



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**LAURA EDUARDA FERNANDES FRANÇA**

**ESTUDO DO EFEITO DO DMT (N,N-DIMETILTRIPTAMINA) NA NEUROGÊNESE  
*IN VITRO* DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS ADULTOS**

**Brasília - DF  
2025**

**LAURA EDUARDA FERNANDES FRANÇA**

**ESTUDO DO EFEITO DO DMT (N,N-DIMETILTRIPTAMINA) NA NEUROGÊNESE  
*IN VITRO* DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS ADULTOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira

**Brasília-DF**

**2025**

**LAURA EDUARDA FERNANDES FRANÇA**

**ESTUDO DO EFEITO DO DMT (N,N-DIMETILTRIPTAMINA) NA NEUROGÊNESE  
DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS ADULTOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Animal da Universidade de Brasília, como  
requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Biologia Animal.

**Aprovado em:**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr(a). Cíntia Marques Coelho  
Instituição: Universidade de Brasília

Prof. Dr(a). Diego Sousa Moura  
Instituição: Universidade de Brasília

Prof. Dr(a). Alice Pic Taylor  
Instituição: Universidade de Brasília

**Brasília- DF**

**2025**

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho representa não apenas um projeto científico concluído, mas também uma trajetória de crescimento pessoal e profissional. Ao longo do mestrado, enfrentei muitos desafios que exigiram autonomia, paciência e resiliência, e me orgulho profundamente do caminho que trilhei até aqui. Com esse trabalho, pude evoluir profissionalmente, mas principalmente como pessoa, pois precisei ter a capacidade de me reinventar a cada etapa.

Agradeço ao meu companheiro, Klayton, por estar presente nos dias mais difíceis e nos mais felizes. Saber do seu apoio constante tornou esta jornada mais suportável e fortaleceu minha coragem para seguir adiante. Foram anos difíceis, mas cheios de realizações e felicidades.

À minha família, minha irmã, minha mãe e meu pai, agradeço por acreditarem em mim e torcerem pela minha vitória.

Agradeço à CAPES, que foi essencial para que eu pudesse me dedicar à pesquisa, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (PPG BioAni/UnB), pela oportunidade de formação, estrutura institucional e ambiente acadêmico que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Sou profundamente grata à Prof.<sup>a</sup> Daniela Mara de Oliveira, pela oportunidade de realizar este projeto no laboratório. Essa oportunidade abriu portas importantes e permitiu que eu buscasse, com autonomia, os caminhos necessários para consolidar meus resultados.

Registro meu agradecimento ao Centro de Primatologia da Universidade de Brasília, especialmente ao Prof. Fábio Caixeta e ao Rafael Souto Maior, cujo apoio foi fundamental na coleta e no manejo do material biológico. Sem essa colaboração, esta pesquisa não teria sido possível.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste mestrado. Cada gesto de apoio, cada conversa e cada troca de conhecimento fizeram parte desta conquista.

**“Todo o homem recebe duas espécies de educação: a que lhe é dada pelos outros, e, muito mais importante, a que ele dá a si mesmo.”**

**Edward Gibbon**

## RESUMO

A neurogênese é o processo pelo qual novos neurônios são gerados a partir de células-tronco neurais ou progenitores neuronais e, no cérebro adulto, ocorre de forma restrita a nichos específicos, apresentando baixa taxa proliferativa, o que limita a capacidade de regeneração neural. Nesse contexto, o N,N-dimetiltriptamina (DMT), um composto endógeno já descrito em mamíferos, tem sido investigado principalmente em modelos de roedores por seu potencial de modular vias associadas à sobrevivência celular, plasticidade neural e respostas neurotróficas. Como vantagem, o DMT apresenta afinidade por receptores envolvidos na homeostase celular; entretanto, sua rápida metabolização, curta meia-vida e a estreita janela entre efeitos tróficos e tóxicos constituem limitações importantes para sua ação endógena e para a extrapolação de seus efeitos. Neste estudo, avaliou-se o efeito do DMT sobre a viabilidade celular e o crescimento de neuroesferas derivadas de primatas não humanos adultos, visando investigar seu potencial modulador em um modelo filogeneticamente mais próximo do humano. No ensaio de viabilidade celular (MTT), após 72 h de exposição, observou-se um perfil bifásico dose-dependente, no qual a concentração de 200 mg/L promoveu aumento da atividade metabólica celular de aproximadamente 4%, enquanto 800 mg/L resultou em redução significativa da viabilidade para cerca de 30%, caracterizando citotoxicidade. No ensaio de formação de neuroesferas, empregando concentrações entre 0,02 e 188 mg/L (0,1–1000  $\mu$ M), verificou-se que o tempo de cultivo foi determinante para o crescimento global das esferas; entretanto, o DMT modulou a distribuição dos tamanhos, com tendência à redução de neuroesferas intermediárias e aumento da proporção de esferas maiores (>500  $\mu$ m). No sétimo dia, as concentrações de 18,8 mg/L e 188 mg/L estiveram associadas a maior número de neuroesferas grandes, sem prejuízo da viabilidade celular. Um ensaio complementar, utilizando doses entre 2 e 2000 mg/L, confirmou o padrão observado, indicando 200 mg/L como a concentração mais favorável ao crescimento e à viabilidade celular, enquanto concentrações mais elevadas apresentaram toxicidade progressiva. Em conjunto, os resultados indicam que o DMT exerce um efeito modulador dose-dependente sobre células neurais adultas de primatas não humanos, promovendo crescimento e maturação das neuroesferas dentro de uma janela restrita de concentração. Embora os dados apontem para uma tendência a efeitos neurotróficos, as limitações inerentes ao DMT endógeno reforçam a necessidade de cautela na interpretação e na extrapolação dos achados.

Palavras-chave: Neurogênese adulta; DMT; Neuroesferas; Primatas; Viabilidade celular

## ABSTRACT

Neurogenesis is the process by which new neurons are generated from neural stem cells or neuronal progenitors and, in the adult brain, it is restricted to specific niches with low proliferative activity, which limits neural regenerative capacity. In this context, N,N-dimethyltryptamine (DMT), an endogenous compound described in mammals, has been investigated mainly in rodent models due to its potential to modulate pathways associated with cell survival, neural plasticity, and neurotrophic responses. As an advantage, DMT shows affinity for receptors involved in cellular homeostasis; however, its rapid metabolism, short half-life, and the narrow window between trophic and toxic effects represent important limitations for its endogenous action and for extrapolation of its effects. In this study, the effects of DMT on cell viability and the growth of neurospheres derived from adult non-human primates were evaluated, aiming to investigate its modulatory potential in a phylogenetically closer model to humans. In the cell viability assay (MTT), after 72 h of exposure, a dose-dependent biphasic profile was observed, in which the concentration of 200 mg/L promoted an approximately 4% increase in cellular metabolic activity, whereas 800 mg/L resulted in a significant reduction in viability to about 30%, characterizing cytotoxicity. In the neurosphere formation assay, using concentrations between 0.02 and 188 mg/L (0.1–1000  $\mu$ M), culture time was found to be a determining factor for overall sphere growth; however, DMT modulated size distribution, with a tendency toward a reduction in intermediate-sized neurospheres and an increase in the proportion of larger spheres (>500  $\mu$ m). On the seventh day, concentrations of 18.8 mg/L and 188 mg/L were associated with a higher number of large neurospheres, without impairment of cell viability. A complementary assay using doses between 2 and 2000 mg/L confirmed this pattern, indicating 200 mg/L as the most favorable concentration for growth and cell viability, whereas higher concentrations showed progressive toxicity. Taken together, these results indicate that DMT exerts a dose-dependent modulatory effect on adult neural cells from non-human primates, promoting neurosphere growth and maturation within a restricted concentration window. Although the data point to a trend toward neurotrophic effects, the inherent limitations of endogenous DMT reinforce the need for caution in interpretation and extrapolation of these findings.

**Keywords:** Adult neurogenesis; DMT; Neurospheres; Primates; Cell viability.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1</b> – Estruturas químicas da serotonina, 5-MeO-DMT e dimetiltryptamina (DMT)<br>.....                                                                            | <b>14</b> |
| <b>Figura 2</b> – Via biossintética endógena da N,N-dimetiltryptamina (DMT)<br>.....                                                                                         | 15        |
| <b>Figura 3</b> – Neuroesfera do primeiro teste formada em 5 dias sem fator de crescimento e neuroesferas no segundo teste, com acrescimo de fatores de crescimento<br>..... | 28        |
| <b>Figura 4</b> – Ensaio de MTT em 48 horas<br>.....                                                                                                                         | 31        |
| <b>Figura 5</b> – Ensaio de MTT em 72 horas<br>.....                                                                                                                         | 31        |
| <b>Figura 6</b> – Curva dose-resposta de DMT (48h vs 72h)<br>.....                                                                                                           | 32        |
| <b>Figura 7</b> – Numero de neuroesferas para cada concentração e grupo de tamanho<br>.....                                                                                  | 34        |
| <b>Figura 8</b> – Progressão morfológica da formação de neuroesferas ao longo dos dias de tratamento<br>.....                                                                | 36        |
| <b>Figura 9</b> – Proporção de neuroesferas com diâmetro superior a 600 µm no 7º dia de cultivo em função das concentrações de DMT<br>.....                                  | 38        |
| <b>Figura 10</b> – Efeito do DMT sobre o tamanho médio das neuroesferas.<br>.....                                                                                            | 40        |
| <b>Figura 11</b> – Efeito do DMT sobre o tamanho e morfologia das no 5 dia de cultivo<br>.....                                                                               | 41        |



**Figura 12** – Microscopia das células em Diferenciação Neuronal e Células Primárias Aderentes.

.....42

**Figura 13** – Imunofluorescência de neuroesferas tratadas com DMT.

.....44

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1</b> — Principais alterações neuronais associadas a diferentes patologias .....                             | <b>17</b> |
| <b>Fluxograma 1</b> – Desenho do processo de coleta e dissociação do tecido até o cultivo celular de neuroesferas..... | <b>25</b> |
| <b>Fluxograma 2</b> – Desenho experimental do delineamento do estudo: métodos aplicados e doses de DMT .....           | <b>27</b> |
| <b>Quadro 1</b> – Conversão mg/L para uM (DMT) .....                                                                   | <b>29</b> |
| <b>Quadro 2</b> – Condições experimentais relacionadas ao controle e a interpretação biológica de cada dose.....       | <b>33</b> |
| <b>Tabela 2</b> — Resumo estatístico do modelo global (DIAxConcentraçãoX Faixa de Tamanho) .....                       | <b>37</b> |
| <b>Tabela 3</b> - Comparações múltiplas (Tukey, dia 7).....                                                            | <b>38</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**μl:** Microlitro

**μM:** Micro Molar

**μm:** Micrômetro

**PNH:** Primatas Não Humanos

**DMT:** Dimetiltryptamina (N,N-dimethyltryptamina)

**pb:** Par de bases

**RNA:** Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic acid* – inglês)

## SUMÁRIO

|              |                                                                           |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                    | <b>15</b> |
| <b>1.1</b>   | <b>O DMT.....</b>                                                         | <b>15</b> |
| <b>1.1.1</b> | <b>NEUROGÊNESE E NEUROGÊNESE ADULTA.....</b>                              | <b>17</b> |
| <b>1.1.2</b> | <b>PSICODÉLICOS E SEUS EFEITOS NEUROGÊNICOS .....</b>                     | <b>19</b> |
| <b>1.1.3</b> | <b>CÉLULAS MICROGLIAIS E NEUROGÊNESE .....</b>                            | <b>20</b> |
| <b>1.2</b>   | <b>NEUROESFERA .....</b>                                                  | <b>21</b> |
| <b>2</b>     | <b>JUSTIFICATIVA .....</b>                                                | <b>21</b> |
| <b>3</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                    | <b>22</b> |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                          | <b>23</b> |
| <b>4.1</b>   | <b>DMT.....</b>                                                           | <b>23</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>ANIMAIS.....</b>                                                       | <b>23</b> |
| <b>4.3</b>   | <b>COLETA DO TECIDO.....</b>                                              | <b>23</b> |
| <b>4.4</b>   | <b>DISSOCIAÇÃO DO TECIDO E CULTIVO PRIMÁRIO.....</b>                      | <b>24</b> |
| <b>4.5</b>   | <b>ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....</b>                                | <b>25</b> |
| <b>4.6</b>   | <b>CULTURA DE NEUROESFERAS.....</b>                                       | <b>25</b> |
| <b>4.7</b>   | <b>TESTE DE NEUROESFERAS COM DIFERENTES<br/>CONCENTRAÇÕES DE DMT.....</b> | <b>25</b> |
| <b>4.8</b>   | <b>ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.....</b>                             | <b>26</b> |
| <b>4.9</b>   | <b>MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....</b>                                  | <b>26</b> |
| <b>4.10</b>  | <b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>                                           | <b>27</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS.....</b>                                                    | <b>28</b> |
| <b>5.1</b>   | <b>ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA DE<br/>NEUROPROGENITORES.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>5.2</b>   | <b>ENSAIOS DE MTT COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE<br/>DMT .....</b>       | <b>29</b> |
| <b>5.3</b>   | <b>EFEITOS TRÓFICOS DE CITOTÓXICOS OBTIDOS PELO TESTE<br/>DE MTT.....</b> | <b>33</b> |
| <b>5.4</b>   | <b>EFEITO DO DMT NA FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS.....</b>                     | <b>35</b> |
| <b>5.4.1</b> | <b>DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.....</b>                                        | <b>42</b> |
| <b>5.5</b>   | <b>IMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>                                             | <b>43</b> |

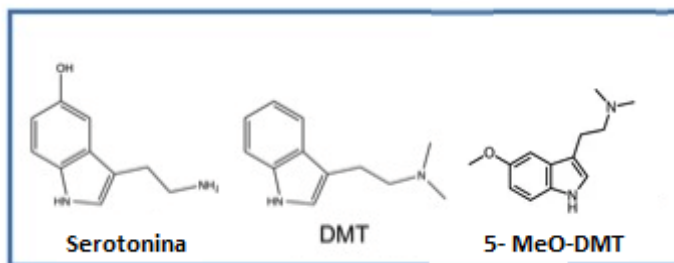
|            |                                                                                               |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6</b>   | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                         | <b>46</b> |
| <b>6.1</b> | <b>ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE RESULTADOS DOS TESTES DE MTT E FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS.....</b> | <b>46</b> |
| <b>6.2</b> | <b>ANÁLISE GERAL.....</b>                                                                     | <b>47</b> |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                                        | <b>50</b> |
| <b>8</b>   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                        | <b>51</b> |
|            | <b>APÊNDICE A – TABELA BRUTA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA NO GRAPH PAD PRISM.....</b>             | <b>57</b> |

## Introdução

A neurogênese no cérebro adulto ocorre de forma limitada, o que impõe restrições à regeneração neural. Nesse contexto, o N,N-dimetiltryptamina (DMT), um composto endógeno descrito em mamíferos, tem despertado interesse por seu possível papel modulador em células neurais, embora seus efeitos ainda sejam pouco compreendidos e descritos de forma heterogênea na literatura. Diante dessa lacuna, este trabalho avaliou os efeitos do DMT sobre a viabilidade celular e o crescimento de neuroesferas derivadas de primatas não humanos adultos, utilizando diferentes concentrações e tempos de exposição, com o objetivo de investigar seu potencial modulador em um modelo filogeneticamente mais próximo do humano.

## O DMT

N,N-dimethyltryptamina (DMT) é uma molécula psicodélica quimicamente semelhante à serotonina (5-HT) (Figura 1) encontrada naturalmente em inúmeros gêneros de plantas e animais.

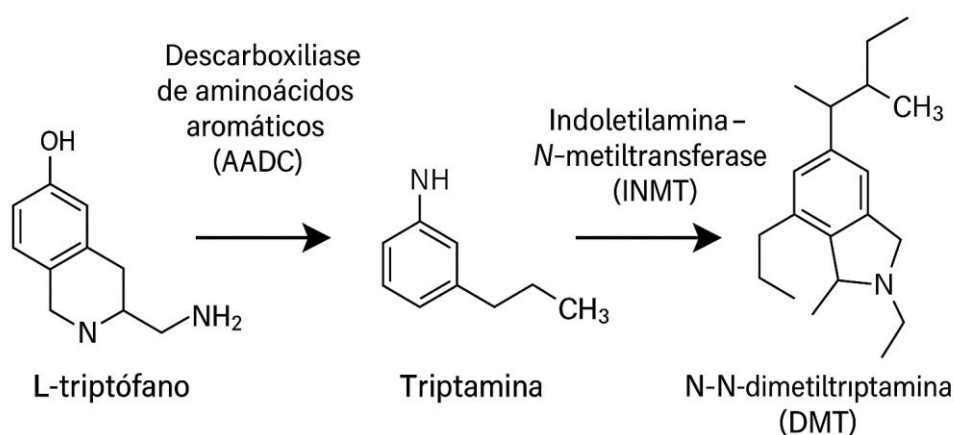


**Figura 1** – Estruturas químicas da serotonina, dimetiltryptamina (DMT) e 5-MeO-DMT  
 Fonte: (Wikipedia: *Serotonina*; *Dimetiltryptamina*; *5-MeO-DMT*)

Em humanos e roedores, o DMT é detectado facilmente em baixas concentrações no pulmão, plasma e líquido cefalorraquidiano (Morales-Garcia et al., 2020). O DMT foi sintetizado pela primeira vez por Richard Manske em 1931 (Manske, 1931) sem que seus efeitos farmacológicos fossem avaliados. Em 1946, foi descrita pela primeira vez sua ocorrência natural no “vinho da jurema” (Lima, 1946). Entretanto, suas propriedades alucinógenas só foram relatadas em 1965, quando o psiquiatra e químico Stephen Szara administrou em si mesmo intramuscularmente o DMT extraído e purificado, e relatou seus efeitos psicodélicos potentes. Os efeitos descritos incluíram forte taquicardia, midríase e tremores, intensas alterações perceptivas com padrões geométricos coloridos, visões eidéticas vívidas e alucinações completas de faces e cenas em rápida transformação, além de uma sensação subjetiva de euforia

e profunda alteração do estado de consciência (Samorini, 2019). Esta sequência de relatos formaram a ligação entre a base científica do uso histórico de várias plantas contendo DMT como um sacramento ritualístico e religioso, aumentando o interesse pelos efeitos químicos do DMT na psiquê. Além disso, o DMT passou a ganhar notoriedade fora do contexto científico, tornando-se uma droga de abuso proscria, especialmente nos Estados Unidos e em diversos países da Europa, onde seu uso recreativo é rigidamente controlado.

O DMT e a serotonina são sintetizados endogenamente a partir do aminoácido triptofano que ao ser descarboxilizado forma a triptamina. Esta sofre a ação da enzima indoletilamina-N-metiltransferase (INMT) que introduz um grupamento metil na molécula de triptamina. Em seguida, outro grupamento metil é introduzido formando o DMT (N, N-di-metiltriptamina) (Dean et al., 2019) (Figura 2).



