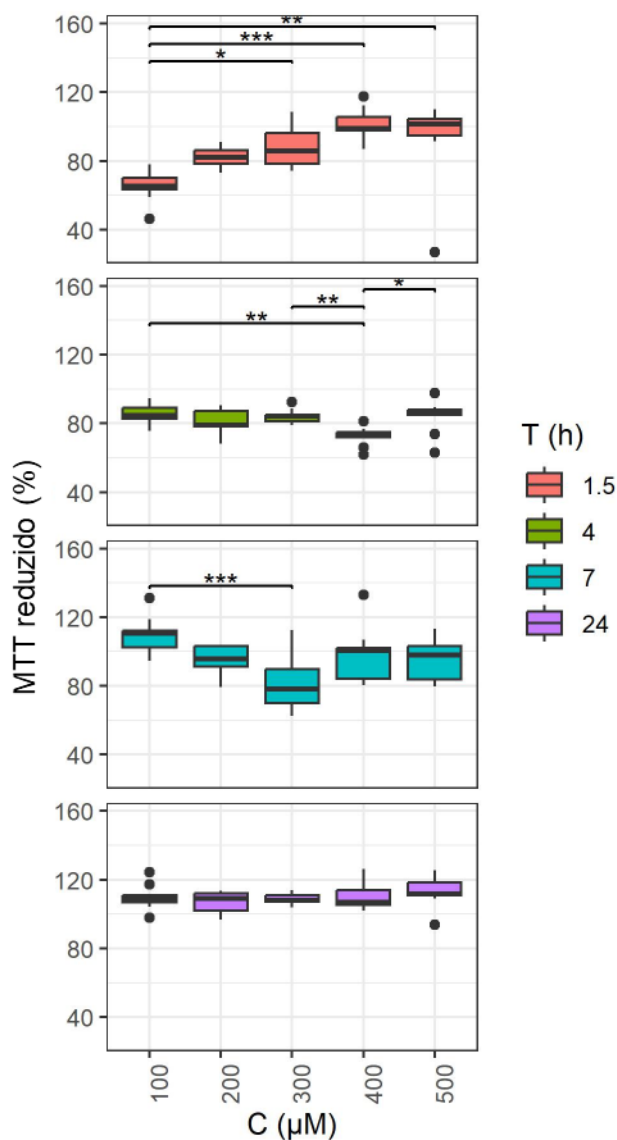


Figura 16 – Representação gráfica, em *box plot*, do MTT reduzido em cada fase de crescimento ao longo das diferentes concentrações de mescalina testadas. O eixo XX corresponde à concentração de mescalina (em μM) e o eixo YY corresponde ao valor de MTT reduzido (em percentagem).
(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$)

Na fase inicial de crescimento, correspondente a 1 h e 30 min, verifica-se uma ligeira tendência no aumento da redução de MTT à medida que aumenta a concentração de mescalina. Uma vez que o aumento do valor de MTT reduzido decorre do aumento da função mitocondrial, pode aferir-se que a atividade da cadeia respiratória da

mitocôndria aumentou. Quanto à variabilidade dos dados, é possível observar que os intervalos interquartis de todas as concentrações são semelhantes e, portanto, consistentes, com exceção da concentração de 300 μM , onde há um ligeiro aumento do intervalo. Os *outliers* presentes neste gráfico são casos isolados que não afetam a tendência geral da redução de MTT e que podem ter ocorrido devido a erros experimentais ou variações naturais. No entanto, não deve ser descartada a hipótese de que o *outlier* obtido para a concentração de 500 μM poderá ser uma indicação de uma certa vulnerabilidade, em relação à mescalina, por parte de algumas subpopulações de leveduras. Foi, ainda, efetuado um teste ANOVA simples que permitiu verificar que existem diferenças significativas da concentração de 100 μM para as concentrações de 300 μM ($p < 0,05$), 400 μM ($p < 0,001$) e 500 μM ($p < 0,01$).

Na fase exponencial de crescimento, correspondente a 4 h, a percentagem da redução de MTT mantém-se estável, havendo apenas uma ligeira diminuição na concentração de 400 μM , o que indica uma atividade mitocondrial constante e independente da concentração de mescalina, que poderá ser derivada de uma adaptação das células à mesma. Neste gráfico, a variabilidade dos dados apresenta-se menor do que no gráfico *box plot* obtido para a fase inicial de crescimento, sendo visível que os intervalos interquartis são mais reduzidos, com exceção das concentrações de 100 e 200 μM , cujos intervalos se mantêm idênticos aos do gráfico acima. Neste caso, observa-se um ligeiro aumento do número de *outliers*, sendo bastante provável que tenham ocorrido erros experimentais durante a manipulação das amostras provenientes desta recolha. Uma vez que existem *outliers* abaixo do intervalo interquartil nas duas concentrações mais elevadas de mescalina, é possível que, tal como referido anteriormente, algumas subpopulações de leveduras tenham ficado vulneráveis à substância em causa. O teste ANOVA simples permitiu confirmar a existência de diferenças significativas entre as concentrações de 100 e 400 μM ($p < 0,01$), entre 300 e 400 μM ($p < 0,01$) e entre 400 e 500 μM ($p < 0,05$).

Na fase de crescimento médio-exponencial, correspondente a 7 h, observa-se uma tendência, até 300 μM , para a diminuição do MTT reduzido, que, a partir de 400 μM , volta a estabilizar em valores semelhantes aos de 200 μM . Assim, fica claro que a atividade mitocondrial variou consideravelmente durante esta fase de crescimento. A variabilidade dos dados é ligeiramente superior nesta fase de crescimento e foram obtidos dois *outliers*. Tendo estes dois fatores em consideração, é possível aferir que a

adaptação das leveduras à mescalina não decorreu de forma uniforme em todas as subpopulações, já que, no geral, existe uma quantidade significativa de valores diferentes de MTT reduzido dentro de cada concentração. Apenas se verificou uma diferença significativa entre as concentrações de 100 e 300 μM ($p < 0,001$), de acordo com o teste ANOVA simples.

Por último, na fase estacionária, correspondente a 24 h, a estabilidade da viabilidade celular é bastante notória, uma vez que, não só todos os intervalos interquartis se apresentam significativamente reduzidos e consistentes, como se verifica uma proximidade do valor da mediana em todas as diferentes concentrações de mescalina. Verifica-se, ainda, que a viabilidade celular aumentou relativamente ao controlo (cuja percentagem de viabilidade é de 100%) para todas as concentrações testadas. Verifica-se a ocorrência de um *outlier* que poderá ser derivado da vulnerabilidade das células à concentração de 500 μM e, ainda, um *outlier* que poderá ser derivado da resistência das células à concentração de 100 μM , sendo que os restantes *outliers* presentes no gráfico são casos isolados, provenientes de erros experimentais ou de variações naturais.

Avaliando os gráficos no seu todo, verifica-se que a redução de MTT através da cadeia respiratória aumentou ao longo do tempo, sendo que, para todas as concentrações, os valores percentuais de MTT reduzido rondam os 110% na fase final de crescimento.

Na Figura 17, apresentam-se os gráficos, em formato *box plot*, obtidos para cada fase de crescimento celular na presença das diferentes concentrações de LSD estudadas. Os valores da redução de MTT foram normalizados através da densidade celular das amostras. Os resultados apresentados foram calculados considerando o controlo negativo (concentração de 0 μM) como aquele cuja percentagem de MTT reduzido corresponde a 100%.

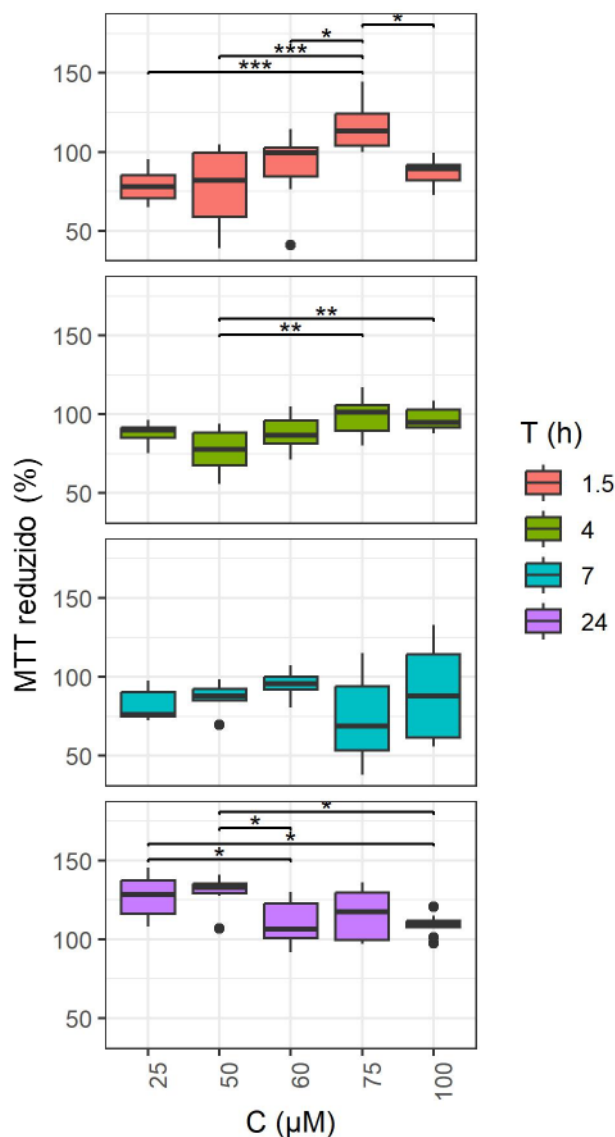


Figura 17 – Representação gráfica, em *box plot*, do MTT reduzido em cada fase de crescimento ao longo das diferentes concentrações de LSD testadas. O eixo XX corresponde à concentração de mescalina (em µM) e o eixo YY corresponde ao valor de MTT reduzido (em percentagem).
(*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001)