### Via biossintética endógena da N,N-dimetiltriptamina (DMT)

**Figura 2** – Via biossintética endógena da N,N-dimetiltriptamina (DMT).

Em humanos, outros primatas e roedores, a atividade da enzima INMT foi detectada no córtex cerebral, glândula pineal e plexo coroide (Cozzi, 2011), reforçando assim a hipótese que o DMT não é um subproduto ou traço da síntese de neurotransmissores, e sim, uma molécula endógena fisiológica, cuja função ainda não foi desvendada. Além disso, evidências sugerem que o DMT, após ser sintetizado, é sequestrado e estocado em vesículas no cérebro (Cozzi et al., 2009).

O DMT possui propriedades alucinógenas que induzem modificações muito intensas na percepção, emoção e cognição em humanos que duram entre 10 e 20 minutos após a administração (Malaca Et al., 2020). O DMT liga-se, exercendo atividade agonista, nos receptores de serotonina 5-HT dos subtipos 1A, 2A e 2C (Ly et al., 2018). Estes receptores são acoplados à proteína G e encontram-se em várias regiões do sistema nervoso central. Alguns

estudos demonstraram que o DMT também se liga à receptores não serotoninérgicos, como os receptores de glutamato, dopamina, acetilcolina, TAAR e sigma-1 (S1R) (Fontanilla et al., 2009).

Pesquisas recentes exploraram os potenciais efeitos terapêuticos da N,N-dimetiltriptamina (DMT) e seus análogos na neurogênese e neuroproteção. Foi demonstrado que o DMT protege os neurônios corticais humanos e as células imunes contra o estresse hipóxico por meio da ativação do receptor sigma-1 (Szabo et al., 2016). Outros demonstraram que o DMT promove a neurogênese adulta no hipocampo, melhorando o aprendizado espacial e a memória em camundongos (Morales-García et al., 2020). Da mesma forma, uma dose única de 5-MeO-DMT, um análogo do DMT, aumentou a proliferação celular e a sobrevivência neuronal no giro dentado de camundongos adultos, ao mesmo tempo em que induziu alterações morfológicas e funcionais em células granulares recém-nascidas (Cruz et al., 2018). Por isso, as potenciais aplicações terapêuticas do DMT estendem-se a condições de saúde mental em que ocorrem perdas neuronais ou conexões neuronais, como distúrbios neurodegenerativos, além de estudos sobre a consciência. Achados obtidos em ensaios experimentais e clínicos preliminares sugerem caminhos promissores para investigações mais aprofundadas sobre as propriedades neurogênicas e neuroprotetoras do DMT (Colosimo et al., 2024)

### **Neurogênese e Neurogênese Adulta**

Neurogênese é o processo pelo qual neurônios são gerados a partir de células tronco neuronais também conhecidos como progenitores neuronais. Atualmente, a geração de novos progenitores de neurônios no cérebro, ao longo de toda vida e até em idosos, está bem caracterizada em duas regiões distintas (denominados nichos de neuroprogenitores ou de células-tronco neurais adultas) no cérebro humano: na zona subventricular da parede do ventrículo lateral e no giro dentado do hipocampo (Eriksson et al., 1998; Gage, 2000; Ming; Song, 2011; Kempermann et al., 2018). A neurogênese também parece ocorrer em outras áreas cerebrais como substância negra, estriato, amígdala e neocórtex (Gu et al., 2012; Kempermann et al., 2018). As células-tronco que residem no hipocampo e na zona subventricular dão origem a células progenitoras intermediárias que se diferenciam principalmente em neurônios granulares do hipocampo, no giro dentado, e em neurônios granulares e periglomerulares no bulbo olfatório. Entretanto, durante o desenvolvimento embrionário, a neurogênese ocorre de forma muito mais ampla e intensa, envolvendo toda a zona ventricular e subventricular do tubo neural. Nesse período, células-tronco neurais altamente proliferativas, gerando precursores que migram longas distâncias pela placa cortical e formam praticamente todos os tipos neuronais do encéfalo. Já no cérebro adulto, essa capacidade torna-se restrita a dois nichos específicos, com



menor taxa proliferativa, menor plasticidade celular e migração muito limitada. Em comparação, a neurogênese embrionária é global, robusta e essencial para a formação do sistema nervoso, enquanto a neurogênese adulta é localizada, reduzida e voltada principalmente para funções adaptativas, como aprendizado, memória e modulação olfatória (Ming; Song, 2011).

A investigação sobre neurogênese adulta tem encontrado vários obstáculos, como, por exemplo, identificar novos nichos que provavelmente são menos ativos e a própria identificação desses neuroprogenitores. Dentre os outros grandes desafios da área, destaca-se a compreensão da importância fisiológica da renovação neuronal e como ocorre a reintegração destes neurônios recém-formados em circuitos já estabelecidos e a integração formação de novos circuitos na arquitetura funcional de diferentes estruturas cerebrais (Kempermann et al., 2018). Em adultos, os neurônios recém-formados desempenham suas funções em processos como aprendizagem, memória, estresse e regeneração de estruturas e circuitos (Jin, 2016). Há a hipótese de que com uma compreensão melhor do processo de neurogênese, a sua subsequente manipulação poderá resultar em novas terapias para várias doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas como, por exemplo: depressão, síndrome do stress pós-traumático, doença de Alzheimer, isquemia cerebral, dentre outras. Na depressão ocorrem redução da neurogênese hipocampal, diminuição da plasticidade sináptica e retração dendrítica; no transtorno de estresse pós-traumático, há hiperativação da amígdala, disfunção do córtex pré-frontal e supressão da neurogênese; na doença de Alzheimer, observa-se perda sináptica progressiva, morte neuronal, deposição de  $\beta$ -amiloide e comprometimento da neurogênese; e na isquemia cerebral ocorre excitotoxicidade, necrose e apoptose neuronal, acompanhadas de um aumento compensatório, porém insuficiente, da proliferação de precursores neurais (Tabela 1).

| <b>Patologia</b>               | <b>Alterações Neurais</b>                                                                                      |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Depressão</b>               | Redução da neurogênese e da plasticidade sináptica; retração dendrítica. (Duman; Aghajanian, 2012).            |
| <b>Estresse Pós-Traumático</b> | Hiperatividade da amígdala; disfunção do córtex pré-frontal; supressão da neurogênese. (Bremner et al., 1995). |
| <b>Alzheimer</b>               | Perda sináptica e neuronal; acúmulo de $\beta$ -amiloide/tau; neurogênese prejudicada. (Mu; Gage, 2011)        |
| <b>Isquemia cerebral</b>       | Necrose/apoptose; excitotoxicidade por glutamato; inflamação. (Dirnagl; Iadecola; Moskowitz, 1999).            |

**Tabela 1** - Principais alterações neurais associadas a diferentes patologias

Vale mencionar que devido à complexidade dos circuitos cerebrais e suas interações, um agente que cause uma superprodução de neurônios, interferindo com a homeostase do

processo, poderia potencialmente causar conexões aberrantes, criando circuitos epiléticos e/ou ativar vias que deflagram a geração de células-tronco tumorais. Por isso, Duque e Spector (2019) sugerem que, em um cérebro adulto ou maduro, a preservação e regeneração de neurônios já existentes seria uma estratégia terapêutica mais interessante que a geração de novos neurônios ou neuroprogenitores devido as nossas limitações atuais sobre o conhecimento dos processos envolvidos. A preservação de neurônios se trata da manutenção da viabilidade e função de células já existentes, enquanto a regeneração neuronal envolve a formação de novos neurônios a partir de células-tronco ou progenitores neurais. Avanços na compreensão destes dois fenômenos: i) neurogenese fisiológica e ii) regeneração de neurônios preexistente ou remanescentes possibilitariam o estabelecimento de novas estratégias para ativação da plasticidade regenerativa do cérebro adulto e, consequentemente, o desenvolvimento de terapias mais efetivas para doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas.

Atualmente a estimulação da neurogênese tem sido proposta como uma nova estratégia terapêutica tanto para doenças neurodegenerativas como para transtornos psiquiátricos (Apple et al., 2017). Muitos estudos tentam relacionar a conexão entre eficácia de drogas antidepressivas com a capacidade destas drogas de induzir neurogênese (Park, 2019).

Estudos clínicos demonstram o significativo potencial antidepressivo do DMT por meio de diferentes vias de administração. O DMT intravenoso mostrou uma redução significativa nos escores de depressão (diferença média de -4,5 pontos na Escala de Hamilton para Depressão), com efeitos perceptíveis já no dia seguinte. Já a ayahuasca administrada por via oral apresentou uma taxa de resposta de 64%, em comparação com 27% do placebo no sétimo dia (Fontes, 2017).

Os mecanismos neurobiológicos por trás desses efeitos envolvem múltiplas vias: exames de neuroimagem funcional revelaram que a ayahuasca modula a atividade da amígdala, ínsula anterior, córtex pré-frontal ventrolateral e cíngulo subgenual, sendo que experiências psicodélicas mais intensas se correlacionam com melhores respostas antidepressivas (Fontes, 2017). Acredita-se que o DMT pode atuar por meio do aumento da neurotransmissão e da neurogênese (Antunes et al., 2023), especificamente por meio da ativação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e da inibição da monoamina oxidase A, que modulam as vias serotoninérgicas (Gonçalves et al., 2025).

### **Psicodélicos e seus efeitos neurogênicos**

Doenças psiquiátricas como depressão e outras doenças do humor são atualmente uma das maiores causas de desabilidade mundial (Whiteford et al., 2013). Aproximadamente um terço dos pacientes não respondem aos diferentes fármacos antidepressivos disponíveis e os que

respondem bem ou parcialmente geralmente observam seus efeitos benéficos somente após aproximadamente três semanas de tratamento (Rush et al., 2006).

A depressão envolve alterações fisiológicas importantes, incluindo redução da neurogênese hipocampal, prejuízo da plasticidade sináptica e disfunção do eixo HPA, com liberação crônica de cortisol. Além disso, apresenta inflamação sistêmica de baixo grau, evidenciada pelo aumento de citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$ , que contribuem para prejuízos na neurotransmissão e maior vulnerabilidade neuronal (MILLER; RAISON, 2016).

Ultimamente, com o aumento das doenças psiquiátricas, a procura por agentes capazes de promover plasticidade e regeneração neuronal no córtex pré-frontal aumentou. Mas, mesmo assim, poucos fármacos ou procedimentos terapêuticos têm se mostrado promissores nessa busca intensa. Uma classe de fármacos tem se mostrado promissora em estudos recentes: os psicodélicos (Ly et al., 2018b). Dentre estas moléculas, destaca-se a cetamina.

O uso da cetamina, em doses mais baixas que as usadas para alcançar seu efeito anestésico, teve seu uso liberado via administração muscular, intravenosas e nasal esporádicas (não-diárias e em ambientes clínicos supervisionados em termos médicos) para o tratamento de depressão resistente e prevenção de suicídio em pacientes nos Estados Unidos pelo FDA em 2019. Ela demonstra um efeito antidepressivo de ação rápida mesmo em alguns pacientes que se mostram resistentes aos antidepressivos comercializados mais prescritos atualmente (Berman et al., 2000; Feder et al., 2021; Ionescu et al., 2016; Krupitsky et al., 2002; Phillips et al., 2020; Zarate et al., 2012).

Estudos experimentais sugerem que este efeito terapêutico ocorre devido à habilidade da cetamina em aumentar as espículas dendríticas, aumentar a síntese de proteínas presentes nas fendas sinápticas e modular respostas sinápticas (Ly et al., 2018). Outros fármacos serotoninérgicos psicodélicos com ação alucinatória mais intensa que a cetamina, como psilocibina, LSD (dietilamida do ácido lisérgico), DMT e 5-meoDMT têm demonstrado surpreendente efeitos anti-ansiolíticos e antidepressivos duradouros em estudos clínicos, mesmo após uma única dose em pacientes resistentes a tratamentos tradicionais (Carhart-Harris et al., 2016; Dore et al., 2019; Galvão-Coelho et al., 2021; Nichols et al., 2017; Palhano-Fontes et al., 2019; Rucker et al., 2016). Embora o mecanismo de ação dos psicodélicos serotoninérgicos nessas doenças ainda não esteja estabelecido, após uma única administração destas moléculas, sugere-se que elas atuem por meio de uma plasticidade neuronal (capacidade do sistema nervoso de modificar conexões e funções em resposta a experiências, estímulos ou lesões), o que estabeleceria novos circuitos, de qualquer forma causando um “reset” na circuitaria pré-existente, cuja deterioração era responsável pela alteração neuropsiquiátrica. Em 2018, Ly e colaboradores observaram que o DMT e o LSD, aumentaram a formação de neuritos e espículas

dendríticas em neurônios de roedores tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*.

### **Células Microgliais e Neurogênese**

As células microgliais, como células imunes locais do SNC, estão difusamente localizadas no cérebro e na medula espinhal. No início, supunha-se que as células microgliais tinham as mesmas funções em todas as áreas do sistema nervoso central (SNC). Entretanto, pesquisas demonstraram que as células microgliais em regiões neurogênicas e não neurogênicas possuem diferenças na capacidade de proliferação e na expressão de marcadores durante sua ativação (Goings et al. 2006) e não desempenham apenas papéis relacionados a defesa, mas também estão envolvidas na migração, proliferação e diferenciação de células-tronco neurais e progenitoras (Walton et al. 2006). Por exemplo, o enriquecimento ambiental leva ao aumento da produção neuronal no giro dentado do hipocampo e esse processo é regulado pela ativação das células microgliais (Ziv et al. 2006). Foi demonstrado que o cultivo *in vitro* de células-tronco neurais e progenitoras retiradas da zona subventricular (SVZ) pode levar à perda de sua capacidade neurogênica. No entanto, quando células microgliais provenientes da SVZ são adicionadas à cultura a cada passagem, a capacidade neurogênica é mantida por um período prolongado (Marshall et al. 2014).

### **Neurosfera**

As neurosféricas são estruturas esferoidais tridimensionais formadas por células-tronco neurais e progenitores cultivados em suspensão, mantendo capacidade de autorrenovação e diferenciação. Elas são obtidas pela dissociação mecânica ou enzimática de tecido neural (embrionário, pós-natal ou adulto) ou de culturas previamente estabelecidas, e depois cultivadas em meio livre de soro suplementado com fatores mitogênicos, como EGF e bFGF, que promovem proliferação e a organização espontânea dos esferoides. Cada neurosfera representa um agrupamento clonogênico contendo células em múltiplos estágios do desenvolvimento neural, sendo amplamente utilizada em modelos experimentais para estudar neurogênese, plasticidade e respostas a fármacos (Michielin; Borges, 2020).

### **Justificativa**

Antes da pandemia de covid-19, estimava-se que uma em cada seis pessoas no mundo sofria de depressão maior, muitas vezes recorrente ou crônica sem tratamento eficaz. Mesmo entre os que recebem cuidados médicos e terapêuticos, cerca de um terço não responde ao tratamento. Estudos recentes trouxeram novas esperanças ao revelar o potencial regenerativo dos psicodélicos no cérebro, tanto em pesquisas experimentais quanto em ensaios clínicos,

ampliando as perspectivas para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Da Cruz et al., 2024).

Escolhemos testar o DMT neste estudo porque estudos clínicos pequenos e relatos de casos médicos mostram que ele tem um efeito terapêutico contra depressão, e síndrome do estresse pós-traumático e adicção quando administrado em pacientes resistentes a tratamentos convencionais após apenas uma única infusão (Timmermann et al., 2018). A interação da DMT com receptores serotoninérgicos, sigma-1 e associados a traços de amina pode promover a neuroplasticidade, oferecendo potencial terapêutico para condições de saúde mental e doenças neurodegenerativas (Colosimo et al., 2024). A administração de DMT em camundongos demonstrou ativar a neurogênese adulta no hipocampo, melhorando o aprendizado espacial e a memória (Morales-García et al., 2020).

Além, pesquisas sobre neurogênese adulta em primatas são cruciais para entender sua relevância para a função cerebral humana e potenciais aplicações clínicas. Embora estudos extensivos tenham sido conduzidos em roedores, pesquisas em primatas não humanos (NHPs) são mais limitadas devido ao alto custo, dificuldades éticas, menor disponibilidade de animais e exigências regulatórias rigorosas, mas fornecem compreensões valiosas devido à sua semelhança neural mais próxima aos humanos (Zhang et al., 2023). Modelos de NHP demonstraram que a neurogênese é necessária para os efeitos terapêuticos de antidepressivos, sugerindo que mecanismos semelhantes podem ser aplicados em humanos (Perera et al., 2011).

No entanto, a extensão da neurogênese adulta em humanos permanece controversa, o que destaca a importância dos estudos em NHP como ponte entre as descobertas em roedores e as aplicações humanas (Seki, 2020). Assim, pesquisas com modelos de NHP são essenciais para avançar na compreensão da neurogênese adulta e de suas potenciais implicações clínicas em humanos.

Nesse contexto, estudos *in vitro* com neuroesferas oferecem uma ferramenta complementar valiosa, pois permitem avaliar diretamente a proliferação, diferenciação e respostas farmacológicas das células-tronco neurais em condições controladas, incluindo a análise de vias moleculares específicas e dos efeitos de substâncias neurogênicas sem as limitações éticas e logísticas dos experimentos *in vivo*.

Outra razão, o DMT é considerado a droga psicodélica mais potente de todas em termos de efeitos alucinógenos e, ao mesmo tempo, apresenta um baixo poder viciante e poucas e brandas intercorrências fisiológicas durante sua infusão em estudos clínicos e relatos de usos recreativos ilícitos. Além disso, nosso grupo tem experiência em estudos toxicológicos e *neurológicos in vitro e in vivo* nos últimos anos com substâncias alucinógenas, como o DMT.

## Objetivos

7

1. Analisar o efeito “in vitro” de DMT na morfologia de neuroprogenitores e neurônios isolados de nichos de células progenitoras neurais de Saguís (*Callitrix penicillata*), após o estabelecimento e caracterização de cultura primárias de neuroprogenitores isolados a partir do cérebro destes animais;
2. Analisar a toxicidade e efeito do DMT na biologia e morfologia de células progenitoras neurais de Saguís (*Callitrix penicillata*) isoladas;
3. Analisar o efeito do DMT na capacidade das células primárias isoladas de cérebros de Saguís (*Callitrix penicillata*) de formação de neurosféricas e no potencial de diferenciação em neurônios.

## Materiais e Métodos

### DMT

O padrão químico de DMT (Sigma -Aldrich), com pureza de 99%, que foi utilizado neste projeto foi adquirido pela Dra Eloísa Dutra Caldas com permissão da Polícia Federal para uso em pesquisa. Utilizamos o sintetizado pela Prof. Dra. Lucilia.

### Animais

Em nossos estudos, utilizamos Saguís (*Callitrix penicillata*) que se encontravam no Centro de Primatologia da UnB. Este estudo só foi iniciado após sua aprovação pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UnB (CEUA – UnB) e conduzido estritamente em acordo com a regulamentação do CONCEA e recomendações dos Conselhos Internacionais de Ética sobre o Uso de Primatas em Pesquisa. O número do protocolo aprovado pelo CEUA é SEI nº 23106.008617/2023-95.

Para a obtenção de neuroprogenitores, três animais adultos foram eutanasiados sob anestesia profunda com solução de tiopental (Thiopentil) a 5% diluída em solução fisiológica a 0,9% de NaCl (Sigma) estéril, administrada via intraperitoneal em uma dose de 250 mg/kg. Após a detecção da morte, o corpo foi colocado em uma plataforma gelada previamente esterilizada e o cérebro, rapidamente, removido da caixa craniana para o subsequente isolamento de estruturas já caracterizadas como ricas em neuroprogenitores.

### Coleta do Tecido

Após a retirada do cérebro, o mesmo foi rapidamente colocado dentro de um tubo tipo

Falcon de 50 mL previamente pesado, contendo meio Hibernate A (Gibco) suplementado com B27 (Sigma) 50x e Anti-Anti 100x (Sigma), para minimizar o risco de contaminação durante o transporte do Centro de Primatologia da UnB até a sala de cultivo do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. No dia da coleta, o meio para transporte deve ser armazenado a 4°C para mantê-lo gelado. Para melhorar significativamente a taxa de sucesso das culturas, é necessário que o tempo entre a remoção do tecido na sala de cirurgia e o início do protocolo de cultivo seja minimizado ao máximo. Por isso, foi estabelecido que o tempo de deslocamento do centro cirúrgico para a sala de cultivo, onde o isolamento foi executado, se mantenha entre 1 e 2 horas.

### **Dissociação do Tecido e Cultivo primário**

Depois de colocar o cérebro dentro do tubo Falcon de 50 mL pré-pesado, contendo meio Hibernate A (Gibco) gelado, selá-lo e pesá-lo novamente para determinar o peso do tecido coletado. Em seguida, na cabine biológica da sala de cultivo celular, o cérebro foi transferido para uma placa de Petri e, com bisturi, tesoura e pinça estéreis, realizada a remoção das meninges aparentes e a maceração manual do tecido. Com uma pipeta sorológica de 10 mL, os fragmentos foram transferidos para um tubo contendo o meio Hibernate A (Gibco) e, caso ainda estivessem grandes para serem transferidos, é importante que sejam picotados um pouco mais, para que as etapas seguintes sejam facilitadas.

Depois que os pedaços de tecido assentarem no fundo do tubo, o meio Hibertnate A (Gibco) foi removido e acrescentado à mistura de dissociação enzimática, que contém papaína (Sigma) (2,5 U/ml) e DNase I (Sigma) (10 U/ml) em metade de meio Hibertnate A (Gibco) e metade de Accutase (Gibco), até cobrir totalmente o tecido, e incubado a 37°C por 15 minutos, mexendo de 5 a 10 vezes a cada 5 minutos. Como as culturas neuronais são extremamente sensíveis, é importante que, após a incubação, o tecido seja triturado com a pipeta sorológica no máximo cinco vezes. Para obter sucesso no processo, também é necessário repetir o procedimento de incubação e trituração até que não haja mais pedaços de tecido visíveis.

Para obter uma suspensão de células única, a mistura da dissociação enzimática foi filtrada por um filtro de 70 µm (Falcon). O filtro precisou ser enxaguado 2x com meio de cultura celular SCM para que sejam coletadas quaisquer células restantes.

A solução filtrada foi centrifugada e ressuspensa em meio SCM composto por 50 mL de DMEM/F-12 (Gibco), 1 mL de B27(Sigma) 50X, 500 µL de Glutamax (Sigma) 100X, 500 µL de AntiAnti (Sigma) 100X, 40 ng/mL de bFGF (Gibco) e EGF (Gibco) e 2 µg/mL de heparina. Para o plaqueamento, foi utilizado um frasco de 75 cm<sup>3</sup> (Kasvi) e mantiveram-se em estufa provida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

No dia seguinte, a garrafa de 75 cm<sup>3</sup> apresenta 2 tipos de culturas diferentes: uma aderente e outra semiaderente. Por isso, é necessário bater na garrafa para soltar quaisquer células não aderentes e semi-aderentes no meio e, logo em seguida, despejar o meio da garrafa em um tubo Falcon para certificar que todas as células semi-aderentes foram coletadas. As células aderentes que permanecem no frasco de cultura são identificadas como cultura glial mista (pericitos, microglia, astrócitos), pois aderem rapidamente à superfície plástica do frasco de cultura. Para manter o cultivo das aderentes, o meio utilizado foi o GCM, composto por 50 mL de DMEM/F-12 (Gibco), 5 mL de soro fetal bovino, 500 µL de AntiAnti(Sigma) 100X e 500 µL de Glutamax 100X. O meio foi trocado a cada 3 dias e passagens foram feitas antes que a confluência celular chegasse a 80%. A cada passagem, uma quantidade de células era congelada com DMSO.

O pellet das células não aderentes, depois de coletadas e centrifugadas, foi ressuspensionado em meio SCM e as células foram contadas. Depois, foram plaqueadas em 200 mil células por poço, em placas de 48 poços, de superfície antiaderente. Isso ocorre porque as células precisam manter maior proximidade entre si e interagir com células vizinhas para proliferarem adequadamente. O meio foi trocado a cada 3 dias. Na troca, somente metade do volume do meio foi substituído por meio fresco.

### **Ensaio de viabilidade Celular**

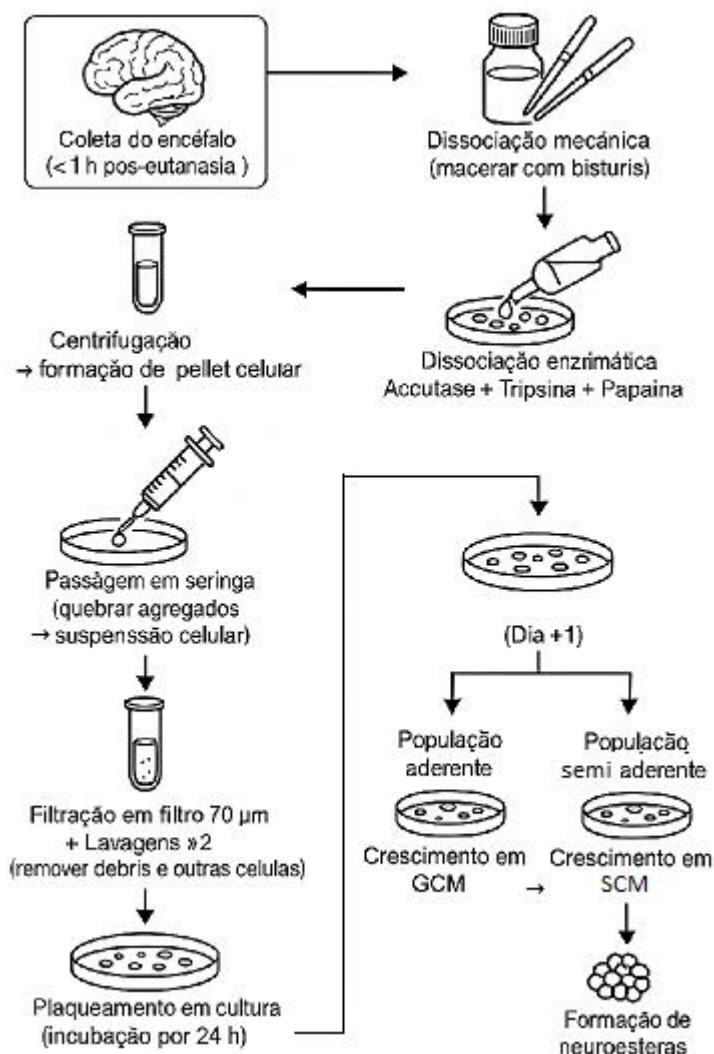
Para os ensaios de viabilidade celular utilizamos o teste do MTT (Mosmann, 1983), as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $1,2 \times 10^4$  células/poços em meio GCM, sem fatores de crescimento e com soro fetal bovino 10%, e incubadas por 48 horas na presença de diferentes concentrações de DMT. Em seguida, foram adicionados 150 µL de MTT (0,5 mg/mL) ao meio em cada poço, e as células foram incubadas por 4 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o meio foi removido e o formazan formado foi solubilizado em DMSO (Sigma). A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro a 570 nm, permitindo a quantificação da viabilidade celular.

### **Cultura de neuroesferas**

Após o estabelecimento, a expansão e a caracterização das células primárias de progenitores neuronais, as células foram desaderidas de garrafas de cultivo. As células foram ressuspensas ( $2 \times 10^5$  células/poço) em meio para neuroesferas (DMEM/F12, sem soro fetal bovino 10%, Fator de crescimento de fibroblastos humanos recombinante básico (bFGF – 40ng/mL), Fator de crescimento epidérmico humano recombinante (40ng/mL) (Gibco), B-27 (1:50) (Gibco)), Heparina (2 µg/mL), Glutamax (100X) e AntiAnti (100X), na ausência e presença de diferentes



concentrações de DMT (de 0,1  $\mu\text{M}$  até 10.000  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 2000 mg/L). Para o plaqueamento, foram utilizadas placas de 48 poços de baixa aderência (Gibco). As placas contendo as células foram mantidas com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. A mensuração e análise morfológicas das neuroesferas, bem como suas imunomarcações, foram feitas utilizando o EVOS FL Cell Imaging System. O fluxograma 1 representa bem o processo de coleta e dissociação até o cultivo celular de neuroesferas.



**Fluxograma 1** – Desenho do processo de coleta e dissociação do tecido até o cultivo celular de neuroesferas.

### Teste de Neuroesferas com diferentes concentrações de DMT

Devido aos resultados do teste de viabilidade (MTT), percebemos que as doses testadas estavam muito abaixo da possível  $\text{dl}_{50}$ . Por isso, foram realizados testes de neuroesferas com concentrações em uma escala mais ampla de concentrações.

No primeiro teste, diferentes concentrações de DMT foram avaliadas. Dentre elas estão: grupo controle; controle + metanol (solvente do DMT, considerando a quantidade da dose mais alta, ou seja 188mg/L); 0,0188 mg/L; 0,188 mg/L; 1,88 mg/L; 18,8 mg/L e 188 mg/L.

Em uma placa de 48 poços de baixa aderência (Greiner bio-one), 7 condições em quintuplicatas,  $2 \times 10^5$  células por poço foram plaqueadas com meio SCM, tratadas e analisadas durante 7 dias usando microscopia optica. Os dados dos ensaios pela foram obtidos nos dias 2, 5 e 7 do ensaio. Os fatores de crescimento foram acrescentados todos os dias (a cada 24 horas) durante os 7 dias do ensaio.

Em cada condição, foram contadas e medidas todas as neuroesferas presentes, e assim foram classificadas e contabilizadas por tamanhos: entre 100-200  $\mu\text{m}$ ; entre 200-300  $\mu\text{m}$ ; entre 300-400  $\mu\text{m}$ ; entre 400-500  $\mu\text{m}$  e  $>600 \mu\text{m}$ .

Todavia, no segundo teste de neuroesfera, seguiram-se os mesmos parâmetros de confluência de células/poço do primeiro teste, com os fatores de crescimento acrescentados na dose dobro durante os 5 dias de tratamento. Este ensaio foi realizado em duplicata nas seguintes condições: controle+metanol, 2mg/L, 20mg/L, 200mg/L e 2000mg/L de DMT. Os critérios de avaliação foram os mesmos: tamanho e concentração. No primeiro teste, foi considerado fator tempo também nas análises, justamente para compreender a tendência de crescimento comportamento das neuroesferas.

### **Ensaio de diferenciação neuronal**

As células foram plaqueadas no meio de diferenciação neuronal, composto por DMEM/F-12, soro fetal bovino (1% (vol/vol)), AntiAnti (100X), Glutamax (100X), NGF (40 ng/mL), BDNF (40 ng/mL) e NT-3 (40 ng/mL), em uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 48 poços (Kasvi) previamente tratadas com Geltrex (Sigma). As placas foram mantidas em estufa (Thermo Fisher Scientific) provida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, onde receberam trocas de meios de cultura para diferenciação neuronal (StemCell Technologies) a cada 3 dias. Imagens foram capturadas no sétimo dia da indução da diferenciação neuronal usando equipamento EVOS FL Cell Imaging System. O experimento foi realizado em triplicatas para cada linhagem celular estabelecida e repetido ao menos duas vezes.

### **Microscopia de fluorescência**

A morfologia de i) células das culturas primárias estabelecidas, ii) neuroesferas, e iii) células submetidas a protocolos de diferenciação neuronal tratadas e não tratadas com DMT foi analisada após fixação histológica com paraformaldeído 4%, permeabilizando as células com 0,3% Triton X-100 seguida por incubação com anticorpos contra os seguintes antígenos: marcador de Ki67-PE (proliferação) (Pharmigen), CD133-APC (marcador de células-tronco neuronais) (Milteniy biotec), Nestina (marcador de progenitor neuronal) (Pharmigen), GFAP

(marcador de astrócitos) (Pharmigen), e b-tubulina III-FITC (marcador para neurônios em estágio de maturação e formação de filamentos) (Pharmigen). Os núcleos celulares foram visualizados com marcação por 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, Sigma). A análise e obtenção de imagens foi utilizando o sistema EVOS FL Cell Imaging System.

### **Análise Estatística**

O primeiro experimento de neuroesferas com diferentes concentrações mais baixas de DMT foram realizados em quintuplicata. O segundo experimento foi realizado em duplicata e com uma dosagem mais alta, entre 2 mg/L a 2000 mg/L de DMT. Os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism 10, adotando um nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP), considerando-se réplicas independentes para cada condição experimental. Inicialmente, foi realizada avaliação exploratória dos dados visando verificar a adequação aos pressupostos para análises paramétricas, incluindo inspeção da distribuição, presença de assimetria e homogeneidade das variâncias. Embora parte dos conjuntos de dados apresentasse comportamento compatível com análises paramétricas, observou-se que a distribuição percentual do tamanho das neuroesferas por classes apresentava características composicionais, com assimetria acentuada e presença de valores nulos em múltiplos grupos, especialmente em classes de maior diâmetro.

Diante disso, a análise estatística foi conduzida de forma complementar. Para avaliação global das tendências entre concentrações e ao longo do tempo, foram empregados testes paramétricos (ANOVA), considerando seu caráter exploratório e a capacidade de integrar múltiplas condições experimentais. A análise de variância (ANOVA unidirecional) foi utilizada para comparar os dados obtidos nas diferentes condições e/ou concentrações de DMT, permitindo avaliar se havia diferenças significantes entre os grupos experimentais.

No entanto, para desfechos específicos em que os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade não foram atendidos, foi adotada análise não paramétrica confirmatória.

Nesses casos, as comparações entre concentrações foram realizadas por meio do teste de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn com correção para múltiplas comparações pelo método de Benjamini, Krieger e Yekutieli ( $Q = 0,05$ ). Essa abordagem permitiu preservar a integridade biológica dos dados, especialmente em situações de deslocamento pronunciado da distribuição para classes específicas de tamanho, sem a necessidade de agregação artificial de categorias.

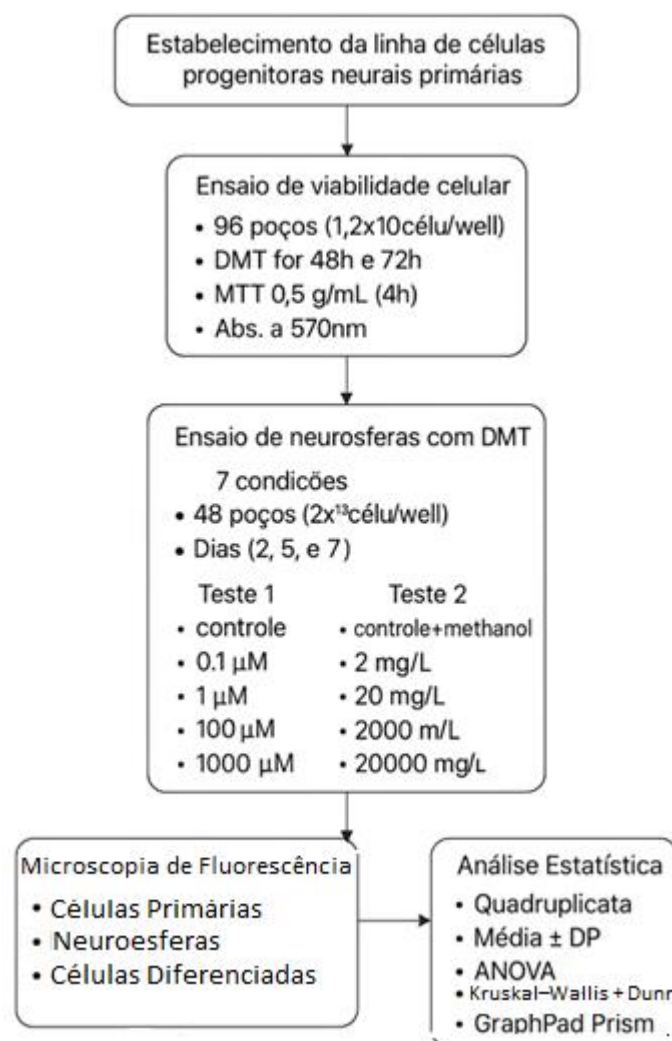
O grupo controle+metanol foi utilizado como referência para todas as comparações, servindo de base para determinar tanto a presença de efeito trófico, um aumento significativo na

viabilidade celular ou no crescimento das neuroesferas, quanto efeitos citotóxicos, observados pela redução da viabilidade ou de outros parâmetros avaliados em relação ao controle.

A mesma abordagem estatística foi aplicada aos seguintes dois ensaios experimentais:

- 1: no teste de MTT, para analisar a viabilidade celular após 48 e 72 horas de exposição ao DMT;
- 2: nos ensaios de formação de neuroesferas, para comparar o diâmetro médio das esferas formadas sob diferentes concentrações de DMT ao longo dos dias.

Além de fornecer uma análise estatística robusta, o GraphPad Prism também permitiu visualizar graficamente a grande quantidade de dados obtidos, facilitando a interpretação das tendências gerais — como o comportamento bifásico do DMT, que apresentou estímulo celular em doses intermediárias e efeito inibitório em concentrações mais elevadas.