O gráfico obtido para a fase inicial de crescimento (1 h e 30 min) apresenta uma tendência para o aumento da redução de MTT à medida que a concentração de LSD aumenta até 75 µM. Tal como se verificou na fase inicial de crescimento obtida para a mescalina, esta tendência sugere um aumento da atividade mitocondrial. Em termos de variabilidade dos dados, as caixas apresentam variações relativamente distintas, principalmente para a concentração de 50 µM, onde se observa a maior variabilidade, e para a concentração de 100 µM, cuja variabilidade é a menor. Tendo sido obtido apenas um *outlier*, o mesmo é considerado como um caso isolado que não afeta a globalidade dos resultados para esta fase de crescimento. O teste ANOVA realizado permitiu aferir a

ocorrência de diferenças significativas entre a concentração de 75 μM e as restantes ($p < 0,05$ para 100 e 60 μM ; $p < 0,001$ para 50 e 25 μM).

Para a fase de crescimento exponencial (4 h), verifica-se uma certa estabilidade da percentagem de redução de MTT, sendo possível que as células se tenham adaptado ao LSD, já que a atividade mitocondrial se tornou consistente e independente da concentração de substância adicionada ao meio da cultura celular. A variabilidade dos dados é um pouco menor do que no gráfico anterior, uma vez que os intervalos interquartis se apresentam mais reduzidos, com exceção da concentração de 100 μM , onde apenas a mediana sofreu alteração em relação à fase de crescimento anterior. Não há *outliers* neste caso e, após a realização do teste ANOVA simples, verifica-se que há diferenças significativas da concentração de 50 μM para as concentrações de 75 e 100 μM ($p < 0,01$).

Observando o gráfico obtido para a fase de crescimento médio-exponencial (7 h), mais especificamente analisando as medianas, a redução de MTT mantém-se estável para as três concentrações mais baixas e para a concentração de 100 μM , enquanto na concentração de 75 μM se verifica uma ligeira redução do valor percentual de MTT reduzido. Desta forma, nota-se a consistência da atividade mitocondrial e a independência da mesma em relação à concentração de LSD adicionada, excetuando o caso dos 75 μM , onde é provável que tenha ocorrido uma redução da função mitocondrial. Além disso, é de salientar que os dados variam de forma muito superior nas concentrações de 75 e 100 μM relativamente às restantes concentrações, onde os intervalos interquartis se encontram reduzidos. A existência de apenas um *outlier* é, como já referido, um caso isolado, que poderá ser decorrente de algum erro experimental ou de variações naturais. Apesar de ser notável a ligeira redução da mediana na concentração de 75 μM relativamente às restantes concentrações, o teste ANOVA efetuado não revelou quaisquer diferenças significativas entre todas as concentrações.

Por fim, na fase estacionária (24 h), os valores percentuais de viabilidade são mais elevados comparativamente ao controlo (100%), sugerindo um aumento em termos de atividade mitocondrial com o aumento da concentração de LSD. A variabilidade dos dados é bastante reduzida nas concentrações de 50 e 100 μM , sendo relativamente superior nas restantes concentrações. Verificam-se alguns *outliers* neste caso, que

podem ter ocorrido devido a erros experimentais ou variações naturais, não afetando a tendência geral dos dados. A utilização do teste ANOVA permitiu obter diferenças significativas da concentração de 25 μM para as concentrações de 60 e 100 μM , bem como da concentração de 50 μM para as concentrações de 60 e 100 μM ($p < 0,05$).

A avaliação global dos gráficos obtidos no ensaio com LSD permite aferir que há uma maior variabilidade dos dados do que aquela que se verificou para a mescalina. No entanto, é possível observar um aumento geral da percentagem de viabilidade celular, uma vez que, na fase estacionária, os valores percentuais se encontram todos acima de 100%.

4. Estudo da atividade metabólica através da quantificação de ATP

Para que fosse possível estudar a atividade metabólica das leveduras na presença de mescalina e LSD, foi realizado um ensaio de quantificação de ATP, tendo sido utilizado um *kit* de análise colorimétrica. Foram testadas as concentrações de 0, 100 e 500 μM no caso da mescalina e de 0, 25 e 100 μM no caso do LSD, tendo sido obtidos resultados ao fim de 24 h de crescimento celular (fase estacionária).