**Fluxograma 2** – Desenho experimental do delineamento do estudo: métodos aplicados e doses de DMT

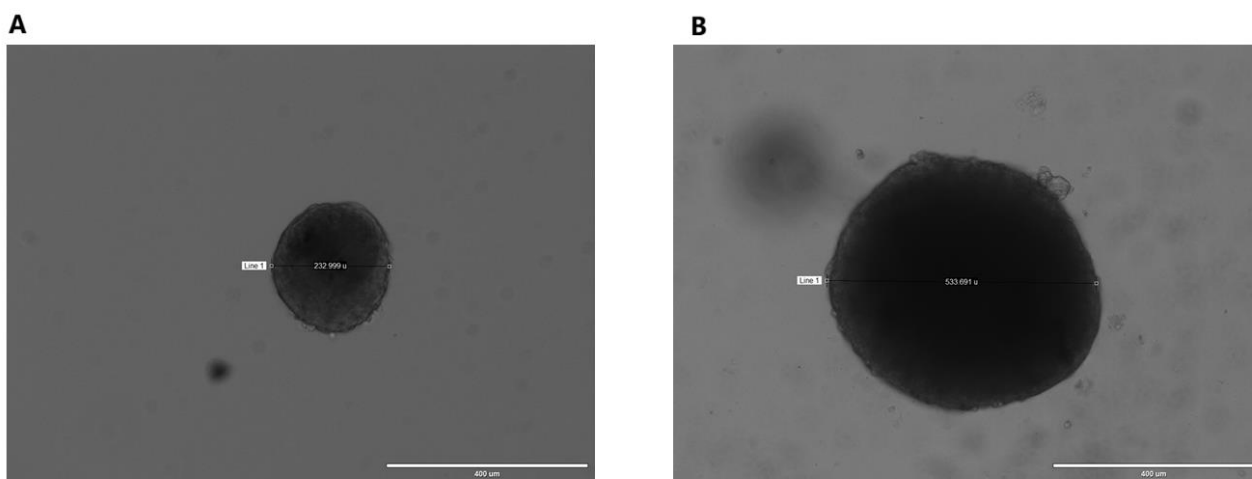
## Resultados

### Estabelecimento da cultura primária de neuroprogenitores

Para o aprimoramento do protocolo de isolamento e cultivo de células neuronais primárias, diversos reagentes e modos de culturas diferentes foram testados tendo com base em protocolos preliminares publicados para isolamento de neuropogenitores de primatas e roedores (Park et al., 2022). Durante as tentativas de estabelecimento da cultura primária, se citar, comparamos a utilização de B-27 e de B-27 menos vitamina A em 1X e 4X. Concluiu-se visualmente, por microscopia óptica, que a concentração B-27 1X foi a melhor para o estabelecimento da cultura primária de neuroprogenitor.

Também foi feita a comparação entre diferentes concentrações celulares em cada poço. Testamos na placa de 48 poços, as concentrações: de  $5 \times 10^3$  células/poço,  $1 \times 10^4$  células/poço,  $1 \times 10^5$  células/poço e  $1 \times 10^6$  células/poço. Como são células suspensas, concluiu-se que a concentração deveria ser maior; assim, no segundo teste de neuroesferas, adotou-se a concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço. Também foi realizada a comparação entre dois tipos diferentes de meio com suplementação para diferenciação neuronal: um com soro fetal bovino e outro sem. Com microscopia óptica e testes de imuno-histoquímica, confirmou-se o protocolo mais adequado (Figura 12).

Além disso, foram realizados diversos testes de formação de neuroesferas com diferentes concentrações de DMT, e concluiu-se que, após o cultivo, as neuroesferas precisam ser dissociadas para serem plaqueadas e submetidas ao protocolo de diferenciação neuronal. Essa dissociação não exigiu ação enzimática, sendo realizada apenas com força mecânica e pressão, por meio de seringa e agulha fina (BD Ultra-Fine™ 32G 4 mm). Notavelmente, com os testes, verificamos que o acréscimo diário de fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblastos humanos recombinante básico (bFGF – 40 ng/mL) e fator de crescimento epidérmico humano recombinante (40 ng/mL)) promove formação mais uniforme das neuroesferas e evita aglomerações rápidas. No primeiro teste com diferentes concentrações de DMT, em 5 dias de experimento, as neuroesferas atingiram tamanhos próximos a 200  $\mu\text{m}$  (figura 3A), enquanto no segundo teste, com adição diária de fatores de crescimento, no 5º dia, as neuroesferas variaram de 400 a 600  $\mu\text{m}$ , dependendo da concentração (figura 3B).



**Figura 3** – (A) Neuroesfera do primeiro teste formada em 5 dias de tratamento, sem acrescento de fatores de crescimento durante os dias de experimento, com tamanho em 232,999μm. (B) Neuroesfera do segundo teste em seu 5º dia de tratamento, com acrescento de fatores de crescimento todos os dias durante os 7 dias, em tamanho de 533,691μm.

### Ensaio de MTT com diferentes concentrações de DMT

Inicialmente, fizemos ensaios de viabilidade das células primárias usando o teste de MTT com as seguintes concentrações de DMT: 10mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L e 400 mg/L. Como não observamos morte celular nestas concentrações, ao contrario observamos um aumento na taxa de viabilidade celular de aproximadamente 4% na concentração de 200 mg/L. Refizemos 3 testes independentes com as concentrações de DMT de 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L e 800 mg/L, cada concentração em quintuplicata, acompanhados do controle negativo e do controle do solvente (metanol). Os valores de absorbância foram corrigidos pela leitura do branco (poço contendo apenas DMSO) e normalizados em relação ao grupo controle, definido como 100% de viabilidade.

Assim, em todos os ensaios de MTT, a viabilidade celular foi estabelecida em comparação ao controle negativo como 100% para comparação.

Nos ensaios de MTT - 24 horas, o controle com DMSO (0+DMSO), a adição de DMSO não parece afetar significativamente a viabilidade em relação ao controle puro em nenhum dos testes, indicando que o DMSO usado como solvente é relativamente inerte nessa concentração e duração. Não foi observada redução clara de viabilidade a 50%, sugerindo que a DL50 é superior a 800 mg/L, além também de apresentar pouca resposta significativa em qualquer concentração, o que sugere a necessidade do aumento das horas para a análise.

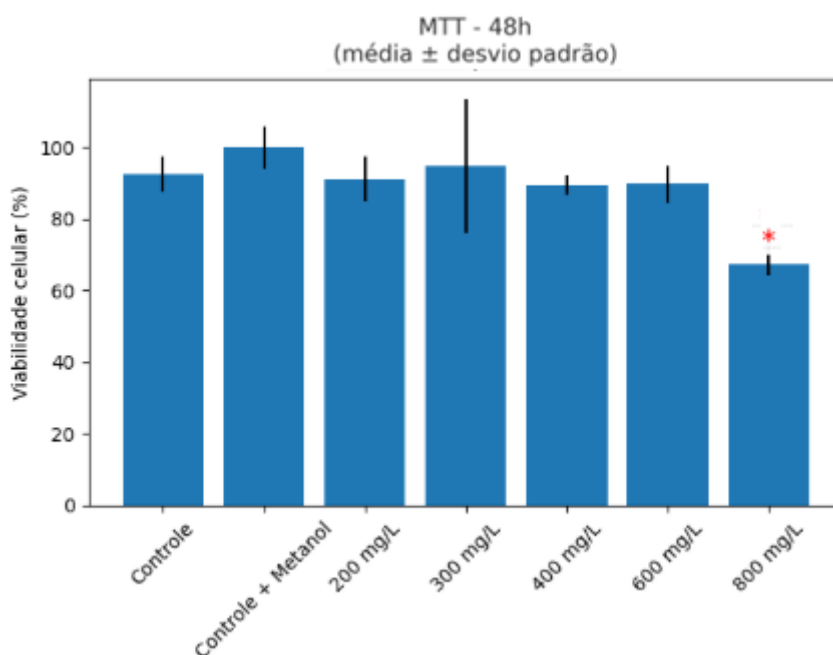
A exposição ao DMT mostra um perfil de resposta dependente da concentração de DMT. Em todas as três repetições independentes dos testes (Teste 1, 2 e 3), a viabilidade celular aumenta aparentemente com 200 mg/L e 300 mg/L de DMT, mas começa a declinar em concentrações mais altas (400-800 mg/L). O aumento inicial pode indicar um efeito estimulante

do DMT em baixas concentrações, enquanto a queda subsequente sugere toxicidade em concentrações mais altas. E no Ensaio de MTT - 48 horas: o Controle + DMSO apresentou viabilidade similar à observada nas 24 horas iniciais e as concentrações de DMT 200-800 mg/L. Aumentos na viabilidade são observados em 200, 300 e 400 mg/L em algumas repetições, especialmente notáveis no ensaio independente 2. No entanto, as concentrações mais altas (600 e 800 mg/L) mostram uma redução significativa da viabilidade celular em 48 horas, em comparação com 24 horas, sugerindo que o efeito tóxico do DMT é mais pronunciado com tempo prolongado de exposição. Esse resultado pode estar ligado, além da baixa confluência deste teste, à baixa estabilidade do DMT no meio de cultura.

Devido ao desvio padrão elevado, foi necessário refazer os ensaios de MTT com um maior número de células por poço para reduzir a variabilidade entre os testes, o que foi obtido após: 1. Ajustar o número de células por poço para 12.000, já que não atingiam pelo menos 70% necessários no teste anterior; 2. Ajustar o tempo de teste para 48h e 72h, pois 24h não foi suficiente para o DMT mostrar qualquer tipo de toxicidade ou interação que difira do controle.

Então, para consolidar e aprimorar os dados já obtidos, o próximo ensaio de MTT realizado foram analisados após 48h e 72h de exposição. Nestes testes, a análise de variância de uma via (ANOVA) indicou diferenças estatisticamente significativas entre as médias das condições testadas em 72 h ( $F = 100,85$ ;  $p < 0,0001$ ). Esses resultados confirmam que as concentrações de DMT influenciaram a atividade metabólica celular.

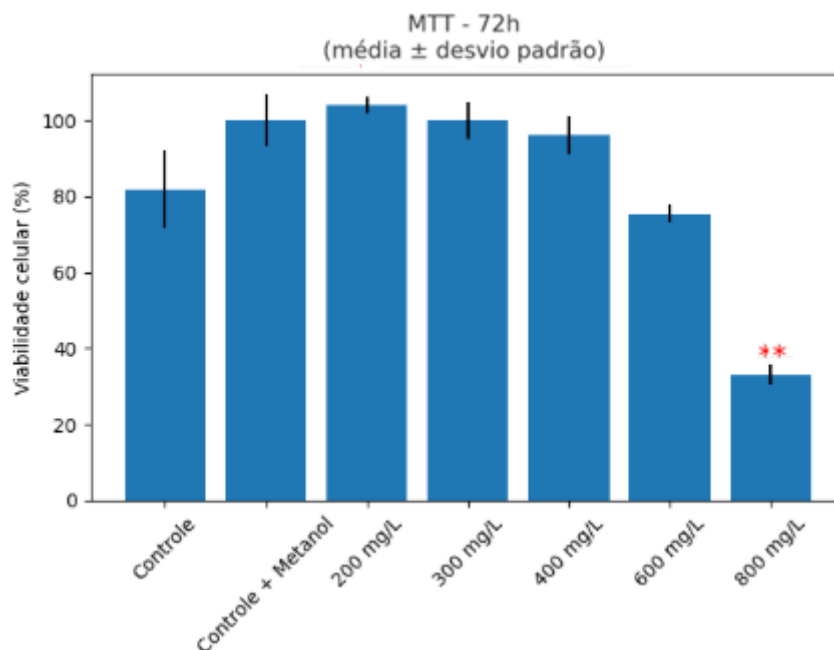
O teste de comparações múltiplas de Tukey (HSD) foi aplicado para identificar quais grupos diferiram do controle. Esse teste identifica diferenças reais entre pares de médias.



**Figura 4** – Ensaio de MTT em 48 horas – teste com confluência celular diferente e desvio padrão menor comparado aos anteriores. Os marcados com asterisco vermelho (\*) corresponde à um decréscimo na viabilidade significativa

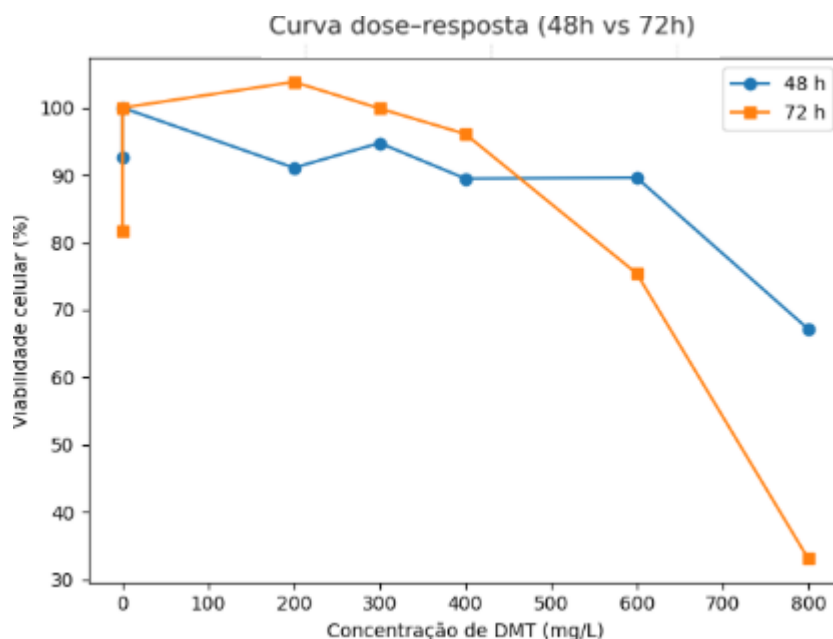
A figura 4 (48 h) mostra as médias e os desvios-padrão (SD) das leituras de MTT nas

condições testadas. Ao final do ensaio, as viabilidades celular na maioria das condições ficaram muito próximas de 100%. O único grupo que apresentou um decréscimo na viabilidade significativa foi o grupo tratado com concentração de 800 mg/L de DMT, com diferença estatística significativa em relação ao controle+metanol ( $p < 0,05$ ). As barras de erro (SD) são pequenas e homogêneas, indicando variação experimental mínima.



**Figura 5** – Ensaio de MTT em 72 horas – teste com confluência celular diferente e desvio padrão menor comparado aos anteriores.

A Figura 5 (72 h) exibe um aumento do número de células viáveis tratadas com DMT nas concentrações entre 200 e 400 mg/L, indicando um efeito trófico claro após 72 horas de exposição nessas condições. O grupo tratado com 800 mg/L de DMT apresenta novamente uma redução significativamente expressiva, marcada no gráfico (Figura 5) com duplo asterisco, demonstrando uma citotoxicidade severa nesta concentração.





**Figura 6** – Curva dose-resposta (48h vs 72h) – teste com confluência celular diferente e desvio padrão menor comparado aos anteriores.

A Figura 6 mostra uma comparação das curvas de dose-resposta entre 48 h e 72 h. Em 48 h, observa-se uma curva quase horizontal até 600 mg/L, seguida de declínio abrupto em 800 mg/L. Em 72 h, a curva assume o formato típico de resposta hormética, com aumento pronunciado nas doses intermediárias e queda acentuada nas doses altas. Basicamente, a exposição a algumas doses de DMT (agente estressor), que, em grandes quantidades, seria prejudicial ou tóxico, resulta em um efeito benéfico ou protetor para as células neuronais em doses intermediárias. Essa diferença temporal sugere que os efeitos estimulantes do DMT requerem um período de exposição maior para se manifestarem.

### **Efeitos tróficos e citotóxicos do DMT obtidos pelo teste de MTT**

Os dados obtidos revelam que o DMT apresenta dupla ação sobre a viabilidade celular, dependente da dose e do tempo de exposição. Em baixas concentrações (200–400 mg/L), o composto produziu aumento da atividade metabólica após 72 h, sugerindo efeitos tróficos possivelmente relacionados à ativação de receptores sigma-1 e serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>/1A), conhecidos por promoverem sobrevivência celular, neuroproteção e indução de fatores tróficos como BDNF. Estudos demonstram que o DMT exerce efeitos multifacetados no sistema nervoso: atua diretamente sobre células-tronco neurais, estimulando sua proliferação e a formação de novos neurônios (Morales-García et al., 2020; Szabo et al., 2016), mas também modula outras vias celulares, como a ativação do receptor sigma-1 (S1R) em neurônios maduros e células imunes, protegendo neurônios contra o estresse hipóxico (Szabo et al., 2016). Além disso, o DMT induz neuritogênese e plasticidade sináptica (Colosimo et al., 2024), mostrando que sua ação vai além dos progenitores neurais e reforça seu potencial em doenças neurológicas e psiquiátricas.

Esses achados são compatíveis com o aumento de viabilidade observado, refletindo potencial estímulo pró-neurogênico ou metabólico adaptativo. Por outro lado, em concentrações elevadas ( $\geq 800$  mg/L), o DMT induziu redução significativa da viabilidade celular, sugerindo efeito citotóxico. O ponto de transição observado em 600 mg/L representa o basicamente o limite entre os efeitos tróficos e os tóxicos, já que a partir dessa dose a viabilidade começa a declinar.

O Quadro 2 resume as condições experimentais, destacando as diferenças estatísticas em relação ao controle e a interpretação biológica de cada dose.

| Tempo | Concentração (mg/L) | Viabilidade (%) | p (vs ctrl metanol) | + Interpretação estatística | Efeito biológico          |
|-------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 48 h  | 200                 | <b>91,08 %</b>  | ns                  | não significativo           | Basal                     |
| 48 h  | 300                 | <b>94,77 %</b>  | ns                  | não significativo           | Basal                     |
| 48 h  | 400                 | <b>89,49 %</b>  | ns                  | não significativo           | Basal                     |
| 48 h  | 600                 | <b>89,62 %</b>  | ns                  | não significativo           | Basal                     |
| 48 h  | 800                 | <b>67,16 %</b>  | < 0,001             | significativo (↓)           | Citotóxico                |
| 72 h  | 200                 | <b>103,71 %</b> | < 0,001             | significativo (↑)           | Efeito trófico/metabólico |
| 72 h  | 300                 | <b>99,55 %</b>  | < 0,01              | significativo (↑)           | Efeito trófico            |
| 72 h  | 400                 | <b>96,49 %</b>  | < 0,05              | significativo (↑)           | Efeito trófico discreto   |
| 72 h  | 600                 | <b>74,77 %</b>  | ns                  | não significativo           | Limiar de toxicidade      |
| 72 h  | 800                 | <b>32,78 %</b>  | < 0,001             | significativo (↓)           | Citotóxico severo         |

**Quadro 2** - Condições experimentais relacionadas ao controle e a interpretação biológica de cada dose.

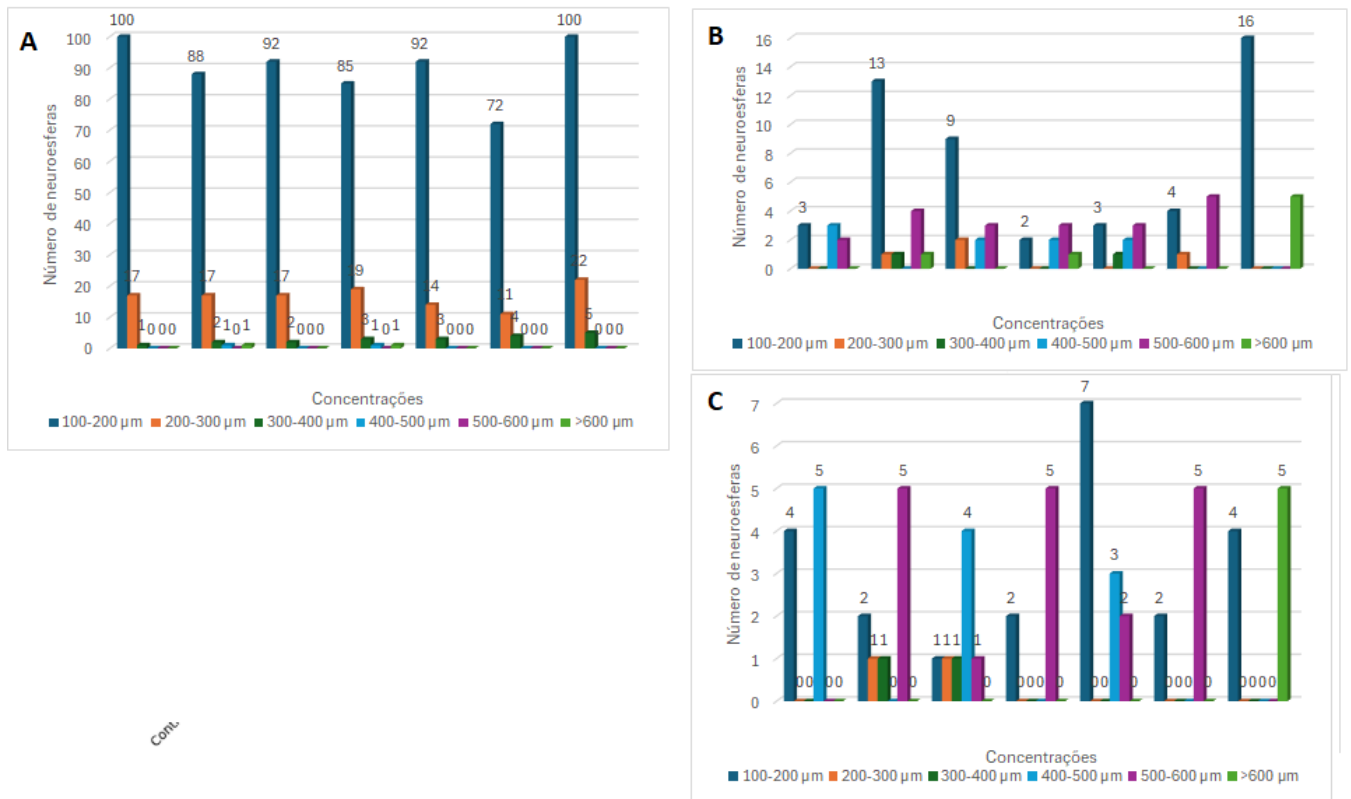
ns = não significativo; (↑) aumento em relação ao controle; (↓) redução em relação ao controle. sd= sem diferença

Então, em síntese, o DMT apresentou um perfil bifásico de ação nas células progenitoras neuronais: 1. Efeito trófico entre 200–400 mg/L, evidenciado por aumento estatisticamente significativo na viabilidade após 72 h; 2. Limiar de toxicidade: 600 mg/L; e 3. Citotoxicidade marcante em 800 mg/L, com queda drástica na viabilidade já em 48 h e intensificação após 72 h.