Na Figura 18, estão representados os gráficos que mostram a relação obtida entre as concentrações crescentes de mescalina ou LSD e o conteúdo de ATP total⁴ existente nas leveduras.

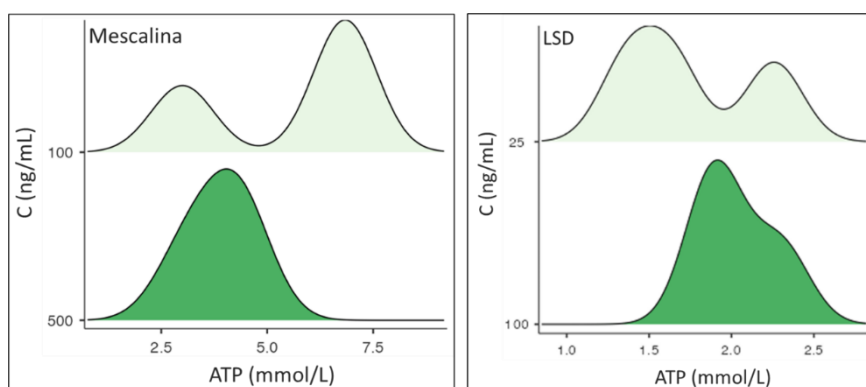


Figura 18 – Representações gráficas da variação do conteúdo de ATP, em mmol/L, em função das concentrações estudadas, em ng/mL, de mescalina (à esquerda) e de LSD (à direita).

⁴ATP total = ATP citoplasmático + ATP mitocondrial

Para a concentração de 100 μM de mescalina, foi obtido um valor médio de ATP de 5,56 mmol/L, sendo notória uma distribuição bimodal. No caso da concentração de 500 μM , o valor médio de ATP correspondeu a 3,88 mmol/L. Por sua vez, para o LSD foram obtidos valores médios de ATP de 1,76 e 2,03 mmol/L para as concentrações de 25 e 100 μM , respectivamente, tendo ocorrido uma distribuição bimodal em ambos os casos. Em ambos os casos, verifica-se que ocorreu um aumento da quantidade de ATP em comparação com o controlo, que apresentou um valor de 0,78 mmol/L. Contudo, com o aumento da concentração de mescalina, verifica-se uma diminuição na quantidade de ATP, enquanto o aumento da concentração de LSD induziu um aumento da concentração de ATP.

Além da obtenção dos gráficos, foi efetuado o teste de Brunner-Munzel para averiguar a existência de diferenças significativas entre as concentrações testadas, tendo este sido escolhido como alternativa mais robusta do que o teste de Mann-Whitney U. Assim, foi possível verificar que existem diferenças significativas entre as duas concentrações testadas de LSD ($p < 0,05$), não se tendo verificado o mesmo no caso da mescalina.

Estes resultados devem ser observados com muita cautela, dada a elevada variação obtida relativamente aos valores de ATP determinados. Idealmente, a distribuição bimodal dos resultados não é normativa dentro de uma concentração específica de composto, sendo esta uma forte indicação de ocorrência de problemas experimentais. Posto isto, o ensaio deveria ser repetido para confirmar a veracidade dos dados obtidos no presente estudo.

5. Discussão global

Seguidamente, é apresentada a Tabela 7, que associa os resultados obtidos através do ensaio final de crescimento celular, de redução de MTT e de quantificação de ATP. Uma vez que apenas se obtiveram dados ao fim de 24 h para os crescimentos e para a quantificação de ATP, são apenas apresentados os valores de redução de MTT correspondentes a este tempo.

Tabela 7 – Valores de tempo de duplicação (Td), biomassa final (K), MTT reduzido e conteúdo de ATP obtidos para cada concentração testada de mescalina e LSD.

Substância	C (μ M)	Crescimentos celulares		MTT (%)	ATP (mmol/L)
		Td (min)	K (D.O. _{600nm})		
Mescalina	0	85,2	0,482	100	0,78
	100	84,0	0,465	108	5,56
	500	95,4	0,493	110	3,88
LSD	0	64,8	0,578	100	0,78
	25	67,2	0,578	125	1,76
	100	76,2	0,516	109	2,03

Os ensaios de crescimento celular 1 e 2 realizados com mescalina não constam da tabela anterior pois não foi utilizada a concentração de 500 μ M. Assim, para a integração de informação dos vários testes, foi considerado apenas o ensaio final de crescimento celular efetuado com o composto em causa. Verifica-se que ambos os parâmetros (Td e K) são mais elevados para a concentração de 500 μ M do que para a de 100 μ M. Os valores obtidos para a concentração mais elevada ultrapassam, inclusivamente, os da cultura controlo. A relação entre o tempo de duplicação e a biomassa final deveria ser inversamente proporcional, pois, se as células de uma cultura apresentam um tempo de duplicação superior, significa que a sua divisão é mais lenta; logo, seria expectável que a biomassa final desta cultura fosse menor, uma vez que levaria mais tempo a atingir valores semelhantes aos de outra cultura cujo tempo de duplicação fosse inferior. No entanto, existem estudos que demonstraram que uma cultura celular, ao ajustar o seu Td, pode levar a que as células aumentem a sua dimensão (Turner et al., 2012). Tendo em consideração que o valor de biomassa final é proporcional ao valor de densidade ótica medido numa determinada cultura e que esta medição não diferencia a dimensão e o número de células, o facto de serem obtidos valores de Td e de K simultaneamente mais elevados pode derivar do aumento da dimensão das células. Assim, é possível que a mescalina esteja a exercer algum tipo de interferência no tempo de crescimento celular, levando a um aumento da dimensão das células e, consequentemente, a um aumento do valor de K. Além disso, também existem estudos que indicam que células maiores prosperam em meios mais ricos em nutrientes, enquanto células menores em meios mais pobres (Smith et al., 2014). Neste sentido, se a mescalina está a produzir valores de K e Td mais elevados, este efeito pode sugerir que há um aumento da dimensão celular, o que poderá implicar algum tipo de

sinalização, por parte da mescalina, que faz com que as leveduras percecionem o ambiente como rico em nutrientes.

Quanto aos ensaios de MTT e ATP, verifica-se que ambas as concentrações de mescalina apresentam valores mais elevados de redução de MTT e quantidade de ATP relativamente ao controlo, sendo o aumento do conteúdo de ATP muito acentuado. Comparando as concentrações de 100 e 500 μM , o ligeiro aumento dos valores de MTT reduzido é uma indicação de que a atividade da cadeia respiratória da mitocôndria aumenta, podendo ser interpretado como um aumento da viabilidade celular.

A quantidade de ATP celular é o resultado do balanço entre a sua produção e o seu consumo. Assim, o aumento da concentração total de ATP pode tanto indicar um aumento da produção, como uma diminuição do consumo. No entanto, na presença de mescalina, o ensaio do MTT permitiu verificar um aumento da atividade mitocondrial e o crescimento celular um aumento da biomassa final, para a concentração mais elevada. Assim, o aumento de ATP total na presença de concentrações elevadas de mescalina comparativamente ao controlo sugere um aumento da atividade metabólica, que além de ser mitocondrial, de acordo com o MTT, poderá, eventualmente, envolver a via glicolítica.

É interessante notar que, comparando os níveis de ATP total das concentrações de 100 e 500 μM de mescalina, existe uma diminuição dos mesmos. Uma possível explicação para esta diminuição é que o ATP mitocondrial está a ser consumido para o crescimento e divisão celular, tal como indica o valor obtido de biomassa final superior.

No caso do LSD, também foi considerado apenas o ensaio de crescimento final para a discussão global. O valor de Td aumenta com o aumento da concentração da substância referida e o valor de K mantém-se constante para a concentração mais baixa e diminui para a concentração mais alta. Em relação aos ensaios de MTT e ATP, observa-se que ambas as concentrações de LSD aumentaram a redução de MTT e a quantidade de ATP relativamente ao controlo. Assim, tal como verificado para a mescalina, o aumento dos valores de MTT reduzido sugere um aumento da atividade da cadeia respiratória da mitocôndria, podendo ser uma indicação de um aumento da viabilidade das células. Em relação à concentração de ATP total, verifica-se que esta aumenta com o aumento da concentração de LSD. Relacionando este aumento com a