A resposta positiva nas doses intermediárias e o comportamento hormético ao longo do tempo sugerem que o DMT, dentro de uma faixa específica de concentração e duração de exposição, pode estimular mecanismos celulares associados à plasticidade e sobrevivência neuronal, reforçando seu potencial de modulação da atividade celular e contribuindo para a compreensão de seus possíveis papéis em processos de neurogênese e regeneração neural enquanto doses excessivas comprometem a integridade celular.

### Efeito do DMT na formação de neuroesferas

A formação de neuroesferas em diferentes concentrações de DMT foi analisada. Foram observadas variações significativas na quantidade e no tamanho dessas estruturas ao longo dos dias de tratamento. A quantificação das neuroesferas (figura 7), considerando a quantidade de neuroesferas em todos os poços feitos em quintuplicata para cada concentração, foi realizada e demonstra um aumento progressivo no número total de esferas nos primeiros dias em tamanhos de 100 a 200  $\mu$ m (figura 7A), seguido de uma estabilização do número delas nos dias finais do experimento (a partir do dia 4). Essa tendência foi observada em todas as concentrações testadas, porém com diferenças na taxa de crescimento entre os grupos experimentais.

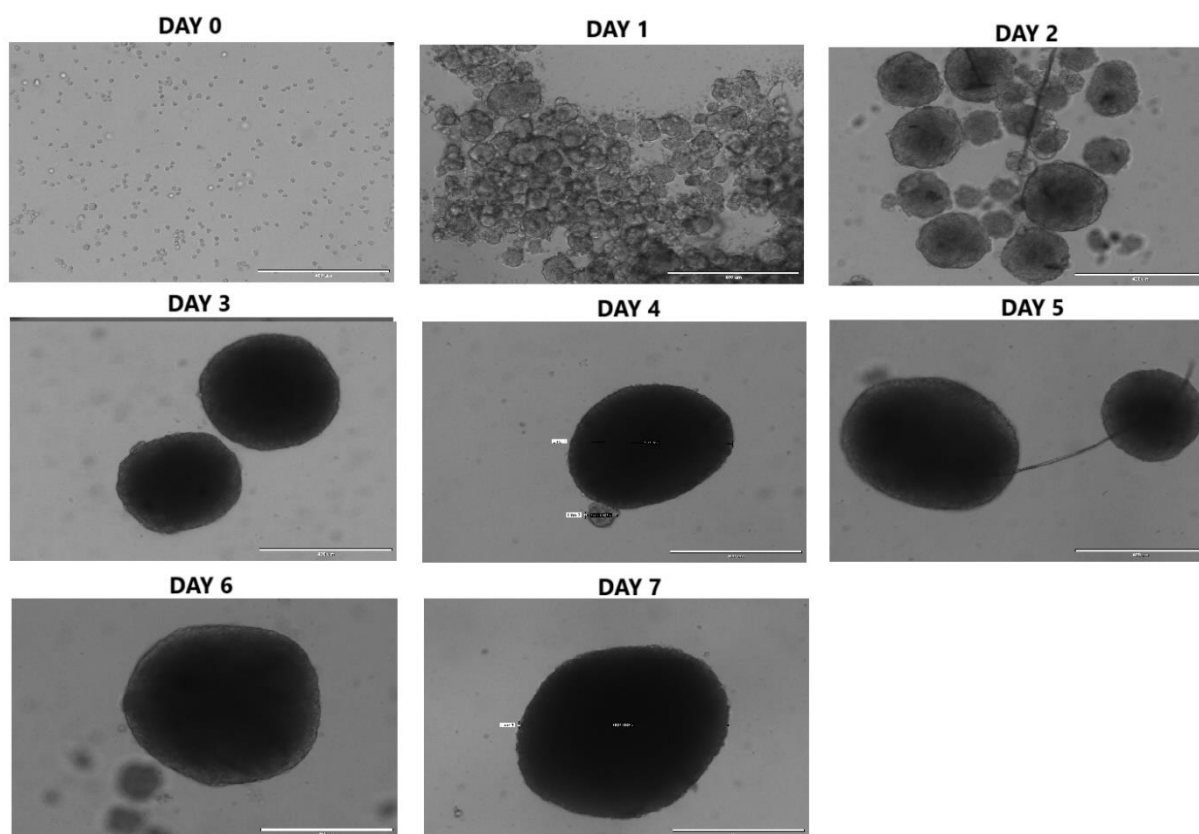


**Figura 7 - Número de neuroesferas para cada concentração e grupo de tamanho.** Considera-se a soma dos poços feitos em quintuplicatas observadas ao longo do período do ensaio (dias 2, 5 e 7), onde - azul escuro: 100-200 µm; laranja: 200-300 µm; verde escuro: neuroesferas 300-400 µm; roxo: neuroesferas 500-600 µm; verde claro: neuroesferas >600 µm. (A) 2º dia de teste. (B) 5º dia de teste. (C) 7º dia de teste.

Detalhando os dados brutos da distribuição das neuroesferas em faixas de tamanho (100-200 µm, 200-300 µm, 300-400 µm, 500-600 µm e >600 µm), em suas respectivas concentrações, para os dias 2, 5 e 7 de análise, considerando a quantidade total dos poços em quintuplicata, no segundo dia de tratamento, a maioria das neuroesferas encontrava-se nas menores faixas de diâmetro (100-200 µm e 200-300 µm), indicando um estágio inicial de agregação celular, ou seja, formação de neuroesferas. Com o avanço do tempo, observou-se um aumento na proporção de neuroesferas de tamanhos maiores, especialmente na faixa >500 µm, sugerindo crescimento contínuo e fusão de esferas menores (Figura 7). Esse efeito foi mais evidente nas concentrações mais altas de DMT testadas, nas quais a presença de neuroesferas de grande diâmetro se tornou mais expressiva a partir do dia 5 do tratamento (figura 7B). No sétimo dia (figura 7C), torna-se evidente que a concentração de 1000 µM de DMT induziu a formação de neuroesferas maiores, de tamanho >600 µm. Concentrações menores testadas, inferiores a 100 µM, também apresentam neuroesferas maiores em comparação ao controle. Resumindo, a progressão morfológica que ocorre nas células, com a tendência de se aglomerarem para formarem neuroesferas depende do fator tempo. O que acontece quando há presença de DMT em determinada concentração é o aumento do tamanho das neuroesferas formadas.

A progressão morfológica das neuroesferas ao longo dos dias de tratamento é

apresentada na Figura 8, que compila imagens capturadas a cada dia do ensaio. Essa figura mostra imagens representativas de poço tratados com a concentração de 1000  $\mu$ M (188,27 mg/L). Podemos observar a segregação inicial das células no início do ensaio, a fusão das neuroesferas já formadas e a proliferação delas nos dias seguintes. Esses dados acabam condizendo com o teste de viabilidade MTT, o qual aponta que a partir da dose de 200 mg/L, as células apresentam maior tendência de proliferação, chegando a ser 4% maior quando comparadas ao controle.



**Figura 8** - Progressão morfológica da formação de neuroesferas ao longo dos dias de tratamento, com 1000  $\mu$ M de DMT.

Inicialmente, as células apresentavam-se dispersas, organizando-se gradualmente em esferas compactas. A partir do dia 3, foi possível observar mudanças estruturais, incluindo aumento da densidade celular no interior das neuroesferas e variações na esfericidade das estruturas, aspectos que podem indicar alterações na proliferação e na viabilidade celular. Percebe-se que, com o passar dos dias, as neuroesferas vão se aglomerando cada vez mais e se desenvolvendo dessa maneira. Essa aglomeração é um comportamento natural que não depende da presença de DMT. Disso, o parâmetro passa a ser o tamanho que elas atingem, em vez da quantidade, que diminui ao longo do experimento (Figura 7 e 8).

Assim, para a primeira análise estatística dos resultados desse teste de formação de neuroesferas sobre os efeitos do DMT (0,0188 a 188 mg/L de DMT) no crescimento e viabilidade de neuroesferas, fizemos uma análise global, considerando simultaneamente a

influência de (i) o tempo de cultivo (dia: 2, 5 e 7), (ii) controles e concentração de DMT e (iii) faixa de diâmetro das neuroesferas (faixas: 100–200; 200–300; 300–400; 400–500; 500–600; >600  $\mu\text{m}$ ) sobre a proporção (%) de neuroesferas observadas em cada faixa. Todos os 5 poços foram considerados na análise. Para isso, foi utilizada uma *regressão linear múltipla com interações* (implementada no GraphPad Prism), já que o objetivo foi exploratório/descritivo, na qual (i) *Dia* foi tratada como variável contínua (com tendência temporal de crescimento); (ii) *Concentração de DMT* foi tratada como variável contínua (efeito dose); (iii) *Faixa de tamanho* foi tratada como variável categórica (classes de diâmetro). O modelo incluiu efeitos principais (Dia, DMT e Faixa) e interações de 2ª e 3ª ordem (por exemplo, Dia×Faixa e Dia×DMT×Faixa), permitindo testar se o efeito do tempo e/ou da dose varia conforme o tamanho das esferas. Os coeficientes ( $\beta$ ) são interpretados como diferenças em pontos percentuais na proporção de neuroesferas, em relação a um nível de referência (Dia 1, concentração 0 e faixa 100–200  $\mu\text{m}$ ). Assim, coeficientes negativos para “Dia” nas faixas pequenas indicam queda de esferas pequenas ao longo do cultivo, enquanto as interações positivas “Dia×Faixa” nas faixas grandes indicam aumento de esferas maiores ao longo do cultivo, ou seja, maturação.

A Tabela 2 apresenta um resumo estatístico do modelo global empregado, no qual, na análise global (Dia × Concentração × Faixa de Tamanho), o modelo geral de regressão indicou um forte efeito do tempo de cultivo sobre a distribuição do número de neuroesferas formadas ( $\beta = -12,03$ ;  $p < 0,0001$ ), com redução progressiva das esferas pequenas e aumento nas faixas maiores. Todas as interações entre Dia × Faixa foram altamente significativas ( $p < 0,0001$ ), confirmando que o crescimento das esferas depende do tempo.

O DMT isoladamente não alterou a média global ( $p = 0,79$ ), mas mostrou interações significativas com o tempo nas faixas 400–600  $\mu\text{m}$  ( $p = 0,0126$  e  $p = 0,0014$ ) e tendência positiva em >600  $\mu\text{m}$  ( $p = 0,0758$ ).

#### **Resumo estatístico do modelo global (Dia × Concentração × Faixa de Tamanho).**

| Variável / Interação              | B       | 95 % IC        | p       | Interpretação           |
|-----------------------------------|---------|----------------|---------|-------------------------|
| Dia                               | -12,03  | -14,16 a -9,90 | <0,0001 | efeito temporal forte   |
| Concentração (DMT)                | -0,0038 | -0,032 a 0,025 | 0,79    | sem efeito isolado      |
| Dia × Faixa 400–500 $\mu\text{m}$ | —       | —              | 0,0126  | interação significativa |
| Dia × Faixa 500–600 $\mu\text{m}$ | —       | —              | 0,0014  | interação significativa |
| Dia × Faixa >600 $\mu\text{m}$    | —       | —              | 0,0758  | tendência positiva      |

**Tabela 2** – Resumo estatístico do modelo global (Dia × Concentração × Faixa de Tamanho).

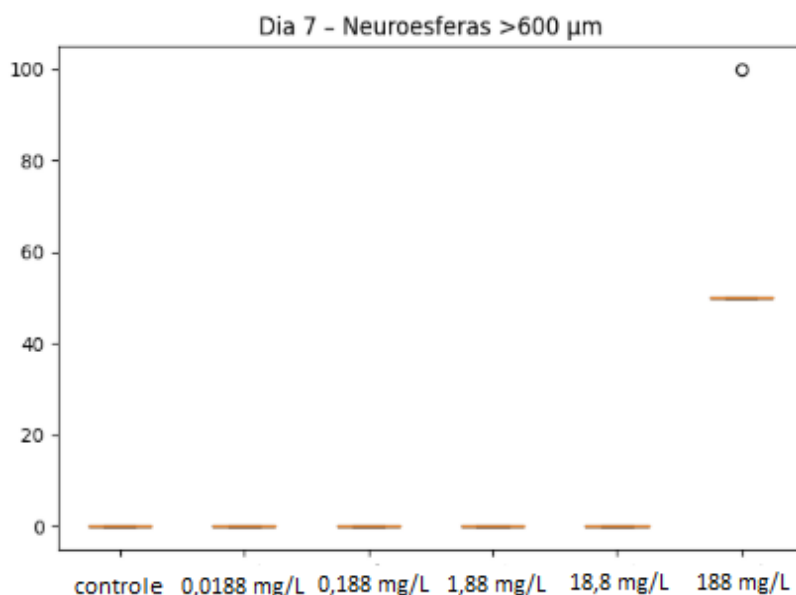
Esses achados indicam, mais uma vez, que, embora o desenvolvimento das neuroesferas seja um processo natural do cultivo, em que o tempo dirige o crescimento global, o DMT acelera

a transição para esferas maiores, ajustando a distribuição, reduzindo a retenção nas faixas médias e favorecendo o acúmulo em  $>600\ \mu\text{m}$ , o que indica modulação trófica do crescimento neuronal. Em suma, o tempo é o principal determinante, mas o DMT influencia o padrão de maturação, aumentando a proporção de neuroesferas grandes ao longo dos dias.

Após a análise estatística global dos dados, verificou-se que a distribuição do tamanho das neuroesferas apresentava assimetria acentuada, presença de valores nulos em múltiplos grupos e concentração do efeito biológico em classes específicas de maior diâmetro, especialmente no 7º dia de cultivo. Essas características limitaram a aplicação exclusiva de testes paramétricos para determinados desfechos, uma vez que a agregação de classes implicaria perda de informação biológica relevante. Diante disso, optou-se por realizar análise não paramétrica confirmatória focada no 7º dia de cultivo, quando o efeito trófico do DMT se mostrou mais pronunciado, avaliando-se especificamente a proporção de neuroesferas com diâmetro superior a  $600\ \mu\text{m}$ .

Os resultados demonstraram ausência completa de neuroesferas  $>600\ \mu\text{m}$  nos grupos controle e nas concentrações de 0,0188 mg/L; 0,188 mg/L; 1,88 mg/L e 18,8 mg/L de DMT. Em contraste, o tratamento com 188 mg/L promoveu aumento expressivo dessa classe de tamanho, com valores variando entre 50% e 100% por poço experimental (Figura 9). A análise estatística por teste de Kruskal–Wallis revelou diferença altamente significativa entre os grupos (Kruskal–Wallis = 28,85;  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Dunn, com correção para múltiplas comparações pelo método de Benjamini, Krieger e Yekutieli ( $Q = 0,05$ ), indicou que essa diferença foi atribuída exclusivamente ao grupo tratado com 188 mg/L de DMT em comparação ao controle.

Esses resultados evidenciam um deslocamento acentuado da distribuição do tamanho das neuroesferas apenas na maior concentração testada, indicando que o efeito trófico do DMT no 7º dia de cultivo é fortemente dependente da concentração e se manifesta de forma seletiva na formação de neuroesferas de grande diâmetro, compatíveis com agregados neurais mais organizados e metabolicamente ativos.

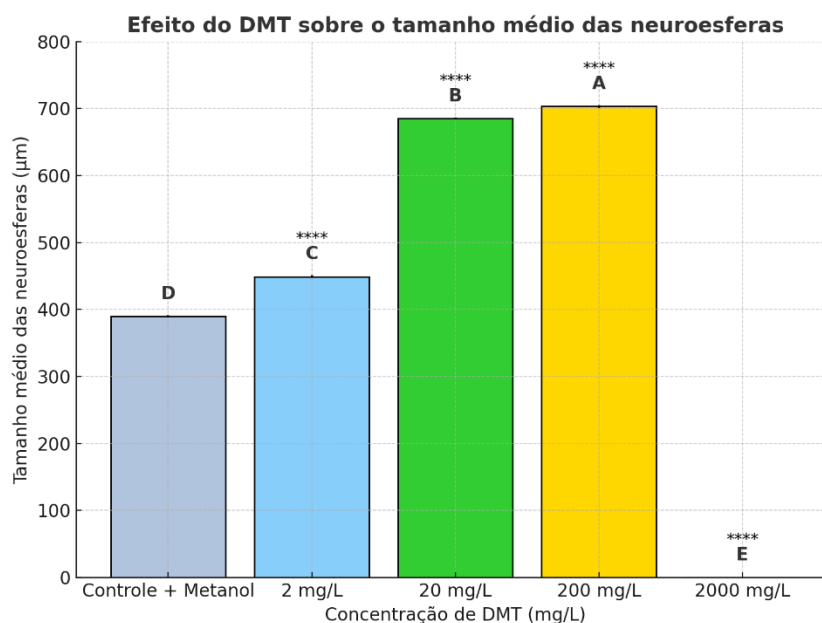


**Figura 9- Proporção de neuroesferas com diâmetro superior a 600 µm no 7º dia de cultivo em função das concentrações de DMT.** Cada ponto representa um poço experimental (n = 5). Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada por teste de Kruskal–Wallis seguido do pós-teste de Dunn, com correção para múltiplas comparações pelo método de Benjamini, Krieger e Yekutieli. \*\*\*\*p < 0,0001 em relação ao controle (com metanol).

Em seguida, outros testes de neuroesferas foram realizados para complementar e confirmar os achados obtidos na análise global e na avaliação do sétimo dia. Foi conduzido um experimento abrangendo uma faixa ampliada de concentrações de DMT (de 2 a 2000 mg/L). Essa etapa teve como objetivo verificar se o padrão observado anteriormente, de estímulo ao crescimento e à maturação das neuroesferas em doses intermediárias, se manteria quando o DMT fosse testado em doses mais elevadas, permitindo, assim, a identificação mais precisa da concentração ótima e do limite entre efeito trófico e efeito tóxico.

Dessa forma, enquanto o primeiro ensaio (0,018–188 mg/L) evidenciou o papel modulador do DMT sobre o tamanho e maturação das neuroesferas, o segundo experimento amplia a análise, relacionando doses em escala mg/L com parâmetros funcionais previamente observados no teste de viabilidade (MTT). Esse experimento foi feito em duplicata, com controle + metanol; 2 mg/L; 20 mg/L; 200 mg/L; 2000 mg/L de DMT, acrescentando fatores de crescimento (egf e bfgf) em dobro (80 ng/mL) em todos os 5 dias de teste. Os resultados foram analisados no último dia do teste (dia 5).

Analisando por um caráter exploratório pela variância de uma via (One-way ANOVA) revelou diferenças altamente significativas entre os grupos tratados com diferentes concentrações de DMT e o grupo controle com metanol (p < 0,0001) (Figura 10).



**Figura 10-** Efeito do DMT sobre o tamanho médio das neuroesferas. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 2$ ). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (como análise exploratória, One-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ; pós-teste de Tukey). \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Letras diferentes (A–E) acima das barras indicam grupos estatisticamente distintos entre si, conforme o agrupamento de letras compactas do teste de Tukey. Barras que compartilham letras iguais não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

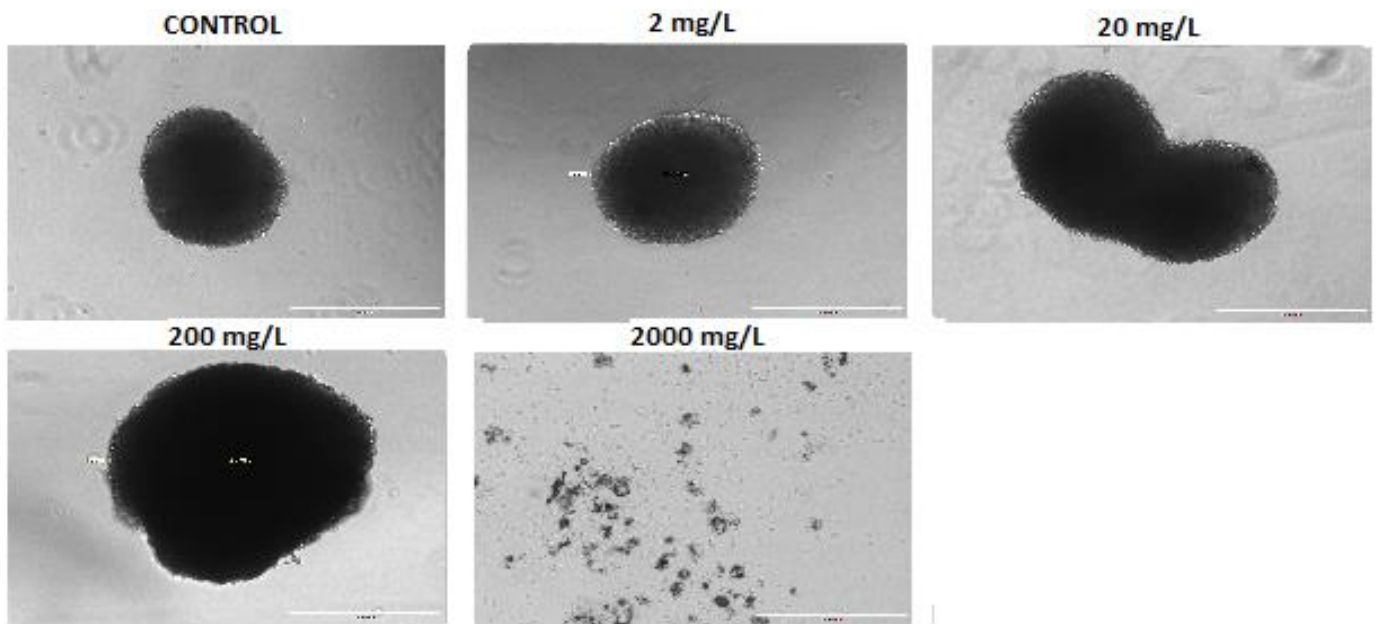
O pós-teste de Tukey confirmou que todas as comparações entre as concentrações foram estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ), indicando um efeito dose-dependente do DMT sobre o crescimento e a organização das neuroesferas.

A Figura 11 mostra o tamanho de cada concentração no último dia do teste (dia 5). No grupo controle, as neuroesferas apresentaram diâmetro médio de 389,7  $\mu\text{m}$ , enquanto, na menor concentração (2 mg/L), apresentaram um discreto aumento (449,2  $\mu\text{m}$ ) porém significativamente diferente do controle ( $p < 0,0001$ ). Concentrações intermediárias de 20 mg/L e 200 mg/L de DMT promoveram aumentos notáveis no tamanho médio das neuroesferas (685,1  $\mu\text{m}$  e 703,1  $\mu\text{m}$ , respectivamente), indicando um efeito trófico dose-dependente pronunciado do DMT. A diferença entre 20 mg/L e 200 mg/L também foi significativa ( $p = 0,0008$ ), sugerindo um potencial máximo de estímulo próximo de 200 mg/L. Em contraste, a concentração mais alta testada (2000 mg/L) resultou na completa dissipação das estruturas (0  $\mu\text{m}$ ) corroborando os resultados prévios do ensaio de MTT, no qual concentrações acima de 800 mg/L reduziram a viabilidade celular para 72% em 48 h e para 30% em 72 h. O agrupamento de letras compactas (A–E) obtido no teste de Tukey confirma a distinção estatística entre todos os tratamentos, sendo a dose de 200 mg/L classificada isoladamente no grupo “A”, como a de maior efeito positivo, seguida por 20 mg/L (“B”), 2 mg/L (“C”), controle (“D”) e 2000 mg/L (“E”) (Figura 10).

Esses resultados indicam que o DMT exerce efeito estimulador da neuroesfera em concentrações intermediárias (20–200 mg/L), promovendo aumento significativo do tamanho e da agregação celular, o que sugere um efeito neurotrófico. Em concentrações elevadas ( $\geq 800$  mg/L), o efeito torna-se tóxico, levando à morte celular e à perda de integridade morfológica das



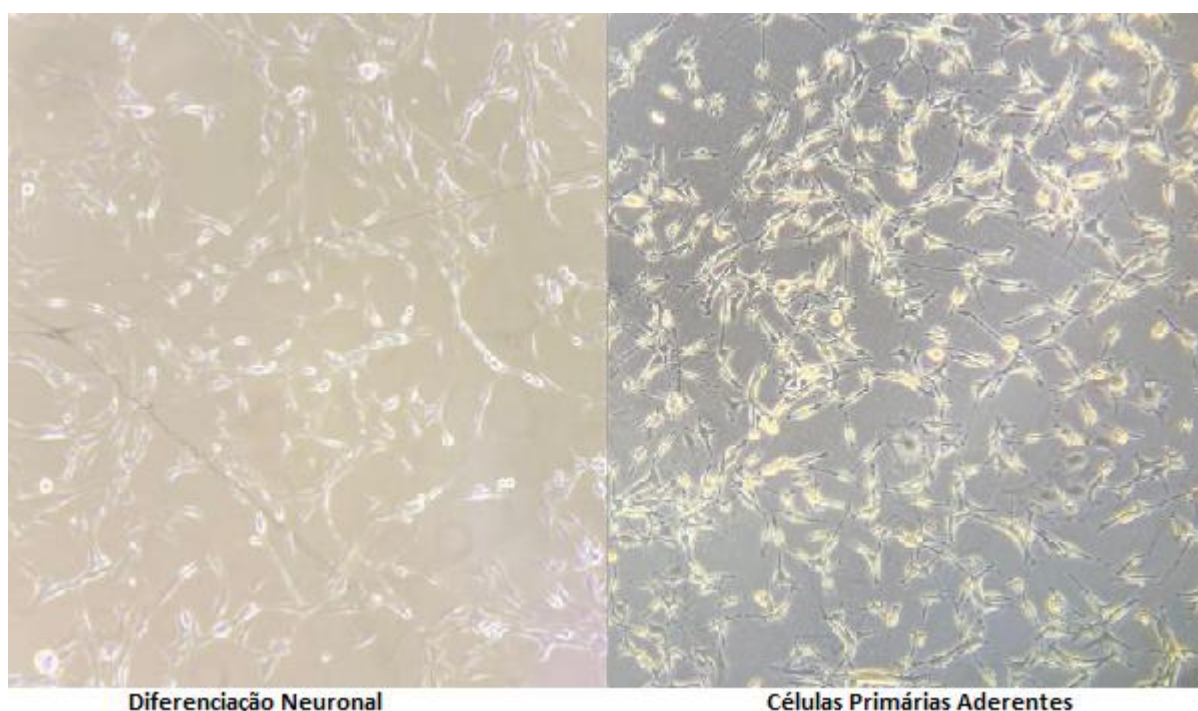
esferas.



**Figura 11-** Efeito do DMT sobre o tamanho e a morfologia das neuroesferas no 5º dia de cultivo, evidenciando aumento significativo em doses intermediárias e colapso estrutural em concentrações elevadas.

### Diferenciação Neuronal

Para testar se o tipo de célula primária que isolamos realmente possuía linhagem progenitora neuronal, induzimos a diferenciação neuronal com o meio de diferenciação (Figura 4A), para poder testar se o tipo de célula que estávamos cultivando realmente possuía linhagem progenitora neuronal, induzimos a diferenciação neuronal com o meio de diferenciação (figura 4A), composto por DMEM/F-12, soro fetal bovino (1% (vol/vol)), AntiAnti (100X), Glutamax (100X), NGF (40ng/mL), BDNF (40ng/mL) e NT-3 (40ng/mL). O teste foi realizado em duplicata, com o controle negativo e dois poços de diferenciação. A placa de 48 poços foi previamente revestida com Geltrex (150 uL em cada poço) e incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Foi realizada troca de meio a cada 3 dias durante 2 semanas.



**Figura 12** – Microscopia das células em Diferenciação Neuronal com 7 dias de tratamento e no cultivo de Células Primárias Aderentes.

Na Figura 12, observa-se, após sete dias uma mudança na morfologia das células induzidas à diferenciação em relação ao controle não induzido. As células induzidas apresentaram prolongamentos mais finos e longos, conforme o esperado. Uma vez estabelecido esse protocolo em nosso laboratório, testaremos futuramente o efeito do DMT neste processo.

### **Imunohistoquímica**

Para as neuroesferas tratadas com DMT, a técnica de imunofluorescência indireta foi empregada para avaliar a expressão de proteínas associadas à progenitores neurais em neuroesferas submetidas a diferentes concentrações de DMT. As amostras foram analisadas em um microscópio confocal de varredura a laser, o que possibilitou a obtenção de imagens de alta resolução e seccionamento óptico, eliminando interferências do plano fora de foco e permitindo observar a distribuição espacial dos marcadores ao longo da espessura das neuroesferas.

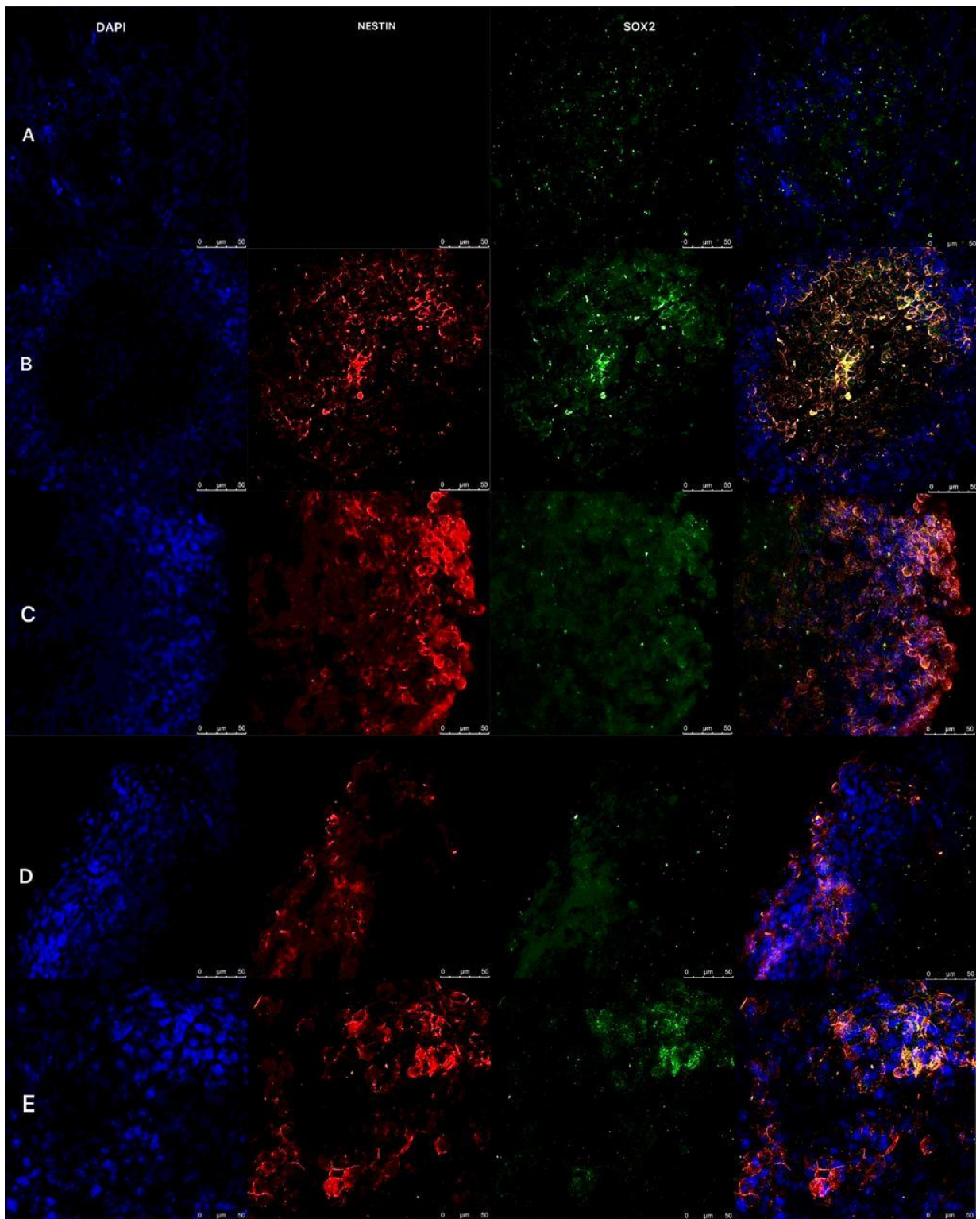
Foram utilizados anticorpos contra os marcadores de progenitores neurais Nestina e SOX2 e o corante DAPI. O DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é um corante fluorescente que se liga ao DNA, emitindo fluorescência azul sob excitação ultravioleta, sendo empregado para marcar os núcleos e indicar a densidade e a integridade celular. Na figura 13, é possível ver a marcação para a presença de Nestina, detectada com anticorpo primário anti-Nestin (Invitrogen) e anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (emissão vermelha), que é uma proteína do citoesqueleto intermediário expressa principalmente em células-tronco e progenitoras neurais, atuando como marcador de neurogênese e proliferação celular. O SOX2,

revelado com anticorpo primário anti-SOX2 e secundário conjugado ao Alexa Fluor 555 (emissão verde), é um fator de transcrição nuclear essencial para a manutenção da pluripotência e autorrenovação de células-tronco neurais. A sobreposição dos canais de fluorescência (merge) permitiu avaliar a colocalização entre Nestin e SOX2, identificada pelas áreas amareladas nas imagens compostas.

Interpretando a figura 13, o painel A representa o controle negativo (sem anticorpo primário), utilizado para testar a especificidade da reação. Observa-se apenas a coloração azul do DAPI, sem sinal fluorescente nos canais vermelho ou verde, confirmando a ausência de ligação inespecífica dos anticorpos secundários e garantindo a confiabilidade dos resultados nas demais condições. No painel B da Figura 13, correspondente ao grupo controle (sem DMT), as neuroesferas apresentaram morfologia esférica regular e compacta, com diâmetro médio de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ . As marcações de Nestin e SOX2 foram moderadas e homogêneas, concentradas nas regiões centrais e com sobreposição amarelada, característica de células progenitoras neurais em equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação inicial. Esse padrão de marcação reflete a preservação do fenótipo progenitor em condições normais de cultivo. No grupo tratado com 2 mg/L de DMT (painel C), verificou-se um aumento discreto no tamanho das neuroesferas, associado a uma intensificação da fluorescência de Nestin e SOX2, principalmente nas regiões periféricas. A colocalização evidente entre ambos os marcadores sugere expansão das células progenitoras e manutenção do fenótipo imaturo, indicando um efeito trófico do DMT em baixa concentração. Esse padrão sugere que o DMT pode estimular a autorrenovação neural e a proliferação sem induzir diferenciação, possivelmente por mecanismos mediados pela ativação do receptor Sigma-1 e de vias serotoninérgicas intracelulares.

Nas amostras tratadas com 20 mg/L de DMT (painel D), observou-se um aumento acentuado no volume das neuroesferas e expressão aparentemente mais intensa de Nestina, com distribuição mais difusa e heterogênea em relação ao controle. A marcação de SOX2 manteve-se presente, porém com variação de intensidade entre regiões distintas. Esse padrão sugere que parte das células permanece em estado progenitor.

No grupo tratado com 200 mg/L de DMT (painel E), as neuroesferas apresentaram dimensões próximas de 700  $\mu\text{m}$ , visíveis a olho nu, o que dificultou a focalização total das esferas no campo óptico do confocal. Apesar da menor nitidez devido ao aumento do tamanho, observou-se forte marcação para Nestin e SOX2, com padrão mais irregular. A manutenção da expressão de SOX2, mesmo sob tais condições, sugere que o DMT, em altas concentrações, estimula proliferação intensa e reorganização estrutural sem perda completa do fenótipo progenitor.