diminuição da biomassa final para a concentração mais elevada, é possível verificar que, apesar de ocorrer um aumento da quantidade de ATP total formado, é provável que este não esteja a ser consumido para o crescimento e para a divisão celular, o que pode sugerir uma eventual toxicidade de LSD nas concentrações mais elevadas, ainda que sejam necessários mais ensaios para confirmar esta hipótese.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para a compreensão de mecanismos celulares e moleculares da mescalina e do LSD utilizando como modelo celular leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Mais especificamente, pretendeu-se verificar potenciais alterações que podem ocorrer nos padrões metabólicos das leveduras (cadeia respiratória e glicólise) quando expostas aos compostos referidos. Assim sendo, foram realizados diversos ensaios, nomeadamente curvas de crescimento, estudos de sensibilidade celular (*spot assay*), de viabilidade celular (medição de MTT reduzido pelas células) e de função metabólica (quantificação de ATP total). Para ambos os compostos psicadélicos estudados, a análise dos parâmetros associados aos crescimentos celulares permitiu concluir que quer a mescalina, quer o LSD exercem efeitos no crescimento das leveduras. Os testes de sensibilidade efetuados não permitiram comprovar o que se verificou nas curvas de crescimento, uma vez que não foram notórias diferenças nos crescimentos celulares em nenhum dos casos. É de salientar que os testes de sensibilidade deveriam ser repetidos recorrendo a micropipetas, ao invés de se utilizar o instrumento referido no presente documento (Figura 4), uma vez que um dos problemas enfrentados, claramente observável nas Figuras 14 e 15, corresponde à aplicação de pouco líquido no meio depositado nas placas de Petri, o que afeta, de forma evidente, o resultado do ensaio. O terceiro teste realizado, correspondente à medição da redução de MTT, demonstrou que a viabilidade celular tende a aumentar na presença de mescalina e LSD. Por fim, o ensaio de quantificação de ATP demonstrou que, apesar de ocorrer um aumento acentuado da concentração de ATP na presença de mescalina relativamente ao controlo, a comparação entre as duas concentrações testadas indicou uma relação proporcionalmente inversa entre a concentração de ATP e a concentração de mescalina. No caso do LSD, verificou-se o oposto, isto é, apesar de ambas as concentrações testadas terem resultado em valores superiores relativamente ao controlo, verificou-se um aumento da concentração de ATP com o aumento da concentração de LSD.

Considerando todas as informações do parágrafo anterior, é possível concluir que as duas substâncias psicadélicas utilizadas neste estudo apresentam efeitos na atividade mitocondrial e, eventualmente, no fluxo glicolítico de leveduras

Saccharomyces cerevisiae, uma vez que os resultados obtidos apontam para alterações notórias do metabolismo celular.

É importante realçar que estes são os primeiros resultados de um estudo pioneiro e, devido ao tempo restrito para a realização do mesmo, um estudo de natureza exploratória. Será importante repetir alguns dos ensaios para obter respostas mais claras, bem como confirmar as conclusões apresentadas no presente documento. Além disso, devem ser efetuadas outras metodologias relevantes que avaliem diferentes parâmetros como, por exemplo, a quantificação da glutathione, permitindo avaliar os níveis de stress oxidativo das substâncias estudadas. O foco da comunidade científica tem sido a avaliação dos compostos psicadélicos no sentido de perceber se a sua utilização é viável em contexto terapêutico, sendo que vários estudos têm sido desenvolvidos na última década com o objetivo de estudar o que acontece a nível psicológico e quais os sintomas físicos causados pelas referidas substâncias. Além disso, também tem sido estudada a atuação de substâncias psicadélicas ao nível do cérebro, tendo-se verificado, por exemplo, um aumento de neuroplasticidade.

O presente trabalho mostra, pela primeira vez, um aumento do metabolismo celular na presença de LSD e mescalina. Esta observação poderá estar associada às melhorias detetadas clinicamente.

REFERÊNCIAS

- Danforth, A. L., Grob, C. S., Struble, C., Feduccia, A. A., Walker, N., Jerome, L., Yazar-Klosinski, B., & Emerson, A. (2018). Reduction in social anxiety after MDMA-assisted psychotherapy with autistic adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Psychopharmacology*, 235(11), 3137–3148. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5010-9>
- Decreto-Lei nº 15/93 do Ministério da Justiça (1993). Diário da República: I Série A, nº 18/93. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/15-1993-585178>
- Escohotado, A. (1995). *Aprendiendo de las drogas: usos y abusos, prejuicios y desafíos*. Anagrama. ISBN: 9788433914415
- European Union Drugs Agency (2024). *Other drugs – the current situation in Europe (European Drug Report 2024)*. https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024/other-drugs_en
- Ferreira, C., Couceiro, J., Família, C., Jardim, C., Antas, P., Santos, C. N., Outeiro, T. F., Tenreiro, S., & Quintas, A. (2019). The synthetic cannabinoid JWH-018 modulates *Saccharomyces cerevisiae* energetic metabolism. *FEMS Yeast Research*, 19(5). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz042>
- Gaikani, H. K., Stolar, M., Kriti, D., Nislow, C., & Giaever, G. (2024). From beer to breadboards: yeast as a force for biological innovation. In *Genome Biology* (Vol. 25, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-03156-9>
- Galvão-Coelho, N. L., Marx, W., Gonzalez, M., Sinclair, J., De Manincor, M., Perkins, D., & Sarris, J. (2021). Classic serotonergic psychedelics for mood and depressive symptoms: a meta-analysis of mood disorder patients and healthy participants. *Psychopharmacology*, 238, 341–354. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05719-1/Published>
- Gill, H., Gill, B., Chen-Li, D., El-Halabi, S., Rodrigues, N. B., Cha, D. S., Lipsitz, O., Lee, Y., Rosenblat, J. D., Majeed, A., Mansur, R. B., Nasri, F., & McIntyre, R. S. (2020). The emerging role of psilocybin and MDMA in the treatment of mental