**Figura 13. Imunofluorescência de neuroesferas tratadas com DMT.**

Marcação nuclear com DAPI (azul), expressão de Nestin (vermelho) e SOX2 (verde). (A) Controle negativo (sem anticorpo primário); (B) Controle (sem DMT); (C) 2 mg/L de DMT; (D) 20 mg/L de DMT; (E) 200 mg/L de DMT.

Observa-se aumento progressivo na expressão de Nestin e SOX2 nas condições tratadas, com colocalização (em amarelo) indicando a manutenção do fenótipo neural progenitor. As neuroesferas tratadas com maiores concentrações apresentaram diâmetro expandido e



organização heterogênea, compatíveis com o efeito trófico dose-dependente do DMT.

De forma geral, os resultados obtidos por imunofluorescência confocal demonstram que o DMT modulou, de forma dose-dependente, a morfologia, mantendo a expressão dos marcadores Nestin e SOX2. As baixas concentrações (2 mg/L) promoveram efeitos tróficos evidentes, com aumento da colocalização dos marcadores e manutenção do estado progenitor, enquanto as doses intermediárias e altas (20–200 mg/L) levaram a uma expansão significativa do diâmetro das neuroesferas, acompanhada de heterogeneidade na distribuição das proteínas e sinais de desorganização estrutural.

## Discussão

### Análise comparativa entre resultados dos testes MTT e formação de neuroesferas

O valor correspondente à dose de 2000 mg/L foi considerado zero no teste de formação de neuroesferas, uma vez que, no ensaio de MTT, observou-se que 800 mg/L reduziu a viabilidade celular para 72% em 48 horas e para 30% em 72 horas, indicando um efeito citotóxico progressivo. No teste de neuroesferas, essa concentração mais alta resultou na dissipação completa das estruturas celulares, o que evidencia apoptose e perda da integridade morfológica.

Ao relacionar os dois testes, verifica-se que a concentração de 200 mg/L apresenta resultados consistentes e favoráveis em ambos. No ensaio de neuroesferas, essa dose promoveu um aumento expressivo no tamanho médio das estruturas, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e às concentrações menores ( $p < 0,0001$ ). No teste de MTT, a mesma faixa de concentração, aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  ( $\sim 200$  mg/L), apresentou aumento de 4% na viabilidade celular em 72 horas quando comparada ao controle, reforçando o efeito trófico e proliferativo do DMT em doses intermediárias.

A análise estatística (ANOVA,  $p < 0,0001$ ) seguida do teste de Tukey confirmou diferenças significativas entre todas as concentrações avaliadas, com destaque para o grupo tratado com 200 mg/L, que apresentou o maior tamanho médio das neuroesferas (703,1  $\mu\text{m}$ ). O agrupamento de letras compactas (A–E) demonstrou que essa concentração pertence isoladamente ao grupo “A”, representando o ponto máximo de crescimento, seguida por 20 mg/L (B), 2 mg/L (C), controle (D) e 2000 mg/L (E).

Em termos morfológicos, observou-se que doses mais elevadas de DMT provocaram maior aglomeração e fusão celular, enquanto concentrações mais baixas resultaram em neuroesferas menores e menos compactas, caracterizando um padrão dose-dependente. Assim,

os resultados indicam que o DMT exerce efeito trófico em concentrações intermediárias (~200 mg/L) e efeito tóxico em doses elevadas, reproduzindo de forma coerente o comportamento observado no teste de MTT.

### **Análise Geral**

Os resultados deste estudo demonstram a tendência que o DMT (N,N-dimetiltriptamina) exerce efeitos dose-dependentes sobre a viabilidade e a morfologia de células progenitoras neurais, promovendo ativação trófica e aumento da autorrenovação em concentrações intermediárias, enquanto concentrações mais elevadas resultam em redução da viabilidade e morte celular.

A faixa de concentrações de DMT utilizada neste estudo (0,1–1000  $\mu$ M; ~0,02–188 mg/L) foi definida a partir da integração entre os resultados experimentais obtidos e dados da literatura. Estudos *in vivo* em ratos demonstram que, após administração subcutânea de DMT associada à harmina, as concentrações cerebrais detectadas variam entre 7,8 e 11,3  $\mu$ M no córtex frontal e cerebelo, valores significativamente inferiores aos empregados em modelos *in vitro* (Egger et al., 2023). Essa diferença é esperada, considerando a rápida metabolização do DMT e a influência de fatores farmacocinéticos *in vivo*, ausentes em sistemas celulares.

Além disso, a literatura descreve ampla variabilidade de doses eficazes conforme a via de administração, variando de 0,75 mg/kg (IV) a 128 mg/kg (IP) (Glynos et al., 2024), bem como a ausência de ocupação significativa de receptores 5-HT<sub>2A</sub> mesmo em concentrações cerebrais próximas a 11  $\mu$ M (Egger et al., 2023). Assim, a adoção de uma faixa ampla de doses permitiu identificar concentrações com efeito trófico e limiar de toxicidade, garantindo respostas celulares detectáveis e biologicamente interpretáveis em sistemas *in vitro*.

No ensaio de MTT, utilizado para avaliar a viabilidade metabólica e a atividade mitocondrial das células, observou-se que a concentração de 800 mg/L de DMT reduziu a viabilidade para aproximadamente 72% em 48 horas e 30% em 72 horas, indicando citotoxicidade significativa em altas doses e tempos de exposição prolongados.

Esses dados coletados são coerentes com o comportamento observado no ensaio de formação de neuroesferas, no qual o DMT promoveu crescimento e organização celular dependentes da dose, reforçando a relação entre proliferação e sobrevivência metabólica. Nas doses mais baixas (2 mg/L e 20 mg/L), as neuroesferas apresentaram aumento gradual de diâmetro, maior coesão celular e coloração homogênea, sugerindo um alta da atividade proliferativa. Já nas concentrações mais altas (200 mg/L), as neuroesferas atingiram diâmetro médio de aproximadamente 700  $\mu$ m bordas mais irregulares, tornando-se visíveis a olho nu, o que reflete proliferação acentuada e expansão celular tridimensional.

A correlação entre os dois testes demonstra coerência biológica: as doses que promoveram aumento de proliferação e viabilidade no MTT (cerca de 200 mg/L) foram as mesmas que induziram expansão significativa das neuroesferas, indicando um pico ótimo de efeito trófico nessa faixa de concentração. Acima desse ponto, o DMT passa a exercer efeitos citotóxicos cumulativos, possivelmente por disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, mecanismos já descritos na literatura em contextos de hiperestimulação serotoninérgica e ativação prolongada de receptores intracelulares (Oliveira-Lima et al., 2021).

O ensaio de imunofluorescência confocal complementa e reforça essas observações, permitindo visualizar diretamente a expressão dos marcadores Nestin e SOX2, associados à autorrenovação e imaturidade neural. Nestin tem localização principalmente na membrana celular e no citoplasma e padrões de marcação “denso e pontilhado” (Zhang et al., 2008). SOX2 marca “células neurais indiferenciadas, progenitores neurais”, onde sua expressão está “ligada a propriedades de stemness, incluindo multipotência, proliferação e resistência à diferenciação” (Annovazzi et al., 2011; Zhang et al., 2008; Phi et al., 2008).

As análises revelaram que as neuroesferas tratadas com DMT apresentaram expressão desses marcadores em todas as concentrações testadas (2, 20 e 200 mg/L).

A colocalização amarelada indica células progenitoras ativamente proliferativas, confirmando que o DMT, em concentrações controladas, estimula a expansão de células-tronco neurais sem induzir diferenciação precoce. Esse comportamento foi mais evidente na dose de 200 mg/L, que apresentou neuroesferas de maior diâmetro e expressão robusta de Nestin e SOX2, o que condiz com o aumento de viabilidade observado no MTT (31% superior ao controle após 72 horas).

O efeito observado é compatível com relatos de que o DMT atua como agonista de receptores serotoninérgicos (particularmente 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>1A</sub>) e como ligante do receptor Sigma-1 ( $\sigma_1R$ ), ambos expressos em tecidos neurais e em células progenitoras (CARHART-HARRIS et al., 2014). O receptor Sigma-1, em especial, é uma chaperona mitocondrial e reticular envolvida na regulação da homeostase de cálcio, estresse oxidativo, sobrevivência celular e plasticidade sináptica (MORRIS; BRUTON, 2014).

Estudos recentes demonstram que a ativação do  $\sigma_1R$  pode estimular a neurogênese, aumentar a expressão de fatores neurotróficos como BDNF e NGF, e proteger células nervosas contra apoptose induzida por estresse (Fontanilla et al., 2009; Dakic et al., 2017). Assim, os resultados aqui obtidos reforçam a hipótese de que o DMT atua como modulador trófico endógeno, capaz de promover sobrevivência e a proliferação neural em concentrações fisiológicas, mas que, em excesso, desencadeia respostas citotóxicas e apoptóticas.

A análise confocal revelou ainda que o padrão de fluorescência das amostras tratadas

com DMT se manteve sem marcações inespecíficas (controle negativo sem anticorpo primário), o que confirma a especificidade dos anticorpos utilizados e a fidedignidade dos dados obtidos.

A heterogeneidade observada nas maiores concentrações (20 e 200 mg/L) pode refletir processos de diferenciação parcial e alterações na densidade celular, fenômenos esperados em culturas tridimensionais submetidas a intensa proliferação.

Portanto, considerando em conjunto os resultados de viabilidade (MTT), crescimento morfológico (neuroesferas) e expressão de marcadores progenitores (imunofluorescência confocal), conclui-se que o DMT exerce efeito trófico significativo sobre células progenitoras neurais, promovendo aumento de viabilidade, expansão esferoidal e manutenção da expressão de Nestina e SOX2 em doses intermediárias (até 200 mg/L).

Concentrações superiores, contudo, ultrapassam o limiar fisiológico de estímulo e induzem mecanismos de apoptose e perda de integridade celular, de modo condizente com os dados quantitativos de MTT e qualitativos de morfologia celular.

Esses resultados corroboram a hipótese de que o DMT, além de seu efeito psicodélico clássico, pode atuar como molécula endógena de regulação neural, com potencial neuroprotetor e regenerativo em contextos específicos. A convergência entre os três ensaios realizados (MTT, neuroesferas e imunofluorescência), fornece a tendência do papel do DMT como agente modulador da plasticidade neural em condições controladas de exposição.

Além disso, para informação complementar, foram realizados 2 testes de controle positivo, testando o efeito da bufotenina concomitante aos testes de neuroesfera de DMT. A bufotenina (5-HO-DMT) é uma triptamina endógena relacionada ao DMT, porém com maior polaridade devido ao grupo hidroxila, o que altera sua permeabilidade e seu efeito farmacológico. Ela age principalmente em receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>/5-HT<sub>2C</sub> e é frequentemente usada como molécula comparativa em estudos celulares devido à sua similaridade estrutural com o DMT e à diferença marcante em estabilidade, toxicidade e comportamento celular (Ott, 2001; Shimma et al., 2020). Neste ensaio, verificou-se que a bufotenina, embora seja estruturalmente semelhante ao DMT, apresentou comportamento distinto nos testes realizados em paralelo. Apesar de tolerar cerca de 1.000 µM, concentrações acima de 300 mg/L induziram a dissociação das neuroesferas, enquanto o DMT manteve as estruturas coesas e metabolicamente ativas sob as mesmas condições. Essa diferença pode estar ligada ao grupo hidroxila presente na bufotenina, que a torna mais polar e menos capaz de atravessar as membranas celulares. Além disso, essa modificação química torna a bufotenina mais suscetível à oxidação, o que pode causar leve estresse celular e contribuir para as células se desagregarem (Shimma et al., 2020). O DMT demonstrou maior compatibilidade com o sistema neuronal, mantendo as estruturas estáveis e ativas por mais tempo. Essa diferença reforça



a relevância do DMT como modulador mais equilibrado e funcional do ambiente neural, evidenciando seu potencial biológico superior entre as duas triptaminas testadas.

Esses dados são compatíveis com estudos em ratos que demonstram aumento de neurogênese e plasticidade induzidos pelo DMT, especialmente no hipocampo (DA CRUZ et al., 2024), porém o presente trabalho avança além desses modelos, ao demonstrar esses efeitos em células de primatas não humanos, um sistema biologicamente mais próximo do cérebro humano e, portanto, de maior relevância translacional.

## Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a tendência do DMT em efeitos moduladores sobre células neurais de PNH, com respostas diretamente dependentes da dose e do tempo de exposição. Essa relação temporal foi um dos achados mais expressivos: enquanto, em 24 horas, o ensaio de MTT não revelou alterações significativas na viabilidade celular, a extensão do período experimental para 48 e, sobretudo, 72 horas foi determinante para que os efeitos tróficos do DMT se tornassem evidentes.

A queda acentuada observada em 800 mg/L, que reduziu a viabilidade para aproximadamente 30–32% em 72 horas, valor inferior a 50%, define o entorno da  $DL_{50}$  (dose letal mediana) para esse modelo experimental, com células progenitoras neuronais de primatas adultos não humanos. Essa concentração representa o ponto em que o DMT perde seu efeito trófico e passa a exercer toxicidade celular significativa, possivelmente por colapso mitocondrial e estresse oxidativo. Assim, o perfil dose–resposta obtido sugere um padrão bifásico (hormético), em que baixas ou medianas doses são benéficas e doses elevadas tornam-se prejudiciais.

A analogia entre os resultados mostra que todos os testes se comportaram de maneira coerente e complementar: (i) o MTT revelou o aumento metabólico e de viabilidade celular em doses intermediárias; (ii) o ensaio de neuroesferas demonstrou crescimento e organização celular aumentados nas mesmas concentrações; (iii) e ambos mostraram toxicidade progressiva apenas em doses mais altas, especialmente 800 mg/L, consolidando um padrão biológico convergente.

Esses resultados encontrados em conjunto permitem concluir que o DMT apresenta ação trófica robusta em baixas e medianas doses e toxicidade apenas em concentrações elevadas, definindo uma janela terapêutica biologicamente favorável. O fato de o aumento de viabilidade só se manifestar plenamente após 72 horas reforça que o tempo de exposição é crucial para que seus efeitos moduladores se consolidem

De modo geral, os resultados aqui apresentados sustentam fortemente a hipótese de que o DMT estimula processos associados à neurogênese adulta, atuando tanto no metabolismo quanto na organização celular. O conjunto de dados obtidos reforça a relevância do DMT como molécula endógena com potencial neuroprotetor e regenerativo.

Essas descobertas não apenas abrem novas perspectivas para o estudo da plasticidade neural mediada por psicodélicos, mas também incentivam investigações clínicas futuras, com o objetivo de compreender como o DMT pode ser utilizado de forma segura e controlada para estimular regeneração neuronal e restaurar circuitos afetados em doenças neurodegenerativas.

## Referências

ANTUNES, N. M.; PALMA, A. G. L.; DALARMI, L. Ayahuasca no tratamento de depressão resistente. **Visão Acadêmica**, [S.l.], v. 24, n. 4, 2023. Disponível em:

<https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/93207>. Acesso em: 19 abr. 2025.

ANNOVAZZI, L.; MELLAI, M.; CALDERA, V.; VALENTE, G.; SCHIFFER, D. **SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines.** *Cancer Genomics & Proteomics*, v. 8, n. 3, p. 139–148, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21518820/>. Acesso em: 14 out. 2025.

APPLE, D. M.; FONSECA, R. S.; KOKOVAY, E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders. **Brain Research**, [s. l.], v. 1655, p. 270–276, 2017. Disponível em: Acesso em: 15 de abr. 2022.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 351–354, 2000. Disponível em: Acesso em: 16 de abr. 2022.

BOND, A. M.; MING, G. L.; SONG, H. Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 17, p. 385–395, 2015.

BREMNER, J. D.; RANDALL, P.; SCOTT, T. M.; BRONEN, R. A.; SEIBYL, J. P.; SOUTHWICK, S. M.; DELANEY, R. C.; MC CARTHY, G.; CHARNEY, D. S.; INNIS, R. B. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 7, p. 973–981, 1995.

CARHART-HARRIS, R. L. *et al.*

The entropic brain: a theory of conscious states informed by neuroimaging research with psychedelic drugs. *Frontiers in Human Neuroscience*, v. 8, p. 1–20, 2014.

CARHART-HARRIS, R. L. et al. Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. **The lancet. Psychiatry**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 619–627, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27210031/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.

COLOSIMO, F. A. et al. The clinical potential of dimethyltryptamine: breakthroughs into the other side of mental illness, neurodegeneration, and consciousness. **Psychoactives**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 93–122, 26 fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/psychoactives3010007>. Acesso em: 19 abr. 2025.

COZZI, N. V. , M. T. A. , T. M. A. , & R. A. E. Indolethylamine N-methyltransferase expression in primate nervous tissue. **In Society for Neuroscience Abstracts**, [s. l.], v. 37, n. 840, p. 19, 2011.

COZZI, N. v. et al. Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 116, n. 12, p. 1591–1599, 2009.

CRUZ, R. V. L. et al. A single dose of 5-MeO-DMT stimulates cell proliferation, neuronal survivability, morphological and functional changes in adult mice ventral dentate gyrus.

**Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S.l.], v. 11, 03 set. 2018. Seção: Neuroplasticity and Development. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00312>. Acesso em: 19 abr. 2025.

DA CRUZ, R. V.; LEÃO, R. N.; MOULIN, T. C. Effects of psychedelics on neurogenesis and broader neuroplasticity: a systematic review. **Molecular Medicine**, v. 30, art. n. 244, 2024.

DORE, J. et al. Ketamine Assisted Psychotherapy (KAP): Patient Demographics, Clinical Data and Outcomes in Three Large Practices Administering Ketamine with Psychotherapy. **Journal of Psychoactive Drugs**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 189–198, 2019. Disponível em: Acesso em: 16 de abr. 2022.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–397, 1999.

DUMAN, R. S.; AGHAJANIAN, G. K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. **Science**, v. 338, n. 6103, p. 68–72, 2012.

DUQUE, A.; SPECTOR, R. A balanced evaluation of the evidence for adult neurogenesis in humans: implication for neuropsychiatric disorders. **Brain structure & function**, [s. l.], v. 224, n. 7, p. 2281–2295, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31278571/>. Acesso em: 15 de abr. 2022.

EGGER, K.; GUDMUNDSEN, F.; JESSEN, N. S.; BAUN, C.; POETZSCH, S. N.; SHALGUNOV, V.; HERTH, M. M.; QUEDNOW, B. B.; MARTIN-SOELCH, C.; DORNBIEER, D.; SCHEIDEGGER, M.; CUMMING, P.; PALNER, M. *A pilot study of cerebral metabolism and serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor occupancy in rats treated with the psychedelic tryptamine DMT in conjunction with the MAO inhibitor harmine*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, art. 1140656, 28 set. 2023. DOI: [10.3389/fphar.2023.1140656](https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1140656).

ERIKSSON, P. S. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature**, [s. l.], v. 4, p. 131–134, 1998.

FEDER, A. et al. A Randomized Controlled Trial of Repeated Ketamine Administration for Chronic Posttraumatic Stress Disorder. **The American journal of psychiatry**, [s. l.], v. 178, n. 2, p. 193–202, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33397139/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.

FONTANILLA, D. et al. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 323, n. 5916, p. 934–937, 2009a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19213917/>. Acesso em: 14 de abr. 2022.