- illness. *Expert Review of Neurotherapeutics* 20(12), 1263-1273. <https://doi.org/10.1080/14737175.2020.1826931>
- Henríquez-Hernández, L. A., Rojas-Hernández, J., Quintana-Hernández, D. J., & Borkel, L. F. (2023). Hofmann vs. Paracelsus: Do Psychedelics Defy the Basics of Toxicology?—A Systematic Review of the Main Ergolamines, Simple Tryptamines, and Phenylethylamines. In *Toxics* (Vol. 11, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxics11020148>
- Hofmann, A. (2013). *LSD: My Problem Child*. Oxford University Press, USA. ISBN: 978-0-19-884020-6
- Johansen, L., Liknaitzky, P., Nedeljkovic, M., Mastin-Purcell, L., & Murray, G. (2022). The psychological processes of classic psychedelics in the treatment of depression: a systematic review protocol. In *Systematic Reviews* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13643-022-01930-7>
- Johnson, M. W., Richards, W. A., & Griffiths, R. R. (2008). Human hallucinogen research: Guidelines for safety. In *Journal of Psychopharmacology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 603–620). <https://doi.org/10.1177/0269881108093587>
- Kakolyri, M., Margaritou, A., & Tiligada, E. (2016). Dimethyl sulphoxide modifies growth and senescence and induces the non-revertible petite phenotype in yeast. *FEMS Yeast Research*, 16(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow008>
- Karch, S. B. (1998). *Drug Abuse Handbook*. CRC Press LLC. ISBN: 0-8493-2637-0
- Kelly, D. F., Heinzerling, K., Sharma, A., Gowrinathan, S., Sergi, K., & Mallari, R. J. (2023). Psychedelic-Assisted Therapy and Psychedelic Science: A Review and Perspective on Opportunities in Neurosurgery and Neuro-Oncology. In *Neurosurgery* (Vol. 92, Issue 4, pp. 680–694). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.1227/neu.0000000000002275>
- Kozłowska, U., Nichols, C., Wiatr, K., & Figiel, M. (2022). From psychiatry to neurology: Psychedelics as prospective therapeutics for neurodegenerative disorders. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 162, Issue 1, pp. 89–108). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.15509>

- Kwan, A. C., Olson, D. E., Preller, K. H., & Roth, B. L. (2022). The neural basis of psychedelic action. In *Nature Neuroscience* (Vol. 25, Issue 11, pp. 1407–1419). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01177-4>
- Lei nº 30/2000 da Assembleia da República (2000). Diário da República: Regime Jurídico Aplicável ao Consumo de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas, Bem Como A Proteção Sanitária E Social Das Pessoas Que Consomem Tais Substâncias Sem Prescrição Médica. <https://diariodarepublica.pt/dr/legislacao-consolidada/lei/2000-34545875-49120775>
- Lowe, H., Toyang, N., Steele, B., Grant, J., Ali, A., Gordon, L., & Ngwa, W. (2022). Psychedelics: Alternative and Potential Therapeutic Options for Treating Mood and Anxiety Disorders. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27082520>
- Marta, R. F. L. O. (2019). Metabolism of lysergic acid diethylamide (LSD): an update. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 51, Issue 3, pp. 378–387). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1638931>
- Mastinu, A., Anyanwu, M., Carone, M., Abate, G., Bonini, S. A., Peron, G., Tirelli, E., Pucci, M., Ribaud, G., Oselladore, E., Premoli, M., Gianoncelli, A., Uberti, D. L., & Memo, M. (2023). The Bright Side of Psychedelics: Latest Advances and Challenges in Neuropharmacology. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24021329>
- Mithoefer, M. C., Mithoefer, A. T., Feduccia, A. A., Jerome, L., Wagner, M., Wymer, J., Holland, J., Hamilton, S., Yazar-Klosinski, B., Emerson, A., & Doblin, R. (2018). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-assisted psychotherapy for post-traumatic stress disorder in military veterans, firefighters, and police officers: a randomized, double-blind, dose-response, phase 2 clinical trial. *The Lancet Psychiatry* 5(6), 486-497. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30135-4](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30135-4)
- Mohammadi, S., Saberidokht, B., Subramaniam, S., & Grama, A. (2015). Scope and limitations of yeast as a model organism for studying human tissue-specific pathways. *BMC Systems Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0253-0>