FONTES, F. P. X. *Os efeitos antidepressivos da ayahuasca, suas bases neurais e relação com a experiência psicodélica*. 2017. 196f. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/24156>. Acesso em: 19 abr. 2025.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, [s. l.], v. 287, p. 1433–1438, 2000.

GALVÃO-COELHO, N. L. et al. Classic serotonergic psychedelics for mood and depressive symptoms: a meta-analysis of mood disorder patients and healthy participants. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 238, n. 2, p. 341–354, 2021. Disponível em: Acesso em: 16 de abr. 2022.

GLYNOS, N. G.; HUELS, E. R.; NELSON, A.; KIM, Y.; KENNEDY, R. T.; MASHOUR, G. A.; PAL, D. *Neurochemical and neurophysiological effects of intravenous administration of N,N-dimethyltryptamine in rats*. **bioRxiv**, 22 abr. 2024. Preprint. DOI: **10.1101/2024.04.19.589047**.

GONÇALVES, R. V. et al. Neurociência dos psicodélicos: fundamentos bioquímicos, segurança e indicações emergentes em psiquiatria. **Contribuciones a las Ciencias Sociales**, [S.l.], v. 18, n. 5, e18047, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.55905/revconv.18n.5-295>. Acesso em: 19 abr. 2025.

GU, Y.; JANOSCHKA, S.; GE, S. Neurogenesis and hippocampal plasticity in adult brain. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, [s. l.], v. 15, p. 31–48, 2012. Disponível em: Acesso em: 15 de abr. 2022.

IONESCU, D. F. et al. Rapid and Sustained Reductions in Current Suicidal Ideation Following Repeated Doses of Intravenous Ketamine: Secondary Analysis of an Open-Label Study. **The Journal of clinical psychiatry**, [s. l.], v. 77, n. 6, p. e719–e725, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27232360/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.

JIN, X. The role of neurogenesis during development and in the adult brain. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 2291–2299, 2016. Disponível em: Acesso em: 15 de abr. 2022.

KEMPERMANN, G. et al. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 25–30, 2018a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29681514/>. Acesso em: 15 de abr. 2022.

KRUPITSKY, E. et al. Ketamine psychotherapy for heroin addiction: immediate effects and two-year follow-up. **Journal of substance abuse treatment**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 273–283, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12495789/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.

13

LIMA, O. G. Observações sobre o “Vinho da Jurema” utilizado pelos índios Pancarú de Tacaratu (Pernambuco). **Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, 4, 45-86., [s. l.], v. 4, p. 45–86, 1946.

LY, C. et al. Psychedelics Promote Structural and Functional Neural Plasticity. **Cell reports**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 3170–3182, 2018a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29898390/>. Acesso em: 15 de abr. 2022.

LY, C. et al. Psychedelics Promote Structural and Functional Neural Plasticity. **Cell reports**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 3170–3182, 2018b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29898390/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.

- MALACA, S. et al. Toxicology and Analysis of Psychoactive Tryptamines. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 23, p. 1–38, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33291798/>. Acesso em: 15 de abr. 2022.
- MANSKE, R. H. F. A SYNTHESIS OF THE METHYLTRYPTAMINES AND SOME DERIVATIVES. **Canadian Journal of Research**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 592–600, 1931. Disponível em: Acesso em: 15 de abr. 2022.
- MICHIELIN, F.; BORGES, J. C. Neurospheres and the advances on neural stem cell research. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 1–15, 2020.
- MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 16, p. 22–34, 2016.
- MING, G.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, [s. l.], v. 70, p. 687–702, 2011.
- MORALES-GARCIA, J. A. et al. N,N-dimethyltryptamine compound found in the hallucinogenic tea ayahuasca, regulates adult neurogenesis in vitro and in vivo. **Translational Psychiatry**, 2020 10:1, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41398-020-01011-0>. Acesso em: 11 de jul. 2021.
- MORRIS, G.; BRUTON, S. The mitochondrial Sigma-1 receptor: emerging neuroprotective roles. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 54, p. 50–60, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- MU, Y.; GAGE, F. H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer’s disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, art. 85, 2011.
- NICHOLS, D. E.; JOHNSON, M. W.; NICHOLS, C. D. Psychedelics as Medicines: An Emerging New Paradigm. **Clinical pharmacology and therapeutics**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 209–219, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28019026/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.
- OLIVEIRA-LIMA, A. J. et al. Serotonergic hallucinogens, neurotoxicity and oxidative stress: insights from recent research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 110, p. 110–125, 2021.
- OTT, J. Pharmacology of bufotenine: a brief review. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 33, n. 3, p. 273–281, 2001.
- PALHANO-FONTES, F. et al. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: A randomized placebo-controlled trial. **Psychological Medicine**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 655–663, 2019. Disponível em: Acesso em: 16 de abr. 2022.

PARK, S. C. Neurogenesis and antidepressant action. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], 2019. Disponível em: Acesso em: 15 de abr. 2022.

PARK, T. I.-H.; SMYTH, L. C. D.; AALDERINK, M.; WOOLF, Z. R.; RUSTENHOVEN, J.; LEE, K.; JANSSON, D.; SMITH, A.; FENG, S.; CORREIA, J.; HEPPNER, P.; SCHWEDER, P.; MEE, E.; DRAGUNOW, M. Routine culture and study of adult human brain cells from neurosurgical specimens. *Nature Protocols*, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 190-221, fev. 2022. DOI: 10.1038/s41596-021-00637-8.

PERERA, T.D. et al. Necessity of Hippocampal Neurogenesis for the Therapeutic Action of Antidepressants in Adult Nonhuman Primates. **Plos One**, v. 6, n.4, e17600, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017600>. Acesso em: 10 abr. 2025.

PHI, J. H.; PARK, S.-H.; KIM, S.-K.; PAEK, S. H.; KIM, J. H.; LEE, Y. J.; CHO, B.-K.; PARK, C.-K.; LEE, D.-H.; WANG, K.-C. **Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway**. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 32, n. 1, p. 103–112, 2008. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31812f6ba6.

PHILLIPS, J. L. et al. Single and repeated ketamine infusions for reduction of suicidal ideation in treatment-resistant depression. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 606–612, 2020. Disponível em: Acesso em: 16 de abr. 2022.

RUCKER, J. J. H. et al. Psychedelics in the treatment of unipolar mood disorders: a systematic review. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 1220–1229, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27856684/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.

14

RUSH, A. J. et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR\*D report. **The American journal of psychiatry**, [s. l.], v. 163, n. 11, p. 1905–1917, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17074942/>. Acesso em: 15 de abr. 2022.

SAMORINI, G. *DMT and its homologues: pharmacological and psychopharmacological studies (1956–1963)*.

Disponível em: [https://www.samorini.it/doc1/alt\\_aut/sz/szara-dmt-and-homologues.pdf](https://www.samorini.it/doc1/alt_aut/sz/szara-dmt-and-homologues.pdf)

SEKI, T. Understanding the Real State of Human Adult Hippocampal Neurogenesis From Studies of Rodents and Non-human Primates. **Front. Neurosci**, v. 14, n. 839, 2020. Disponível em: 10.3389/fnins.2020.00839. Acesso em: 10 abr. 2025.

SHIMMA, S. *et al.* Molecular characterization of serotonin-related tryptamines in biological systems. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1–10, 2020.

SZABO, A. et al. The endogenous hallucinogen and trace amine N,N-dimethyltryptamine (DMT) displays potent protective effects against hypoxia via sigma-1 receptor activation in human primary iPSC-derived cortical neurons and microglia-like immune cells. **Frontiers in Neuroscience**, [S.l.], v. 10, 13 set. 2016. Seção: Neuroparmacology. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00423>. Acesso em: 19 abr. 2025.

TIMMERMAN, C. et al. DMT Models the Near-Death Experience. **Frontiers in psychology**, [s. l.], v. 9, n. AUG, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30174629/>. Acesso em: 14 de abr. 2022.

WHITEFORD, H. A. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 382, n. 9904, p. 1575–1586, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23993280/>. Acesso em: 15 de abr. 2022.

ZARATE, C. A. et al. Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: a randomized controlled add-on trial. **Biological psychiatry**, [s. l.], v. 71, n. 11, p. 939–946, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22297150/>. Acesso em: 16 de abr. 2022.

ZHANG, R. et al. Neurogenesis in primates versus rodents and the value of non-human primate models. **National Science Review**, v.10, n.11, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwad248>. Acesso em 10 abr. 2025.

ZHANG, M.; SONG, T.; YANG, L.; CHEN, R.; WU, L.; YANG, Z.; FANG, J. **Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients**. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 27, p. 85, 2008. DOI: 10.1186/1756-9966-27-85.

#### APENDICE 1 – TABELA BRUTA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA NO GRAPH PAD PRISM

| Dia | Concentração de DMT | Poço | % 100-200 µm | % 200-300 µm | % 300-400 µm | % 400-500 µm | % 500-600 µm | % > 600 µm |
|-----|---------------------|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| 2   | Controle            | 1    | 84,2         | 15,8         | 0            | 0            | 0            | 0          |
| 2   | Controle            | 2    | 86,7         | 13,3         | 0            | 0            | 0            | 0          |
| 2   | Controle            | 3    | 81,82        | 18,18        | 0            | 0            | 0            | 0          |
| 2   | Controle            | 4    | 83,33        | 12,5         | 4,17         | 0            | 0            | 0          |
| 2   | Controle            | 5    | 86,96        | 13,04        | 0            | 0            | 0            | 0          |
| 2   | Controle+metanol    | 1    | 82,61        | 17,39        | 0            | 0            | 0            | 0          |
| 2   | Controle+metanol    | 2    | 82,61        | 13,04        | 0            | 4,35         | 0            | 0          |
| 2   | Controle+metanol    | 3    | 77,78        | 11,11        | 11,11        | 0            | 0            | 0          |
| 2   | Controle+metanol    | 4    | 78,94        | 15,78        | 0            | 0            | 0            | 5,28       |
| 2   | Controle+metanol    | 5    | 80,76        | 19,24        | 0            | 0            | 0            | 0          |



|   |          |   |       |       |       |       |   |   |
|---|----------|---|-------|-------|-------|-------|---|---|
| 2 | 0,1 uM   | 1 | 64,29 | 28,57 | 7,14  | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 0,1 uM   | 2 | 89,65 | 10,35 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 0,1 uM   | 3 | 77,28 | 22,72 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 0,1 uM   | 4 | 86,95 | 8,69  | 4,36  | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 0,1 uM   | 5 | 86,95 | 13,05 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1 uM     | 1 | 72,73 | 27,27 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1 uM     | 2 | 85    | 5     | 5     | 5     | 0 | 0 |
| 2 | 1 uM     | 3 | 73,34 | 13,33 | 13,33 | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1 uM     | 4 | 75    | 25    | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1 uM     | 5 | 83,87 | 16,13 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 10 uM    | 1 | 86,36 | 9,09  | 4,55  | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 10 uM    | 2 | 90,47 | 9,53  | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 10 uM    | 3 | 87,5  | 6,25  | 6,25  | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 10 uM    | 4 | 90    | 10    | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 10 uM    | 5 | 73,34 | 23,33 | 3,33  | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 100 uM   | 1 | 73,33 | 20    | 6,67  | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 100 uM   | 2 | 78,58 | 7,14  | 14,28 | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 100 uM   | 3 | 78,95 | 21,05 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 100 uM   | 4 | 87,5  | 6,25  | 6,25  | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 100 uM   | 5 | 90    | 10    | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1000 uM  | 1 | 83,33 | 0     | 16,67 | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1000 uM  | 2 | 75,86 | 24,14 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1000 uM  | 3 | 73,07 | 26,93 | 0     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1000 uM  | 4 | 72    | 24    | 4     | 0     | 0 | 0 |
| 2 | 1000 uM  | 5 | 89,66 | 6,9   | 3,44  | 0     | 0 | 0 |
| 5 | Controle | 1 | 66,67 | 0     | 0     | 33,33 | 0 | 0 |

|   |                  |   |       |       |    |       |       |       |
|---|------------------|---|-------|-------|----|-------|-------|-------|
| 5 | Controle         | 2 | 0     | 0     | 0  | 100   | 0     | 0     |
| 5 | Controle         | 3 | 50    | 0     | 0  | 0     | 50    | 0     |
| 5 | Controle         | 4 | 0     | 0     | 0  | 100   | 0     | 0     |
| 5 | Controle         | 5 | 0     | 0     | 0  | 0     | 100   | 0     |
| 5 | Controle+metanol | 1 | 75    | 0     | 0  | 0     | 25    | 0     |
| 5 | Controle+metanol | 2 | 66,67 | 0     | 0  | 0     | 0     | 33,33 |
| 5 | Controle+metanol | 3 | 66,67 | 0     | 0  | 0     | 33,33 | 0     |
| 5 | Controle+metanol | 4 | 80    | 10    | 0  | 0     | 10    | 0     |
| 5 | Controle+metanol | 5 | 50    | 0     | 25 | 0     | 25    | 0     |
| 5 | 0,1 uM           | 1 | 33,33 | 33,33 | 0  | 33,34 | 0     | 0     |
| 5 | 0,1 uM           | 2 | 0     | 0     | 0  | 0     | 100   | 0     |
| 5 | 0,1 uM           | 3 | 75    | 0     | 0  | 0     | 25    | 0     |
| 5 | 0,1 uM           | 4 | 75    | 0     | 0  | 0     | 25    | 0     |
| 5 | 0,1 uM           | 5 | 50    | 25    | 0  | 25    | 0     | 0     |
| 5 | 1 uM             | 1 | 50    | 0     | 0  | 50    | 0     | 0     |
| 5 | 1 uM             | 2 | 0     | 0     | 0  | 0     | 100   | 0     |
| 5 | 1 uM             | 3 | 0     | 0     | 0  | 0     | 100   | 0     |
| 5 | 1 uM             | 4 | 0     | 0     | 0  | 0     | 100   | 0     |
| 5 | 1 uM             | 5 | 0     | 0     | 0  | 0     | 0     | 100   |
| 5 | 10 uM            | 1 | 0     | 0     | 50 | 50    | 0     | 0     |
| 5 | 10 uM            | 2 | 50    | 0     | 0  | 0     | 50    | 0     |
| 5 | 10 uM            | 3 | 50    | 0     | 0  | 50    | 0     | 0     |
| 5 | 10 uM            | 4 | 0     | 0     | 0  | 0     | 100   | 0     |
| 5 | 10 uM            | 5 | 50    | 0     | 0  | 0     | 50    | 0     |

|   |                  |   |       |    |    |     |       |       |
|---|------------------|---|-------|----|----|-----|-------|-------|
| 5 | 100 uM           | 1 | 0     | 0  | 0  | 0   | 100   | 0     |
| 5 | 100 uM           | 2 | 50    | 0  | 0  | 0   | 50    | 0     |
| 5 | 100 uM           | 3 | 75    | 0  | 0  | 0   | 25    | 0     |
| 5 | 100 uM           | 4 | 0     | 0  | 0  | 0   | 100   | 0     |
| 5 | 100 uM           | 5 | 0     | 50 | 0  | 0   | 50    | 0     |
| 5 | 1000 uM          | 1 | 80    | 0  | 0  | 0   | 0     | 20    |
| 5 | 1000 uM          | 2 | 80    | 0  | 0  | 0   | 0     | 20    |
| 5 | 1000 uM          | 3 | 66,67 | 0  | 0  | 0   | 0     | 33,33 |
| 5 | 1000 uM          | 4 | 80    | 0  | 0  | 0   | 0     | 20    |
| 5 | 1000 uM          | 5 | 66,67 | 0  | 0  | 0   | 0     | 33,33 |
| 7 | Controle         | 1 | 50    | 0  | 0  | 50  | 0     | 0     |
| 7 | Controle         | 2 | 0     | 0  | 0  | 100 | 0     | 0     |
| 7 | Controle         | 3 | 50    | 0  | 0  | 50  | 0     | 0     |
| 7 | Controle         | 4 | 50    | 0  | 0  | 50  | 0     | 0     |
| 7 | Controle         | 5 | 50    | 0  | 0  | 50  | 0     | 0     |
| 7 | Controle+metanol | 1 | 50    | 0  | 0  | 0   | 50    | 0     |
| 7 | Controle+metanol | 2 | 50    | 0  | 0  | 0   | 50    | 0     |
| 7 | Controle+metanol | 3 | 0     | 0  | 0  | 0   | 100   | 0     |
| 7 | Controle+metanol | 4 | 0     | 50 | 0  | 0   | 50    | 0     |
| 7 | Controle+metanol | 5 | 0     | 0  | 50 | 0   | 50    | 0     |
| 7 | 0,1 uM           | 1 | 0     | 50 | 0  | 50  | 0     | 0     |
| 7 | 0,1 uM           | 2 | 0     | 0  | 0  | 0   | 100   | 0     |
| 7 | 0,1 uM           | 3 | 50    | 0  | 0  | 50  | 0     | 0     |
| 7 | 0,1 uM           | 4 | 0     | 0  | 0  | 100 | 0     | 0     |
| 7 | 0,1 uM           | 5 | 0     | 0  | 50 | 50  | 0     | 0     |
| 7 | 1 uM             | 1 | 66,67 | 0  | 0  | 0   | 33,33 | 0     |
| 7 | 1 uM             | 2 | 0     | 0  | 0  | 0   | 100   | 0     |

|   |         |   |       |   |   |     |       |     |
|---|---------|---|-------|---|---|-----|-------|-----|
| 7 | 1 uM    | 3 | 0     | 0 | 0 | 0   | 100   | 0   |
| 7 | 1 uM    | 4 | 0     | 0 | 0 | 0   | 100   | 0   |
| 7 | 1 uM    | 5 | 0     | 0 | 0 | 0   | 100   | 0   |
| 7 | 10 uM   | 1 | 50    | 0 | 0 | 50  | 0     | 0   |
| 7 | 10 uM   | 2 | 80    | 0 | 0 | 0   | 20    | 0   |
| 7 | 10 uM   | 3 | 50    | 0 | 0 | 0   | 50    | 0   |
| 7 | 10 uM   | 4 | 50    | 0 | 0 | 50  | 0     | 0   |
| 7 | 10 uM   | 5 | 0     | 0 | 0 | 100 | 0     | 0   |
| 7 | 100 uM  | 1 | 0     | 0 | 0 | 0   | 100   | 0   |
| 7 | 100 uM  | 2 | 0     | 0 | 0 | 0   | 100   | 0   |
| 7 | 100 uM  | 3 | 66,67 | 0 | 0 | 0   | 33,33 | 0   |
| 7 | 100 uM  | 4 | 0     | 0 | 0 | 0   | 100   | 0   |
| 7 | 100 uM  | 5 | 0     | 0 | 0 | 0   | 100   | 0   |
| 7 | 1000 uM | 1 | 50    | 0 | 0 | 0   | 0     | 50  |
| 7 | 1000 uM | 2 | 0     | 0 | 0 | 0   | 0     | 100 |
| 7 | 1000 uM | 3 | 50    | 0 | 0 | 0   | 0     | 50  |
| 7 | 1000 uM | 4 | 50    | 0 | 0 | 0   | 0     | 50  |
| 7 | 1000 uM | 5 | 50    | 0 | 0 | 0   | 0     | 50  |