- Nichols, D. E., & Grob, C. S. (2018). Is LSD toxic? In *Forensic Science International* (Vol. 284, pp. 141–145). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.01.006>
- Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. In *Biotechnology Journal* (Vol. 14, Issue 9). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
- Olson, D. E. (2022). Biochemical Mechanisms Underlying Psychedelic-Induced Neuroplasticity. *Biochemistry*, 61(3), 127–136. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00812>
- Palhano-Fontes, F., Barreto, D., Onias, H., Andrade, K. C., Novaes, M. M., Pessoa, J. A., Mota-Rolim, S. A., Osório, F. L., Sanches, R., Dos Santos, R. G., Tófoli, L. F., De Oliveira Silveira, G., Yonamine, M., Riba, J., Santos, F. R., Silva-Junior, A. A., Alchieri, J. C., Galvão-Coelho, N. L., Lobão-Soares, B., ... Araújo, D. B. (2019). Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: A randomized placebo-controlled trial. *Psychological Medicine*, 49(4), 655–663. <https://doi.org/10.1017/S0033291718001356>
- Portaria nº 94/96 do Ministério da Justiça e da Saúde (1996). Diário da República: I Série B, nº 73/96. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/94-1996-545980>
- Psiuk, D., Nowak, E., Cholewa, K., Łopuszańska, U., & Samardakiewicz, M. (2021). The potential role of serotonergic hallucinogens in depression treatment. In *Life* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11080765>
- Resolução da Assembleia da República nº 29/91 (1991). Diário da República: I Série A, nº 205/91. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/resolucao-assembleia-republica/29-1991-304535>
- Rodríguez Arce, J. M., & Winkelman, M. J. (2021). Psychedelics, Sociality, and Human Evolution. *Frontiers in Psychology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.729425>
- Rucker, J. J. H., Iliff, J., & Nutt, D. J. (2018). Psychiatry & the psychedelic drugs. Past, present & future. In *Neuropharmacology* (Vol. 142, pp. 200–218). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.040>

- Sadowska-Bartosz, I., Paczka, A., Moloń, M., & Bartosz, G. (2013). Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 13(8), 820–830. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12091>
- Sánchez, N. S., & Königsberg, M. (2006). Using yeast to easily determine mitochondrial functionality with 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 34(3), 209–212. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.49403403209>
- Schlag, A. K., Aday, J., Salam, I., Neill, J. C., & Nutt, D. J. (2022). Adverse effects of psychedelics: From anecdotes and misinformation to systematic science. In *Journal of Psychopharmacology* (Vol. 36, Issue 3, pp. 258–272). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/02698811211069100>
- Sistema de Segurança Interna (2023). RASI – *Relatório Anual de Segurança Interna*. <https://www.portugal.gov.pt/pt/gc24/comunicacao/documento?i=relatorio-anual-de-seguranca-interna-2023>
- Slocum, S. T., DiBerto, J. F., & Roth, B. L. (2022). Molecular insights into psychedelic drug action. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 162, Issue 1, pp. 24–38). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.15540>
- Smith, C., Pomiankowski, A., & Greig, D. (2014). Size and competitive mating success in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Behavioral Ecology*, 25(2), 320–327. <https://doi.org/10.1093/beheco/art117>
- Sprouffske, K., & Wagner, A. (2016). Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>
- Ting, T. Y., Li, Y. D., Bunawan, H., Ramzi, A. B., & Goh, H. H. (2023). Current advancements in systems and synthetic biology studies of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Journal of Bioscience and Bioengineering* (Vol. 135, Issue 4, pp. 259–265). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.01.010>
- Turner, J. J., Ewald, J. C., & Skotheim, J. M. (2012). Cell size control in yeast. In *Current Biology* (Vol. 22, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.041>

- Valério, E., Barreiros, S., Rodrigues, S., Turkina, M. V., Vasconcelos, V. M., & Campos, A. (2020). New insights in *saccharomyces cerevisiae* response to the cyanotoxin microcystin-LR, revealed by proteomics and gene expression. *Toxins*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/toxins12100667>
- Vamvakopoulou, I. A., Narine, K. A. D., Campbell, I., Dyck, J. R. B., & Nutt, D. J. (2023). Mescaline: The forgotten psychedelic. In *Neuropharmacology* (Vol. 222). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109294>
- van Elk, M., & Yaden, D. B. (2022). Pharmacological, neural, and psychological mechanisms underlying psychedelics: A critical review. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104793>
- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., & Verstrepen, K. J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>
- Waters, K. (2021). Pharmacologic Similarities and Differences Among Hallucinogens. *Journal of Clinical Pharmacology*, 61(S2), S100–S113. <https://doi.org/10.1002/jcph.1917>
- Yu, R., & Nielsen, J. (2020). Yeast systems biology in understanding principles of physiology underlying complex human diseases. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 63, pp. 63–69). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.021>